

AValiação DA ATIVIDADE DA PON1, DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL E DAS ENZIMAS HEPÁTICAS EM CÃES COM TUMORES MAMÁRIOS

**CLÁUDIA BEATRIZ DE MELLO MENDES¹; CAMILLA FEDERIZZI VEDANA²;
ANDREIA NOBRE ANCIUTI³; MARIANA TEIXEIRA TILLMANN⁴; ANELIZE DE
OLIVEIRA CAMPELLO FELIX⁵; MÁRCIA DE OLIVEIRA NOBRE⁶**

¹Universidade Federal de Pelotas – claudiabeatrizmm@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – camilla.vedana@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – andreianciuti@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – mariana.teixeira.tillmann@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – anelizecampellofelfelix@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – (CNPq: 305072/2012-9)marciaonobre@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Entre todas as neoplasias, as mamárias são as mais frequentes em mulheres INCA (2012), e em fêmeas caninas (FIGHERA et al. 2008; CASSALI et al.2009). Estudos realizados em cadelas podem ser extrapolados para as mulheres, devido à similaridade nas formas de apresentação destes tumores entre as duas espécies (PINHO et al., 2012). O estabelecimento de metástases, assim como o surgimento de tumores mamários esta relacionado com uma serie de fatores, dentre eles a liberação de radicais livres (PANIS et al., 2011). que são produtos intermediários do metabolismo celular oxidativo, atuando como sinalizadores moleculares vasculares (HALLIWELL, 2006).

A enzima paraoxanase (PON1) é produzida pelo fígado, e é capaz de remover os produtos da peroxidação lipídica FANG (2013), possuindo um papel importante no estresse oxidativo ligado ao surgimento do câncer. Em humanos, já foi relatado que a atividade PON1 é menor nos pacientes com vários tipos de câncer do que nos pacientes controles (BOBIN-DOUBIGEON, 2012). Os níveis da CAT esta diretamente ligada ao fenômeno do surgimento de tumores, sofrendo grande influência da presença de radicais livres (VERA-RAMIREZ, et al, 2011).

A enzima alanina amino transferase (ALT) é uma enzima de extravasamento que fica livre no citoplasma, sua maior concentração é nos hepatócitos de cães e gatos, ela não esta relacionada com a gravidade da lesão e sim com a quantidade de células envolvidas. A enzima aspartato amino transferase (AST) sua maior concentração é nas membranas das mitocôndrias, sendo mais abundante nos hepatócitos e nas células musculares. E a fosfatase alcalina (FA) é uma enzima de indução que é sintetizada no fígado, podendo ser encontrada em diversos tecidos. Estas enzimas são utilizadas na medicina veterinária para a avaliação de lesões hepáticas nos animais (Thrall et al., 2007). O objetivo deste estudo é demonstrar a atividade da PON 1, da capacidade antioxidante total e das enzimas hepáticas, em pacientes com neoplasias mamárias.

2. METODOLOGIA

Este trabalho foi submetido à análise pela CEEA - UFPel e obteve parecer favorável à sua execução (8529). Para a realização deste estudo foram utilizados 17 animais, da espécie canina, fêmeas, onde dez animais apresentavam diagnóstico de neoplasia mamária, cujo o diagnóstico histopatológico fosse de cارسinossarcoma (Grupo Neoplasma), e sete animais hígidos (Grupo Controle), os quais não

apresentavam histórico de nodulações mamárias,. Foram obtidas amostras de sangue imediatamente antes da realização da mastectomia nos animais do grupo Neoplasma, que foram acondicionados em tubos contendo gel ativador de coágulo, e obtido o soro. Este era armazenado em microtubos e mantido congelado a -80°C até o momento das análises.

A atividade da PON1 foi determinada através da técnica do fenilacetato (Sigma – Aldrich). A atividade foi avaliada a partir da taxa de formação de fenol monitorada através da absorbância à 207 nm e 25°C . O reagente de trabalho utilizado é composto por 100 ml de Tampão 20 mM Tris/HCl pH 8.0, contendo 1 mM CaCl_2 e 50 uL de fenilacetato como substrato. As amostras foram diluídas 1 para 3 em Tampão 20 mM Tris/HCl (10 uL de amostra e 20 uL de Tampão) e foi adicionado 3.3 ul desta diluição em 500 uL da solução de trabalho. A leitura foi realizada em espectrofotômetro utilizando cubeta de quartzo, na faixa de 270 nm, 20 seg de tempo de retenção, 1 min de tempo de leitura.

