

SIMONE FELITTI

**Influência do estresse oxidativo ao DNA e da
expressão dos mediadores pró inflamatórios no
desenvolvimento do câncer de mama**

Bragança Paulista

2009

SIMONE FELITTI

**Influência do estresse oxidativo ao DNA e da
expressão dos mediadores pró inflamatórios do
câncer de mama**

ORIENTADOR

PROF. DR. MARCELO DE LIMA RIBEIRO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco (USF) para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Bragança Paulista

2009

ii

577.23
F359i

Felitti, Simone.

Influência do estresse oxidativo ao DNA e da expressão das citocinas pró inflamatórias no desenvolvimento do câncer de mama / Simone Felitti . -- Bragança Paulista, 2009.
59p.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação
Scripto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Marcelo de Lima Ribeiro.

1. Estresse oxidativo. 2. Inflamação. 3. Lesão de DNA.
4. Câncer de mama. I. Ribeiro, Marcelo de Lima. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de
Processamento Técnico da Universidade São Francisco

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Lima Ribeiro

Membros:

1. Prof. Dr. Marcelo de Lima Ribeiro.
 2. Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez.
 3. Prof. Dra. Carmen Silvia Passos Lima.
-

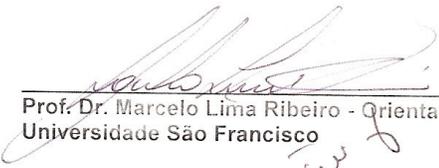
Suplentes:

1. Prof. Dra. Alessandra Gambero.
 2. Prof. Dr. José Pedrazzoli Jr.
-

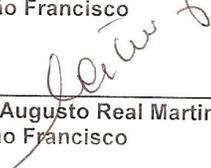
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco.

Data: 25/05/2009

FELITTI, Simone. “Influência do estresse oxidativo ao DNA e da expressão das citocinas pró inflamatórias no desenvolvimento do câncer de mama”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e cinco de Maio de 2009 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro - Orientadora e Presidente
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
Universidade São Francisco



Profa. Dra. Carmem Silvia Passos Lima
Universidade Estadual de Campinas

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS Rod. Gen. Milton Tavares de Lima, 1572 - CEP 13083-680 - Distrito de Barão Geraldo - Fone: (19)3754-3300
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 02031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036

Dedicatória

A todos aqueles que me ajudaram e entenderam esse momento.

AGRADECIMENTOS:

Ao Dr. Marcelo Ribeiro, meu orientador, por todo trabalho e paciência.

Reconhecendo que sem o mesmo nada disto seria possível.

Ao Dr. Olavo Pedroso pelo comprometimento comigo em datas e prazos e com as biópsias;

Ao Dr. Carim Yousef e Dra. Simone Galvão pelas biópsias;

Ao Dr. Felippo Campione por ceder material para armazenamento das biópsias, e seus funcionários que mesmo a noite de domingo me atendiam com cordialidade;

Aos técnicos de laboratório, as secretárias e todos aqueles que se importaram com meu trabalho e dentro de suas possibilidades me ajudaram a tornar este trabalho real.

Sumário

	PÁG.
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
LISTA DE TABELAS.....	3
LISTA DE FIGURAS.....	4
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5. CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS.....	57

**INFLUÊNCIA DO ESTRESSE OXIDATIVO AO DNA E DA EXPRESSÃO DOS MEDIADORES
PRÓ INFLAMATÓRIAS NO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE MAMA.**

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar, em biópsias de tecido mamário de pacientes com câncer de mama, a expressão gênica dos mediadores inflamatórios como *IL-1 β*, *IL-8*, *COX-2*, *TNF-α*; além da influência do estresse oxidativo ao DNA, isto porque trabalhos relatam aumento desses em neoplasia e provável envolvimento com a tumorigênese, como em câncer de cólon. Os resultados das análises da expressão gênica dos mediadores inflamatórios sugerem que ocorre aumento no tecido com presença de neoplasia ($p < 0,005$) em relação ao tecido normal, e também foi possível correlacionar uma elevação desta expressão quanto maior o grau de indiferenciação celular ($p < 0,005$). Os níveis de danos oxidativos ao DNA foram avaliados por meio do ensaio do cometa (*Single cell gel electrophoresis*). Nossos resultados indicam que as biópsias de tecido com câncer mamário apresentaram maiores níveis de danos ao DNA, quando comparados as biópsias com tecido mamário normal ($p < 0,001$). Esses resultados confirmam a presença dos mediadores inflamatórios estudados em tecido tumoral mamário e se correlacionam com literatura, mostram também que o método do ensaio cometa de dosagem de dano ao DNA é eficiente para análise de câncer de mama.

Palavras chaves:

Estresse oxidativo, inflamação, lesão DNA, câncer de mama.

ABSTRACT

This study has as main objective to evaluate the influences on the development of mammary cancer caused by the inflammatory markers *IL-1 β*, *IL-8*, *COX-2* and *TNF α*, and by cell's DNA under oxidation stress, by studying biopsy results of cancerous breast tissue; and it is influenced by researches that also investigating the possible link between the factors above and increase of neoplasia.

Following the high levels of inflammatory markers in tissue with neoplasia, which are higher and higher the more cellular indiferece, comparing to healthy tissue ($p < 0,005$), we can confirm in numbers the presence and quantity of the inflammatory process and its probable influence on the DNA damage and probable correlation to the origin of breast cancer.

The levels of DNA oxidation were studied by single cell gel electrophoresis, and our results show higher level of DNA damage when compared to those seen on biopsy of healthy normal tissue ($p < 0,001$).

Therefore, it is possible to confirm the presence of the mentioned markers in cancerous breast tissue and their relation to DNA, and also to confirme that the single cell gel eletrophoresis is an efficient method for the study of breast cancer.

KEY WORDS:

Oxidation stress, inflammation, DNA damage, breast cancer.

Lista de tabelas:

- 1- *Primers* utilizados para a PCR em tempo real.....pág. 31
- 2- Lesões de DNA identificadas em tecido mamário tumoral e normal.....pág. 36
- 3- Expressão dos genes IL-1 β , IL-8, COX-2 e TNF α em tecido mamário tumoral e normal pág. 38

Lista de figuras:

- 1- Imagem de resultado de teste cometa.....pág.29
- 2- Curvas de amplificação e dissociação dos genes de IL-1 β , IL-8, COX-2, TNF αpág.32

I - INTRODUÇÃO

I.1 Neoplasia de mama

I.1.1 Uma visão geral

O diagnóstico do câncer no mundo tem crescido com a melhora dos métodos diagnósticos. Em 2000, 100 milhões de pessoas receberam o diagnóstico da doença e 6 milhões morreram. No Brasil são 400 mil casos novos/ano e 125 mil mortes (Manual de Oncologia Clínica- UICC, 1998).

O câncer de mama tem-se tornado problema de saúde pública (*sic* Fundação Oncocentro de São Paulo, 1999) em países desenvolvidos e também em desenvolvimento. Dentre todos os novos, o câncer de mama tem tido acréscimo em sua taxa de diagnóstico, no Brasil estima-se (INCA 2006) 48.930 casos novos de câncer de mama, sendo a neoplasia que mais acomete as mulheres e a segunda mais incidente no mundo. Apesar das altas taxas de diagnóstico do câncer de mama estamos alcançando índices de sobrevida de 61% em 5 anos, isso graças as novas drogas quimioterápicas e as terapias alvo específicas que se desenvolveram por meio de estudos celulares, moleculares e gênicos (UICC- União Internacional de Controle de Câncer).

I.1.2 Fatores de risco

Os fatores de risco são multifatoriais e não determinantes. Dentre eles 15% estariam relacionadas com presença familiar e sua agregação familiar sugere haver genes (*BRCA1, BRCA2*) que determinem a susceptibilidade para a doença (Manual de Oncologia Clínica, 1998; Brentani et al., 2003; Forones,

2005). Vários estudos genéticos mostram que as condições benignas da mama, nas quais, a biópsia mostra hiperplasia associada com atipia do epitélio mamário, aumentaram o risco para desenvolvimento de um câncer subsequente (Manual de Oncologia Clínica, 1998; Ross e Pinho, 2003; Forones, 2005).

Em relação ao consumo de álcool, em seis estudos de coorte incluindo 322.647 mulheres seguidas por até onze anos e 4335 casos incidentes de câncer de mama invasivo, foi observado que o risco relativo crescia linearmente com o consumo de álcool, atingindo 1,41 para faixa de consumo entre 30 a 60 gramas de álcool por dia. O tipo de bebida alcoólica não teve influência significativa (Alexander et al., 1999; Forones, 2005).

Para o aleitamento materno, revisão sistemática de estudos caso-controle, seguida de metanálise, comparando a amamentação e o tempo total de aleitamento, encontrou-se pequena (0,95), porém significativa redução do risco de câncer de mama. Quanto ao uso de contracepção hormonal oral e terapia de reposição hormonal há observação a ser confirmada (Moalli et al., 1987; Romieu et al., 1990; Henderson et al., 1991; Forones, 2005).

A dieta influenciaria vários fatores de risco como idade de menarca e idade de menopausa. No entanto, até agora, os estudos epidemiológicos não mostraram relação consistente entre dieta e câncer de mama (Manual de Oncologia Clínica, 1998; Smith-Warner, 2001; Forones, 2005; Baer et al., 2005; Draper, 2006). O Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos recomenda baixa ingestão de carne e duas porções de frutas e três vegetais por dia.

Antioxidantes naturais de frutas e vegetais como ascorbato, tocoferol e carotenídeos sugerem ser as substâncias benéficas, como associação com fibras e diminuição de absorção e inibem a oxidação por atuarem por anti radicais livres (Block et al., 1992; Steinmetz e Potter,1992; Matsui et al., 2000; Starcevic et al., 2003; Lin e Pollard, 2004; Dehn et al., 2005) mas epidemiologicamente os dados não são consistentes e usá-los como prevenção não trouxeram benefícios (Vogelstein et al., 1989; Fraga et al., 1991).

