UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Nutrição e origem fetal do câncer de mama: efeito da deficiência ou suplementação com zinco no período gestacional de camundongos na suscetibilidade da progênie à carcinogênese mamária

(Versão original)

Raquel Santana da Cruz

SÃO PAULO, 2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

Nutrição e origem fetal do câncer de mama: efeito da deficiência ou suplementação com zinco no período gestacional de camundongos na suscetibilidade da progênie à carcinogênese mamária

(Versão Original)

Raquel Santana da Cruz

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Thomas Prates Ong

SÃO PAULO, 2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cruz, Raquel Santana da
C957n Nutrição e origem fetal do câncer de mama: efeito da deficiência ou suplementação com zinco no período gestacional de camundongos na suscetibilidade da progênie à carcinogênese mamária / Raquel Santana da Cruz. - São Paulo, 2016.
94p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Orientador : Ong, Thomas Prates

1. Nutrição experimental : Ciências dos alimentos I. T. II. Ong, Thomas Prates, orientador.

641.1 CDD

Raquel Santana da Cruz

Nutrição e origem fetal do câncer de mama: efeito da deficiência ou suplementação com zinco no período gestacional de camundongos na suscetibilidade da progênie à carcinogênese mamária

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. Thomas Prates Ong

_____

Orientador/Presidente

_____

1o. examinador

_____

2o. examinador

_____

3o. examinador

_____

4o. examinador

São Paulo, _____ de janeiro de 2016.

Dedicatória

Com Amor

Dedico esta tese a minha mãe Margarida Santana Silva, aos meus irmãos Silvia Santana e Marcelo pelo amor, carinho, incentivo e compreensão.

Ao meu orientador Dr. Thomas Prates Ong pela amizade, paciência, carinho e dedicação.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pois durante todo o tempo Ele esteve ao meu lado, renovando as minhas forças, me capacitando, e sendo fiel para comigo.

A minha querida e adorada Mãe. Por ser um grande exemplo. Pelo incentivo e disposição de lutar sempre por meus sonhos, apoio incondicional e grande Amor.

À FAPESP (Processo Fapesp: 2013/04960-9) e CAPES pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Dr. Thomas Prates Ong por incentivar o desenvolvimento de pesquisa e a formação do conhecimento científico. Muito obrigado pela confiança, colaboração e oportunidade que possibilitou meu ingresso a vida científica. Assim, como todo o apoio proporcionado para construção e evolução deste trabalho.

Ao Professor Dr. Luís Fernando Barbisan pelo exemplo, colaboração, acolhimento em seu laboratório, e viabilização de análises metodológicas do projeto.

Ao Professor Dr. Pedro de Oliveira Vitoriano por todo crédito. Pela colaboração, disponibilidade e paciência em compartilhar e contribuir com fundamentos científicos para o bom desenvolvimento do projeto.

Ao Professor Dr. Fernando Salvador Moreno por todo crédito em relação ao meu ingresso no programa e intercâmbio de conhecimento em disciplinas.

A Dra Fábia de Oliveira Andrade pelo carinho e grande amizade, dedicação, pelo exemplo e companheirismo irrestrito em momentos difíceis, e pela disponibilidade constante em ajudar no bom desenvolvimento do projeto.

A toda equipe do laboratório de Nutrigenômica e Programação e por todo incentivo, amizade e colaboração. Em especial, Camile Castilho, Gabriela Rezende Costa, Luiza Guido, Mariana Rosim e Vanessa Cardoso Pires por toda contribuição, amizade construída e grande carinho.

Á toda equipe do Laboratório Dieta, Nutrição e Câncer da FCF/USP por todo apoio. Em especial a Mayara Lilian Paulino Miranda pela amizade, e constante disponibilidade em ajudar na realização de procedimentos essenciais para a realização do projeto. Pela parceria na realização de cursos e disciplinas e por todo conhecimento compartilhado.

Á toda equipe do Laboratório de Desenvolvimento de Alimentos Funcionais. Em especial a Professora Dra Inar Alves de Castro pela dedicação, orientação e amizade.

Á toda equipe do Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL) por todo apoio técnico-científico. Em especial à Professora Dra Mari Cleide Sogayar por ser um grande exemplo profissional, pelo carinho e colaboração. As pesquisadoras Ana Claudia O Carreira, Camila Leal Lopes da Silva, Marina Trombeta Lima e

Marluce da Cunha Mantovani pelo carinho, pela dedicação e compartilhamento de conhecimentos científicos.

Ao Claudio Marcos Vigna pela amizade ao longo destes anos. Pela paciência e contribuição em momentos de muito trabalho. Agradeço por ter me fortalecido em momentos de grandes obstáculos vividos. E pela ajuda no desenvolvimento de algumas etapas do trabalho.

Á toda equipe do Biotério, em especial a Silvana M.P. Neves, Flávia de Moura Prates, Fátima, Renata Spalutto Fontes e Silvia Gomes Novo por toda dedicação no período de treinamento em reprodução animal. Por toda ajuda e contribuição técnica e científica ao longo da realização do ensaio biológico.

Ao departamento de Ciência dos Alimentos da Faculdade de Ciência Farmacêutica da Universidade de São Paulo pela frequente disposição em colaborar.

As minhas amigas Ana Cristina, Graziela Rosa Ravacci, Erica Molina, Maria Fernanda Forni, Rosangela Wailemann pela grande amizade e carinho.

Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida,
Esses são os imprescindíveis.

"In praise of Fighters", song from the play
"The Mother", 1930 (Bertolt Brecht)

RESUMO

SANTANA, R.C. **Nutrição e origem fetal do câncer de mama: efeito da deficiência ou suplementação com zinco no período gestacional de camundongos na suscetibilidade da progênie à carcinogênese mamária**. 2016. 94p. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Universidade de São Paulo, 2016.

O câncer de mama é um importante problema de saúde pública, sendo o mais frequente em mulheres no mundo. A alimentação influencia diretamente o desenvolvimento do câncer de mama. Assim, por exemplo, dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (AGPI ω-3), flavonóides, vitaminas A e E, bem como em minerais, incluindo selênio e zinco, têm sido associadas a redução de risco desta neoplasia. Neste contexto, zinco tem-se destacado por regular mecanismos celulares e moleculares como reparo de DNA, controle de ciclo celular e controle de fatores transcricionais. Uma hipótese pouco descrita na literatura, ainda que biologicamente plausível, aponta a origem do câncer de mama já na vida intrauterina, período em que a glândula mamária estaria mais suscetível à influência da alimentação e níveis hormonais maternos. A dieta materna no período gestacional parece ter importante influência na modulação do ambiente intrauterino e, consequentemente, na programação do risco de desenvolvimento do câncer de mama na progênie. Assim, fatores dietéticos e níveis hormonais poderiam induzir modificações na morfologia da glândula mamária durante as fases iniciais do desenvolvimento, alterando, assim, o risco para o desenvolvimento do câncer de mama. Do ponto de vista molecular, a modulação inadequada do epigenoma no início da vida pode ter implicações para os descendentes ao longo da vida, modificando a suscetibilidade ao risco de doenças crônicas não transmissíveis, incluindo o câncer de mama. Sugere-se que a exposição, durante o período fetal, ao zinco parece também modular a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Dessa forma, propôs-se avaliar se o zinco representa fator dietético que modula o risco de câncer de mama já no início da vida. Camundongos fêmeas C57BL/6 foram expostas, durante a gestação, a dieta controle (AIN-93G; grupo CO); dieta deficiente em zinco (8 ppm; grupo ZND) e dieta suplementada com zinco (45 ppm; grupo ZnS). Neoplasias mamárias foram induzidas na prole feminina com 6 semanas de idade com a administração subcutânea de 15 mg de medroxiprogesterona, seguida pela administração oral de 1 mg 7,12-dimetilbenz [a] antraceno uma vez por semana durante 4 semanas. As glândulas mamarias da prole feminina com 7 semanas de idade não iniciadas, de todos os grupos, foram usadas para análise morfológica, proliferação celular, apoptose e análise molecular. Em relação a prole feminina do grupo CO, a do ZnS apresentou aumento ($p<0,05$) da incidência final de neoplasias mamária, proliferação celular (Ki67) e apoptose. A expressão da proteína p21 foi maior ($p=0,06$) no grupo ZnS em relação ao grupo CO. Em relação a prole do grupo ZnD, ZnS apresentou maior ($p<0,05$) nível de expressão da proteína p53. Sem diferença ($p>0,05$) em relação a estas variáveis entre o grupo CO e ZnD. Em relação a prole femina do grupo CO, ZnS apresentou aumento ($p=0,08$) marginal da expressão dos genes RASSF1 e STAT3. Em relação a prole feminina do grupo ZnD, ZnS apresentou maior ($p=0,02$) expressão de ZPF382. H3K9me3 e H4K20me3 foram regulados positivamente ($p<0,05$) na glândula mamária da prole feminina do grupo ZnD em relação aos grupos CO e ZnS. A suplementação com zinco, mas não a deficiência, no início de vida foi associado com aumento da susceptibilidade de câncer de mama na vida adulta.

Palavras-chave: Câncer de mama; Programação Fetal; Nutrigenômica; Epigenética; e Zinco.

ABSTRACT

SANTANA, R.C. **Nutrition and fetal origin of breast cancer: effect of zinc deficiency or supplementation during gestational phase of mice on offspring's susceptibility to mammary carcinogenesis.** 2016. 94p. PhD Thesis. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, 2016.

Breast cancer is an important public health problem, representing the main cause of women death worldwide. Dietetic factors, such as omega-3 fatty-acids, flavonoids, vitamins A and E, and micronutrients have been associated with the reduction of breast cancer risk. Zinc is a micronutrient of remarkable importance for health, essential for several cellular mechanisms, which may influence the development of breast cancer through epigenetic mechanisms, among others. A hypothesis not frequently addressed in the literature, although biologically plausible, considers the fetal origin of breast cancer, a developmental stage in which the mammary gland would be more sensitive to the influence of maternal diet and hormone levels. The maternal diet during pregnancy seems to have significant influence in the modulation of the intrauterine environment and, consequently, in programming the risk of development of breast cancer in offspring through the induction of morphological and molecular changes. The inadequate modulation of the epigenome in early life may have implications for the offspring throughout life, modulating the susceptibility to the risk of chronic diseases, including breast cancer. The exposure during the fetal period, to zinc, seems also to modulate the susceptibility to the development of chronic diseases, such as cardiovascular diseases and renal dysfunctions. Thereby, it would be interesting to evaluate the effects of zinc deficiency or supplementation in maternal diet during pregnancy period in the susceptibility of breast cancer in offspring. In this context, we propose to evaluate if zinc is a dietary factor that may modify the risk of breast cancer during early life, by modulation of morphological, molecular and epigenetic events. C57BL/6 female mice consumed during pregnancy control diet (AIN-93G; CO group); zinc-deficient diet (8 ppm; ZnD group) and zinc-supplemented diet (45 ppm; ZnS group). Mammary tumors were induced by subcutaneous administration of 15mg of medroxyprogesterone to 6-week-old female offspring, followed by oral administration of 1mg 7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene once-a-week for 4 weeks. Non-initiated mammary glands of 7-week-old female offspring from all groups were used to morphological, cell proliferation, apoptosis and molecular analysis. Compared to CO group offspring, ZnS presented increased ($p<0.05$) mammary tumor incidence, cell proliferation (Ki67) and apoptosis. Expression levels of p21 protein was higher ($p=0.06$) in ZnS compared to the CO group. Compared to ZnD group offspring, ZnS showed higher ($p<0.05$) expression level of p53 protein. There were no differences ($p\geq0.05$) concerning these variables between CO and ZnD group. Compared to CO offspring group, ZnS also showed marginal increased ($p=0.08$) expression of RASSF1 and STAT3 genes. Compared to ZnD offspring group, ZnS showed higher ($p=0.02$) expression of ZPF382. H3K9me3 and H4K20me3 were upregulated ($p<0.05$) in the mammary gland of ZnD female offspring compared to CO and ZnS groups. Thereby, zinc-supplementation, but not zinc-deficiency, in early-life was associated with an increased susceptibility to breast cancer development in adulthood.

Keywords: Breast cancer, zinc, supplementation, deficiency, programming, epigenetic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: PROGRESSÃO DO CÂNCER DE MAMA. 22
FIGURA 2: IMAGEM REPRESENTATIVA DA ESTRUTURA DOS BROTOS TERMINAIS (TEBS) DA GLÂNDULA MAMÁRIA. 25
FIGURA 3: MECANISMOS EPIGENÉTICOS. 28
FIGURA 4: ASSOCIAÇÃO DO DOMÍNIO REPRESSOR *KRÜPPEL-ASSOCIATED BOX* (KRAB) A PROTEÍNA KAP-1 E REGULAÇÃO DE MECANISMOS EPIGENÉTICOS. 30
FIGURA 5: PAPEL DO LMO4 NA REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR E PROGRESSÃO DE NEOPLASIA MAMÁRIA. 31
FIGURA 6: DESENHO EXPERIMENTAL 40
FIGURA 7: INGESTÃO CALÓRICA (KCAL) DIÁRIA DAS FÊMEAS DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL.. 53
FIGURA 8: ESTIMATIVA DO CONSUMO DIÁRIO DE ZINCO DE FÊMEAS DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS. REPETIDAS. 54
FIGURA 9: CONSUMO CALÓRICO DA PROLE FEMININA DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS.. 56
FIGURA 10: ESTIMATIVA DO CONSUMO DIÁRIO DE ZINCO DA PROLE FEMININA DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS.. 57
FIGURA 11: CURVA GLICÊMICA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS. 57
FIGURA 12: MORFOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA. FOTOMICROGRAFIA REPRESENTATIVA DAS TEBS [40X]. 60
FIGURA 13: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE KI67 POR IMUNOISTOQUÍMICA E P21 POR WESTERN BLOT. FOTOMICROGRAFIA (40X) DA MARCAÇÃO COM KI67 E QUANTIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR NA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS 61
FIGURA 14: ANÁLISE DE APOPTOSE E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P53 POR WESTERN BLOT. FOTOMICROGRAFIA (40X) COLORAÇÃO DE H&E E QUANTIFICAÇÃO DE APOPTOSE NA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS. 62
FIGURA 15: NÍVEIS DE MRNA DE (A) RASSF1, (B) ZNF382, (C) STAT3, (D) C-MYC, (E) LMO4 NA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE. 63
FIGURA 16: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA HISTONA H3K9 POR IMUNOISTOQUÍMICA. FOTOMICROGRAFIA (40X) DA MARCAÇÃO (A) E QUANTIFICAÇÃO (B) DA EXPRESSÃO DA H3K9 NA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS.. 64

FIGURA 17: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA HISTONA H3K27 POR IMUNOISTOQUÍMICA. FOTOMICROGRAFIA (40X) DA MARCAÇÃO (A) E QUANTIFICAÇÃO (B) DA EXPRESSÃO DA H3K27ME3 NA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS. 65
FIGURA 18: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA HISTONA H4K20 POR IMUNOISTOQUÍMICA. FOTOMICROGRAFIA (40X) DA MARCAÇÃO (A) E QUANTIFICAÇÃO (B) DA EXPRESSÃO DA H4K20 NA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS. 66
FIGURA 19: INCIDÊNCIA DA PROLE FEMININA COM NEOPLASIAS MAMÁRIAS DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS. 67
FIGURA 20: FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DOS TIPOS HISTOLÓGICOS DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS DA PROLE FEMININA DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS: A) ADENOCARCINOMA TIPO A; B) ADENOCARCINOMA TIPO B; C) ADENOCARCINOMA TIPO C; D) ADENOACANTOMA; E) CARCINOSSARCOMA CORADAS COM H&E (10X). 69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO CONTROLE COM BASE NA AIN93-G. 41
TABELA 2: COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO AIN93-M. 41
TABELA 3: SONDAS UTILIZADAS NAS ANÁLISES DE AMPLIFICAÇÃO DOS GENES POR PCR EM TEMPO REAL 48
TABELA 4: VARIÁVEIS DO NASCIMENTO DA PROLE E DESMAME DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS. 55
TABELA 5: PESO RELATIVO DE ÓRGÃOS DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS. 58
TABELA 6: GANHO DE PESO, CONCENTRAÇÃO DE ZINCO NO PLASMA, ERITRÓCITOS E FÍGADO DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS. 59
TABELA 7: LATÊNCIA, MULTIPLICIDADE E TAMANHO DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS DA PROLE FEMININA DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS. 68
TABELA 8: HISTOPATOLOGIA DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS DA PROLE FEMININA DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABs Botões Alveolares
AGPI Ácidos Graxos Poliinsaturados
AGPI ω-3 Ácidos Graxos Poliinsaturados Ômega 3
AGPI ω-6 Ácidos Graxos Poliinsaturados Ômega 6
BHT Butil-hidróxido-tolueno
BSA Bovine sérum albumin
cDNA DNA complementar ao mRNA
CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais
CO Grupo Controle
CO Ração Controle
DAB Diaminobenzidina
DEF Ração com deficiência de zinco
DMBA 7,12-Dimetilbenz(a)antraceno
DNA Ácido desoxirribonucleico
DNMT DNA metiltransferase
dNTPs Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
E1 Eutanásia da prole feminina com 50 dias de idade
E2 Eutanásia da prole feminina com 175 dias de idade
ECL Enhanced chemiliminescence
ER Receptor de estrógeno
FAM Amidita de Fluoresceína
GAPDH Gliceraldeído desidrogenase-3 fosfatase
GF-AAS Espectrofotometria por Absorção Atômica de Chama com Forno de Grafite
GPx Glutationa peroxidase
HAT Histona acetiltransferase
HDAC Histona deacetilase
HER Humam Epidermal Growth Factor Receptor
HMT Histona metiltransferase
HNO_3 Ácido Nítrico
HP1 Heterochromatin Protein 1
H&E Hematoxilina e eosina
IDP Proliferação intraductal

INCA	Instituto Nacional do Câncer
IOD	Densidade óptica integrada
KAP1	KRAB-associated protein 1
KDa	Quilo Dalton
Kg	Quilograma
KRAB	Krüppel-associated box
LMO4	LIM domain only 4
MDA	Malondialdeído
miRNA	microRNA
MNU	N-metil N-nitrosúreia
MPA	Acetato de Medroxiprogesterona
MT	Metalotioneínas
NaOH	Hidróxido de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	Polyacrilamide gel eletrophoresis
PBS	Phosphate buffered saline
PBT	PBS adicionado de Tween-20 (0,1 %, v/v)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PPM	Parte por milhão
RASSF1	Ras association domain family 1
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SETDB1	SET domain, bifurcated 1
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SUPL	Ração com suplementação de zinco
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TDLUs	Unidade Terminal Ducto Lobular
TEBs	Brotos Terminais
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UR	Umidade Relativa
ZnD	Grupo com Deficiência de Zinco
ZNF	Zinc Finger (Dedos de Zinco)

ZnS Grupo com Suplementação de Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 22

2.1 CÂNCER DE MAMA 22
2.2 ORIGEM DESENVOLVIMENTISTA DO CÂNCER DE MAMA 23
2.2.1 Desenvolvimento da glândula mamária 24
2.2.2 Nutricao no inicio da vida, regulação epigenética e risco de câncer de mama 27
2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS NA CARCINOGÊNESE MAMÁRIA 31
2.4 ZINCO E CÂNCER DE MAMA 32
2.5 ZINCO E PROGRAMAÇÃO FETAL 35

3. OBJETIVOS 37

3.1. OBJETIVO GERAL 37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 37

4. MATERIAL E MÉTODOS 38

4.1. ANIMAIS 38
4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 38
4.3. RAÇÕES OFERTADAS DURANTE A FASE EXPERIMENTAL DO ESTUDO 40
4.4 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE NA PROLE FEMININA DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS 42
4.5 EUTANÁSIA DA PROLE FEMININA DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS 42
4.7 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO NO PLASMA E NO FÍGADO DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS 44
4.8 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS 44
4.9 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR NA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS 45
4.10 APOPTOSE NA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS 46
4.11 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA NA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS 46
4.11.1 Extração de RNA 46
4.11.2 Conversão do RNA para cDNA pela enzima transcriptase reversa 47
4.11.3 Amplificação dos genes LMO4, RASSF1, ZPF382, STAT3 e c-MYC por qRT-PCR 47
4.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS P21 E P53 NA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS 49
4.13 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE TRIMETILAÇÃO DE HISTONAS NA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS POR IHC 50

4.14 INDUÇÃO DA CARCINOGÊNESE MAMÁRIA NA PROLE FEMININA DOS GRUPO CO, ZND E ZNS 51
4.15 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS DA PROLE FEMININA DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS POR MEIO DE COLORAÇÃO POR H&E 52
4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA 52

5. RESULTADOS 53

5.1. EFEITO DA DEFICIÊNCIA OU SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL..... 53
5.2. ESTIMATIVA DA INGESTÃO DIÁRIA DE ZINCO DE FÊMEAS DOS GRUPOS CO, ZND E ZNS 53
5.3 EFEITO DA DEFICIÊNCIA OU SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO EM VARIÁVEIS GESTACIONAIS 54
5.4 EFEITO DA DEFICIÊNCIA OU SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL EM VARIÁVEIS DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE 56
5.4.1 Ingestão calórica da prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS 56
5.4.2 Estimativa da ingestão diária de zinco da prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS. 56
5.4.3 Curva glicêmica da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS 57
5.4.4 Peso relativo de órgãos da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS ... 58
5.4.4 Avaliação do peso corporal, concentração de zinco e MDA no plasma, eritrócitos e fígado da prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS 58
5.5. EFEITO DA DEFICIÊNCIA OU SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL NO DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE 59
5.6 EFEITO DA DEFICIÊNCIA OU SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL NA PROLIFERAÇÃO CELULAR E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P21 NA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE 60
5.7 EFEITO DA DEFICIÊNCIA OU SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL NA APOPTOSE E EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P53 NA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE 61
5.8 EFEITO DA DEFICIÊNCIA OU SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL NA EXPRESSÃO DE GENES NA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE 62
5.9 EFEITO DA DEFICIÊNCIA OU SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL NA EXPRESSÃO DE HISTONAS NA GLÂNDULA MAMÁRIA DA PROLE FEMININA COM 7 SEMANAS DE IDADE 63
5.10 EFEITO DA DEFICIÊNCIA OU SUPLEMENTAÇÃO COM ZINCO DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL NA CARCINOGÊNESE MAMÁRIA QUIMICAMENTE INDUZIDA NA PROLE FEMININA 66

6. DISCUSSÃO 71

7. CONCLUSÃO 76

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 77

ANEXO – TERMO DO COMITÊ DE ÉTICA DO USO **DE ANIMAIS DA FCF/USP 94**

1. INTRODUÇÃO

Uma hipótese que vem ganhando destaque na comunidade científica aponta a origem do câncer de mama já na vida intrauterina, período em que a glândula mamária estaria mais sensível à influência da alimentação e níveis hormonais maternos (BURDGE G.C., LILLYCROP K.A., JACKSON A.A., 2009). Trichopoulos (1990) estabeleceu a hipótese de que mulheres expostas a elevadas concentrações de estrógeno durante o período fetal estariam mais predispostas ao desenvolvimento do câncer de mama na idade adulta. Nesse sentido, filhas de mulheres que utilizaram o dietilestilbestrol (estrógeno sintético) no período gestacional, para evitar aborto espontâneo, apresentaram maior suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama (SANDERSON M. et al., 1998; PALMER J.R. et al., 2006).

A dieta materna no período gestacional parece ter importante influência na modulação do ambiente intrauterino e, consequentemente, na programação do risco de desenvolvimento do câncer de mama na progênie (YU B. et al., 2006). Diante da alta prevalência do câncer de mama e de evidências de sua possível origem fetal, tem-se buscado em nível epidemiológico e experimental elucidar a associação da nutrição materna durante o período gestacional e o risco de desenvolvimento de câncer de mama na progênie feminina (HILAVIKI-CLARKE L. et al, 1997; LILLYCROP K.A. et al., 2005; ASSIS S. et al., 2012;).