A capacidade antioxidante total foi determinada com o uso do kit comercial “Cayman Antioxidant Assay Kit” (Cayman Chemical Company, 1180 E. Ellsworth Rd. Ann Arbor, MI 48108 - USA), de acordo com as recomendações do fabricante. Brevemente, a capacidade antioxidante total foi aferida através de reação colorimétrica, medida à 405 nm, que avaliou a capacidade dos antioxidantes de inibir a oxidação de ABTS (2,2'-Azino-di-[sulfato-3-ethylbeztiazolina]) pela metamioglobina. A capacidade antioxidante das amostras foi comparada com um padrão (Trolox) e o resultado expresso em equivalente trolox (mM).

Para a avaliação das enzimas ALT, AST e FA, foram utilizados kit's comerciais da Labtest, de acordo com as recomendações do fabricante. E os seus níveis foram determinados através do método cinético-colorimétrico, a leitura foi realizada em espectrofotômetro, com 120 segundos de tempo de leitura. Todas as leituras foram feitas em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média da atividade da PON1 foi significativamente maior nos animais do grupo controle ($p=0,002$), quando comparado ao grupo neoplasma (Figura 1). Em relação a CAT, foi observada diferença significativamente maior ($p=0,003$) nos animais do grupo controle, ao comparar com os animais que apresentaram nodulações (Figura 2). Quanto a avaliação das enzimas ALT e FA, não teve diferença significativa entre os grupos. A avaliação da AST foi significativamente maior no grupo controle ($p=0,03$), ao comparar entre os grupos (Figura 3). Apesar da diferença encontrada nos resultados da enzima AST, não é uma alteração significativa Bush (2004), pois as demais enzimas hepáticas não estão alteradas, indicando que a função hepática não deve estar afetada.

A redução da atividade da PON1 já vem sendo relatada em pacientes humanos com diversos tipos tumorais (KARAMAN et al, 2010). Esta redução ocorre devido ao aumento dos radicais livres no organismo de pacientes, que tem surgimento de tumores (BALCI et al, 2012).. Além dos relatos da sua relação com o surgimento de neoplasmas, já foi observado uma relação com o tempo de sobrevivência de pacientes humanos com câncer de mama e níveis reduzidos da atividade da PON 1 (BOBIN-DUBIGEON et al, 2012). A atividade da PON1 tem sido estudada como um biomarcador do estadiamento do câncer, podendo ser utilizada como uma alternativa de monitoramento dos pacientes (MAFFEI et al, 2011). Em cães, não há até o momento relatos do estudo da PON 1 em pacientes com neoplasmas.

A capacidade antioxidante total representa os níveis de antioxidantes no organismo capazes de inibir a formação e a liberação de radicais livres. Quanto maior a CAT, menor a possibilidade das moléculas resultantes da peroxidação lipídica causarem danos aos organismos, reduzindo as chances do surgimento de tumores (VERA-RAMIREZ et al, 2011). Além disso, em pacientes que já desenvolveram o câncer, há uma maior probabilidade de desenvolvimento de metástases, visto que o estresse oxidativo é um dos responsáveis pelo estabelecimento de novos focos da doença (PANIS et al, 2011). Pacientes humanos que sofrem a remoção cirúrgica do tumor e são submetidos à quimioterapia também tem a sua CAT alterada, pois a medicação induz a liberação de radicais livres (CONKLIN, 2004). Nos cães, o foco é a prevenção do estresse oxidativo, considerando que o tratamento quimioterápico ainda não se mostra eficaz em alguns casos de câncer de mama (SORENMO, 2003).

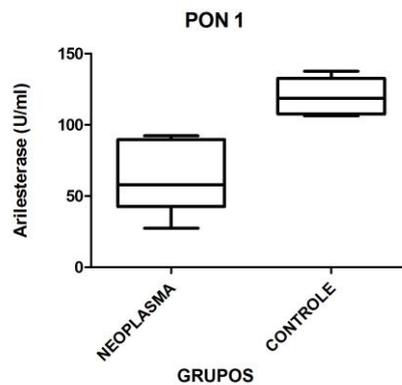


Figura 1: Atividade de PON 1 em cães com neoplasia mamária (Grupo neoplasma) comparado com animais hígidos (Grupo Controle).

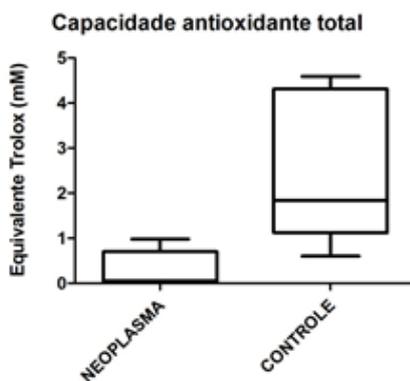


Figura 2: Capacidade antioxidante total em cães com neoplasia mamária (Grupo neoplasma) comparado com animais hígidos (Grupo Controle).