O tabagismo é a mais importante causa global de câncer e prevenível. O tabagismo contribui para um terço dos casos de câncer (Shacter et al., 1988). O mecanismo da carcinogênese pelo tabaco não está totalmente esclarecido, o tabaco causa estresse oxidativo, pois o cigarro contém uma variedade de substâncias mutagênicas como óxido de nitrogênio que depleta antioxidantes corpóreos (Schechtman et al., 1991; Duthie et al., 1991; Bui et al., 1991).

Leucócitos e outros fagócitos do processo inflamatório combatem infecções celulares por bactérias, parasitas e vírus com óxido de nitrogênio e superóxido que em reação transformam-se em peroxidonitrito, hidrogênio peróxido e hipoclorito que são agentes oxidativos mutagênicos. Estes oxidantes protegem os humanos da morte imediata por infecção mas causam lesão oxidativa de DNA, mutação e morte celular com aumento de taxa de duplicação celular compensatória contribuindo para o mecanismo de carcinogênese (Yamashina et al.,1986; Shacter et al.,1988). Como ocorre na hepatite viral B e C que é a maior causa de inflamação crônica do fígado e hepatocarcinoma. O vírus do Papiloma humano é o maior fator de risco para câncer de colo de útero por mecanismos inflamatórios (zur Hausen e de Villiers, 1994).

Níveis de hormônios sexuais estão envolvidos com a carcinogênese por induzir divisão celular. Exposição a níveis elevados de estrógeno nas células endometriais induz a proliferação e aparecimento de câncer de endométrio que tem alta sensibilidade ao estrógeno (Jick et al., 1980). No câncer de ovário a associação com níveis hormonais é relatado como fator de aumento de divisão de células de epitélio de superfície, com a gestação reduz-se o número de ovulações, divisão celular e o risco (De Vitta et al., 2005); anticoncepcional após cinco anos de uso traz decréscimo de 50% no risco de câncer de ovário (Hankinson et al.,1992). Fatores que fazem aumento acumulativo a exposição ao estrógeno como menarca precoce, menopausa tardia e prolongado período de terapia de reposição hormonal pós menopausa aumentam o risco de câncer de mama (De Vitta et al., 2005; Harris et al., 1992).

O fator ocupacional foi estudado para população que trabalha com indústria química e em cozinha, pela exposição à aminas específicas aromáticas, petroquímicos e metais pesados e todos os dados foram controversos por outras interferências do meio e de cada indivíduo (International Agency for Research on Cancer, 1994).

1.1.3 Biologia celular e molecular do câncer de mama

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástases) para outras regiões do corpo. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de tecido de células do corpo e se diferenciam por velocidade de multiplicação das células e

a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (metástases).(De Vitta et al., 2005)

Uma célula normal pode sofrer alterações no DNA dos genes. É o que chamamos de mutação genética. As células cujo material genético foi alterado passam a receber instruções erradas para as suas atividades. As alterações podem ocorrer em genes especiais, denominados protooncogenes, que a princípio são inativos em células normais. (De Vitta et al., 2005; INCA- Instituto Nacional do Câncer, 2008).

Quando ativados, os protooncogenes transformam-se em oncogenes, responsáveis pela malignização (cancerização) das células normais. Essas células diferentes são denominadas cancerosas e passam então a se comportar de forma anormal. Multiplicam-se de maneira desordenada e geralmente, têm capacidade para formar novos vasos sanguíneos que as nutrirão e manterão as atividades de crescimento descontrolado. O acúmulo dessas células forma os tumores malignos.(De Vitta et al., 2005; INCA- Instituto Nacional do Câncer, 2008).

Adquirem a capacidade de se desprender do tumor e de migrar. Inicialmente em tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através desses, disseminar-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases. (De Vitta et al., 2005; INCA- Instituto Nacional do Câncer, 2008).

O processo de carcinogênese, ou de formação do câncer, em geral se dá lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível. Esse processo passa por vários estágios antes

de chegar ao tumor (De Vitta et al., 2005; INCA- Instituto Nacional do Câncer, 2008).

A iniciação é o primeiro estágio da carcinogênese. Nele as células sofrem o efeito dos agentes cancerígenos que promovem a mutação (modificação em alguns de seus genes). (De Vitta et al., 2005; INCA- Instituto Nacional do Câncer, 2008).

A promoção é o segundo estágio da carcinogênese. Nele, as células geneticamente alteradas, ou seja, iniciadas, sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. (De Vitta et al., 2005; INCA- Instituto Nacional do Câncer, 2008).

Progressão é o terceiro e último estágio e se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesse estágio o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença. (De Vitta et al., 2005; INCA- Instituto Nacional do Câncer, 2008).

Para o combate do câncer o organismo se defende através de mecanismos de defesa naturais que o protegem das agressões impostas por diferentes agentes que entram em contato com suas diferentes estruturas (INCA- Instituto Nacional do Câncer, 2008).

A integridade do sistema imunológico, a capacidade de reparo do DNA danificado por agentes cancerígenos e a ação de enzimas responsáveis pela transformação e eliminação de substâncias cancerígenas produzidas pelo corpo são exemplos de mecanismos de defesa. Esses mecanismos, próprios do organismo, são na maioria pré determinados geneticamente o que explica

ocorrência familiar de mesma neoplasia ou não aparecimento em indivíduos expostos aos mesmos carcinógenos (INCA- Instituto Nacional do Câncer, 2008).

O sistema imunológico desempenha um importante papel nesse mecanismo de defesa. Dentro deste sistema os linfócitos desempenham um papel muito importante relacionado às defesas no processo de carcinogênese (INCA- Instituto Nacional do Câncer, 2008).

Cabe aos linfócitos a atividade de atacar as células do corpo infectadas por vírus oncogênicos ou as células em transformação maligna, bem como de secretar substâncias chamadas de linfocinas. As linfocinas regulam o crescimento e o amadurecimento de outras células e do próprio sistema imune. Acredita-se que distúrbios em sua produção ou em sua estrutura propiciem formação de câncer (INCA- Instituto Nacional do Câncer, 2008).

A compreensão dos exatos mecanismos de ação do sistema imunológico muito contribuirá para a elucidação de diversos pontos importantes para o entendimento da carcinogênese e, portanto, para novas estratégias de tratamento e prevenção do câncer, como comparação de níveis de citocinas em mulheres com câncer de mama ou não. Estudos de carcinogênese indicam uma importante ligação entre lesão de DNA por oxidação endógena e processo de reparo e defesa (imunológico/ inflamatório). Também a divisão celular e fatores que a influenciam como hormônios, crescimento, citotoxicidade e inflamação podem determinar lesões de mutação no DNA (Henderson et al., 1991).

Mutações e lesões de DNA são de grande importância na carcinogênese.

Essas lesões internas de DNA ocorrem com frequência e por mecanismos de reparo internos celulares não trazem expressão gênica, mas quando associada a lesões induzidas de forma exógena por interferência do meio podem trazer mutações de expressão gênica (Vogelstein et al., 1989).

A divisão celular é um passo crítico na mutagênese porque quando a célula se divide uma lesão de DNA pode ocasionar mutação, deleção ou translocação (Ames et al., 1990; Cohen et al., 1991; Ames et al., 1993).

Os pontos de checagem do ciclo celular previnem divisão de células com muitas lesões de DNA e inibem também a formação de mutação, mas não são perfeitos. A sinalização de lesão ocorre por perda da sequência de transcrição do RNAm (Hanawalt e Mellon, 1993; Selby e Sancar, 1993). Esta presença da lesão induz reparo do DNA no ponto de checagem do ciclo celular controlado pela proteína p53, este ponto de checagem ocorre na fase G1-S do ciclo celular associado com replicação e reparo de DNA pela proteína RPA (Dutta et al., 1993; Li e Botchan, 1993). Esta proteína bloqueia o ciclo celular e previne a passagem de lesão para mutação e em associação, se o nível de lesão de DNA for muito alto, a proteína *p53* inicia a indução do processo de apoptose.

Na avaliação dos mecanismos a progressão maligna do câncer de mama envolve que lesões benignas e carcinomas *in situ* passem a estágios iniciais e depois avançados e depois metastáticos. Fundamentalmente a progressão de malignização são processos que envolvem regulação de transição do epitélio, hipóxia, desmoplasia e angiogênese (Moalli et al., 1987; Columbano et al., 1990; Cunningham et al., 1994).

Em estudo de câncer de mama (Semenza, 2002) vê-se que na presença de hipóxia, na falta de oxigênio as células epiteliais proliferam além de uma camada normal, também uma camada de pseudo-estratificação ocupando a estrutura ductal ou lobular. Uma resposta de células normais semelhante para a hipóxia seria o gatilho para o estresse induzido pelo fator de necrose tumoral α . Este fator controla o mecanismo de adaptação para hipóxia através da regulação de glicólise, angiogênese (VEGF fator de crescimento angiogênese) e proliferação e sobrevivência celular, pela transcrição de IGF-2 (fator de crescimento insulina *like*) e c-met. Para função de c-met é necessária quebra de ligação covalente ligando HGF (fator de crescimento epitelial e angiogênese). Isto pode envolver aumento de proteases (De Vitta et al., 2005) e conseqüente destruição celular.

Como os fatores de crescimento estão expressos no início do desenvolvimento do câncer de mama invasivo, o estroma torna-se mais fibrótico (desmoplasia) expressando proteínas de matriz extracelular como tenascin C e versican. A angiogênese é uma resposta a este desenvolvimento de lesão contribuindo para progressão em direção a tumorigênese (De Vitta et al., 2005).

O desenvolvimento do câncer envolve supressão de apoptose, desregulação de sinais de fator de crescimento, ativação de oncogenes, desregulação de fator inibidor de crescimento e perda de genes supressor de tumor (Moalli et al., 1987; Romieu et al., 1990; Ellis et al., 1998).

O dano genético é mínimo em lesões benignas da mama ou pré maligna atipia ductal e lobular, a expressão de subunidades de DNA duplicadas

catalizadas por associação a enzima telomerase sugerem que a supressão de novas células pode ocorrer na doença inicial (Kolquist et al., 1998). Altos níveis de telomerase e de subunidades desta enzima (Htert), ambas e três oncogenes SV40T, Sv40t e c-Ras mutante convertem células mamárias epiteliais em câncer (Selby e Sancar, 1993), também tendo a associação de *c-MYC*.