Evidências sugerem que fatores dietéticos e níveis hormonais poderiam induzir modificações na morfologia da glândula mamária durante as fases iniciais do desenvolvimento (HILAKIVI-CLARKE L., 2007*)*. Neste contexto, em períodos precoces da vida a glândula mamária estaria mais sensível à influência da alimentação (MICHELS K.B. et al., 2007; MESSINA M., HILAVIKI-CLARKE L., 2009). Isso porque o período embrionário é caracterizado por extensa reprogramação epigenética, por meio de desmetilação e metilação *de novo* (MICHELS K.B., XUE F., 2006; DELAGE B., DASHWOOD R.H., 2008).

Assim, a modulação inadequada do epigenoma no início da vida pode ter implicações para os descendentes ao longo da vida, modificando a suscetibilidade ao risco de doenças crônicas não transmissíveis, incluindo o câncer de mama (MARET W., SANDSTEAD H.H., 2008; MISTRY H.D., WILLIANS P.J., 2011). Tem-se voltado, nesse sentido, a atenção para o impacto da alimentação materna na modulação do epigenoma fetal, no contexto da programação do risco para tais doenças (HILAKIVI-

CLARKE L., ASSIS S., 2006; BURDGE, LILLYCROP, JACKSON, 2009; CHIAM et al., 2009). Mais especificamente, sugere-se que a modulação de mecanismos epigenéticos por fatores nutricionais sejam responsáveis por alterações na morfologia da glândula mamária e, consequentemente, aumento da suscetibilidade ao câncer de mama (HILAKIVI-CLARKE L., ASSIS S., 2006; BURDGE G.C., LILLYCROP K.A., JACKSON A.A., 2009).

Nesse sentido, estudos na área de nutrição e origem fetal do câncer de mama contemplando o potencial envolvimento de fenômenos epigenéticos ainda são restritos. Por exemplo, *in vivo*, observou-se a perda de metilação do promotor do gene para receptor de estrógeno (ER) na glândula mamária de ratas expostas *in útero* a dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados ômega 6 (AGPI ω-6), associada ao maior risco para câncer de mama na idade adulta (YENBUTR B., HILAKIVI-CLARKE L., PASSANITIA A., 1998).

Tem-se demonstrado que dieta rica em flavonoides, vitamina A e E, e micronutrientes essenciais, como o zinco, têm sido considerados agentes promissores do câncer por modular eventos epigenéticos (MARET W., SANDSTEAD H.H., 2008). Nesse sentido, a exposição ao zinco durante o período fetal parece também modular a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (TOMAT A. et al., 2010).

Dessa forma, faz-se necessário avaliar se o zinco representa um fator dietético que possa modificar o risco de câncer de mama já no início da vida. Objetivou-se avaliar se o zinco representa um fator dietético que possa modificar o risco de câncer de mama já no início da vida, por modulação de eventos moleculares e epigenéticos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer de mama

O câncer de mama é um importante problema global de saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Instituto Nacional do Câncer (INCA) este é o câncer mais frequente em mulheres no mundo, sendo a principal causa de morte por câncer nas mulheres, com aproximadamente, 14.207 mil mortes estimadas para o ano de 2014 (WHO, 2015; INCA 2015). No Brasil as estimativas para o ano de 2014 foram de 57.120 casos de câncer de mama, com risco estimado de 56,09 novos casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2015).

A história natural do câncer envolve progressão através de estágios clínicos e patológicos bem definidos, onde alterações genéticas e epigenéticas levam células luminais epiteliais a adquirir fenótipos que permitem uma rápida proliferação, com subsequente evolução para carcinoma *in situ* e invasivo, e por fim metástase (Figura 1). As neoplasias mamárias são altamente heterogêneas em níveis clínicos e moleculares, e análises do perfil global da expressão gênica de amostras neoplásicas revelaram cinco subtipos: *basal-like*, luminal A, luminal B, $HER2^{+}/ER^{-}$, e normal *breast-like* (PEROU C.M. et al., 2000; POLYACK K., 2007; SALHIA B. et al., 2011).

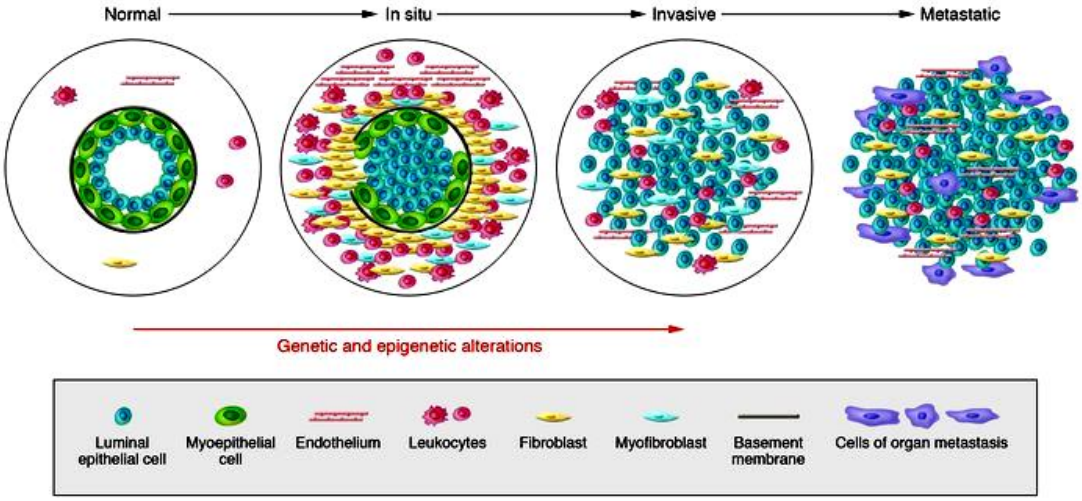


Figura 1: Progressão do Câncer de Mama. Fonte: POLYACK K., 2007.

A etiologia exata do câncer de mama ainda permanece desconhecida (POLYACK K., 2007). Neste contexto, alguns fatores têm sido associados à identificação de grupos de alto risco, incluindo menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação, utilização de anticoncepcionais orais, menopausa tardia, terapias de reposição hormonal, e histórico familiar (INCA, 2015). Outros fatores de riscos relacionados ao estilo de vida incluem ingestão de álcool, tabagismo, sedentarismo, obesidade e a alimentação, que é um fator de destaque no desenvolvimento do câncer de mama (DAVIS C.D., MILNER J.A., 2007; MARTIN-MORENO J.M., SOERJOMATARAM I., MAGNUSSOM G., 2008; BALLARD-BARBASH R. et al., 2009).

2.2 Origem desenvolvimentista do câncer de mama

O risco para o câncer de mama pode ser pré-determinado, ainda, durante o período fetal (GODFREY K.M., BARKER D.J.P., 2000; ASSIS S., KHAN G., HILAKIVI-CLARKE L., 2006; LANGLEY-EVANS S.C., McMULLEN S., 2010). Barker e colaboradores propuseram no final da década de 1980 a hipótese do fenômeno de programação fetal de doenças, como cardiovasculares, obesidade e diabetes. (BARKER D.J. et al., 1989; BURDGE C.G., LILLYCROP K.A., JACKSON A.A., 2009). Em 1990, Trichopoulos estabeleceu a hipótese de que mulheres expostas a elevadas concentrações de estrógeno durante o período fetal estariam mais predispostas ao desenvolvimento do câncer de mama na idade adulta (TRICHOPOULOS D., 1990). Nesse sentido, do ponto de vista clínico, filhas de mulheres que utilizaram o dietilestilbestrol (DES, estrógeno sintético) durante o período gestacional, para evitar aborto espontâneo, apresentaram maior suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama (SANDERSON M. et al., 1998; PALMER J.R. et al.,2006).

A dieta materna no período gestacional parece ter importante influência na modulação do ambiente intrauterino e, consequentemente, na programação do risco de desenvolvimento do câncer de mama na progênie (YU B. et al., 2006). Evidências sugerem que, em períodos precoces da vida, a glândula mamária estaria mais sensível à influência da alimentação (STARK A.H. et al., 2003; MICHELS K.B. et al., 2007; MESSINA M., HILAVIKI-CLARKE L., 2009). Diante da alta prevalência do câncer de mama e de evidências de sua possível origem fetal, tem-se buscado em nível epidemiológico e experimental elucidar a associação da nutrição materna durante a

gestação e o risco de desenvolvimento do câncer de mama na progênie feminina (HILAVIKI-CLARKE L. et al, 1997; LILLYCROP K.A. et al., 2005; KHAN G. et al., 2007; ASSIS S. et al., 2012).

Em ratos, verificou-se que a dieta materna rica em ácidos graxos poliinsaturados ômega-6 (AGPI ω-6) aumentou a incidência e reduziu a latência de neoplasias na progênie (HILAVIKI-CLARKE L. et al., 1997). De modo contrário, dieta materna rica em AGPI ω-3 reduziu o desenvolvimento neoplásico no tecido mamário da prole feminina (ION G., AKINSETE J.A., HARDMAN W.E., 2010).

Neste contexto, fatores dietéticos e níveis hormonais poderiam induzir modificações na morfologia da glândula mamária durante as fases iniciais do desenvolvimento, alterando, assim, o risco para o câncer de mama. Assim, por exemplo, *in vivo,* a exposição à dieta rica em gordura poliinsaturada durante o período fetal alterou o número de brotos terminais (TEBs) na glândula mamária de ratas adultas (HILAKIVI-CLARKE L., 2007*)*. Além disso, estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a prole feminina exposta à ração hiperlipídica à base de banha de porco no período fetal apresentou menor elongamento do epitélio mamário, o qual foi associado com menor incidência de tumores mamários na vida adulta (ANDRADE, F.O. et al., 2014).

2.2.1 Desenvolvimento da glândula mamária

A glândula mamária é um órgão dinâmico, que em fêmeas sofre drásticas alterações em diferentes estágios da vida, como período embrionário, pós-natal, puberdade, gestacional e lactação. Períodos de remodelação da glândula mamária são influenciados pelo crescimento corporal, níveis hormonais e fatores ambientais que podem modificar o risco de desenvolvimento do câncer de mama (RUSSO J. et al, 1990).

Desenvolve-se a partir de invaginações compactas da ectoderme, resultando em uma estrutura mamária rudimentar. A partir desta estrutura há expansão dos ductos da glândula presentes até o nascimento. Ainda no pós-natal, a glândula mamária é constituída apenas por um sistema de ductos lactíferos rudimentares e a exposição fetal à hormônios maternos pode induzir secreções, evento denominado como “leite de bruxa” (MOORE K.L., PERSAUD T.V.N., 2000). Em fêmeas, a glândula mamária desenvolve-se progressivamente até a puberdade, período em que há aumento da

proliferação celular, desenvolvimento do *fat-pad* entre outros elementos do tecido conjuntivo (MACIAS H., HINCK L., 2012).

Durante a puberdade inicia-se a morfogênese, caracterizada por amplo crescimento e expansão ductal e desenvolvimento das TEBs. Estas são estruturas altamente proliferativas que controlam o desenvolvimento e ramificação dos ductos mamário. Além disso, as TEBs são formadas por células *cap* (células-tronco) consideradas células-alvo de ação de carcinógenos e, consequentemente, sítios de iniciação do câncer de mama (Figura 2) (RUSSO J. et al., 2005; HILAKIVI-CLARKE L., ASSIS S., 2006; RUSSO J., BALOGH G.A., RUSSO I.H., 2008).

Após o desmame, as TEBs dividem-se em botões alveolares (ABs), a progressiva diferenciação é acentuada e regulada a cada ciclo estral durante a puberdade. Apesar deste processo contínuo de diferenciação, algumas TEBs não se diferenciam e tornam-se estruturas finas e pequenas como os ductos terminais (RUSSO I.H., RUSSO J., 1978; RUSSO J. et al., 1990). Os ductos mamários são estruturas irregulares e constituídos essencialmente por dois tipos celulares, as células epiteliais que compõem a camada interna, revestindo o lúmen, e mioepiteliais que compõe a camada externa (MASSO-WELCH P.A., et al., 2000; MOORE K.L., PERSAUD T.V.N., 2000). Células *cap* (células-tronco) presentes nas TEBs podem diferenciar-se em células mioepiteliais e epiteliais luminais, de modo que esta estrutura representa uma região constituída por células tronco com potencial de pluripotência (GJOREVSKI N.E., NELSON C.M., 2011).

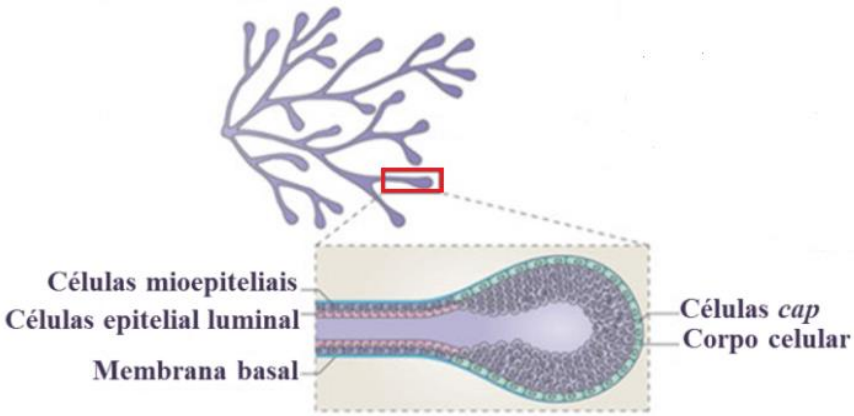


Figura 2: Imagem representativa da estrutura dos Brotos Terminais (TEBs) da glândula mamária. Adaptado: GJOREVSKI N.E NELSON C.M. Nature, 2011.

Após o período da puberdade, que em roedores equivale aos 50 dias de vida, a glândula mamária ramifica-se progressivamente para áreas adjacentes constituídas de tecido mesenquimal ou *fat-pad* e com a redução do número de TEBs (RUSSO J. et al., 1990).

Durante a gestação e lactação, a glândula mamária atinge sua completa capacidade funcional sobre influência de hormônios esteroidais (estrógeno e progesterona) e polipeptídicos (prolactina). No final da gestação, a glândula mamária adquire uma conformação com estruturas constituídas por células alveolares, responsáveis por sintetizar e secretar o leite (MOORE K.L., PERSAUD T.V.N., 2000).

O leite materno constitui uma importante fonte de energia, nutrientes essenciais e fatores de crescimento que asseguram o desenvolvimento adequado da prole no período pós-natal (PEREIRA P.C., 2014). Após a lactação, estímulos para a produção de leite são perdidos e inicia-se o processo de remodelamento tecidual e apoptose na glândula mamária. Neste estágio, diversas vias de sinalização são ativadas e atuam no processo de regulação hormonal e diferenciação celular, favorecendo a ocorrência de alterações morfológicas semelhante ao estado pré-gestacional (INMAN J.L. et al., 2015). Estrógeno e progesterona são responsáveis pela promoção do desenvolvimento da glândula mamária em diferentes estágios da vida. Estrógeno é responsável pelo crescimento dos ductos e a progesterona estimula crescimento lobuloalveolar (RUSSO I.H; RUSSO J., 1996). A prolactina, hormônio secretado pela glândula pituitária, também influência o desenvolvimento da glândula mamária nos diferentes estágios de vida reprodutiva de fêmeas. E parece agir direta e/ou indireta no epitélio mamário sobre estímulo dos níveis de progesterona (HORSEMAN N.D., 1999).

Ativação contínua da prolactina é essencial para manter a integridade do epitélio secretor. Sugere-se que zinco, em particular, pode regular a síntese e secreção da prolactina. Ainda, apresenta funções distintas na regulação do desenvolvimento e manutenção da glândula mamária como, diferenciação celular, regulação do fenótipo secretor, e síntese proteica. Durante a lactação, a glândula mamária acumula e transporta níveis elevados de zinco para o complexo golgi e sistema secretor do epitélio mamário. Ainda, todo este processo é coordenado para disponibilizar íons de zinco para proteínas dependentes de zinco essenciais na lactação e para eventual secreção de zinco no leite materno e satisfazer a demanda nutricional da prole (MCCORMICK N.H. et al., 2014).

O desenvolvimento e a remodelação da glândula mamária do ser humano são muito semelhantes aos eventos observados na glândula mamaria de roedores (camundongos e ratos). Apesar de existir algumas diferenças no que diz respeito à estrutura da glândula, em seres humanos a principal estrutura lobular é a unidade terminal ducto lobular (TDLUs), que se apresenta em várias formas morfológicas nos diferentes estágios de desenvolvimento. As TDLUs assim como as TEBs em roedores são as principais estruturas do epitélio mamário que possuem células-tronco e por isso são consideradas sítios de iniciação da carcinogênese mamária (TIEDE B., KANG Y., 2011).

2.2.2 Nutricao no início da vida, regulação epigenética e risco de câncer de mama

O período embrionário é caracterizado por extensa reprogramação epigenética, por meio de desmetilação e metilação *de novo* (MICHELS K.B., XUE F., 2006; DELAGE B., DASHWOOD R.H., 2008). Nesse sentido, a modulação inadequada do epigenoma no início da vida pode ter implicações para os descendentes ao longo da vida, modificando a suscetibilidade ao risco de doenças crônicas não transmissíveis, incluindo o câncer de mama (HILAKIVI-CLARKE L., ASSIS S., 2006; MARET W., SANDSTEAD H.H., 2008; MISTRY H.D., WILLIANS P.J., 2011). Tem-se voltado, nesse sentido, a atenção para o impacto da alimentação materna na modulação do epigenoma fetal, no contexto da programação do risco para tais doenças. Mais especificamente, sugere-se que a modulação de mecanismos epigenéticos por fatores nutricionais sejam responsáveis por alterações na morfologia da glândula mamária e, consequentemente, aumento na suscetibilidade ao câncer de mama (WATERLAND R.A., JIRTLE R.L., 2003; LILLYCROP K.A. et al., 2005; HILAKIVI-CLARKE L., ASSIS S., 2006; BURDGE C.G., LILLYCROP K.A., JACKSON A.A, 2009; CHIAM K. et al., 2009).

Eventos epigenéticos referem-se a alterações hereditárias e reversíveis na expressão de genes, que ocorrem independentemente de modificações na sequência primária do DNA (SHARMA S.; KELLY T.K.; JONES P.A., 2010; CAFARELLI E., FILETICI P., 2011). Muitas destas alterações epigenéticas são estabelecidas durante a diferenciação, e mantidas estáveis através de múltiplos ciclos de divisão celular, permitindo que as células tenham identidades distintas, mas com a mesma informação

genética. Os mecanismos epigenéticos incluem metilação do DNA, modificações pós-traducionais em histonas e microRNAs (miRNA) (KHAN S.I. et al., 2012).

A metilação do DNA resulta da adição covalente de um grupo metil a citosinas presentes nos dinucleotídeos CpGs, por meio da ação de DNA metiltransferases (DNMT1, 3a, 3b e 3L) (HINSHELWOOD R.A., CLARK S.J., 2008; PANG-KUO L., SARASWATI S., 2008). Além da metilação do DNA, alterações da estrutura da cromatina por meio de modificações pós-traducionais em histonas, também são consideradas essenciais para modificar a expressão gênica. O remodelamento da cromatina ocorre pela modificação de resíduos de histonas H3 e H4 por enzimas como acetil- e metil-transferases de histonas (HAT e HMT), bem como desacetilases e desmetilases de histonas (KIEFR J.C., 2007).

Os micro-RNAs (miRNAs) são uma classe de pequenos RNAs não codificantes, que regulam pós-transcricionalmente a expressão gênica através do reconhecimento de locais complementares na região 3' não traduzida (3' UTR) de seus RNAs mensageiros alvos (Figura 3) (AMBROS V. et al., 2003; ESQUELA-KERSCHER A, SLACK F.J., 2006). Estes são expressos de maneira tecido-específica, e controlam uma ampla variedade de processos biológicos, incluindo proliferação celular, apoptose e diferenciação (SHARMA S., KELLY T.K., JONES P.A., 2010).

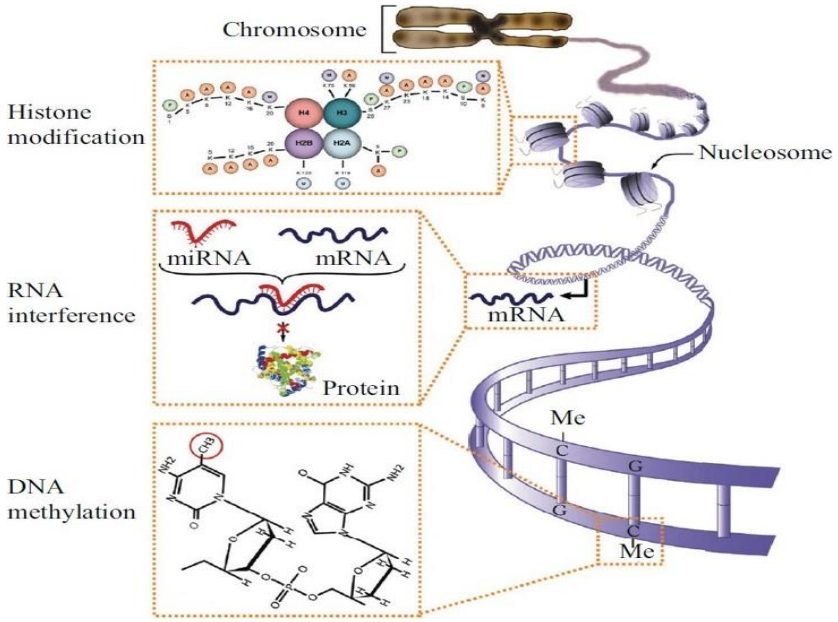


Figura 3: Mecanismos epigenéticos. Fonte: GENE KIM H. et al. Official Journal of the Pulmonary Vascular Research Institute, 2011.

No câncer de mama, alterações nos padrões de metilação de oncogenes e/ou genes supressores de tumores estão relacionadas à iniciação e progressão tumoral. Por exemplo, o gene supressor de tumor RASSF1A (*Ras-association domain family 1A*) encontra-se silenciado por hipermetilação na região promotora tanto em linhagens celulares de câncer de mama, quanto em tumores primários da mama (PFEIFER G.P., DAMMANN R., 2005; SHUKLA S. et al., 2006). O gene RASSF1 está localizado no cromossomo 3p21.3, em uma região que frequentemente sofre perda alélica em cânceres de pulmão e mama. Este gene codifica dois transcritos, RASSF1A e RASSF1C, os quais são produzidos por seleção do promotor e "*splicing*" alternativo do mRNA. No entanto, evidências sugerem que apenas a isoforma RASSF1A apresenta potencial de supressão tumoral (BURBEE D.G. et al., 2001). *In vitro*, observou-se que em diferentes linhagens de carcinoma mamário humano o promotor do gene RASSF1A estava completamente metilado. Em aproximadamente 78 % das neoplasias mamárias analisadas, o gene RASSF1A estava hipermetilado (HELLER G. et al., 2009), sugerindo que este gene apresenta um importante papel na patogênese do câncer (DAMMANN R., YANG G., PFEIFER G.P., 2001; DUMONT N. et al., 2009). Adicionalmente, o gene ZNF382, potencial supressor tumoral, se encontra silenciado por mecanismos epigenéticos em diversas linhagens de câncer de mama analisadas (CHENG Y. et al., 2010). Este se localiza no cromossomo 19q13.12, e codifica fator de transcrição com domínio transcricional dedo de zinco, o qual geralmente se encontra associado a um domínio repressor *Krüppel-associated box* (KRAB) (LUO K. et al., 2002; URRUTIA R., 2003). O domínio KRAB liga-se a proteína KAP1, que recruta HP1, SETDB1 (H3K9 metiltransferase), e o complexo HDAC (Figura 4). Além disso, o domínio dedo de zinco pode ainda ligar-se a sítios de nucleação, formando heterocromatina e, consequentemente, o silenciamento gênico (SCHULTZ DC et al., 2002). *In vitro*, o ZN382 inibiu a atividade de genes envolvidos na transformação neoplásica e regulação de ciclo celular, como STAT3 e C-MYC, através da formação de heterocromatina (CHENG Y. et al., 2010).

