UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Área de Nutrição Experimental

Efeitos do consumo materno e/ou paterno de extrato de amora
preta (*Rubus* spp.) na suscetibilidade da prole feminina à
carcinogênese mamária quimicamente induzida

Vanessa Cardoso Pires

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Área de Nutrição Experimental

Efeitos do consumo materno e/ou paterno de extrato de amora
preta (*Rubus* spp.) na suscetibilidade da prole feminina à
carcinogênese mamária quimicamente induzida

Vanessa Cardoso Pires

Versão Original

Tese para obtenção do Título de
DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Thomas Prates Ong

São Paulo

2016

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

Pires, Vanessa Cardoso
P667e Efeitos do consumo materno e/ou paterno de extrato de
amora preta (*Rubus* spp.) na suscetibilidade da prole feminina
à carcinogênese mamária quimicamente induzida / Vanessa
Cardoso Pires. -- São Paulo, 2016.
101p.

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

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

641.1 CDD

Vanessa Cardoso Pires

Efeitos do consumo materno e/ou paterno de extrato de amora-
preta (*Rubus* spp.) na suscetibilidade da prole feminina à
carcinogênese mamária quimicamente induzida

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 _____ de 2016.

RESUMO

PIRES, V. C. **Efeitos do consumo materno e/ou paterno de extrato de amora-preta (*Rubus* spp.) na suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária quimicamente induzida.** 2016. 101f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2016.

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais prevalente no mundo e o mais comum entre as mulheres. É descrito que o padrão de consumo alimentar materno e paterno está relacionado à suscetibilidade da prole ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, inclusive o câncer. A amora-preta é uma das frutas com maior conteúdo antioxidante e seus compostos bioativos possuem atividade antioxidante, anticarcinogênica e anti-inflamatória. Sendo assim, o presente trabalho propõe avaliar os efeitos do consumo materno e/ou paterno de extrato de amora-preta (*Rubus* spp.) na suscetibilidade da prole feminina ao desenvolvimento de neoplasias mamárias quimicamente induzidas. Para tanto, camundongos da linhagem C57BL/6 foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: pai amora (PA), mãe amora (MA), pai e mãe amora (PMA) e controle (CTRL). Os pais receberam extrato de amora-preta logo após o desmame durante 8 semanas e as mães receberam o extrato durante a gestação e lactação. O extrato de amora-preta foi administrado na água de beber (0.84g de antocianinas/L) *ad libitum*. Os pais tratados com extrato de amora apresentaram redução na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) no testículo ($p<0.05$ e $p<0.001$, respectivamente), aumento na capacidade antioxidante plasmática, na porcentagem de espermatozoides normais e na produção diária de espermatozoides em relação ao grupo controle ($p<0.001$ para todos). Além disso, os grupos PA, MA e PMA apresentaram aumento na taxa de prenhez ($p<0.05$) e redução da mortalidade perinatal ($p<0.01$, $p<0.05$ e $p<0.001$, respectivamente). Em relação à prole feminina não submetida à carcinogênese foi observada redução na capacidade antioxidante plasmática nos grupos PA ($p<0.001$) e MA ($p<0.01$), enquanto o grupo PMA apresentou aumento nesse parâmetro ($p<0.001$). No desenvolvimento da glândula mamária, houve aumento do desenvolvimento epitelial nos grupos PA, MA e PMA ($p<0.001$ para todos), de diferenciação nos grupos MA e PMA ($p<0.01$ para ambos) e da taxa de apoptose nos grupos MA e PMA ($p<0.05$), além de redução no número de TEBs nos grupos PA, MA e PMA ($p<0.01$, $p<0.001$ e $p<0.001$, respectivamente). Não foram observadas alterações significativas nas filhas submetidas à indução química da carcinogênese mamária por DMBA. Assim, é possível concluir que apesar de ter alterado o desenvolvimento da glândula mamária, o consumo materno e/ou paterno de extrato de amora-preta não foi capaz de impactar sobre a suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária quimicamente induzida.

Palavras-chaves: Câncer de mama, programação fetal, programação paterna, polifenóis, amora-preta

ABSTRACT

PIRES, V. C. **Blackberry (*Rubus* spp.) extract maternal and/or paternal consumption effects on female offspring susceptibility to chemically-induced breast carcinogenesis.** 2016. 101f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2016.

Breast cancer is the second most prevalent type of cancer in the world and the most common among women. It is known that maternal and paternal food intake pattern are related to offspring susceptibility to non-communicable diseases, including cancer. Blackberry is one of the fruits with high antioxidant content and its compounds have antioxidant, anticarcinogenic and anti-inflammatory properties. So, the aim of the present study was evaluate the effects of maternal and/or paternal blackberry extract consumption on female offspring susceptibility to chemically-induced breast carcinogenesis. Thus, C57BL/6 mice were divided into 4 groups: father blackberry (FB), mother blackberry (MB), father and mother blackberry (FMB) and control (CTRL). Fathers received blackberry extract from weaning during 8 weeks and the mothers were treated during gestation and lactation. Blackberry extract was given in the drink water (0.84g anthocyanins/L) *ad libitum*. Fathers treated with blackberry had a reduction on superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in the testis ($p<0.05$ and $p<0.001$, respectively), an increase on plasmatic antioxidant capacity, percentage of normal sperm and daily sperm production in relation to control group ($p<0.001$ for all comparisons). Moreover, FB, MB and FMB groups had an increase of pregnancy rate ($p<0.05$) and a decrease of perinatal mortality ($p<0.01$, $p<0.05$ and $p<0.001$, respectively). Female offspring had a reduction of plasmatic antioxidant capacity in FB ($p<0.001$) and MB ($p<0.01$) groups, while FMB group showed an increase in this parameter ($p<0.001$). On mammary gland development, it was observed higher epithelial development in FB, MB and FMB groups ($p<0.001$ for all comparisons), increased differentiation in MB and FMB groups ($p<0.01$ for both) and higher apoptosis rate in MB and FMB groups ($p<0.05$ for both), besides decreased TEBs number in FB, MB and FMB groups ($p<0.01$, $p<0.001$ and $p<0.001$, respectively). It was not found significant differences in the female offspring submitted to chemically-induced breast carcinogenesis. So, it is possible to conclude that in spite of maternal and/or paternal blackberry extract consumption changed the mammary gland development, it was not able to change the female offspring susceptibility to chemically-induced breast carcinogenesis.

Keywords: Breast cancer, fetal programming, paternal programming, polyphenols, blackberry.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que meu força e coragem para continuar seguindo no caminho que escolhi, com amor e dedicação, apesar de toda e qualquer dificuldade que tenha surgido.

À minha mãe e toda minha família, por todo apoio carinhosamente oferecido em cada passo dado e por compreenderem minha ausência em tantos momentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thomas Prates Ong, que me acolheu em seu laboratório, acreditou no meu potencial e abriu portas para que eu pudesse conhecer um novo horizonte repleto de emoções e desafios.

Ao meu co-orientador e ex-orientador, Prof. Dr. Odair Aguiar Jr., que me ensinou a dar os primeiros passos na vida acadêmica e continua me apoiando incansavelmente.

À Profa. Dra. Neuza Mariko Hassimotto por participar intensamente de todas as etapas desse projeto, por sua disponibilidade em ensinar e sua parceria admirável.

Ao Prof. Dr. Fernando Moreno pelo apoio, pela contribuição e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan pela colaboração e dedicação na realização das análises histopatológicas.

Ao Felipe Granado pela contribuição técnica na realização das análises estatísticas.

À Sara Lima, aluna de Iniciação Científica, que colaborou efetivamente para a realização de várias etapas desse projeto.

À minha amiga e parceira Gabriela Costa por todo apoio pessoal e profissional durante todos esses anos, ajudando sempre de maneira desprendida e amorosa.

Às minhas parceiras de laboratório Laila Santos, Mariana Rosim, Luiza Guido, Camile Fontelles, Fábila Andrade, Raquel Santana, Natália Castro e Livia Ribeiro pelo apoio em diversos momentos.

A todos os funcionários do biotério da FCF/IQ-USP pela paciência e pelo suporte técnico e estrutural necessários para a realização desse estudo.

Ao CNPq e à FAPESP pela bolsa de estudos concedida.

Ao Food Research Center (FoRC) pelo apoio financeiro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
Câncer de mama.....	17
Programação fetal.....	19
Programação fetal do câncer de mama.....	23
Programação paterna.....	26
Programação paterna do câncer de mama.....	29
Amora-preta.....	30
3. OBJETIVOS	
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5. RESULTADOS.....	45
6. DISCUSSÃO.....	74
7. CONCLUSÕES.....	80
8. REFERÊNCIAS.....	81
9. APÊNDICES.....	97
10. ANEXOS.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química das antocianidinas.....	30
Figura 2. Estrutura química do ácido elágico.....	31
Figura 3. Apresentação esquemática do delineamento experimental.....	39
Figura 4. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (525 nm) do extrato obtido do fruto de amora-preta.....	45
Figura 5. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (270 nm) do extrato obtido do fruto de amora-preta.....	46
Figura 6. Demonstração gráfica da estimativa do consumo individual diário de ração dos machos F0 (pais).....	49
Figura 7. Gráfico demonstrativo da estimativa do consumo individual diário de líquido pelos machos F0 (pais).....	49
Figura 8. Representação gráfica da evolução do ganho de massa corporal dos machos F0 (pais).....	50
Figura 9. Gráfico demonstrativo do resultado obtido no teste de tolerância à glicose intraperitoneal dos machos F0 (pais).....	51
Figura 10. Representação gráfica da produção diária de espermatozoides dos machos F0 (pais).....	52
Figura 11. Representação gráfica da morfologia espermática dos machos F0 (pais).....	52
Figura 12. Representação gráfica da capacidade antioxidante plasmática dos machos F0 (pais).....	54
Figura 13. Representação gráfica dos níveis plasmáticos de testosterona dos machos F0 (pais).....	54
Figura 14. Gráfico demonstrativo da taxa de prenhez.....	55
Figura 15. Demonstração gráfica da estimativa do consumo individual diário de ração das fêmeas F0 (mães) durante a gestação.....	56
Figura 16. Demonstração gráfica da estimativa do consumo individual diário de ração das fêmeas F0 (mães) durante a lactação.....	56
Figura 17. Demonstração gráfica da estimativa do consumo individual diário de líquido das fêmeas F0 (mães) durante a gestação.....	57

Figura 18. Demonstração gráfica da estimativa do consumo individual diário de líquido das fêmeas F0 (mães) durante a lactação.....	57
Figura 19. Demonstração gráfica do ganho de massa corporal das fêmeas F0 (mães) durante o período gestacional.....	58
Figura 20. Demonstração gráfica do ganho de massa corporal das fêmeas F0 (mães) durante o período lactacional.....	59
Figura 21. Gráfico demonstrativo do resultado obtido no teste de tolerância à glicose intraperitoneal das fêmeas F0 (mães).....	59
Figura 22. Demonstração gráfica do número de filhotes machos e fêmeas por grupo.....	62
Figura 23. Demonstração gráfica do número relativo de mortos em relação aos vivos por grupo.....	63
Figura 24. Gráfico demonstrativo do resultado obtido no teste de tolerância à glicose intraperitoneal das fêmeas F1 (filhas).....	64
Figura 25. Gráfico demonstrativo da capacidade antioxidante das fêmeas F1 (filhas) não submetidas ao ensaio da carcinogênese (PND 50).....	65
Figura 26. Gráfico demonstrativo do desenvolvimento epitelial da glândula mamária, avaliado pela distância entre a ponta da árvore epitelial e a <i>fat pad</i> , das fêmeas F1 (filhas) não submetidas ao ensaio da carcinogênese (PND 50).....	66
Figura 27. Gráfico demonstrativo do desenvolvimento epitelial da glândula mamária, avaliado pela distância entre o linfonodo e o fim da árvore epitelial, das fêmeas F1 (filhas) não submetidas ao ensaio da carcinogênese (PND 50).....	67
Figura 28. Gráfico demonstrativo do grau de diferenciação da glândula mamária, avaliado pela soma dos brotos alveolares primários, secundários e lóbulos, das fêmeas F1 (filhas) não submetidas ao ensaio da carcinogênese (PND 50).....	67
Figura 29. Gráfico demonstrativo do risco para transformação maligna na glândula mamária, avaliado pelo número de TEBs, das fêmeas F1 (filhas) não submetidas ao ensaio da carcinogênese (PND 50).....	68
Figura 30. Gráfico demonstrativo da porcentagem de células em apoptose da glândula mamária das fêmeas F1 (filhas) não submetidas ao ensaio da carcinogênese (PND 50).....	69
Figura 31. Representação gráfica do ganho de massa corporal das fêmeas F1 (filhas) submetidas à indução química da carcinogênese mamária por DMBA.....	69

Figura 32. Gráfico demonstrativo da evolução do volume tumoral das fêmeas F1 (filhas) submetidas à indução da carcinogênese mamária.....	71
Figura 33. Gráfico demonstrativo do número relativo de fêmeas F1 (filhas) submetidas à indução da carcinogênese mamária que não desenvolveram tumores mamários ao longo de todo o período avaliado.....	72
Figura 34. Figuras representativas de tumores mamários.....	73
Figura 35. Lesões neoplásicas pulmonares.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação de flavonoides e elagitânicos do fruto de amora-preta e de seus extratos aquoso e alcoólico em fase aquosa.....	46
Tabela 2. Concentração de cianidina, quercetina e ácido elágico livre no extrato alcoólico de amora-preta em fase aquosa, durante manutenção a temperatura ambiente por 1 e 2 dias, e a -80°C durante 7 dias.....	47
Tabela 3. Quantificação de glicose, frutose e sacarose no extrato alcoólico de amora-preta em fase aquosa.....	48
Tabela 4. Teor de fenólicos totais (FT) e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ORAC no fruto de amora-preta e em seu extrato.....	48
Tabela 5. Dados referentes ao peso inicial, peso final e ganho de massa corporal dos machos F0 (pais).....	50
Tabela 6. Valores descritivos do peso relativo do testículo, epidídimo, rim, fígado, pulmão e coração dos machos F0 (pais).....	51
Tabela 7. Valores descritivos da área tubular, área intersticial e diâmetro tubular do tecido testicular nos machos F0 (pais).....	53
Tabela 8. Valores descritivos da atividade enzimática da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) no testículo dos machos F0 (pais).....	53
Tabela 9. Valores descritivos do peso relativo do útero (com ovário), rim, fígado, pulmão e coração das fêmeas F0 (mães).....	60
Tabela 10. Valores descritivos da atividade enzimática da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) no fígado das fêmeas F0 (mães).....	60

Tabela 11. Valores descritivos da capacidade antioxidante plasmática das fêmeas F0 (mães).....	61
Tabela 12. Valores descritivos do número de filhotes nascidos por mãe.....	61
Tabela 13. Valores descritivos do peso das fêmeas F1 (filhas) no momento do desmame e do ganho de massa corporal ao longo do tempo.....	63
Tabela 14. Valores descritivos do peso relativo do útero (com ovários), rim, fígado, pulmão e coração das fêmeas F1 (filhas).....	64
Tabela 15. Valores descritivos da atividade enzimática da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) no fígado das fêmeas F1 (filhas).....	65
Tabela 16. Multiplicidade e latência dos tumores mamários das fêmeas F1 (filhas) submetidas à indução da carcinogênese.....	70
Tabela 17. Peso do primeiro (T1) e do segundo (T2) tumor mamário observado nas fêmeas F1 (filhas) submetidas à indução da carcinogênese.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AE	ácido elágico
AP1	proteína ativadora 1
BRCA	gene câncer de mama
°C	grau Celsius
CAT	catalase
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
COX	ciclooxigenase
Cy	cianidina
DCNT	Doenças crônicas não-transmissíveis
DMBA	7,12-dimetilbenz[a]antraceno
DNA	ácido desoxirribonucleico
dL	decilitro
DNMT	DNA metiltransferase
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ER+	receptor de estrógeno positivo
ER-	receptor de estrógeno negativo
EZH	intensificador do homólogo 2 de zeste
F0	geração parental
F1	primeira geração
GAE	equivalente em ácido gálico
g	gramas
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione
HAT	histona acetiltransferase
HDAC	histona desacetilase
HHA	eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	proteína ligadora do fator de crescimento semelhante à insulina
IL	interleucina
IMC	índice de massa corporal

kg	kilograma
LDL	lipoproteína de baixa densidade
M	molar
mg	miligrama
mTORC	alvo mecanístico do complexo rapamicina 1
MPA	acetato de medroxiprogesterona
NFκB	fator nuclear kappa B
ng	nanograma
nm	nanômetro
OH	hidroxila
PBS	tampão fosfato salina
PDE	Produção diária de espermatozoides
PND	dia pós-natal
PUFA	ácidos graxos poli-insaturados
Querc	quercetina
RNA	ácido ribonucleico
SOD	superóxido dismutase
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TDLU	<i>terminal ductal-lobular unit</i>
TEB	<i>terminal end bud</i>
TNF	fator de necrose tumoral
UA	unidade de atividade

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo de neoplasia mais prevalente no mundo e o mais comum entre as mulheres (IARC, 2014). Fatores genéticos, endócrinos e ambientais constituem os principais elementos envolvidos na carcinogênese mamária, destacando-se inclusive o padrão alimentar (WCRF/AICR, 2007). Enquanto o consumo elevado de gordura saturada e alimentos processados aumentam o risco para o desenvolvimento de doenças como o câncer, a ingestão de frutas e vegetais ricos em compostos bioativos é capaz de reduzir esse risco (ATAOLLAHI et al., 2014).

Para além do estilo de vida, por mais de duas décadas acumulam-se evidências de que experiências vivenciadas durante o período intrauterino podem programar a suscetibilidade do indivíduo à carcinogênese mamária na idade adulta (AHLGREN et al., 2003; PARK et al., 2006; TRICHOPOULOS, 1990). Nesse sentido, é necessário considerar não apenas o fato de que a glândula mamária inicia seu desenvolvimento ainda no período fetal, como também os inúmeros eventos epigenéticos envolvidos na embriogênese (MEIER-ABT e BENTIREN-ALJ, 2014; RUSSO e RUSSO, 2004). O elevado grau de indiferenciação das células nesse momento, bem como a rápida taxa de divisão celular, torna o indivíduo em formação mais sensível às variações do ambiente materno (SANTOS e DEAN, 2004).

Dentro desse contexto, mais recentemente, tem sido apontado que as experiências paternas ao longo da vida são capazes de modular a qualidade dos espermatozoides, impactando diretamente no desenvolvimento embrionário/fetal do indivíduo e no risco de doenças crônicas não-transmissíveis na idade adulta (CARRELL, 2012). Embora os mecanismos envolvidos nesse processo sejam ainda pouco conhecidos, alterações epigenéticas durante a espermatogênese têm sido apontadas como um dos possíveis fatores responsáveis por essa programação.

Alguns compostos bioativos, como os polifenóis, são capazes de alterar a expressão de inúmeros genes por meio de modificações epigenéticas (ONG et al., 2011). A amora-preta (*Rubus* spp.) é uma fruta com elevado teor de antocianinas e elagitaninos, polifenóis com capacidade de estimular ou inibir enzimas envolvidas no controle da metilação do DNA e na acetilação de histonas (DING et al., 2006; KAUSAR et al., 2012;). Embora seus compostos de maneira isolada sejam capazes de desencadear tais alterações, a fruta na forma íntegra parece apresentar maior potencial contra o desenvolvimento do câncer de mama (AIYER et al., 2012; KAUSAR et al.,

2012). Além disso, a potencialidade do consumo materno de antocianinas provenientes de mirtilo e do resveratrol em reduzir o risco de neoplasias mamárias na prole feminina já foi demonstrada em estudos com animais de experimentação realizados recentemente (PAPOUTSIS et al., 2013; RAHAL et al., 2013).

Dessa forma, considerando a relevância dos eventos maternos e paternos na programação fetal de doenças crônicas não-transmissíveis nos descendentes, bem como a capacidade de compostos polifenólicos dietéticos em modular diferentes mecanismos envolvidos nesse processo, o presente trabalho propõe avaliar os efeitos do consumo materno e/ou paterno de amora preta na suscetibilidade da prole feminina ao desenvolvimento de neoplasias mamárias.

2. REVISÃO DA LITERATURA

CÂNCER DE MAMA

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), como as cardiovasculares e respiratórias, diabetes e câncer, são responsáveis por mais da metade do número de mortes no mundo (OMS, 2010). Entre 2000 e 2012, as doenças isquêmicas do coração e acidente vascular cerebral (AVC) foram as principais causas de óbito em países desenvolvidos e em desenvolvimento (OMS, 2014).

As DCNTs são multifatoriais, nas quais fatores genéticos e ambientais estão diretamente envolvidos em sua etiologia, sendo o tabagismo, etilismo, sedentarismo e má alimentação os principais elementos do componente ambiental (BRASIL, 2008). Fatores socioeconômicos também estão diretamente relacionados à ocorrência dessas doenças, principalmente no que se refere à exposição aos fatores de risco associados (OMS, 2010).

Depois das doenças cardiovasculares, o câncer é a principal causa de morte dentre as DNCTs, estimando-se o aumento em 100% do número de pessoas com câncer no mundo até 2030 em relação aos dados atuais (WCRF/AICR, 2007; OMS, 2010). Segundo dados obtidos no projeto GLOBOCAN, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, a incidência global da doença foi de 14.067.894 casos em 2012, sendo que aproximadamente 60% da população acometida foi a óbito (FERLAY et al., 2013).