Os próximos passos da tumorigênese envolvem amplificação gênica espontânea, perda de heterozigose, metilação, mutação ou baixa expressão de *BRCA1/2* ou gene *P53*, desregulação de gene *c-MYC* ou *ciclina D1*, e mutação trazendo de resultado hiper ativação de ciclo celular, defeitos de pontos de checagem de ciclo celular e defeitos no mecanismo de apoptose (Li e Botchan, 1993; O' Connel et al., 1998; Stewart e Pietsenpol, 1999)

Estudos mostram (Stewart e Pietsenpol, 1999) que deficiências em ponto de checagem de ciclo celular são fundamentais para acúmulo de defeitos genéticos em células do epitélio mamário que levam ao câncer. Nas quatro transições celulares G1 – S, G2 – M, formação do fuso e função e separação de células filhas pós metáfase são importantes pontos de vulnerabilidade para dano genético. (De Vitta et al., 2005)

Nas alterações gênicas que se apresentam no câncer de mama 5% à 10% são familiares e estão envolvidos com *BRCA1/2* (Stewart e Pietsenpol, 1999; De Michele e Weber, 2000); as demais estão envolvidas parcialmente com predisposição genética e ocasional onde um ponto de mutação possa ser herdado em um locus de alelo gênico com susceptibilidade e perda de heterozigose ou a alteração gênica pode ocorrer em um alelo de um locus mais

tardamente na vida, levando a instabilidade gênica e câncer (De Vitta et al., 2005).

As mutações afetam mecanismos de reparo de DNA e apoptose em *BRCA1*, *BRCA2*, *P53*, *PTEN* (Fan et al., 1999; De Michele e Weber, 2000). Estes genes por perda de alelo em tecido neoplásico (Moinfair et al., 2000); ou por presença de mutação *BRCA1/2* que por recombinação homólogo diminui o mecanismo de reparo por perda e quebra de dupla hélice de DNA, leva a instabilidade gênica (Rafi et al., 2000).

No câncer metastático temos novo fenótipo de apoptose e diferente resposta à terapêutica de tratamento. Tem alterações fenotípicas em secreção de fator de crescimento para angiogênese e expansão metastática (Dickson e Lippman, 2000; Troyer e Lee, 2001), por mutação gênica, onde ocorre a perda de estrutura de proteína E-caderina, que promove estruturação celular, através de mecanismo de metilação e alteração gênica com formação de β -caderina e fator de transcrição oncogênico, aumentando motilidade e invasão celular (Christofori e Semb, 1999; Bouzahzah et al., 2001; Feltes et al., 2002; Oesterreich et al., 2003; De Vitta et al., 2005). No processo de invasão celular em matriz óssea estavam envolvidos interleucina-11, metaloproteinase de matriz 1 (MMP-1) e quimiorreceptores de tecido. (Kang et al., 2003)

Os fatores de crescimento de fibroblasto: *FGF1* e *FGF2* estão localizados em mioepitélio e células epiteliais. *FGF2* é relacionado com imortalização de células mamárias normais e *FGF1* está localizado primariamente em macrófagos e pode contribuir com processo inflamatório e angiogênese. O fator *TGF*, que pertence a outra família de fator de crescimento, está relacionado com

imunossupressão através de subproduto *TGF-β* que se liga a receptores celulares tumorais e induz processo de fosforilação, promovendo invasão. (Dickson e Lippman, 2000).

1.1.4 Inflamação e câncer de mama

Produtos da oxidação interna do metabolismo normal causam extenso dano ao DNA, proteínas e lipídios. Constata-se que esta lesão é a maior contribuição para doenças degenerativas, câncer, doenças cardíacas, catarata e disfunção cerebral. Antioxidantes de defesa incluem o ácido ascórbico, tocoferols e carotenóides (Gardner et al., 1988).

A oxidação do DNA ocorre, pois as defesas antioxidantes não são perfeitas. O número de eventos oxidativos ao DNA por dia por célula é estimado em 100.000 em ratos e 10 vezes mais em humanos. As enzimas de reparo removem a maioria mas não todas, e as lesões são formadas. Lesões oxidativas em DNA se acumulam com a idade, em ratos após dois anos tem-se um milhão de lesões por célula (Branda et al., 1993; Yang et al., 2001).

No DNA mitocondrial estes níveis de oxidação são dez vezes maiores por estar a organela diretamente relacionada com processos oxidativos de fosforilação do metabolismo celular (Lingle et al., 1978; Richter et al., 1998). A defesa celular ocorre com constante substituição de mitocôndrias para não ocorrer dano acumulativo. A oxidação lesa tanto as proteínas como o DNA e a proteção da enzima proteolítica que hidrolisa proteína oxidada não é suficiente

para prevenir o acúmulo associado à idade de lesão de oxidação protéica (Stadtman, 1992; Christofori e Semb, 1999).

No processo inflamatório tem-se a presença de vários mediadores químicos que tem papel de catalisar reações e promover o processo inflamatório, que consiste em aumento do aporte sanguíneo local, maior número de leucócitos, e por estes maior liberação de mediadores com conseqüente aumento de volume local (edema), aumento de fluxo sanguíneo e temperatura (calor), mudança do padrão e coloração do tecido com aumento de fluxo sanguíneo (rubor) e aumento de sensibilidade neural e infiltrado inflamatório.

Uma das famílias de mediadoras são as prostaglandinas e entre elas uma de interesse nos últimos anos é a cicloxigenase que está envolvida na gênese do câncer, pela identificação e formas *COX-2* nas lesões pré malignas de câncer colorretal (Herschman,1996; Williams et al., 1999; Dannenberg et al., 2001).

A super expressão de *COX-2* está detectada em 40% de neoplasias de mama bem como em carcinoma ductal *in situ* . Análises epidemiológicas sugerem um efeito protetor de drogas inibidoras da *COX-2* para câncer de cólon e mama. A *COX-2* está identificada em vários tecidos como placenta, cérebro e rim, e todo local com processo inflamatório em curso. Este ocorre com a estimulação de enzimas *COX* que catalisam a conversão do ácido araquidônico para prostaglandinas *PGG2* e subseqüente *PGH2* que atuam com substratos de isomerases que individualmente se responsabilizam pela geração de outros produtos eicosanóides como *PGE2*, prostaciclina (*PGI2*) e tromboxano (Herschman,1996; Williams et al., 1999; Dannenberg et al., 2001).

Os derivados da *COX* contribuem para funções do organismo humano, incluindo hemostasia, agregação plaquetária, função gástrica e intestinal e processos reprodutivos. Eicosanóides são os mediadores chaves de dor, febre e inflamação (Dannenberg et al., 2001).

A inibição errônea da via normal de *COX* com subsequente produção de PG inicia a neoplasia (Herschman, 1996; Williams et al., 1999; Dannenberg et al., 2001). O primeiro ponto de indicação da afirmação é a detecção de níveis elevados de *PG* nas amostras de neoplasia e em sequência vê-se elevação dos níveis de *COX-2*, em 40% das amostras de câncer de mama, sugerindo que esteja envolvida na tumorigênese (Soslow et al., 2000; Spizzo et al., 2000; Ristimaki et al., 2002; Watanabe et al., 2003; Wulfing et al., 2003; Yoshimura et al., 2003; Boland et al., 2004). *COX-1* está expressa no tecido mamário e *COX-2* aumentada no tecido tumoral (Soslow et al., 2000; Spizzo et al., 2000; Watanabe et al., 2003; Wulfing et al., 2003; Yoshimura et al., 2003), reafirmando seu envolvimento na tumorigênese e está sendo relacionada pela sua superexpressão com parâmetros de agressividade tumoral, incluindo infiltração, alto grau histológico, alta taxa de proliferação, tumor de receptor hormonal negativo, e super expressão de *HER2* (receptor celular de transmissão de sinal de duplicação) (Ristimaki et al., 2002; Subbaramaiah et al., 2002; Wulfing et al., 2003; Boland et al., 2004). Ristimaki e colaboradores também reafirmam sua superexpressão como parâmetros de agressividade quando identificaram a inversa relação entre níveis de expressão de *COX-2* e intervalo livre de doença que também pode ser explicada *in vitro* pela correlação de níveis de oncogene *HER2/neu* e *COX-2* em tecido tumoral

mamário (Vadlamudi et al., 1999; Ristimaki et al., 2002; Subbaramaiah et al., 2002; Wulfing et al., 2003; Boland et al., 2004).

Ambos HER2/neu e *COX-2* estão aumentados com grande frequência 50%-60% em carcinoma ductal *in situ*, que é a forma inicial e precursora do câncer invasivo de mama, sugerindo a correlação entre eles e a indução do processo de doença (Soslow et al., 2000; Subbaramaiah et al., 2002; Watanabe et al., 2003; Shim et al., 2003; Tan et al., 2004; Boland et al., 2004).

Modelos experimentais de câncer de mama em ratos com ou sem uso de inibidores de prostaglandinas mostraram que em animais que usaram inibidores tiveram taxas de implante tumoral menor e tumores com *status* hormonal positivo, pois a *COX* estimula a transcrição do gene (*CYP19*) que decodifica o citocromo *P450* que biotransforma os hormônios (Brueggemeier et al., 1999).

Segundo Lithgow e Covington, 2005 o processo inflamatório promoveria mutações em DNA e estimularia desenvolvimento do câncer de mama. Adicionalmente, Radisky et al. (2007), em cultura de células, identificaram associação de fibroblastos promovendo progressão através da estimulação do processo inflamatório e indução de remodelamento de proteases de matriz celular.

Em relação à associação de macrófagos (Lin e Pollard, 2004) que são recrutados pelo processo inflamatório em qualquer tecido, sadio ou não; vê-se que o seu aumento mediado e induzido por proteína 1 (*CSF-1*, receptor de citocina) através do gene *CSF*, traz remodelação de proteases de matriz com hiperproliferação, progressão de fibrose (desmoplasia) e invasão.

Dentro do processo inflamatório Starcevic et al. (2003) mostraram em culturas de células com oxidação por H_2O_2 que há um aumento nos níveis de proteínas relacionadas com oxidação enzimática incluindo catalases, superoxide dismutase e o decréscimo nos níveis da *p53*.

