

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

Ausência de atividade quimiopreventiva por parte da vitamina A
quando administrada a ratas na etapa de pós-iniciação da
carcinogênese mamária

Letícia Okamoto

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Thomas Prates Ong

SÃO PAULO
2010

Letícia Okamoto

Ausência de atividade quimiopreventiva por parte da vitamina A
quando administrada a ratas na etapa de pós-iniciação da
carcinogênese mamária

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Thomas Prates Ong
Orientador/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

“Não se perturbe o coração de vocês.
Creiam em Deus; creiam também em mim”.

João 14:1

Primeiramente a Deus que em todos os momentos esteve e está ao meu lado constantemente e que permitiu que eu entrasse para o mestrado.

Aos meus pais Isao e Ruri que sempre me incentivaram nos estudos e por serem os meus primeiros mestres. Obrigada por todo o suporte espiritual e financeiro e por terem acreditado em mim. Amo vocês!

À minha querida avó Mitsuko que participou da minha vida aproximadamente 17 anos, mas que hoje não pode compartilhar deste momento tão importante.

Ao meu namorado Daniel pelos conselhos, pela paciência, pelo carinho e amor que tem demonstrado e principalmente, por me fazer tão feliz!

Às minhas amigas Suemi, Vivi, Nane, Cris e Rubia por me apoiarem nesses quase três anos de mestrado!

Ao grupo de profissionais da Igreja Evangélica Holiness da Liberdade que me apoiou em oração e palavras de incentivo.

Aos meus irmãos Alexandre e Gustavo e às minhas cunhadas Adriane e Bruna e meu tio Kaoru que mesmo tão longe, sempre me apoiaram!

A Teka e a Tibi que me alegram com suas lambidas e latidos quando eu volto para Curitiba.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Thomas Prates Ong que auxiliou a difundir o conhecimento da Nutrigenômica no Brasil, por ter aceitado meu pedido para orientação neste estudo e por me ensinar os primeiros passos na pesquisa;

Ao professor Tit. Fernando Salvador Moreno pelo pioneirismo no desenvolvimento da área de Nutrigenômica e Biologia Molecular e por me aceitar em seu laboratório e me ensinar como é precioso estudar e amar o que se faz;

A Profa. Tit. Maria Lúcia Zaidan Dagli (Malu) do Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP pela ajuda com as análises histológicas

Ao professor Dr. Luis Fernando Barbisan do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP pelo auxílio na classificação das análises histopatológicas;

Ao professor Dr. Alceu Jordão Jr e professor Tit. Hélio Vannucchi do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pelo auxílio na análise das concentrações de retinol e palmitato de retinila no HPLC.

Ao André que me auxiliou no início do experimento. Torço muito para que consiga realizar seu sonho de ser médico;

A “Z”Aline que foi minha professora em biologia molecular. Desejo o melhor pra você, saiba que é uma ótima pesquisadora e professora! Continue sempre assim espontânea, alegre e de bem com a vida!;

A Alessandra (Fu) sempre alegre e com uma simpatia que a todos contagia!;

A Aderuza (Dera) com uma disposição e coração incríveis para ajudar a todos em qualquer momento!;

A Fábia que apesar de pequena é uma guerreira, enfrentando todas as dificuldades com muito esforço e dedicação!

A Mônica pela sua determinação em busca do seu sonho e pela sua disposição em me ajudar!;

A Bruna exigente e sistemática que conhece melhor que ninguém os segredos da estatística;

A Clarissa com suas conversas irreverentes que sempre animavam o laboratório;

Ao Renato que além de técnico do laboratório é pai e doutorando! Obrigada por me auxiliar nas técnicas de bancada;

Ao Carlos pelas conversas a respeito da profissão de Nutricionista e pelo seu engajamento na promoção da área da Nutrição;

A Ju, Rodrigo e Edu que estão no início desta caminhada em busca do conhecimento através da pesquisa. Boa sorte para vocês!;

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Cléo, Mônica, Edilson e à Lurdinha e Joana pela ajuda;

A Elaine e Jorge, funcionários da secretaria de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP;

A todos os funcionários do biotério do Conjunto das Químicas, em especial à Flavia e Renata;

Finalmente, a Capes e a FAPESP pela bolsa de estudos e auxílio financeiro para a realização desse trabalho.

RESUMO

OKAMOTO, L. **Ausência de atividade quimiopreventiva por parte da vitamina A quando administrada a ratas na etapa de pós-iniciação da carcinogênese mamária.** [Lack of chemopreventive activity by the vitamin A when administered to rats in the stage of post-initiation of mammary carcinogenesis]. 2010. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Avaliou-se a eventual atividade quimiopreventiva por parte da vitamina A (VA) quando administrada a ratas Sprague-Dawley durante a etapa de pós-iniciação da carcinogênese mamária induzida pelo 7-12 dimetilbenz(a)antraceno (DMBA). Com exceção de 10 animais que constituíram um grupo controle à parte de ratas consideradas normais [grupo normal (N)], e que não foram submetidas a qualquer procedimento experimental durante todo o estudo, 40 ratas com 50 dias de idade receberam o agente carcinogênico DMBA, por meio de entubação gástrica na dose de 60 mg/kg/peso corpóreo. Após 2 semanas, as ratas iniciadas receberam durante 12 semanas consecutivas, por entubação gástrica, 0,25 mL/100 g de peso corpóreo de óleo de milho (grupo OM; controle, n=20) e 2,5 mg/100 g de peso corpóreo de vitamina A (grupo VA, n=20), sendo, então, eutanasiadas. Não houve diferenças ($p>0,05$) entre os grupos OM e VA quanto a latência de aparecimento da primeira neoplasia mamária, incidência, multiplicidade e peso médio das neoplasias mamárias, todas classificadas como malignas. Em comparação ao grupo OM, o grupo VA apresentou maior concentração ($p<0,05$) de retinol no tecido mamário neoplásico e hepático, além de maiores concentrações hepáticas ($p<0,05$) de palmitato de retinila. Não se detectou palmitato de retinila em neoplasias mamárias de ambos os grupos. Não houve diferença ($p>0,05$) entre neoplasias mamárias do grupo OM e o tecido mamário do grupo N quanto à metilação global do DNA. Em comparação a neoplasias mamárias do grupo OM, neoplasias do grupo VA apresentaram menor ($p<0,05$) metilação global do DNA. Conclui-se que a VA não apresentou atividades quimiopreventivas e seu metabolismo encontra-se alterado em neoplasias mamárias.

Palavras chave: Carcinogênese mamária. Quimioprevenção. Vitamina A. Metabolismo do retinol.

ABSTRACT

OKAMOTO, L. **Lack of chemopreventive activity of vitamin A when administered to rats during the stage of post-initiation of mammary carcinogenesis.** [Ausência de atividade quimiopreventiva por parte da vitamina A quando administrada a ratas na etapa de pós-iniciação da carcinogênese mamária]. 2010. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The potential chemopreventive activity of vitamin A (VA) was evaluated when administered to Sprague-Dawley rats during the stage of post-initiation of mammary carcinogenesis induced by 7-12 dimethylbenz(a)anthracene (DMBA). Except for 10 animals that constituted a separate control group of normal rats [normal group (N)], that were not subjected to any experimental procedure throughout the study, 40 rats with 50 days of age received the carcinogen DMBA by gavage at the dose of 60 mg/kg/body weight. After 2 weeks, the rats received for 12 consecutive weeks, by gavage, 0.25 mL/100 g body weight of corn oil (OM group, control, n = 20) or 2.5 mg/100 g body weight of vitamin A (VA group, n = 20), being then euthanized. There were no differences ($p > 0.05$) between the OM and VA groups regarding the latency of onset of first breast neoplasm, incidence, multiplicity and average weight of breast tumors, all classified as malignant. Compared to the OM group, the VA group had a higher concentration ($p < 0.05$) of retinol in neoplastic breast tissue and liver as well as higher concentrations ($p < 0.05$) of retinyl palmitate in the liver. Retinyl palmitate was not detected in breast tumors of both groups. There was no difference ($p > 0.05$) between breast tumours of OM group and mammary tissue of N group regarding global DNA methylation. Compared to breast tumors of OM group, breast tumors of VA group had lower ($p < 0.05$) global DNA methylation. VA did not show chemopreventive activity when administered to rats during the stage of post-initiation of mammary carcinogenesis. Furthermore, the metabolism of VA is altered in breast tumors.

Keywords: Mammary carcinogenesis. Chemoprevention. Vitamin A. Retinol metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reprodução de quadro de 1275 da universidade de Leiden (Holanda), retratando exame da mama em freiras pelo médico Teodorico Borgognoni	15
Figura 2: Representação esquemática do protocolo experimental.	28
Figura 3: Evolução do peso corpóreo de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA e tratadas com OM ou VA, durante 12 semanas consecutivas.	34
Figura 4: Consumo de ração de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA e tratadas com OM ou VA, durante 12 semanas consecutivas.	35
Figura 5: Neoplasias mamárias de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA	36
Figura 6: Neoplasia mamária de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA.	36
Figura 7: Incidência de neoplasias mamárias de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA e tratadas com OM e VA.	37
Figura 8: Análise histopatológica de neoplasias mamárias de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA e tratadas com OM e VA.	39
Figura 9: Adenocarcinoma mamário do tipo papilar corada em H&E. Objetiva de 50x.	40
Figura 10: Adenocarcinoma mamário do tipo papilar-cribriforme corada em H&E. Objetiva de 50x.	40
Figura 11: Padrão de metilação global do DNA. A: blot. B: membrana.	42
Figura 12: Padrão de metilação global do DNA em tecido mamário normal (grupo N) e em neoplasias mamárias dos grupos OM e VA.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso corpóreo inicial e final e consumo médio de ração de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA e tratadas com óleo de milho (OM) ou vitamina a (VA), durante 12 semanas consecutivas. 33

Tabela 2: Incidência, número total, multiplicidade e peso médio das neoplasias mamárias de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA e tratadas com OM ou VA, durante 12 semanas consecutiva. 38

Tabela 3: Concentrações de retinol e palmitato de retinila em tecidos hepáticos e neoplasias mamárias dos grupos OM e VA. 41

LISTA DE ABREVIATURAS

4-HPR	Fenretinida
ARAT	Acil:Coa Retinol Aciltransferase
ATRA	Ácido Retinóico todo-Trans
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CpG	Citosina Adjacente à Guanina
CRA	Ácido Retinóico 13-cis
CRBP-I	Proteína Celular Ligadora de Retinol-I
CRBP-II	Proteína Celular Ligadora de Retinol-II
CRBP-III	Proteína Celular Ligadora de Retinol-III
CYP1A1	Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 1
CYP1B1	Citocromo P450, família 1, subfamília B, polipeptídeo 1
DMBA	7-12-dimetilbenz(a)antraceno
GNMT	Glicina- <i>N</i> -Metil-Transferase
LRAT	Lecitina: Retinol Aciltransferase
MNU	<i>N</i> -metil- <i>n</i> -nitrosuréia
OM	Óleo de milho
RAR	Receptor de Ácido Retinóico
RBP4	Proteína Ligadora de Retinol
RP	Palmitato de Retinila
RXR	Receptor do Retinóide X
SERM's	Moduladores seletivos de receptores de estrogênio
TTR	Transtiretina
VA	Vitamina A

SUMÁRIO

1	REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1	Câncer de Mama.....	14
1.2	Modelos de carcinogênese mamária quimicamente induzidos	16
1.3	Nutrição e Câncer de mama.....	17
1.4	Vitamina A e Câncer de mama.....	19
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1	Animais	26
3.2	Protocolo experimental.....	26
3.3	Eutanásia	29
3.4	Análise macroscópica das neoplasias mamárias	29
3.5	Exame histopatológico das neoplasias mamárias por meio de coloração pela hematoxilina e eosina (H&E).....	29
3.6	Determinação, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), das concentrações de retinol e palmitato de retinila em tecido hepático e adenocarcinomas mamários	29
3.7	Análise do padrão de metilação global do DNA.....	30
3.7.1	Extração de DNA de amostras de tecidos mamários normais e neoplasias mamárias	30
3.7.2	“Dot-Blot”	31
3.8	Análise estatística	32
4	RESULTADOS.....	33
4.1	Peso e consumo de ração dos animais.....	33
4.2	Latência de aparecimento da 1ª neoplasia, bem como incidência, multiplicidade e peso médio das neoplasias mamárias em ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA.....	36

4.3	Análise histopatológica das neoplasias mamárias.....	39
4.5	Análise do padrão de metilação global do DNA	42
5	DISCUSSÃO.....	44
6	CONCLUSÕES.....	49
7	ANEXOS.....	50
7.1	Informações para os membros de Bancas Julgadoras de Mestrado	50
7.2	Ficha de Aluno	51
7.3	Cópia do Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA).....	54
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Câncer de Mama

O câncer de mama é conhecido desde o tempo dos antigos egípcios (Rice e Whitehead, 2006). Em 1275, o cirurgião Teodorico Borgognoni já examinava a mama de freiras de conventos na Europa, onde naquela época era comum encontrar casos de câncer de mama (**Figura 1**) (Greaves, 2002). Outro médico, Bernardino Ramazzini, especulou se essa condição seria devido ao estilo de vida celibatário das religiosas, associando fatores reprodutivos e hormonais à incidência de câncer de mama (Weinstein e Case, 2008).