Dentre os tipos de neoplasias mais frequentes, destaca-se o câncer de mama como o segundo tipo mais prevalente no mundo e o mais comum entre as mulheres, independente das condições socioeconômicas (EHEMAN et al., 2012; IARC, 2014; INCA, 2011; OMS, 2010; WCRF/AICR, 2007). Acompanhando as perspectivas mundiais, o Brasil apresenta a maior incidência de câncer de mama entre as mulheres, principalmente nas regiões sul e sudeste, estimando-se a ocorrência de 57 mil novos casos nos anos de 2014 e 2015 (INCA, 2014).

O desenvolvimento do câncer de mama está relacionado a fatores endócrinos, genéticos e associados ao estilo de vida (INCA, 2014; WCRF/AICR, 2007). Assim, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, terapia de reposição hormonal, uso de anticoncepcionais orais, histórico familiar, consumo moderado de bebidas alcoólicas, obesidade, diabetes mellitus e sedentarismo são considerados fatores de risco (ANOTHAISINTAWEE et al., 2013; INCA, 2014).

A regulação endócrina é fundamental para o desenvolvimento da glândula mamária. Apesar desse processo ter início ainda no período embrionário/fetal, é na puberdade, sob ação dos hormônios sexuais, que as estruturas primárias iniciam sua divisão e diferenciação (MANAVATHI et al., 2014; RUSSO e RUSSO, 2004). A morfogênese da glândula mamária continua durante a vida, atingindo o nível máximo do desenvolvimento após a gestação, sendo que mulheres nulíparas possuem maior número de estruturas indiferenciadas e, portanto, são mais suscetíveis à transformação maligna (MEIER-ABT e BENTIREN-ALJ, 2014; RUSSO e RUSSO, 2004). Por outro lado, é durante a lactação que ocorre a produção de leite pelas células alveolares da glândula mamária, estimuladas pelo próprio aleitamento, o qual é considerado fator protetor contra o câncer de mama (ANOTHAISINTAWEE et al., 2013; RUSSO e RUSSO, 2004).

Pelo fato da glândula mamária ser altamente regulada por mecanismos endócrinos, a utilização de estrógeno e progesterona exógenos, para efeito anticoncepcional e reposição hormonal tem sido relacionada ao maior risco de câncer de mama (HUZELL et al., 2015). Isso porque além de estimular a proliferação celular e diminuir a apoptose junto à progesterona, o estrógeno libera metabólitos carcinogênicos, os quais levam diretamente a danos no DNA. Portanto, esses hormônios podem atuar tanto como iniciadores quanto promotores na carcinogênese (BROWN e HANKINSON, 2015; LANFRANCHI, 2014). Nesse sentido, grande parte das pacientes com neoplasia mamária apresentam receptores de estrógeno (ER+) e/ou progesterona

(PR+) no nucléolo das células tumorais, sendo indicada a utilização de moduladores de receptor estrogênico como tratamento junto com a quimioterapia (BAUERSCHLAG et al., 2014; DALMAU et al., 2014).

Na presença de um estímulo que desencadeie lesões no DNA, diversos mecanismos são ativados para impedir o progresso do ciclo celular e favorecer o reparo, dentre eles a proteína BRCA, um conhecido supressor tumoral. Os genes BRCA 1 e BRCA 2 são responsáveis também pela estabilidade genômica, favorecendo a integridade cromossômica. Mutações nesses genes estão diretamente relacionados à redução dos mecanismos de reparo no DNA e instabilidade da cromatina, favorecendo a propagação de danos e levando à carcinogênese (MINAMI et al., 2014; SHIOVITZ e KORDE, 2015). Apesar da baixa incidência de alterações (5-10%), o gene BRCA apresenta alta penetrância, ou seja, está associado ao elevado risco para o desenvolvimento de câncer (50-85%), principalmente de mama e ovário (ECONOMOPOULOU et al., 2015; SHIOVITZ e KORDE, 2015). Os tumores decorrentes de mutações especialmente no gene BRCA 1, em geral, não expressam receptor de estrógeno (ER-), e estão relacionados a um pior prognóstico e morte precoce (LEE et al., 2010).

Apesar da potencialidade do fator genético na etiologia do câncer de mama, aproximadamente 90% desse tipo de neoplasia é decorrente das exposições relacionadas ao estilo de vida (KRUK, 2014a). Na América Latina, por exemplo, mudança no padrão cotidiano das mulheres ao longo dos anos foi capaz de aumentar a incidência da doença entre 1980 e 2010 (AMADOU et al., 2014).

Nesse contexto, já foi relatado que o consumo de bebidas alcoólicas pode contribuir efetivamente para o desenvolvimento do câncer de mama, por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), lesões no DNA e estimulação da expressão de ER e PR, aumentando a proliferação da glândula mamária e favorecendo o desenvolvimento de estruturas lobulares atípicas (KRUK, 2014a; SCHENNINK et al., 2014). Embora não haja definição da quantidade e dos tipos de bebidas prejudiciais, consumo de etanol, mesmo que esporadicamente em elevada quantidade, pode aumentar o risco de câncer de mama (SCOCCIANI et al., 2014).

O controle do ciclo circadiano também parece estar relacionado ao risco da doença. Um estudo mostrou que alteração nos níveis de cortisol decorrente do distúrbio no ciclo sono-vigília, em pacientes portadoras de neoplasias mamárias, pode resultar em aumento dos tumores e no índice de massa corporal (IMC) (HSIAO et al., 2015).

Elevado IMC, principalmente correspondente à obesidade, está altamente associado ao maior risco da doença, tanto pelas inúmeras alterações endócrinas, como aumento de insulina, fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), adipocinas e hormônios sexuais, como pela indução do estresse oxidativo. Desta forma, a obesidade pode contribuir para o desenvolvimento do câncer de mama em todas as etapas da carcinogênese (KRUK, 2014b).

Por outro lado, a prática de atividade física de moderada a intensa, realizada frequentemente, é apontada como fator protetor contra a doença (ANOTHAISINTAWEE et al., 2013; LYNCH et al., 2011). Além de modular os hormônios sexuais, a taxa metabólica basal e contribuir para a redução do IMC e de todos os distúrbios desencadeados pela obesidade, a atividade física favorece o aumento da capacidade antioxidante e redução na concentração de fatores de crescimento, atuando tanto na fase de iniciação como de promoção da carcinogênese (KRUK, 2014b; LYNCH et al., 2011). Já foi relatada, inclusive, a potencialidade do exercício físico em estimular a expressão gênica de BRCA1 em mulheres de mutação nesse gene (PETTAPIECE-PHILLIPS et al., 2015).

O padrão alimentar também está relacionado ao risco de câncer de mama. Enquanto o consumo de carne vermelha, carne processada e gorduras de origem animal parecem aumentar o risco da doença (MOBARAKEH et al., 2014; MOUROUTI et al., 2015; ROSSI et al., 2014), dieta tipo mediterrâneo, incluindo ingestão de peixes, fibras, azeite, frutas, vegetais e alimentos ricos em polifenóis pode ser um fator protetor (KAKKOURA et al., 2015; MOBARAKEH et al., 2014; ROSSI et al., 2014). Um estudo recente observou que mulheres iranianas com neoplasias mamárias apresentam maior consumo de cereais, gordura, fritura, *fast food*, molho branco, arroz e óleo de fritura, enquanto mulheres saudáveis consomem mais pão integral, peixe, castanhas, frutas e vegetais (ATAOLLAHI et al., 2014).

PROGRAMAÇÃO FETAL

O termo “programação fetal” é utilizado para definir o processo de estimulação na vida intrauterina que promove alterações permanentes no feto, aumentando a suscetibilidade a doenças na idade adulta (ARMITAGE et al., 2005). A influência do ambiente fetal sobre o risco de doenças ao longo da vida foi sugerida por Barker e Osmond (1986), após observarem uma forte associação entre a mortalidade neonatal e

pós-natal de 1921 a 1925 e doença isquêmica do coração em adultos, entre 1968 e 1978, na Inglaterra e País de Gales, de acordo com a localização geográfica e condições socioeconômicas. Desta forma, os autores sugeriram que a distribuição geográfica da doença poderia refletir as variações no perfil nutricional no início da vida, programando o organismo a uma resposta patológica frente às influências do padrão dietético na vida adulta.

Depois de apresentada a hipótese, diversos estudos epidemiológicos mostraram consistentemente a relação entre a privação de nutrientes na vida intrauterina, ocorrida no período denominado “fome holandesa”, durante a Segunda Guerra Mundial (1944-1945), e a ocorrência de doenças na idade adulta, como hiperlipidemia, obesidade, doença coronariana, obstrução de vias aéreas e alteração na tolerância à glicose e na coagulação (RAVELLI et al., 1999; ROSEBOOM et al., 2006; ROSEBOOM et al., 2000; PAINTER et al., 2006; PAINTER et al., 2005a; PAINTER et al., 2005b;).

Como indicador indireto de condições intrauterinas adversas, o baixo peso ao nascer parece estar relacionado à maior suscetibilidade a doenças na idade adulta (BARKER, 2007). Alguns estudos epidemiológicos e experimentais mostraram associação entre o baixo peso ao nascer e risco de doenças cardiovasculares, hipertensão e diabetes tipo 2 (XIE et al., 2014; CURHAN et al., 1996; HALES e BARKER, 1992; BARKER et al., 1989). Essa relação pode ser explicada pela “hipótese do fenótipo poupador”, proposta por Hales e Barker (2001), a qual propõe que o feto se adapta ao ambiente restrito de nutrientes por meio da diminuição da velocidade de crescimento e de mudanças no metabolismo da glicose.

Ademais, de acordo com a hipótese da “resposta adaptativa preditiva”, tal adaptação permitiria melhor sobrevivência do indivíduo tanto no período fetal quanto pós-natal, considerando um ambiente nutricionalmente semelhante. Entretanto, se a oferta nutricional for de elevada densidade energética, associado ao baixo metabolismo desencadeado na vida intrauterina, maior será o risco para o desenvolvimento de doenças como obesidade, disfunção vascular e diabetes mellitus (GLUCKMAN et al., 2007; SWANSON et al., 2009; THOMPSON et al., 2014).

Em resposta ao atraso do desenvolvimento decorrente da privação de nutrientes, ocorre o fenômeno chamado *catch-up growth*, referente ao rápido ganho de peso nos dois primeiros anos de vida para tentar recuperar o nível de desenvolvimento em atraso (LAKSHMY, 2013). Entretanto, devido à elevada taxa de proliferação celular ocorrida tanto no tecido ósseo quanto nos órgãos vitais, o crescimento resultante desse evento

geralmente é maior do que o esperado para a idade (FINKIELSTAIN et al., 2013; MUÑOZ-VALVERDE et al., 2014). Mediado pelos eixos hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) materno e placentário, a consequência desse fenômeno é o aumento do risco de alterações metabólicas e obesidade (STOUT et al., 2015).

Por outro lado, a obesidade materna e o elevado peso ao nascer também parecem estar associados ao maior risco de doenças crônicas não-transmissíveis, sugerindo que além da restrição alimentar, a nutrição excessiva também pode programar o feto ao elevado risco de doenças metabólicas da idade adulta (ALFARADHI e OZANNE, 2011; CRUME et al., 2015; HARDER et al., 2007; MILOSEVIĆ et al., 2012; RØNN et al., 2014). Um estudo recente encontrou correlação positiva entre os níveis hormonais e de fatores de crescimento presentes no cordão umbilical e o tamanho e peso ao nascer (LAGIOU et al., 2014). De maneira semelhante, crianças expostas à nutrição excessiva no ambiente intrauterino apresentaram maiores níveis de insulina e leptina no cordão umbilical, ambas associadas ao maior peso ao nascer (KAAR et al., 2014). Em revisão, alguns autores sugerem a importância da elevada glicemia materna, com consequente hiperinsulinemia, no maior crescimento fetal (PALATIANOU et al., 2014).

De modo geral, a leptina participa fundamentalmente na organogênese fetal, principalmente no desenvolvimento cerebral (incluindo a região responsável pelo controle da fome/saciedade), cardiovascular, renal e pancreático, atravessando a placenta por meio de seus receptores (BRIFFA et al., 2015). Entretanto, elevados níveis maternos de leptina ao longo da gestação parecem estar diretamente relacionados à maior resistência à insulina no feto, indicando o possível papel desse hormônio na programação de alterações metabólicas (WALSH et al., 2014).

Fatores nutricionais associados à alimentação materna também parecem exercer importantes efeitos durante o desenvolvimento embrionário, modulando o funcionamento celular e determinando o perfil metabólico do indivíduo na fase adulta (RAMÍREZ-VÉLEZ, 2012). Em estudo experimental com roedores, foi mostrado o potencial do elevado consumo de sacarose durante a gestação e lactação em desencadear baixo peso ao nascer, com posterior *catch-up growth*, resultando em aumento do tecido adiposo e na glicemia de jejum, redução da sensibilidade à insulina, aumento da atividade de enzimas hepáticas envolvidas na lipogênese *de novo* e redução da atividade mitocondrial relacionada à oxidação lipídica (D'ALESSANDRO et al., 2014).

O leite também tem sido considerado um potente estimulador anabólico necessário para o crescimento pós-natal. Entretanto, por conter ácidos graxos de cadeia

ramificada essenciais e microRNAs capazes de promover o anabolismo pela ativação da quinase mTORC (alvo mecanístico do complexo rapamicina 1), seu consumo durante a gestação parece estar relacionado ao maior crescimento fetal, intensificando a ativação dessa via naturalmente controlada apenas pela placenta (MELNIK et al., 2015). Um estudo recente verificou elevado consumo protéico durante a gestação de mulheres canadenses, principalmente proveniente de produtos lácteos, embora tal evento tenha sido negativamente correlacionado com o peso ao nascer (STEPHENS et al., 2014).

A programação fetal, decorrente das experiências maternas, padrão alimentar e condições intrauterinas, é mediada principalmente por mecanismos epigenéticos (WANG et al., 2013). Os principais processos epigenéticos incluem metilação do DNA e modificações pós-traducionais de histonas, como metilação e acetilação (ESTELLER, 2007). A ligação covalente de grupamento metila ao DNA, promovendo o silenciamento gênico, ocorre normalmente em citosinas seguidas por guanina (dinucleotídeos CpG), e é mediada por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) (SHARMA et al., 2010). A repressão da expressão gênica também pode ser resultante da metilação de histonas, executada por histona metiltransferases, ou desacetilação dessas proteínas pela ação de histona desacetilases (HDAC). Já a acetilação de histonas, mediada pelas histona acetiltransferases (HAT) e desmetilação dessas proteínas pela ação de histona desmetilases, promove a descompactação da cromatina e favorece a expressão gênica (KOUZARIDES, 2007).

Durante a embriogênese, ocorrem diversos eventos regulados por meio de mecanismos epigenéticos, incluindo crescimento, proliferação e diferenciação celular, bem como a inativação do cromossomo X em fêmeas (BARAKAT e GRIBNAU, 2012; JONES e BAYLIN, 2007). Além disso, nesse período, o DNA embrionário sofre desmetilação global para eliminar as marcas epigenéticas provenientes dos gametas parentais e reativar sua capacidade pluripotente, embora os genes que sofrem *imprinting* permaneçam inalterados (SANTOS e DEAN, 2004). O processo de *imprinting* é caracterizado pelo silenciamento de um dos alelos, materno ou paterno, para garantir e controlar o crescimento e a nutrição fetal adequada (MOORE et al., 2015).

A desregulação desses processos durante a fase embrionária pode acarretar no aumento da suscetibilidade a diferentes doenças na fase adulta, inclusive câncer de mama (SOOKOIAN e PIROLA, 2013; NOVAKOVIC e SAFFERY, 2012; IVANOVA et al., 2012; FOWDEN et al., 2011). Vale ressaltar que fatores nutricionais são capazes de modular as características epigenéticas, tanto pelo fornecimento de grupamento

metila (colina, metionina e folato), como pela modulação da atividade de enzimas envolvidas nesse processo (compostos polifenólicos, selênio, retinóides e butirato) (ONG et al., 2011).

Desta forma, e considerando a importância dos eventos epigenéticos no período embrionário, Cooney *et al.* (2002) verificaram que a suplementação alimentar de folato durante a gestação de camundongos Agouti alterou o padrão de metilação do DNA da prole, resultando na mudança da cor da pelagem e no aumento do risco de obesidade. Além disso, Feng *et al.* (2013) observaram a ocorrência de defeitos cardíacos congênitos associada à alteração no padrão de metilação do DNA e na expressão de DNMTs na prole de ratas submetidas à deficiência de vitamina A durante a gestação.

PROGRAMAÇÃO FETAL DO CÂNCER DE MAMA

A hipótese de que o risco para o desenvolvimento de câncer de mama poderia ser programado ainda na vida intrauterina foi proposta por Trichopoulos (1990), baseada principalmente na exposição aos elevados níveis estrogênicos presentes durante a gestação e a importância desse hormônio para a carcinogênese mamária.

Estudos populacionais demonstraram correlação positiva entre peso ao nascer, indicador de grande exposição ao estrógeno no período intra-uterino, e risco de câncer de mama especialmente na fase pré-menopausa (AHLGREN et al., 2003; MICHELS et al., 1996; PARK et al., 2006; SANDERSON et al., 1996). Além disso, foi relatada em outros trabalhos a presença de elevados níveis de IGF-1, IGFBP-3, estriol e testosterona em sangue de cordão umbilical humano, o que poderiam estar associados ao maior risco de câncer de mama (BAIK et al., 2005; LAGIOU et al., 2011).

Entre 1947 e 1971 um hormônio sintético mais potente que o estrógeno, o dietilestilbestrol, foi amplamente receitado e utilizado por gestantes para evitar aborto espontâneo (REED e FENTON, 2013). Anos depois os estudos mostraram as consequências para os indivíduos expostos intrauterinamente ao hormônio. Entre as mulheres, maior predisposição ao desenvolvimento de neoplasias mamárias na vida adulta foi reportada (HOOVER et al., 2011; PALMER et al., 2006). Apesar do estrógeno não ser requerido para o desenvolvimento da glândula mamária no período fetal, o dietilestilbestrol parece alterar os fatores de sinalização necessários para esse processo, além de modificar a expressão de moléculas envolvidas nos mecanismos epigenéticos, como as DNA metiltransferases (DNMTs), histona metiltransferases e

microRNAs (HILAKIVI-CLARKE, 2014). Considerando que as células germinativas são formadas ainda na vida intrauterina, as consequências da exposição a esse hormônio podem atingir até a terceira geração (REED e FENTON, 2013).

De maneira semelhante, o consumo durante a gestação de fitoestrógenos como a genisteína, um flavonoide presente na soja, parece mimetizar os efeitos estrogênicos, reduzindo a diferenciação epitelial e aumentando o risco para o desenvolvimento de câncer de mama na prole feminina, apesar de não ter sido encontrada diferença na incidência de tumores mamários quimicamente induzidos (HILAKIVI-CLARKE et al., 2002; HILAKIVI-CLARKE et al., 1998). Por outro lado, a ingestão de proteína isolada de soja por ratas prenhas foi capaz de desencadear alterações metabólicas no tecido adiposo mamário das filhas, o que poderia estar relacionado à maior diferenciação epitelial da glândula mamária por sinalização parácrina (SU et al., 2009). Em humanos, correlação positiva foi encontrada entre o consumo de soja e a presença das isoflavonas genisteína e daidzeína no cordão umbilical de gestantes japonesas no momento do parto, indicando o potencial efeito direto desses compostos sobre o feto (NAGATA et al., 2006).

Nesse sentido, um estudo de coorte mostrou que o consumo alimentar poderia interferir diretamente na modulação dos níveis hormonais durante a gestação e, consequentemente, no risco de câncer de mama na geração posterior (LAGIOU et al., 2006). De fato, o consumo de óleo de peixe, rico em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) n-3, por ratas prenhas foi capaz de alterar os níveis séricos de estrógeno, impactando em redução do número de *terminal end buds* (TEBs) na glândula mamária e menor incidência de tumores mamários na prole (HILAKIVI-CLARKE et al., 2002). Por outro lado, o consumo de óleo de milho, rico em PUFAs n-6, pelas mães resultou em baixos níveis de estrógeno nas filhas, bem como hipometilação na região promotora do gene que codifica o receptor de estrógeno α (ER α), maior número de TEBs, maior incidência de tumores e início precoce da puberdade (HILAKIVI-CLARKE et al., 2002; HILAKIVI-CLARKE et al., 1997; YENBUTR et al., 1998).

Para além das consequências do consumo gestacional de dieta hiperlipídica rica em PUFAs n-6 já relatadas, foi demonstrado que o padrão de programação fetal do câncer de mama não apenas foi semelhante à exposição intrauterina a estrógeno sintético, como foi capaz de transmitir essa informação, por meio de alterações epigenéticas, até a segunda geração. Digno de nota é que tanto fêmeas como machos

expostos intrauterinamente à ração hiperlipídica transmitiram o aumento do risco de câncer de mama para suas filhas (de ASSIS et al., 2012).