Na oxidação pelo radical $\bullet OH$ (Malins et al., 1993; Anderson et al., 2006) presente no processo inflamatório vê-se que causa troca em DNA (adenina/ guanina) e impede transcrição e ação da enzima polimerase por redução de expressão gênica. Isto ocorre (Matsui et al., 2000) por aumento de catecolaminas e de 8-hidroxi-guanosina e diminuição de *GTSP1* (catechol-methyltransferase) através de ação direta do OH.

Em testes de oxidação por óxido nítrico (Hofseth et al., 2003) e RH1 (Dehn et al., 2005) vemos que ambos trazem mutação em DNA e gene ataxia-telangectasia aumentando níveis de *p53* e sua transcrição mas diminuindo sua ação, e acumulando células em fase G2 no ponto de checagem.

Estudos indicam que essas citocinas, anteriormente citadas, são moléculas de sinalização e medeiam e regulam o processo inflamatório, imunológico e hematopoiético (Thomson e Lotze, 2003). Em pessoas com câncer a resposta imunológica para com as células tumorais contribuem para um estado pró inflamatório (Coussens e Werb, 2002).

Interleucina-6 é um fator de crescimento epitelial autócrino e parácrino em vários tipos tumorais, inclusive o de mama (Balkwill e Mantovani, 2001; Ben-Baruch, 2006). Interleucina-6 estimula crescimento de células tumorais e contribui para recorrência e metástases de câncer de mama (Leek e Harris, 2002). Elevados níveis circulatórios de citocinas inflamatórias, incluindo *IL-6*, *IL-*

IL-1β (Bachelot et al., 2003), *IL-8* (Benoy et al., 2004) e *IL-18* (Ben-Baruch, 2003) podem ser associados com menor sobrevida em pessoas com câncer, e *IL-6* e *IL-8* podem ser relacionadas com estágio de doença e progressão no câncer de mama (Rao et al., 2006).

Altos níveis de *IL-6* podem ser considerados de pior prognóstico na população geral com câncer (Zhang e Adachi, 1999).

A *IL-1β* e *TNF-α* atuam sobre endotélio, leucócitos e fibroblastos induzindo ativação endotelial com síntese de moléculas de adesão, outras citocinas e fatores de crescimento. A *IL-1β* apresenta importantes efeitos sistêmicos e locais como febre (pirógeno endógeno), estimula a proliferação de linfócitos T e B, a expressão de receptores de para IL-2, e de moléculas de adesão pelos neutrófilos e células endoteliais, atua como fator quimiotático e aumenta a atividade citotóxica de células *natural-killer*. O fator de necrose tumoral é responsável pela caquexia, causa agregação plaquetária e acúmulo de neutrófilos, intensificando a resposta dessas células a outros mediadores, além de promover a liberação de enzimas proteolíticas de células mesenquimatosas, contribuindo, para a lesão tissular. Recentemente, descreveu-se como pertencente à família do *TNF* uma série de citocinas (BAFF, BLys, APRIL) produzidas por monócitos/macrófagos e neutrófilos que reduzem apoptose celular (Nawroth et al., 1986; Carter, R.H., 2003).

Foram dosados níveis séricos de diferentes interleucinas, fatores estimulantes de colônia, interferon- γ , proteína de macrófago e *TNF-α*. Viu-se como resultado níveis elevados de *IL-4*, *IL-10*, *IL-6* e *IL-7* em pacientes com

câncer de mama confirmado enquanto normal em pacientes com biópsia negativa, sem correlação clínica (Carter, R.H., 2003).

A família de proteínas inflamatórias *bcl-2* medeia mecanismo anti-apoptótico e estão associadas a aumento de receptor hormonal positivo, estes traduzem com sua expressão no câncer de mama um subgrupo clínico com prognóstico favorável. A proteína *Bcl-2* bloqueia apoptose através de mecanismo mitocondrial, inibindo retorno do citocromo C para a mitocôndria, evitando que a cascata de eventos que resultam no comprometimento do potencial de membrana da mitocôndria, interagindo com ativação da caspase 9 e sequente apoptose (Lingle et al., 2002).

II - OBJETIVOS

II.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência do estresse oxidativo ao DNA e da expressão dos mediadores pró inflamatórios no desenvolvimento do câncer de mama.

II.1.1 Objetivos específicos

- Analisar e quantificar a presença de *IL-1 β*, *IL-8*, *COX-2*, *TNF-α*, em tecido normal e tecido tumoral mamário.
- Analisar e quantificar a presença de danos oxidativos ao DNA.
- Correlacionar os níveis de danos ao DNA com grau de indiferenciação do tecido tumoral.

III – MATERIAL E MÉTODOS

III.1- Pacientes

Foram incluídos no presente estudo 27 pacientes consecutivas do sexo feminino, com mais de 18 anos, submetidas anteriormente à biópsia tipo *core* analisada por patologista; a biópsia foi incluída em bloco de parafina e corada por método de Hematoxilina-Eosina; e por este confirmado diagnóstico de câncer de mama e caracterizado por critérios de anatomia patológica de observação de características de estrutura celular seu grau histológico; oriundas do ambulatório e serviço de mastologia da Universidade São Francisco e Hospital Paulo Sacramento. Todas as pacientes foram selecionadas, entrevistadas e examinadas pela Dr. Simone Felitti, oncologista clínica.

Foram excluídos, pacientes do sexo masculino, as que já se apresentarem com câncer de mama inflamatório (T4) e *in situ*, as que se negaram ao procedimento cirúrgico bem como as que se negaram a participar do presente estudo. Todas as pacientes assinaram termo de consentimento esclarecido (ANEXO 2). O trabalho foi submetido ao comitê de ética da Universidade São Francisco e aprovado (ANEXO 1).

Para o desenvolvimento deste trabalho três biópsias foram obtidas, tipo *core* sendo realizadas por punção através de pinça de *Pose* com tamanho aproximado de 2 mm sendo uma do tecido tumoral, uma de tecido peritumoral e outra do tecido sadio, colhidas em duplicidade pelo fato de termos usados dois métodos de análise diferentes (cometa e PCR) e todas vistas somente a olho nu para escolha de local, podendo ter acontecido de serem realizadas em local errôneo, todas as biópsias foram feitas pela Dra. Simone Felitti e no mesmo instante foram colocadas em meio adequado e congeladas em

nitrogênio líquido. As biópsias de tecido peritumoral foram descartadas por dúvida quanto a serem tumor ou peritumoral por terem sido escolhidas em localização a olho nu.

III.2- Ensaio do cometa

Através deste foi possível detectar danos no DNA em células isoladas. Para tal usamos uma biópsia obtida da região tumoral e outra da região distante ao tumor, ou seja, tecido normal. O método foi realizado por técnico no laboratório da UNIFAG (Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia) da Universidade São Francisco.

A análise de danos nas células mamárias foi feita de acordo com o POOL-ZOBEL et al. (1994). Resumidamente, as amostras foram incubadas em 3 ml de uma solução de Hank's (HBSS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo 5,5 mg de proteinase K (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO) e 3 mg de colagenase I (Invitrogen) por 45 minutos a 37°C para a liberação das células. Estas, então, foram ressuspensas em 10 ml de HBSS e centrifugadas para o isolamento das células. Descartado o sobrenadante, as amostras foram ressuspensas em 500 µl de Hank's. Alíquotas foram retiradas para que a viabilidade celular fosse avaliada, sendo descartadas aquelas com viabilidade inferior a 75%.

A versão alcalina do ensaio do cometa foi realizada de acordo com LADEIRA et al. (2004). Em suma, 15 µl da suspensão celular previamente obtida foram misturados à agarose *low melting point* 0.5 % (Promega), postos sobre uma lâmina e cobertos com uma lamínula. Estas foram imersas em uma solução de lise gelada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM Tris, 1% SDS, pH 10

com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) a 4°C *overnight*. Subseqüentemente, foram expostas a um tampão alcalino (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH~13,4) por 40 min a 4°C. A eletroforese foi realizada neste tampão a 4°C por 30 min a 25V e 300 mA. Após a corrida as lâminas foram neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5), coradas com *SYBR Safe™* (Invitrogen) e analisadas com um microscópio de fluorescência. Duzentas células foram aleatoriamente selecionadas (100 de cada réplica) e analisadas usando o *software* Komet 5.5 (Kinetic Imaging, USA). A Figura 1 abaixo ilustra as imagens obtidas após a realização do ensaio cometa

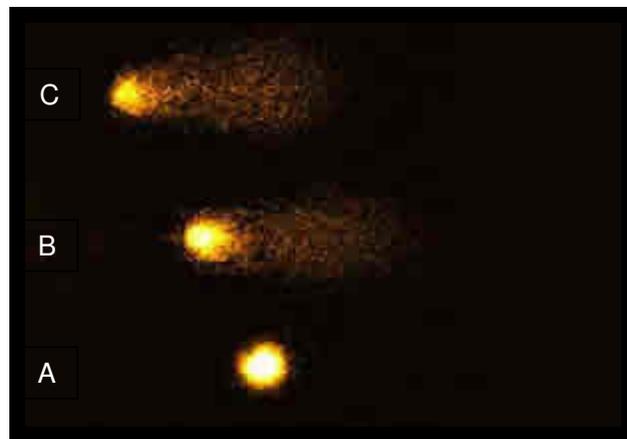


FIGURA 1 – A – célula com baixo nível de danos oxidativos; B – célula com nível intermediário de danos ao DNA evidenciados pelo tamanho da cauda; C célula com nível elevado de danos ao DNA

III.3- Extração de RNA e síntese de cDNA

Uma biópsia de tecido tumoral e outra de tecido normal foram destinadas à extração de RNA. O método foi realizado por técnico experiente e

capacitado no procedimento no laboratório de biologia molecular da UNIFAG na Universidade São Francisco.