Atualmente, o câncer de mama é considerado um importante problema de saúde pública (Hanf e Gonder, 2005). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 1 milhão de casos novos de câncer de mama são diagnosticados anualmente em todo o mundo (OMS, 2003). Por outro lado, em 2007 nos EUA houve, pela primeira vez, uma diminuição da incidência da doença desde 1980 (Lester, 2007). Essa diminuição foi identificada somente em mulheres com 50 anos de idade ou mais (Lynch et al, 2008). Este fato se deve à realização contínua da mamografia, a projetos de prevenção de câncer de mama e à diminuição do uso de terapias de reposição hormonal em mulheres na pós-menopausa (Jemal et al, 2007).

O tratamento é baseado no fato de que a doença é hormônio-dependente (Buijs et al, 2008). Estudos epidemiológicos demonstraram que a exposição ao estrogênio, tanto exógeno quanto endógeno, aumenta o risco para a doença (Dunn et al, 2005). Assim, foram desenvolvidos tratamentos com agentes que inibem a ação do estrogênio em seu receptor (moduladores seletivos de receptores de estrogênio – SERMs) ou inibem enzimas sintetizantes de estrogênio (inibidores de aromatase) (Dunn et al, 2005).

As formas mais eficazes para detecção precoce da doença, de acordo com o Ministério da Saúde e o Instituto Nacional do Câncer, são o exame clínico das mamas e a mamografia (INCA, 2006). O exame clínico das mamas

deve ser realizado anualmente em todas as mulheres a partir dos 40 anos de idade. A mamografia, por sua vez, deve ser realizada em mulheres com idade entre 50 e 69 anos de idade, com intervalo máximo de 2 anos entre os exames (INCA, 2006). O auto-exame das mamas ainda é um assunto que gera muita discussão pois estudos indicam dados conflitantes sobre o real benefício do exame na sobrevivência das pacientes (Lester, 2007). Apesar das controvérsias, é aconselhável que se faça o auto-exame das mamas a partir dos 20 anos (Lester, 2007).

Embora um dos fatores para o desenvolvimento do câncer de mama seja hormonal, outros fatores como os genéticos (mutações nos genes BRCA1 e BRCA2), a exposição a agentes carcinogênicos e a própria nutrição influenciam seu desenvolvimento (Chen, 2008; Foulkes, 2006; Harrel et al., 2006; Snedeker, 2006; Tsubura et al., 2005).



Figura 1: Reprodução de quadro de 1275 da Universidade de Leiden (Holanda), retratando exame da mama em freiras pelo médico Teodorico Borgognoni (retirado de Greaves, 2002).

1.2 Modelos de carcinogênese mamária quimicamente induzidos

De todos os modelos experimentais disponíveis para estudo de câncer de mama, aqueles em ratas são os mais utilizados principalmente porque possibilitam entender o mecanismo de desenvolvimento do câncer, uma vez que a glândula mamária é fonte de neoplasias hormônio-dependentes que são, em vários aspectos, similares aos encontrados em humanos (Russo e Russo, 2000). Entretanto, alguns critérios devem ser seguidos para a condução de um modelo experimental de carcinogênese mamária como: relativa rapidez no desenvolvimento do câncer de mama; desenvolvimento do câncer somente no tecido mamário; características de crescimento semelhantes aos de câncer de mama em humanos; o carcinógeno químico deve causar pouca ou nenhuma toxicidade sistêmica e a histogênese e a histopatologia dos tumores deve ser similar aos encontrados em humanos (Moon e Constantinou, 1997).

Existem dois modelos de carcinogênese mamária induzida quimicamente que utilizam os carcinógenos 7,12-dimetilbenzen(a)antraceno (DMBA) e *N*-metil-*n*-nitrosuréia (NMU ou MNU) em ratas Sprague-Dawley (Clarke, 1997). Outras linhagens de ratos como Fisher e Wistar Furth também foram estudados como possíveis modelos animais para indução de carcinogênese mamária. Entretanto, devido à baixa incidência de tumores, esses modelos não têm sido muito utilizados (Mehta, 2000).

Apesar de várias semelhanças entre os dois carcinógenos, esses apresentam diferenças toxicológicas que dependendo do desenho do estudo são dignos de consideração. A principal diferença encontrada é a necessidade da ativação metabólica do DMBA, enquanto que a MNU é considerada um carcinógeno de ação direta (Clarke, 1997). Além disso, o DMBA é administrado intragastricamente a ratas Sprague-Dawley, enquanto que a MNU é administrada intravenosa ou subcutaneamente a ratas Fisher 344 (Russo e Russo, 1996).

As ratas apresentam máxima sensibilidade ao DMBA no período antes da puberdade, quando ocorre um rápido crescimento da glândula mamária, geralmente entre 35 a 60 dias de idade. O aumento da idade, gravidez e

lactação diminuem a suscetibilidade da glândula mamária à carcinogênese química e aumenta a proporção de lesões benignas (Chavez-MacGregor et al., 2005).

O modelo de carcinogênese mamária que utiliza o DMBA exhibe algumas características importantes que incluem: homogeneidade, reprodutibilidade, e rápida geração dos tumores. O hidrocarboneto policíclico DMBA é um pró-carcinógeno que necessita ser convertido metabolicamente em seu metabólito carcinogênico definitivo, DMBA-3,4-dihidrodiol-1,2-epóxido, um processo que inclui duas oxidações pelas enzimas microsossomais CYP1. A primeira oxidação produz o 3,4-dihidrodiol e é catalizada tanto pela CYP1A1 ou CYP1B1, ambos induzidos pela DMBA e expressos no fígado e na glândula mamária (Rowlands et al., 2001). A segunda oxidação produz o metabólito 3,4-dihidrodiol-1,2-epóxido, altamente mutagênico, catalizado pela CYP1B1 (Shimada et al., 1996).

A absorção do DMBA no fígado ocorre de 2-3 horas após sua ingestão e na glândula mamária o pico de concentração ocorre aproximadamente de 3-6 horas após sua administração. (Clarke R, 1997).

1.3 Nutrição e Câncer de mama

O consumo de frutas e hortaliças tem sido associado com a baixa incidência de câncer (Piyathilake e Johanning, 2002). Nesse sentido, várias evidências apontam que a alimentação é um dos mais importantes fatores que determinam o risco para o câncer (Milner, 2004). Wynder e Gori sugeriram que o potencial protetor contra o câncer através da alimentação era de aproximadamente 80 a 90% e que a alimentação inadequada poderia contribuir com 40% de todos os cânceres masculinos e em torno de 60% de todos os cânceres femininos (Wynder e Gori, 1977).

Em 1981, Doll e Peto estimaram que aproximadamente 35% de todos os cânceres poderiam ser evitados por mudanças nos hábitos alimentares (Doll e Peto, 1981). Frutas e hortaliças são consideradas fontes importantes de compostos bioativos que contêm ácidos graxos poliinsaturados, fitoquímicos

como glucosinolatos e flavonóides, muitos dos quais podem inibir a proliferação celular e induzir a apoptose, além de agir sinergicamente quando combinados na alimentação (Davis, 2007).

Nesse sentido, nutrientes e compostos bioativos atuam na regulação de vias metabólicas, através da regulação de enzimas específicas ou pela modulação da secreção de hormônios (Corthesy-Theulaz et al., 2005). Definir quais componentes dos alimentos influenciam essas mudanças torna-se um desafio devido à sua complexidade e aos locais onde esses compostos podem realmente atuar (Milner, 2008).

Estima-se que mais de 25.000 diferentes compostos bioativos estejam presentes em alimentos consumidos pelos seres humanos e que, aproximadamente, 500 desses compostos tenham capacidade de atuar em processos como o câncer (Milner, 2008). Esses compostos bioativos podem ser de origem vegetal, animal, proveniente de fungos (cogumelos) ou derivados da fermentação de alimentos pelas bactérias na microflora intestinal (Milner, 2004). Esta gama de compostos está envolvida em várias vias envolvendo a carcinogênese como apoptose, controle do ciclo celular, diferenciação, inflamação, angiogênese, reparo do DNA e metabolismo (Davis e Uthus, 2004).

Park et al (2009) observaram que na carcinogênese mamária induzida em ratas Sprague-Dawley, o peptídeo da soja inibiu o fator nuclear kappa B (NF κ B) que é associado com o desequilíbrio do controle normal de proliferação celular, angiogênese e metástase (Park et al, 2009). Outros compostos bioativos como o resveratrol (vinho tinto) e as catequinas (chá verde) também são capazes de inibir a ativação do NF κ B (Surh, 2003).

Efeitos anticarcinogênicos de vegetais crucíferos (couve-flor, brócolis, repolho) são verificados por meio dos glucosinolatos como os indóis, que são estudados pelos seus efeitos no metabolismo do estrogênio (Nowell et al., 2004). O indol-3-carbinol pode ligar-se ao receptor de estrogênio, reprimindo a ativação de 17 β -estradiol, modulando, assim, a regulação da expressão de genes de resposta ao estrogênio (Nowell et al., 2004).

Eventos epigenéticos constituem um importante mecanismo pelos quais nutrientes e compostos bioativos podem ativar ou inativar a expressão de

genes (Davis e Uthus, 2004). A epigenética é um termo utilizado para se referir às alterações genéticas que não envolvem mudanças na sequência de DNA, mas que acabam intervindo na expressão gênica, causando silenciamento ou hiperativação de um gene. Esses eventos ocorrem principalmente em consequência de alterações no padrão de metilação do DNA, e modificações da cromatina em nível de histonas (Dashwood e Ho, 2007).

Células neoplásicas apresentam padrões anormais de metilação (Davis e Uthus, 2004). A metilação do DNA envolve a transferência do grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para a posição 5 do nucleotídeo citosina adjacente à guanina (CpG). A metilação de resíduos de citosina presente em sequências de ilhas CpG podem reprimir a transcrição de genes como os supressores de tumor (Piyathilake e Johanning, 2002). Sabe-se que o padrão de metilação em células tumorais está alterado em relação às células normais, havendo hipometilação global do genoma, acompanhado de regiões específicas hipermetiladas. As regiões que parecem ser alvos freqüentes de hipermetilação são as ilhas CpG em promotores gênicos (Robertson e Jones, 2000). Genes regulados dessa forma incluem supressores de tumor, genes envolvidos com reparo do DNA e aqueles envolvidos com proliferação, diferenciação e outras funções celulares importantes (Esteller, 2007).

O estudo do impacto de nutrientes em processos epigenéticos torna-se essencial para a compreensão da metilação do DNA e conseqüentemente, da suscetibilidade ao câncer (Davis e Uthus, 2004). Nesse sentido, podem-se destacar alguns compostos da alimentação que influenciam no padrão de metilação do DNA como o folato, colina, metionina, selênio e a própria VA (Ross, 2007).

1.4 Vitamina A e Câncer de mama

Os retinóides (vitamina A) e seus derivados são essenciais para processos importantes no organismo como a visão, função imune, reprodução e manutenção do tecido epitelial (Fields et al., 2007). Além disso, atuam na regulação do crescimento celular, diferenciação e apoptose em vários tipos de

células (Simeone e Tari, 2004). Fontes importantes de VA pré-formada (isto é, ésteres de retinila) na alimentação são constituídas exclusivamente por produtos de origem animal, como por exemplo, fígado, ovos e leite (Sporn et al, 1976). Ainda estão presentes em outros alimentos fortificados como margarina e cereais matinais (Blomhoff e Blomhoff, 2006). A classe dos retinóides compreende compostos naturais da VA (retinol, retinal e ácido retinóico) e seus derivados e análogos (Hill and Grubbs, 1992).

A VA é absorvida na forma de ésteres de retinila (Mongan e Gudas, 2007). Em situações fisiológicas os ésteres de retinila são hidrolizados em retinol no lúmen intestinal por enzimas pancreáticas ou da borda em escova dos enterócitos para então, serem absorvidas (Harrison, 2005). No interior das células o retinol se liga a três proteínas ligadoras de retinol celular: CRBP-I, CRBP-II ou CRBP-III. As proteínas CRBP-I e CRBP-III são expressas principalmente no coração, músculo e tecido adiposo e mamário (Zizola et al., 2008). O CRBP-II regula o metabolismo intestinal do retinol (Vogel et al., 2001).