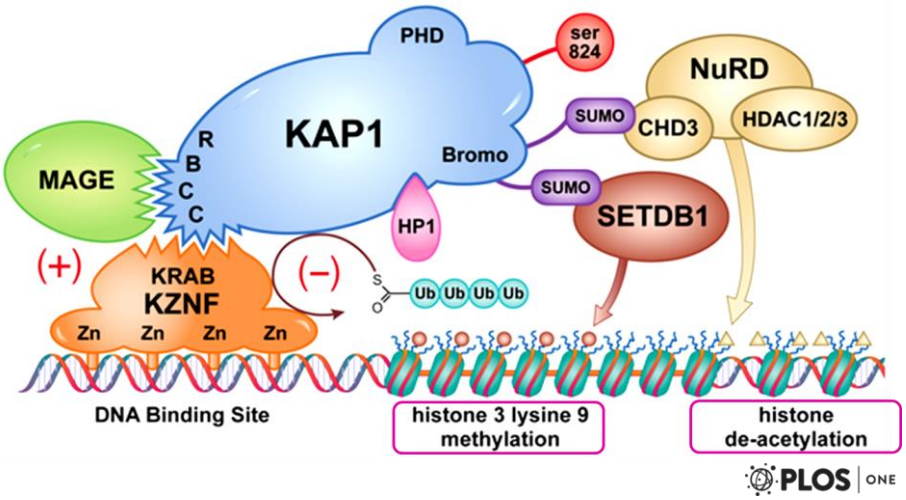


Figura 4: Associação do domínio repressor *Krüppel-associated box* (KRAB) a proteína KAP-1 e regulação de mecanismos epigenéticos. XIAO T.Z. et al., 2011.

O gene LMO4 também codifica proteínas da família dedo de zinco, podendo atuar como regulador transcricional e/ou oncogene (VISVADER J.E. et al., 2001; SUM E.Y. et al., 2002). Este parece regular a expressão gênica, por mecanismos epigenéticos, e eventos celulares, através da interação com complexo de proteínas e reguladores transcricionais (Figura 5). *In vivo*, o LMO4 encontra-se altamente expresso em pelo menos 50% das neoplasias mamárias. Além disso, observou-se que a perda de expressão do gene interferiu no processo de proliferação alveolar, e consequentemente, no desenvolvimento lobuloalveolar. Ao contrário, a superexpressão induziu hiperplasia e neoplasias mamárias em camundongos (SUM E.Y. et al., 2005). Outros estudos associaram a superexpressão do gene LMO4 em conjunto com a sua proteína de ligação-específica (Ldb1) com a diminuição de expressão de marcadores de diferenciação celular (WANG N. et al., 2004).

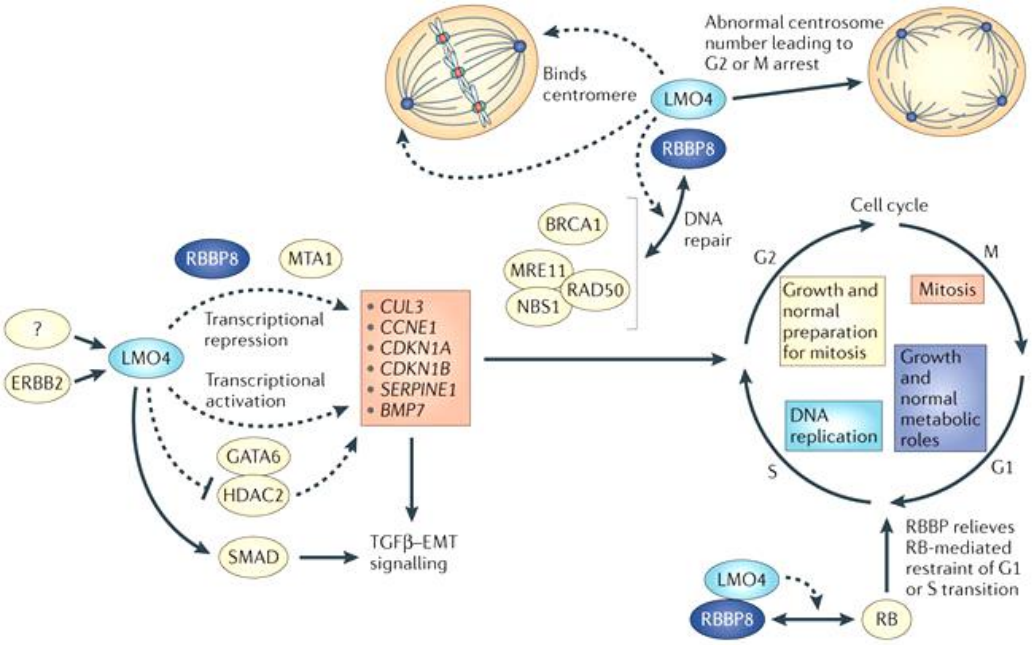


Figura 5: Papel do LMO4 na regulação do ciclo celular e progressão de neoplasia mamária. Fonte: MATTHEWS J.M. et al. Nature. 2013.

Vale ressaltar que estudos na área da nutrição e origem fetal do câncer de mama, contemplando o potencial envolvimento de fenômenos epigenéticos ainda são restritos (BURDGE G.C., LILLYCROP K.A., JACKSON A.A., 2009). Observou-se, *in vivo*, a perda de metilação do promotor do gene que codifica receptor de estrógeno (ER) na glândula mamária de ratas expostas *in útero* a dieta rica em AGPI ω-6, associada ao maior risco para câncer de mama na idade adulta (YENBUTR P., HILAKIVI-CLARKEB L., PASSANITIA A., 1998; SU H.M., HSIEH P.H., CHEN H.F., 2010).

2.3 Modelos experimentais na carcinogênese mamária

A indução de neoplasias mamárias em roedores por carcinógenos químicos é um dos modelos amplamente utilizado (RUSSO J., RUSSO I.H., 1996). As neoplasias mamárias quimicamente induzidas constituem-se ferramentas para estudar a patologia, bem como aspectos moleculares envolvidos em diferentes fases da carcinogênese mamária. Os principais modelos experimentais de carcinogênese mamária amplamente utilizados são 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) em ratos Sprague-Dawley ou N-metil N-nitrosúreia (MNU) em ratos Fisher. Neste contexto, o DMBA é administrado por gavagem com uma única dose de 2,5-20 mg e o MNU por injeções subcutâneas ou

intravenosas de até 50 mg/kg do peso corpóreo. Ambos os modelos apresentam parâmetros da carcinogênese semelhantes como incidência e latência (RUSSO J.et al., 1990).

Especificamente, em camundongos o DMBA é considerado o agente iniciador mais potente. Duas limitações em modelos com camundongos são a necessidade de utilização de múltiplas doses do carcinógeno e concomitante indução de outras neoplasias como, ovário, estômago e pulmão. Estimulação hormonal, previamente, a exposição ao DMBA aumenta significativamente a incidência de neoplasias mamárias e diminui o período médio de latência (MEDINA D., 2010).

O DMBA é altamente lipofílico e requer ativação metabólica para ação carcinogênica. Diversos tecidos são capazes de ativar o DMBA, incluindo a glândula mamária. Na glândula mamária, o DMBA é convertido em epóxidos, ou seja, metabólitos ativos com potencial de induzir danos ao DNA. A glândula mamária, principalmente, na puberdade apresenta altos índices de proliferação celular, assim, a exposição ao DMBA neste período está associado a maior atividade metabólica e aumento de epóxidos, resultando em mais dano ao DNA (BARROS A.C.S.D. et al., 2004).

A administração do DMBA na puberdade de ratos e camundongos, período que corresponde aos 50 dias de vida, aumenta exponencialmente a incidência das neoplasias mamárias. Neste mesmo período, observa-se uma elevada densidade de TEBs altamente proliferativas. Neste sentido, após administração do DMBA as TEBs iniciam sua transformação através de proliferação intraductal (IDP), carcinoma in situ e carcinoma invasivo de maneira semelhante ao modelo de carcinogênese mamária descrito. Estes modelos experimentais podem fornecer a compreensão de mecanismos envolvidos na carcinogênese mamária e contribuir para o desenvolvimento de estratégias de intervenção na progressão de células iniciadas (RUSSO J., TAIT L., RUSSO I.H., 1983).

2.4 Zinco e câncer de mama

Especificamente no campo da nutrição, dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 (AGPI ω-3), flavonóides, vitaminas A e E, bem como em minerais, incluindo zinco e selênio, têm sido associadas a redução de risco de câncer de mama (STOLL B.A., 2002; MICHELS K.B. et al., 2007; HAMDY S.M. et al., 2012).

Zinco, em particular, tem sido considerado micronutriente de notável importância para a saúde (HAMBIDGE K.M. et al., 2010).

Zinco é o segundo elemento traço mais abundante no corpo humano (COLEMAN J.E., 1992). É um componente essencial na nutrição humana e animal por apresentar uma grande variedade de funções biológicas. Ainda, é componente estrutural e regulador de mais de 300 enzimas e atua como cofator de metaloenzimas dependentes de zinco, como a superóxido dismutase Cu/Zn (MACDONALD R.S., 2000). Participa do metabolismo de carboidratos, lipídios proteínas e ácidos nucleicos e desempenha função característica em mecanismos celulares e/ou moleculares como indução de síntese de DNA e regulação de fatores transcricionais (SUN D et al., 2007; STEVE-EDEMBA C.L., 2014). Além disso, desempenha papel vital no processo reprodutivo, desenvolvimento neurocomportamental e do sistema imunológico (KELLEHER S.L., SEO Y.A., LOPEZ V., 2009).

No organismo humano, está presente em todos os tecidos e órgãos, especialmente em músculos, fígado, rim, ossos e próstata. Aproximadamente, 90% do zinco total encontra-se no osso e musculo esquelético e 95% encontra-se ligados a proteínas presente em células e membranas celulares (HONGSTRAND C. et al, 2009; KLOUBERT V., RINK L., 2015).

Tem como principais fontes alimentares carne bovina, de frango e de peixe, grãos integrais, castanhas, cereais, e legumes, sendo frutas, hortaliças e outros vegetais fontes pobres em zinco (LIM K.H. et al., 2013). Vale ressaltar que a absorção de zinco é relativamente baixa e sujeita a fatores dietéticos como elevada concentração de fitato e cobre que interfere no processo de absorção de zinco (TOMAT A.L., COSTA M.L.A., ARRANZ C.T., 2011).

A dose diária recomendada (RDA) de zinco para a população adulta é de 8 mg/dia para mulheres e 11 mg/dia para homens (SHIH S., 2007). Especificamente, no período gestacional a dose diária recomendada aumenta para 12 mg/dia, sendo o limite superior tolerável (UL) de até 40 mg/dia (TRUMBO P. et al., 2001). Em modelos experimentais, essencialmente no período gestacional e crescimento, a dose recomendada é de 30 mg/kg, sendo a dose máxima tolerada de 60 mg/kg (JOHNSON F.O. et al., 2011). Valores de zinco acima destas concentrações são associados a infertilidade, aborto espontâneo e anomalias congênitas, (KAGARA N. et al., 2007; FARQUHARSON M.J. et al., 2009; TOMAT A.L., COSTA M.L.A., ARRANZ C.T., 2011).

A deficiência com zinco é ocasionalmente diagnosticada em crianças com distúrbios genéticos, com capacidade de absorção intestinal reduzida ou lactantes de mães com deficiência de zinco (EVANS G.W, 1986). Ainda, pode ser detectada em gestantes, crianças e idosos devido à baixa ingestão ou disponibilidade reduzida de zinco na dieta (LIVINGSTONE C., 2015).

A deficiência com zinco constitui-se um problema de saúde pública, principalmente de países em desenvolvimento, assim como, de países industrializados. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a deficiência com zinco é prevalente em um terço da população mundial, especificamente, na África Subsaariana e Sul da Ásia, sendo uma causa frequente de morte em mulheres e crianças (WESSELLS K.R., BROWN K.H., 2012; WHO, 2015).

A absorção de zinco ocorre na borda e escova dos enterócitos por mecanismos de difusão ativa ou passiva e transportado ao fígado pela albumina e deste para outros tecidos, ligados a albumina, aminoácidos ou α-2-macroglobulinas (MAFRA D., COZZOLINO S.M.F., 2004; LIVINGSTONE C., 2015). Em células da mucosa intestinal, os níveis de zinco são regulados por proteínas com alta afinidade de ligação a metais como, metalotioneínas (MT), proteínas de baixo peso molecular (6-7 kDa) capazes de liberar íons de zinco no citoplasma em condições de baixos níveis de zinco. A principal forma de eliminação de zinco corporal ocorre pelas fezes, rim e pele (KLOUBERT V., RINK L., 2015).

O estado nutricional relativo ao zinco pode ser determinado pela concentração do elemento no soro e/ou plasma, eritrócito e expressão e atividade de enzimas zinco-dependentes (MAFRA D., COZZOLINO S.M.F., 2004).

Os níveis de zinco no organismo são controlados por transportadores específicos, os quais são responsáveis pelo controle da entrada e saída deste micronutriente na célula. Sugere-se que a expressão destes transportadores de zinco é tecido-específica e pode ser regulada de acordo com a quantidade de zinco proveniente da dieta. (HOGSTRAND. C. et al., 2009; KELLEHER S.L., SEO Y.A., LOPEZ V., 2009; FUKADA T. et al., 2011). Entretanto, o controle homeostático de zinco ainda não é totalmente compreendido. Especula-se que o armazenamento e expressão dos transportadores de zinco sejam diferentes entre tecidos normais e tumorais. Em neoplasias de mama alterações no metabolismo de zinco tem sido associada com desenvolvimento e progressão tumoral. Nesse sentido, modificações no metabolismo de

zinco podem estar relacionadas com desequilíbrio no processo de transporte deste micronutriente (SUN D. et al., 2007; KELLEHER S.L., SEO Y.A., LOPEZ V., 2009).

Tem-se demonstrado que esse mineral é um micronutriente essencial para diversos mecanismos celulares, que pode influenciar o desenvolvimento do câncer de mama por apresentar ações como reparo de DNA, controle de ciclo celular, controle de fatores transcricionais, e ativação e/ou silenciamento de genes supressores de tumores e oncogenes (DAVIS C.D., MILNER J.A., 2007; MICHELS K.B. et al., 2007). Outros possíveis mecanismos associados ao efeito de zinco incluem propriedades antioxidantes, com a redução de radicais superóxido a peróxido de hidrogênio, que favorece a integridade da membrana celular, e evita danos a biomoléculas, incluindo o DNA (BRAY T.M., BETTER W.J., 1990; HO E., COURTEMANCHE C., AMES B.N., 2003; SONG Y. et al., 2009).

Em estudos clínicos observaram-se menores concentrações séricas de zinco em pacientes com câncer de mama em relação ao grupo controle (KUO H.W. et al., 2002). Outros estudos associaram a suplementação com zinco à redução de estresse oxidativo e melhor resposta imunológica de pacientes com câncer (FREDERICO A. et al., 2001). Em estudo populacional verificou-se que a suplementação com zinco por aproximadamente dez anos reduziu significativamente o risco de câncer de mama na pré-menopausa (PAN S.Y. et al., 2011). Contraditoriamente, estudo longitudinal associou a suplementação com zinco com aumento de proliferação celular em mulheres com diagnóstico de neoplasia mamária benigna, e, subsequente aumento do risco de desenvolvimento do câncer de mama (CUI Y. et al., 2007).

O processo de regulação dos níveis de zinco e iniciação da carcinogênese ainda é pouco compreendido. No entanto, pesquisas recentes indicam que o metabolismo de zinco pode controlar eventos como proliferação celular e apoptose, processos fundamentais para o desenvolvimento de todas as neoplasias (KAGARA N. et al., 2007; TAYLOR K.M. et al., 2007; HOGSTRAND C. et al., 2009; FUKADA T. et al., 2011).

2.5 Zinco e programação fetal

No período gestacional, a influência do estado nutricional, hormonal e metabólico materno na fisiologia e morfologia da prole ocorre através da barreira placentária, alterando a suscetibilidade de risco de doenças na vida adulta. Outros fatores nutricionais devem ser considerados no contexto de programação fetal de

doenças, como o estado nutricional de micronutrientes (HARDING J.E., 2001; DARNTON-HILL I., MKPARU U.C., 2015). A exposição, durante o período fetal, ao zinco, parece também modular a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (TOMAT A. et al., 2010). Estudos em ratos associaram a deficiência de zinco na gestação a efeitos adversos no feto, como baixo peso ao nascer, aumento do risco de doenças cardiovasculares e disfunções renais no adulto (ALEXANDER B.T., 2006; GLUCKMAN P.D. et al., 2008; BARKER D.J. et al., 2010). Foi observado que modificações epigenéticas no gene *agouti* foram fundamentais para demonstrar que eventos epigenéticos são programados na fase embrionária e, ainda, moduláveis por dietas maternas (BULTMAN S.J. et al., 1994; WATERLAND R.A., JIRTLE R.L., 2003). Observou-se que a suplementação de fêmeas gestantes com intermediários do metabolismo de 1-carbono, como metionina, ácido fólico, colina, vitamina B12, e zinco modificou o padrão de metilação do gene *agouti* na prole, com consequente alteração fenotípica da cor da pelagem e suscetibilidade a alterações metabólicas (WOLFF G.L. et al., 1998; WATERLAND R.A., JIRTLE R.L., 2003; MARET W., SANDSTEAD H., 2008).

Além disso, a exposição ao zinco em diferentes períodos de desenvolvimento como pós-natal e puberdade parece modificar o risco de câncer de mama na prole. Estudos experimentais observaram que a deficiência com zinco no período pós-natal diminuiu a incidência de neoplasias mamárias (LEE S. et al., 2004). Outros estudos, observaram que a suplemtação com zinco e resveratrol, ainda no período pós-natal, aumentou a incidência de neoplasias mamárias quimicamente induzida por DMBA (BOBROWSKA-KORCZAK B., SKRAJNOWSKA D., TOKARZ A, 2012). Além disso, ratas Sprague-Dawley expostas a suplementação com zinco desde o período fetal até a vida adulta foi associada com aumento da incidência de neoplasias mamárias quimicamente induzidas por DMBA (SILVA F.R.M., et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar se o consumo de ração deficiente (8 ppm) ou suplementada (45 ppm) com zinco por camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 durante o período gestacional influência a suscetibilidade da progênie feminina à carcinogênese mamária quimicamente induzida.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1 Determinar as concentrações de zinco plasmática e eritrocitária da prole feminina com 7 semanas de idade exposta à ração deficiente (8 ppm) ou suplementada (45 ppm) com zinco durante o período fetal;

3.2.2 Determinar a concentração de malondialdeído (MDA) da prole feminina com 7 semanas de idade exposta à ração deficiente (8 ppm) ou suplementada (45 ppm) com zinco durante o período fetal;

3.2.3 Avaliar em glândulas mamárias da prole feminina com 7 semanas de idade não iniciadas com DMBA e exposta a ração deficiente (8 ppm) ou suplementada (45 ppm) com zinco durante o período fetal:

a) Morfologia, proliferação e morte celular;

b) Expressão dos genes LMO4, RASSF1A, ZNF382, STAT3, c-MYC;

c) Expressão da proteína p21 e p53;

d) Expressão global das histonas H3K9me3, H3K27me3 e H4K20me3 por IHC;

3.2.3 Avaliar o desenvolvimento de neoplasias mamárias, induzidas pelo carcinógeno DMBA, na prole feminina exposta a ração deficiente (8 ppm) ou suplementada (45 ppm) com zinco durante o período fetal;

3.2.4 Realizar análise histopatológica das neoplasias mamárias da prole feminina exposta a ração deficiente (8 ppm) ou suplementada (45 ppm) com zinco durante o período fetal induzidas quimicamente por DMBA;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCF/USP (Protocolo de Aprovação nº 407) foram obtidos três lotes de camundongos da linhagem C57BL/6, sendo 6 machos e 12 fêmeas/lote.

Os animais foram obtidos da colônia do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo (FCF/IQ-USP). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com tampas de aço inoxidável, contendo maravalha previamente esterilizada, que foi trocada rotineiramente em dias alternados. Além disso, variáveis como peso e consumo de ração foram controladas em dias alternados. O ensaio biológico foi realizado nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, em ambiente com temperatura de 22 ± 2°C e umidade relativa (UR) do ar em 50 ± 10%, sob ciclo de 12 horas claro-escuro.

4.2. Protocolo Experimental

Os três lotes de camundongos C57BL/6 foram obtidos consecutivamente, sendo machos com 6 semanas de idade e fêmeas com 4 semanas de idade. Machos e fêmeas passaram por duas semanas de aclimatação e adaptação, e durante este período todas as fêmeas receberam ração controle (CO), contendo 30 ppm de zinco. Após este período, as fêmeas com 6 semanas de idade foram distribuídas aleatoriamente em três grupos (Figura 1):

CO (controle): doze fêmeas de cada lote receberam durante a gestação ração controle (com 30 ppm de zinco);

ZnD (deficiência): doze fêmeas de cada lote receberam durante a gestação ração com deficiência de zinco (com 8 ppm de zinco);

ZnS (suplementação): doze fêmeas de cada lote receberam durante a gestação ração suplementada com zinco (com 45 ppm de zinco);

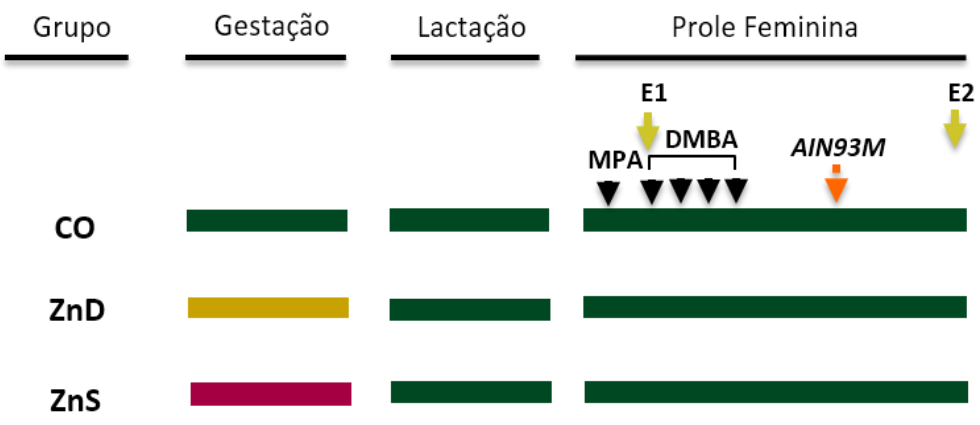
Camundongos fêmeas com 7 semana de idade foram acasaladas com machos com 10 semanas de idade, sendo 1 macho para cada 2 fêmeas/gaiola. Realizou-se a sincronização de estro nas fêmeas, utilizando a interferência do feromônio, o qual é secretado pelas glândulas prepuciais e liberado na urina do macho. Para realizar a

sincronização do estro, as fêmeas foram expostas a gaiola suja do macho por quatro dias antes do acasalamento. Posteriormente, as fêmeas foram agrupadas com o macho correspondente àquela gaiola no final da tarde, próximo ao período escuro. O acasalamento foi realizado no período escuro e o dia gestacional zero (GD0) foi determinado pela presença do tampão vaginal (sêmen solidificado que tampona o canal vaginal das fêmeas) e por ganho de peso, mensurado duas vezes por semana, durante o período gestacional (21-22 dias). Camundongos machos e fêmeas foram mantidos juntos durante 15 dias, com fornecimento de ração controle (CO), deficiente (DEF) ou suplementada (SUPL) com zinco.

Após o acasalamento, as fêmeas foram individualizadas em gaiolas de polipropileno com tampas de aço inoxidável, contendo maravalha previamente esterilizada, e continuaram a receber ração CO, DEF ou SUPL com zinco até o término da gestação.