Para a estabilização e proteção do RNA, após a biópsia, todas as amostras destinadas a este fim foram armazenadas em *RNAlater* (QIAGEN, Valencia, CA, USA) a -80°C até o momento da extração do RNA. Esta foi feita usando-se o *RNeasy[®] tissue kit* (QIAGEN) seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração 100 µg de RNA foram usados para a síntese do cDNA usando o *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

III.4- Quantificação da expressão por PCR em tempo real

A análise de expressão dos genes *COX-2*, *IL-8*, *TNF-α*, e *IL-1β* e do gene constitutivo β-actina foram feitas por meio da PCR em tempo real. Os iniciadores e sondas utilizadas neste estudo foram desenhados usando o *D-LUX[™] Designer*. A Tabela 1 mostra a seqüência dos iniciadores marcados utilizados na PCR em tempo real. A reação de PCR em tempo real foi realizada no equipamento 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e o C_t (*threshold cycle* - momento da reação em que a fluorescência da amostra começa a ser detectada) determinado com o auxílio do RQ Study Software (Applied Biosystems). Todas as reações foram feitas em triplicata e a média do C_t usada para avaliação da expressão gênica. As amostras foram normalizadas usando-se o controle constitutivo. A expressão relativa foi calculada de acordo com a fórmula $2^{(Rt-Et)}/2^{(Rn-En)}$ (BUCKHAULTS et al., 2001)

Tabela 1 – Iniciadores que utilizados para a PCR em tempo real.

Gene	Iniciador	Seqüência (5'→3')
β-actina	Direto	CGACCCGGAGTCAACGGATTTGGT[FAM]G
	Reverso	GGCAACAATATCCACTTTACCAGA
TNF-α	Direto	ACACTGGCTCGTGTGACAAGG
	Reverso	CGGCTAATACACACTCCAAGGC[FAM]G
IL-8	Direto	CACCACACTGGACAGCCCTTT
	Reverso	CGAACTTGCCCAGGAGCTTTATTT[FAM]G
COX-2	Direto	GGGTTGCTGGTGGTAGGAATG
	Reverso	CGCAGCCTGTGATACTTTCTGTACTG[FAM]G
IL-1β	Direto	AAAGACATACTCCAAACCTTTCCA
	Reverso	CGCCTTACAATAATTTCTGTGTTGG[FAM]G

As reações foram feitas usando o Platinum[®] Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante. Em resumo, para um volume final de 50 µl foram adicionados 25 µl do Platinum[®] SuperMix, 1 µl (10 µM) do primer marcado com LUX[™], 1 µl (10 µM) do primer não marcado e 10 µl do cDNA.

Para amplificação foi usado o ciclo descrito a seguir: 2 min a 50°C de pré-tratamento de UDG (Uracil-DNA Glicosilase) e desnaturação de 2 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 59°C por 15 s, e uma extensão a 72°C por 30 s, seguida de uma análise de curva de *melting* (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 s iniciando-se em 95°C). Através desta análise foi possível averiguar a especificidade da reação de amplificação, uma vez que o fluoróforo usado emite luz sempre que um dímero de DNA é formado (Figura 2).

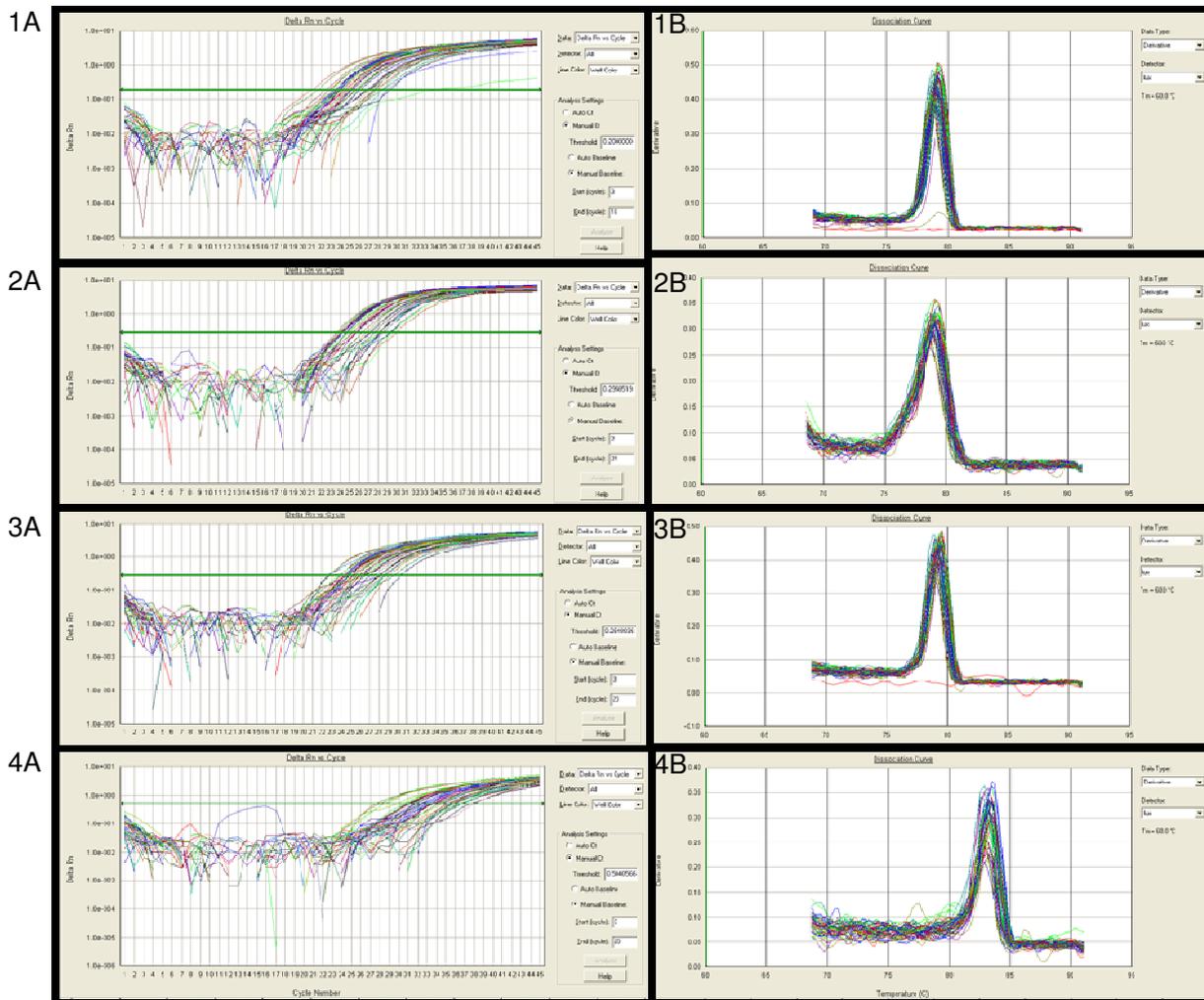


FIGURA 2 – 1A Curva de amplificação e 1B curva de dissociação do gene IL-1 β ; 2A Curva de amplificação e 2B curva de dissociação do gene COX-2; 3A Curva de amplificação e 3B curva de dissociação do gene IL-8; 4A Curva de amplificação e 4B curva de dissociação do gene TNF- α

III.5 Análise dos Dados

Todos os dados obtidos foram analisados usando o programa estatístico SPSS 12.0 (SPSS Inc., USA). Os resultados estão sendo apresentados como razões de chance com um intervalo de confiança de 95%. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

IV – RESULTADOS & DISCUSSÃO

IV.1- Pacientes

Vinte e sete pacientes foram estudadas e após coletadas as biópsias. Destas amostras, 26 foram consideradas com histologia para câncer de mama, uma não constava tumor no material colhido, sendo descartada. Das pacientes com câncer de mama, 24 foram consideradas com câncer de mama ductal e 2 com tipos histológicos diferentes, uma papilífero e lobular, sendo descartadas para homogeneidade histológica do grupo. Desse modo, as amostras que foram colhidas em duplicidade, e uma de tecido normal e uma de tecido tumoral subdivididas em dois grupos: Tecido mamário (n=24; Normal); e câncer de mama (n=24). Este grupo de tecido tumoral foi subdividido em grau de diferenciação histológico sendo Grau I, bem diferenciado (n=2); Grau II, moderadamente diferenciado (n=8); e Grau III, indiferenciado (n=14).

IV.2- Determinação dos níveis de oxidação ao DNA – Ensaio Cometa

Os níveis de danos oxidativos ao DNA foram avaliados por meio do ensaio do cometa (*Single cell gel electrophoresis*). Nossos resultados indicam que as biópsias de tecido com câncer mamário apresentaram os maiores níveis de danos ao DNA, quando comparados as biópsias com tecido mamário normal (Tabela 2).

Em literatura vê-se estudo de Synowiec et. al, 2008 que analisou por método do ensaio do cometa dano de DNA relacionado com polimorfismo de

gene de reparo e perda de capacidade desses genes de reparo ao DNA, sem avaliação de mediadores de inflamação correlacionados como fizemos em nosso trabalho onde vemos que o tecido com maiores níveis de lesão de DNA também é o tecido com maior nível de mediadores do processo inflamatório, isso ainda não correlacionado e estudado pelo método do cometa em câncer de mama. Em continuação de observação de estudos de inflamação e método do cometa temos na literatura trabalhos como Ribeiro et. al, 2008 que verificam a presença de dano de DNA, estresse oxidativo, em biópsias de tecido tumoral de cólon e seu aumento em número conforme o estadiamento inicial da doença e sua potencial agressividade, confirmando a ação de agressão oxidativa em mucosa colônica e sua correlação com a tumorigênese.

Tabela 2 – Lesões de DNA identificadas em tecidos mamários normal e tumoral.

Grau Histológico	Origem	<i>Tail Moment</i>
		Média + desvio padrão
GI n=2	Normal	2.03 ± 0.55
	Tumoral	3.94 ± 0.92*
GII n=8	Normal	1.64 ± 0.41
	Tumoral	4.35 ± 0.63**
GIII n=12	Normal	1.64 ± 0.33
	Tumoral	4.56 ± 0.99** #

*p < 0.05 e **p < 0.01, quando comparado ao tecido normal; #p < 0.05, quando comparado ao tecido tumoral em Grau histológico I.A significância estatística foi realizada por método ANOVA e teste-t.

O início da teoria do estresse oxidativo foi proposta por Harman et al. (1950) na qual radicais livres de oxigênio endógenos formados no processo metabólico normal teriam um acúmulo e por oxidação trariam dano em DNA. Subsequentemente, em 1972, Harman identificou que o processo de oxidação estava envolvido com a mitocôndria e ocorria dano em seu DNA. Esse processo ocasionava mudança de padrão de proteínas celulares e imortalização das mesmas. Associado à essas mudanças viu-se aumento do número de polimorfonucleares e proteínas inflamatórias locais em todo o processo e potencializando o mesmo (Benz et al., 2008). Hoje muitos estudos e doenças tem apresentado ligação com estresse oxidativo, como inflamação e câncer.