No interior do enterócito, o retinol ligado à proteína CRBP-II é esterificado principalmente pela lecitina:retinol aciltransferase (LRAT) (Harrison e Hussain, 2001). Quando presente em altas concentrações, o retinol pode também ser esterificado pela enzima acil:Coa retinol aciltransferase (ARAT) (Silveira e Moreno, 1998). Posteriormente, os ésteres de retinila são incorporados em quilomícrons e transferidos ao sistema linfático por exocitose, atingindo a circulação sistêmica e transferindo para o fígado a maior parte dos ésteres de retinila que carregam (Silveira e Moreno, 1998; Harrison e Houssain, 2001).

No interior dos hepatócitos os ésteres de retinila são hidrolisados e o retinol formado é transferido para o retículo endoplasmático, onde se liga à proteína ligadora de retinol (RBP4) (Mongan e Gudas, 2007), para posterior secreção para o exterior da célula para satisfazer as necessidades de VA do organismo, sendo o restante armazenado nas células perissinusoidais estreladas ou de Ito (Silveira e Moreno, 1998; Harrison e Houssain, 2001).

Antes de ser liberado para a circulação sistêmica o complexo retinol-RBP4 se associa, no lúmen do retículo endoplasmático, a uma proteína sintetizada pelo fígado e que também apresenta um sítio de ligação com elevada afinidade pela tiroxina, a transtiretina (TTR), previamente conhecida como pré-albumina, que reduz sua filtração glomerular (Noy, 2000). Assim, o complexo retinol-RBP liberado pelos hepatócitos tem a função básica de satisfazer as necessidades de vitamina A do organismo, sendo o restante armazenado nas células perissinusoidais estreladas, que contêm cerca de 80-90% do total hepático de retinol, principalmente na forma de ésteres de retinila (Silveira e Moreno, 1998). Alguns tipos de células epiteliais alvo captam o retinol presente no complexo retinol-RBP4-transtiretina por um receptor de membrana para proteína ligadora de retinol sérico codificado pelo gene SRA6 (Mongan e Gudas, 2007).

Assim como no intestino delgado, o retinol ligado à CRBP-I pode ser esterificado no fígado pelas enzimas LRAT e ARAT. Nesse sentido, descreve-se que a LRAT catalisa a esterificação do retinol mais eficientemente quando o substrato é apresentado à enzima ligado à CRBP-I (Zolfaghari e Ross, 2000; Noy, 2000). Além disso, descreveu-se que a CRBP-I está também envolvida com a conversão do retinol hepático em ácido retinóico, que em elevadas concentrações pode inibir a conversão da VA em retinaldeído, além de estimular a síntese de ésteres de retinila (Napoli, 1999). Assim, enzimas específicas reconhecem retinóides ligados a CRBPs, sugerindo que estas proteínas limitem o acesso de retinóides a algumas enzimas, enquanto possibilitam que ocorra o metabolismo por outras. Tal papel é especialmente importante, face à necessidade de uma estreita regulação dos níveis celulares do metabólito ativo da VA, o ácido retinóico (Noy, 2000).

No interior das células, o retinol pode seguir diferentes vias metabólicas como ser estocado na forma de ésteres de retinila ou metabolizado em ácido retinóico, ou ainda ser reciclado novamente para a circulação sistêmica devido a outros tecidos também poderem sintetizar a RBP (Silveira e Moreno, 1998).

A modulação do crescimento e diferenciação celular através dos retinóides tem sido a base da utilização em medicamentos anti-câncer. Em

modelos animais, a vitamina A pode interferir no crescimento de vários tipos de câncer como melanoma, bexiga, próstata, cabeça e pescoço, pele, neuroblastoma e mama (Altucci e Gronemeyer, 2001). Além da indução da diferenciação celular, outras atividades são exercidas pelos receptores de retinóides como a modulação da expressão gênica através de suas interações com proteínas receptoras nucleares que fazem parte de uma numerosa família de receptores e que atuam como fatores de transcrição modulando a expressão gênica (Clarke et al., 2004).

Essas famílias de receptores, receptor de ácido retinóico e receptor do retinóide X (RARs e RXRs), na presença de seus ligantes (ácido retinóico *trans* e ácido retinóico *9-cis*), agem como fatores de transcrição. Dessa forma o ácido retinóico no interior da célula, alcançaria o núcleo, ligado a uma das proteínas celulares ligadoras de ácido retinóico (CRABP II). No núcleo, complexar-se-ia com dímeros das proteínas dos receptores para retinóides, que podem ser compostos de um par RAR/RXR ou RXR/RXR, principalmente heterodímeros RAR/RXR em condições fisiológicas. Esse complexo interagiria com uma seqüência reguladora específica de DNA responsável pela indução pelo ácido retinóico. A partir desse momento ele aumentaria ou retardaria a transcrição do DNA de um dado gene específico, aumentando ou retardando a síntese de determinadas proteínas e modulando a expressão de genes (Mangerlsdorf et al., 1995; ver Silveira e Moreno, 1998 ; Altucci e Gronemeyer, 2001; Budhu e Noy, 2002).

A VA demonstrou ações na inibição do crescimento de várias linhagens de cultura de células de câncer de mama, assim como redução no crescimento de tumores de mama em modelos de animais (Yang et al., 2002). Bhat e Lacroix (1989) não observaram presença de retinol nem ésteres de retinila em tumores de mama de ratas Sprague-Dawley induzidas quimicamente pela MNU (Bhat e Lacroix, 1989). Hayden e Satre também observaram menores concentrações de retinol e ésteres de retinila em células MCF-7 e MDA-MB-231 de câncer de mama em relação à células normais de mama HMEC's (Hayden e Satre, 2002). Esses dados sugerem que o metabolismo alterado da VA pode ser um fator para a progressão do câncer de mama (Hayden e Satre,

2002). Assim, descreve-se em alguns casos, a perda ou ausência da enzima responsável pela esterificação do retinol, lecitina:retinol aciltransferase (LRAT) enquanto em outros, há perda de expressão da CRBP-1 (Niles, 2007). Descreve-se ainda no câncer de mama perda ou redução da expressão de RAR β (Xu et al, 1997; Widschwendter et al., 1997).

Kuppumbatti et al. (2000) observaram em neoplasias de mama que houve a ausência concomitante de CRBP e RAR β em aproximadamente um em cada cinco casos de câncer de mama. Dessa forma, a perda de CRBP-I restringiria os efeitos do retinol endógeno em células do epitélio mamário (Kuppumbatti et al., 2001), além de resultar em redução da capacidade de retinóides de controlar processos importantes como a proliferação e diferenciação celular (Xu et al., 1997). Nesse sentido, a atividade biológica da vitamina A poderia estar duplamente comprometida em uma parcela das pacientes (Kuppumbatti et al., 2000).

Um grande número de evidências sugere que o gene RAR β 2 é um gene supressor de tumor e que os efeitos quimiopreventivos dos retinóides envolvem a indução desse gene. No câncer de mama invasivo não há expressão de RAR β 2 (Lotan et al., 1995). Yang et al demonstraram que a metilação da região promotora de RAR β 2 era fortemente associado com silenciamento epigenético do gene e que esse fato, era suficiente para inativar o gene da RAR β 2 (Yang et al., 2002). Esteller et al. observaram em lesões pré-malignas a ocorrência freqüente da metilação do gene CRBP-1 com hipermetilação do gene RAR β 2 nos mesmos tumores (Esteller et al., 2002). Farias et al., estudaram células epiteliais mamárias MTSV1-7 e estabeleceram que a CRBP-1 atuaria através de seu efeito no armazenamento de retinol e através da ativação de RAR, promovendo diferenciação de células epiteliais da mama e inibição do crescimento, ambos *in vitro* ou *in vivo* (Farias et al., 2005).

Apesar do potencial da VA para o controle do câncer de mama, é necessário que seus mecanismos moleculares de ação sejam melhor elucidados (Simeoni e Tari, 2004). Nesse contexto, descreve-se que a capacidade de retinóides de modular processos epigenéticos constituiria

importante aspecto relacionado às suas ações anticarcinogênicas (Johanning e Piyathilake, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar eventual atividade quimiopreventiva por parte da VA quando administrada a ratas Sprague-Dawley durante a etapa de pós-iniciação da carcinogênese mamária induzida pelo DMBA.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o desenvolvimento neoplasias mamárias em ratas iniciadas com DMBA e tratadas ou não com VA.
- Realizar análise histopatológica de neoplasias mamárias de ratas iniciadas com DMBA e tratadas ou não com VA.
- Determinar as concentrações de retinol e palmitato de retinila em neoplasias mamárias e tecidos hepáticos de ratas iniciadas com DMBA e tratadas ou não com VA.
- Avaliar o padrão de metilação global em neoplasias mamárias de ratas iniciadas com DMBA e tratadas ou não com VA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizadas 50 ratas, virgens, da linhagem Sprague-Dawley, com pesos iniciais compreendidos entre 100 e 110g, obtidas 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 (no máximo 5 ratos/gaiola) com tampas de aço inoxidável e contendo maravalha previamente esterilizada, trocada em dias alternados. Durante todo o período experimental, os animais receberam “ad libitum” água e ração comercial peletizada comum para roedores de laboratório (Purina Nutrimentos Ltda., Campinas, Brasil), sendo ainda controlados em dias alternados seus respectivos pesos, bem como consumo de ração.

O ensaio biológico foi realizado nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, em ambiente apropriado para condução de estudos de carcinogênese, com temperatura, luz e umidade ambiental controladas. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais de Experimentação da FCF-USP (Protocolo CEEA nº 126, em anexo).

3.2 Protocolo experimental

A indução de neoplasias mamárias foi realizada utilizando-se o modelo clássico que emprega o carcinógeno DMBA (Costa et al., 2002). Após um período de aclimação de 7 dias, com exceção de 10 animais que constituíram um grupo controle à parte de ratas consideradas normais [grupo normal (N)], e que não foram submetidas a qualquer procedimento experimental durante todo o estudo, 40 animais, com 50 dias de idade, receberam, por intubação gástrica, dose única (60 mg/kg de peso corpóreo) de DMBA (Sigma, EUA). Essa, foi dissolvida em óleo de milho (OM) na concentração de 30 mg/mL. Duas

semanas após a iniciação com DMBA, 40 ratas foram distribuídas aleatoriamente em 2 grupos experimentais (**Figura 3**):

- Grupo óleo de milho (OM): duas semanas após iniciação com DMBA, as 20 ratas desse grupo foram tratadas com óleo de milho (Mazola®, Brasil) na dose de 0,25 mL/100g de peso corpóreo, por intubação gástrica, diariamente, na parte da manhã, durante 12 semanas consecutivas até o dia do sacrifício. Este grupo experimental serviu como controle para o grupo VA.
- Grupo vitamina A (VA): duas semanas após iniciação com DMBA, as 20 ratas desse grupo foram tratadas com VA na dose de 2,5 mg/100g de peso corpóreo (Sporn et al., 1976), na forma de palmitato de retinila, pureza de 83,7% (cedido gentilmente pela BASF, Alemanha) dissolvida em óleo de milho (Mazola®, Brasil) na dose de 0,25 mL/100g de peso corpóreo por intubação gástrica, diariamente, durante 12 semanas consecutivas até o dia do sacrifício.

3.3 Eutanásia

Por ocasião do término do experimento, as ratas foram anestesiadas com CO₂ e, a seguir, eutanasiadas por exsanguinação após punção da artéria aorta abdominal. Os animais do grupo OM e VA tiveram suas neoplasias mamárias coletadas, enquanto que dos animais do grupo N foram coletadas as glândulas mamárias inguinais do lado direito.

3.4 Análise macroscópica das neoplasias mamárias

Para detecção das neoplasias mamárias, as ratas foram apalpada duas vezes por semana após iniciação com DMBA, até o término do experimento. Os parâmetros avaliados foram latência de aparecimento da 1ª neoplasia mamária, incidência, multiplicidade e peso médio das neoplasias mamárias.

3.5 Exame histopatológico das neoplasias mamárias por meio de coloração pela hematoxilina e eosina (H&E)

Neoplasias mamárias fixadas em formalina tamponada neutra a 10% foram coradas com H&E basicamente como descrito por Junqueira e Junqueira (1983). As neoplasias mamárias foram classificados quanto a sua malignidade e de acordo com Costa et al., (2002).

3.6 Determinação, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), das concentrações de retinol e palmitato de retinila em tecido hepático e adenocarcinomas mamários

De acordo com metodologia descrita por Stahl et al. (1993), retinol e palmitato de retinila foram extraídos de 100 mg de tecido hepático e

adenocarcinomas mamários de ratas dos grupos OM e VA, previamente armazenados a -80°C . As amostras foram homogeneizadas em agitador mecânico, com 2 mL de etanol por 2 minutos, sendo então agitadas em agitador de tubos após acréscimo de 2 mL de n-hexano, também por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (centrífuga Sorvall, modelo RC5C, rotor SS-34) a 10.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi seco em atmosfera de nitrogênio e ressuspenso na fase móvel [acetonitrila – diclorometano – metanol (20:20:10)].

