



## TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DE MARCADORES OXIDATIVOS EM CÉLULAS DO COLO DO ÚTERO

Tatiana Mugnol<sup>1</sup>, Thais Patricia Hammes<sup>2</sup>, Lara Kochenborger<sup>3</sup>  
Nathalia Billig Garces<sup>3</sup>, Roberta Cattaneo Horn<sup>4</sup>, Janaina Coser

**Palavras-chave:** Estresse Oxidativo. Biomarcadores. Neoplasias do Colo do Útero. Papilomavírus Humano.

### 1 INTRODUÇÃO

Embora necessária para o desenvolvimento do câncer do colo do útero, a infecção genital pelo Papilomavírus Humano (HPV), não é suficiente para levar ao desenvolvimento do tumor. O estresse oxidativo parece ter relação com a carcinogênese cervical atuando como um cofator deste processo, por estimular a integração do HPV ao genoma da célula e induzir desregulação de oncogenes virais durante a progressão do carcinoma cervical. Porém, esta relação ainda é pouco investigada (GONÇALVES et al., 2005; CARRERO et al., 2009; SENEPATI, SENEPATI, DWUBEDI, 2016).

Atualmente, o exame de Papanicolaou é o método utilizado para o rastreamento do câncer de colo de útero, pois possibilita a identificação de lesões precursoras, além de sua fácil execução, baixo custo e aceitação pela população feminina (BRASIL, 2016). No entanto, é preciso avaliar outros fatores ligados ao desenvolvimento da neoplasia cervical, como os marcadores de estresse oxidativo. No entanto, a literatura ainda é escassa quanto ao uso de técnicas que avaliam o perfil oxidativo em amostras obtidas no exame de Papanicolaou. Portanto, o objetivo do presente estudo foi descrever a adaptação de protocolos de técnicas para determinação de marcadores oxidativos em células do colo do útero, sendo eles: Formação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), Proteínas Carboniladas (PCs), Glutathiona Reduzida (GSH), Glutathiona-S-Transferase (GST) e Catalase (CAT).

### 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Como estudo piloto, foram utilizadas três amostras de células do colo do útero para realização e adaptação dos testes para determinação de marcadores oxidativos. Estas amostras foram obtidas de mulheres que realizaram o exame de Papanicolaou em Serviços de Saúde do de um município do Rio Grande do Sul. Este estudo possui aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade de Cruz Alta parecer nº 2.790.225. As amostras cervicais foram coletadas

<sup>1</sup> Biomédica, graduada pela Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. Bolsista PIBITI – CNPq de agosto de 2018 a julho de 2019. E-mail: tatimugnol@hotmail.com

<sup>2</sup> Biomédica, graduada pela Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: paty\_cris18@hotmail.com

<sup>3</sup> Discentes do curso de Biomedicina da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: lara\_0884@hotmail.com; nathaliabgarces@hotmail.com

<sup>4</sup> Pesquisadoras do Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em Saúde - GIPS, Docentes da Universidade de Cruz Alta - Unicruz, Cruz Alta, Brasil. E-mail: rcattaneo@unicruz.edu.br; coser@unicruz.edu.br



utilizando-se escova endocervical, armazenadas em tubo falcon contendo 3mL de Tampão de Fosfato de Potássio (TFK) pH 6,5 e transportadas sob refrigeração para o Laboratório *In vitro* da Unicruz,

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A maioria dos biomarcadores do câncer do colo do útero, exceto o teste molecular do HPV, não são realizados em amostras coletadas durante o exame de Papanicolaou, isto facilitaria o uso na rotina de rastreamento. Alguns estudos relacionaram o estresse oxidativo e o câncer cervical, porém, utilizando amostras sanguíneas e não amostras citológicas cérvico-vaginais (BORGES et al., 2016; MALDONADO, 2008). Em nosso estudo, avaliamos a reprodutibilidade de técnicas já descritas na literatura, utilizadas originalmente para avaliar marcadores de estresse oxidativo em plasma, eritrócitos e tecidos, para determinação destes marcadores em células obtidas no exame Papanicolaou (Quadro 1).

Quadro 1. Descrição dos protocolos e adaptações de TBARS, PCs, GSH, GST e CAT

<u>Técnica</u>	<u>Adaptações realizadas</u>	<u>Protocolo Final</u>
<u>TBARS</u>  BUEGE; AUST, 1978	Quantidade de amostra e de reagentes.  Remoção do descarte de precipitado.  Determinação de proteínas.	Foram pipetados em tubo <b>400µL de amostra, 100µL de TCA 10% e 500µL de TBA 0,67%</b> , os quais foram incubados em banho-maria (100°C) por 15 minutos e após centrifugados por 15 minutos. A leitura foi realizada em 535nm. Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína. Os <b>níveis proteínas totais</b> foram determinados por meio de <b>espectrofotômetro NanoDrop® 2000 Thermo Scientific</b> .
<u>PCs</u>  LEVINE, 1990	Diluição da amostra.  Determinação de proteínas.	<b>150µL de amostra</b> foram diluídos em <b>1.350µL de HEPES</b> (20mM pH 7,2). Em outro tubo, foram pipetados <b>750µL da diluição inicial e 750µL de água destilada</b> . Com esta segunda diluição foi realizada a dosagem das proteínas carboniladas, cada amostra possuía um branco. Inicialmente, foram pipetados 500µL da diluição e 250µL de TCA 10% no teste e da mesma forma no branco, o material foi centrifugado por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante desprezado. Em seguida, foram pipetados 250µL de HCl 2M no branco e 250µL de 2,4 DNP 10Mm no teste e realizada incubação, no escuro por 30 minutos, agitando por 20 segundos no vórtex a cada 5 minutos. Após essa etapa, foram pipetados 250µL de TCA 10% no branco e no teste e mais 250µL de 2,4 DNP 10Mm no teste. Novamente o material foi centrifugado por 5 minutos a 3.000 rpm e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi lavado duas vezes com 500µL de etanol, para então adicionar 1.500µL de SDS a 3% no branco e no teste e incubá-los em banho-maria a 37°C por 10 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro visível em 370 nm, foram utilizados 1.500µL de SDS 3% para zerar o aparelho. Os resultados foram expressos por nmol de proteína carbonilada/mg de proteína total.  Os níveis proteínas totais foram determinados por meio de espectrofotômetro NanoDrop® 2000 Thermo Scientific.