Sabe-se que durante o processo inflamatório, neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, geram radicais livres de oxigênio e/ou nitrogênio em resposta a mediadores pró-inflamatórios e produtos da parede celular bacteriana. Os compostos gerados durante este processo reagem com o DNA e podem induzir alteração da expressão de proto-oncogenes, bem como gerar produtos genotóxicos, capazes de interagir com alvos moleculares no DNA (DRAKE et al., 1996).

IV.3- Análise da expressão gênica - PCR em tempo real

As quarenta e oito amostras tiveram o RNA extraído e o cDNA sintetizado.

IV.3.1 - Influência da expressão de *IL-8*, *IL-1β*, *COX-2* e *TNF-α*

A análise da expressão relativa dos genes *IL-8*, *IL-1β*, *COX-2* e *TNF-α* foram feitas por meio de PCR em tempo real. Nossos dados mostram que os níveis de mRNA foram significativamente maiores nas biópsias de tecido mamário com câncer quando comparados as biópsias de tecido mamário normal. Além disso, quando se avaliou a relação entre a expressão destes genes com o grau histopatológico foi verificada uma maior expressão em todos os genes estudados (Tabela 3).

Acredita-se que a presença de *IL-8*, *IL-1β*, *COX-2* e *TNF-α* seja responsável por serem esses mediadores do processo inflamatório e este estarem envolvidos na gênese dos processos de oxidação, mutação de DNA e conseqüente gênese do câncer (Herschman, 1996; Fan et al., 1999; De Michele et al., 2000; Dannenberg et al., 2001; Kang et al., 2003; Boland et al., 2004; De Vitta et al., 2005)

Tabela 3 – Expressões dos genes *IL-8*, *IL-1 β* , *COX-2* e *TNF- α* em tecidos mamários normal e tumoral.

Grau Histológico	Origem	Genes			
		IL-8	IL-1 β	COX-2	TNF- α
GI n=2	Normal	0.56 \pm 0.11	0.92 \pm 0.37	0.55 \pm 0.09	0.19 \pm 0.01
	Tumoral	0.92 \pm 0.23*	1.23 \pm 0.54*	0.99 \pm 0.22*	0.63 \pm 0.21*
GII n=8	Normal	0.47 \pm 0.17	0.92 \pm 0.41	0.41 \pm 0.21	0.26 \pm 0.17
	Tumoral	0.95 \pm 0.28*	1.39 \pm 0.45*	1.04 \pm 0.43*	0.76 \pm 0.32*
GIII n=14	Normal	0.71 \pm 0.38	0.88 \pm 0.36	0.39 \pm 0.15	0.70 \pm 0.22
	Tumoral	1.19 \pm 0.34*	2.07 \pm 0.83** #	1.22 \pm 0.32** #	1.51 \pm 0.45** #

*p < 0.05 and **p < 0.01, quando comparado ao tecido normal; #p < 0.05, quando comparado ao tecido tumoral em Grau histológico I. A significância estatística foi realizada por ANOVA E Teste-t.

No presente trabalho detectou-se que existe a expressão gênica de COX-2 em número variável em tecido mamário normal mas quando avalia-se o tecido tumoral temos uma quantidade muito maior da expressão gênica da enzima e com acréscimo ainda maior nos tecidos tumorais com maior grau histológico conforme em literatura com trabalhos de câncer de cólon (Williams et al., 1999; Herschman, 1996; Dannenberg et al., 2001) provou-se a presença de altas taxas de *COX-2* em lesões pré malignas e a superexpressão de *COX-2* em câncer de mama está detectada em 40% dos diagnósticos bem como do carcinoma ductal *in situ*, lesão mais inicial. A enzima *COX-2* está envolvida no processo de oxidação e cataliza a reação de conversão do ácido araquidônico para prostaglandina *PGH 2* que passa a *PGI 2* e Tromboxane (Herschman, 1996; Williams et al., 1999; Fan et al., 1999; Soslow et al., 2000; De Michele e

Weber, 2000; Soslow et al., 2000; Yang et al., 2001; Dannenberg et al., 2001; Ristimaki et al., 2002; O'Connell, 2003; Spizzo et al., 2003; Watanabe et al., 2003; Wulfing et al., 2003; Yoshimura et al., 2003; Boland et al., 2004).

Quanto à associação do aumento da expressão gênica de *COX-2* e maior grau histológico sua superexpressão foi verificada por Soslow et al., 2000; e relacionada com alto grau histológico, alta taxa de proliferação celular. Ristimaki et al. (2002) identificaram a relação inversa de níveis de *COX-2* e intervalo livre de doença sugerindo seu pior prognóstico.

Em estudo de Malins et al. (2006); a análise da presença da Interleucina-8 que é uma das citocinas de mediação do processo inflamatório mostrava a mudança de interação de epitélio e estroma mamário e o produto de oxidação através do radical hidroxila OH agindo sobre eles e trazendo mutação em DNA de mulheres mais jovens, em nosso trabalho vê-se que há um aumento da expressão gênica desta citocina no tecido neoplásico em relação ao tecido mamário normal. E concordando como refere Benoy et al. (2004), e que quanto maior o grau histológico maiores os níveis dosados e que podem estar associados a pacientes mais jovens, a menor sobrevida, estágio de doença e progressão(Rao et al, 2006).

A procura de presença de outras citocinas de processo inflamatório trouxe pesquisas das interleucinas como a Interleucina-1 β que é uma das citocinas de mediação do processo inflamatório e está presente no mecanismo do processo inflamatório mediado por leucócitos mononucleares e interferindo na capacidade de reparo do DNA humano através da análise de níveis de oxigênio radical livre e defesas antioxidantes com $p= 0,005$ conforme Pero et

al.(1990); e em Lyon et al. (2008); em nosso trabalho vê-se que há um aumento da expressão gênica desta citocina no tecido neoplásico e nota-se que quanto maior a indiferenciação do tecido neoplásico mamário maior expressão de Interleucina-1 β e maior quantidade de dano de DNA, explicando a indiferenciação maior e pior prognóstico das pacientes; e concordando como refere Benoy et al. (2004); e que quanto maior o grau histológico maiores os níveis dosados e que podem estar associados a menor sobrevida, estágio de doença e progressão (Rao et al. 2006). Em câncer de cólon Duque et. al, 2006 mostra que *IL-1 β* e *Cox-2* tem papel fundamental na patogênese da doença inflamatória e crescimento tumoral pois *IL-1 β* media a ativação da transcrição da *Cox-2*, confirmado também por Liu et al., 2003.

O Fator de Necrose Tumoral (*TNF- α*) é um mediador inflamatório celular que promove adaptação celular ao mecanismo de hipóxia (Semenza, 2002) e esse seria o gatilho para sua expressão. Essa expressão aumentada eleva o nível de proteases que promovem dano celular (De Vitta et al., 2005) trazendo hiperativação do ciclo celular, defeitos de pontos de reparo celular e de apoptose (O'Connel et al., 1998). Assim essas células acumulam defeitos genéticos maiores e mutações propiciando a formação do câncer (Stewart et al., 1999). Correlacionando com os dados do nosso trabalho, vê-se conforme relatado na literatura níveis mais elevados de *TNF- α* em células tumorais e muito mais elevados em células tumorais de grau de indiferenciação celular maior (Stewart et al., 1999; Semenza et al., 2002), estes estão correlacionados com maior agressividade (Boland et al., 2004; Lin et al., 2004).

A ligação que se vê e sugere-se em alguns estudos científicos como relatados pelo Instituto Nacional do Câncer, INCA; Moifar F. et al, 2000; e Rafii et al, 2002; de oxidação, dano de DNA e processo de oncogênese trazendo os primeiros passos das alterações de ciclo celular e presença de neoplasia em atividade, também em nosso trabalho pode ser vista com método de dosagem pelo cometa para neoplasia de mama somente podendo ser correlacionado indiretamente com formação histológica neoplásica do câncer de cólon.

Durante o processo inflamatório, elementos celulares como leucócitos e reações enzimáticas geram radicais livres de oxigênio em resposta ao aumento da expressão gênica dos mediadores pró-inflamatórios. Os resultados provenientes do ensaio cometa mostram que o aumento na expressão destes genes está relacionado a um aumento nos níveis de danos oxidativos ao DNA, que estão relacionados com o grau de indiferenciação histopatológico e estadiamento/agressividade de doença relatados em câncer de cólon (Ribeiro et. al, 2008) que pode sugerir o mesmo para o desenvolvimento da neoplasia de mama. Nesta sugestão, podemos então correlacionar os resultados de nosso trabalho que mostra relação de aumento de níveis oxidativos de DNA em tecido tumoral em relação ao normal, e progressivo aumento de níveis de oxidação quanto mais indiferenciada a amostra tumoral analisada.

VI – CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a presença de mediadores inflamatórios como citocinas; *IL-1 β*, *COX-2*, *IL-8*, *TNF-α* em tecido tumoral mamário.

Foi possível relacionar aumento dos níveis de *TNF-α* e *IL-1 β* com maior grau de indiferenciação celular histológica do tecido tumoral mamário.

O método utilizado para detecção e dosagens de dano de DNA mostrou-se eficiente também para câncer de mama.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham J, Allegra C. **Bethesda handbook of clinical oncology**.Philadelphia:Lippincott Wilkins:2001.

Acta 1996, 1299:125-140.

Alexander, F.E. et al. 14 years of follow-up from the Edinburgh randomised trial of breast-cancer screening. **Lancet**.353(9168):1903-8, 1999.

Ames, B.N. & Gold, L.S. (1990). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 87, 7772-7776.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. & Hagen, T.M.(1993) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90, 7915-7922.

Anderson KM, Jaruga P, Ramsey CR, Gilman NK, Green VM, Rostad SW, Emerman JT, Dizdaroglu M, Malins DC. Structural alterations in breast stromal and epithelial DNA: the influence of 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine.**Cell Cycle**.2006 Jun;5(11):1240-4.

Anticancer Res 2003, 23:3215-3221.