De modo interessante, foi mostrado experimentalmente pelo nosso grupo de pesquisa, que o consumo de banha de porco, rica em gordura saturada, aumentou os níveis séricos de leptina sem alterar os níveis estrogênicos durante a gestação. Entretanto, diferente da expectativa dos autores, a exposição *in utero* a essa dieta resultou em redução do número de TEBs, menor proliferação celular e maior metilação global da histona H3K9me3 nos ductos e lóbulos da glândula mamária e menor incidência de tumores mamários quimicamente induzidos (de OLIVEIRA ANDRADE et al., 2014).

Considerando a transmissão transgeracional de informações epigenéticas capazes de modular o risco de enfermidades, já tem sido aventada a possibilidade da prevenção de doenças como câncer e diabetes, por meio do consumo de compostos bioativos durante a gestação e lactação. São classificados como compostos bioativos aqueles encontrados nos alimentos, essenciais ou não essenciais, que de alguma forma favoreçam a saúde (BIESALSKI et al., 2009). Assim, o consumo materno de alimentos ricos em folato (vegetais folhosos), quercetina (maçã), curcumina (curry), sulforafano (brócolis), catequinas (chá), carotenoides (cenoura, tomate), resveratrol (vinho), butirato (queijo) e indole-3-carbinol (crucíferas) durante o período embrionário e fetal poderia modular a capacidade antioxidante e reduzir o risco inclusive de câncer de mama na geração seguinte (HILL e HODSDON, 2014; KAUR et al., 2014; LI et al., 2014; VANHEES et al., 2014).

Nesse sentido, um estudo mostrou que o consumo de resveratrol por ratas apenas durante a gestação, foi capaz de reduzir o número de TEBs, diminuir a metilação na região promotora do gene BRCA1 e atenuar a expressão de genes envolvidos na progressão do ciclo celular na glândula mamária de filhas expostas intrauterinamente ao 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (PAPOUTSIS et al., 2013). Redução nos indicadores de risco para câncer de mama também foi observada na prole de ratas saudáveis submetidas ao consumo de mirtilo (5% adicionado à ração), que contém elevado teor de antocianinas, durante a gestação e lactação (WU et al., 2009).

Similarmente, o consumo de ração acrescida de 3% de mirtilo por camundongos saudáveis tanto na gestação quanto na lactação, resultou na diminuição de neoplasias mamárias decorrentes da superexpressão do oncogene Wnt-1 nas descendentes. Dentre os resultados, destacou-se a redução no peso e volume dos tumores, aumento da

expressão de genes supressores tumorais e redução na expressão de genes anti-apoptóticos, proliferativos e relacionados à angiogênese. Modulações epigenéticas também foram observadas, incluindo o aumento nos níveis transcricionais de *Dnmt1* e *Ezh2*, envolvidos na metilação do DNA e histonas, respectivamente (RAHAL et al., 2013).

PROGRAMAÇÃO PATERNA

Apesar dos inúmeros trabalhos avaliando o impacto das experiências maternas sobre a programação de doenças na geração seguinte, observa-se na literatura acúmulo de evidências ressaltando também a importância das vivências paternas nesse contexto. Os relatos de que o ambiente intrauterino proporcionaria alterações passíveis de transmissão até a terceira geração, não apenas pelas fêmeas como também pelos machos, indicam a suscetibilidade das células germinativas primordiais a possível programação frente aos insultos ocorridos durante o desenvolvimento, bem como a herdabilidade das experiências paternas acumuladas desde o período fetal (AIKEN e OZANNE, 2014).

É descrito que o ambiente paterno, incluindo composição corporal, idade, hábitos alimentares e estilo de vida, pode influenciar no desenvolvimento de doenças na geração seguinte quando na idade adulta (HOCHER et al., 2014). De fato, embora os mecanismos tenham sido pouco explorados, estudos experimentais em ratos mostraram que o consumo de bebida alcoólica pelos pais esteve relacionado ao menor peso ao nascer, atraso no desenvolvimento e alterações comportamentais nos descendentes (LEDIG et al., 1998; WOZNIAK et al., 1991). Além disso, outro estudo observou que o tabagismo paterno levou à diminuição do sistema de reparo oxidativo e aumento na suscetibilidade a danos no DNA da prole (VANDE LOOCK et al., 2012).

Estudos populacionais também mostraram que a idade dos pais parece ser fundamental para o desenvolvimento de desordens psiquiátricas nos descendentes, como autismo, esquizofrenia, distúrbio obsessivo compulsivo e bipolaridade (BUIZER-VOSKAMP et al., 2011; MENEZES et al., 2010; PULEO et al., 2012; REICHENBERG et al., 2006; WU et al., 2012). Tal evento pode estar associado à redução na qualidade espermática observada com o avanço da idade (ESKENAZI et al., 2003).

O perfil do consumo alimentar tem sido destacado como um dos fatores de herança não genética das experiências paternas e está relacionado ao desenvolvimento

de diversas doenças na geração posterior (FERGUSON-SMITH e PATTI, 2011). Estudos populacionais demonstraram que o sobrepeso e a obesidade paterna estão diretamente associados ao crescimento intrauterino e ao estado nutricional de seus filhos, favorecendo a ocorrência de alterações metabólicas e desenvolvimento de doenças crônicas na idade adulta (CHEN et al., 2012; COOPER et al., 2010; OHLUND et al., 2010). Mais recentemente, um estudo com humanos observou alteração no padrão de metilação de genes que normalmente sofrem *imprinting* em leucócitos extraídos do cordão umbilical de recém-nascidos cujos pais eram obesos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (SOUBRY et al., 2013).

Experimentalmente, foi verificado que o consumo de dieta rica em lipídeos pelos pais proporcionou prejuízos na secreção de insulina e intolerância à glicose por meio da alteração no padrão de expressão gênica das células β -pancreáticas na prole feminina (NG et al., 2010). Além disso, alteração na expressão de genes envolvidos na sensibilidade à presença de nutrientes, resposta celular e mitocondrial ao estresse, sinalização da telomerase, sobrevivência e morte celular, controle do ciclo celular, regulação do crescimento e proliferação celular e na etiologia do câncer foi encontrada no tecido adiposo retroperitoneal das filhas cujos machos foram submetidos ao consumo de dieta hiperlipídica (NG et al., 2014). Além desse mesmo padrão dietético ser capaz, ainda, de reduzir a capacidade reprodutiva da progênie (FULLSTON et al., 2012), pais diabéticos podem predispor seus filhos à mesma condição (GRASEMANN et al., 2012).

De maneira semelhante, a restrição alimentar paterna avaliada experimentalmente também foi capaz de desencadear alterações no metabolismo da prole, favorecendo a adiposidade e alterando os níveis séricos de glicose (ANDERSON et al., 2006; MIERSCH e DÖRING, 2012). Recentemente, um estudo mostrou que a deficiência protéica em camundongos machos antes do acasalamento resultou em disfunção vascular, diminuição no tamanho do coração, intolerância à glicose, maior adiposidade e menor expressão de genes envolvidos da sinalização do cálcio, fundamental para a contração muscular, na geração seguinte (WATKINS e SINCLAIR, 2014).

A programação ambiental transgeracional paternamente induzida parece estar relacionada a alterações moleculares nas células da linhagem germinativa durante o processo espermatogênico (HOCHER et al., 2014; SKINNER, 2010). A diferenciação das espermátides, chamada espermição, compreende diversas alterações epigenéticas, incluindo protaminação, metilação do DNA, modificação de histonas e presença de

RNAs não codificantes, todos esses eventos possivelmente importantes durante o desenvolvimento embrionário e na herdabilidade das marcas adquiridas (CARRELL, 2012).

Nesse sentido, já foi relatado que a restrição energético-protéica em camundongos machos resultou em redução nos níveis de RNA não codificantes e de histona H3K27me3 nos espermatozoides, estando diretamente relacionado à alteração no metabolismo lipídico e no padrão de metilação global do DNA observados na prole (CARONE et al., 2010). Além disso, a deficiência de folato nos pais está relacionada à redução da placenta e alteração na quantidade e no transporte desse nutriente, além de comprometer a metilação e expressão de IGF-2 no tecido cerebral dos fetos (KIM et al., 2011; KIM et al., 2013).

Fatores nutricionais estão diretamente relacionados à qualidade espermática. Estudo recente demonstrou que homens dinamarqueses com elevada ingestão de gordura saturada apresentaram redução na concentração e na contagem espermática (JENSEN et al., 2013). É de amplo conhecimento que o consumo excessivo de lipídeos reduz a motilidade espermática, aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio, favorece a ocorrência de lesões no DNA espermático e reduz a capacidade de fertilização dos espermatozoides (BAKOS et al., 2010). Enquanto o consumo de carnes processadas e doces foi correlacionado com maior risco de astenozoospermia (redução na motilidade espermática), a ingestão de vegetais verde-escuros, leite desnatado, aves e frutos do mar conferiram proteção contra essa alteração (ESLAMIAN et al., 2012).

Os espermatozoides são células altamente vulneráveis a reações oxidativas por serem ricos em ácidos graxos poliinsaturados e apresentarem baixa capacidade antioxidante, o que favorece a fragmentação de DNA e danos associados à peroxidação da mitocôndria e membrana plasmática, resultando em decréscimo da motilidade e viabilidade desses gametas (BOLAYIRLI et al., 2007; SARADHA e MATHUR, 2006; VERNET et al., 2004). Lesões oxidativas são capazes de modular o sistema epigenético por meio de alterações no padrão de metilação do DNA, favorecendo a herdabilidade dessas características (ZEH et al., 2012; FENECH, 2008).

Já foi relatado que a qualidade espermática está diretamente relacionada à viabilidade dos embriões e a alterações na prole, como baixo peso ao nascer seguido de *catch-up growth*, intolerância à glicose, baixa sensibilidade à insulina, aumento da adiposidade, alterações pancreáticas e subfertilidade (MCPHERSON et al., 2014). Nesse sentido, um estudo mostrou que espermatozoides expostos a danos oxidativos

levaram ao atraso da embriogênese e redução na taxa de implantação dos embriões, bem como desencadeou baixo peso ao nascer, intolerância à glicose e maior adiposidade na prole (LANE et al., 2014).

Diversas substâncias provenientes da dieta, tais como astaxantina, β -caroteno, vitamina E, vitamina C, ácidos graxos essenciais, zinco, selênio e licopeno, são capazes de modular o sistema antioxidante, reduzindo a ocorrência de danos ao DNA espermático e melhorando a qualidade do sêmen (TREMELLEN, 2008). Diferentes polifenóis, como o resveratrol, também apresentam propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, contribuindo para a homeostase do sistema endócrino, aumento da produção espermática e preservação dos túbulos seminíferos (JIANG et al., 2008; JUAN et al., 2005). Além disso, há relato da modulação do sistema antioxidante e endócrino de animais expostos ao cádmio pelo consumo de concentrado de suco de uva, que contém antocianinas, quercetina e resveratrol, prevenindo alteração nos órgãos reprodutivos, melhorando a qualidade espermática e reduzindo alterações histopatológicas testiculares de maneira dose-dependente (PIRES et al., 2013).

PROGRAMAÇÃO PATERNA DO CÂNCER DE MAMA

Embora haja fortes evidências da contribuição paterna para o risco de doenças crônicas não-transmissíveis nos descendentes, pouco tem sido estudado especificamente sobre o câncer de mama. Nessa vertente, correlação positiva entre o nível de escolaridade dos pais e risco de câncer de mama foi relatada em um estudo que avaliou 2900 mulheres, o que pode estar relacionado ao estilo de vida e ao consumo alimentar das diferentes gerações (TITUS-ERNSTOFF et al., 2002).

Por outro lado, dois estudos mostraram relação direta entre o risco para o desenvolvimento de neoplasias mamárias e idade paterna (HODGSON et al., 2004; XUE et al., 2007). O processo do envelhecimento impacta diretamente sobre a qualidade dos gametas masculinos, seja por acúmulo de danos no DNA das chamadas espermatogônias tronco, responsáveis pela manutenção da produção de espermatozoides; por alterações nas células de Sertoli, envolvidas no suporte físico e nutricional às células da linhagem germinativa; ou por danos oxidativos decorrentes da redução do sistema antioxidante, levando a alterações no conteúdo genético dos espermatozoides e aumentando o risco de doenças nas gerações seguintes (PAUL e ROBAIRE, 2013).

AMORA-PRETA

A amora-preta (*Rubus* spp.) é uma fruta com elevado teor de polifenóis, ou seja, moléculas que possuem vários anéis de fenóis, tendo como base pelo menos um anel aromático em sua estrutura ligado a um ou mais grupamentos hidroxila (-OH) (WATERHOUSE, 2002). Dentre os flavonoides, a amora-preta contém principalmente antocianinas e, dos não-flavonoides, principalmente elagitaninos, embora outros compostos como epicatequina, quercetina, kaempferol também possam ser encontrados (AROZARENA et al., 2012; CUEVAS-RODRIGUEZ et al., 2010; HASSIMOTTO et al., 2008).

O significado da palavra antocianina origina-se do grego *anthos* = flor e *kianos* = azul, tratando-se, portanto, de uma pigmentação presente em plantas, responsável pelas cores rosa, vermelho, violeta e azul de flores e frutos (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). Essas moléculas se originam a partir da incorporação de um glicosídeo ou de grupamentos acetil, cumaril e cafeoil à molécula de antocianidina, conferindo maior estabilidade (Figura 1) (WATERHOUSE, 2002).

Figura 1. Estrutura química das antocianidinas (Adaptado de Waterhouse, 2002).

Como os flavonoides de maneira geral, as antocianinas são absorvidas majoritariamente no intestino grosso após ação da microflora intestinal, que conjuga moléculas agliconas e forma ácidos fenólicos e hidroxicinamatos (CROZIER et al., 2009). No organismo, as antocianinas exercem função antioxidante pela capacidade de doar elétron ou átomo de hidrogênio a radicais livres reativos. Os grupamentos 1,2 dihidroxila (ou grupo catecol) e 1,4 hidroquinona (1,4 hidroxibenzeno) são facilmente oxidados pelo fato do radical fenoxil poder ser estabilizado com oxigênio e, por isso, tem efeito duradouro, sendo o número de grupos hidroxilas determinante na capacidade

antioxidante dos flavonoides (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; RODRIGO et al., 2011).

Os elagitaninos pertencem à classe dos taninos hidrolisáveis, compostos por cadeias de ácido elágico esterificados ligadas a açúcares (Figura 2) (WATERHOUSE, 2002). Depois de ingerido, os elagitaninos sofrem hidrólise no estômago, liberando ácido elágico, que por sua vez é convertido em intermediários metabolizáveis pela microbiota colônica, formando urolitinas, as quais são finalmente absorvidas para a circulação êntero-hepática (LIPÍNSKA et al., 2014).

Figura 2. Estrutura química do ácido elágico (LIPÍNSKA et al., 2014).

Por ser uma das frutas com maior conteúdo antioxidante (WANG e LIN, 2000), a amora-preta é capaz de modular a atividade de enzimas como a superóxido dismutase e glutathione peroxidase, e diminuir a peroxidação lipídica (CHO et al., 2011; HASSIMOTTO e LAJOLO, 2011; MURAPA et al., 2012). Além disso, o consumo do extrato de amora-preta já demonstrou ser capaz de reduzir o risco de doenças cardiovasculares por diminuir os níveis séricos de triglicerídeos e fração LDL-colesterol, bem como prevenir a peroxidação lipídica, aterogênese e agregação plaquetária (FERREIRA DE ARAÚJO et al., 2011; KAUME et al., 2012).

As propriedades anticarcinogênicas da amora-preta também já foram descritas. *In vitro*, extrato de amora-preta foi capaz de inibir a proliferação celular e estimular a apoptose em diferentes tipos de células cancerígenas humanas de maneira dose-dependente, além de reduzir a expressão de COX-2 induzida por TNF (BOIVIN et al., 2007; DAI et al., 2007; SEERAM et al., 2006). *In vivo*, o consumo da fruta foi capaz de suprimir moderadamente a genotoxicidade quimicamente induzida em hamsters (PLATT et al., 2010).

Os compostos bioativos de maneira isolada também demonstraram potencial anticarcinogênico, reduzindo a transativação de NF-κB e AP-1 e expressão de COX-2 e TNF-α, embora sejam menos eficazes na supressão do crescimento celular, indução de

apoptose e prevenção de invasão e migração do que de forma conjunta, como encontrado na fruta (DING et al., 2006; KAUSAR et al., 2012). De maneira geral, polifenólicos provenientes de *berries* têm sido apontados como classe promissora de compostos bioativos para a prevenção do câncer de mama (AIYER et al., 2012).

É importante ressaltar que os polifenóis são capazes de modular processos de metilação do DNA e modificação de histonas (ONG et al., 2011). Alguns polifenóis podem atuar como inibidores de DNA metiltransferases (DNMT) e histona desacetilases (HDAC), aumentando histonas acetiladas H3 e H4 e reativando genes silenciados como os de proteínas supressoras de tumor (HO et al., 2011; PALUSZCZAK et al., 2010; RAJENDRAN et al., 2011). Além disso, esses compostos podem inibir a enzima histona acetiltransferase (HAT) e reduzir a expressão de genes como NF- κ B e IL-6, envolvidos em processos inflamatórios e carcinogênicos (RAJENDRAN et al., 2011).

3. OBJETIVOS

Objetivos gerais

Os objetivos do presente trabalho são avaliar os efeitos do consumo de extrato de amora-preta por camundongos fêmeas durante a gestação e/ou camundongos machos a partir do desmame, na suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária quimicamente induzida, bem como possíveis mecanismos celulares e moleculares envolvidos.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente estudo são:

I. Caracterizar os efeitos do consumo de extrato de amora-preta por camundongos machos, da pré-puberdade até a idade adulta, sobre parâmetros reprodutivos e capacidade antioxidante.

II. Caracterizar os efeitos do consumo de extrato de amora-preta por camundongos fêmeas, durante a gestação e lactação, sobre a capacidade antioxidante.

III. Avaliar o risco para o desenvolvimento de câncer de mama, bem como a capacidade antioxidante da prole feminina no início da puberdade (50 dias de vida), após o consumo materno e/ou paterno de extrato de amora-preta.

IV. Avaliar o desenvolvimento de tumores mamários na prole feminina submetida à indução química da carcinogênese mamária por DMBA (7,12-

dimetilbenz[a]antraceno), após o consumo materno e/ou paterno de extrato de amora-preta.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6, 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 e contendo maravalha previamente esterilizada, a qual foi trocada rotineiramente duas vezes por semana. Foram utilizados pedaços de algodão e caninhos de papelão para camundongos como enriquecimento ambiental. A pesagem dos animais e o registro do consumo de ração e água ou extrato de amora foram realizados em dias alternados. O ensaio biológico foi realizado nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, em ambiente com temperatura e umidade ambiental controladas, sob ciclo de 12 horas claro-escuro. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo sob protocolo nº 411 (Anexo).

4.2. EXTRATO DE AMORA-PRETA

4.2.1. Caracterização química do fruto de amora-preta e de seus extratos

A amora-preta (*Rubus* spp.) foi adquirida junto ao produtor e fornecedor Sítio do Belo (São Paulo - SP), acondicionada em saco plástico de 1 kg e mantida a -20 °C até o uso. Para a caracterização do conteúdo fenólico e capacidade antioxidante, bem como a quantificação de compostos fenólicos do fruto, uma pequena amostra (100g) foi triturada em nitrogênio líquido e armazenada em ultrafreezer (-80°C) até a realização dos ensaios. As mesmas análises foram realizadas para todos os extratos administrados aos animais.

4.2.1.1. Conteúdo de fenólicos totais e capacidade antioxidante

Para análise do conteúdo de fenólicos totais e capacidade antioxidante, a amostra de amora-pretatriturada em nitrogênio anteriormente foi extraída, em triplicata, com metanol 70% acidificado com 0.2% de ácido acético em homogeneizador do tipo Turrax

(Brinkmann Homogenizer, Suíça), com posterior agitação durante 30 min a 4 °C e filtração em papel filtro.

Quantificação de fenólicos totais

Os compostos fenólicos foram quantificados pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SWAIN e HILLIS, 1959) (APÊNDICE A). A análise foi realizada em triplicata e a leitura feita em espectrofotômetro (Hewlett Packard, 8453) a 765 nm. Os resultados foram expressos em mg GAE equivalente/100g ou 100mL.

Capacidade antioxidante pelo método DPPH

Foi utilizado o método DPPH para avaliação da capacidade antioxidante, conforme descrito por Brand-Williams et al. (1995). A análise foi realizada em triplicata e a leitura feita em leitor de microplaca (Benchmark Plus, Microplate Spectrophotometer, Japan) a 517 nm (APÊNDICE B). Os resultados foram expressos como μmol Trolox equivalente/100g ou 100mL.

Capacidade antioxidante pelo método ORAC

Foi utilizado o método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) para avaliar a capacidade antioxidante, conforme proposto por Prior et al. (2003). A análise foi realizada em triplicata em leitor de microplaca (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc., EUA) e o decaimento da fluorescência foi monitorado em intervalos de 1 min durante 60 min em comprimento de excitação de 493 nm e emissão em 515 nm (APÊNDICE C). A capacidade antioxidante foi calculada a partir da área sob a curva (AUC), através da curva de calibração do Trolox, e os resultados foram expressos em μmol Trolox equivalente/100g ou 100 mL.