Durante a lactação, a prole foi mantida com a mãe (aproximadamente, 8 filhotes/mãe) em gaiolas de polipropileno com tampas de aço inoxidável, contendo maravalha previamente esterilizada, que foi trocada rotineiramente em dias alternados (1 ninhada/gaiola). Cinco dias após o início da lactação, a ração das mães dos grupos ZnD e ZnS foram modificadas para ração CO (contendo 30 ppm de Zn). O desmame da prole foi realizado na quarta semana de idade, tendo sido a prole masculina e feminina mantidas em gaiolas distintas e com ração CO.

A prole feminina do primeiro lote foi eutanasiada com 7 semanas de idade e as amostras de tecidos e sangue destes animais foram destinadas à análise morfológica, de proliferação celular e molecular das glândulas mamárias, bem como concentração de zinco e marcadores de estresse oxidativo. A prole feminina do segundo e terceiro lote foi submetida ao protocolo de carcinogênese mamária e eutanasiada na décima sexta semana após a última dose de DMBA (Figura 6).



Legenda:

- Ração do Grupo CO, contendo 30 ppm de zinco;
- Ração do Grupo Zn D, contendo 8 ppm de zinco;
- Ração do Grupo Zn S, contendo 45 ppm de zinco;
- Ração CO AIN93M, contendo 35 ppm de zinco;

MPA: Acetato de Medroxiprogesterona, Pfizer®. Única dose subcutânea de 15 mg/100µL

DMBA: 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene, Sigma®. 4 doses consecutivas de 1mg (1 dose/semana) por gavagem.

E1: Eutanásia da prole feminina com 7 semanas de idade.

E2: Eutanásia da prole feminina com 27 semanas de idade.

Figura 6: Desenho Experimental

4.3. Rações ofertadas durante a fase experimental do estudo

Camundongos fêmeas prenhas da linhagem CB57BL/6 dos grupos CO, ZnD e ZnS foram alimentadas com ração formulada com base na AIN-93G (REEVES P.G. et al., 1993) (Tabela 1) e fornecida pela empresa HARLAN Laboratories (Miami, USA). Na ração foi acrescido sulfato de zinco nas concentrações de 45 ppm para o grupo ZnS, 30 ppm para o grupo CO e 8 ppm para o grupo ZnD. As concentrações de zinco utilizadas no estudo para o grupo ZnS, CO e ZnD foram 75 %, 50 % e 13 %, respectivamente, da dose máxima tolerada (60 mg/kg-d) de acordo com JHONSON e colaboradores (2011). Além disso, a caseína presente na ração, como fonte de proteína, foi substituída por clara de ovo sólida, para reduzir o *background* de zinco presente na caseína. A prole feminina foi alimentada com ração AIN-93G CO (contendo 30 ppm de zinco) até a 10ª semana de idade e, posteriormente, com a ração de manutenção AIN93-M (contendo 35 ppm de zinco) (Tabela 2) (REEVES P.G. et al., 1993).

Tabela 1: Composição da ração controle com base na AIN93-G.

Ingredientes	**g/kg da dieta**		
	CO	DEF	SUPL
Amido de Milho	371,576	371,673	371,508
Clara de ovo	218,0	218,0	218,0
Maltodextrina	132,0	132,0	132,0
Sacarose	100,0	100,0	100,0
Óleo de Soja	70,0	70,0	70,0
Celulose	50,0	50,0	50,0
Mix de Vitamina	12,0	12,0	12,0
Mix de Minerais*	35,0	35,0	35,0
Bitartarato de Colina	2,5	2,5	2,5
Tetrabutilhidroquinona	0,014	0,014	0,014
Biotina	0,004	0,004	0,004
Fosfato de Cálcio	8,0	8,0	8,0
Citrato férrico	0,37	0,37	0,37
Carbonato Cúprico	0,004	0,004	0,004
Óxido de Magnésio	0,2	0,2	0,2
Corante Alimentar	0,2	0,2	0,2
Sulfato de Zinco#	0,132	0,035	0,2
Total			**1.000**

*Mix de Minerais livre de zinco; #A quantidade de sulfato de zinco foi ajustada para ter 30 mg/kg (CO), 8 mg/kg (DEF) e 45 mg/kg (SUPL) da dieta.

Tabela 2: Composição da ração AIN93-M.

Ingredientes	**g/kg da dieta**
Caseína	140,0
L-Cisteína	1,8
Amido de Milho	465,692
Maltodextrina	155,0
Sacarose	100,0
Óleo de soja	40,0
Celulose	50,0
Mix de Minerais, AIN93-M-MX	35,0
Mix de Vitamina, AIN93-VX	10,0
Bitartarato de Colina	2,5
Tetrabutilhidroquinona	0,008
Total	1.000

4.4 Teste de tolerância à glicose na prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS

Os testes de tolerância à glicose foram realizados na prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS com o intuito de avaliar intolerância à glicose e resistência à insulina. A prole feminina foi mantida em jejum durante 6 horas. Após este período foi injetada uma solução estéril de solução de glicose a 66% (2 g/kg do peso corpóreo do animal) via intraperitoneal. Amostras de sangue foram coletadas com a amputação de 1 mm da cauda, nos respectivos tempos, 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, após a administração da solução de glicose para mensurar os níveis de glicose por glicosímetro Accu-check (Roche).

4.5 Eutanásia da prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS

A prole feminina com 7 e 27 semanas de idade dos grupos CO, ZnD, e ZnS foi eutanasiada após anestesia com isofluorano e o sangue coletado por punção cardíaca, e, separado em plasma e eritrócitos para análises das concentrações de zinco e malondialdeído (MDA). Também foram coletadas amostras da glândula mamária, fígado, ovário, rins, pulmão, útero e coração. Todas as amostras de órgãos e tecidos foram pesadas a fresco e, posteriormente, determinou-se o peso relativo a partir da fórmula: (peso absoluto do órgão ou tecido/peso corporal) x 100. Parte dos tecidos e órgãos foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e a outra parte fixada em formol 10 % tamponado, para posteriores análises.

4.6 Avaliação da concentração de zinco no plasma e eritrócitos da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS

Para a avaliação da concentração de zinco foram utilizadas amostras de plasma e eritrócitos da feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS. Aproximadamente, 1 mL de sangue total foi separado em plasma e eritrócitos por centrifugação a 3000rpm por 15 minutos a 4ºC, acondicionados em microtubos e armazenados em ultrafreezer (- 80ºC). A massa eritrocitária obtida do sangue total foi lavada três vezes com solução salina a 0,9%, homogeneizada por inversão e centrifugada a 10.000rpm por 10 minutos a 4ºC, sendo o sobrenadante descartado. Após

as lavagens, a solução salina foi aspirada, a massa do eritrócito foi transferida para outro microtubo e armazenada em ultrafreezer (- 80ºC).

4.6.1. Desmineralização de Materiais para Determinação de Zinco

Toda a vidraria, plásticos, ponteiras e tubos utilizados para análises de zinco foram desmineralizados em banho de ácido nítrico a 20% por 12 horas. Em seguida foram lavados 10 vezes com água destilada livre de minerais, minimizando a contaminação por minerais.

4.6.2. Determinação de zinco plasmático da prole feminina 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS por Espectrofotometria por Absorção Atômica de Chama com Forno de Grafite (GF-AAS)

A determinação da concentração de zinco plasmático foi realizada por GF-AAS, no Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da USP. Foram retiradas duas alíquotas de cada amostra do plasma e diluídas 1:4 em solução de HNO_3 0,1 % e aspiradas na chama do aparelho. A curva de calibração foi preparada com a utilização de Tritizol® (Merck) diluído em HNO_3 0,1 % nas respectivas concentrações: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 mg/L. Os resultados das absorbâncias estão expressos em mg/L.

4.6.3. Determinação de zinco nos eritrócitos e no fígado da prole feminina 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS por GF-AAS

A determinação de zinco nos eritrócitos e no fígado foi realizada por GF-AAS, no Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da USP. Amostras de eritrócitos e fígado foram tratadas com 1mL de solução [HNO_3 65% (Merck), peróxido de hidrogênio 30% (Merck) e água ultrapura (Milli-q®)] incubadas em banho-maria a 100ºC, com agitação, por 1 hora. Posteriormente, retirou os tubos do banho-maria e deixou na bancada até atingir temperatura ambiente. 100 µL das amostras foram aspiradas em GF-AAS, modelo ZEEnit 60 (Analytic Jena AG), equipado com corretor de fundo baseado no efeito Zeeman transversal, atomizador recoberto com grafite e aquecimento transversal, amostrador automático AS73 para amostragem de soluções e amostrador para sólidos SSA-62 do mesmo fabricante. A curva de calibração foi preparada com a utilização de Tritizol® (Merck) diluído em HNO_3 0,1% nas respectivas

concentrações: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 mg/L. Os resultados das absorbâncias estão expressos em mg/L.

4.7 Análise da concentração de malondialdeído no plasma e no fígado da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS

50 µL de plasma e homogenato do fígado da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD, e ZnS, foram transferidas para um eppendorf de 1,5 mL contendo 12,5 µL de BHT 0,2% e 6,25 µL de NaOH 10N. As amostras foram aquecidas em banho a 60ºC por 3 minutos. Após resfriamento no gelo, as amostras foram centrifugadas a 12.000rpm a 4ºC por 10 minutos. Após centrifugação, 500 µL do sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf de 2 mL, e adicionou 250 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6% a cada amostra. Novamente as amostras foram aquecidas em banho a 95ºC por 30 minutos. Após resfriamento em gelo foi realizada a extração de malondialdeído (MDA) com 750 µL de butanol por 15 segundos em vórtex na velocidade máxima. Após extração, as amostras foram centrifugadas a 12.000rpm a 4ºC por 10 minutos. 650 µL do sobrenadante foi filtrado utilizando-se microfiltro de 13 mm (Millex®, Millipore) e transferido para leitura em HPLC com detector DAD 532 ηm, coluna Phenomenex Reverse-phase C18(250 mm x 4,6 mm x 5 µm), fluxo de 1 mL/min. Os resultados são expressos em ηMol/mL.

4.8 Avaliação da morfologia da glândula mamária da prole feminina com 7 semanas dos grupos CO, ZnD e ZnS

Durante a eutanásia da prole feminina com 7 semanas de idade, a glândula mamária abdominal esquerda foi retirada, e utilizada para montagem total conforme descrito por De Assis (2010). Para tanto a glândula mamária foi espalhada sob uma lâmina e fixada em Carnoy (etanol 60%, clorofórmio 30%, ácido acético 10%), durante a noite. No dia seguinte foram realizadas lavagens de 15 minutos em: etanol 70%, etanol 50% e etanol 30%. As lâminas foram novamente lavadas por 5 minutos em água destilada e coradas durante a noite em solução carmine (Carmine 0,2% e sulfato de potássio de alumínio 0,5%). No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em água destilada para retirar o excesso do corante e, posteriormente, lavadas por 15 minutos em: etanol 70%, etanol 90%, etanol 95%, e etanol 100%. As lâminas foram incubadas

em Xilol para a dissolução do excesso de gordura e então montadas com resina (*Fisher Chemical Permount*™) e lamínula.

Para a análise do potencial de transformação maligna realizou-se a contagem total do número de TEBs. Estas foram contadas de acordo com Russo e Russo (1996), de forma aleatória e por dois pesquisadores independentes, em microscópio *Carl Zeiss MicroImaging GmbH* – 37081. E para análise de crescimento epitelial realizou-se a medida da distância a partir do linfonodo ao final da árvore epitelial, e da árvore epitelial ao final da *fat-pad*, em mm, conforme descrito por De Assis (2010).

4.9 Análise de proliferação celular na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS

A análise de proliferação celular foi realizada na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS, por imunoistoquímica do Ki-67, no Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP. A glândula mamária foi fixada em formol 10 % tamponado, e incluídas em parafina e seccionadas. Os cortes histológicos foram desparifinizados em xilol, hidratados em sequência graduada de álcoois (absoluto, 95% e 70%) e água destilada. Realizou-se a recuperação antigênica dos tecidos com a utilização de tampão citrato 0,1 mM, pH 6,0 a 120ºC, em uma panela de pressão (Dako Cytomation, Denmark A/S) por 10 minutos.

A inativação da peroxidase endógena foi realizada com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% por 10 minutos. Lavou as lâminas três vezes com PBS, por 5 minutos, para retirar o excesso da solução de H_2O_2. O bloqueio de proteínas não-especificas foi realizado com leite desnatado (La Sereníssima) 3% em PBS por 60 minutos. Os cortes histológicos foram incubados, durante a noite, com anticorpo primário monoclonal anti-rabbit (Abcam®) diluído 1:50. No outro dia, retirou-se o excesso do anticorpo primário e lavou as laminas 5 vezes com PBS por 5 minutos cada. Após as lavagens, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário biotinylated link universal e Streptavidin-HRP por 20 minutos a temperatura ambiente, seguido, pelo tratamento com os reagentes Vectastain ABC (Vector Laboratories, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente. Os cortes histológicos foram lavados com PBS e marcados com DAB [3,3´-*diaminobenzidine tetrahydrochroride* (Sigma–Aldrich, Co, USA)] por 5 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em água destilada por 3 minutos e contra

coradas com hematoxilina Harris's por 45 segundos. Para retirar o excesso, realizou-se três lavagens em água corrente seguida por lavagem com água destilada. E então, seguiu-se com a desidratação e montagem das lâminas com resina (*Fisher Chemical Permount*™) e lamínulas. O índice de proliferação celular foi determinado pelo cálculo da porcentagem de células marcadas positivamente por Ki-67 entre 1000 células por estrutura (lóbulo ou ducto). As imagens foram avaliadas com o *Image J Software* (NIH, USA).

4.10 Apoptose na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS

Os cortes das glândulas mamárias da prole feminina com 7 semanas de idades dos grupos CO, ZnD e ZnS foram fixados em formalina tamponada neutra a 10% e corados com H&E como descrito por Junqueira e Junqueira (1983). Células que apresentaram retração celular com perda de adesão entre as células adjacentes, condensação citoplasmática e nuclear, fragmentação nuclear e citoplasmática, e formação de corpos apoptóticos. O índice apoptótico foi determinado pelo cálculo da porcentagem de corpos apoptóticos/1000 células contadas. As imagens foram avaliadas com *Image J Software* (NIH, USA).

4.11 Análise de expressão gênica na glândula mamária da prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS

A expressão dos genes LMO4, RASSF1, ZNF382, STAT3, e c-MYC foram avaliadas na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS por PCR em tempo real.

4.11.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído de acordo com as instruções do Kit *RNase Lipid Tissue Mini* (Qiagen, USA). 50 mg de tecido foi homogeneizado em QIAzol Lysis e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. A seguir, adicionou 200 µL de clorofórmio e homogeneizou por 15 segundos. As amostras foram incubadas por 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugou-se a 12.000rpm, por 15 minutos, a 4ºC. Nesta fase, o homogenato foi separado em fase aquosa e orgânica. A fase aquosa foi transferida

para outro tubo cuidadosamente para evitar contaminação com a interfase de proteínas e DNA. E 1 mL de etanol 70% gelado foi adicionado para uma melhor ligação. Posteriormente, 700 µL da amostra foi transferido para a coluna RNasy Mini spin com um tubo coletor de 2 mL, e centrifugou a 8000rpm por 15 segundos a temperatura ambiente. O RNA total ligou-se a membrana, o fenol e outros contaminantes foram descartados. Adicionou-se 700 µL de tampão RW1 a coluna RNasy e centrifugou a 8000 g por 15 segundos a temperatura ambiente. O volume contido no tubo coletor foi descartado. Acrescentou-se 500 µL de tampão RPE, centrifugou a 8000g por 15 segundos e o volume contido no tubo coletor foi descartado. Acrescentou 500 µL de tampão RPE e centrifugou por 2 minutos. Para retirar o excesso do tampão da membrana transferiu-se a coluna para um novo tubo coletor de 2 mL, e centrifugou a velocidade máxima por 1 minuto. Transferiu a coluna RNasy para um novo tubo de 1,5 mL e o RNA foi eluído com 40 µL de água RNase-Free.

A concentração, integridade e pureza do RNA total extraído das amostras foram verificadas em espectrofotômetro, no aparelho NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA). Adotou-se como valor ideal de pureza do RNA, uma razão a partir de 2.0 entre as absorbâncias de 260 e 280 nanômetros (nm) medidas no aparelho.

4.11.2 Conversão do RNA para cDNA pela enzima transcriptase reversa

A transcrição reversa foi realizada a partir de 1 µg mRNA de acordo com as instruções do *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, USA). Em tubos de 200 µL foram adicionados amostra de RNA, 2µL de *RT Buffer* 10X, 0,8 µL de dNTP Mix (100 mM), 2 µL de *Randon Primers* 10X, 1 µL *Multiscribe™ Reverse Transcriptase* e 4,2 µL de água Nuclease-free. As amostras foram levadas ao termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf, Alemanha) e submetidas a quatro ciclos: (1) 25ºC por 10 minutos, (2) 37ºC por 120 minutos, (3) 85ºC por 5 minutos, (4) 4ºC ∞ e então armazenadas a - 20ºC após o término dos ciclos da reação.

4.11.3 Amplificação dos genes LMO4, RASSF1, ZPF382, STAT3 e c-MYC por qRT-PCR

A quantificação da expressão dos genes LMO4, RASSF1, ZNF382, STAT3, c-MYC e GAPDH (controle endógeno) foi realizada por PCR em tempo real, utilizando o

sistema de amplificação TaqMan (Applied Biosystems, USA), no Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL)/IQ-USP. Foram selecionadas sondas marcadas com fluoróforo FAM para todos os genes de acordo com os "assays" disponibilizados pela Applied Biosystems (Tabela 3).

Tabela 3: Sondas utilizadas nas análises de amplificação dos genes por PCR em tempo real

Gene	Assay ID
GAPDH	Mm99999915_g1
c-MYC	Mm00451074_m1
LMO4	Mm00495373_m1
RASSF1	Mm00451074_m1
STAT3	Mm01219775_m1
ZPF382	Mm01176397_m1

As reações foram realizadas em placas de 384 poços – *Well Clear Optical Reaction Plate, with Barcode (Applied Biosystems, USA*). Acrescentou-se 2 μL de cDNA diluído (1:19) e 8 μL do *mix* por poço. O *mix* continha 5 μL de *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystem, USA), 1μL do *Assay*, e 1μL de água *UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water* por amostra de cDNA diluído. Posteriormente, as placas foram cobertas com selante óptico - *MicroAmp® Optical Adhesive Film* (Applied Biosystem, USA) e centrifugadas a 600rpm por 40 segundos.

As reações foram realizadas em duplicata por amostra. Após o preparo da placa a reação de PCR foi realizada em termociclador Applied Biosystems ViiA™ 7 Real-Time PCR System com dois ciclos iniciais: 1º ciclo de 2 minutos a 50ºC e 2º ciclo de 10 minutos a 95ºC. Na etapa de amplificação, as amostras foram submetidas a 50 ciclos de 15 segundos a 95ºC (desnaturação), e 1 minuto a 60ºC (hibridização e extensão). O sinal de fluorescência captada pelo programa *ViiA™ 7software* (Applied Biosystems, EUA) gerou parâmetros de ciclo, denominado ciclo treshold (Ct), que é o nível de fluorescência onde a reação foi detectada em fase exponencial. Para cada amostra de cDNA, respectiva de cada gene, o Ct foi registrado e comparado com o Ct do gene da

gliceraldeído desidrogenase-3 fosfatase (GAPDH), o qual foi utilizado como controle endógeno. Os valores de Ct obtidos nos ensaios foram utilizados para determinar a expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à expressão do GAPDH (controle endógeno) através da relação Delta Ct (ΔCt): ΔCt = (Ct gene alvo - Ct controle endógeno). Para verificar se houve variação da expressão dos genes, listados na tabela 3, na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos ZnD e ZnS em relação ao grupo CO os dados foram normalizados de acordo com o parâmetro Delta Delta Ct (ΔΔt): ΔΔCt= (ΔCt Zn - ΔCt CO). E por último, os resultados foram transformados em escala logarítmica (2ΔΔCt).

4.12 Análise da expressão das proteínas p21 e p53 na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS

A expressão das proteínas p21 e p53 foi avaliada na glândula mamária torácica da prole feminina com 7 semana de idade por Western Blot. A proteína total foi extraída do tecido mamário com tampão [cloreto de sódio (150 mM); NP-40 1,0%; Tris (50 mM) pH 8,0; fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) (1 mM)]. As amostras foram incubadas em agitação a 4ºC por 2 horas, centrifugado a 12 000rpm a 4ºC por 20 minutos e a proteína total foi coletada do sobrenadante. A concentração da proteína total foi determinada por Bradford Assay (Bio-Rad, USA). As amostras quantificadas (50 μg) foram submetidas ao fracionamento em gel vertical contendo 4-15% [Mini-Protean TGX (Bio-Rad, USA)]de poliacrilamida-SDS, a uma voltagem constante de 100V por 2 horas. As proteínas fracionadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose usando o Trans-Blot® Turbo Transfer System (Bio-Rad, USA) e bloqueadas com reagentes detergents and blocking® (Bio-Rad) por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-p21 e anti-p53 (Santa Cruz Biotecnologia, USA) diluídos 1:1000 durante a noite a 4ºC. Após diversas lavagens com PBST [PBS com 10% de Tween-20 (Sigma, USA)], a membrana foi incubada com anticorpo secundário, anti-IgG, conjugado a peroxidase (GE Healthcare Life Sciences) diluído 1:10 000 por 1 hora a temperatura ambiente. As membranas foram reveladas por método de quimiluminescência com a utilização do Kit ECL Plus® (GE Healthcare Life Sciences). A densidade óptica das bandas foram quantificadas com a utilização do software Quantity-one (Bio-Rad, USA) e normalizadas pela expressão da β-actina.

4.13 Avaliação do padrão de trimetilação de histonas na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS por IHC

Avaliação do padrão de trimentilação da histona H3K9, H3K27 e H4K20 foi realizada na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS, por imunoistoquímica. A glândula mamária foi fixada em formol 10% tamponado, e incluídas em parafina e seccionadas. Os cortes histológicos foram desparifinizados em xilol, hidratados em sequência graduada de álcoois (absoluto, 95% e 70%) e água destilada. Realizou-se a recuperação antigênica dos tecidos com a utilização de tampão Tris-EDTA, pH 6,0 a 120ºC, em panela de pressão (Dako Cytomation, Denmark A/S) por 10 minutos. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS, por 5 minutos, para retirar o excesso do tampão e incubou as lâminas em HCL 2N a 60ºC por 30 minutos.

A inativação da peroxidase endógena foi realizada com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% por 10 minutos. Para inibição da marcação de sítios inespecíficos, os cortes histológicos foram bloqueados com leite desnatado (Molico®, Nestlé) 3% em PBS por 1 hora. Os cortes histológicos foram incubados durante uma noite com anticorpo primário monoclonal anti-H3K9, anti-H3K27 e anti-H4K20 (cell signaling®) diluído 1:50 em BSA. Após diversas lavagens, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário anti-IgG conjugado a peroxidase (GE Healthcare Life Sciences), diluído 1:200 em BSA, por 1 hora a temperatura ambiente.

Após diversas lavagens com PBS, os cortes histológicos foram marcados com DAB [3,3´-*diaminobenzidine tetrahydrochroride* (Sigma–Aldrich, Co, USA)] e, em seguida contra corados com hematoxilina Harris's.

As lâminas foram analisadas com a utilização do software Image J. (NIH, EUA). E a densidade óptica integrada (IOD = marcação do anticorpo, que reflete o nível de expressão de histonas presente em cada célula) de 1000 células marcadas (lóbulo e ducto) foi medida.