Armstrong, B. & Doll, R. (1975) **Int. J.Cancer** 15, 617-631.

Baer JH, et al. Early life factors and incidence of proliferative benign breast disease.**Cancer Epidemiology & Preventio**.14,2889-2897,2005.

BB, Subbaramaiah K: Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. **Lancet Oncol** 2001, 2:544-551

Benz, C. C.; Yau, C. Ageing, oxidative stress and cancer: paradigms in parallax. **Nat Ver Cancer**, 8(11):875-879,2008.

Bernstein, L., Henderson, B. E., Ha-nisch,R., Sullivan-Halley, J. & Ross. (1994) **Cancer Causes Control** 5, 42-46.

Block, G. (1992) **Nutr. Rev.** 50, 207-213.

Block, G., Patterson, B. & Subar, A.(1992) **Nutr. Cancer** 18, 1-29.

Boland GP, Butt IS, Prasad R, Knox WF, Bundred NJ: COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ. **Br J Cancer** 2004, 90:423-429.

Bouzahzah B, Albanese C, Ahmed F, et al. Rho family GTPases regulate mammary epithelium cell growth and metastasis through distinguishable pathways. **Mol Med** 2001;7:816.

Boyer, Ford, Judkins, Levin. 1th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

Branda, R.F., Sullivan, L. M., O'Neill, J.P., Falta, M.T., Nicklas, J. A., Hirsch, B., Vacek, P.M. & Albertini, R.J. (1993) **Mutat. Res.** 285,267-279.

Brentani MM, Coelho FRG, Kowalski LP, eds. **Bases da oncologia.** 2 ed. São Paulo: Lemar, 2003.

Brueggemeier RW, Quinn AL, Parrett ML, Joarder FS, Harris RE,

Bui, M. H., Sauty, A., Collet, F. & Leuenberger, P. (1991) **J. Nutr.** 122, 312-

Carson, R. (1962) *Silent Spring* (Hough-ton-Mifflin, Boston).

Causes Control 5, 53-60.

Carter, R. H. A role for BLys in tissue inflammation?. **Arthritis and Rheumatism**, v.48, n.4, p. 882-885, 2003.

Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumoursuppressor gene. **Trends Biochem Sci** 1999;24:73.

Cohen, S. M., Purtilo, D.T. & Ellwein, L. B.(1991) **Mod. Pathol.** 4, 371-382.

Ames, B.N., Shigenaga, M.K. & Gold, L. S. (1993) **Environ. Health Perspect.** 93,35-44.

Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Willett, W. C., Hunter, D. J., Manson, J. E., Hennekens, C. H., Rosner, B. A. & Speizer, F. E. (1992) **Cancer Causes Control** 3,433-439.

Columbano, A., Ledda-Columbano, G. M., Ennas, M.G., Curto, M., Chelo, A. & Pani, P. (1990) **Cell** 11, 771-776.

Cunningham, M.L., Maronpot, R.R., Thompson, M. & Bucher, J.R. (1994) **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 124, 31-38.

Cunningham, M.L., Elwell, M.R. & Matthews, H. B. (1994) **Fundam. Appl. Toxicol.** 23, 363-369.

Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler

De Michele A, Weber BL. Inherited genetic factors. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, et al., eds. **Diseases of the breast**, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:221.

De Vita VT, Hellman S, Rosenberg AS, eds. **Cancer: principles and practice of oncology**. 7th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2005.

Debies MT, Welch DR. Genetic basis of human breast cancer metastasis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2001;6:441.

Dehn DL, Hussain S H, Ross D. RH1 induces cellular damage in NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1-dependent manner: relationship between DNA cross-linking, cell cycle perturbations, and apoptosis. **Jour Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 2005 Jan ; 10.1124.

DH, Cha I, Tlsty TD, Esserman LJ: Cyclooxygenase-2 expression is related to nuclear grade in ductal carcinoma in situ and is increased in its normal adjacent epithelium. **Cancer Res** 2003, 63:2347-2350.

Dickson RB, Lippman ME. **Autocrine and paracrine growth factors in the normal and neoplastic breast.** In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, et al., eds. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins,2000:303.

Dorgan, J. F., Reichman, M. E., Judd,J. T., Brown, C., Longcope, C., Schatzkin,A., Campbell, W. S., Franz, C.,Kahle, L. & Taylor, P. R. (1994) **Cancer**

Draper L. Breast cancer: trends, risks, treatments and effects. **AAOHN J.** 54(10): 445-51,2006.

Duque, J., Díaz-Muñoz M.D., Fresno, M., Iñiguez, M.A. Up-regulation of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 beta in colon carcinoma cells. **Cell Signal.** 2006,18(8):1262-9.

Duthie, G. G., Arthur, J. R. & James,W. P. T. (1991) **Am. J. Clin. Nutr.** 53,

Dutta, A., Ruppert, J. M., Aster, J.C. & Winchester, E. (1993) **Nature** (London) 365, 79-82.

Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, et al. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. **Genes Dev** 2001;15:50.

Ellis LM, Nicolson GL, Fidler IJ. Concepts and mechanisms of breast cancer metastasis. In: Bland KI, Copeland EM, eds. **The breast**, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders,1998;564.

Fan S, Wang J, Yuan R, et al. BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. **Science** 1999;284:1354.

Feltes CM, Kudo A, Blaschuk O, et al. An alternatively spliced cadherin-11 enhances human breast cancer cell invasion. **Cancer Res** 2002;62:6688.

Forones NM, eds. **Guia de medicina ambulatorial e hospitalar de oncologia**. São Paulo: Manole, 2005.

Fraga, C. G., Motchnik, P. A., Shi-genaga, M. K, Helbock, H. J., Jacob, R. A. & Ames, B. N. (1991) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88, 11003-11006.

Gardner E, Gray DJ, Rahilly R. **Anatomia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

Grasl-Kraupp, B., Bursch, W., Ruttkay-Nedecky, B., Wagner, A., Lauer, B & Schulte-Herman, R. (1994) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91, 9995-9999.

Guyton, Arthur C, Hall, John E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

Hanawalt, P. & Mellon, I. (1993) **Curr. Biol.** 3, 67-69.

Hankinson, S. E., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Spencer, T. L., Rosner, B. & Stampfer, M. J. (1992) **Obstet. Gynecol.** 80, 708-714.

Harris, J. R., Lippman, M. E., Veronesi, U. & Willett, W. (1992) **N. Engl. J. Med.** 327, 319-328.

Haskell CM, et all. **Cancer treatment**. 5 ed. Saunders Company, 2001.

Heller, T.D., Holt, P.R. & Richardson, A. (1990) **Gastroenterology** 98, 387-391.

Henderson, B.E., Ross, R.K. & Pike, M.C. (1991) *Science* 254, 1131-1138.

Henderson, B.E., Ross, R.K., Pike, M.C. & Casagrande, J.T. (1982) **Cancer Res.** 42, 3232-3239.

Herschman HR: Prostaglandin synthase 2. **Biochim Biophys**

Hill, M. J., Giacosa, A. & Caygill, C. P. J., eds. (1994) **Epidemiology of Diet**

Hofseth LJ, Saito S, Hussain SP, Espey MG, Miranda KM, Araki Y, Jhappan C, Higashimoto Y, He P, Linke SP, Quezado MM, Zurer I, Rotter V, Wink DA, Appella E, Harris CC. Nitric oxide-induced cellular stress and p53 activation in chronic inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003 Jan 7;100(1):143-8.

Hunter, D. J. & Willett, W. C. (1993) **Epidemiol. Res.** 15, 110-132.

in inflammation, cancer, and development. **Oncogene** 1999,18:7908-7916.

INCA, **Instituto Nacional do Câncer**, Brasil.

Jick, H., Walker, A. M., Watkins, R. N., D'Ewart, D. C., Hunter J. R., Danford, A., Madsen, S., Dinan, B. J. & Rothman, K. J. (1980) **Am. J. Epidemiol.** 112, 586-594.

Joensuu H, Isola J: Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. **Cancer Res** 2002, 62:632-635.

Kang D.H. **AACN Clin Issues**, 13(4):540-9.

Kang Y, Siegel PM, Shu W, et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. **Cancer Cell** 2003;3:537.

Kolquist KA, Ellisen LW, Counter CM, et al. Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues. **Nat Genet** 1998;19:182.

Kumar R: Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor. **Oncogene** 1999, 18:305-314.

Li, R. & Botchan, M.R. (1993) **Cell** 73, 1207-1222.

Lin EY, Pollard JW. Macrophages: modulators of breast cancer progression. **Novartis Found Symp.** 2004;256:158-68.

Lingle WL, Barret SL, Negron VC, et al. Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002;99:1978.

Lithgow D, Covington C. Chronic inflammation and breast pathology: a theoretical model. **Biol Res Nurs**.2005 Oct;7(2):118-29.

Liu, W., Reinmuth, N., Stoeltzing, O., Parikh, A.A., Tellez, C., Williams, S., Jung, Y. D., Fan, F., Takeda, A., Akagi, M., Bar-Eli, M., Gallick, G.E., Ellis, L.M. Cyclooxygenase-2 is up-regulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways. **Cancer Res.** 2003 Jul 1;63(13):3632-6

Lok, E., Scott, F.W., Mongeau, R, Nera, E.A., Malcom, S.& Clayson, D.B. (1990) **Cancer Lett.** 51, 67-73.

Longnecker, M. P. (1994) **Cancer Causes Control** 5, 73-82.

Lyon, D. E.; McCain, N. L.; Walter, J. Cytokine comparisons between women with breast cancer and women with a negative breast biopsy. **Nurs Res**, 57(1):51-58, 2008.

Malins DC, Holmes EH, Polissar NL, Gunselman SJ. The etiology of breast cancer.Characteristic alteration in hydroxyl radical-induced DNA base lesions during oncogenesis with potential for evaluating incidence risk. **Cancer.** 1993 May 15;71(10):3036-43.

Malins, D.C.; Anderson, K.M.; Jaruga, P.; Ramsey,C.R.; Gilman N.K.; Green V.M.; Rostad S.W.; Emerman J.T.; Dizdarougiu M. **Cell Cycle**, 5(15):1629-32,2006.