4.2.1.2. Quantificação de flavonoides

A extração de flavonoides do fruto foi realizada em metanol 70% acidificado em 0.2% de ácido acético, com posterior eluição em coluna de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), seguindo o método descrito por Arabbi et al. (2004). A quantificação e identificação de flavonoides foram realizadas, em duplicata, por CLAE/DAD (sistema Agilent 1260, com injetor automático e bomba quaternária, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), utilizando-se coluna Prodigy 5 μ ODS3 (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido), com fluxo de 1 mL/min, a 25 °C, monitorando os comprimentos de onda

de 270 nm e 525 nm (HASSIMOTTO et al., 2007). Os padrões cianidina-3-glucosídeo (Extrasynthese, Genay, France), quercetina e ácido elágico (Sigma-Aldrich) foram utilizados para identificação dos compostos, através da similaridade do espectro de absorção e tempo de retenção. O protocolo utilizado está apresentado detalhadamente no APÊNDICE D.

4.2.1.3. Quantificação de elagitaninos (ácido elágico total)

A extração de elagitaninos foi realizada em triplicata, utilizando-se solução de acetona 80%, de acordo com o proposto por Pinto et al.(2008), descrito no APÊNDICE E. A quantificação de ácido elágico (AE) total foi feita em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por CLAE/DAD (sistema Agilent 1260, com injetor automático e bomba quaternária, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), utilizando-se coluna Prodigy 5 μ ODS3 (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido). Os resultados foram expressos em mg AE/100g ou 100mL.

4.2.2. Tipo de extração da amora-preta utilizada no experimento

4.2.2.1. Extração aquosa de amora-preta

Amostras de amora-preta congeladas foram trituradas em água milliQ na concentração de 1:4 em liquidificador na velocidade máxima e, em seguida, centrifugadas a 5000 rpm durante 30 minutos a 4°C. O extrato obtido foi liofilizado e armazenado a -80°C para posterior caracterização e quantificação de compostos fenólicos, seguindo o protocolo descrito anteriormente no tópico 3.2.1.

4.2.2.2. Extração alcóolica de amora-preta

Amostra de amora preta congelada foi triturada em metanol 70% com 0.2% de ácido acético na concentração de 1:5 em liquidificador na velocidade máxima e, em seguida, filtrada em papel filtro qualitativo. O extrato obtido foi evaporado em rotaevaporador a 40°C e posteriormente ressuspendido em água milliQ. O extrato em fase aquosa foi armazenado a -80°C para caracterização e quantificação de compostos fenólicos, seguindo o protocolo descrito anteriormente no tópico 3.2.1.

4.2.2.3. Escolha do tipo de extrato de amora-preta

Após a análise qualitativa e quantitativa do conteúdo fenólico dos extratos aquoso e alcoólico, optou-se por utilizar no presente estudo o extrato alcoólico de amora

preta em fase aquosa, devido ao maior conteúdo de polifenóis obtido em relação ao extrato aquoso e maior semelhança com o perfil observado no fruto (Tabela 1).

4.2.3. Teste de estabilidade do extrato alcoólico de amora-preta em fase aquosa

Para estabelecer o tempo de exposição do extrato de amora-preta a temperatura ambiente durante o consumo pelos animais, bem como as condições de armazenamento até sua administração, foi realizada a quantificação de flavonoides e ácido elágico total (descritos anteriormente) após 1 e 2 dias de exposição do extrato alcoólico de amora-preta em fase aquosa a temperatura ambiente, e após 7 dias de armazenamento a -80°C.

4.2.4. Quantificação de açúcares solúveis do extrato alcoólico de amora-preta em fase aquosa

Os açúcares solúveis foram identificados e quantificados por CLAE com detecção por amperometria de pulso em um sistema de cromatografia (Dionex DX-500, USA), equipado com coluna Carbpac PA1 (4 mm x 250 mm, Dionex, Sunnyvale, USA), em corrida isocrática com fluxo de 1mL/min de hidróxido de sódio 18mM durante 25 min (SARAIVA et al., 2013).

4.2.5. Preparação e administração do extrato alcoólico de amora preta em fase aquosa aos animais

A preparação do extrato de amora preta foi realizada por meio da trituração da fruta em metanol 70% com 0.2% de ácido acético, na concentração de 1:5, em liquidificador na velocidade máxima durante 1 minuto, com posterior filtração em papel filtro qualitativo. O extrato obtido foi totalmente evaporado em rotaevaporador a 40°C, ressuspendido em água milliQ e separado em alíquotas para armazenamento a -80°C.

Em dias alternados, as alíquotas foram descongeladas e diluídas em água autoclavada em proporção que resultasse na concentração de fenólicos totais de 0.8mg/mL. Essa concentração foi baseada em estudo prévio em que o consumo diário de aproximadamente 4 mg de antocianinas do mirtilo por camundongos fêmeas prenhas resultou em redução do desenvolvimento de neoplasias mamárias na prole feminina (RAHAL et al., 2012).

O extrato de amora preta foi preparado semanalmente para garantir o conteúdo fenólico ofertado aos animais a cada dia. Para controle preciso da quantidade de

compostos fenólicos oferecidos, uma alíquota foi retirada de cada extrato para análise do conteúdo fenólico e capacidade antioxidante.

4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1. Tratamentos com extrato de amora preta

Camundongos machos receberam extrato de amora-preta *ad libitum* em substituição à água de beber logo após o desmame (21 dias de vida) durante 8 semanas, tempo necessário para garantir que os animais alcançaram a idade reprodutiva (8-10 semanas). Camundongos fêmeas foram tratadas com extrato de amora-preta *ad libitum* em substituição à água de beber durante a gestação e lactação (6 semanas). Os animais controle receberam solução de açúcar invertido a 3.4% *ad libitum* para adequação energética e nutricional em relação ao extrato de amora (Tabela 2). Durante o período de tratamento, todos os animais receberam ração AIN-93G (REEVES et al., 1993) para evitar possíveis efeitos sinérgicos dos compostos presentes no extrato de amora-preta com as isoflavonas presentes em rações comerciais padrões. O consumo de ração (g) e de líquido (mL) foi monitorado em dias intercalados para cálculo da estimativa do consumo diário individual através da fórmula:

$$\text{Estimativa de consumo diário individual} = \frac{(\text{Oferta} - \text{sobra}) \times \text{dias}}{\text{Número de animais}}$$

4.3.2. Acasalamento

Após o período de tratamento, os machos com 11 semanas de idade foram acasalados com fêmeas da mesma idade na proporção de 1 macho para 2 fêmeas por gaiola. Para obter maior êxito na taxa de prenhez, foi realizada a indução do ciclo estro nas fêmeas. Para tanto, antes do acasalamento propriamente dito, os machos foram mantidos em gaiolas individuais durante 3 dias. Em seguida, cada dupla de fêmeas foi colocada na gaiola referente ao seu macho para reconhecimento dos ferômonios e mantidas durante 3 dias. No 4º dia, as fêmeas foram colocadas na caixa dos machos e permaneceram juntos durante 7 dias, considerando que o ciclo estral completo dos camundongos dura 5 dias. Uma semana antes do acasalamento, foi iniciado o tratamento das fêmeas com o extrato de amora preta e, durante o acasalamento, essa condição se manteve independente do tratamento dos machos. Ao final do período de acasalamento,

os machos foram eutanasiados e as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais para os períodos de gestação e lactação.

Para o preparo e aprendizado das técnicas empregadas durante o acasalamento e os cuidados necessários durante a gestação e lactação, bem como no desenvolvimento da prole, foi realizado treinamento com a equipe de produção de animais de experimentação nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, duas vezes por semana durante dois meses.

4.3.3. Prole

Após o nascimento, toda a prole foi mantida com a mãe em gaiolas individuais (1 gaiola para cada ninhada) até os 21 dias de idade. Após o desmame, as mães (fêmeas F0) foram eutanasiadas e as filhas (fêmeas F1) mantidas em gaiolas com no máximo 5 camundongos/gaiola, com acesso à ração comercial padrão (Nuvital, PR) e água *ad libitum*. Parte das fêmeas F1 foram eutanasiadas com 7 semanas de idade (50 dias) para realização de análise morfológica, de proliferação celular e molecular das glândulas mamárias. A prole feminina remanescente (n=15 filhas/grupo) foi submetida ao modelo de carcinogênese mamária quimicamente induzida. Para tanto, foi administrada uma única injeção subcutânea de acetato de medroxiprogesterona (MPA) (15mg/100µL) na 6ª semana de vida e 4 posteriores doses semanais de 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) (1mg/100µL) diluído em óleo de milho, administrado por gavagem, conforme realizado por de Assis et al. (2011). Após 3 semanas da última dose de DMBA, os animais foram pesados e apalpados 2 vezes por semana para acompanhamento da evolução dos tumores. Os animais foram acompanhados até 20 semanas após a primeira dose de DMBA e eutanasiados 3 semanas após o aparecimento do primeiro tumor palpável.

4.3.4. Grupos experimentais

Os camundongos machos (n=12/grupo) e fêmeas (n=24/grupo) foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, conforme descrito abaixo. O delineamento experimental completo está apresentado de forma esquemática na Figura 3.

a) Grupo CTRL (controle): fêmeas controle acasaladas com machos controle

b) Grupo PA (Pai amora): fêmeas controle acasaladas com machos tratados com extrato de amora-preta.

c) Grupo MA (Mãe amora): fêmeas tratadas com extrato de amora-preta acasaladas com machos controle.

d) Grupo PMA (Pai e mãe amora): fêmeas tratadas com extrato de amora-preta acasaladas com machos tratados com o mesmo extrato.

Figura 3. Apresentação esquemática do delineamento experimental

4.3.5. Eutanásia

Todos os animais foram eutanasiados por overdose do anestésico inalatório isoflurano. Imediatamente após a anestesia, foi realizada punção cardíaca para coleta de sangue. Dos pais (machos F0), foram coletados testículos, epidídimos, próstata, vesícula seminal, fígado, rins, coração e pulmão. Das mães (fêmeas F0), foram coletados útero, ovários, glândula mamária inguinal direita e esquerda, fígado, rins, coração e pulmão. Das filhas (fêmeas F1) eutanasiadas com 7 semanas, foram coletados útero, ovários, glândula mamária inguinal direita e esquerda, glândula mamária torácica direita e esquerda, fígado, rins, coração e pulmão. Já das filhas submetidas à indução da carcinogênese mamária, além dos órgãos listados anteriormente, também foram coletados os tumores. Todos os órgãos foram pesados a fresco e o valor obtido foi utilizado para calcular o peso relativo (SELLERS et al., 2007). O sangue foi centrifugado à 3500rpm por 15 minutos a 4°C, e o plasma obtido foi coletado e armazenado -80°C.

Os tecidos destinados à análise histopatológica foram fixados em solução formalina 10% tamponada, exceto testículo, próstata e vesícula seminal, os quais foram fixados em methacarn (60% metanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético). As glândulas mamárias das filhas destinadas à análise morfológica foram colocadas em lâmina imediatamente após a coleta e fixadas em carnoy (60% etanol, 30% clorofórmio e 10% ácido acético). Os demais tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e posteriormente mantidos à -80°C.

4.4. PARÂMETROS REPRODUTIVOS DOS MACHOS F0 (PAIS)

4.4.1. Estimativa da produção diária de espermatozoides (PDE)

A determinação da produção diária de espermatozoides foi realizada com o testículo direito, mantido à -20°C até o processamento. Após a homogeneização do tecido em solução STM (NaCl 0,9% e Triton X-100 0,05%), foi realizada a contagem de espermátides nos estágios 14 a 16 da espermatogênese em câmara hemocitométrica, seguindo o protocolo de Thayer et al. (2001).

4.4.2. Avaliação da morfologia espermática

Para avaliar o percentual de espermatozoides morfolologicamente normais foram utilizados espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo, conforme proposto por Seed et al. (1996). Para tanto, a cauda do epidídimo ainda fresco foi submetida à incisão e posteriormente imersa em solução tampão PBS (tampão fosfato salina) para promover a difusão dos gametas ao meio aquoso. Em seguida, a solução obtida foi colocada em lâminas histológicas para análise em microscópio de luz. Foram avaliados 200 espermatozoides em aumento de 400x (FAVARETO et al., 2011), classificados em normal ou anormal (SEED et al., 1996).

4.4.3. Análise histomorfométrica testicular

A análise histomorfométrica testicular consistiu na avaliação da porcentagem de área intersticial e tubular do testículo, determinada pela medida da área ocupada por túbulos seminíferos e interstício em 15 imagens por animal selecionadas aleatoriamente (PREDES et al., 2010). O diâmetro tubular também foi analisado em 30 túbulos

redondos por animal selecionados aleatoriamente (PREDES et al., 2010). Essas análises foram realizadas utilizando o software AxioVision 4.8 associado ao microscópio de luz em aumento de 200x.

4.5. NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TESTOSTERONA DOS MACHOS F0 (PAIS)

Os níveis plasmáticos de testosterona dos machos F0 (pais) foram determinados, em duplicata, por quimiluminescência utilizando o equipamento automatizado UniCel dxI 800 (Beckman Coulter®). A sensibilidade do equipamento para essa análise foi de 10 ng/dL.

4.6. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE INTRAPERITONEAL (TTGI)

Parte de todos os animais, incluindo pais (machos F0), mães (fêmeas F0) e filhas (fêmeas F1), foram submetidos ao teste de tolerância à glicose intraperitoneal. Para tanto, os animais foram privados de ração *overnight*, até a realização do experimento na manhã do dia seguinte. Após a análise da glicemia de jejum em glicosímetro (AccuCheck Performa Nano), os animais foram submetidos à injeção intraperitoneal de solução de dextrose (2g/kg peso corporal), avaliando-se a glicemia por punção caudal nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção.

4.7. MARCADORES ANTIOXIDANTES

4.7.1. Atividade de enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) foram avaliadas no tecido hepático das mães (fêmeas F0) e das filhas (fêmeas F1) não submetidas à indução da carcinogênese mamária, e no tecido testicular dos pais (machos F0).

4.7.1.1. Extração

Os tecidos hepáticos e testiculares foram extraídos com tampão fosfato de potássio 0.1 M pH 7.0 com o auxílio de homogeneizador do tipo Potter. Em seguida, o homogenato obtido foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 min a 4°C, descartando-se o

sobrenadante. O material remanescente foi utilizado para análise da atividade da SOD, CAT e GPx.

4.7.1.2. *Superóxido dismutase (SOD)*

A determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase foi realizada em espectrofotômetro (Hewlett Packard, 8453) a 550nm, 25°C por 3 minutos, seguindo o proposto por Ewing e Janero (1995). O protocolo utilizado está detalhado no APÊNDICE F. Todas as análises foram realizadas em triplicata e o resultado foi expresso como UA/min/g proteína.

4.7.1.3. *Catalase (CAT)*

A atividade enzimática da catalase foi determinada cineticamente em espectrofotômetro (Hewlett Packard, 8453) a 240nm, 37°C por 3 minutos, baseado no método descrito por Adamo et al. (1989). O protocolo utilizado está detalhado no APÊNDICE G. Todas as análises foram realizadas em quintuplicata e o resultado foi expresso como UA/min/g proteína.

4.7.1.4. *Glutathione peroxidase (GPx)*

A determinação da atividade glutathione peroxidase (GPx) foi realizada em espectrofotômetro (Hewlett Packard, 8453) a 340 nm, 37°C por 3 minutos, seguindo o proposto por Wendel (1981). O protocolo utilizado está detalhado no APÊNDICE H. Todas as análises foram realizadas em triplicata e o resultado foi expresso como UA/min/g proteína.

4.7.1.5. *Quantificação de proteína*

Para a normalização da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, o conteúdo de proteínas totais foi dosado, em quintuplicata, a partir de uma alíquota adquirida dos respectivos homogenatos pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

4.7.2. Avaliação da capacidade antioxidante plasmática

Foi realizada a análise da capacidade antioxidante plasmática dos pais (machos F0), mães (fêmeas F1) e filhas (fêmeas F1) não submetidas à indução da carcinogênese

mamária, utilizando o método ORAC descrito anteriormente (tópico 3.2.2.1.) e detalhados no APÊNDICE C.

4.8. RISCO PARA DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE MAMA

Para a avaliação do risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias na prole feminina, parte das fêmeas F1 (filhas) foi eutanasiada aos 50 dias de vida, tempo correspondente ao período de desenvolvimento pós-púbere. Nesse momento, a mama inguinal esquerda foi integralmente retirada; colocada em lâmina histológica; fixada em solução Carnoy (60% etanol, 30% clorofórmio, 10% ácido acético) e posteriormente corada em carmine, seguindo o protocolo proposto por de Assis *et al.* (2010).

Os parâmetros avaliados para a inferência de suscetibilidade ao desenvolvimento de neoplasias mamárias foram: desenvolvimento epitelial, potencial para transformação maligna e grau de diferenciação da glândula mamária (de ASSIS *et al.*, 2010).

4.8.1. Desenvolvimento epitelial

Para a análise do desenvolvimento epitelial foram mensuradas as distâncias entre o linfonodo e o final da árvore epitelial e entre a ponta da árvore epitelial e o final da *fat pad* (tecido adiposo presente na glândula mamária), ambas realizadas com régua e expressas em milímetros (mm).

4.8.2. Potencial para transformação maligna

A avaliação do potencial para transformação maligna foi realizada através da contagem das estruturas denominadas *terminal end buds* (TEBs), presentes na região distal do epitélio, e são similares às estruturas presentes em humanos denominadas *terminal ductal lobular units* (TDLUs). Essas estruturas apresentam células indiferenciadas suscetíveis a mutações e são os principais locais de iniciação da carcinogênese mamária em humanos.

4.8.3. Grau de diferenciação da glândula mamária

Para a avaliação do grau de diferenciação da glândula mamária foi realizada a contagem de brotos alveolares primários, secundários e lóbulos e considerada a soma dessas estruturas.

4.8.4. Taxa de Apoptose

A avaliação de células em apoptose na glândula mamária foi realizada em lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina. Para tanto, foram analisadas 1000 células epiteliais mamárias por glândula mamária, sendo considerada a porcentagem de células apoptóticas. As células em apoptose foram identificadas seguindo critérios bem estabelecidos na literatura (ELMORE et al., 2016; LEVIN et al., 1999).

4.9. ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO TUMORAL

A análise do desenvolvimento tumoral foi realizada nas fêmeas F1 (filhas) submetidas à indução química da carcinogênese mamária por DMBA descrito anteriormente. Para tanto, foram considerados os seguintes parâmetros:

Latência - tempo médio necessário para o aparecimento do primeiro tumor.

Incidência - número de animais que desenvolveram tumores mamários dentro de cada grupo.

Multiplicidade - número médio de tumores desenvolvidos em cada animal.

Volume tumoral - avaliado através da fórmula: $1/6 \cdot (\pi abc)$, onde a = comprimento, b = largura e c = altura

Sobrevivência – número de animais que não desenvolveram neoplasias mamárias em relação a todo o período do estudo (de Assis *et al.*, 2010).

Além disso, foi realizada a análise histopatológica dos tumores para caracterização e classificação de acordo com Frith e Ward (1988), por meio de lâminas histológicas coradas em hematoxilina e eosina, bem como análise do tecido pulmonar para verificação de metástase.

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar o comportamento das variáveis-resposta em relação ao consumo de extrato de amora-preta pelos machos F0 (pais), empregou-se o teste t de Student para amostras não relacionadas. Para estudar a influência do consumo materno e paterno de extrato de amora-preta nos períodos de gestação e lactação, foi empregado o modelo de análise de variância com dois fatores fixos. Para a avaliação do efeito do consumo de amora-preta pela geração parental sobre a prole feminina (fêmeas F1), foi utilizado o modelo de análise de variância com dois fatores fixos e o método de comparações múltiplas de Tukey. Foi utilizado o teste qui-quadrado para comparação de proporções

na avaliação da prole. Na análise de sobrevivência da prole feminina (Fêmeas F1) submetidas ao ensaio da carcinogênese mamária, foi empregado o estimador de Kaplan-Meier para curvas de sobrevivência de cada grupo formado e o modelo de riscos proporcionais de Cox. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISES DO FRUTO DE AMORA-PRETA E SEU EXTRATO

5.1.1. Identificação de flavonoides no fruto de amora-preta

Foram identificados quatro derivados de cianidina (cy), sendo a cianidina-3-glucosídeo a antocianina majoritária (Figuras 4A e 4B). Três das antocianinas foram encontradas na fração eluída com metanol e um pico adicional foi observado na fração eluída com metanol:amônia. Também foram identificados três picos correspondentes a derivados do ácido elágico (AE), sendo um deles o próprio AE, e um pico de um derivado de quercetina (Querc) (Figura 5). As identidades da cianidina-3-glucosídeo e AE foram confirmadas pela co-eluição com o respectivo padrão comercial.

Figura 4. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (525 nm) do extrato obtido do fruto de amora-preta(A) fração eluída com metanol e (B) fração eluída com metanol:amônia. Picos identificados como derivados de cianidina(1).

Figura 5. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (270 nm) do extrato obtido do fruto de amora-preta. Fração eluída com metanol. Picos identificados como derivados do ácido elágico (2) e derivado de quercetina(3). Os picos 4 e 5 foram identificados como contaminantes presentes no metanol.