4.14 Indução da carcinogênese mamária na prole feminina dos grupo CO, ZnD e ZnS

A indução da carcinogênese foi realizada em fêmeas com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS. Camundongos fêmeas receberam uma única dose 15 mg/100 µL de acetato de medroxiprogesterona por injeção subcutânea, seguida por 4 doses via intragástrica, por gavagem, (1 dose/semana) 1 mg de DMBA (Sigma, EUA), dissolvido em óleo de milho. O procedimento foi realizado com o auxílio de agulha de gavagem de aço inox, curva 22 GA, com cânula de diâmetro 1,0 mm, esfera de 1,7 mm e comprimento 31 mm (CIENCOR®).

Três semanas após a última dose de DMBA todos os animais foram apalpados 2 vezes por semana para registrar a presença, localização, tamanho e data de detecção de todas as neoplasias mamárias (WHITSETT et al., 2006). Foram analisados nos animais os seguintes parâmetros: latência de aparecimento de neoplasias mamárias; incidência de neoplasias mamárias (número de animais com neoplasias/número total de animais); multiplicidade de neoplasias mamárias (número de neoplasias/animal); volume das neoplasias mensuradas com auxílio de um paquímetro digital (*Fisher scientific*) e calculado pela seguinte fórmula: [1/6 π (ABC)] onde A, B e C correspondem, respectivamente, ao comprimento, largura e altura da neoplasia (ASSIS et al., 2006). A prole feminina induzida à carcinogênese mamária (segundo lote de animais) foi eutanasiada após 16 semanas da administração da última dose de DMBA. Camundongos que apresentaram aspecto moribundo ou com tumor maior que 10 % do peso corporal foram eutanasiados antes da data prevista (HILAKIVI-CLARKE, et al., 1997; ASSIS et al., 2006; ASSIS et al., 2011). Após a eutanásia, as glândulas e neoplasias mamárias foram retiradas e lavadas em solução salina a 0,9%. Parte do material foi fixada em formol tamponado 10% e o restante congelado em nitrogênio líquido e armazenado em ultrafreezer (- 80ºC) para posteriores análises.

4.15 Análise histopatológica das neoplasias mamárias da prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS por meio de coloração por H&E

Os cortes das neoplasias mamárias foram fixados em formalina tamponada neutra a 10% e corados com hematoxilina e eosina (H&E) como descrito por Junqueira e Junqueira (1983). As neoplasias mamárias foram analisadas por Patologista da Universidade Estadual de São Paulo.

4.16 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias (teste de Levene e Brown-Forsythe). Quando atendidos esses requisitos foi aplicado o teste ANOVA com pós-teste de Duncan. Quando não foi observada distribuição normal aplicou-se o teste Kruskall-Wallis. Para análise de incidência dos tumores utilizou-se o teste de Kaplan-Meier, seguido de Long Rank Test, e, para ingestão calórica e teste de tolerância à glicose utilizou-se ANOVA de medidas repetidas. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão, e considerou-se nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Utilizou-se o programa STATISTICA 8.0 (StatSoft).

5. RESULTADOS

5.1. Efeito da deficiência ou suplementação com zinco durante o período gestacional

O consumo de ração experimental de fêmeas dos grupos CO, ZnD e ZnS foi controlado durante o período gestacional. O consumo foi calculado em energia, considerando-se a densidade energética da ração (3,7 Kcal/g) especificada em laudo fornecido pela empresa HARLAN Laboratories (Miami – USA). Sem diferença estatisticamente (p>0,05) significante entre os grupos CO, ZnD e ZnS durante o período gestacional (Figura 7).

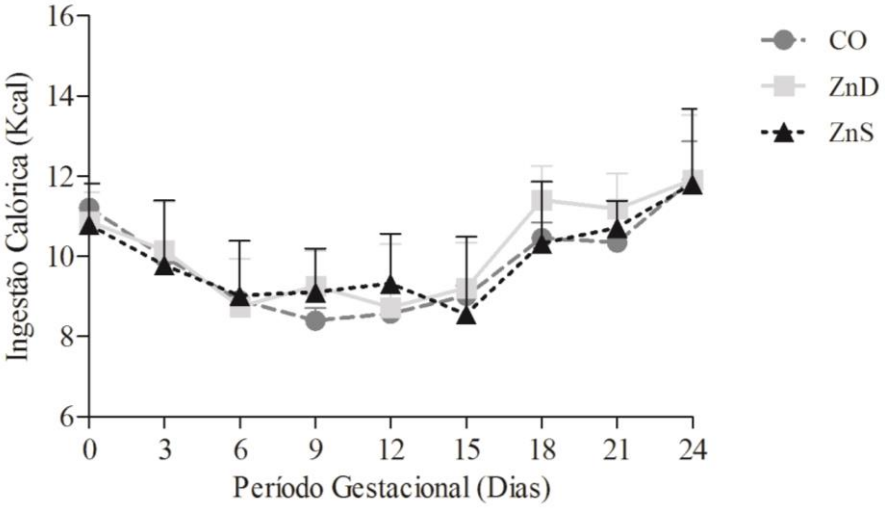


Figura 7: Ingestão calórica (Kcal) diária das fêmeas dos grupos CO (n=23), ZnD (n=26) e ZnS (n=23) durante o período gestacional. Os valores estão representados em média ± desvio padrão. Sem diferença (p>0,05) entre os grupos CO, ZnD e ZnS de acordo com ANOVA de medidas repetidas.

5.2. Estimativa da ingestão diária de zinco de fêmeas dos grupos CO, ZnD e ZnS

Considerando a concentração de zinco em cada ração, especificada em laudo fornecido pela empresa HARLAN Laboratories (Miami - USA), realizou-se uma estimativa do consumo médio de zinco por fêmeas dos grupos CO, ZnD e ZnS (Figura

8). Em relação as fêmeas do grupo CO, as dos grupos ZnD e ZnS consumiram 3,4 menos e 1,5 mais zinco ($p \leq 0,05$), respectivamente.

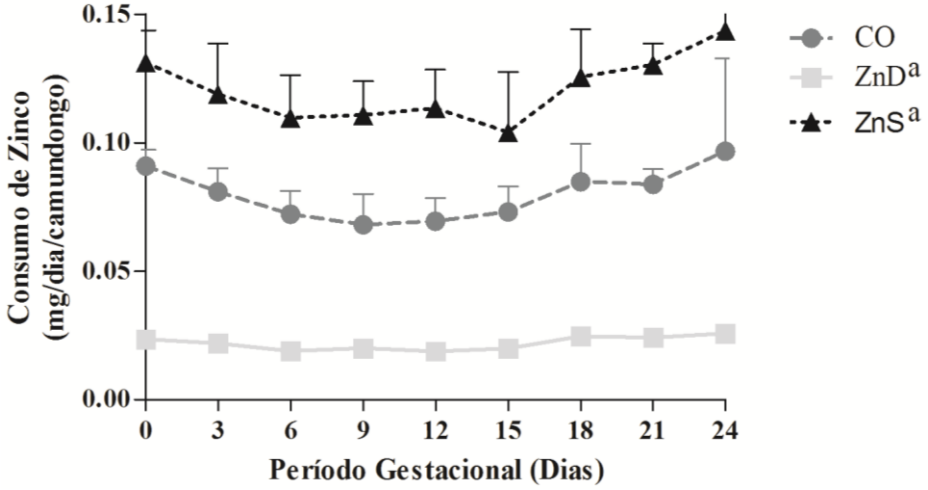


Figura 8: Estimativa do consumo diário de zinco de fêmeas dos grupos CO (n=23), ZnD (n=26) e ZnS (n=23). Os valores estão representados em média ± desvio padrão. [a]Diferença ($p<0,05$) significativa em relação ao grupo CO de acordo com ANOVA de medidas repetidas.

5.3 Efeito da deficiência ou suplementação com zinco em variáveis gestacionais

Em relação ao desempenho reprodutivo de fêmeas dos grupos CO, ZnD e ZnS observou-se fecundidade em torno de 70%. Não houve diferença estatisticamente ($p>0,05$) significante no ganho de peso (peso final – peso inicial) das fêmeas dos grupos CO, ZnD e ZnS durante o período gestacional. Além disso, fêmeas dos grupos CO, ZnD e ZnS tiveram período gestacional dentro do periodo experado (entre 20-22 dias). A prole do grupo CO apresentou índice de mortalidade de 6 e 8 vezes maior em relação a prole do grupo ZnD e ZnS, respecticvamente. O número de filhotes/mãe, número de prole feminina e peso no desmame da prole feminina não foi estatisticamente ($p>0,05$) diferente entre os grupos experimentais (Tabela 4).

Tabela 4: Variáveis do nascimento da prole e desmame dos grupos CO, ZnD e ZnS[1,2].

Variáveis	*Grupos Experimentais*		
	CO	**ZnD**	**ZnS**
Ganho de peso no período gestacional (g)	12,4 ± 2,8	13,1 ± 2,6	14,1 ± 3,0
Índice de Fertilidade	61	72	67
Índice de mortalidade	10	4	2 [a]
Número de filhotes/ninhada	5,7 ± 2,0	5,6 ± 2,1	5,96 ± 1,9
Número de Fêmeas	2,5 ± 1,9	2,6 ± 1,1	3,2 ± 2,0
Peso no desmame da prole feminina (g)	10,23 ± 1,1	10,3 ± 1,08	10,6 ± 1,11

[1]Os dados apresentados foram obtidos de 16, 17 e 18 fêmeas dos grupos CO, ZnD e ZnS, respectivamente. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão. [2]Quatro fêmeas do grupo CO foram eutanasiadas no início do protocolo experimental pela presença de anomalias congênitas (2 fêmeas com hidrocefalia e 2 fêmeas com crescimento exagerado do dente incisivo superior). [a]Diferença estatisticamente ($p \leq 0,05$) significante em relação ao grupo CO de acordo com o teste de Exato de Fisher.

5.4 Efeito da deficiência ou suplementação com zinco durante o período gestacional em variáveis da prole feminina com 7 semanas de idade

5.4.1 Ingestão calórica da prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS

Não se observou diferença estatisticamente (p>0,05) significante em relação a ingestão calórica da prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS (Figura 9).

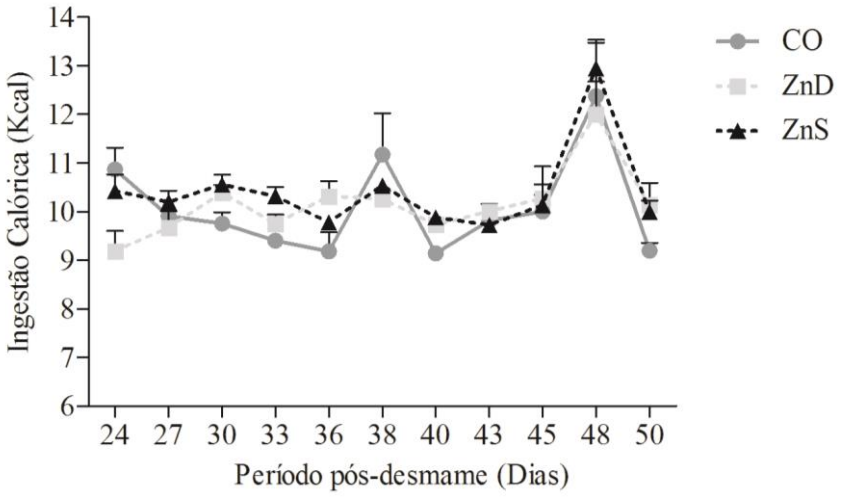


Figura 9: Consumo calórico da prole feminina dos grupos CO (n=14), ZnD (n=11) e ZnS (n=18). Os valores estão representados em média ± desvio padrão. Sem diferença (p>0,05) entre os grupos CO, ZnD e ZnS de acordo com ANOVA de medidas repetidas.

5.4.2 Estimativa da ingestão diária de zinco da prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS.

Considerando a concentração de zinco na ração controle (AIN93-G), especificada em laudo fornecido pela empresa HARLAN Laboratories (Miami - USA), realizou-se uma estimativa do consumo médio de zinco pela prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS. Não houve diferença estatisticamente (p>0,05) significante entre os grupos experimentais (Figura 10).

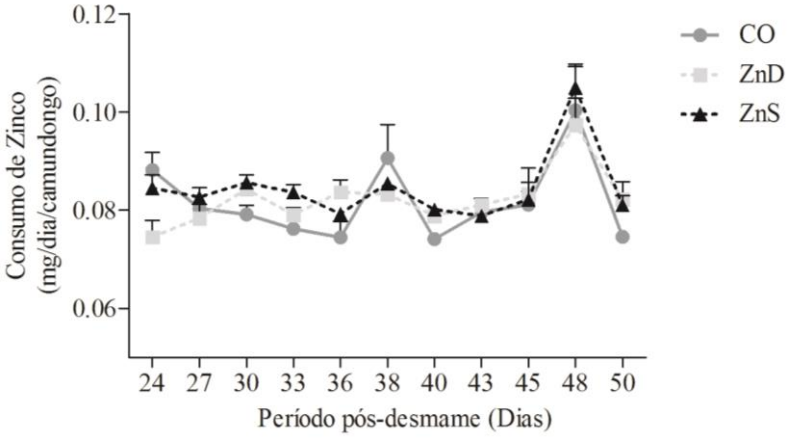


Figura 10: Estimativa do consumo diário de zinco da prole feminina dos grupos CO (n=14), ZnD (n=11) e ZnS (n=18). Os valores estão representados em média ± desvio padrão. Sem diferença estatisticamente (p>0,05) significante de acordo com ANOVA de medidas repetidas.

5.4.3 Curva glicêmica da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS

Não se observou diferença estatisticamente (p>0,05) significante em relação aos níveis glicêmicos da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS (Figura 11).

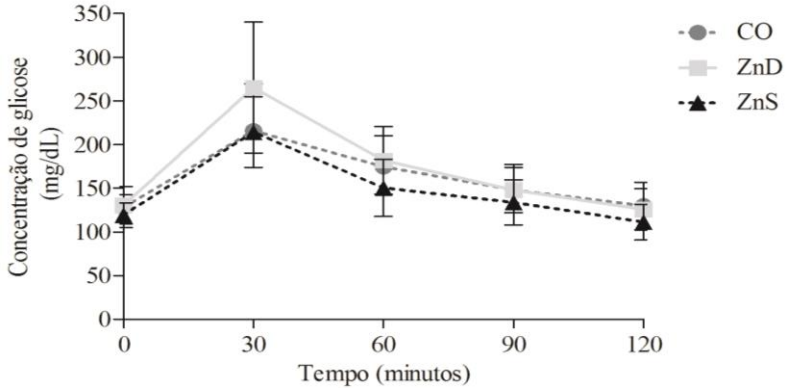


Figura 11: Curva glicêmica da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS. Os valores estão expressos em média ± desvio padrão (11 animais/grupo). Sem diferença (p>0,05) entre os grupos CO, ZnD e ZnS de acordo com ANOVA de medidas repetidas.

5.4.4 Peso relativo de órgãos da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS

Não se observou diferença estatisticamente (p>0,05) significante no peso relativos dos órgãos da prole feminina com 7 semanas dos grupos CO, ZnD e ZnS (Tabela 5).

Tabela 5: Peso relativo de órgãos da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS.

Variáveis	***Grupos***		
	CO	**ZnD**	**ZnS**
Fígado	3,91 ± 0,55	3,82 ± 0,49	4,28 ± 0,91
Rim	1,17 ±0,39	1,23 ±0,33	1,04 ± 0,55
Ovário/Útero	0,43 ± 0,18	0,37 ± 0,2	0,36 ± 0,22

Os dados foram obtidos de 14, 11 e 18 animais dos grupos CO, ZnD e ZnS, respectivamente. Os valores estão representados em média ± desvio padrão. Sem diferença (p>0,05) entre os grupos experimentais de acordo com o teste de Kruskal-wallis.

5.4.4 Avaliação do peso corporal, concentração de zinco e MDA no plasma, eritrócitos e fígado da prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS

Não se observou diferença estatisticamente (p>0,05) significante quanto ao ganho de peso corporal e concentração de zinco plasmática entre os grupos CO, ZnD e ZnS. Em relação a prole feminina dos grupos CO e ZnS, a do grupo ZnD apresentou menor (p=0,006) concentração de zinco nos eritrócitos. Não se observou diferença estatisticamente (p>0,05) significante entre os grupos CO e ZnS em relação a esta variável. Em relação a prole feminina dos grupos CO e ZnD, a do grupo ZnS apresentou maior (p=0,02) concentração de zinco no lóbulo lateral esquerdo do fígado. Não se observou diferença estatisticamente (p>0,05) entre os grupos CO e ZnD. Além disso, observou-se que a prole feminina do grupo ZnD apresentou aumento marginal (p=0,078) e significativo (p<0,05) na concentração de MDA no plasma e no fígado, respectivamente, em relação aos grupos CO e ZnS (Tabela 6).

Tabela 6: Ganho de peso, concentração de zinco no plasma, eritrócitos e fígado da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS.

Variáveis	*Grupos Experimentais*		
	CO	**ZnD**	**ZnS**
Prole Feminina com 7 semanas de idade			
Peso corporal (kg)	13,39 ± 2,1	13,17 ± 2,68	12,99 ± 2,62
Concentração de zinco plasmática (µg/mL)	1,59 ± 0,8	1,38 ± 0,65	1,24 ± 0,37
Concentração de zinco eritrocitária (µg/mL)	7,52 ± 2,8	4,42 ± 1,97[a]	8,77 ± 2,21
Concentração de zinco hepática (µg/g)	50,9 ± 7,0	48,82 ± 2,8	58,43 ± 6,7[b]
mg MDA/L plasma	1,74 ± 0,13	1,95 ± 0,33[c]	1,56 ±0,27
mmol MDA/µg de proteína no fígado	37,85 ± 21,9	75,36 ± 15,6[a]	35,37 ± 15,7

Os dados apresentados foram obtidos de 5 fêmeas/grupo. Os valores estão apresentados em média ± desvio padrão. [a]Diferença estatisticamente ($p<0,05$) significante em relação aos grupos CO e ZnS de acordo com o teste Kruskal-wallis. [b]Diferença estatisticamente ($p=0,072$) marginal e ($p=0,033$) significante em relação aos grupos CO e ZnD, respectivamente. [c]Diferença ($p=0,078$) marginal em relação aos grupo ZnS de acordo com Anova seguida do teste de Duncan.

5.5. Efeito da deficiência ou suplementação com zinco durante o período gestacional no desenvolvimento da glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade

Análise da morfologia da glândula mamária e do crescimento da árvore epitelial pode ser utilizada para predizer alterações no desenvolvimento da glândula mamária no início da vida que, posteriormente, podem alterar o risco ao desenvolvimento do câncer de mama. Observou-se que a prole feminina do grupo ZnD apresentou menor ($p<0,05$) número de TEBs em relação aos grupos CO e ZnS. Em relação a prole feminina com 7 semanas de idade do grupo CO, a do grupo ZnS apresentou menor ($p<0,05$) número de TEBs (Figuras 12A-12C). Não houve diferença ($p>0,05$) em relação à elongação do epitélio mamário entre a prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS (Figura 12D).

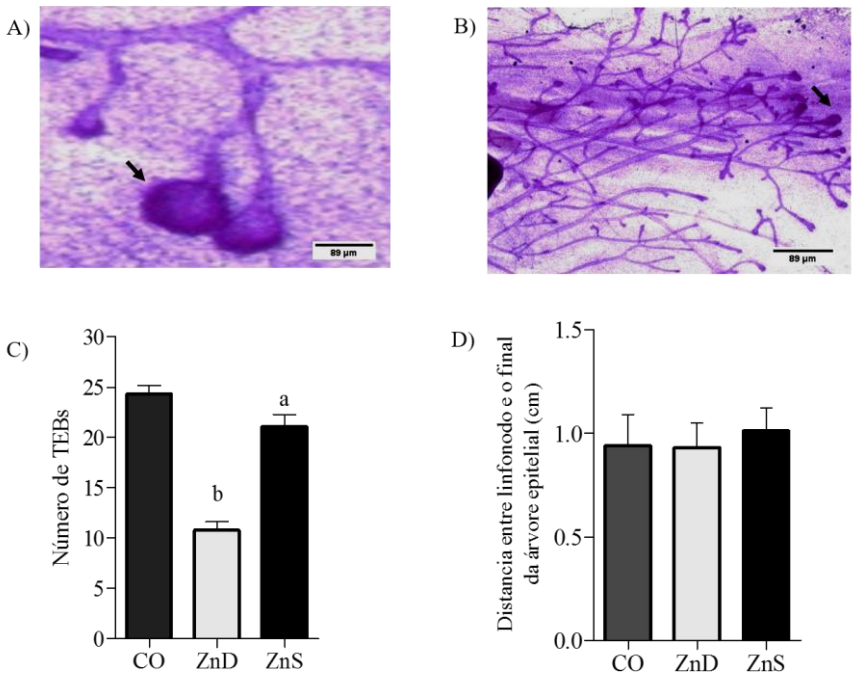


Figura 12: Morfologia da glândula mamária. Fotomicrografia representativa das TEBs [(A e B), 40x]; C) Número de TEBs; D) Elongação do epitélio mamário (distância, em centímetros, a partir do linfonodo até o final da árvore epitelial) da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS (5 animais/grupo). Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. [a]Diferença estatisticamente (p=0,0033) significante em relação aos grupos CO e ZnD. [b]Diferença estatisticamente (p=0,0001) significante em relação aos grupos CO e ZnS de acordo com ANOVA com pós-teste de Duncan.

5.6 Efeito da deficiência ou suplementação com zinco durante o período gestacional na proliferação celular e expressão da proteína p21 na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade

Observou-se maior ($p \leq 0,05$) número de células proliferando no ducto e lóbulo mamário da prole feminina com 7 semanas de idade do grupo ZnS em relação aos grupos CO e ZnD (Figura 13A-13B). Além disso, observou-se um aumento (p=0,06) marginal na expressão da proteína p21 em relação ao grupo CO (Figura 13C-13D).

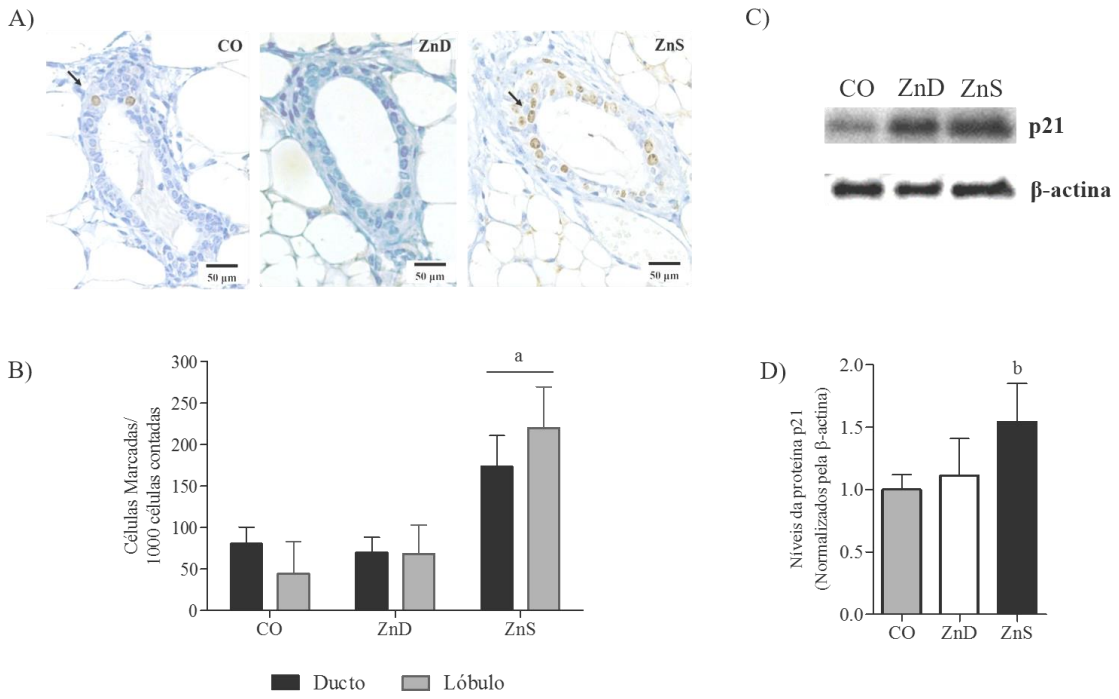


Figura 13: Análise da expressão de Ki67 por imunoistoquímica e p21 por western blot. Fotomicrografia (40x) da marcação com Ki67 (A) e quantificação da proliferação celular (B) na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS (n=5 animais/grupo). Os dados estão representados em média ± desvio padrão. [a]Diferença estatisticamente ($p \leq 0,05$) significante em relação aos grupos CO e ZnD de acordo com ANOVA seguido do teste de Duncan. Análise de western blot (C) e quantificação (D) da expressão da proteína p21 na glândula mamaria da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS. [b]Diferença ($p=0,06$) marginal em relação ao grupo CO de acordo com o teste Student's.