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo (modelo LC9A, Shimadzu, Japão) com sistema de bomba de multissolventes, auto injetor (modelo SIL – 6B) e detector de fotodiodo UV-VIS (modelo SPD-M6A, ajustado a 325 nm para a detecção dos retinóides), com coluna C18 de fase reversa (CLC-ODS; $5\mu\text{m}$, 6 mm x 15 cm). Alíquotas de 20 μL foram injetadas no cromatógrafo e os retinóides (retinol e palmitato de retinila) foram eluídos (1,5 mL/minuto) em fase móvel [acetonitrila – diclorometano – metanol (20:20:10)]. Os retinóides foram identificados pela comparação de seus tempos de retenção com os de padrões autênticos, e quantificados pelas áreas dos picos.

3.7 Análise do padrão de metilação global do DNA

3.7.1 Extração de DNA de amostras de tecidos mamários normais e neoplasias mamárias

A extração de DNA foi realizada a partir de amostras de tecidos normais e adenocarcinomas mamários pelo método clássico utilizando fenol e fenol-clorofórmio álcool isoamílico (Yu et al, 2000). Inicialmente, cerca de 100 mg de tecido foram incubados em 4 ml de solução de lise SNET (Tris HCl 20 mM pH 8,0, EDTA 5 mM, SDS 1%) acrescidos de 80 μl de Proteinase K (20 mg/ml), sob agitação, por aproximadamente 18 horas a $55,5^{\circ}\text{C}$.

No dia seguinte, adicionaram-se 4 ml de fenol equilibrado (Invitrogen, pH=8,0), e agitou-se por 30 minutos em agitador mecânico. A seguir, realizou-se centrifugação a 4°C por 5 minutos a 2.320 rpm para separar a fase aquosa

da fase orgânica. A fase aquosa foi então transferida para um tubo falcon, realizando-se, novamente, extração com 4 ml de fenol equilibrado. A seguir, foi realizada uma extração com fenol-clorofórmio-alcool isoamílico (Invitrogen 25:24:1, v/v). Após nova centrifugação, a fase aquosa foi novamente transferida para outro tubo falcon, adicionando-se 1 ml de isopropanol para precipitação do DNA. Em seguida, outra centrifugação foi realizada a 4°C por 15 minutos a 11.000 rpm. Após a remoção do isopropanol, o pellet foi lavado com 1 ml de etanol gelado a 70% para lavar as impurezas eventualmente presentes. Uma nova centrifugação foi realizada por 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O “precipitado” foi ressuscitado em 200 µl de TE (Tris 100 mM, EDTA 10 mM, pH =8,0). Após quantificação da concentração de DNA em espectrofotômetro (Nanodrop1000 ThermoScientific), sua integridade foi verificada em gel de agarose a 0,8%.

3.7.2 “Dot-Blot”

A análise do padrão de metilação global do DNA foi realizada pela técnica de “dot blot” (Alyaqoub et al., 2006) em amostras de tecidos mamários de ratas do grupo N e em adenocarcinomas mamários de ratas dos grupos OM e VA. Amostras de DNA (2µg) foram desnaturadas em 100 µL de solução 0,1N de NaOH e 10mM de EDTA a 95°C, durante 5 minutos. As amostras foram aplicadas em membrana de nitrocelulose Hybond™(GE Healthcare) (Alyaqoub et al., 2006) e fixadas em forno de hibridização através de luz UV (120.000 joules/cm²), por 1 minuto. Posteriormente, a membrana foi incubada em 5% de leite desnatado em tampão TRIS [1% Tween 20 (Sigma, EUA) em PBS, pH=7,6 por 2 horas]. Em seguida, foi incubada com anticorpo primário monoclonal anti-5-metilcitosina (Serotec, Reino Unido) por cerca de 2 h. Em seguida, as membranas foram lavadas em PBS [0,1% Tween 20 (Sigma, EUA)] e tratadas com anticorpo secundário anti IgG de camundongo (Santa Cruz) por 1 h e, novamente, lavada em PBS com [1% Tween 20 (Sigma, EUA)]. A intensidade do sinal foi determinada por leitura em densitômetro (Bio Rad, modelo GS-700).

Para controle da aplicação das amostras de DNA, a membrana foi corada com azul de metileno (Alyaqoub et al., 2006; Ong et al., 2006).

3.8 Análise estatística

Os experimentos foram realizados de forma inteiramente casualizada e todos os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (testes de Levene e Brown-Forsythe).

Quando satisfeitas as condições para aplicação dos testes estatísticos paramétricos de comparação de médias, as seguintes análises estatísticas foram realizadas:

a) as comparações com relação à multiplicidade, peso e incidência de neoplasias, metilação global do DNA e concentrações hepáticas e mamárias de retinol e palmitato de retinila foram realizadas pelo teste t de Student.

Nos conjuntos de dados em que não foram observadas distribuição normal e, principalmente, a homogeneidade das variâncias, testes estatísticos não-paramétricos foram adotados. Para comparação de dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Os resultados foram expressos como média dos resultados \pm erro padrão da média. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa STATISTICA 8.0 e adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Peso e consumo de ração dos animais

Na **Tabela 1** estão apresentados os pesos corpóreos iniciais e finais e o consumo médio de ração dos animais submetidos a modelo de carcinogênese mamária e tratados com OM ou VA, durante 12 semanas consecutivas. Não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos OM e VA quanto aos pesos corpóreos iniciais, indicando homogeneidade entre os grupos no momento da aleatorização e consumo de ração. Além disso, ao longo do experimento não se observaram diferenças ($p>0,05$) entre os grupos OM e VA em relação ao peso corpóreo (**Figura 3**) e consumo de ração (**Figura 4**). Esses dados sugerem ausência de toxicidade por parte da VA.

Tabela 1: Peso corpóreo inicial e final e consumo médio de ração de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA e tratadas com óleo de milho (OM) ou vitamina A (VA), durante 12 semanas consecutivas.

Grupo	n	Peso Corpóreo Inicial (g)*	Peso Corpóreo Final (g)*	Consumo médio de ração (g/100g de peso corpóreo)*
OM	20	247 ± 7	263 ± 15	7,2 ± 1
VA	17	243 ± 8	258 ± 8	6,8 ± 1

n = número de animais; *média + desvio padrão
 OM = óleo de milho (grupo controle)
 VA = vitamina A

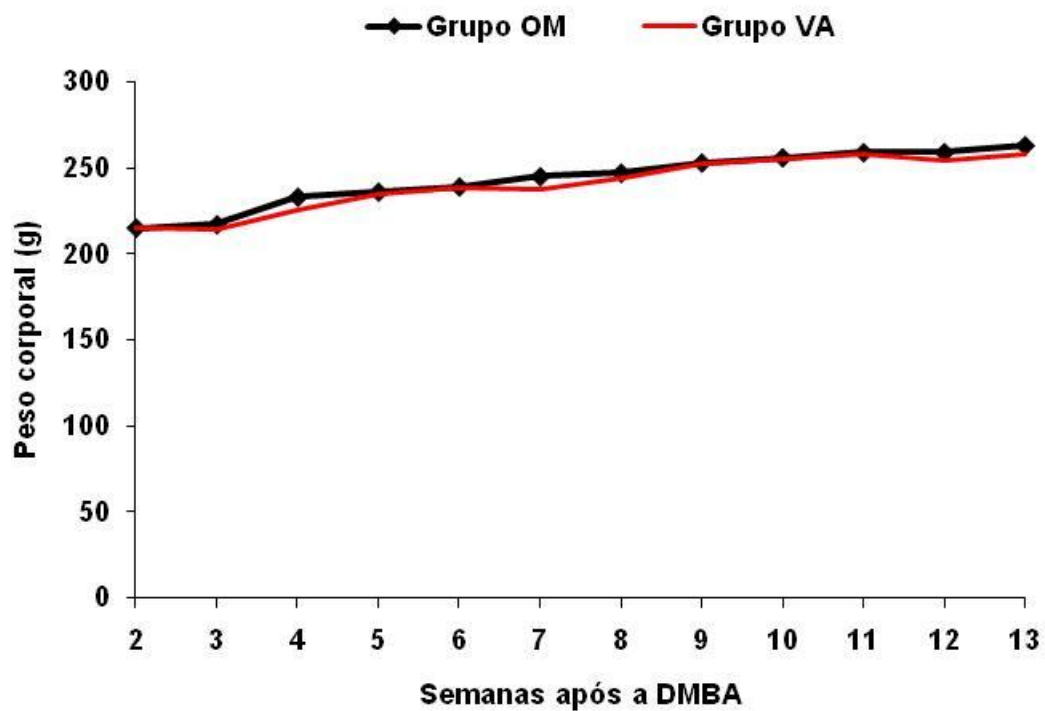


Figura 3: Evolução do peso corpóreo de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA e tratadas com OM ou VA, durante 12 semanas consecutivas.

OM = óleo de milho (grupo controle)

VA = vitamina A

DMBA: 7,12 dimetilbenzantraceno

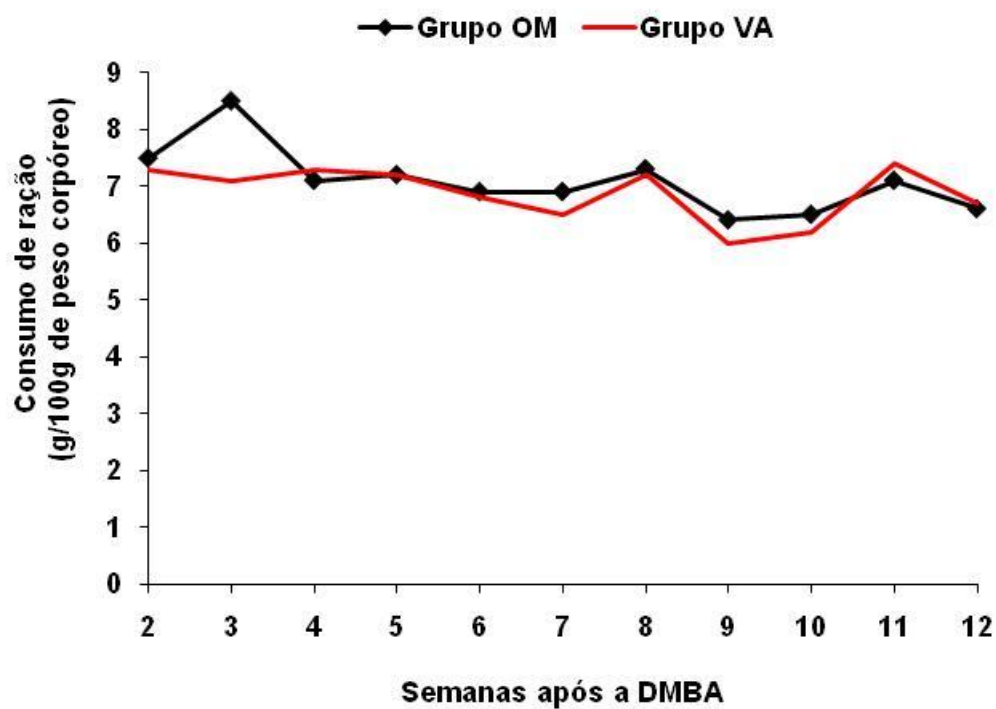


Figura 4: Consumo de ração de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA e tratadas com OM ou VA, durante 12 semanas consecutivas.

OM = óleo de milho (grupo controle)

VA = vitamina A

DMBA: 7,12 dimetilbenzantraceno

4.2 Latência de aparecimento da 1ª neoplasia, bem como incidência, multiplicidade e peso médio das neoplasias mamárias em ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA.

Após a eutanásia dos animais realizou-se exame macroscópico das ratas quanto à presença neoplasias mamárias (**Figura 5 e 6**) (Clarke, 1997). Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos OM e VA quanto à latência de aparecimento da 1ª neoplasia mamária, que no grupo OM foi de 62 dias \pm 12 e no grupo VA foi de 58 dias \pm 10, após a iniciação com o agente carcinogênico DMBA (**Figura 7**).

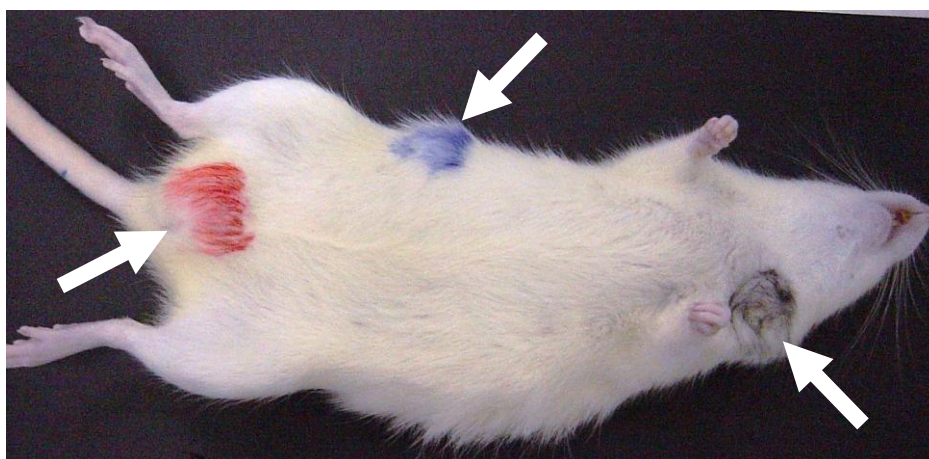


Figura 5: Neoplasias mamárias de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA.