5.1.2. Análise dos extratos aquoso e alcoólico para determinação do método de administração no delineamento experimental.

5.1.2.1. Quantificação de flavonoides e elagitaninos de amora-preta e seus extratos aquoso e alcoólico em fase aquosa

Conforme mostrado anteriormente, a amora-preta adquirida para o presente estudo contém cianidina, quercetina e elagitaninos. O extrato aquoso da fruta apresentou menor quantidade de todos os compostos encontrados, enquanto o extrato alcoólico em fase aquosa apresentou quantidades semelhantes de cianidina e quercetina em relação ao fruto, porém menor quantidade de elagitaninos (Tabela 1). Tendo em vista esses resultados, consideramos mais adequado utilizar no presente estudo o extrato alcoólico em fase aquosa.

Tabela 1. Quantificação de flavonoides e elagitaninos do fruto de amora-preta e de seus extratos aquoso e alcoólico em fase aquosa, apresentados em média $\pm$ desvio-padrão

	Fruto (mg/100g)	Extrato aquoso (mg/100mL)	Extrato alcoólico em fase aquosa (mg/100mL)
Cianidina total	104.86 $\pm$ 6.23	19.63 $\pm$ 0.68	176.38 $\pm$ 2.49
Quercetina total	26.11 $\pm$ 1.61	6.42 $\pm$ 0.41	25.77 $\pm$ 0.72
Ácido elágico livre	5.96 $\pm$ 0.22	3.66 $\pm$ 0.36	7.77 $\pm$ 2.31
Ácido elágico total (elagitaninos)	430.04 $\pm$ 26.78	34.17 $\pm$ 1.75	65.13 $\pm$ 47.39

5.1.2.2. *Teste de estabilidade do extrato alcoólico de amora-preta em fase aquosa*

No teste de estabilidade do extrato alcoólico de amora-preta em fase aquosa foi observado que, quando mantido em temperatura ambiente durante 1 dia, o extrato apresentou perda de 13% de cianidina, 12% de quercetina e 9% de ácido elágico livre. Após 2 dias de exposição a temperatura ambiente, foi observada perda de 14% de cianidina e 30% de quercetina. Considerando que a perda de cianidina, composto fenólico mais abundante, entre 1 e 2 dias, foi muito pequena, além da viabilidade da produção de extrato durante a semana, foi estabelecida a oferta de extrato alcoólico de amora-preta em fase aquosa aos animais em dias intercalados.

Em relação à estocagem do extrato, foi observado perda de 4% de cianidina, 12% de quercetina e 10% de ácido elágico livre após 7 dias de armazenamento a -80°C. Sendo assim, a produção do extrato foi realizada toda semana e estocada a -80°C por, no máximo, 7 dias, até sua administração aos animais. Todos os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração de cianidina, quercetina e ácido elágico livre no extrato alcoólico de amora-preta em fase aquosa, durante manutenção a temperatura ambiente por 1 e 2 dias, e a -80°C durante 7 dias, expressa em µg/mL extrato e apresentado em média ± desvio-padrão

	Dia 0	Dia 1*	Dia 2*	Dia 7**
Cianidina (cianidina-3-glicosídeo)	1763.82 ± 2.49	1532.91 ± 3.51	1514.78 ± 1.59	1691.10 ± 0.43
Quercetina (aglicona)	257.77 ± 0.72	225.36 ± 1.52	180.30 ± 2.50	226.79 ± 1.18
Ácido elágico livre	77.76 ± 2.31	70.75 ± 0.47	78.11 ± 0.72	69.83 ± 0.10
Elagitanino	621.39 ± 47.39	627.19 ± 25.08	659.18 ± 8.5	634.26 ± 21.97

* Estocado a temperatura ambiente ** Estocado a -80°C

5.1.2.3. *Quantificação de açúcares solúveis do extrato alcoólico de amora-preta em fase aquosa*

Na análise do conteúdo de açúcares do extrato alcoólico de amora-preta em fase aquosa foram observadas concentrações semelhantes de glicose e frutose, e pequena quantidade de sacarose (glicose + frutose), conforme apresentado na Tabela 3. Com base neste resultado, foi decidido acrescentar à água dos animais não tratados com extrato de amora, 3.4% de açúcar invertido, oferecendo conteúdo energético e perfil de açúcares semelhante aos animais tratados.

Tabela 3. Quantificação de glicose, frutose e sacarose no extrato alcoólico de amora-preta em fase aquosa. Valores expressos em mg/mL e apresentados em média $\pm$ desvio-padrão

Glicose	56.4 $\pm$ 2.0
Frutose	58.1 $\pm$ 1.4
Sacarose	0.4 $\pm$ 0.1
Total	114.9 $\pm$ 3.3

5.1.3. Conteúdo de fenólicos totais e capacidade antioxidante na amora-preta e em seu extrato alcoólico em fase aquosa

O conteúdo de fenólicos totais e capacidade antioxidante do fruto de amora-preta e seu respectivo extrato está apresentado na Tabela 4. Tanto na amora-preta quanto em seu extrato, a capacidade antioxidante avaliada pelo método ORAC foi superior ao avaliado pelo método DPPH. Apesar do conteúdo de fenólicos totais do fruto de amora-preta ser semelhante ao encontrado em seu extrato, a capacidade antioxidante foi inferior nesse último.

Tabela 4. Teor de fenólicos totais (FT) e capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e ORAC no fruto de amora-preta e em seu extrato, expressos em mg GAE eq/100g ou 100mL e apresentados em média $\pm$ desvio-padrão

	Fruto	Extrato
FT	157 $\pm$ 23	154 $\pm$ 11
DPPH	1525 $\pm$ 88	80 $\pm$ 5
ORAC	2265 $\pm$ 612	644 $\pm$ 770

5.2. ANÁLISES DO ENSAIO BIOLÓGICO

5.2.1. MACHOS F0 (PAIS)

5.2.1.1. Estimativa do consumo individual diário de ração

De acordo com a estimativa do consumo individual diário de ração, não houve diferença significativa entre os animais tratados com o extrato de amora-preta e os animais controle durante todo o período de tratamento, conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6. Demonstração gráfica da estimativa do consumo individual diário de ração dos machos F0 (pais) tratados com extrato de amora-preta (grupo amora) ou solução de açúcar invertido a 3.4% (grupo controle).

5.2.1.2. Estimativa do consumo individual diário de líquido

Em relação à estimativa do consumo individual diário de líquidos, o grupo que recebeu extrato de amora-preta apresentou menor consumo quando comparado ao grupo controle nas semanas de tratamento 1, 2 e 3 ($p < 0.001$, $p < 0.01$ e $p < 0.05$, respectivamente), não havendo diferença significativa nas semanas seguintes, conforme apresentado na Figura 7.

Figura 7. Gráfico demonstrativo da estimativa do consumo individual diário de extrato de amora-preta (grupo amora) ou solução de açúcar invertido a 3.4% (grupo controle) pelos machos F0 (pais). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

5.2.1.3. Ganho de massa corporal

Conforme apresentado na Figura 8, não houve diferença significativa na evolução do ganho de massa corporal entre os animais tratados com o extrato de amora-preta e os animais controle. Da mesma forma, não houve diferença significativa no ganho de massa corporal, bem como nos pesos inicial e final dos animais tratados com o extrato de amora-preta em relação aos animais controle (Tabela 5).

Figura 8. Representação gráfica da evolução do ganho de massa corporal dos machos F0 (pais) tratados com extrato de amora-preta (grupo amora) ou solução de açúcar invertido a 3.4% (grupo controle) durante o período de tratamento.

Tabela 5. Dados referentes ao peso inicial, peso final e ganho de massa corporal dos machos F0 (pais), expressos em gramas e apresentados em média $\pm$ desvio-padrão

	Controle	Amora
Peso inicial	9.58 $\pm$ 2.00	9.56 $\pm$ 2.00
Peso final	28.83 $\pm$ 3.48	27.79 $\pm$ 2.78
Ganho de massa corporal	19.24 $\pm$ 2.52	18.22 $\pm$ 1.82

5.2.1.4. Teste de tolerância à glicose intraperitoneal

No teste de tolerância à glicose intraperitoneal conduzido nos camundongos machos F0 (pais), não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais tratados com extrato de amora-preta e os animais controle em nenhum dos tempos avaliados, conforme apresentado na Figura 9.

Figura 9. Gráfico demonstrativo do resultado obtido no teste de tolerância à glicose intraperitoneal pela dosagem da glicemia dos machos F0 (pais) tratados com extrato de amora-preta (amora) ou solução de açúcar invertido a 3.4% (controle) em diferentes tempos (minutos) após a injeção i.p. de dextrose (2mg/kg peso corporal).

5.2.1.5. *Peso relativo dos órgãos*

Na análise do peso relativo dos órgãos, não houve alterações estatisticamente significativas no peso relativo dos testículos, epidídimos, rins, fígado, pulmão e coração dos animais tratados com extrato de amora-preta em relação aos animais controle, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Valores descritivos do peso relativo do testículo, epidídimo, rim, fígado, pulmão e coração dos machos F0 (pais), expressos em porcentagem (%) e apresentados em média $\pm$ desvio padrão

	Testículo	Epidídimo	Rim	Fígado	Pulmão	Coração
Controle	0.23 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.05	0.58 $\pm$ 0.05	4.45 $\pm$ 0.61	0.68 $\pm$ 0.13	0.53 $\pm$ 0.07
Amora	0.25 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.03	0.60 $\pm$ 0.07	4.45 $\pm$ 0.59	0.70 $\pm$ 0.19	0.53 $\pm$ 0.09

5.2.1.6. *Estimativa da Produção diária de espermatozoides*

Em relação à produção diária de espermatozoides foi observado que os animais tratados com extrato de amora-preta apresentaram aumento estatisticamente significativo ($p < 0.05$) desse parâmetro em 17.5% quando comparado aos animais controle, conforme apresentado graficamente na Figura 10.

Figura 10. Representação gráfica da produção diária de espermatozoides dos machos F0 (pais) tratados com extrato de amora-preta (amora) ou solução de açúcar invertido a 3.4% (controle). * $p < 0.05$

5.2.1.7. Morfologia espermática

Na análise para avaliação da morfologia espermática, foi observado que os animais tratados com extrato de amora-preta apresentaram aumento estatisticamente significativo ($p < 0.001$) na porcentagem de espermatozoides normais em 51.68% quando comparado aos animais controle, conforme apresentado graficamente na Figura 11.

Figura 11. Representação gráfica da morfologia espermática, expressa em porcentagem de espermatozoides normais, dos machos F0 (pais) tratados com extrato de amora-preta (amora) ou solução de açúcar invertido a 3.4% (controle). *** $p<0.001$

5.2.1.8. Histomorfometria testicular

Na análise histomorfométrica testicular, não foram observadas alterações na proporção de área tubular e intersticial e nem no diâmetro tubular. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Valores descritivos da área tubular, área intersticial e diâmetro tubular do tecido testicular nos machos F0 (pais), apresentados em média $\pm$ desvio-padrão

	Controle	Amora
Área tubular (μm^2)	73.72 $\pm$ 5.16	74.58 $\pm$ 6.91
Área intersticial (μm^2)	26.28 $\pm$ 5.16	25.42 $\pm$ 6.91
Diâmetro tubular (μm)	176.58 $\pm$ 33.27	173.70 $\pm$ 37.80

5.2.1.9. Atividade das enzimas antioxidantes

Nos ensaios para determinação da atividade enzimática da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) testicular dos machos F0 (pais), foi observado que o consumo do extrato desencadeou redução significativa tanto na atividade da SOD ($p<0.001$) quanto da CAT ($p<0.05$), não havendo alterações significativas da atividade da GPx. Todos os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. valores descritivos da atividade enzimática da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) no testículo dos machos F0 (pais), expressos em UA/min/mg proteína, apresentados em média $\pm$ desvio-padrão.

	CAT	SOD	GPx
Controle	20.25 $\pm$ 4.86	28.16 $\pm$ 0.37	43.05 $\pm$ 5.78
Amora	9.83 $\pm$ 2.36*	17.43 $\pm$ 1.16***	44.32 $\pm$ 7.89

* $p<0.05$, *** $p<0.001$

5.2.1.10. Capacidade antioxidante plasmática

Na avaliação da capacidade antioxidante plasmática, foi observado que os animais tratados com extrato de amora-preta apresentaram aumento significativo em relação ao controle ($p < 0.001$), conforme apresentado na Figura 12.

Figura 12. Representação gráfica da capacidade antioxidante plasmática dos machos F0 (pais) tratados com extrato de amora-preta (amora) ou solução de açúcar invertido a 3.4% (controle). *** $p < 0.001$

5.2.1.11. Níveis plasmáticos de testosterona

Não houve diferença significativa nos níveis séricos de testosterona nos animais tratados com extrato de amora-preta em relação ao grupo controle, conforme apresentado na Figura 13.

Figura 13. Representação gráfica dos níveis séricos de testosterona dos machos F0 (pais) tratados com extrato de amora-preta (amora) ou solução de açúcar invertido a 3.4% (controle).

5.2.2. ACASALAMENTO

5.2.2.1. Taxa de prenhez

A taxa de prenhez, avaliada considerando o número de fêmeas prenhas, foi maior nos grupos PA, MA e PMA em relação ao grupo CTRL ($p < 0.05$ para todas as comparações), conforme ilustrado na Figura 14. A partir da utilização do modelo estatístico log-linear, foi possível afirmar que o consumo de extrato de amora pelos pais aumentou a chance de prenhez em 2.28 vezes.

Figura 14. Gráfico demonstrativo da taxa de prenhez, apresentado pela porcentagem de fêmeas prenhas em relação às não prenhas, dos grupos experimentais CTRL (controle), PA (pai amora), MA (mãe amora) e PMA (pai e mãe amora).

5.2.3. FÊMEAS F0 (MÃES)

5.2.3.1. Estimativa do consumo individual diário de ração

De acordo com a estimativa do consumo individual diário de ração, não houve diferença significativa entre os animais tratados com o extrato de amora-preta e os animais controle, tanto durante a gestação quanto durante a lactação, conforme apresentado nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

Figura 15. Demonstração gráfica da estimativa do consumo individual diário de ração das fêmeas F0 (mães) tratadas com extrato de amora-preta (grupo amora) ou solução de açúcar invertido a 3.4% (grupo controle) durante a gestação (DG: dia gestacional aproximado).

Figura 16. Demonstração gráfica da estimativa do consumo individual diário de ração das fêmeas F0 (mães) tratadas com extrato de amora-preta (grupo amora) ou solução de açúcar invertido a 3.4% (grupo controle) durante a lactação (DL: dia lactacional aproximado).

5.2.3.2. Estimativa do consumo individual diário de líquido

Em relação à estimativa do consumo individual diário de líquidos durante a gestação, o grupo que recebeu extrato de amora-preta apresentou menor consumo

quando comparado ao grupo controle nos dias gestacionais (DG) 7($p<0.001$), 10($p<0.01$), 18 ($p<0.05$) e 20 ($p<0.05$) não havendo diferença significativa apenas no DG 14, conforme apresentado na Figura 17. Já durante a lactação, o grupo que recebeu extrato de amora-preta apresentou menor consumo em todo o período lactacional, conforme apresentado na Figura 18.

Figura 17. Demonstração gráfica da estimativa do consumo individual diário de líquido das fêmeas F0 (mães) tratadas com extrato de amora-preta (grupo amora) ou solução de açúcar invertido a 3.4% (grupo controle) durante a gestação (DG: dia gestacional aproximado). *** $p<0.001$; ** $p<0.01$; * $p<0.05$.

Figura 18. Demonstração gráfica da estimativa do consumo individual diário de líquido das fêmeas F0 (mães) tratadas com extrato de amora-preta (grupo amora) ou solução de

açúcar invertido a 3.4% (grupo controle) durante a gestação (DL: dia lactacional aproximado). *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$.

5.2.3.3. Ganho de massa corporal gestacional e lactacional

Em relação ao ganho de massa corporal, foi observada diferença estatisticamente significativa no sétimo dia gestacional (GD7) nos grupo PA e PMA em relação ao grupo controle ($p < 0.05$ para ambos), não havendo alterações no grupo MA (Figura 19). Por outro lado, durante a lactação, os grupos MA e PMA apresentaram menor peso nas semanas 2 e 3 e no momento do desmame em relação ao grupo CTRL ($p < 0.05$ para todas as comparações) (Figura 20).

Figura 19. Demonstração gráfica do ganho de massa corporal das fêmeas F0 (mães) durante o período gestacional de acordo com os grupos experimentais CTRL: controle, PA (pai amora), MA (mãe amora) e PMA (pai e mãe amora) (DG: dia gestacional aproximado). * $p < 0.05$ nos grupos PA e PMA em relação ao grupo CTRL.

Figura 20. Demonstração gráfica do ganho de massa corporal das fêmeas F0 (mães) durante o período lactacional (em semanas) de acordo com os grupos experimentais CTRL (controle), PA (pai amora), MA (mãe amora) e PMA (pai e mãe amora). * $p < 0.05$ nos grupos MA e PMA em relação ao grupo CTRL.

5.2.3.4. Teste de tolerância intraperitoneal à glicose

No teste de tolerância à glicose intraperitoneal das fêmeas F0 (mães), realizado após o término da lactação, não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais tratados com extrato de amora-preta (grupo amora) e com solução de açúcar invertido a 3.4%, em nenhum dos tempos avaliados, conforme apresentado na Figura 21.

Figura 21. Gráfico demonstrativo do resultado obtido no teste de tolerância à glicose intraperitoneal, pela dosagem da glicemia, das fêmeas F0 (mães) tratadas com extrato de amora-preta (grupo amora) ou solução de açúcar invertido a 3.4% (grupo controle), em diferentes tempos (minutos) após a injeção i.p. de dextrose (2mg/kg peso corporal).

5.2.3.5. *Peso relativo dos órgãos*

Na análise do peso relativo dos órgãos, não houve alterações estatisticamente significativas no peso relativo do útero (com ovários), rins, fígado, pulmão e coração dos animais tratados com extrato de amora-preta (grupo amora) em relação aos que consumiram a solução de açúcar invertido a 3.4% (grupo controle), conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9. Valores descritivos do peso relativo do útero (com ovário), rim, fígado, pulmão e coração das fêmeas F0 (mães), expressos em porcentagem (%) e apresentados em média $\pm$ desvio padrão

	Útero (com ovários)	Rim	Fígado	Pulmão	Coração
Controle	0.50 $\pm$ 0.18	0.57 $\pm$ 0.15	5.37 $\pm$ 1.34	1.00 $\pm$ 0.25	0.69 $\pm$ 0.15
Amora	0.48 $\pm$ 0.12	0.62 $\pm$ 0.11	5.11 $\pm$ 0.85	0.95 $\pm$ 0.19	0.71 $\pm$ 0.17

5.2.3.6. *Atividade das enzimas antioxidantes*

Nos ensaios para determinação da atividade enzimática da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) hepática das fêmeas F0 (mães), foi observado que o consumo de extrato de amora-preta foi capaz apenas de diminuir a atividade da SOD ($p < 0.05$), não havendo alteração significativa na atividade das demais enzimas (Tabela 10).

Tabela 10. Valores descritivos da atividade enzimática da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) no fígado das fêmeas F0 (mães), expressos em UA/min/mg proteína, apresentados em média $\pm$ desvio padrão

	CAT	SOD	GPx
Controle	125.69 $\pm$ 18.20	3.96 $\pm$ 0.93	620.86 $\pm$ 127.59
Amora	129.57 $\pm$ 26.66	2.88 $\pm$ 0.45*	511.27 $\pm$ 106.46

* $p < 0,05$ em relação ao controle

5.2.3.7. Capacidade antioxidante plasmática

Diferentemente do observado nos machos F0 (pais), não houve diferença significativa na capacidade antioxidante plasmática das fêmeas F0 (mães) tratadas com extrato de amora-preta conforme apresentado na Tabela 11.

Tabela 11. Valores descritivos da capacidade antioxidante plasmática das fêmeas F0 (mães), expressos em $\mu\text{mol}/100\text{mL}$, e apresentados em média $\pm$ desvio-padrão

	Controle	Amora
ORAC	80.33 ± 20.41	80.74 ± 10.06

5.2.4. PROLE

5.2.4.1. Número de filhotes

Embora tenha sido observado maior número de filhote nos grupos cujos pais consumiram extrato de amora-preta (PA e PMA), não houve diferença significativa no número de filhotes nascidos por mãe, como apresentado na Tabela 12.

Tabela 12. Valores descritivos do número de filhotes nascidos por mãe, apresentados em média $\pm$ desvio padrão

	Controle	Pai amora	Mãe amora	Pai e mãe amora
n filhotes/mãe	7.02 ± 1.30	6.88 ± 1.75	6.50 ± 1.86	6.81 ± 1.46

5.2.4.2. Sexagem

Para a avaliação de machos e fêmeas nascidos, foram considerados apenas os filhotes vivos devido à inviabilidade de realizar a sexagem no restante da prole, principalmente pela elevada taxa de canibalismo encontrada. Enquanto no grupo CTRL foi observado 50% de filhotes fêmeas e 50% de filhotes machos, o grupo PA apresentou 60,63% de machos e 39,36% de fêmeas; o grupo MA apresentou 54,66% de machos e 45,33% de fêmeas; e o PMA obteve 55,15% de machos e 44,85% de fêmeas, não havendo diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos experimentais. Os resultados estão apresentados na Figura 22.