Mallins DC, Anderson KM, Jaruga P, Ramsey CR, Gilman NK, Green VM, Rostad SW, Emerman JT, Dizdaroglu M. Oxidative changes in the DNA of stroma and epithelium from the female breast: potential implications for breast cancer. **Cell Cycle**.2006 Aug;5(15):1629-32.

Manual de Oncologia Clínica- UICC- Fundação Oncocentro de São Paulo,6 ed. São Paulo,1998.

Matsui A, Ikeda T, Enomoto K, Nakashima H, Omae K, Watanabe M, Hibi T, Kitajima M. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. **Cancer Lett**.2000 Apr 3;151(1):87-95.

Moalli, P.A., MacDonald, J.L., Goodglick, L.A. & Kane, A.B. (1987) **Am. J. Pathol.** 128, 426-445.

Moinfar F, Man YG, Arnould L, Bratthauer GL, Ratschek M, Tavassoli FA. Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis. **Cancer Res**. 2000 May 1;60(9):2562-6.

Nawroth, P.P., Bank, I., Handley, D., Cassimeris, J., Chess, L., Stern, D. Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1. **J. Exp. Med.**, v. 163, p. 1363-1375, 1986.

Newcomb, P. A., Storer, B. E., Long-necker, M. P., Mittendorf, R., Green-berg, E. R., Clapp, R. W., Burke, K. P., Willett, W. C. & MacMahon, B. (1994) **N. Engl. J. Med.** 330, 81-87.

O' Connel P, Pekkel V, Fuqua SA, et al. Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. **J Natl Cancer Inst** 1998;90:697.

O' Connel P. Genetic and cytogenetic analyses of breast cancer yield different perspectives of a complex disease. **Breast Cancer Res Treat** 2003;78:347.

Oesterreich S, Deng W, Jiang S, et al. Estrogen-mediated down-regulation of E-cadherin in breast cancer cells. **Cancer Res** 2003;63:5203.

Patterson, B. H. & Block, G. (1988) *Am.J. Pub. Health* 78, 282-286.

Pero R.W., Roush G.C., Markowitz M.M., Miller D.G. **Cancer Detect Prev**, 14(5):555-61,1990.

Prentice, R. L. & Sheppard, L. (1990) **Cancer Causes Control** 1, 81-97.

Radisky ES, Radisky DC. Stromal induction of breast cancer: inflammation and invasion. **Rev Endocr Metab Disord**. 2007 Apr 20.

Rafii S, O'Regan P, Xinarianos G, Azmy I, Stephenson T, Reed M, Meuth M, Thacker J, Cox A. A potential role for XRCC2 R188H polymorphic site in DNA-damage repair and breast cancer. **Hum Mol Genet**. 2002 Jun 1;11(12):1433-8.

Ribeiro, M.L., Priolli, D.G., Miranda, D.D., Arçari, D.P., Pedrazzoli, J., Jr., Martinez, C.A. Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. **Clin Colorectal Cancer**. 2008 Jul;7(4):267-72.

Richter, C., Park, J.W. & Ames, B.N. (1998) **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85, 6454-6467.

Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C,

Robertson FM: Correlation of aromatase and cyclooxygenase gene expression in human breast cancer specimens. **Cancer Lett** 1999, 140:27-35.

Rody A, Greb RR, Bocker W, Kiesel L: Analysis of cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer: high throughput tissue microarray analysis. **J Cancer Res Clin Oncol** 2003,129:375-382.

Romieu,I.; Berlin, JA. & Colditz, G. Oral contraceptives and breast cancer: review and meta-analysis. **Cancer**. 66(11):2253-63, 1990.

Ross BM, Pinho M. **Genética e Biologia Molecular para o cirurgião**.1 ed. São Paulo: Lemar, 1999.

Russo, J., Calaf, G., Sohi, N., Tahin, Q.,Zhang, P. L., Alvarado, M. E., Estrada,S. & Russo, I. H. (1993)**Ann. N. Y Acad.Sci**. 698, 1-20.

Schechtman, G., Byrd, J. C. & Hoffmann,R. (1991) **Am. J. Clin. Nutr**. 53, 1466-1470.

Selby, C. P. & Sancar, A. (1993) **Science** 260, 53-58.

Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. **Trends Mol Med** 2002;8(Suppl 4):S62.

Shacter, E., Beecham, E. J., Covey, J. M.,Kohn, K. W. & Potter, M. (1988) **Carci-nogenesis** 9, 2297-2304.

Shim V, Gauthier ML, Sudilovsky D, Mantei K, Chew KL, Moore

Smith-Warner, SA. et al. Intake of fruits and vegetables and risk of breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. **JAMA**.285(6):769-76,2001.

Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT: COX-2 is expressed in human pulmonary,colonic, and mammary tumors. **Cancer** 2000, 89:2637-2645.

Spizzo G, Gastl G, Wolf D, Gunsilius E, Steurer M, Fong D, Amberger A, Margreiter R, Obrist P: Correlation of COX-2 and Ep-CAM overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival. **Br J Cancer** 2003, 88:574-578.

Stadtman, E.R. (1992) **Science** 257, 1220-1224.

Starcevic SL, Diotte NM, Zukowski KL, Cameron MJ, Novak RF. Oxidative DNA damage and repair in a cell lineage model of human proliferative breast disease. **Toxicol Sci.**2003 Sep;75(1):74-81.

Steinmetz, K. A. & Potter, J. D. (1991) **Cancer Causes Control** 2, 325-357.

Steinmetz, K. A. & Potter, J. D. (1991)**Cancer Causes Control** 2, 427-442.

Stewart ZA, Pietenpol JA. Cell cycle checkpoints as therapeutic targets. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 1999;4:389.

Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ: Cyclooxygenase-2, Kimura K, Hirano A, Yoshimatsu K, Aiba M, et al.: Expression of cyclooxygenase-2 in malignant and benign breast tumors.

Synowiec, E., Stefanska,J., Morawiec, Z., Blasiak, J., Wozniak, K. Association between DNA damage, DNA repair genes variability and clinical characteristics in breast cancer patients. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.** 2008;648:65-72.

Tan KB, Yong WP, Putti TC: Cyclooxygenase-2 expression: a potential prognostic and predictive marker for high-grade ductal carcinoma in situ of the breast. **Histopathol** 2004, 44:24-28.

THE WASHINGTON MANUAL OF ONCOLOGY.1th ed.Washington: Lippincott-Raven, 2002.

Troyer KL, Lee DC. Regulation of mouse mammary gland development and tumorigenesis by the ERBB signaling network. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2001;6;7.

UICC, **União Internacional de Combate ao Câncer**

Vadlamudi R, Mandal M, Adam L, Steinbach G, Mendelsohn J,

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Kern, S.E., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Nakamura, Y.& White, R.(1989) **Science** 244, 207-211.

Watanabe O, Shimizu T, Imamura H, Kinoshita J, Utada Y, Okabe

Willett, W. C. & Stampfer, M. J. (1990)**Cancer Causes Control** 1, 103-109.

Williams CS, Mann M, DuBois RN: The role of cyclooxygenases

Wulfing P, Diallo R, Muller C, Wulfing C, Poremba C, Heinecke A,

Yamashina, K., Miller, B. E. & Heppner,G. H. (1986) **Cancer Res.** 46, 2396-2401.

Yang X,Yan L,Davidson NE. DNA methylation in breast cancer. **Endocr Relat Cancer** 2001;8:115.

Yoshimura N, Sano H, Okamoto M, Akioka K, Ushigome H, Kadotani Y, Yoshimura R, Nobori S, Higuchi A, Ohmori Y, et al.:Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human breast cancer. **Surg Today** 2003, 33:805-811.

zur Hausen, H. & de Villiers, E.-M.(1994) Annu. Rev. Microbiol. 48, 427-447.

2 is Overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer. Evidence for involvement of AP-1 and PEA3. **J Biol Chem** 2002, 277:18649-18657.

VIII – ANEXO

Bragança Paulista, 23 de Outubro 2007.

****COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Projeto de Pesquisa: Avaliação do estresse oxidativo em pacientes com câncer de mama.

Autor(es): Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro, Simone Felitti

Instituição: Universidade São Francisco

Protocolo CAAE: 0143.0.142.000-07 (Citar este número nas correspondências referentes a este projeto)

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, em reunião ordinária realizada no dia 23 de Outubro 2007, analisou o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: Aprovado

Atenciosamente,



José Pedrazzoli Júnior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisas
Universidade São Francisco

II - TERMO DE CONSENTIMENTO

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Responsável: Marcelo Lima Ribeiro

O abaixo-assinado (nome, idade, RG, endereço) declara que é de livre e espontânea vontade que está participando do projeto de pesquisa supra-citado.

O abaixo-assinado está ciente que:

i - O objetivo da pesquisa é avaliar a influencia do estresse oxidativo ao DNA no desenvolvimento de câncer de mama.

ii. A participação neste estudo não lhe acarretará benefício terapêutico.

iii - Será submetido aos seguintes procedimentos: retirada de três biópsias, sendo uma da região do tumor e outra adjacente a este e uma de tecido normal mamário.

iv - Obteve todas as informações necessárias para poder decidir conscientemente sobre a participação do referido ensaio.

v - Está livre para interromper a participação a qualquer momento, sem que isto lhe acarrete prejuízo ao seu atendimento.

vi - Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, e o HUSF não identificará o paciente por ocasião da exposição e/ou publicação dos mesmos.

vii - Caso surja alguma intercorrência, deverá procurar o serviço de Pronto Socorro do HUSF e solicitar que o mesmo contacte o médico responsável pelo

ensaio clínico (procurar plantonista do pronto socorro da clínica médica ou ginecologia e a posterior a Dra. Simone Felitti).

viii - Poderá contactar o Comiê de Ética em Pesquisa para apresentar recursos ou reclamações em relação ao ensaio clínico (fone 4034-8442).

ix - É condição indispensável para participação no ensaio clínico que esteja em boa saúde, e portanto, não esteja no momento sob tratamento médico ou fazendo uso de quaisquer drogas ou medicações.

x - Poderá contactar o responsável pelo estudo, sempre que necessário pelo telefone 4034-8134.

xi - Este Termo de consentimento é feito em duas vias sendo que uma permanecerá em meu poder e as outras com o pesquisador responsável

Bragança Paulista, de de 200

Nome do Voluntário

Dr. Marcelo Lima Ribeiro