Figura 6: Neoplasia mamária de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA.

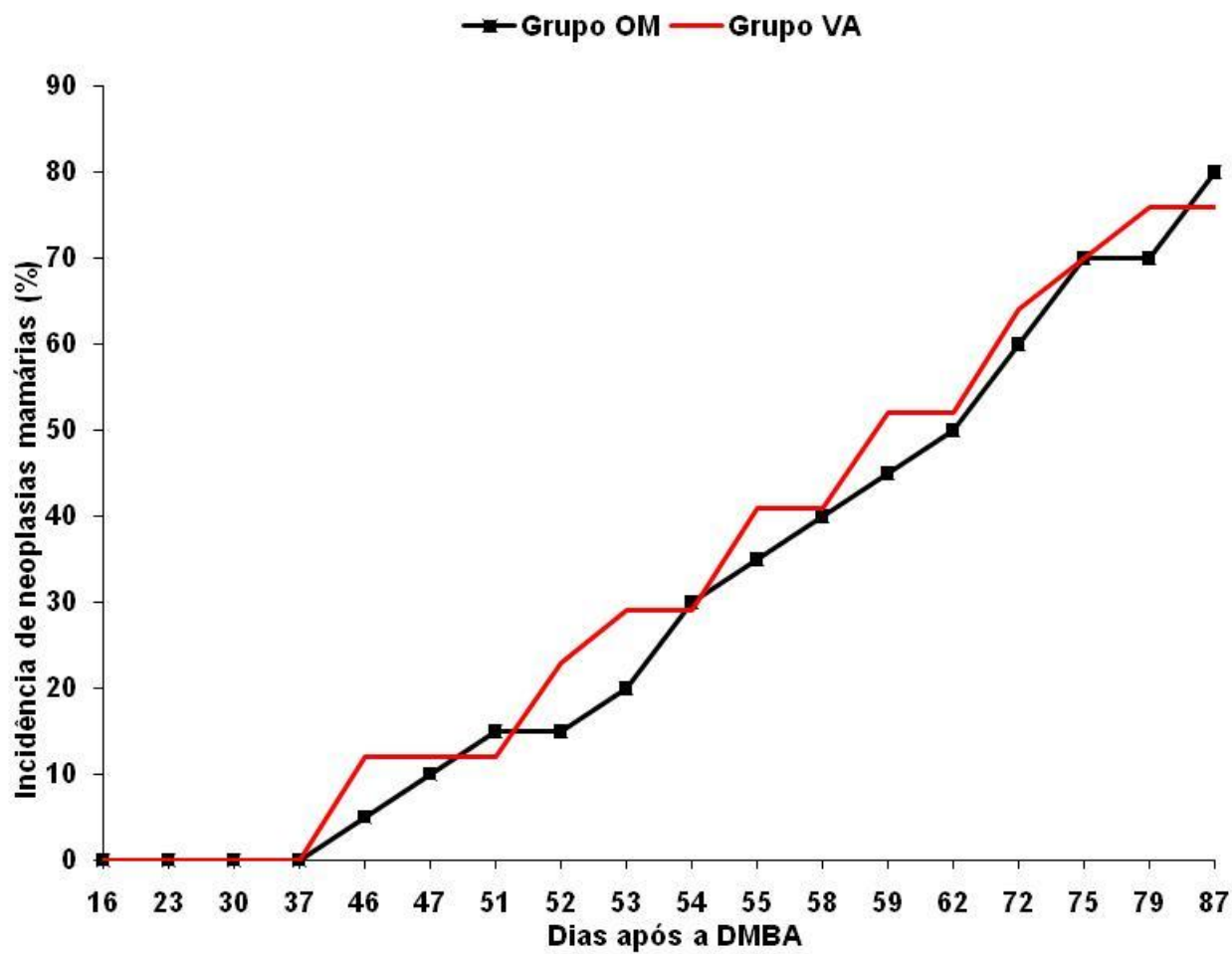


Figura 7: Incidência de neoplasias mamárias de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA e tratadas com OM e VA.

A **Tabela 2** apresenta os resultados relativos à incidência, número total, multiplicidade e peso médio das neoplasias mamárias de ratas Sprague-Dawley tratadas com OM ou VA, ao final de 12 semanas consecutivas.

Tabela 2: Incidência, número total, multiplicidade e peso médio das neoplasias mamárias de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA e tratadas com OM ou VA, durante 12 semanas consecutivas.

Grupo	N de animais com neoplasias mamárias sobre N de animais totais				Peso médio das neoplasias mamárias (g)*
	Incidência de neoplasias mamárias	Número total de neoplasias mamárias	Multiplicidade das neoplasias mamárias*		
OM	16/20	80%	28	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,6
VA	13/17	76%	35	2,6 ± 0,6	3,0 ± 0,8

n = número de animais

* média + erro padrão

OM = óleo de milho (grupo controle)

VA = vitamina A

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre os grupos OM e VA quanto à incidência, multiplicidade e peso médio das neoplasias mamárias ao final do experimento.

4.3 Análise histopatológica das neoplasias mamárias

A análise histopatológica das neoplasias mamárias (**Figura 8**) mostrou que os tumores induzidos pela 7,12 dimetilbenzantraceno (DMBA) foram todos malignos e apresentaram, em sua maioria, padrão papilar e ductal (**Figuras 9 e 10**).

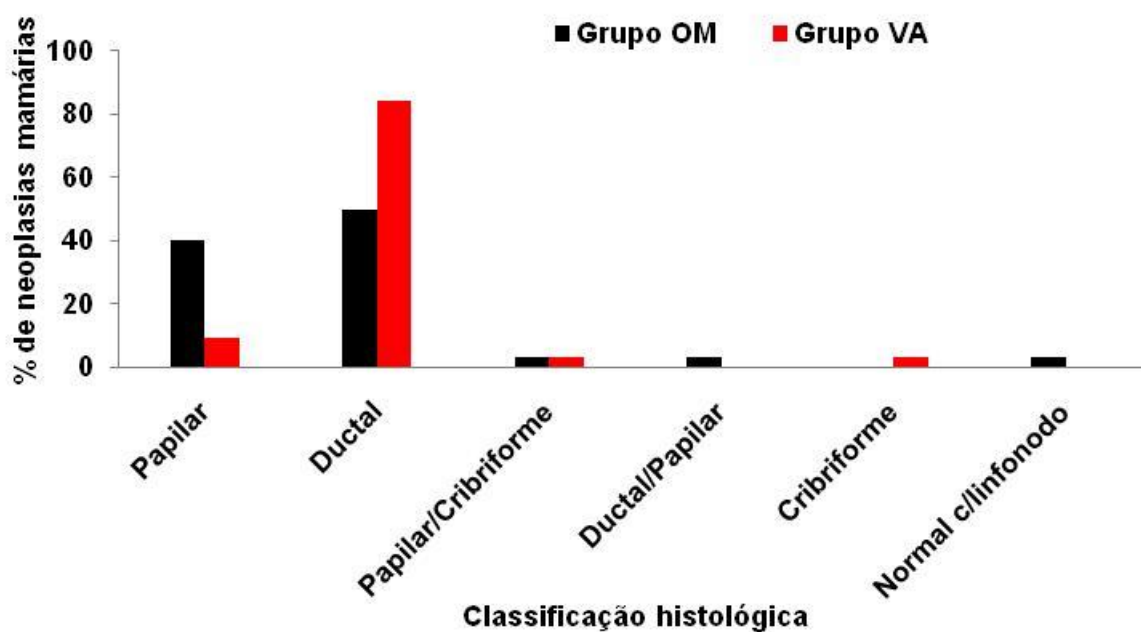


Figura 8: Análise histopatológica das neoplasias mamárias de ratas Sprague-Dawley submetidas ao modelo de carcinogênese mamária com DMBA e tratadas com OM e VA.

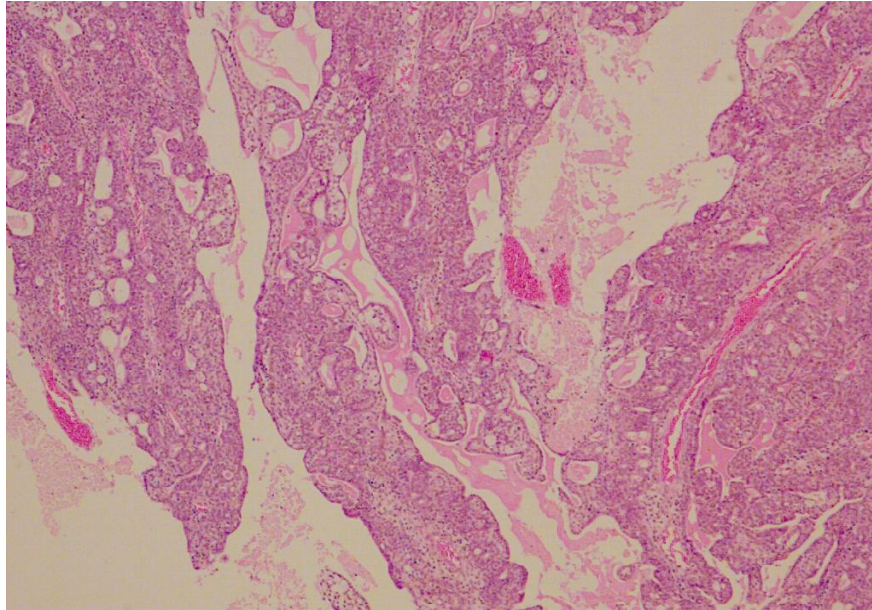


Figura 9: Adenocarcinoma mamário do tipo papilar corada em H&E. Objetiva de 50X.

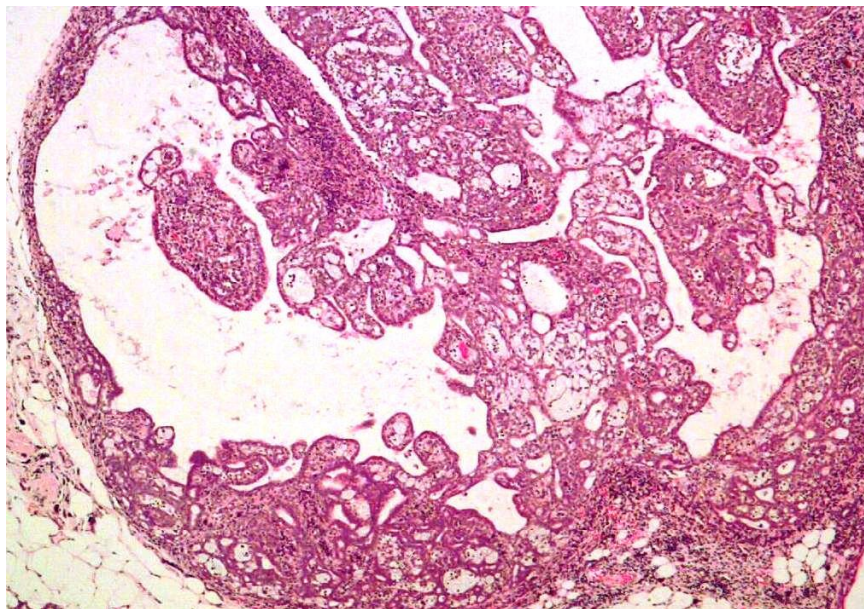


Figura 10: Adenocarcinoma mamário do tipo papilar-cribriforme corada em H&E. Objetiva de 50X.

A **Tabela 3** apresenta os resultados relativos às concentrações de retinol e palmitato de retinila em tecidos hepáticos e neoplasias mamárias dos grupos OM e VA.

Tabela 3: Concentrações de retinol e palmitato de retinila em tecidos hepáticos e neoplasias mamárias dos grupos OM e VA.

Grupo	Retinol em tecidos hepáticos (µg/g)*	Retinol em neoplasias mamárias (µg/g)*	Palmitato de retinila em tecidos hepáticos (µg/g)*	Palmitato de retinila em neoplasias mamárias (µg/g)*
OM	76 + 7	0,3 + 0,1	10 + 4	ND
VA	249 + 50[#]	1,4 + 0,2[#]	443 + 84[#]	ND

OM = óleo de milho (grupo controle)

VA = vitamina A

ND = não detectado

* Valores expressos como média + erro padrão

[#] diferença em relação ao grupo controle (OM)

Verifica-se que em comparação a ratas do grupo OM, ratas do grupo VA apresentaram maiores concentrações ($p < 0,05$) de retinol em tecidos hepáticos e neoplasias mamárias, além de maiores concentrações de palmitato de retinila em tecidos hepáticos. Não se detectou palmitato de retinila em neoplasias mamárias de ambos os grupos.