Figura 22. Demonstração gráfica do número de filhotes machos e fêmeas, dentre os vivos, nos grupos CTRL (controle), PA (pai amora), MA (mãe amora) e PMA (pai e mãe amora).

5.2.4.3. *Mortalidade perinatal*

Foi observado no presente estudo que a taxa de mortalidade dos filhotes foi de 34.06% no grupo CTRL, 16.93% no grupo PA, 19.35% no grupo MA e 8.54% no grupo PMA. Houve diferença estatisticamente significativa nos grupos PA ($p < 0.01$), MA ($p < 0.05$) e PMA ($p < 0.001$) em relação ao grupo CTRL. Além disso, houve diferença significativa nos grupos PA e MA em relação ao grupo PMA ($p < 0.05$ para ambos) (Figura 23). A partir do modelo estatístico log-linear, foi possível afirmar que o consumo de extrato de amora-preta pelos pais aumentou a chance de sobrevivência dos filhotes em 1.9 vezes, enquanto o consumo materno aumentou essa chance em 2,65 vezes. Já o consumo do extrato por ambos, aumentou a chance de sobrevivência dos filhotes em 5.04 vezes em relação ao grupo controle.

Figura 23. Demonstração gráfica do número relativo de mortos em relação aos vivos nos grupos CTRL (controle), PA (pai amora), MA (mãe amora) e PMA (pai e mãe amora). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ em relação ao grupo CTRL; ^a $p < 0.05$ em relação ao grupo PMA.

5.2.5. FÊMEAS F1 (FILHAS) PND 50

5.2.5.1. Peso no desmame e ganho de massa corporal

Na pesagem no momento do desmame, foi observada redução estatisticamente significativa do grupo MA em relação ao grupo CTRL ($p < 0.05$), não havendo alteração deste parâmetro nos demais grupos. Entretanto, não houve diferença significativa no ganho de massa corporal em nenhum dos grupos experimentais. Esses resultados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Valores descritivos do peso das fêmeas F1 (filhas) no momento do desmame e do ganho de massa corporal, expressos em gramas e apresentados em média $\pm$ desvio padrão

	Controle	Pai amora	Mãe amora	Pai e mãe amora
Peso desmame	9.05 $\pm$ 1.23	8.91 $\pm$ 1.83	7.67 $\pm$ 1.28*	9.02 $\pm$ 1.23
Ganho de massa corporal	7.17 $\pm$ 1.51	6.98 $\pm$ 1.79	7.63 $\pm$ 2.28	7.05 $\pm$ 1.58

* $p < 0.05$ em relação ao grupo controle

5.2.5.2. Peso relativo dos órgãos

Na análise do peso relativo do útero (com ovários), rim, fígado, pulmão e coração das fêmeas F1 (filhas) não submetidas à indução da carcinogênese, não foi observada diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos experimentais, conforme apresentado na Tabela 14.

Tabela 14. Valores descritivos do peso relativo do útero (com ovários), rim, fígado, pulmão e coração das fêmeas F1 (filhas), expressos em porcentagem e apresentados em média $\pm$ desvio padrão

	Útero (com ovários)	Rim	Fígado	Pulmão	Coração
Controle	0.66 $\pm$ 0.21	0.68 $\pm$ 0.07	0.66 $\pm$ 0.07	0.84 $\pm$ 0.07	5.77 $\pm$ 0.57
Pai amora	0.54 $\pm$ 0.22	0.63 $\pm$ 0.08	0.62 $\pm$ 0.08	0.71 $\pm$ 0.11	5.00 $\pm$ 1.10
Mãe amora	0.51 $\pm$ 0.14	0.70 $\pm$ 0.06	0.70 $\pm$ 0.09	0.79 $\pm$ 0.09	5.64 $\pm$ 0.27
Pai e mãe amora	0.68 $\pm$ 0.23	0.66 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.11	0.78 $\pm$ 0.08	5.23 $\pm$ 0.36

5.2.5.3. Teste de tolerância à glicose intraperitoneal

No teste de tolerância à glicose intraperitoneal das fêmeas F1 (filhas), foi observado menor pico de glicemia 15 minutos após a injeção intraperitoneal de dextrose nos grupos MA e PMA em relação ao grupo CTRL ($p < 0.01$ para ambos), não havendo influência do tratamento paterno nesse parâmetro. Os resultados estão apresentados graficamente na Figura 24.

Figura 24. Gráfico demonstrativo do resultado obtido no teste de tolerância à glicose intraperitoneal pela dosagem da glicemia das fêmeas F1 (filhas) dos grupos CTRL (controle), PA (pai amora), MA (mãe amora) e PMA (pai e mãe amora), após a injeção i.p. de dextrose (2mg/kg peso corporal). ** $p < 0.01$ nos grupos MA e PMA em relação ao grupo CTRL.

5.2.5.4. Atividade das enzimas antioxidantes

Em relação à atividade enzimática da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) hepática das fêmeas F1 (filhas) não submetidas à indução da carcinogênese mamária, foi observada apenas redução estatisticamente significativa da atividade da SOD do grupo PA ($p < 0.05$), não havendo qualquer outra alteração nos demais grupos (Tabela 15).

Tabela 15. Valores descritivos da atividade enzimática da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) no fígado das fêmeas F1 (filhas), expressos em UA/min/mg proteína e apresentados em média $\pm$ desvio padrão

	CAT	SOD	GPx
Controle	124.05 $\pm$ 27.22	3.88 $\pm$ 0.33	577.78 $\pm$ 39.71
Pai amora	118.52 $\pm$ 26.71	2.75 $\pm$ 1.03*	628.71 $\pm$ 132.13
Mãe amora	106.57 $\pm$ 18.50	3.34 $\pm$ 0.52	634.83 $\pm$ 92.77
Pai e mãe amora	117.54 $\pm$ 24.39	3.32 $\pm$ 0.33	696.97 $\pm$ 152.58

* $p < 0.05$ em relação ao controle

5.2.5.5. Capacidade antioxidante plasmática

Na avaliação da capacidade antioxidante plasmática das fêmeas F1 (filhas) não submetidas à indução da carcinogênese mamária, foi possível observar que, enquanto a prole feminina dos grupos PA e MA apresentaram redução significativa de aproximadamente 8 e 5 vezes, respectivamente, em relação ao CTRL ($p < 0.001$ para ambos), as filhas do grupo PMA apresentaram aumento da capacidade antioxidante plasmática em 188% em relação ao CTRL ($p < 0.001$) (Figura 25).

Figura 25. Gráfico demonstrativo da capacidade antioxidante das fêmeas F1 (filhas) não submetidas ao ensaio da carcinogênese (PND 50) dos grupos CTRL (controle), PA

(pai amora), MA (mãe amora) e PMA (pai e mãe amora). *** $p<0.001$ em relação ao grupo CTRL.

5.2.5.6. Risco para desenvolvimento de neoplasias mamárias

5.2.5.6.1. Desenvolvimento epitelial

Na avaliação do desenvolvimento epitelial da glândula mamária, foi observada diferença significativa na distância entre o início da árvore epitelial e o término da *fat pad* nos grupos PA, MA e PMA em relação ao grupo CTRL ($p<0.01$ para todas as comparações) (Figura 26). Além disso, o grupo PA apresentou maior distância entre o linfonodo e o fim da árvore epitelial em relação ao grupo CTRL ($p<0.01$) (Figura 27).

Figura 26. Gráfico demonstrativo do desenvolvimento epitelial da glândula mamária, avaliado pela distância entre a ponta da árvore epitelial e a *fat pad*, das fêmeas F1 (filhas) não submetidas ao ensaio da carcinogênese (PND 50) dos grupos CTRL (controle), PA (pai amora), MA (mãe amora) e PMA (pai e mãe amora). *** $p<0.001$ em relação ao grupo CTRL.

Figura 27. Gráfico demonstrativo do desenvolvimento epitelial da glândula mamária, avaliado pela distância entre o linfonodo e o fim da árvore epitelial, das fêmeas F1 (filhas) não submetidas ao ensaio da carcinogênese (PND 50) dos grupos CTRL (controle), PA (pai amora), MA (mãe amora) e PMA (pai e mãe amora). ** $p < 0.01$ em relação ao grupo CTRL.

5.2.5.6.2. Grau de diferenciação da glândula mamária

Na avaliação do grau de diferenciação da glândula mamária das fêmeas F1 (filhas) não submetidas ao ensaio da carcinogênese (PND 50), foi observado aumento significativo na soma do número de brotos alveolares primários, secundários e lóbulos nos grupos MA e PMA em relação ao grupo CTRL ($p < 0.01$ para ambos), conforme apresentado na Figura 28.

Figura 28. Gráfico demonstrativo do grau de diferenciação da glândula mamária, avaliado pela soma dos brotos alveolares primários, secundários e lóbulos das fêmeas F1 (filhas) não submetidas ao ensaio da carcinogênese (PND 50) dos grupos CTRL (controle), PA (pai amora), MA (mãe amora) e PMA (pai e mãe amora). *** $p < 0.01$ em relação ao grupo CTRL.

5.2.5.6.3. Potencial para transformação maligna

Em relação à análise do potencial para transformação maligna na glândula mamária das fêmeas F1 (filhas) não submetidas ao ensaio da carcinogênese (PND 50), foi observada redução no número de TEBs nos grupos PA ($p < 0.01$), MA ($p < 0.001$) e PMA ($p < 0.01$) em relação ao grupo CTRL, conforme apresentado na Figura 29.

Figura 29. Gráfico demonstrativo do risco para transformação maligna na glândula mamária, avaliado pelo número de TEBs, das fêmeas F1 (filhas) não submetidas ao ensaio da carcinogênese (PND 50) dos grupos CTRL (controle), PA (pai amora), MA (mãe amora) e PMA (pai e mãe amora). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ em relação ao grupo CTRL.

5.2.5.6.5. Apoptose

Na avaliação da taxa de apoptose na glândula mamária das filhas não submetidas à carcinogênese mamária, foi observado que os grupos MA e PMA apresentaram aumento nesse parâmetro em relação ao grupo CTRL ($p < 0.05$ para ambos), não havendo efeito do consumo paterno (Figura 30).

Figura 30. Gráfico demonstrativo da porcentagem de células em apoptose na glândula mamária das fêmeas F1 (filhas) não submetidas ao ensaio da carcinogênese (PND 50) dos grupos CTRL (controle), PA (pai amora), MA (mãe amora) e PMA (pai e mãe amora). * $p < 0.05$ em relação ao grupo CTRL.

5.2.7. FÊMEAS F1 (FILHAS) DMBA

5.2.7.1. Análise do ganho de massa corporal

Na análise do ganho de massa corporal das fêmeas F1 (filhas) submetidas à indução química da carcinogênese mamária por DMBA, não foram observadas alterações significativas desde o início do protocolo de iniciação da carcinogênese até o fim do experimento, conforme observado na Figura 31.

Figura 31. Representação gráfica do ganho de massa corporal das fêmeas F1 (filhas) submetidas à indução química da carcinogênese mamária por DMBA dos grupos CTRL (controle), PA (pai amora), MA (mãe amora) e PMA (pai e mãe amora).

5.2.7.2. Análise do desenvolvimento tumoral

5.2.7.2.1. Incidência, multiplicidade e latência

Na avaliação do desenvolvimento tumoral das fêmeas F1 (filhas) submetidas à indução química da carcinogênese mamária, os grupos PA, MA e PMA apresentaram incidência de tumores em 66.66% dos animais de cada grupo, enquanto 93.33% dos animais do grupo CTRL desenvolveram tumores, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa (Figura). Não foi observada diferença significativa nem na multiplicidade (número de tumores por animal) nem na latência (tempo necessário para o aparecimento do primeiro tumor, em dias), conforme apresentado na Tabela 16.

Tabela 16. Multiplicidade e latência dos tumores mamários das fêmeas F1 (filhas) submetidas à indução da carcinogênese, expressos em número de tumores por animal e dias, respectivamente, e apresentados em média $\pm$ desvio-padrão

	Multiplicidade	Latência
Controle	1.40 $\pm$ 0.73	75.78 $\pm$ 23.25
Pai amora	1.06 $\pm$ 1.09	64.81 $\pm$ 24.26
Mãe amora	1.00 $\pm$ 0.65	80.66 $\pm$ 29.00
Pai e mãe amora	1.13 $\pm$ 1.12	67.90 $\pm$ 29.45

5.2.7.2.2. Peso dos tumores

Das fêmeas F1 (filhas) submetidas à indução química da carcinogênese mamária que desenvolveram tumores, não houve diferença estatisticamente significativa no peso tumoral em nenhum dos grupos experimentais avaliados (Tabela 17).

Tabela 17. Peso do primeiro (T1) e do segundo (T2) tumor mamário observado nas fêmeas F1 (filhas) submetidas à indução da carcinogênese, expresso em gramas e apresentados em média $\pm$ desvio-padrão

	T1	T2
Controle	0.81 $\pm$ 1.90	0.22 $\pm$ 0.58
Pai amora	0.36 $\pm$ 0.64	0.25 $\pm$ 0.50
Mãe amora	0.30 $\pm$ 0.43	0.73 $\pm$ 1.25
Pai e mãe amora	1.42 $\pm$ 1.17	0.48 $\pm$ 0.69

5.2.7.2.3. Volume tumoral

Na análise da evolução do desenvolvimento tumoral considerando seu volume, embora tenha sido observada grande variabilidade, não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos avaliados (Figura 32).

Figura 32. Gráfico demonstrativo da evolução do volume tumoral das fêmeas F1 (filhas) submetidas à indução da carcinogênese mamária, nas 3 semanas avaliadas, dos grupos CTRL (controle), PA (pai amora), MA (mãe amora) e PMA (pai e mãe amora).

5.2.7.2.4. Sobrevivência

Na análise de sobrevivência das fêmeas F1 (filhas) submetidas à indução da carcinogênese mamária, apesar da probabilidade de sobrevivência ter sido maior nos grupos PA, MA e PMA em relação ao grupo CTRL durante todo o período de acompanhamento, essa diferença não foi estatisticamente significativa conforme apresentado na Figura 33.

Figura 33. Gráfico demonstrativo do número relativo de fêmeas F1 (filhas) submetidas à indução da carcinogênese mamária que não desenvolveram tumores mamários ao longo de todo o período avaliado (dias) dos grupos CTRL (controle), PA (pai amora), MA (mãe amora) e PMA (pai e mãe amora).

5.2.7.2.5. Análise histopatológica dos tumores

Dentre os animais que desenvolveram tumores em todos os grupos, foram identificados adenocarcinoma tipo A (tubular), adenocarcinoma tipo B (sólido-papilar), adenocarcinoma tipo C (misto) e adenoacantoma, não havendo diferença estatisticamente significativa na incidência de cada um deles nos diferentes grupos experimentais. Os tipos de neoplasias identificados estão ilustrados na Figura 34. Apenas 2 animais do grupo PA apresentaram metástase pulmonar conforme ilustrado na Figura 35.

Figura 34. Figuras representativas de tumores mamários. A) Adenocarcinoma do tipo A, mostrando áreas sólidas e com formação microacinares; B) Adenocarcinoma do tipo B, mostrando áreas papilíferas (P); C) Adenocarcinoma do tipo C mostrando a proliferação de células epiteliais e mioepiteliais em estroma mixomatoso (EM); D) Adenoacantoma mostrando áreas com pérolas córneas (PC).(A-D, 20x objetiva).

Figura 35. Lesões neoplásicas pulmonares. A-B) Metástase de tumor adenoacantoma (10 e 20x objetivas, respectivamente). C-D) Metástase de adenocarcinoma (10 e 20x objetivas, respectivamente). Br = bronquíolo; Des = área com diferenciação escamosa.

6. DISCUSSÃO

Amora-preta

No presente estudo foi avaliado o consumo de extrato de amora-preta pela geração parental (F0) e o risco de câncer de mama na prole feminina. A amora-preta utilizada apresentou elevado teor de antocianinas, principalmente na forma de cianidina-3-glicosídeo, embora outros tipos de cianidina também tenham sido detectados. Já foi demonstrado anteriormente na literatura, que a quantidade de cianidina-3-glicosídeo em diferentes cultivares de amora-preta pode representar em torno de 80 a 90% de todo o conteúdo de antocianinas (JORDHEIM et al., 2011).

Além das cianidinas, também foi encontrado quantidade expressiva de elagitaninos no fruto de amora-preta. Entretanto, redução de aproximadamente 7 vezes foi observada quando avaliado seu extrato alcoólico em fase aquosa. Tal evento pode estar relacionado à retirada das sementes pela filtração, realizada durante o processamento do fruto, uma vez que os elagitaninos são predominantemente

encontrados nessa região (KAUME et al., 2012). Perda de 70 a 80% do conteúdo de elagitaninos já foi observada em suco de amora-preta (HAGER et al., 2010).

Em menor quantidade, e de maneira semelhante no fruto e no extrato, foi observada a presença de quercetina, o flavonol mais abundante em amora-preta, geralmente na forma de quercetina-3-galactosídeo e quercetina-3-glicosídeo, quando comparado aos outros flavonóis kaempferol e miricetina (KAUME et al., 2012).

O solvente utilizado na extração da fruta pode influenciar diretamente na quantidade de compostos obtidos. Enquanto a utilização de acetona 70% é mais eficaz em extrair compostos fenólicos das frutas chamadas *berries*, a solução de metanol 70% acidificada com 0.5% de ácido acético, método utilizado no presente estudo, parece ser mais eficiente para a extração de antocianinas, inclusive de amora-preta (BOEING et al., 2014).

Além de interferir na quantidade de compostos extraídos, o solvente utilizado, bem como os procedimentos empregados, pode afetar a capacidade antioxidante (MOURE et al., 2001). Isso poderia explicar a redução nesse parâmetro, avaliado pelos métodos DPPH e ORAC, observada no extrato de amora-preta em relação ao fruto em ambas as análises, mesmo sem a alteração do conteúdo de fenólicos totais. Diferenças no resultado da capacidade antioxidante pelos diferentes métodos, conforme observado tanto no fruto quanto no extrato, são esperadas por empregarem compostos diferentes em sua metodologia, e já foram descritas em análise de amora-preta (AZOFEIFA et al., 2013).

Efeitos na geração parental (pais e mães)

Enquanto o consumo de extrato de amora-preta não foi capaz de alterar o ganho de massa corporal nos machos F0 (pais) e nas fêmeas F0 (mães) durante a gestação, houve menor ganho de peso nas mães durante a lactação. Embora já tenha sido mostrada anteriormente a capacidade das antocianinas e elagitaninos, presentes no suco de framboesa, em modular o ganho de massa corporal em animais submetidos ao consumo de dieta hiperlipídica (SUH et al., 2011), o mesmo não foi observado após o consumo de amora-preta adicionada à ração (HEYMAN et al., 2014), mostrando que os polifenóis presentes nos alimentos podem atuar de maneiras distintas, dependendo da forma de administração, da biodisponibilidade desses compostos e da condição metabólica do indivíduo.

Adicionalmente, além de não haver alteração no consumo de ração tanto pelos machos quanto pelas fêmeas, a oferta energética foi ajustada no grupo controle com a adição de açúcar invertido na mesma concentração da encontrada no extrato de amora-preta. Apesar disso, foi observado menor consumo de extrato tanto pelos pais quanto pelas mães em todo o período de tratamento, o que possivelmente pode estar relacionado à sua palatabilidade. Um estudo anterior mostrou relação inversa entre a aceitação de suco comercial de romã adicionado de amora-preta, por consumidores norte-americanos, e a concentração de amora-preta utilizada, indicando a baixa palatabilidade da fruta (VÁZQUEZ-ARAÚJO et al., 2010). Por outro lado, é necessário destacar que o grupo controle recebeu adição de açúcar invertido na água, o que pode ter contribuído para um maior consumo devido à maior palatabilidade e à capacidade de estimular o sistema límbico, responsável pelo prazer e outras emoções (LEVINE et al., 2003).

Alguns indícios do benefício do consumo de amora-preta sobre o diabetes mellitus já foram descritos na literatura, principalmente favorecendo a redução dos níveis glicêmicos (STEFĂNUȚ et al., 2013; JOUAD et al., 2002) e aumentando o estímulo da liberação de insulina pela inibição da atividade da enzima dipeptidil peptidase IV (FAN et al., 2013). Entretanto, no presente estudo não foi observada diferença estatisticamente significativa na glicemia de jejum e no teste de tolerância à glicose intraperitoneal dos machos e das fêmeas saudáveis tratados com o extrato de amora-preta, discordando de achados anteriores (JOUAD et al., 2002).

O consumo de extrato de amora-preta foi capaz aumentar a capacidade antioxidante plasmática, corroborando com estudo anterior em humanos (HASSIMOTO et al., 2008), e desencadear alterações significativas na atividade de enzimas antioxidantes. Nas mães, houve redução na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) no tecido hepático, assim como em um estudo anterior utilizando animais saudáveis suplementados com mirtilo (BINGÜL et al., 2013). Nos pais, foi observada redução tanto na atividade da SOD quanto da catalase (CAT) no tecido testicular. É importante ressaltar que as espécies reativas de oxigênio estão amplamente presentes na gônada, devido à elevada taxa de divisão celular e alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados, exigindo maior aporte funcional das enzimas antioxidantes (GUERRIERO et al., 2014).