<b>GSH</b> ELLMAN, 1959	Quantidade de amostra.	50µL de amostra e 750µL de tampão fosfato de potássio (1M pH 7,4), esse material foi transferido para a cubeta e 50µL de DTNB 10mM foram adicionados, agitando e lendo imediatamente em 412nm. Foram utilizados 850µL de TFK (1M pH ,4), 100µL de água destilada e 50µL de DTNB 10mM para o branco. Os resultados foram expressos em µmol GSH/mL.
<b>GST</b> HABIG; PABST; JAKOBY, 1974	Quantidade de amostra.	2,5mL de TFK pH 6.5, 300µL de GSH e 100µL de amostra, esse material foi transferido para a cubeta e homogeneizado para zerar o aparelho. Em seguida, foram adicionados 150µL de CDNB, homogeneizado e iniciada a leitura em 340nm, em intervalos de 10 em 10 segundos. Os resultados foram expressos por µmol GS-DNB/min/mg proteína
<b>CAT</b> NELSON; KIESOV, 1972.	Quantidade de amostra.  Determinação de proteínas.	2mL de tampão fosfato de potássio e 20µL de amostra, esse material foi homogeneizado e com ele zerou-se o espectrofotômetro. Após, 50µl de solução de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , preparado na hora, foram adicionados na cubeta e a leitura realizada, por 1 minuto de 10 em 10 segundos em 240nm. A atividade da CAT foi calculada e expressa em nmol/mg ptn/min.

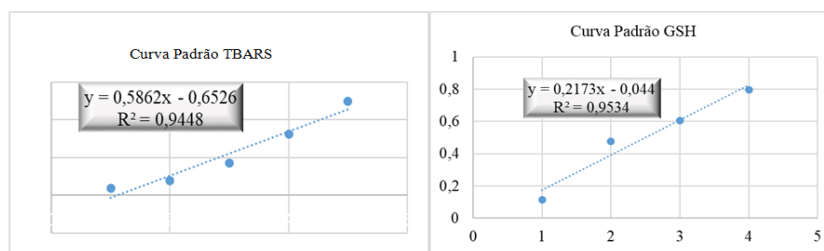
Fonte: autores (2019).

A realização da curva padrão (Quadro 2) possibilitou o cálculo do Fator de Correção do Malonil-Dialdeído (FCM), o qual obteve o valor de 4,008, o ideal é que este esteja entre os valores de 3 e 6, portanto obteve um valor adequado (BUEGE; AUST, 1978). Além disso o R<sup>2</sup> encontrado foi 0,9448 (Figura 1), indicando que o modelo está ajustado à amostra, pois o R<sup>2</sup> é uma medida de ajustamento de um modelo estatístico linear generalizado em relação aos valores observados (LOESCH; HOELTGEBAUM, 2017). Em relação a GSH, o Fator de Calibração (FC) encontrado foi 0,08625, sendo que os FC aceitos ficam entre 0,08 e 0,15 (ELLMAN, 1959), e o R<sup>2</sup> foi 0,9534.

Quadro 2. Curva Padrão TBARS e GSH

Curva Padrão TBARS		Curva Padrão GSH	
Concentração	Absorbância	Concentração	Absorbância
25 µl	0,181	10 µl	0,116
50 µl	0,389	25 µl	0,477
100 µl	0,847	50 µl	0,607
200 µl	1,613	100 µl	0,797
400 µl	2,5	10 µl	0,116

Figura 1. Curva Padrão TBARS e GSH





## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas foram reprodutíveis para avaliar os marcadores TBARS, PCs, GSH, GST e CAT em células do colo do útero obtidas pelo exame de Papanicolaou.

## REFERÊNCIAS

BORGES, BES et al. **Estresse oxidativo associado à infecção pelo HPV e às lesões precursoras do câncer de colo uterino em mulheres ribeirinhas**. Dissertação de mestrado (Medicina tropical) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Diretrizes Brasileira para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero. Rio de Janeiro, 2016.

BUEGE, J. A; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 302-310, 1978.

CARRERO, Y. et al. Increased vascular endothelial growth factor expression, CD3-positive cell infiltration, and oxidative stress in premalignant lesions of the cervix. **Cancer**. v.115, n.16, p.3680-3688, 2009.

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

GONÇALVES, T. L et al. Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. **Clin Biochem.**, v. 38, n. 12, p. 1071-1075, 2005.

HABIG, W. H; PABST, M. J; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 464-478, 1990.

LOESCH, C.; HOELTGEBAUM, M. **Métodos estatísticos multivariados**. Editora Saraiva, 2017.

MALDONADO, P. A. **Avaliação do perfil oxidativo e da atividade de ectoenzimas em pacientes com neoplasia intra-epitelial cervical**. Tese de Doutorado (Bioquímica toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2008.

NELSON, D. P; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). **Analytical biochemistry**, v. 49, n. 2, p. 474-478, 1972.