5.7 Efeito da deficiência ou suplementação com zinco durante o período gestacional na apoptose e expressão da proteína p53 na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade

Observou-se maior frequência de morte celular ($p \leq 0,05$) no ducto e lóbulo mamário da prole feminina com 7 semanas de idade do grupo ZnS em relação aos grupos CO e ZnD. Não se observou diferença estatiscamente ($p > 0,05$) significante entre os grupos CO e ZnD quanto a esses parametros (14A-14B). Além disso, observou-se aumento da expressão da proteína p53 na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas do grupo ZnS em relação ao ZnD (Figura 14C-14D).

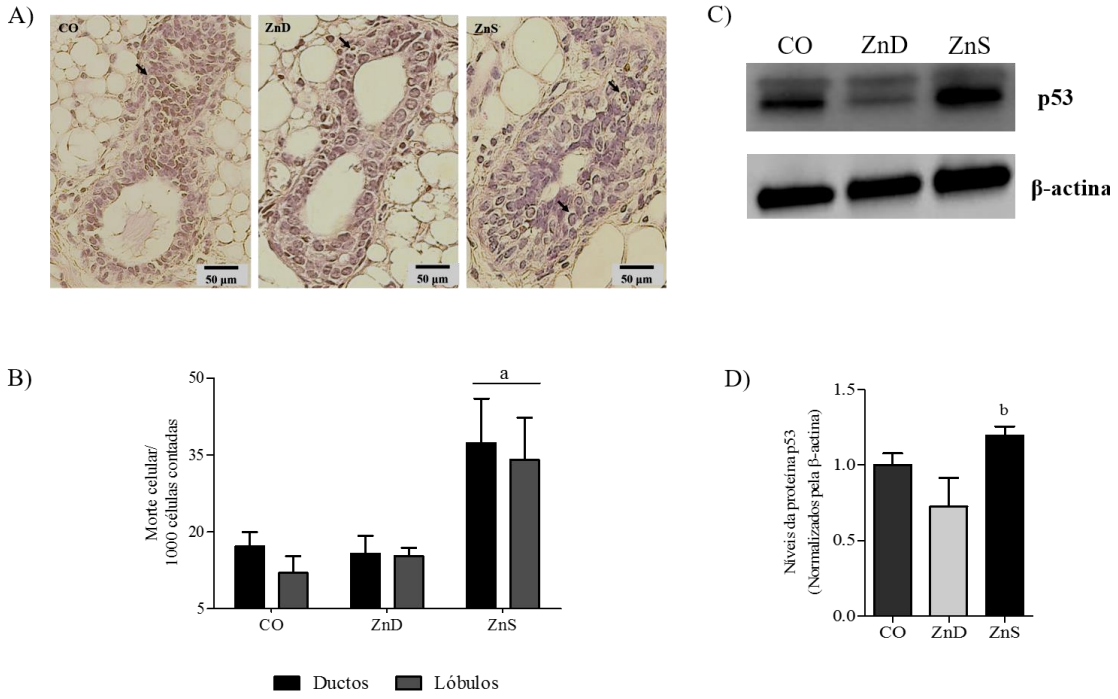


Figura 14: Análise de apoptose e expressão da proteína p53 por western blot. Fotomicrografia (40x) coloração de H&E (A) e quantificação de apoptose (B) na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n=5 animais/grupo). [a]Diferença estatisticamente ($p \leq 0,05$) significante em relação aos grupos CO e ZnD. Análise de western blot (C) e quantificação (D) da expressão da proteína p53 na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS. [b]Diferença estatisticamente ($p < 0,05$) significante em relação ao grupo ZnD de acordo com ANOVA seguido do teste Duncan.

5.8 Efeito da deficiência ou suplementação com zinco durante o período gestacional na expressão de genes na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade

Observou-se aumento ($p \leq 0,05$) significativo e ($p=0,08$) marginal na expressão relativa dos genes supressores de tumores RASSF1 (Figura 15A) e ZNF382 (Figura 15B), e, do ativador transcricional STAT3 (Figura 15C), respectivamente, na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade do grupo ZnS em relação a prole do grupo ZnD. Observou-se aumento ($p=0,077$) marginal na expressão relativa do gene c-

Myc (Figura 15D) e LMO4 (Figura 15E) na glândula mamária da prole feminina do grupo ZnD em relação ao CO.

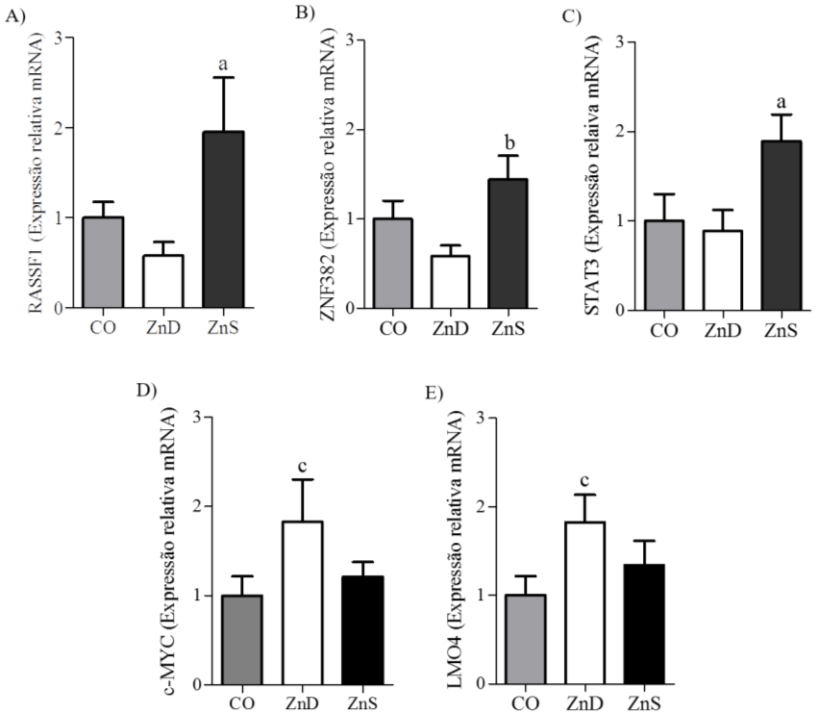


Figura 15: Níveis de mRNA de (A) RASSF1, (B) ZNF382, (C) STAT3, (D) c-MYC, (E) LMO4 na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n=5 animais/grupo). [a]Diferença estatisticamente (p=0,04) significante e (p=0,08) marginal em relação aos grupos ZnD e CO, respectivamente. [b]Diferença estatisticamente (p=0,02) significante em relação ao grupo ZnD. [c]Diferença (p=0,077) marginal em relação ao grupo CO de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Duncan.

5.9 Efeito da deficiência ou suplementação com zinco durante o período gestacional na expressão de histonas na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade

Observou-se aumento significativo (p<0,05) e marginal (p=0,06) na expressão da histona H3K9me3 no lóbulo da glândula mamária da prole feminina do grupo ZnD em relação aos grupos CO e ZnS, respectivamente (Figura 16). Além disso, observou que o grupo ZnD apresentou aumento (p<0,05) da expressão da H3K9me3 no ducto da

glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade em relação aos grupos CO e ZnS.

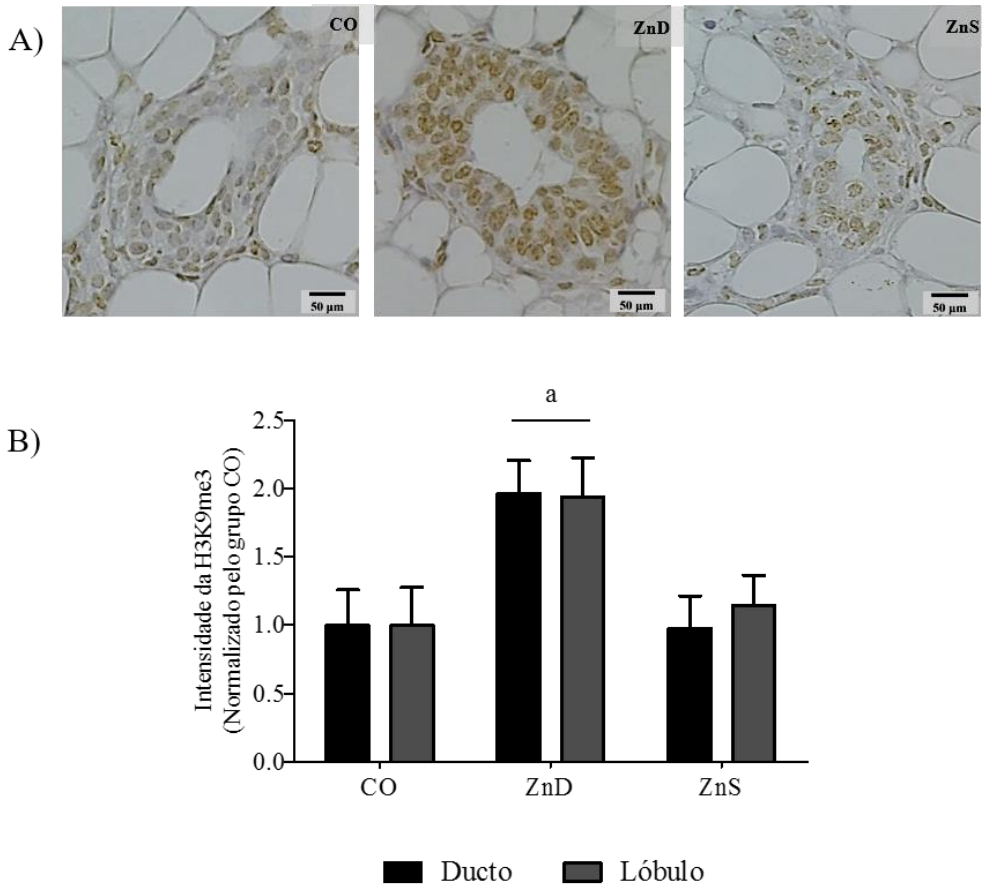


Figura 16: Análise da expressão da histona H3K9me3 por imunoistoquímica. Fotomicrografia (40x) da marcação (A) e quantificação (B) da expressão da H3K9me3 na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n=5 animais/grupo).

A prole feminina com 7 semanas de idade do grupo ZnD apresentou aumento marginal ($p=0,086$) e significativo ($p<0,05$) na expressão da H4K20me3 no ducto e lóbulo da glândula mamária, respectivamente, em relação aos grupos CO e ZnS (Figura 18). Não se observou diferença estatisticamente ($p>0,05$) significante na expressão da H3K9 e H4K20 entre os grupos CO e ZnS e, sem diferença ($p>0,05$) na expressão da H3K27me3 (Figura 17) entre os grupos experimentais.

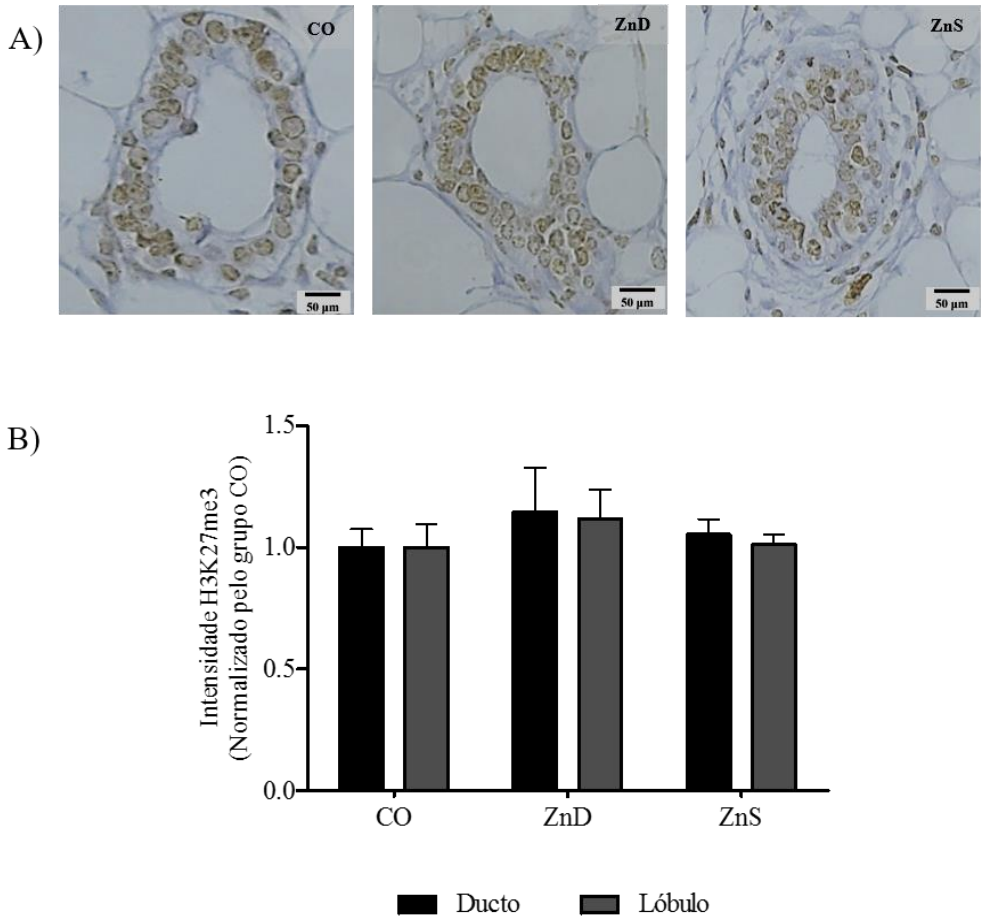


Figura 17: Análise da expressão da histona H3K27me3 por imunoistoquímica. Fotomicrografia (40x) da marcação (A) e quantificação (B) da expressão da H3K27me3 na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n=5 animais/grupo).

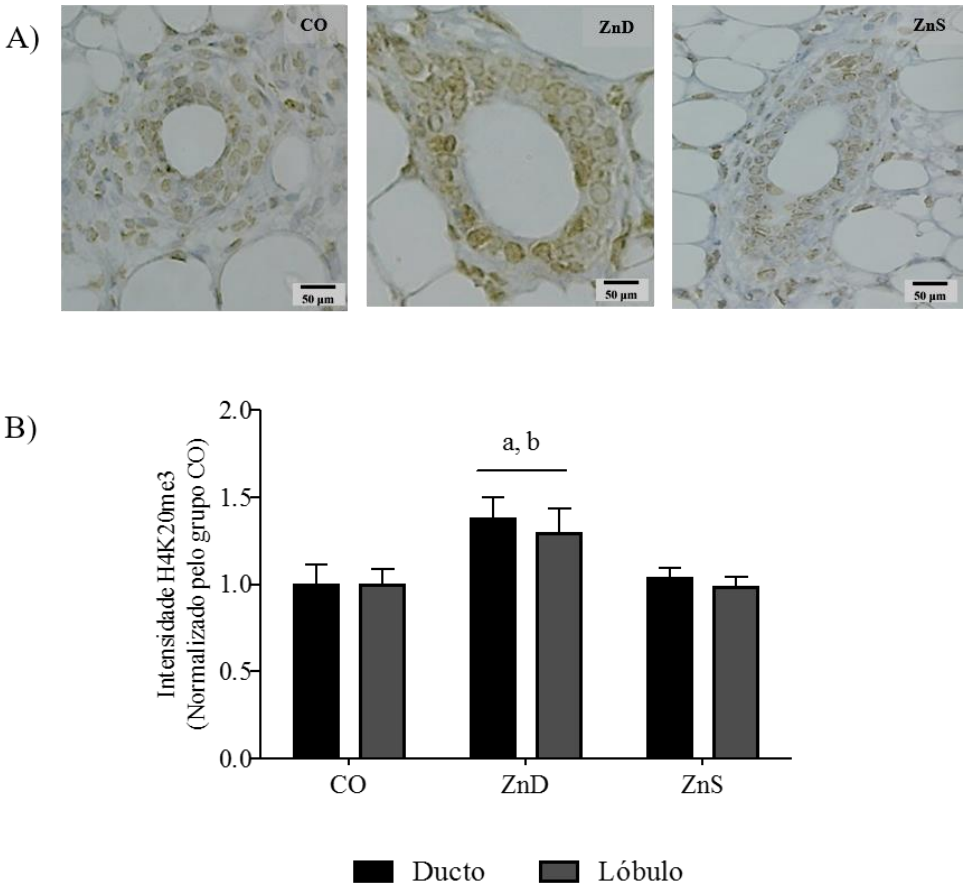


Figura 18: Análise da expressão da histona H4K20me3 por imunoistoquímica. Fotomicrografia (40x) da marcação (A) e quantificação (B) da expressão da H4K20me3 na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, ZnD e ZnS. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n=5 animais/grupo).

5.10 Efeito da deficiência ou suplementação com zinco durante o período gestacional na carcinogênese mamária quimicamente induzida na prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS

Não se observou diferença estatisticamente (p>0,05) significante na incidência de neoplasias mamárias entre os grupos CO, ZnD e ZnS de acordo com o teste Log-rank (Figura 18). Entretanto, observou-se que a prole feminina do grupo ZnS apresentou maior incidência final (p=0,006) de neoplasias mamárias em relação aos grupos CO e ZnD [apresentaram um percentual de 61, 64 e 87 nos grupos CO, ZnD e ZnS, respectivamente].

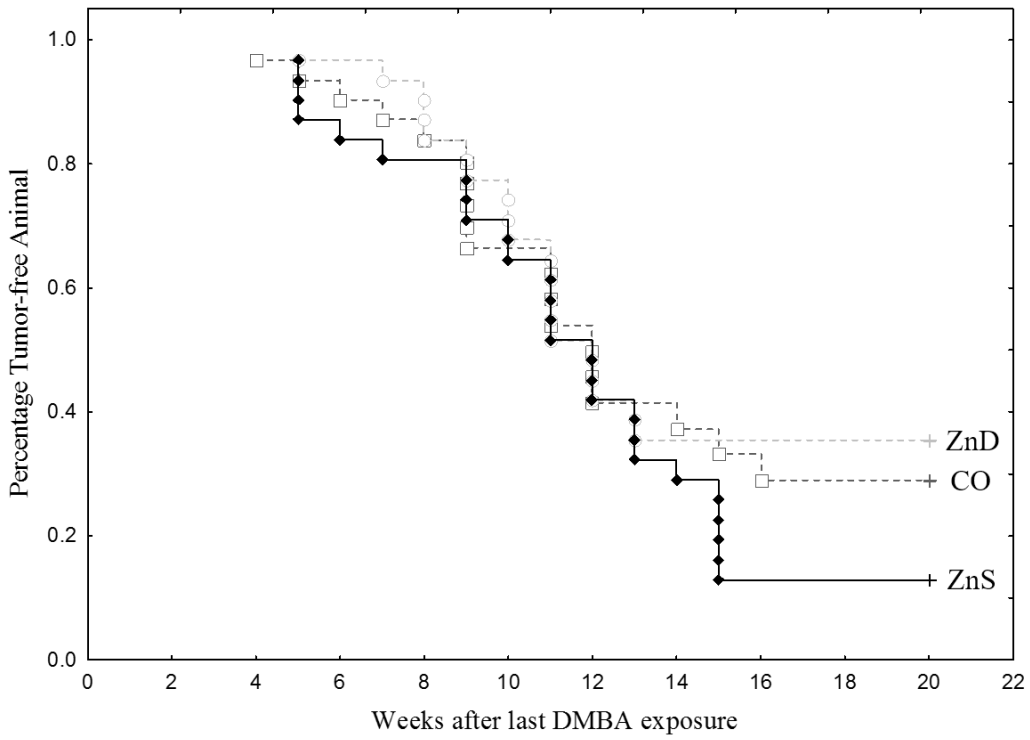


Figura 19: Incidência da prole feminina com neoplasias mamárias dos grupos CO (n=31 animais/grupo), ZnD (n=31 animais/grupo) e ZnS (n=33 animais/grupo). Curva de Kaplan-Meier: Sem diferença estatisticamente (p>0,05) significante entre os grupos CO, ZnD e ZnS de acordo com o teste Log-rank.

Não se observou diferença estatisticamente (p>0,05) significante em relação à multiplicidade [o número de tumores/número total de ratos por grupo (apresentaram valores médios entre 1,3 - 1,8 nos grupos CO, ZnD e ZnS)], latência do primeiro tumor [tempo de aparecimento do primeiro tumor (tempo médio observado foi de 13 - 14,5 semanas nos grupos CO, ZnD e ZnS)]. Observou-se que a prole feminina do grupo ZnS apresentou menor e maior (p<0,05) frequência de neoplasias com pesos menores (pesos compreendidos entre 0,1 – 0,3 g) e maiores (peso maior que 0,6 g), respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7: Latência, multiplicidade e tamanho das neoplasias mamárias da prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS.

Variáveis	*Grupos Experimentais*		
	CO	**ZnD**	**ZnS**
Número total da prole feminina	31	31	33
Latência do primeiro tumor (semanas)	12,42±3,1	10,63±2,7	10,43±3,3
Multiplicidade (número/animal)	1,42±0,67	1,58±0,79	1,90±0,87
Peso da neoplasia (%)			
0,01 – 0,3 g	59	44[b]	30[a]
0,3 – 0,6 g	14	17	18
> 0,60 g	27	39[b]	52[a]

Os valores estão representados em média ± desvio padrão. [a]Diferença estatisticamente ($p<0,05$) significante em relação aos grupos CO e ZnD. [b]Diferença estatisticamente ($p<0,05$) significante em relação ao grupo CO de acordo com o teste Exato de Fisher.

Análise histopatológica demonstrou que as neoplasias mamárias foram, predominantemente, malignas nos grupos CO, ZnD e ZnS, e, classificadas como adenocarcinoma (tipo A, B e C), adenoacantoma e carcinossarcoma (Figura 20). Observou-se que a prole feminina dos grupos ZnS e ZnD apresentaram maior ($p<0,05$) número de adenocarcinomas do tipo A, sem diferença ($p>0,05$) entre os grupos ZnD e ZnS. Além disso, observou-se que a prole feminina do grupo ZnS apresentou menor ($p<0,05$) número de adenocarcinomas do tipo B em relação ao grupo ZnD, e, uma diferença marginal ($p=0,09$) nos grupos CO e ZnD em relação aos grupos CO. Observou-se que a prole feminina do grupo ZnD apresentou menor ($p<0,05$) número de carcinossarcoma em relação aos grupos CO e ZnS, sem diferença ($p>0,05$) entre os grupos CO e ZnS (Tabela 8).