Em relação ao sistema reprodutor masculino, alimentos contendo compostos com potencial antioxidante são capazes de reduzir a formação de espécies reativas de

oxigênio e, consequentemente, diminuir a atividade das enzimas antioxidantes, contribuindo para melhor qualidade do sêmen (TREMELLEN, 2008). Entretanto, os poucos trabalhos que apresentaram resultados do consumo de compostos fenólicos sobre a atividade das enzimas antioxidantes testiculares em animais saudáveis são controversos (KAYA et al., 2014; PIRES et al., 2013).

Associado à modulação da atividade antioxidante testicular, os machos F0 apresentaram aumento significativo na produção diária de espermatozoides e na porcentagem de espermatozoides normais, sem, entretanto, alterar a estrutura morfológica testicular e os níveis plasmático de testosterona. Melhora na qualidade espermática, incluindo aumento na motilidade e contagem espermática, já foi relatada em animais saudáveis submetidos ao consumo de resveratrol e de extrato fermentado de amora-preta (JEON et al., 2008; JUAN et al., 2005; SHIN et al., 2008). Ademais, há evidências de que alterações morfológicas, especialmente na cabeça dos espermatozoides, estejam associadas a lesões oxidativas (AITKEN e CURRY, 2011; ZINI et al., 2009), indicando que a redução de anormalidades espermáticas observadas no presente estudo pode estar associada ao restabelecimento do equilíbrio na relação oxidante-antioxidante.

Todos esses resultados em conjunto parecem ter contribuído para o aumento da fertilidade dos machos, já que maior taxa de prenhez e maior número de filhotes foram obtidos nos grupos cujos pais consumiram extrato de amora-preta, não havendo diferença no número de filhote nascidos por mãe. Esses achados poderiam contribuir, futuramente, para estimular o consumo de frutas ricas em antocianinas e elagitaninos com o objetivo de controlar das elevadas taxas de infertilidade observadas nos dias atuais em todo o mundo (MUGHAL et al., 2016; SKAKKEBAEK et al., 2016).

Além dos efeitos benéficos já descritos, o consumo de amora tanto pelos pais quanto pelas mães foi capaz de reduzir em 50% a taxa de mortalidade perinatal da prole. Já o consumo do extrato por ambos potencializou ainda mais esse resultado. A elevada ocorrência de morte perinatal em camundongos de laboratório, especialmente na linhagem C57BL/6, tem sido relatada (WEBER et al., 2013a). No presente estudo, grande parte dos filhotes mortos foi encontrada com sinais de canibalismo ou íntegra com indícios de abandono materno. Um estudo anterior, que avaliou a relação entre o comportamento materno e a mortalidade, mostrou que as mães não mataram efetivamente seus filhotes, realizando o canibalismo horas depois de constatado o óbito (WEBER et al., 2013b).

Há alguma evidência na literatura de que o consumo energético materno, modulado por características ambientais, possa interferir na sobrevivência da ninhada durante a lactação (PAUL et al., 2010). Porém, tal evento não parece estar relacionado com os achados neste estudo, visto que ficou evidente a influência da alimentação paterna na taxa de mortalidade. Por outro lado, já foi demonstrado que o estresse oxidativo no espermatozoide paterno pode prejudicar o desenvolvimento fetal e contribuir para o risco de doenças (LANE et al., 2014). Portanto, é possível que o aumento na qualidade dos espermatozoides dos pais, bem como a modulação do sistema antioxidante materno na gestação e lactação, possa ter contribuído para melhor desenvolvimento da prole, impactando em maior sobrevivência.

Efeitos na prole feminina (filhas)

Em 1990, Trichopoulos sugeriu que o câncer de mama poderia ser programado ainda na vida intrauterina, devido à exposição fetal a elevados níveis de estrógeno. O peso ao nascer tem sido apontado como possível indicador da exposição hormonal e, conseqüentemente, do risco de neoplasias mamárias, relação esta já observada em estudos epidemiológicos (BUKOWSKI et al., 2012; MICHELS et al., 1996; MICHELS e XUE, 2006). No presente estudo, entretanto, devido à elevada taxa de mortalidade observada nessa linhagem de camundongos, optamos por não mexer nos animais no dia no nascimento, considerando que esse poderia ser um fator desencadeador de estresse nas mães com conseqüente canibalismo.

Considerando apenas o peso da prole feminina no momento do desmame, foi observada redução deste parâmetro no grupo cujas mães, somente, consumiram o extrato de amora-preta. Entretanto, tal evento parece não estar relacionado ao consumo de amora durante a gestação e lactação, visto que o grupo no qual pai e mãe consumiram o extrato não apresentou qualquer alteração. Apesar disso, o ganho de massa das filhas até os 50 dias de vida foi semelhante em todos os grupos experimentais.

Diversos tipos de doenças crônica não-transmissíveis (DCNT) podem ser programadas ainda na vida intrauterina, inclusive o diabetes mellitus tipo 2, o qual parece estar diretamente associado ao risco do desenvolvimento de câncer de mama (CALKINS e DEVASKAR, 2011; LIAO et al., 2011; PORTHA et al., 2011; RAMÍREZ-VÉLEZ, 2012). No presente estudo, foi observada redução no pico de

glicemia das filhas, aos 50 dias de vida, frente à injeção intraperitoneal de glicose, nos grupos cujas mães consumiram o extrato de amora-preta, não havendo influência paterna. Apesar das consequências do consumo de polifenóis sobre a saúde da prole ainda serem pouco conhecidas (LY et al., 2014), um estudo recente mostrou que o consumo de polifenóis presentes na pele de uva durante a gestação e lactação foi capaz de reduzir o risco de problemas renais na prole submetida à restrição protéica no período intrauterino (COSTA et al., 2015). Por outro lado, o consumo de procianidinas extraídas de semente de uva no mesmo período desencadeou aumento do risco de doenças cardiovasculares na prole masculina (DEL BAS et al., 2015).

Atualmente, a importância do quadro de estresse oxidativo na fisiopatologia de diversas doenças crônicas é bem conhecida (HYBERTSON et al., 2011). Entretanto já tem sido relatada a possibilidade da capacidade de defesa antioxidante ser programada na vida intrauterina, o que pode ter relação direta com a ocorrência de doenças crônicas não-transmissíveis na idade adulta (STRAKOVSKY e PAN, 2012). Nossos achados, entretanto, destacam o efeito do consumo paterno de extrato de amora-preta na modulação da atividade enzimática da superóxido dismutase testicular, não havendo qualquer alteração pelo consumo materno ou de ambos na atividade das enzimas antioxidantes avaliadas no fígado. Diferentemente, dados anteriores mostraram a influência do consumo de quercetina e genisteína pelas mães durante a gestação sobre a expressão de enzimas antioxidantes e seus reguladores, reduzindo lesões no DNA identificadas no tecido hepático (VANHEES et al., 2013).

Por outro lado, nossos resultados mostraram que tanto o consumo de extrato de amora pelos pais quanto pelas mães foi capaz de reduzir a capacidade antioxidante plasmática nas filhas, diferentemente da inalteração observada na prole de fêmeas diabéticas suplementadas com ácidos graxos poli-insaturados n-3 (YESSOUFOU et al., 2006). De maneira inédita, nós observamos que o consumo de extrato de amora-preta por ambos os pais, levou ao aumento da capacidade antioxidante em aproximadamente 3 vezes quando comparado ao grupo controle. Esse resultado mostra a potencialidade da interação entre pai e mãe na determinação da capacidade antioxidante na prole feminina, embora a avaliação de antioxidantes endógenos seja pertinente para melhor compreensão desse resultado e dos possíveis mecanismos envolvidos.

Sobre o risco para o desenvolvimento de câncer de mama, o consumo de extrato de amora-preta pelos pais e pelas mães foi capaz de aumentar o desenvolvimento epitelial da glândula mamária nas filhas com 50 dias de idade, além de reduzir o número

de *terminal end buds*, indicador para potencial transformação maligna, e aumentar a taxa de diferenciação e apoptose. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos anteriores avaliando o consumo gestacional e lactacional de mirtilo, comprovando a influência positiva do consumo de alimentos ricos em polifenóis, na estimulação do desenvolvimento da glândula mamária (RAHAL et al., 2013; XU et al., 2009). Em outro estudo, o consumo de resveratrol durante a gestação de fêmeas expostas ao 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) foi capaz de restabelecer o nível de diferenciação da glândula mamária na prole feminina (PAPOUTSIS et al., 2013).

Apesar do consumo de extrato de amora-preta pela geração parental ter impactado claramente na redução de marcadores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama na prole feminina, não foram observadas alterações significativas no ensaio de carcinogênese mamária quimicamente induzida. Tal resultado pode estar relacionado à limitação do número de animais utilizado nesta etapa do estudo, uma vez que houve grande variabilidade nos resultados de diversos parâmetros avaliados. Além disso, a indução química da carcinogênese mamária pode ter sido muito agressiva para avaliar as sutis alterações provenientes da programação no modelo experimental utilizado. Em estudo semelhante, Rahal et al. (2013) utilizaram camundongos transgênicos para avaliar o consumo materno de mirtilo durante a gestação sobre o risco para o desenvolvimento de tumores mamários espontâneos.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que o consumo de extrato de amora-preta foi capaz de modular o sistema antioxidante e aumentar a fertilidade na geração parental, além de impactar positivamente na sobrevivência da progênie. Na prole feminina, o consumo do extrato pelo pai, pela mãe ou por ambos foi capaz de modular a capacidade antioxidante plasmática e reduzir o risco para o desenvolvimento de câncer de mama, embora o consumo materno tenha sido mais eficiente. No entanto, o consumo materno e/ou paterno de extrato de amora-preta não foi capaz de impactar sobre a suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária quimicamente induzida.

8. REFERÊNCIAS

- ADAMO, A. M.; LLESUY, S. F.; PASQUINI, J. M.; BOVERIS, A. **Brain chemiluminescence and oxidative stress in hyperthyroid rats.** *Biochemical Journal*, 263, 273-7, 1989.
- AHLGREN, M.; SØRENSEN, T.; WOHLFAHRT, J.; HAFLIDADÓTTIR, A.; HOLST C.; MELBYE, M. **Birth weight and risk of breast cancer in a cohort of 106,504 women.** *Int J Cancer*. 2003 Dec 20;107(6):997-1000.
- AIKEN, C. E.; OZANNE, S. E. **Transgenerational developmental programming.** *Hum Reprod Update*. 2014 Jan-Feb;20(1):63-75.
- AITKEN, R. J.; CURRY, B. J. **Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line.** *Antioxid Redox Signal* 2011;14(3):367-81.
- AIYER, H. S.; WARRI, A. M.; WOODE, D. R.; HILAKIVI-CLARKE, L.; CLARKE R. **Influence of berry polyphenols on receptor signaling and cell-death pathways: implications for breast cancer prevention.** *J Agric Food Chem*. 2012 Jun 13;60(23):5693-708.
- ALFARADHI, M. Z.; OZANNE, S. E. **Developmental programming in response to maternal overnutrition.** *Front Genet*. 2011 Jun 3;2:27.
- AMADOU, A.; TORRES-MEJÍA, G.; HAINAUT, P.; ROMIEU, I. **Breast cancer in Latin America: global burden, patterns, and risk factors.** *Salud Publica Mex*. 2014 Oct;56(5):547-54.
- ANDERSON, L. M.; RIFFLE, L.; WILSON, R.; TRAVLOS, G. S.; LUBOMIRSKI, M. S.; ALVORD, W. G. **Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice.** *Nutrition*. 2006 Mar;22(3):327-31.
- ANOTHASINTAWEE, T.; WIRATKAPUN, C.; LERDSITTHICHA, P.; KASAMESUP, V.; WONGWASAYAWAN, S.; SRINAKARIN, J.; HIRUNPAT, S.; WOODTICHARTPREECHA, P.; BOONLIKIT, S.; TEERAWATTANANON, Y.; THAKKINSTIAN, A. **Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis.** *Asia Pac J Public Health*. 2013 Sep;25(5):368-87.
- ARMITAGE, J. A.; TAYLOR, P. D.; POSTON, L. **Experimental models of development programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development.** *J Physiol*. 2005 May 15; 565(Pt 1): 3–8. 2005.
- AROZARENA, Í.; ORTIZ, J.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; URRETAVIZCAYA, I.; SALVATIERRA, S.; CÓRDOVA, I.; MARÍN-ARROYO, M. R.; NORIEGA, M. J.; NAVARRO, M. **Color, ellagitannins, anthocyanins, and antioxidant activity of Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) wines.** *J Agric Food Chem*. 2012 Aug 1;60(30):7463-73.
- ATAOLLAHI, M.; SEDIGHI, S.; MASOUMI, S. Z. **Nutritional and unhealthy behaviors in women with and without breast cancer.** *Iran Red Crescent Med J*. 2014 Sep 5;16(9):e19684.
- AZOFEIFA, G.; QUESADA, S.; BOUDARD, F.; MORENA, M.; CRISTOL, J. P.; PÉREZ, A. M.; VAILLANT, F.; MICHEL, A. **Antioxidant and anti-inflammatory in**

vitro activities of phenolic compounds from tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichos*). J Agric Food Chem. 2013 Jun 19;61(24):5798-804.

BAIK, I.; DEVITO, W. J.; BALLEEN, K.; BECKER, P. S.; OKULICZ, W.; LIU, Q.; DELPAPA, E.; LAGIOU, P.; STURGEON, S.; TRICHOPOULOS, D.; QUESENBERRY, P. J.; HSIEH, C. C. **Association of fetal hormone levels with stem cell potential: evidence for early life roots of human cancer.** Cancer Res. 2005 Jan 1;65(1):358-63.

BAKOS, H. W.; MITCHELL, M.; SETCHELL, B. P.; LANE, M. **The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model.** Int J Androl. 2011 Oct;34(5 Pt 1):402-10.

BARAKAT, T. S.; GRIBNAU, J. **X chromosome inactivation in the cycle of life. Development.** 2012 Jun;139(12):2085-9.

BARKER, D. J.; OSMOND, C. **Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales.** Lancet. 1986 May 10;1(8489):1077-81.

BAUERSCHLAG, D. O.; MAASS, N.; SCHEM, C. **Standard of care and controversies in the adjuvant endocrine treatment of hormone-responsive early breast cancer.** Breast Care (Basel). 2014 Apr;9(4):283-6.

BIESALSKI, H. K.; DRAGSTED, L. O.; ELMADFA, I.; GROSSKLAUS, R.; MÜLLER, M.; SCHRENK, D.; WALTER, P.; WEBER, P. **Bioactive compounds: definition and assessment of activity.** Nutrition. 2009 Nov-Dec;25(11-12):1202-5.

BINGÜL, I.; BAŞARAN-KÜÇÜKGİRGİN, C.; TEKKEŞİN, M. S.; OLGAC, V.; DOĞRU-ABBASOĞLU, S.; UYSAL, M. **Effect of blueberry pretreatment on diethylnitrosamine-induced oxidative stress and liver injury in rats.** Environ Toxicol Pharmacol. 2013 Sep;36(2):529-38.

BOEING, J. S.; BARIZÃO, E. O. E.; SILVA, B. C.; MONTANHER, P. F.; DE CINQUE ALMEIDA, V.; VISENTAINER, J. V. **Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis.** Chem Cent J. 2014 Aug 22;8(1):48.

BOIVIN, D.; BLANCHETTE, M.; BARRETTE, S.; MOGHRABI, A.; BÉLIVEAU, R. **Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFκB by edible berry juice.** Anticancer Res. 2007 Mar-Apr;27(2):937-48.

BOLAYIRLI, I. M.; ASLAN, M.; BALCI, H.; ALTUG, T.; HACIBEKİROĞLU, M.; SEVEN, A. **Effects of atorvastatin therapy on hypercholesterolemic rabbits with respect to oxidative stress, nitric oxide pathway and homocysteine.** Life Sci 2007;81(2):121-7.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** Lebensm. – Wiss. u.- Technol. 28, 25-30, 1995.

BRIFFA, J. F.; MCAINCH, A. J.; ROMANO, T.; WLODEK, M. E.; HRYCIW, D. H. **Leptin in pregnancy and development: a contributor to adulthood disease?** Am J Physiol Endocrinol Metab. 2015.

BROWN, S. B.; HANKINSON, S. E. **Endogenous estrogens and the risk of breast, endometrial, and ovarian cancers.** Steroids. 2015; 99(Pt A):8-10.

- BUIZER-VOSKAMP, J. E.; LAAN, W.; STAAL, W. G.; HENNEKAM, E. A.; AUKES, M. F.; TERMORSHUIZEN, F.; KAHN, R.S.; BOKS, M. P.; OPHOFF, R. A. **Paternal age and psychiatric disorders: findings from a Dutch population registry.** Schizophr Res. 2011 Jul;129(2-3):128-32.
- BUKOWSKI, R.; CHLEBOWSKI, R. T.; THUNE, I.; FURBERG, A. S.; HANKINS, G. D.; MALONE, F. D.; D'ALTON, M. E. **Birth weight, breast cancer and the potential mediating hormonal environment.** PLoS One. 2012;7(7):e40199.
- CALKINS, K.; DEVASKAR, S. U. **Fetal origins of adult disease.** Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care. 2011 Jul;41(6):158-76.
- CARONE, B. R.; FAUQUIER, L.; HABIB, N.; SHEA, J. M.; HART, C. E.; LI, R.; BOCK, C.; LI, C.; GU, H.; ZAMORE, P. D.; MEISSNER, A.; WENG, Z.; HOFMANN, H. A.; FRIEDMAN, N.; RANDO, O. J. **Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals.** Cell. 2010 Dec 23;143(7):1084-96.
- CARRELL, D. T. **Epigenetics of the male gamete.** Fertil Steril. 2012 Feb;97(2):267-74.
- CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNANDEZ, M. L.; PAEZ-HERNANDEZ, E.; RODRIGUEZ, J. A.; GALAN-VIDAL, C. A. **Chemical studies of anthocyanins: A review.** Food Chemistry 2009;113:859–871
- CHAE, H. J.; YIM, J. E.; KIM, K. A.; CHYUN, J. H. **Hepatoprotective effects of Rubus coreanus miquel concentrates on liver injuries induced by carbon tetrachloride in rats.** Nutr Res Pract. 2014 Feb;8(1):40-5.
- CHEN, Y. P.; XIAO, X. M.; LI, J.; REICHETZEDER, C.; WANG, Z. N.; HOCHER, B. **Paternal body mass index (BMI) is associated with offspring intrauterine growth in a gender dependent manner.** PLoS One. 2012;7(5):e36329.
- CHO, B. O.; RYU, H. W.; JIN, C. H.; CHOI, D. S.; KANG, S. Y.; KIM, D. S.; BYUN, M. W.; JEONG, I. Y. **Blackberry extract attenuates oxidative stress through up-regulation of Nrf2-dependent antioxidant enzymes in carbon tetrachloride-treated rats.** J Agric Food Chem. 2011 Nov 9;59(21):11442-8.
- COONEY, C. A.; DAVE, A. A.; WOLFF, G. L. **Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring.** J Nutr. 2002 Aug;132(8 Suppl):2393S-2400S.
- COOPER, R.; HYPPÖNEN, E.; BERRY, D.; POWER, C. **Associations between parental and offspring adiposity up to midlife: the contribution of adult lifestyle factors in the 1958 British Birth Cohort Study.** Am J Clin Nutr. 2010 Oct;92(4):946-53.
- COSTA, M. R.; PIRES, K. M.; NALBONES-BARBOSA, M. N.; DOS SANTOS VALENÇA, S.; RESENDE, Â. C.; DE MOURA, R. S. **Grape skin extract-derived polyphenols modify programming-induced renal endowment in prenatal protein-restricted male mouse offspring.** Eur J Nutr. 2015 Jun 22.
- CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. **Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health.** Nat Prod Rep 2009;26(8):1001-43.
- CRUME, T. L.; SHAPIRO, A. L.; BRINTON, J. T.; GLUECK, D. H.; MARTINEZ, M.; KOHN, M.; HARROD, C.; FRIEDMAN, J. E.; DABELEA, D. **Maternal Fuels**

and Metabolic Measures during Pregnancy and Neonatal Body Composition: The Healthy Start Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Jan 9;jc20142949.

CUEVAS-RODRÍGUEZ, E. O.; YOUSEF, G. G.; GARCÍA-SAUCEDO, P. A.; LÓPEZ-MEDINA, J.; PAREDES-LÓPEZ, O.; LILA, M. A. **Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in wild and domesticated Mexican blackberries (*Rubus* spp.).** *J Agric Food Chem.* 2010 Jun 23;58(12):7458-64.

CURHAN, G. C.; WILLETT, W. C.; RIMM, E. B.; SPIEGELMAN, D.; ASCHERIO, A. L.; STAMPFER, M. J. **Birthweight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men.** *Circulation.* 1996 Dec 15;94(12):3246-50.

DAI, J.; PATEL, J. D.; MUMPER, R. J. **Characterization of blackberry extract and its antiproliferative and anti-inflammatory properties.** *J Med Food.* 2007 Jun;10(2):258-65.