4.5 Análise do padrão de metilação global do DNA

Para avaliação do padrão de metilação global do DNA de tecidos mamários de ratas do grupo N e neoplasias mamárias de ratas do grupo OM e VA, o DNA total extraído foi submetido à técnica de “Dot blot” (**Figura 11**). De acordo com os dados da **Figura 12**, não se verificou diferença entre neoplasias do grupo OM e tecido mamário do grupo N quanto à metilação global do DNA ($p > 0,05$). Em comparação a neoplasias mamárias do grupo OM, neoplasias do grupo VA apresentaram menor ($p < 0,05$) metilação global do DNA.

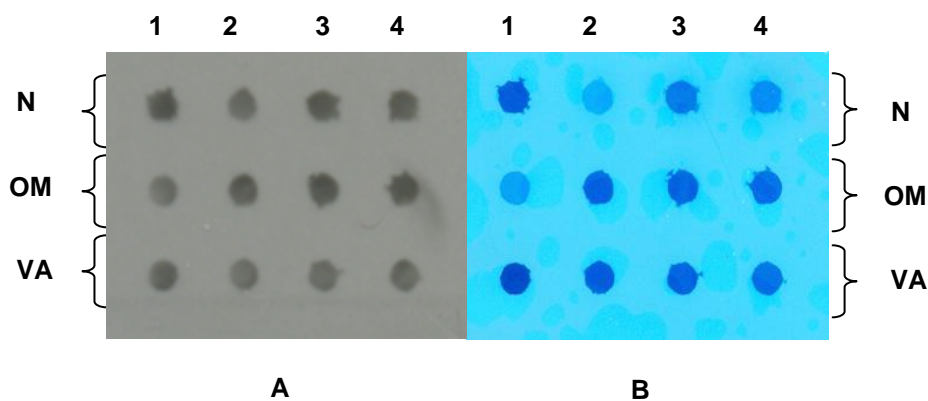


Figura 11: Padrão de metilação global do DNA. A: blot. B: membrana.

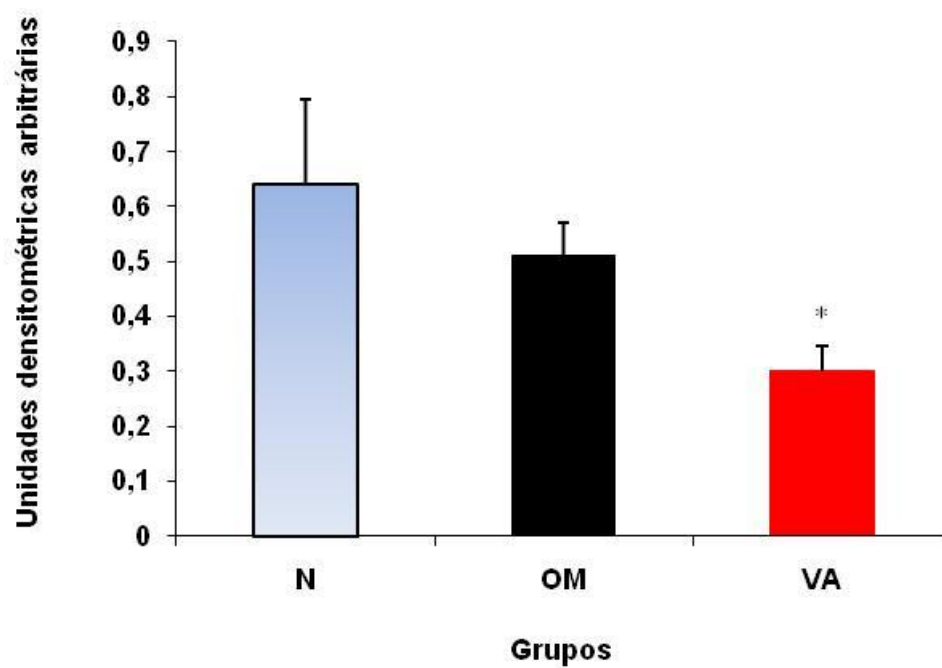


Figura 12: Padrão de metilação global do DNA em tecido mamário normal (grupo N) e em neoplasias mamárias dos grupos OM e VA.

N = normal

OM = óleo de milho (grupo controle)

VA = vitamina A

Valores expressos como média + erro padrão

* diferença em relação ao grupo controle (OM)

5 DISCUSSÃO

O processo de carcinogênese é um processo longo e que geralmente pode levar muitos anos até o desenvolvimento da doença (Smith et al. 2005). Assim, a quimioprevenção do câncer definida como sendo a administração de uma ou mais substâncias (naturais ou sintéticas) durante as fases iniciais da carcinogênese com o objetivo de inibir, reverter ou retardar o processo, pode ser considerada uma opção viável para o controle da doença (Sporn et al., 1976).

Dentre os diversos agentes quimiopreventivos de interesse estão os retinóides (naturais ou sintéticos), incluindo a vitamina A (retinol) (Dragnev et al., 2000). Dados de estudos em animais e em cultura de células, bem como de ensaios clínicos fornecem evidências para o uso dos retinóides em terapias de prevenção contra o câncer (Moon e Constantinou, 1997; Tosetti et al., 1999). Nesse contexto, modelos *in vivo* são amplamente utilizados para avaliar o potencial quimiopreventivo de determinada substância, além de seus mecanismos de ação anticarcinogênica envolvidos (Sporn e Suh, 2002).

Dentre os modelos existentes para a indução da carcinogênese mamária, aquele que emprega o 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) é bem caracterizado e amplamente utilizado, inclusive em estudos com nutrientes. Dentre suas vantagens destacam-se a simplicidade do modelo que utiliza dose única de carcinógeno; a relativa rapidez para induzir adenocarcinomas de mama, que ocorre em torno de 2 meses após a iniciação com DMBA; a alta incidência dessas neoplasias que, dependendo da dose do carcinógeno, pode atingir 100%, bem como a semelhança histológica e molecular das neoplasias induzidas em comparação ao observado em seres humanos (Costa et al., 2002; Whitsett et al., 2006).

No presente estudo não houve diferença entre os animais tratados ou não com VA quanto aos pesos iniciais e finais e consumo médio de ração. Assim, os efeitos constatados por parte da VA neste experimento e discutidos a seguir, não devem estar relacionados a diferenças no consumo de calorias por parte dos animais tratados com a vitamina.

Não se verificou no presente estudo atividade quimiopreventiva por parte da VA quando administrada a ratas na etapa de pós-iniciação da carcinogênese mamária induzida por DMBA. Esses resultados não estão de acordo com os de Moon et al. (1976), que demonstraram atividade quimiopreventiva da VA nesse mesmo modelo. Mais especificamente a VA reduziu em 50 e 39% a incidência de fibroadenomas e adenocarcinomas, respectivamente.

Mc Cormick et al.(1980) administraram acetato de retinila na ração (250 ppm) de ratas Lewis virgens, com 50 dias de idade, que foram iniciadas com 20 mg de DMBA. Este estudo determinou se o acetato de retinila era um inibidor da carcinogênese mamária quando administrado em curtos períodos de tempo antes e depois da DMBA. Verificou-se diminuição significativa da multiplicidade de tumores em todos os grupos tratados com acetato de retinila.

De acordo com a análise histopatológica das neoplasias mamárias, essas foram classificadas no presente estudo como adenocarcinomas de diferentes padrões. Esses dados diferem dos obtidos por Mehta (2000), que descrevem 60% de adenocarcinomas e 40% de fibroadenomas induzidos por DMBA.

Nossas observações de que a administração de VA não inibiu a carcinogênese mamária em ratas diferem da maioria dos estudos de quimioprevenção, que demonstraram eficácia por parte do retinóide (Moon et al., 1976). Entretanto, um estudo relatou aumento da carcinogênese mamária em resposta ao tratamento com retinóides. Nesse estudo foi administrado acetato de retinila (328 mg/kg de ração) ou fenretinida (4-HPR) na dose de 728 mg/kg de ração a ratas Sprague-Dawley durante 2 meses antes da exposição aos carcinógenos MNU ou DMBA. No modelo com MNU houve aumento de 50% no número de adenocarcinomas mamários em ratas pré-tratadas com acetato de retinila, enquanto que o pré-tratamento com 4-HPR resultou no aumento de 93%. No modelo com DMBA o pré-tratamento com esses retinóides aumentou significativamente o número de tumores benignos, mas não de adenocarcinomas mamários. Os autores sugeriram que retinóides deveriam ser melhor avaliados quanto a sua atividade quimiopreventiva em

relação à iniciação da carcinogênese mamária assim como sua atividade anti-promotora (Grubbs et al., 1990).

Descreve-se que o metabolismo da VA encontra-se alterado em diversos tipos de cânceres (Guo et al., 2001; Cvetkovic et al., 2003). Desta forma células neoplásicas apresentam reduções pronunciadas de suas capacidades de acumular ésteres de retinila, o que seria responsável pela deficiência de retinóides que se observa nas mesmas (Guo et al., 2001). Além disso, observaram-se em hepatomas transplantados ou induzidos quimicamente em ratos, reduções de até 99% nas concentrações de ésteres de retinila em comparação ao tecido hepático normal (De Luca, et al., 1984). Também foram observadas reduções de ésteres de retinila em carcinomas de próstata (Guo et al., 2002), assim como em linhagens celulares de pele, mama e cavidade oral (Guo et al., 2001) através da ausência de expressão da proteína lecitina-retinol-aciltransferase (LRAT).

Essa deficiência de retinóides poderia resultar em efeito promotor da carcinogênese mamária, uma vez que existem diversas evidências de que a VA apresenta papel importante no controle da proliferação, diferenciação e morte celular (Donato e Noy, 2005).

No presente estudo, o tratamento com VA resultou no aumento das concentrações de retinol em neoplasias mamárias. Entretanto, não se detectou palmitato de retinila em neoplasias mamárias de ratas tratadas ou não com o retinóide. Esses resultados estão de acordo com os de Bhat e Lacroix (1989), que observaram presença de retinol e ésteres de retinila em células epiteliais da mama normal, enquanto que em carcinomas mamários induzidos pelo MNU não foram detectadas a presença desses retinóides.

Nesse contexto, alterações na função do gene para a proteína ligadora de retinol celular tipo I (CRBP-I) têm sido relacionada aos níveis reduzidos de ésteres de retinila no câncer de mama (Arapshian et al., 2004; Farias et al., 2005). A CRBP-I apresenta importante papel na esterificação do retinol ao fornecer o mesmo à enzima lecitina:retinol aciltransferase (Guo et al., 2001; Simmons et al., 2002). Descreve-se que os níveis de CRBP-I seriam os

determinantes do acúmulo de retinol endógeno bem como de sua esterificação (Levin, 1993).

Carcinomas de mama apresentam menor presença de CRBP-I em comparação a tecidos normais (Palan e Romney, 1980). Kupumbatti et al. (2000) também observaram ausência de expressão de CRBP-I em carcinomas de mama de graus distintos de malignidade. Além disso, os autores sugerem ainda uma relação entre a homeostase da vitamina A e o câncer de mama. Mais especificamente, a perda de CRBP-I restringiria os efeitos do retinol endógeno em células do epitélio mamário. Por outro lado, a indução da expressão de CRBP-I em células de câncer de mama resultou em aumento da esterificação e armazenamento de retinol, bem como em redução da capacidade dessas células de proliferarem (Kupumbatti et al., 2001).

De forma interessante, constatou-se em diferentes linhagens de câncer de mama que a perda da expressão de CRBP-I foi também acompanhada da ausência de expressão do receptor nuclear para ácido retinóico β (RAR β) (Jing et al., 1996). Além disso, descreveu-se perda ou redução da expressão desse fator de transcrição em cânceres de mama (Widschwendter et al., 2001), que poderia resultar em redução da capacidade de retinóides de controlar processos importantes como a proliferação e diferenciação celular (Xu et al., 1997).

Esteller et al. (2002) ao estudarem diversas linhagens de células neoplásicas e tumores primários de humanos, inclusive de mama, descreveram a ocorrência da hipermetilação da região promotora do gene que codifica para CRBP-I, que foi correlacionada com a perda de sua expressão. Além disso, em diversas células neoplásicas e tumores primários de mama, ocorreu hipermetilação conjunta dos promotores dos genes para CRBP-I e RAR β . Dessa forma, assim como o RAR β (Sun e Lotan, 2002), o gene para CRBP-I vem sendo também considerado supressor de tumor (Esteller, 2003).