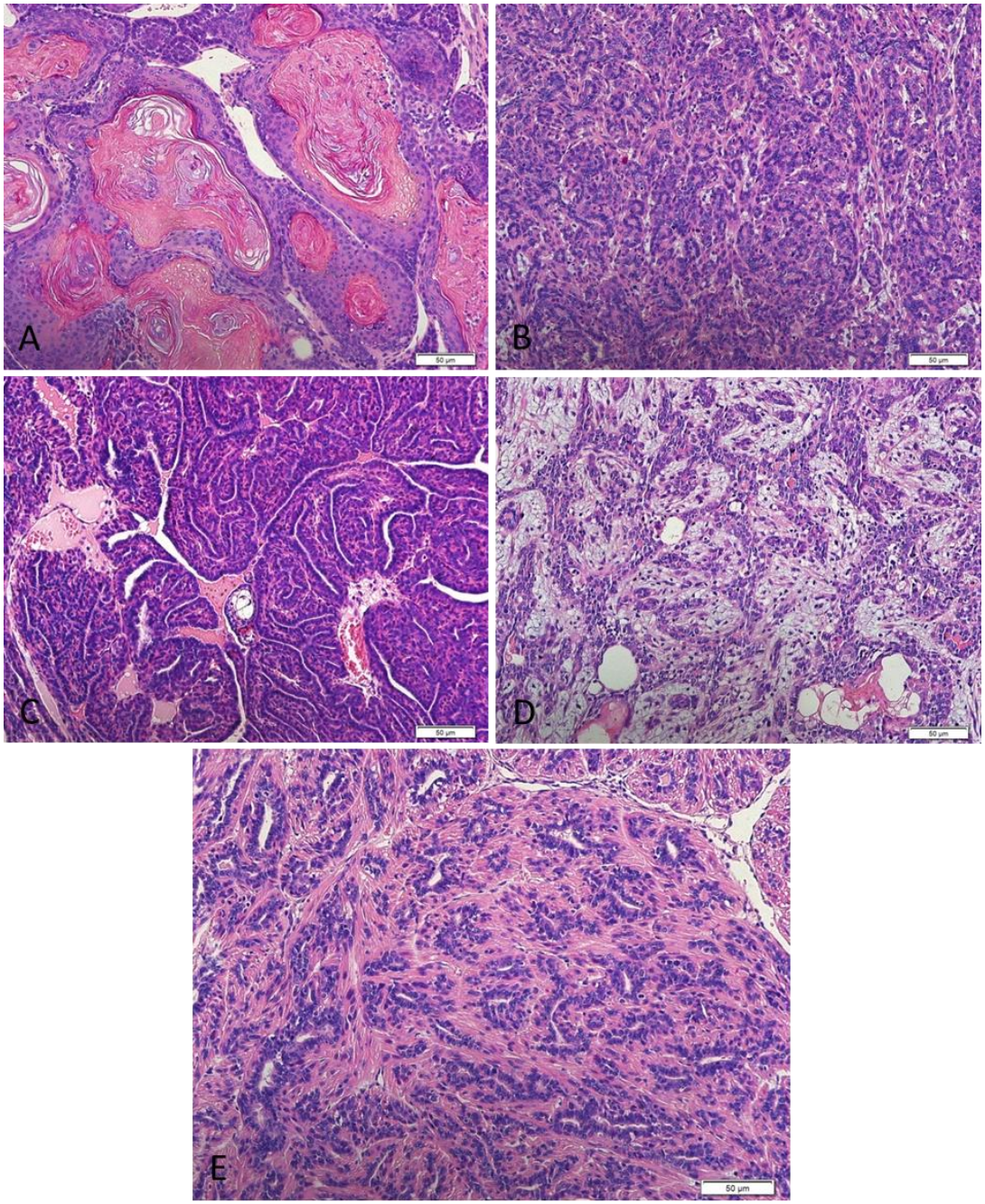


Figura 20: Fotomicrografias representativas dos tipos histológicos das neoplasias mamárias da prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS: A) Adenocarcinoma tipo A; B) Adenocarcinoma tipo B; C) Adenocarcinoma tipo C; D) Adenoacantoma; E) Carcinossarcoma coradas com H&E (10x).

Tabela 8: Histopatologia das neoplasias mamárias da prole feminina dos grupos CO, ZnD e ZnS

Variáveis	*Grupos Experimentais*		
	CO	**ZnD**	**ZnS**
Número total de neoplasias	31	35	40
Benignos	1	-	-
Malignos	29	34	40
Tipos histológicos (%)			
Adenocarcinoma Tipo A	5	15 [a]	17 [a]
Adenocarcinoma Tipo B	21	30 [b,c]	12 [b]
Adenocarcinoma Tipo C	11	11	17
Adenoacantoma	42	37	33
Carcinossarcoma	21	7 [a]	21

Os valores estão representados em média±desvio padrão. [a]Diferença estatisticamente ($p<0,05$) significante em relação aos grupos CO e ZnD. [b]Diferença estatisticamente ($p<0,05$) significante em relação ao grupo CO. [c]Diferença marginal ($p=0,063$) e estatisticamente ($p<0,05$) significante em relação aos grupos CO e ZnS, respectivamente, de acordo com o teste Exato de Fisher.

6. DISCUSSÃO

O risco de desenvolver câncer de mama pode ser modificado ainda no ambiente intrauterino por fatores nutricionais maternos. Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram que a exposição *in utero* a ração hiperlipídica à base de banha de porco diminuiu a suscetibilidade de desenvolvimento do câncer de mama na vida adulta (DE OLIVEIRA ANDRADE F. et al., 2014). No presente estudo, observou-se que a prole feminina exposta a deficiência com zinco no período intrauterino apresentou diminuição dos níveis de zinco nos eritrócitos e aumento da concentração de MDA em amostras de plasma e fígado, no período da puberdade. Ainda, observou-se diminuição do número de TEBs e aumento marginal da expressão dos genes c-MYC e LMO4 na glândula mamária. Além disso, a exposição a deficiência com zinco no período intrauterino, mas não a suplementação, modulou a expressão das histonas H3K9me3 e H4K20me3 na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade. Porém, ao contrário do esperado, não se observou diferença em relação a todos os parâmetros da carcinogênese mamária na prole feminina exposta a deficiência com zinco *in utero*. Por outro lado, observou-se que a exposição a suplementação com zinco *in utero* diminuiu o índice de mortalidade no período pós-natal. Na puberdade, observou-se que a prole feminina exposta *in utero* a suplementação com zinco apresentou aumento na concentração de zinco no fígado. Observou-se modificações na morfologia da glândula mamária da prole exposta *in utero* a suplementação com zinco como diminuição do número de TEBs, e aumento de proliferação (Ki67) e apoptose, bem como, da expressão da proteína p21 e p53 e dos genes RASSF1, STAT3 e ZNF382. Exposição *in utero* a suplementação com zinco aumentou a susceptibilidade de desenvolvimento do câncer de mama na vida adulta. Contudo, parâmetros da carcinogênese mamária como multiplicidade de tumores e latência de aparecimento do primeiro tumor não foram modificados. Em conjunto com a incidência de neoplasias mamárias, a prole feminina exposta a suplementação com zinco no período intrauterino apresentou menor e maior frequência de neoplasias com pesos menores (até 0,3 g) e maiores (>0,6 g), respectivamente. De modo contrário ao esperado a exposição fetal ao excesso de zinco aumentou a suscetibilidade de desenvolvimento do câncer de mama na vida adulta.

O estado nutricional de zinco materno pode influenciar o desenvolvimento embrionário, e, tanto a suplementação com zinco quanto a deficiência grave podem promover efeitos adversos na saúde da prole ao longo da vida (TIAN X., DIAZ F.J.,

2013). A ingestão adequada de zinco durante o período gestacional é essencial para reprodução, crescimento, desenvolvimento neurocomportamental e do sistema imunológico da prole (WESSELLS K.R., BROWN K.H., 2012).

As concentrações de zinco utilizadas no presente estudo foram determinadas a partir de estudos de toxicidade, considerando o período gestacional como importante janela para a modulação do desenvolvimento adequado da prole. Neste sentido, considerou-se níveis de zinco representativos para um modelo de deficiência moderada e suplementação, que representasse a disponibilidade de zinco ideal dentro do modelo proposto e que não induzisse nenhum prejuízo ao processo gestacional (KHAN A.T. et al., 2007; JOHNSON F.O. et al., 2011).

A deficiência com zinco, ainda que moderada, parece favorecer a ocorrência de estresse oxidativo. Estudo recente associou uma menor biodisponibilidade de zinco com aumento de oxidantes celular e parâmetros de oxidação tecidual como, níveis elevados de MDA (OTEIZA P. et al., 2012). O MDA é um produto da peroxidação lipídica e sua concentração plasmática é associada ao nível de estresse oxidativo no organismo. Ratos alimentados com uma dieta deficiente em zinco por cinco semanas apresentaram uma diminuição da expressão e atividade de enzimas antioxidantes e concomitante aumento dos níveis de MDA (CHEN S. et al., 2007; TAISY S. et al., 2008). Ainda, a restrição de zinco no início de vida foi associada com desequilíbrio de marcadores de estresse oxidativo e maior risco de desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis na idade adulta como, cardiovasculares, imunológicas e renais (TOMAT A.L. et al., 2008; TOMAT A.L. et al., 2010; TOMAT A.L. et al., 2011; CHEN Y.H. et al., 2012). Os resultados da concentração de MDA da prole feminina com 7 semanas de idade estão de acordo com dados da literatura, em que uma menor disponibilidade de zinco resulta em maiores concentrações de produtos provenientes do processo de estresse oxidativo (HO E. et.al, 2003). Assim, observou-se que a deficiência com zinco materna aumentou estresse oxidativo na prole feminina no período da puberdade, mas não uma maior suscetibilidade de desenvolvimento do câncer de mama na vida adulta.

Modificações na morfologia da glândula mamária como, número de TEBs e crescimento da árvore epitelial são utilizados em modelos experimentais de carcinogênese mamária para prever alterações no desenvolvimento da glândula mamária no início da vida associado ao risco de desenvolvimento do câncer de mama na vida adulta (RUSSO J. et al., 1990). Exposição de camundongos fêmeas C57BL/6 a deficiência com zinco no período pós-natal foi associada com comprometimento do

desenvolvimento e expansão de estruturas da glândula mamária (BOSTANCI Z., et al., 2015). Em nosso estudo, a exposição a deficiência com zinco no período fetal, mas não no pós-natal, diminuiu o número de TEBs, mas não interferiu na incidência final de neoplasias mamárias.

Alteração pós-transcricional de histonas, um importante mecanismo de remodelamento da cromatina, envolvido na regulação de genes envolvidos em mecanismos de diferenciação e desenvolvimento da glândula mamária, pode ser programada ainda durante o período fetal por exposição a dieta materna (WATERLAND R.A., JIRTLE R.L., 2003; LILLYCROP K.A., BURDGE G.C., 2012). Observou-se que a exposição a deficiência com zinco durante o período fetal aumentou a expressão das histonas H3K9me3 e H4K20me3 na glândula mamária. Modificações globais nos padrões de histonas têm sido associadas a fatores prognósticos e progressão tumoral em diversas neoplasias como mama, próstata e pulmão (YOKOYAMA Y., 2013). Níveis elevados da metilação da H3K9 e H4K20 são associados com a formação da heterocromatina e, consequentemente controle da expressão de genes (KIEFER J.C., 2007).

Mundialmente, estima-se que 17,3% da população tem consumo de zinco inadequado, sendo que gestantes e seus filhos constituem o grupo de maior risco. A deficiência ou excesso deste micronutriente está associada com índices elevados de morbidade e mortalidade, principalmente em crianças (BAILEY R.L., WEST K.P. Jr., BLACK R.E., 2015). O estado nutricional de zinco é essencial para a promoção da saúde, evidências nutricionais associaram a suplementação com zinco com uma redução significativa de parto prematuro, principalmente em mulheres de baixa renda, mas sem interferência no peso ao nascimento (MORI R. et al., 2012). Observou-se que a suplementação com zinco durante o período gestacional reduziu o índice de mortalidade, mas não modificou o peso da prole no pós-natal. Estes dados são relevantes, essencialmente, para destacar a importância do estado de zinco em regiões que apresentam índices elevados de mortalidade perinatal.

No contexto de programação fetal, a modulação do desenvolvimento da glândula mamária por zinco ainda não é totalmente compreendida. Porém, recentes estudos indicam que o metabolismo de zinco pode controlar eventos, como proliferação celular e apoptose e transcrição gênica, processos essenciais para o desenvolvimento da glândula mamária, assim como, para o câncer de mama (FUKADA T. et al., 2011; TIAN X., DIAZ F.J., 2013; KOCDOR H. et al., 2015). No presente estudo, a prole

feminina com 7 semanas de idade exposta a suplementação com zinco durante o período fetal apresentou menor número de TEBs e aumento de proliferação e apoptose, bem como, da expressão da proteína p21 e p53 e dos genes RASSF1, STAT3 e ZNF382. P53, supressor tumor, responsável pela manutenção da estabilidade genômica e regulação da expressão de genes essencialmente envolvidos no controle de ciclo celular, apoptose, senescência e/ou metabolismo. Ainda, induz parada de ciclo celular por ativar a expressão do p21, proteína responsável por inibir a progressão do ciclo celular (CAMPISI J., 2013). *In vitro*, a adição de zinco foi associada a regulação de vias de sinalização, estimulando ras, tirosina quinase e Akt/fosfatidilinositol 3-quinase (PIK3) e inibindo a proteína quinase C, vias envolvidas na regulação de ciclo celular e apoptose (BRUINSMA J.J. et al., 2002; HAJNAL A., 2002; KORICHNEVA I. et al., 2002).

RASSF1 é um supressor tumoral amplamente descrito na literatura por regular ciclo celular e apoptose de forma dependente de quinases, promovendo a estabilização de complexos transcricionais (DONNINGER H., VOS M.D., CLARK G.J., 2007). Possui um sítio específico de fosforilação para o complexo ATM/ATR, que são ativados em reposta a agentes indutores de dano ao DNA (DONNINGER H. et al., 2015). *In vitro*, observou-se que a exposição a níveis elevados de zinco (doses supra fisiológicas) foi associada a fragmentação do DNA (SHIH R.S. et al., 2010). Assim, a suplementação com zinco pode estar associada ao aumento de indução de dano no DNA. ZNF382, é um *zinc-finger*, que funciona como supressor tumoral por regular a expressão de genes envolvidos na iniciação e transformação neoplásica como STAT3, CDK6, NFKβ e AP1 e induzir a formação de heterocromatina (CHENG Y. et al., 2010). Sugere-se que a suplementação com zinco, mesmo em doses fisiológicas, induziu respostas adaptativas associada ao desenvolvimento, resultando em alterações celulares e moleculares para adequações fisiológicas e maiores chances de sobrevivência neste meio adverso. Assim, exposição a suplementação com zinco durante o período fetal induziu aumento de expressão dos supressores de tumores como RASSF1 e ZNF382 e da expressão de proteínas reguladoras de ciclo celular e apoptose como p21 e p53, respectivamente, e aumento da incidência de neoplasias mamárias. Similarmente, a exposição de ratas Sprague-Dawley a suplementação com zinco desde o período fetal até a vida adulta foi associada com aumento da incidência de neoplasias mamárias quimicamente induzidas por DMBA (SILVA F.R.M., et al., 2015). Outros estudos experimentais observaram que exposição a deficiência com zinco, de ratas Sprague-Dawley, no início da vida (vida intra-uterina) diminuiu parâmetros da carcinogênese mamária quimicamente

induzida por MNU como número total de neoplasias e multiplicidade de tumores (LEE S. et al., 2004). Assim, o período do desenvolvimento e de exposição a fatores nutricionais representa aspecto-chave na modificação da suscetibilidade do risco de desenvolvimento do câncer de mama (De ASSIS S., HILAKIVI-CLARKE L., 2006).

Os dados apresentados reforçam a hipótese de que o estado nutricional materno relativo ao zinco pode programar a suscetibilidade do desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis como o câncer de mama na vida adulta. Mais estudos com suplementação com zinco durante o período gestacional fazem-se necessários para uma melhor compreensão de mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares envolvidos. Destaca-se que a suplementação com zinco durante o período gestacional é uma prática de intervenção nutricional amplamente utilizada em muitos países em desenvolvimento, sendo que aproximadamente 20% de gestantes no mundo apresentam deficiência com zinco (MARET W, SANDSTEAD H., 2008). Considerando-se que o zinco tem papel essencial para a integridade e funcionamento do genoma durante todos os estágios de desenvolvimento, faz-se necessário avaliar de forma mais ampla seu papel durante o período gestacional na redução do risco de desenvolvimento de doenças na prole ao longo da vida.

7. CONCLUSÃO

A suplementação com zinco, mas não a deficiência, durante o período gestacional aumentou a suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária na vida adulta. Sugere-se que mecanismos envolvidos nesta programação incluem aumento de proliferação celular e apoptose, bem como alteração da expressão de proteínas que induzem parada de ciclo celular, apoptose e reparo de dano ao DNA como, p21 e p53 e de genes relacionados com o desenvolvimento tumoral como RASSF1, STAT3 e ZNF382 no tecido mamário.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER B.T. Fetal programming of hypertension. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2006;290:R1–10.

AMBROS V., BARTEL B., BARTEL D.P., BURGE C.B., CARRINGTON J.C., CHENG X., DREYFUSS G., EDDY S.R., GRIFFITHS-JONES S., MARSHALL M., MATZKE M., RUVKUN G., TUSCHL T. A uniform system for microRNA annotation. RNA. 2003; 9:277-9.

ASSIS S., WARRI A., CRUZ M.I., LAJA O., TIAN Y., ZHANG B., WANG Y., HUANG T.H.M., HUI-MING T., HILAKIVI-CLARKE L. High-fat or ethinyl-oestradiol intake during pregnancy increases mammary cancer risk in several generations of offspring. Nature Communication. 2012;1-9.

ASSIS S., ARRI A., BENITEZ C., et al. Protective Effects of Prepubertal Genistein Exposure on Mammary Tumorigenesis Are Dependent on BRAC1 Expression. 2011;4:1436-48.

ASSIS, S.; KHAN, G.; HILAKIVI-CLARKE, L. High birth weight increases mammary tumorigenesis in rats. International Journal of Cancer. 2006;119:1537–46.

BAILEY R.L., WEST K.P. Jr., BLACK R.E. The epidemiology of global micronutriente deficiencies. Ann Nutr Metab. 2015;66 Suppl 2:22-33.

BALLARD-BARBASH R., HUNSBERGER S., ALCIATI M.H., BLAIR S.N., GOODWIN P.J., MCTIERNAN A., WING R., SCHATZKIN A. Physical activity, weight control, and breast cancer risk and survival: clinical trial rationale and design considerations. J Natl Cancer Inst. 2009;101(9):630-43.

BARKER D.J., THORNBURG K.L., OSMOND C., KAJANTIE E., ERIKSSON J.G. The surface area of the placenta and hypertension in the offspring in later life. Int J Dev Biol. 2010;54:525–30.

BARKER D.J., WINTER P.D., OSMOND C., MARGETTS B., SIMMONDS S.J. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. Lancet. 1989;2:577-80.

BARROS A.C.S.D., MURANAKA E.N.K., MORI L.JO, PELIZON C.H.T., IRIYA K., GIOCONDO G., PINOTTI J.A. Induction of experimental mammary carcinogenesis in rats with 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. Revista do Hospital das Clínicas. 2004;59(5), 257-261.

BOBROWSKA-KORCZAK B., SKRAJNOWSKA D., TOKARZ A. The effect of dietary zinc - and polyphenols intake on DMBA-induced mammary tumorigenesis in rats. Journal of Biomedical Science. 2012;19(1):43.

BOSTANCI Z., MACK R.P. JR, LEE S., SOYBEL D.I., KELLEHER S.L. Paradoxical zinc toxicity and oxidative stress in the mammary gland during marginal dietary zinc deficiency. Reprod Toxicol. 2015;54:84-92.

BRAY T.M., BETTER W.J. The role of zinc as an antioxidant. Free Radical Biology & Medicine. 1990;8:281-91.

BULTMAN S.J., KLEBIG M.L., MICHAUD E.J., SWEET H.O., DAVISSON M.T., WOYCHIK R.P. Molecular analysis of reverse mutations from nonagouti (a) to black-and-tan (a(t)) and white-bellied agouti (Aw) reveals alternative forms of agouti transcripts. Genes Dev. 1994;15:8(4):481-90.

BURBEE D.G., FORGACS E., ZOCHBAUER S., SHIVAKUMAR L., FONG K., GAO B., RANDLE D., KONDO M., VIRMANI A., BADER S., SEKIDO Y., LATIF F., MILCHGRUB S., TOYOOKA S., GAZDAR A.F., LERMAN M.I., ZABAROVSKY E., WHITE M., MINNA J.D. Epigenetic Inactivation of RASSF1A in Lung and Breast Cancers and Malignant Phenotype Suppression. Journal of the National Cancer Institute.2001;93(9).

BURDGE G.C., LILLYCROP K.A., JACKSON A.A. Nutrition in early life, and risk of cancer and metabolic disease: alternative endings in an epigenetic tale? Br J Nutr. 2009;101(5):619-30.

BRUINSMA J.J., JIRAKULAPORN T., MUSLIN A.J., KORNFELD K. Zinc ions and cation diffusion facilitator proteins regulate Ras-mediated signaling. Dev Cell. 2002;2(5):567-78.

CAFFARELLI E., FILETICI P. Epigenetic regulation in cancer development. Frontiers in Bioscience. 2011;16:2682-94.

CAMPISI J. Aging, cellular senescence, and cancer. Annu Rev Physiol. 2013;75:685-705.

CHEN S.M., KUO C.D., HO L.T., LIAO J.F. Zinc deficiency increases platelet oxidative stress in nephrectomized rats. Biol Trace Elem Res. 2007;118(2):111-9.

CHEN Y.H., ZHAO M., CHEN X., ZHANG Y., WANG H., HUANG Y.Y., WANG Z., ZHANG Z.H., ZHANG C., XU D.X. Zinc supplementation during pregnancy protects against lipopolysaccharide-induced fetal growth restriction and demise through its anti-inflammatory effect. J Immunol. 2012;189(1):454-63.

CHENG Y., GENG H., CHENG S.H., LIANG P., BAI Y., LI J., SRIVASTAVA G., NG M.H., FUKAGAWA T., WU X., CHAN A.T., TAO Q. KRAB zinc finger protein ZNF382 is a proapoptotic tumor suppressor that represses multiple oncogenes and is commonly silenced in multiple carcinomas. Cancer Res. 2010;15;70(16):6516-26.

CHIAM K., TILLEY W.D., BUTLER L.M., BIANCO-MIOTTO T. The dynamic and static modification of the epigenome by hormones: a role in the developmental origin of hormone related cancers.Biochim Biophys Acta. 2009;1795:104-9.

COLEMAN J.E. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. Annu Rev Biochem. 1992;61:897-946.

CUI Y.; VOGT S.; OLSON N.; GLASS A.G.; ROHAN T.E. Levels of zinc, selenium, calcium, and iron in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007; 16(8):1682-5. Erratum in: Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007; 16(10):2173.

DAMMANN R., YANG G., PFEIFER G.P. Hypermethylation of the CpG Island of Ras Association Domain Family 1A (RASSF1A), a Putative Tumor Suppressor Gene from the 3p21.3 Locus, Occurs in a Large Percentage of Human Breast Cancers. Cancer Research.2001;61:3105–9.

DARNTON-HILL I., MKPARU U.C. Micronutrients in pregnancy in low- and middle-income countries. Nutrients. 2015;7(3):1744-68.

DAVIS C.D., MILNER J.A. Biomarkers for diet and cancer prevention research: potentials and challenges. Acta Pharmacologica Sinica, United States. 2007;28(9): 1262-73.

DE ASSIS S., WARRI A., BENITEZ C., HELFERICH W., HILAKIVI-CLARKE L. Protective effects of prepubertal genistein exposure on mammary tumorigenesis are dependent on BRCA1 expression. Cancer Prev Res (Phila). 2011;4(9):1436-48.

DE ASSIS S., WARRI A., CRUZ M.I., HILAKIVI-CLARKE L. Changes in mammary gland morphology and breast cancer risk in rats. J Vis Exp. 2010;16;(44).pii:2260.

DE ASSIS S., HILAKIVI-CLARKE L. Timing of dietary estrogenic exposures and breast cancer risk. Ann N Y Acad Sci. 2006 Nov;1089:14-35.