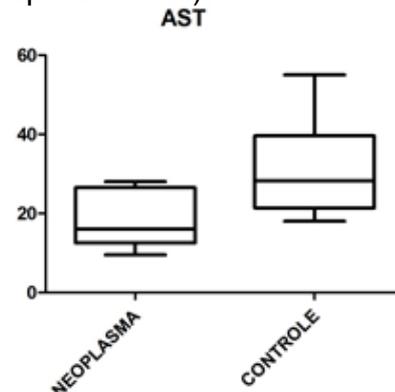


Figura 3: Níveis de aspartato amino transferase (AST) em cães com neoplasia mamária (Grupo neoplasma) comparado com animais hígidos (Grupo Controle).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se, com os resultados obtidos, que a capacidade antioxidante total, e a enzima PON1 estão significativamente reduzidas em cães com neoplasias mamárias. Este resultado indica que o estresse oxidativo está diretamente ligado ao surgimento de tumores mamários.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALCI, H.; GENÇ, H.; PAPILA, C.; CAN, G.; PAPILA, B.; YANARDAG, H.; UZUN, H. Serum Lipid Hydroperoxide Levels and Paraoxonase Activity in Patients With Lung, Breast, and Colorectal Cancer. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. n. 26, p. 155–160, 2012.
- BOBIN-DUBIGEON, C.; JAFFRÉ, I.; JOALLAND, M.P.; CLASSE, J.M.; CAMPONE, M.; HERVÉ, M.; BAR, J. M. Paraoxonase 1 (PON1) as a marker of short term death in breast cancer recurrence. **Clinical Biochemistry**. n. 45, p. 1503–1505, 2012.
- BUSH, B.M. **Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínicos de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2004.
- CASSALI G.D., BERTAGNOLLI A.C., LAVALLE G.E., TAVARES W.L.F., FERREIRA E., SILVA A.E., CAMPOS C.B. Perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of mammary 1181 neoplasms in dogs. **Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress - WSAVA 2009**, 2009.
- CONKLIN, K.A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integrative Cancer Therapies**. n.3, p.294–300, 2004.
- FANG, DAI-HUA; FAN, CONG-HAI; JI, QIANG; QI, BO-XIANG; LI, JUAN; WANG, LU. Differential effects of paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms on cancer risk: evidence from 25 published studies. **Molecular Biology Reproduction** n. 39, p. 6801–6809, 2012.
- FIGHERA R.A., SOUZA T.M., SILVA M.C., BRUM J.S., GRAÇA D.L., KOMMERS G.D., IRIGOYEN L.F.; BARROS C.S.L.. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio Grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 4, p. 223-230. 2008.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology** n.141, p. 312–22, 2006.
- INCA INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. <http://www2.inca.gov.br> acesso em: 17 de abril de 2012.
- KARAMAN, E.; UZUN, H.; PAPILA, I.; BALCI, H.; ALPER, O.; GENÇ, H.; YANARDAG, H.; PAPILA, C. SERUM PARAOXONASE ACTIVITY AND OXIDATIVE DNA DAMAGE IN Patients With Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. **The Journal of Craniofacial Surgery**. n. 6, 2010.
- MAFFEI, FRANCESCA; ANGELONI, CRISTINA; MALAGUTI, MARCO; MORAGA, JUAN MANUEL ZOLEZZI; PASQUI, FRANCESCA; POLI, CAROLINA; COLECCHIA, ANTONIO; FESTI, DAVIDE; HRELIA, PATRIZIA; HRELIA, SILVANA. Plasma antioxidant enzymes and 58 clastogenic factors as possible biomarkers of colorectal cancer risk. **Mutation Research** n. 714, p. 88– 92, 2011.
- PANIS, C.; VICTORINO, V. J.; HERRERA, A.C.S.A.; FREITAS, L.F.; DE ROSSI, T.; CAMPOS, F.C.; COLADO SIMÃO. A.N.; BARBOSA, D.S.; PINGE-FILHO, P.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A.L. B. **Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer**. 2011 DOI: 10.1007/s10549-011-1851-1.
- PINHO, S.S.; CARVALHO, S.; CABRAL, J.; REIS, C.A.; GARTNER, F. **Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis**. 2012 DOI: 10.1016/j.trsl.2011.11.005.
- SORENMO K. Canine mammary gland tumors. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. n. 33, p. 573-596, 2003.
- THRALL, M.A.; BACKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DENICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007.
- VERA-RAMIREZ, L.; ROVIRA, P.S.; RAMIREZ-TORTOSA, M.C.; RAMIREZ-TORTOSA, C.L.; GRANADOS-PRINCIPAL, S.; LORENTE, J.A.; QUILES, J.L. Free radicals in breast carcinogenesis, 59 breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. 2011. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2011.01.004.