No câncer ocorrem diversas mudanças na expressão de genes, que envolvem mecanismos globais de regulação como a metilação do DNA (Narayan et al., 1998). Sabe-se que dois tipos de mudanças no padrão de metilação do DNA ocorrem no câncer de mama: a hipermetilação de

determinados genes em ilhas CpG e a hipometilação global do DNA (Feinberg et al., 1988). Tem-se descrito que a capacidade de retinóides de modular processos epigenéticos constituiria importante aspecto relacionado às suas ações anticarcinogênicas (Johanning e Piyathilake, 2003).

Em indivíduos com câncer de cólon e que apresentavam uma ingestão elevada de VA, observou-se freqüências reduzidas de hipermetilação das regiões promotoras dos genes para CRBP-I e RAR β (Esteller et al., 2002). Além disso, o tratamento de células NB4 de leucemia promielocítica aguda com ácido retinóico resultou desmetilação da região promotora do gene para RAR β (Di Groce et al., 2002).

Observou-se no presente estudo que o tratamento com VA na fase de pós-iniciação resultou em redução da metilação global do DNA em adenocarcinomas mamárias. Assim, por exemplo, se descreveu que o ácido retinóico 13-*cis* (isotretinoína) foi capaz de alterar o catabolismo da metionina hepática em ratos, resultando em hipometilação global do DNA hepático (Schalinske e Steele, 1991).

Em outro estudo Rowling et al. (2002) investigou se a VA apresentava a capacidade de regular e modular a GNMT através das vias de transmetilação e transulfuração. Assim, ratos Sprague-Dawley receberam oralmente palmitato de retinila, ácido retinóico 13-*cis* e ácido retinóico todo-*trans* durante 10 dias. As dietas com palmitato de retinila, ácido retinóico 13-*cis* e ácido retinóico todo-*trans* elevaram a atividade hepática de GNMT em 32, 74 e 124% respectivamente, comparado ao grupo controle. Além disso, o DNA hepático, um substrato para transmetilação dependente de SAM, estava hipometilado em 100% após o tratamento com ácido retinóico todo-*trans* comparado ao grupo controle. Esses resultados fornecem evidências que: a VA, assim como seus derivados ácidos retinóicos, pode induzir enzimaticamente a GNMT; a indução inapropriada de GNMT pode levar a importante perda biológica de grupos metil e, subseqüentemente, insuficiência de processos essenciais de transmetilação.

6 CONCLUSÕES

- A administração de VA ratas Sprague-Dawley durante a etapa de pós-iniciação do modelo de carcinogênese mamária induzida pela DMBA não resultou em atividades quimiopreventivas.
- O metabolismo da VA encontra-se alterado em neoplasias mamárias induzidas por DMBA.

7 ANEXOS

7.1 Informações para os membros de Bancas Julgadoras de Mestrado

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

7.2 Ficha de Aluno



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 6013919/1 - Leticia Okamoto

Email: leticiaok@usp.br ou leticiaok@yahoo.com
Data de Nascimento: 14/12/1977
Cédula de Identidade: RG - 6.262.064-1 - PR
Local de Nascimento:
Nacionalidade:
Graduação: Nutricionista - Faculdades Integradas Espírita - Brasil - 2000

Curso: Mestrado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Nutrição Experimental
Data de Matrícula: 31/07/2007
Início da Contagem de Prazo: 31/07/2007
Data Limite: 31/01/2010
Orientador: Prof(a). Dr(a). Fernando Salvador Moreno - 31/07/2007 a 07/04/2008 E.Mail: rmoreno@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Thomas Prates Ong - 08/04/2008 até o presente. E.Mail: tong@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 31/07/2007
Prazo Máximo para Aprovação no Exame de Qualificação: 31/07/2009 (verifique em sua CPG se ela possui um prazo anterior)
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 03/07/2009
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 31/07/2007
 Matrícula de Acompanhamento em 03/07/2009

Situação Atual: Matrícula de Acompanhamento em 03/07/2009

Impresso em: 19/11/09 11:51:55



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9132 - 6013919/1 - Leticia Okamoto

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
NHA5701-3/4	Fundamentos Biológicos da Nutrição Humana Aplicada (Curso Interunidades: Nutrição Humana Aplicada - Universidade de São Paulo)	06/08/2007	14/10/2007	120	8	85.0	B	N	Concluída
FBA5901-1/1	Tópicos Avançados em Nutrigenômica	29/10/2007	02/12/2007	30	2	100.0	A	N	Concluída
FBA5712-5/1	Fisiologia da Nutrição I	02/04/2008	13/05/2008	90	6	100.0	B	N	Concluída
FBA5728-2/7	Aprimoramento Didático	06/05/2008	02/06/2008	60	0	0.0	-	N	Pré-matricula indeferida
NHA5705-2/1	Fundamentos da Biologia Molecular Aplicados à Nutrição Humana (Curso Interunidades: Nutrição Humana Aplicada - Universidade de São Paulo)	27/05/2008	30/06/2008	60	4	100.0	A	N	Concluída
EDM5791-5/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/08/2008	04/11/2008	120	8	100.0	A	N	Concluída
FBA5896-5/1	Seminários em Ciência dos Alimentos e Nutrição	25/09/2008	03/12/2008	30	0	0.0	-	N	Matricula cancelada
FBA5728-2/8	Aprimoramento Didático	07/10/2008	03/11/2008	60	0	0.0	-	N	Matricula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de dissertação	

Disciplinas:	25	25	28
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	28

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Situação Atual: Matrícula de Acompanhamento em 03/07/2009

Impresso em: 19/11/09 11:51:55

7.3 Cópia do Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

CEEA nº 35/2007

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Nutrigenômica e redução do risco de câncer de mama: alvos moleculares da vitamina A" (Protocolo CEEA nº126), sob a responsabilidade do Prof. Thomas Prates Ong, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 09/10/2006.

São Paulo, 11 de junho de 2007.


Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTUCCI, L., GRONEMEYER, H. Nuclear receptors in cell life and death. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 12, p. 460-468, 2001.

ALYAQOUB, F.S., TAO, L., KRAMER, P.M., STEELE, V.E., LUBET, R.A., GUNNING, W.T., PEREIRA, M.A. Prevention of mouse lung tumors and modulation of DNA methylation by combined treatment with budesonide and R115777(ZarnestraMT). **Carcinogenesis**, v.27, p. 2442-2447, 2006.

ARAPSHIAN, A., BERTRAN, S., KUPPUMBATTI, Y.S., NAKAJO, S., MIRA-Y-LOPEZ, R. Epigenetic CRBP downregulation appears to be an evolutionarily conserved (human and mouse) and oncogen-specific phenomenon in breast cancer. **Mol Cancer**, v. 3, p. 13, 2004.

BHAT, P.V., LACROIX, A. Metabolism of retinol and retinoic acid in N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinomas in rats. **Cancer Res.**, v. 49, p. 139-144, 1989.

BLOMHOFF, R., BLOMHOFF, H.K. Overview of retinoid metabolism and function. **J Neurobiol.**, v. 66, p. 606-630, 2006.

BUDHU AS, NOY N. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. **Mol. Cell Biol.**, v. 22, p. 2632-2341, 2002.

BUIJS, C., DE VRIES, E.G., MOURITS, M.J., WILLEMSE, P.H. The influence of endocrine treatments for breast cancer on health-related quality of life. **Cancer Treat. Rev.**, v. 34, p. 640-655, 2008.

CHAVEZ-MACGREGOR, M., ELIAS, S.G., ONLAND-MORET, N.C., VAN DER SCHOUW, Y.T., VAN GILS, C.H., MONNINKHOF, E., GROBBEE DE, PEETERS, P.H. Postmenopausal breast cancer risk and cumulative number of menstrual cycles. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.14, p. 799-804, 2005.

CHEN, W.Y. Exogenous and endogenous hormones and breast cancer. **Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 22, p. 573-585, 2008.

CLARKE, N., GERMAIN, P., ALTUCCI, L., GRONEMEYER, H. Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v. 30, p.1-23,2004.

CLARKE, R. Animal models of breast cancer: experimental design and their use in nutrition and psychosocial research. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 46, p.117-133, 1997.

CORTHÉSY-THEULAZ, I., DEN DUNNEN, J.T., FERRÉ, P., GEURTS, J.M., MÜLLER, M., VAN BELZEN, N., VAN OMMEN, B. Nutrigenomics: the impact of biomics technology on nutrition research. **Ann. Nutr. Metab.**,v. 49, p. 355-365, 2005.

COSTA, I., SOLANAS, M., ESCRICH, E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12dimethylbenz(*alpha*)anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 126, p. 915-927, 2002.

CVETKOVIĆ, D., WILLIAMS, S.J., HAMILTON, T.C. Loss of cellular retinol-binding protein 1 gene expression in microdissected human ovarian cancer. **Clin Cancer Res.**, v. 9, p. 1013-1020, 2003.

DASHWOOD, R.H., HO E. Dietary histone deacetylase inhibitors: From cells to mice to man. **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, n. 5, p. 363-369, 2007.

DAVIS, C.D. Nutritional interactions: credentialing of molecular targets for cancer prevention. **Exp. Biol. Med.**, v. 232, p. 176-183, 2007.

DAVIS, C.D., UTHUS, E.O. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 229, p. 988-995, 2004.

DI CROCE, L., RAKER, V.A., CORSARO, M., FAZI, F., FANELLI, M., FARETTA, M., FUKS, F., LO COCO, F., KOUZARIDES, T., NERVI, C., MINUCCI, S., PELICCI, P.G. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. **Science**, v. 295, p. 1079-1082, 2002.

DOLL, R., PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 66, p.1191–1308, 1981.

DRAGNEV KH, RIGAS JR, DMITROVSKY E. The retinoids and cancer prevention mechanisms. **Oncologist.**, v. 5, p. 361-368, 2000.

DUNN, B.K., WICKERHAM, D.L., FORD, L.G. Prevention of hormone-related cancers: breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, v. 10, p. 357-367, 2005.

ESPÍNDOLA, R.M. MAZZANTINI, R.P., ONG, T.P., De CONTI, A., HEIDOR, R., MORENO, F.S. Geranylgeraniol and beta-ionone inhibit hepatic preneoplastic lesions, cell proliferation and DNA damage during the initial phases of hepatocarcinogenesis, but only the former inhibits NF-kappaB activation. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 1091-1099, 2005.

ESTELLER, M., GUO, M., MORENO, V., PEINADO, M.A., CAPELLA, G., GALM, O., BAYLIN, S.B., HERMAN, J.G. Hypermethylation-associated Inactivation of the Cellular Retinol-Binding-Protein 1 Gene in Human Cancer. **Cancer Res.**, v. 62, p. 5902-5905, 2002.

ESTELLER, M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. **Lancet Oncol**, v. 4, p. 351-358, 2003.

ESTELLER, M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. **Hum Mol Genet.**, v. 16, p. 50-59, 2007.

FARIAS, E.F., ONG, D.E., GHYSELINCK, N.B., NAKAJO, S., KUPPUMBATTI, Y.S., MIRA Y LOPEZ, R. Cellular retinol-binding protein I, a regulator of breast epithelial retinoic acid receptor activity, cell differentiation, and tumorigenicity. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 97, p. 21-29, 2005.

FEINBERG, A.P., GEHRKE, C.W., KUO, K.C., EHRLICH, M. Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia. **Cancer Research**, v. 48, p.1159-1161, 1988.

FIELDS, A.L., SOPRANO, D.R., SOPRANO, K.J. Retinoids in biological control and cancer. **J. Cell Biochem.**, v. 1, p. 886-898, 2007.

FOULKES, W.D. BRCA1 and BRCA2: chemosensitivity, treatment outcomes and prognosis. **Fam. Cancer**,v. 5,p. 135-142, 2006.

FUKUMASU, H., AVANZO, J.L., HEIDOR, R., SILVA, TC., ATROCH, A., MORENO, F.S., DAGLI, M.L. Protective effects of guarana (Paullinia cupana

Mart. var. Sorbilis) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food Chem. Toxicol.**, v. 44, p. 862-867, 2006.

GALLAGHER, R.E. Retinoic acid resistance in acute promyelocytic leukemia. **Leukemia.**, v. 16, p. 1940-1958, 2002.

GREAVES, M. Cancer causation: the Darwinian downside of past success? **Lancet Oncol.**, v. 3, p. 244-251, 2002.

GREENWALD P. Cancer chemoprevention. **BMJ.**, v. 23, p. 714-718, 2002.

GRUBBS, C.J., ETO, I., JULIANA, M.M., HARDIN, J.M., WHITAKER, L.M. Effect of retinyl acetate and 4-hydroxyphenylretinamide on initiation of chemically-induced mammary tumors. **Anticancer Res.**, v. 10, p. 661-666, 1990.