DE OLIVEIRA ANDRADE F., FONTELLES C.C., ROSIM M.P., DE OLIVEIRA T.F., DE MELO LOUREIRO A.P., MANCINI-FILHO J., ROGERO M.M., MORENO F.S., DE ASSIS S., BARBISAN L.F., HILAKIVI-CLARKE L., ONG T.P. Exposure to lard-based high-fat diet during fetal and lactation periods modifies breast cancer susceptibility in adulthood in rats. JNutr Biochem. 2014;25(6):613-22.

DELAGE B, DASHWOOD RH. Dietary manipulation of histone structure and function. Annu Rev Nutr. 2008;28:347-66.

DONNINGER H., VOS M.D., CLARK G.J. The RASSF1A tumor suppressor. J Cell Sci. 2007;15;120:3163-72.

DONNINGER H., CLARK J., RINALDO F., NELSON N., BARNOUD T., SCHMIDT M.L., HOBBING K.R., VOS M.D., SILS B., CLARK G.J. The RASSF1A tumor suppressor regulates XPA-mediated DNA repair. Mol Cell Biol. 2015 Jan;35(1):277-87.

DUMONT N., CRAWFORD Y.G., SIGAROUDINIA M., NAGRANI S.S., WILSON M.B., BUEHRING G.C., TURASHVILI G., APARICIO S., GAUTHIER M.L., FORDYCE C.A., McDERMOTT K.M., TISTY T.D. Human mammary cancer progression model recapitulates methylation events associated with breast premalignancy. Breast Cancer Research. 2009;11(6):1-17.

ESQUELA-KERSCHER A., SLACK F.J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer. 2006;6(4):259-69.

EVANS G.W. Zinc and its deficiency diseases. Clin Physiol Biochem. 1986;4(1):94-8.

FARQUHARSON M.J., AL-EBRAHEEM A., GERAKI K., LEEK R., JUBB A., HARRIS A.L. Zinc presence in invasive ductal carcinoma of the breast and its correlation with oestrogen receptor status. Phys Med Biol. 2009;7;54(13):4213-23.

FREDERICO A., IODICE P., FREDERICO P., DEL RIO A., MELLONE M.C., GATALANO G., FREDERICO P. Effects of selenium and zinc suplementantion on nutritional status in patients with cancer of digestive tract. European Journal of Clinical Nutrition. 2001;55:293-7.

FUKADA T, YAMASAKI S, NISHIDA K, MURAKAMI M, HIRANO T. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. J Biol Inorg Chem. 2011;16(7):1123-34.

GENE KIM H., RYAN J. J., MARSBOOM G., ARCHER S.L. Epigenetic mechanisms of pulmonary hypertension. Official Journal of the Pulmonary Vascular Research Institute. 2011;1(3):347-56.

GJOREVSKI N., NELSON C.M. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2011;12:581-593.

GLUCKMAN P.D., HANSON M.A., COOPER C., THORNBURG K.L. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. N Engl J Med. 2008;359:61–73.

GODFREY K.M., BARKER D.J.P. Fetal nutrition and adult disease. Am J Clin Nutr. 2000;71(5):1344S-52S.

HAJNAL A. Fine-tuning the RAS signaling pathway: Zn(2+) makes the difference. Mol Cell. 2002 May;9(5):927-8.

HAMBIDGE K. M., MILLER L.V., WESTCOTT J.E., SHENG X., KREBS N.F. Zinc bioavailability and homeostasis. Am J Clin Nutr. 2010;91(5):1478S–83S.

HAMDY S.M., LATIF A.K., DREES E.A., SOLIMAN S.M. Prevention of rat breast cancer by genistin and selenium. Toxicol Ind Health. 2012;28(8):746-57.

HARDING, JE. The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. Int J Epidemiol, v. 30, p. 15-23, 2001.

HELLER G., ZIEGLER B., BRANDSTETTER A., NOVAK S., RUDAS M., HENNING G., GEHRMANN M., ACHT T., ZOCHBAUER S., FILIPITS M. CDK10 Is Not a Target for Aberrant DNA Methylation in Breast Cancer. Anticancer Research. 2009;29:3939-44.

HILAKIVI-CLARKE L. Nutritional modulation of terminal end buds: its relevance to breast cancer prevention. Curr Cancer Drug Targets. 2007;7(5):465-74.

HILAKIVI-CLARKE L., DE ASSIS S. Fetal origins of breast cancer. Trends Endocrinol Metab. 2006;17(9):340-8.

HILAVIKI-CLARKE L., CLARKE R., ONOJAFE I., RAYGADA M., CHO E., LIPPMAN M. A maternal diet high in n-6 polynsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1997;94:9372-7.

HINSHELWOOD R.A., CLARK S.J. Breast cancer epigenetics: normal human mammary epithelial cells as a model system. J Mol Med (Berl). 2008;86(12):1315-28.

HO E., COURTEMANCHE C., AMES B.N. Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases P53 expression in human lung fibroblasts. The Journal of Nutrition. 2003;133(8):2543-48.

HOGSTRAND C, KILLE P, NICHOLSON RI, TAYLOR KM. Zinc transporters and cancer: a potential role for ZIP7 as a hub for tyrosine kinase activation. Trends in Molecular Medicine. 2009;15:3:101-11.

HORSEMAN N.D. Prolactin and mammary gland development. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 1999;4(1):79-88.

INMAN J.L., ROBERTSON C., MOTT J.D., BISSELL M.J. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. Development. 2015;142(6):1028-42.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Disponível em: <WWW.cancer.org.br>. Acesso em: 23/11/2015.

ION G., AKINSETE J.A., HARDMAN W.E. Maternal consumption of canola oil suppressed mammary gland tumorigenesis in C3(1) TAg mice offspring. BMC Cancer. 2010;10:81.

JOHNSON F.O., GILBREAT E.T., OGDEN L., GRAHAM T.C., GORHAM S. Reproductive and developmental toxicities of zinc supplemented rats. Reproductive Toxicology. 2011:31;134-43.

JUNQUEIRA L.C.U., JUNQUEIRA L.M.M.S. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. Ed. Santos, São Paulo. 1983.

KAGARA N, TANAKA N, NOGUSHI S, HIRANO T. Zinc and its transporter ZIP10 are involved in invasive behavior of breast cancer cell. Cancer Sci. 2007;98:5:692-97.

KELLEHER SL, SEO YA, LOPEZ V. Mammary gland zinc metabolism: regulation and dyresgulation. Genes Nutr. 2009;4:83-94.

KHAN A.T., GRAHAM T.C., OGDEN L., ALI S., SALWA, THOMPSON S.J., SHIREEN K.F., MAHBOOB M. A two-generational reproductive toxicity study of zinc in rats. J Environ Sci Health B. 2007 May;42(4):403-15.

KHAN G.; PENTTINEN P., CABANES A., FOXWORTH A., CHEZEK A., MASTROPOLE K., YU B., SMEDS A., HALTTUNEN T., GOOD C., MAKELA S., HILAKIVI-CLARKE L. Maternal flaxseed diet during pregnancy or lactation increases female rat offspring's susceptibility to carcinogen-induced mammary tumorigenesis. Reproductive Toxicology. 2007;23:397-406.

KHAN S.I., AUMSUWAN P., KHAN I.A., WALKER L.A., DASMAHAPATRA A.K. Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. Chem Res Toxicol. 2012;13;25(1):61-73.

KIEFER J.C. Epigenetics in development. Dev Dyn. 2007;236(4):1144-56.

KLOUBERT V., RINK L. Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells. Food Funct. 2015;7;6(10):3195-204.

KOCDOR H., ATES H., AYDIN S., CEHRELI R., SOYARAT F., KEMANLI P., HARMANCI D., CENGIZ H., KOCDOR M.A. Zinc supplementation induces apoptosis and enhances antitumor efficacy of docetaxel in non-small-cell lung cancer. Drug Des Devel Ther. 2015;9:3899-909.

KORICHNEVA I., HOYOS B., CHUA R., LEVI E., HAMMERLING U. Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen. J Biol Chem. 2002 Nov 15;277(46):44327-31.

KUO H.W., CHEN S.F., WU C.C., CHEN D.R., LEE J.H. Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. Biol Trace Elem Res. 2002;89(1):1-11.

LANGLEY-EVANS, S.C., McMULLEN, S. Developmental origins of adult disease. Medical principles and practice, Switzerland. 2010;19(2):87-98.

LEE S., SIMPSON M., NIMMO M., XU Z. Low zinc intake suppressed N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats. Carcinogenesis. 2004;25(10):1879-85.

LILLYCROP K.A., BURDGE G.C. Epigenetic mechanisms linking early nutrition to long term health. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2012;26(5):667-76.

LILLYCROP K.A., PHILLIPS ES., JACKSON A.A., HANSON M.A., BURDGE G.C. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. Journal of Nutrition, 2005;135:6:1382-6.

LIM K.H., RIDDELL L.J., NOWSON C.A., BOOTH A.O., SZYMLEK-GAY E.A. Iron and zinc nutrition in the economically-developed world: a review. Nutrients. 2013;13;5(8):3184-211.

LIVINGSTONE C. Zinc: physiology, deficiency, and parenteral nutrition. Nutr Clin Pract. 2015;30(3):371-82.

LUO K., YUAN W., ZHU C., et al. Expression of a novel Kruppel-like zinc-finger gene, ZNF382, in human heart. Biochem Biophys Res Commun. 2002;299:606-12.

MACDONALD RS. The role of zinc in growth and cell proliferation. J Nutr. 2000;130(5S Suppl):1500S-8S.

MACIAS H., HINCK L. Mammary Gland Development. Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology. 2012;1(4):533-557.

MAFRA D., COZZOLINO S.M.F. Importância do zinco na nutrição humana. Rev. Nutr., Campinas. 2004;17(1):79-87.

MARET W, SANDSTEAD HH. Possible roles of zinc nutriture in the fetal origins of disease. Exp Gerontol. 2008;43(5):378-81.

MARTIN-MORENO J.M., SOERJOMATARAM I., MAGNUSSON G. Cancer causes and prevention: a condensed appraisal in Europe in 2008. Eur J Cancer. 2008;44(10):1390-403.

MASSO-WELCH P.A., DARCY K.M., STANGLE-CASTOR N.C., IP M.M. A developmental atlas of rat mammary gland histology. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2000;5(2):165-85.

MATTHEWS J.M., LESTER K., JOSEPH S., CURTIS D.J. LIM-domain-only proteins in cancer. Nat Rev Cancer. 2013;13(2):111-22.

MCCORMICK N.H., HENNIGAR S.R., KISELYOV K., KELLEHER S.L. The biology of zinc transport in mammary epithelial cells: implications for mammary gland development, lactation, and involution. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2014;19(1):59-71.

MEDINA D. Of mice and women: A short history of mouse mammary cancer research with an emphasis on the paradigms inspired by the transplantation method. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(10):a004523.

MESSINA M., HILAKIVI-CLARKE L. Early intake appears to be the key proposed protective effects of soy intake against breast cancer. Nutrition and cance. 2009;61(6):792-8.

MICHELS K.B., MOHLLAJEE A.P., ROSET-BAHMANYAR E., BEEHLER G.P., MOYSICH K.B. Diet and Breast Cancer. Cancer supplement. 2007;109;12: 2712-49.

MICHELS KB, XUE F. Role of birthweight in the etiology of breast cancer. Int J Cancer. 2006;119(9):2007-25.

MISTRY HD, WILLIAMS PJ. The importance of antioxidant micronutrients in pregnancy. Oxid Med Cell Longev. 2011;8:417-49.

MORI R., OTA E., MIDDLETON P., TOBE-GAI R., MAHOMED K., BHUTTA Z.A. Zinc supplementation for improving pregnancy and infant outcome. Cochrane Database Syst Rev. 2012;11;7:CD000230.

MOORE K.L., PERSAUD T.V.N. Embriologia Clinica. [Livro]:Editora Guanabara Koogan S.A. 6ªED. 2000.

OTEIZA PI. Zinc and the modulation of redox homeostasis. Free Radic Biol Med. 2012;53(9):1748-59.

PALMER J.R., WISW L.A., HATCH E.E., TROISI R., TITUS-EMSTOFF L., STROHNITTER W., KAUFMAN R., HERBST A.L., NOLLER K.L., HYER M., HOOVER R.N. Prenatal Diethylstilbestrol Exposure and Risk of Breast Cancer. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 2006;5(8):1509-14.

PAN S.Y., ZHOU J., GIBBONS L, MORRISON H., WEN S.W. Antioxidants and breast cancer risk- a population-based case-control study in Canada. BMC Cancer. 2011;11:372.

PANG-KUO L., SARASWATI S. Epigenomics and breast cancer. Pharmacogenomics. 2008;9(12):1879–1902.

PEREIRA P.C. Milk nutritional composition and its role in human health. Nutrition. 2014 Jun;30(6):619-27.

PEROU C.M., SURLIE T., EISEN M.B., RIJINS M.V., JEFFREYK S.S., REES C.A., POLLACK J.R., ROSS D.T., JOHNSEN H., AKSLEN L.A., FLUGEL E., PERGAMENSCHIKOV A., WILLIAMS C., ZHUS X., LÙNNING P.E., BÙRRESEN-

DALE A.L., BROWN P.Q., BOTSTEIN D. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000;406(17):747-52.

PFEIFER G.P., DAMMANN R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. Biochemistry (Mosc). 2005;70(5):576-83.

POLYAK K. Breast Cancer: origins and evolution. J.Clin Invest. 2007;117:3155-63.

REEVES P.G., NIELSEN F.H., FAHEY G.C.J. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr. 1993;123:1939–51.

RUSSO J., BALOGH G., RUSSO I.H. Full-term pregnancy induces a specific genomic signature in the human breast cancer. Cancer Epidemiol Biomark Prev. 2008;17(1):51-66.

RUSSO J., MORAL R., BALOGH G.A., MAILO D., RUSSO I.H. Review: the protective role of pregnancy in breast cancer. Br Cancer Res. 2005;7:131-42.

RUSSO I.H., RUSSO J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. Environ Health Perspect. 1996;104(9):938-67.

RUSSO J., GUTERSON B.A., ROGERS A.E., RUSSO I.A. WELLINGS S.R., ZWIETEN J.V. Comparative Study of Human and Rat Mammary Tumorigenesis. Laboratory Investigation. 1990;3:244.

RUSSO J., TAIT L., RUSSO I.H. Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. III. The cell of origin of rat mammary carcinoma. The American Journal of Pathology. 1983;113(1):50-66.

RUSSO I.H., RUSSO J. Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. J Natl Cancer Inst. 1978;61(6):1439-49.

SALHIA B., TAPIA C., ISHAK E.A., GABER S., BERGHUIS B., HUSSAIN K.H., DUQUETTE R.A., RESAU J., CARPTEN J. Molecular subtype analysis determines the association of advanced breast cancer in Egypt with favorable biology. BMC Womens Health. 2011;30:(11)44.

SANDERSON M., WILLIAMS M.A., DALING J.R., HOLT V.L., MALONE K.E., SELF S.G., MOORE D.E. Maternal factors and breast cancer risk among young women. Paediatric and perinatal epidemiology, England. 1998;12(4):397-407.

SCHULTZ D.C., AYYANATHAN K., NEGOREV D., MAUL G.G., RAUSCHER F.J. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. Genes Dev. 2002;16(8):919-32.

SHARMA S., KELLY T.K., JONES P.A. Epigenetics in cancer. Carcinogenesis. 2010;31(1):27-36.

SHIH R.S., WONG S.H., SCHOENE N.W., ZHANG J.J., LEI K.Y. Enhanced Gadd45 expression and delayed G2/M progression are p53-dependent in zinc-supplemented human bronchial epithelial cells. Exp Biol Med (Maywood). 2010;235(8):932-40.

SHI S.M. MODULATION OF HUMAN TUMOR SUPPRESSOR GENES, GADD45, p53 AND p38 MAPK BY ZINC STATUS IN NORMAL HUMAN BRONCHIAL EPITHELIAL CELLS [Dissertation of Doctor of Philosophy]. United State, 2007. 169p.

SHUKLA S., MIRZA S., SHARMA G., PARSHAD R., GUPTA S.D., RALHAN R. Detection of RASSF1A and RARbeta hypermethylation in serum DNA from breast cancer patients. Epigenetics. 2006;1(2):88-93.

SILVA F.R.M., BIDINOTTO L.T., CARVALHO R.F., BARBISAN L.F. Early-in-life dietary zinc supplementation or deficiency and susceptibility to mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rat. [Abstract]. In: Proceedings of the 106th

Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2015 Apr 18-22; Philadelphia, PA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2015; 75(15 Suppl).

SONG Y., LEONARD S.W., TRABER M.G., HO E. Zinc deficiency effects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. The Journal of Nutrition. 2009;139(9):1626-31.

STARK A.H., KOSSOY G., ZUSMAN I., YARDEN G., MADAR Z. Olive Oil Consumption During Pregnancy and Lactation in Rats Influences Mammary Cancer Development in Female Offspring. Nutrition and Cancer. 2003;46(1):59-65.

STEVE-EDEMBA C. L. Biochemical Assessment of Zinc Status of Under-Five Children in Orphanages of Federal Capital Territory, Abuja, Nigeria. Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS). 2014;13(7):60-70.

STOLL B.A. n-3 Fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. British Journal of Nutrition. 2002;87:193-8.

SU H.M., HSIEH P.H., CHEN H.F. A maternal high n-6 fat diet with fish oil supplementation during pregnancy and lactation in rats decreases breast cancer risk in the female offspring. J Nutr Biochem. 2010;21(11):1033–7.

SUM E.Y., SHACKLETON M., HAHM K., THOMAS R.M., O'REILLY L.A., WAGNER K.U., LINDEMAN G.J., VISVADER J.E. Loss of the LIM domain protein Lmo4 in the mammary gland during pregnancy impedes lobuloalveolar development. Oncogene. 2005;14;24(30):4820-8.

SUM E.Y., SEGARA D., DUSCIO B., BATH M.L., FIELD A.S., SUTHERLAND R.L., LINDEMAN G.J., VISVADER J.E. Overexpression of LMO4 induces mammary hyperplasia, promotes cell invasion, and is a predictor of poor outcome in breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;24;102(21):7659-64.

SUM E.Y., PENG B., YU X., CHEN J., BYRNE J., LINDEMAN G.J., VISVADER J.E. The LIM domain protein LMO4 interacts with the cofactor CtIP and the tumor

suppressor BRCA1 and inhibits BRCA1 activity. J Biol Chem. 2002:8;277(10):7849-56.

SUN D, ZHANG L, WANG Y, WANG X, HU X, CUI F, KONG F. Regulation of zinc transporters by dietary zinc supplement in breast cancer. Mol Biol Rep. 2007;34:241-47.

TAYLOR KM, MORGAN HR, SMART K, ZAHARI NM, PUMFORD S, ELLIS IO, ROBERTSON JFR, NICHOLSON R. The emerging role of the LIV-1 subfamily of zinc transporters in breast cancer. Mol Med. 2007;13:7-8:396-406.

TAYSI S., CIKMAN O., KAYA A., DEMIRCAN B., GUMUSTEKIN K., YILMAZ A., BOYUK A., KELES M., AKYUZ M., TURKELI M. Increased oxidant stress and decreased antioxidant status in erythrocytes of rats fed with zinc-deficient diet. Biol Trace Elem Res. 2008;123(1-3):161-7.

TIAN X., DIAZ F.J. Acute dietary zinc deficiency before conception compromises oocyte epigenetic programming and disrupts embryonic development. Dev Biol. 2013;1;376(1):51-61.

TIEDE B., KANG Y. From milk to malignancy: the role of mammary stem cells in development, pregnancy and breast cancer. *Cell Research*. 2011;21(2):245-257.

TOMAT A.L., COSTA M.D.E.L, ARRANZ C.T. Zinc restriction during different periods of life: influence in renal and cardiovascular diseases. Nutrition. 2011;27(4):392-8.

TOMAT A., ELESGARAY R., ZAGO V., FASOLI H., FELLET A., BALASZCZUK A.M., SCHREIER L., COSTA M.A., ARRANZ C. Exposure to zinc deficiency in fetal and postnatal life determines nitric oxide system activity and arterial blood pressure levels in adult rats. Br J Nutr. 2010;104(3):382-9.

TOMAT A.L., INSERRA F., VEIRAS L., VALLONE M.C., BALASZCZUK A.M., COSTA M.A., ARRANZ C. Moderate zinc restriction during fetal and postnatal growth

of rats: effects on adult arterial blood pressure and kidney. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2008;295(2):R543-9.

TRICHOPOULOS D. Hypothesis: does breast cancer originate in utero? Lancet. 1990;21:335(8695):939-40.

TRUMBO P., YATES A.A., SCHLICKER S., POOS M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. J Am Diet Assoc. 2001 Mar;101(3):294-301.

URRUTIA R. KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. Genome Biol. 2003;4:231.

VISVADER J.E., VENTER D., HAHM K., SANTAMARIA M., SUM E.Y., O'REILLY L., WHITE D., WILLIAMS R., ARMES J., LINDEMAN G.J. The LIM domain gene LMO4 inhibits differentiation of mammary epithelial cells in vitro and is overexpressed in breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001:4;98(25):14452-7.

YENBUTR P, HILAKIVI-CLARKE L, PASSANITI A. Hypomethylation of an exon I estrogen receptor CpG island in spontaneous and carcinogen-induced mammary tumorigenesis in the rat. Mech Ageing Dev. 1998;1:106(1-2):93-102.

YOKOYAMA Y., HIEDA M., NISHIOKA Y., MATSUMOTO A., HIGASHI S., KIMURA H., YAMAMOTO H., MORI M., MATSUURA S., MATSUURA N. Cancer-associated upregulation of histone H3 lysine 9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo. Cancer Sci. 2013 Jul;104(7):889-95.

WANG N., KUDRYAVTSEVA E., CH'EN I.L., MCCORMICK J., SUGIHARA T.M., RUIZ R., ANDERSEN B. Expression of an engrailed-LMO4 fusion protein in mammary epithelial cells inhibits mammary gland development in mice. Oncogene. 2004;26;23(8):1507-13.

WATERLAND R.A., JIRTLE R.L. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. Mol Cell Biol. 2003;23(15):5293-300.

WESSELLS K.R., BROWN K.H. Estimating the global prevalence of zinc deficiency: results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. PLoS One. 2012;7(11):e50568.

WHITSETT T., CARPENTER M., LAMARTINIERE C.A. Resveratrol, but not EGCG, in the diet suppresses DMBA-induced mammary cancer in rats. Journal of Carcinogenesis. 2006:15;5;15.

WOLFF G.L., KODELL R.L., MOORE S.R., COONEY C.A. Maternal epigenetics and methyl supplements affect agouti gene expression in Avy/a mice. FASEB J. 1998;12(11):949-57.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: <www.who.int>. Acesso em: 23/11/2015.

XIAO T.Z., BHATIA N., URRUTIA R., LOMBERK G.A., SIMPSON A., LONGLEY B.J. MAGE I transcription factors regulate KAP1 and KRAB domain zinc finger transcription factor mediated gene repression. PLoS One. 2011;6(8):e23747.

YENBUTR P, HILAKIVI-CLARKE L, PASSANITI A. Hypomethylation of an exon I estrogen receptor CpG island in spontaneous and carcinogen-induced mammary tumorigenesis in the rat. Mech Ageing Dev. 1998;1:106(1-2):93-102.

YU B., KHAN G., FOXWORTH A., HUANG K., HILAKIVI-CLARKE L. Maternal dietary exposure to fiber during pregnancy and mammary tumorigenesis among rat offspring. International Journal of Cancer. 2006;119:2279-86.

ANEXO – Termo do Comitê de Ética do Uso de Animais da FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 272013

C E R T I F I C A D O

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP) CERTIFICA que o Projeto de Pesquisa "**Nutrição e origem fetal do câncer de mama: efeito da deficiência ou suplementação com zinco no período gestacional de camundongos na suscetibilidade da progênie à carcinogênese mamária**" (Protocolo CEUA/FCF/407), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Raquel Santana da Cruz**, sob orientação/supervisão do(a) **Prof. Dr. Thomas Prates Ong**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 18 de fevereiro de 2013.

São Paulo, 13 de março de 2013.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br