GUO, X., NANUS, D.M., RUIZ, A., RANDO, R.R., BOK, D., GUDAS, L.J. Reduced levels of retinyl esters and vitamin A in human renal cancers. **Cancer Res.**, v. 15, p. 2774-2781, 2001.

GUO, X., KNUDSEN, B.S., PEEHL, D.M., RUIZ, A., BOK, D., RANDO, R.R., RHIM, J.S., NANUS, D.M., GUDAS, L.J. Retinol metabolism and lecithin:retinol acyltransferase levels are reduced in cultured human prostate cancer cells and tissue specimens. **Cancer Res.**, v. 15, p.1654-1661, 2002.

HANF, V., GONDER, U. Nutrition and primary prevention of breast cancer: foods, nutrients and breast cancer risk. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 123, p. 139-149, 2005.

HARRELL, J.C., DYE, W.W., ALLRED, D.C., JEDLICKA, P., SPOELSTRA, N.S., SARTORIUS, C.A., HORWITZ, K.B. Estrogen receptor positive breast cancer metastasis: altered hormonal sensitivity and tumor aggressiveness in lymphatic vessels and lymph nodes. **Cancer Res.**, v. 66, p. 9308-9315, 2006.

HARRISON, E.H. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. **Annu Rev. Nutr.**, v. 25, p. 87-103. 2005.

HARRISON, E.H., HUSSAIN, M.M. Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. **J. Nutr.**, v. 131, p. 1405-1408, 2001.

HAYDEN, L.J., SATRE, M.A. Alterations in cellular retinol metabolism contribute to differential retinoid responsiveness in normal human mammary epithelial cells versus breast cancer cells. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 72, p. 95-105, 2002.

HILAKIVI-CLARKE, L., WANG, C., KALIL, M., RIGGINS, R., PESTELL, R.G. Nutritional modulation of the cell cycle and breast cancer. **Endocr. Relat. Cancer.**,v. 11, p. 603-622, 2004.

HILL, D.L., GRUBBS, C.J. Retinoids and cancer prevention. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 12, p. 161-181, 1992.

INCA, 2006. Detecção precoce do câncer de mama. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=1932 ; acesso em: 08/06/09

JEMAL, A., SIEGEL, R., WARD E, MURRAY, T., XU, J., THUN, M.J. Cancer statistics, 2007. **CA. Cancer J. Clin.**,v. 57, p. 43-66, 2007.

JING, Y., ZHANG, J., BLEIWEISS, I.J., WAXMAN, S., ZELENT, A., MIRA-Y-LOPEZ, R. Defective expression of cellular retinol binding protein type I and retinoic acid receptors alpha2, beta 2, and gamma 2 in human breast cancer cells. **FASEB J.**, v. 10, p. 1064-1070, 1996.

JOHANNING, G.L., PIYATHILAKE, C.J. Retinoids and epigenetic silencing in cancer. **Nutrition Rev.**, v. 61, p. 284-289, 2003.

KUPPUMBATTI, Y.S., BLEIWEISS, I.J., MANDELI, J.P., WAXMAN, S., MIRA-Y-LOPEZ, R. Cellular retinol-binding protein expression and breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 92, p. 475-480, 2000.

KUPPUMBATTI, Y.S., REXER, B., NAKAJO, S., NAKAYA, K., MIRA-Y-LOPEZ, R. CRBP supresses breast cancer cell survival and anchorage-independent growth. **Oncogene**, v. 20, p. 7413-7419, 2001.

LESTER, J. Breast Cancer in 2007: Incidence, Risk Assessment, and Risk Reduction Strategies. **Clinical Journal of Oncology Nursing**, v. 11, p. 619-622, 2007.

LYNCH, H.T., SILVA, E., SNYDER, C., LYNCH, J.F. Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes. **Breast J.**, v. 14, p. 3-13, 2008.

MCCORMICK, D.L., BURNS, F.J., ALBERT, R.E. Inhibition of rat mammary carcinogenesis by short dietary exposure to retinyl acetate. **Cancer Res.**, v. 40, p. 1140-3, 1980.

MEHTA, R.G. Experimental basis for the prevention of breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. 1275-1282, 2000.

MILNER, J.A. Molecular targets for bioactive food components. **J. Nutr.**, v. 134, p. 2492S-2498S, 2004

MILNER, J.A. Nutrition and cancer: essential elements for a roadmap. **Cancer Lett.**, v. 8, p.189-198, 2008.

MONGAN, N.P., GUDAS, L.J. Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. **Differentiation.**, v. 75, p. 853-70, 2007.

MOON, R.C., CONSTANTINOU, A.I. Dietary retinoids and carotenoids in rodent models of mammary tumorigenesis. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 46, p. 181-189, 1997.

MOON, R.C., GRUBBS, C.J., SPORN, M.B. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis by retinyl acetate. **Cancer Res.**, v. 36, p. 2626-30, 1976.

MULLER, M., KERSTEN, S. Nutrigenomics: goals and strategies. **Nat. Rev. Genet.**, v. 4, p. 315-322, 2003.

NAPOLI, J.L. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.22, p. 139-162, 1999.

NARAYAN, A., JI, W., ZHANG, X.Y., MARROGI, A., GRAFF, J.R., BAYLIN, S.B., EHRLICH, M. Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas. **Int J Cancer.**, v.77, p. 833-888,1998.

NILES RM. Biomarker and animal models for assessment of retinoid efficacy in cancer chemoprevention. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 28, p.1383-1391, 2007.

NOWELL, S.A., AHN, J., AMBROSONE, C.B. Gene-nutrient interactions in cancer etiology. **Nutr. Rev.**, v. 62, p. 427-438, 2004.

NOY, N. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. **Biochem. J.**, v. 15, p. 481-495, 2000.

Organização Mundial de Saúde (OMS). **Fact sheets**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>; acesso em: 08 jun. 09

Organização Mundial de Saúde (OMS). **New releases 2003**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/>>; acesso em: 08 jun. 09

ONG, T.P., HEIDOR, R., DE CONTI, A., DAGLI, M.L., MORENO, F.S. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMG CoA reductase. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 1194-1203, 2006.

PALAN, P.R., ROMNEY, S.L. Cellular binding proteins for vitamin A in human carcinomas and in normal tissues. **Cancer Res**, v. 40, p. 4221-24, 1980.

PARK, K., CHOI, K., KIM, H., KIM, K., LEE, M.H., LEE, J.H., KIM RIM, J.C. Isoflavone-deprived soy peptide suppresses mammary tumorigenesis by inducing apoptosis. **Exp. Mol. Med.**, v. 41, p. 371-381, 2009.

PIYATHILAKE, C.J., JOHANNING, G.L. Cellular vitamins, DNA methylation and cancer risk. **J. Nutr.**, v. 132, p. 2340S-2344S, 2002.

RICE, S., WHITEHEAD, S.A. Phytoestrogens and breast cancer--promoters or protectors? **Endocr. Relat. Cancer**, v. 13, p. 995-1015, 2006.

ROBERTSON, K.D., JONES, P.A. DNA methylation: past, present and future directions. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 461-467, 2000.

ROSS, S.A. Nutritional genomic approaches to cancer prevention research. **Exp Oncol.**, v. 29, p. 250-256, 2007.

ROWLANDS, J.C., HE, L., HAKKAK, R., RONIS, M.J., BADGER, T.M. Soy and whey proteins downregulate DMBA-induced liver and mammary gland CYP1 expression in female rats. **J. Nutr.**, v. 131, p. 3281-3287, 2001.

ROWLING, M.J., MCMULLEN, M.H., SCHALINSKE, K.L. Vitamin A and its derivatives induce hepatic glycine N-methyltransferase and hypomethylation of DNA in rats. **J. Nutr.**, v.132, p. 365-369, 2002.

ROWLING, M.J., SCHALINSKE, K.L. Retinoid compounds activate and induce hepatic glycine N-methyltransferase in rats. **J. Nutr.**, v. 131, p. 1914-1917, 2001.

RUSSO, I.H., RUSSO, J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. **Environ. Health Perspect.**, v. 04, p. 938-967,1996.

RUSSO, J., RUSSO, I.H. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. **J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.**, v. 5, p. 187-200, 2000.

SHIMADA, T., HAYES, C.L., YAMAZAKI, H., AMIN, S., HECHT, S.S., GUENGERICH, F.P., SUTTER, T.R. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. **Cancer Res.**, v. 56, p. 2979-2984, 1996.

SILVEIRA, E.R.; MORENO, F.S. Natural retinoids and β -carotene: from food to their actions on gene expression. **J. Nutri. Biochem.**, v. 9, p. 446-456, 1998.

SIMEONE, A.M., TARI, A.M. How retinoids regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 61, p. 1475-1484, 2004.

SMITH JJ, TULLY P, PADBERG RM. Chemoprevention: a primary cancer prevention strategy. **Semin Oncol Nurs**.v. 21, p. 243-251, 2005.

SNEDEKER, S.M. Chemical exposures in the workplace: effect on breast cancer risk among women. **AAOHN J.**, v. 54, p. 270-279, 2006.

SPORN, M.B., DUNLOP, N.M., NEWTON, D.L., SMITH, J.M. Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). **Fed. Proc.**, v. 35, p. 1332-1338, 1976.

SPORN MB, SUH N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. **Nat Rev Cancer**.v. 2, p. 537-543, 2002.

STAHL, M., SUNDQUIST, A.R., HANUSCH, M., SCHWARZ, W., SIES, H. Separation of beta-carotene and lycopene geometrical isomers in biological samples. **Clin. Chem.**, v. 39, p. 810-814, 1993.

SUN, S-Y, LOTAN, R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 41, p. 41-55, 2002.

SURH, Y.J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer*, v. 3, p. 768-780, 2003.

TOSETTI F, CAMPELLI F, LEVI G. Studies on the cellular uptake of retinol binding protein and retinol. **Exp Cell Res.** v. 250, p. 423-433, 1999.

TSUBURA, A., UEHARA, N., KIYOZUKA, Y., SHIKATA, N. Dietary factors modifying breast cancer risk and relation to time of intake. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v. 10, p. 87-100, 2005.

VAN HUESDEN, J., VAN GINCKEL, R., BRUWIERE, H., MOELANS, P., JANSSEN, B., FLOREN, W., LEEDE, B.J., VAN DUN, J., SANZ, G., VENET, M., DILLEN, L., VAN HOVE, C., WILLEMSSENS, G., JANICOT, M., WOUTERS, W. Inhibition of all-*trans*-retinoic acid metabolism by R116010 induces antitumor activity. **Br J Cancer.**, v 86, p. 605–611, 2002.

VOGEL, S., MENDELSON, C.L., MERTZ, J.R., PIANTEDOSI. R., WALDBURGER, C., GOTTESMAN. M.E., BLANER, W.S. Characterization of a new member of the fatty acid-binding protein family that binds all-*trans*-retinol. **J. Biol. Chem.**, v. 12, p.1353-1360, 2001.

WEINSTEIN, I.B., CASE, K. The history of Cancer Research: introducing an AACR Centennial series. **Cancer Res.**, v. 68, p. 6861-6862, 2008.

WIDSCHWENDTER, M., BERGER, J., DAXENBICHLER, G., MÜLLER-HOLZNER, E., WIDSCHWENDTER, A., MAYR, A., MARTH, C., ZEIMET, A.G. Loss of retinoic acid receptor beta expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. **Cancer Res.**, v 57, p. 4158-61, 1997.

WIDSCHWENDTER, M., BERGER, J., MULLER, H.M., ZEIMET, A.G., MARTH, C. Epigenetic downregulation of the retinoic acid receptor-beta2 gene in breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 6, p. 193-201, 2001.

WHITSETT T., CARPENTER M., LAMARTINIERE C.A. Resveratrol, but not EGCG, in the diet suppresses DMBA-induced mammary cancer in rats. **J Carcinog.**, 5:15, 2006.

WYNDER, E.L., GORI, G.B. Contribution of the environment to cancer incidence: an epidemiologic exercise. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 58, p. 825-832, 1977.

XU, X.C., SNEIGE, N., LIU, X., NANDAGIRI, R., LEE, J.J., LUKMANJI, F., HORTOBAGYI, G., LIPPMAN, S.M., DHINGRA, K., LOTAN, R. Progressive decrease in nuclear retinoic acid receptor beta messenger RNA level during breast carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 57, p. 4992-4996, 1997.

YANG, Q., SAKURAI, T., KAKUDO, K. Retinoid, retinoic acid receptor beta and breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 76, p. 167-173, 2002.

ZIZOLA, C.F., SCHWARTZ, G.J., VOGEL, S. Cellular retinol-binding protein type III is a PPARgamma target gene and plays a role in lipid metabolism. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 295, p. 1358-1368, 2008.

ZOLFAGHARI, R., ROSS, A.C. Lecithin:retinol acyltransferase from mouse and rat liver. CDNA cloning and liver-specific regulation by dietary vitamin a and retinoic acid. **J. Lipid Res.**, v. 41, p. 2024-2034, 2000.