D'ALESSANDRO, M. E.; OLIVA, M. E.; FORTINO, M. A.; CHICCO, A. **Maternal sucrose-rich diet and fetal programming: changes in hepatic lipogenic and oxidative enzymes and glucose homeostasis in adult offspring.** *Food Funct.* 2014 Mar;5(3):446-53.

DALMAU, E.; ARMENGOL-ALONSO, A.; MUÑOZ, M.; SEGUÍ-PALMER, M. Á. **Current status of hormone therapy in patients with hormone receptor positive (HR+) advanced breast cancer.** *Breast.* 2014 Dec;23(6):710-720.

DE ASSIS, S.; WARRI, A.; CRUZ, M. I.; LAJA, O.; TIAN, Y.; ZHANG, B.; WANG, Y.; HUANG, T. H.; HILAKIVI-CLARKE, L. **High-fat or ethinyl-oestradiol intake during pregnancy increases mammary cancer risk in several generations of offspring.** *Nat Commun.* 2012;3:1053.

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.** *J Nutr Biochem.* 2014 Jun;25(6):613-22.

DEL BAS, J. M.; CRESCENTI, A.; AROLA-ARNAL, A.; OMS-OLIU, G.; AROLA, L.; CAIMARI, A. **Intake of grape procyanidins during gestation and lactation impairs reverse cholesterol transport and increases atherogenic risk indexes in adult offspring.** *J Nutr Biochem.* 2015 Dec;26(12):1670-7.

DING, M.; FENG, R.; WANG, S. Y.; BOWMAN, L.; LU, Y.; QIAN, Y.; CASTRANOVA, V.; JIANG, B. H.; SHI, X. **Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity.** *J Biol Chem.* 2006 Jun 23;281(25):17359-68.

DONADIO, J. L. S. **Polimorfismos nos genes da enzima glutatona peroxidase e biomarcadores do estado nutricional relativo ao selênio em população adulta de São Paulo.** Tese de doutorado. 2011.

ECONOMOPOULOU, P.; DIMITRIADIS, G.; PSYRRI, A. **Beyond BRCA: New hereditary breast cancer susceptibility genes.** *Cancer Treat Rev.* 2015 Jan;41(1):1-8.

ELMORE, S. A.; DIXON, D.; HAILEY, J. R.; HARADA, T.; HERBERT, R. A.; MARONPOT, R. R.; NOLTE, T.; REHG, J. E.; RITTINGHAUSEN, S.; ROSOL, T. J.; SATOH, H.; VIDAL, J. D.; WILLARD-MACK, C. L.; CREASY, D. M. **Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group.** *Toxicol Pathol.* 2016.

- ESKENAZI, B.; WYROBEK, A. J.; SLOTER, E.; KIDD, S. A.; MOORE, L.; YOUNG, S.; MOORE, D. **The association of age and semen quality in healthy men.** Hum Reprod. 2003 Feb;18(2):447-54
- ESLAMIAN, G.; AMIRJANNATI, N.; RASHIDKHANI, B.; SADEGHI, M. R.; HEKMATDOOST, A. **Intake of food groups and idiopathic asthenozoospermia: a case-control study.** Hum Reprod. 2012 Nov;27(11):3328-36.
- ESTELLER, M. **Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps.** Nature Review Genetics 2007;8: 286-298
- EWEN, K. A.; KOOPMAN, P. **Mouse germ cell development: from specification to sex determination.** Mol Cell Endocrinol. 2010 Jul 8;323(1):76-93.
- EWING, J. F.; JANERO, D. R. **Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator.** Anal Biochem. 232, 243-8, 1995.
- FAN, J.; JOHNSON, M. H.; LILA, M. A.; YOUSEF, G.; DE MEJIA, E. G. **Berry and citrus phenolic compounds inhibit dipeptidyl peptidase iv: implications in diabetes management.** Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:479505.
- FENECH, M. **Genome health nutrigenomics and nutrigenetics- diagnosis and nutritional treatment of genome damage on an individual basis.** Food Chem Toxicol, v. 46 (4), p. 1365 – 1370, 2008.
- FENG, Y.; ZHAO, L. Z.; HONG, L.; SHAN, C.; SHI, W.; CAI, W. **Alteration in methylation pattern of GATA-4 promoter region in vitamin A-deficient offspring's heart.** J Nutr Biochem. 2013 Jul;24(7):1373-80.
- FERGUSON-SMITH, A. C.; PATTI, M. E. **You are what your dad ate.** Cell Metab. 2011 Feb 2;13(2):115-7.
- FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, **Cancer Incidence and Mortality Worldwide:** IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 26/01/2015.
- FERREIRA DE ARAUJO, P. R.; DA SILVA SANTOS, V.; RODRIGUES MACHADO, A.; GEVEHR FERNANDES, C.; SILVA, J. A.; DA SILVA RODRIGUES, R. **Benefits of blackberry nectar (Rubus spp.) relative to hypercholesterolemia and lipid peroxidation.** Nutr Hosp. 2011 Sep-Oct;26(5):984-90.
- FINKIELSTAIN, G. P.; LUI, J. C.; BARON, J. **Catch-up growth: cellular and molecular mechanisms.** World Rev Nutr Diet. 2013;106:100-4.
- FOWDEN, A. L.; COAN, P. M.; ANGIOLINI, E.; BURTON, G. J.; CONSTANCIA, M. **Imprinted genes and the epigenetic regulation of placental phenotype.** Prog Biophys Mol Bio. v. 106 (1), p. 281-8, 2011.
- FRITH, C. H; WARD, J. M. **Color atlas of neoplastic and non-neoplastic lesions in aging mice.** Elsevier, Amsterdam - Oxford - New York - Tokyo , 1988.
- FULLSTON, T.; PALMER, N. O.; OWENS, J. A.; MITCHELL, M.; BAKOS, H. W.; LANE, M. **Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice.** Hum Reprod. 2012 May;27(5):1391-400.

GAO, J.; SUN, C. R.; YANG, J. H.; SHI, J. M.; DU, Y. G.; ZHANG, Y. Y.; LI, J. H.; WAN, H. T. **Evaluation of the hepatoprotective and antioxidant activities of *Rubus parvifolius* L.** J Zhejiang Univ Sci B. 2011 Feb;12(2):135-42.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; BEEDLE, A. S. **Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective.** Am J Hum Biol. 2007 Jan-Feb;19(1):1-19.

GRASEMANN, C.; DEVLIN, M. J.; RZECZKOWSKA, P. A.; HERRMANN, R.; HORSTHEMKE, B.; HAUFFA, B. P.; GRYNPAS, M.; ALM, C.; BOUXSEIN, M. L.; PALMERT, M. R. **Parental diabetes: the Akita mouse as a model of the effects of maternal and paternal hyperglycemia in wildtype offspring.** PLoS One. 2012;7(11):e50210.

GUERRIERO, G.; TROCCHIA, S.; ABDEL-GAWAD, F. K.; CIARCIA, G. **Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation.** Front Endocrinol (Lausanne). 2014 Apr 22;5:56.

HAGER, T. J.; HOWARD, L. R.; PRIOR, R. L. **Processing and storage effects on the ellagitannin composition of processed blackberry products.** J Agric Food Chem. 2010 Nov 24;58(22):11749-54.

HARDER, T.; RODEKAMP, E.; SCHELLONG, K.; DUDENHAUSEN, J. W.; PLAGEMANN, A. **Birth Weight and Subsequent Risk of Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis.** Am J Epidemiol. 2007 Apr;165(8):849-57.

HASSIMOTTO, N. M.; LAJOLO, F. M. **Antioxidant status in rats after long-term intake of anthocyanins and ellagitannins from blackberries.** J Sci Food Agric. 2011 Feb;91(3):523-31.

HASSIMOTTO, N. M.; PINTO, M. D. A. S.; LAJOLO, F. M. **Antioxidant status in humans after consumption of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) juices with and without defatted milk.** J Agric Food Chem. 2008 Dec 24;56(24):11727-33.

HEYMAN, L.; AXLING, U.; BLANCO, N.; STERNER, O.; HOLM, C.; BERGER, K. **Evaluation of beneficial metabolic effects of berries in high-fat fed C57BL/6J mice.** J Nutr Metab. 2014;2014:403041.

HILAKIVI-CLARKE, L.; CHO, E.; CABANES, A.; DEASSIS, S.; OLIVO, S.; HELFERICH, W.; LIPPMAN, M. E.; CLARKE, R. **Dietary modulation of pregnancy estrogen levels and breast cancer risk among female rat offspring.** Clin Cancer Res. 2002 Nov;8(11):3601-10.

HILAKIVI-CLARKE, L.; CHO, E.; CLARKE, R. **Maternal genistein exposure mimics the effects of estrogen on mammary gland development in female mouse offspring.** Oncol Rep. 1998 May-Jun;5(3):609-16.

HILAKIVI-CLARKE, L.; CLARKE, R.; ONOJAFE, I.; RAYGADA, M.; CHO, E.; LIPPMAN, M. **A maternal diet high in n - 6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Aug 19;94(17):9372-7.

HILAKIVI-CLARKE, L. **Maternal exposure to diethylstilbestrol during pregnancy and increased breast cancer risk in daughters.** Breast Cancer Res. 2014;16(2):208.

HILL, J.; HODSDON, W. **In utero exposure and breast cancer development: an epigenetic perspective.** J Environ Pathol Toxicol Oncol. 2014;33(3):239-45.

HO, E.; BEAVER, L. M.; WILLIAMS, D. E.; DASHWOOD, R. H. **Dietary factors and epigenetic regulation for prostate cancer prevention.** Adv Nutr. 2011 Nov;2(6):497-510.

HOCHER, B. **More than genes: the advanced fetal programming hypothesis.** J Reprod Immunol. 2014 Oct;104-105:8-11.

HODGSON, M.E.; NEWMAN, B.; MILLIKAN, R.C. **Birthweight, parental age, birth order and breast cancer risk in African-American and white women: a population-based case-control study.** Breast Cancer Res. v. 6, p. 656-667, 2004.

HOOVER, R. N.; HYER, M.; PFEIFFER, R. M. et al. **Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol.** N Engl J Med. 2011 Oct 6;365(14):1304-14.

HSIAO, F. H.; KUO, W. H.; JOW, G. M. et al. **Habitual sleep-wake behaviors and lifestyle as predictors of diurnal cortisol patterns in young breast cancer survivors: A longitudinal study.** Psychoneuroendocrinology. 2015;53:60-68.

HUZELL, L.; PERSSON, M.; SIMONSSON, M. et al. **History of oral contraceptive use in breast cancer patients: impact on prognosis and endocrine treatment response.** Breast Cancer Res Treat. 2015;149(2):505-15.

HYBERTSON, B. M.; GAO, B.; BOSE, S. K.; MCCORD, J. M. **Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation.** Mol Aspects Med. 2011 Aug;32(4-6):234-46.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Programa Nacional de Controle do Câncer de Mama.** (http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil/programa_controle_cancer_mama/fatores_risco) acesso em 27 de novembro de 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2014:** Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, 2014.

IVANOVA, E.; CHEN, J. H.; SEGONDS-PICHON, A.; OZANNE, S. E.; KELSEY, G. **DNA methylation at differentially methylated regions of imprinted genes is resistant to developmental programming by maternal nutrition.** Epigenetics. 2012 Oct;7(10):1200-10.

JENSEN, T. K.; HEITMANN, B. L.; JENSEN, M. B. et al. **High dietary intake of saturated fat is associated with reduced semen quality among 701 young Danish men from the general population.** Am J Clin Nutr. 2013 Feb;97(2):411-8.

JEON, J. H.; SHIN, S.; PARK, D. et al. **Fermentation filtrates of *Rubus coreanus* relax the corpus cavernosum and increase sperm count and motility.** J Med Food. 2008 Sep;11(3):474-8.

JIANG, Y. G.; PENG, T.; LUO, Y.; LI, M. C.; LIN, Y. H. **Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2, 5-hexanedione.** Chin Med J (Engl)2008;121(13):1204-9.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. **The epigenomics of cancer.** Cell. 2007 Feb 23;128(4):683-92.

JORDHEIM, M.; ENERSTVEDT, K. H.; ANDERSEN, O. M. **Identification of cyaniding 3-O-β-(6''-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl)glucoside) and other**

- anthocyanins from wild and cultivated blackberries.** J Agric Food Chem. 2011 Jul 13;59(13):7436-40.
- JOUAD, H.; MAGHRANI, M.; EDDOUKS, M. **Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin- induced diabetic rats.** J Ethnopharmacol. 2002 Aug;81(3):351-6.
- JUAN, M. E.; GONZÁLEZ-PONS, E.; MUNUERA, T. et al. **trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats.** J Nutr 2005;135(4):757-60.
- KAAR, J. L.; BRINTON, J. T.; CRUME, T. et al. **Leptin levels at birth and infant growth: the EPOCH study.** J Dev Orig Health Dis. 2014 Jun;5(3):214-8.
- KAKKOURA, M. G.; DEMETRIOU, C. A.; LOIZIDOU, M. A. et al. **Single-nucleotide polymorphisms in one-carbon metabolism genes, Mediterranean diet and breast cancer risk: a case-control study in the Greek-Cypriot female population.** Genes Nutr. 2015 Mar;10(2):453.
- KAUME, L.; HOWARD, L. R.; DEVAREDDY, L. **The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits.** J Agric Food Chem. 2012 Jun 13;60(23):5716-27.
- KAUR, P.; SHOREY, L. E.; HO, E.; DASHWOOD, R. H.; WILLIAMS, D. E. **The epigenome as a potential mediator of cancer and disease prevention in prenatal development.** Nutr Rev. 2013 Jul;71(7):441-57.
- KAUSAR, H.; JEYABALAN, J.; AQIL, F. et al. **Berry anthocyanidins synergistically suppress growth and invasive potential of human non-small-cell lung cancer cells.** Cancer Lett. 2012 Dec 1;325(1):54-62.
- KAYA, K.; CIFTCI, O.; CETIN, A.; DOĞAN, H.; BAŞAK, N. **Hesperidin protects testicular and spermatological damages induced by cisplatin in rats.** Andrologia. 2014 Sep 13.
- KIM, H. W.; CHOI, Y. J.; KIM, K. N.; TAMURA, T.; CHANG, N. **Effect of paternal folate deficiency on placental folate content and folate receptor α expression in rats.** Nutr Res Pract. 2011 Apr;5(2):112-6.
- KIM, H. W.; KIM, K. N.; CHOI, Y. J.; CHANG, N. **Effects of paternal folate deficiency on the expression of insulin-like growth factor-2 and global DNA methylation in the fetal brain.** Mol Nutr Food Res. 2013 Apr;57(4):671-6.
- KOUZARIDES, T. **Chromatin modifications and their function.** Cell. 2007 Feb 23;128(4):693-705.
- KRUK, J. **Lifestyle components and primary breast cancer prevention.** Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(24):10543-10555.
- KRUK, J. **Overweight, obesity, oxidative stress and the risk of breast cancer.** Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(22):9579-86.
- LAGIOU, P.; LAGIOU, A.; SAMOLI, E. et al. **Diet during pregnancy and levels of maternal pregnancy hormones in relation to the risk of breast cancer in the offspring.** Eur J Cancer Prev. 2006 Feb;15(1):20-6.
- LAGIOU, P.; SAMOLI, E.; HSIEH, C. C. et al. **Maternal and cord blood hormones in relation to birth size.** Eur J Epidemiol. 2014 May;29(5):343-51.

- LAGIOU, P.; SAMOLI, E.; OKULICZ, W. et al. **Maternal and cord blood hormone levels in the United States and China and the intrauterine origin of breast cancer.** *Ann Oncol.* 2011 May;22(5):1102-8.
- LAKSHMY, R. **Metabolic syndrome: role of maternal undernutrition and fetal programming.** *Rev Endocr Metab Disord.* 2013 Sep;14(3):229-40.
- LANE, M.; MCPHERSON, N. O.; FULLSTON, T. et al. **Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring.** *PLoS One.* 2014 Jul 9;9(7):e100832.
- LANFRANCHI, A. **Normal breast physiology: the reasons hormonal contraceptives and induced abortion increase breast-cancer risk.** *Issues Law Med.* 2014 Spring;29(1):135-46.
- LEDIG, M.; MISSLIN, R.; VOGEL, E. et al. **Paternal alcohol exposure: developmental and behavioral effects on the offspring of rats.** *Neuropharmacology.* 1998;37(1):57-66.
- LEE, E. H.; PARK, S. K.; PARK, B. et al. **Effect of BRCA1/2 mutation on short-term and long-term breast cancer survival: a systematic review and meta-analysis.** *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jul;122(1):11-25.
- LEVIN, S.; BUCCI, T. J.; COHEN, S. M. et al. **The nomenclature of cell death: recommendations of an ad hoc Committee of the Society of Toxicologic Pathologists.** *Toxicol Pathol.* 1999 Jul-Aug;27(4):484-90.
- LEVINE, A. S.; KOTZ, C. M.; GOSNELL, B. A. **Sugars: hedonic aspects, neuroregulation, and energy balance.** *Am J Clin Nutr.* 2003 Oct;78(4):834S-842S.
- LI, Y.; LU, J.; PAXTON, J. W. **The role of ABC and SLC transporters in the pharmacokinetics of dietary and herbal phytochemicals and their interactions with xenobiotics.** *Curr Drug Metab.* 2012 Jun 1;13(5):624-39.
- LI, Y.; SALDANHA, S. N.; TOLLEFSBOL, T. O. **Impact of epigenetic dietary compounds on transgenerational prevention of human diseases.** *AAPS J.* 2014 Jan;16(1):27-36.
- LIAO, S.; LI, J.; WEI, W. et al. **Association between diabetes mellitus and breast cancer risk: a meta-analysis of the literature.** *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(4):1061-5.
- LIPÍŃSKA, L.; KLEWICKA, E.; SÓJKA, M. **The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review.** *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2014 Jul-Sep;13(3):289-99.
- LY, C.; YOCKELL-LELIÈVRE, J.; FERRARO, Z. M. et al. **The effects of dietary polyphenols on reproductive health and early development.** *Hum Reprod Update.* 2014 Nov 5.
- LYNCH, B. M.; NEILSON, H. K.; FRIEDENREICH, C. M. **Physical activity and breast cancer prevention.** *Recent Results Cancer Res.* 2011;186:13-42.
- MANAVATHI, B.; SAMANTHAPUDI, V. S.; GAJULAPALLI, V. N. **Estrogen receptor coregulators and pioneer factors: the orchestrators of mammary gland cell fate and development.** *Front Cell Dev Biol.* 2014 Aug 12;2:34.
- MCPHERSON, N. O.; FULLSTON, T.; AITKEN, R. J.; LANE, M. **Paternal obesity, interventions, and mechanistic pathways to impaired health in offspring.** *Ann Nutr Metab.* 2014;64(3-4):231-8.

- MEIER-ABT, F.; BENTIREN-ALJ, M. **How pregnancy at early age protects against breast cancer.** Trends Mol Med. 2014 Mar;20(3):143-53.
- MELNIK, B. C.; JOHN, S.; SCHMITZ, G. **Milk consumption during pregnancy increases birth weight, a risk factor for the development of diseases of civilization.** J Transl Med. 2015 Jan 16;13(1):13.
- MENEZES, P. R.; LEWIS, G.; RASMUSSEN, F. et al. **Paternal and maternal ages at conception and risk of bipolar affective disorder in their offspring.** Psychol Med. 2010 Mar;40(3):477-85.
- MICHELS, K. B.; TRICHOPOULOS, D.; ROBINS, J. M. et al. **Birthweight as a risk factor for breast cancer.** Lancet. 1996 Dec 7;348(9041):1542-6.
- MICHELS, K. B.; XUE, F. **Role of birthweight in the etiology of breast cancer.** Int J Cancer. 2006 Nov 1;119(9):2007-25
- MIERSCH, C.; DÖRING, F. **Paternal dietary restriction affects progeny fat content in *Caenorhabditis elegans*.** IUBMB Life. 2012 Jul;64(7):644-8.
- MILOSEVIĆ, M.; SRDIĆ, B.; STOKIĆ, E. et al. **Birth weight and metabolic risk in women of different nutrition levels.** Med Pregl. 2012 Nov-Dec;65(11-12):483-8.
- MINAMI, A.; NAKANISHI, A.; OGURA, Y. et al. **Connection between Tumor Suppressor BRCA1 and PTEN in Damaged DNA Repair.** Front Oncol. 2014 Nov 10;4:318.
- MOBARAKEH, Z. S.; MIRZAEI, K.; HATMI, N. et al. **Dietary habits contributing to breast cancer risk among Iranian women.** Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(21):9543-7.
- MOORE, G. E.; ISHIDA, M.; DEMETRIOU, C. et al. **The role and interaction of imprinted genes in human fetal growth.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015 Mar 5;370(1663).
- MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D. et al. **Natural antioxidants from residual sources.** Food Chemistry 72 (2001) 145-171.
- MOUROUTI, N.; KONTOGIANNI, M. D.; PAPAVALAGELIS, C. et al. **Meat consumption and breast cancer: A case-control study in women.** Meat Sci. 2014 Oct 23;100C:195-201.
- MUGHAL, I. A.; IRFAN, A.; HAMEED, A.; JAHAN, S. **Sperm mitochondrial DNA 15bp deletion of cytochrome c oxidase subunit III is significantly associated with human male infertility in Pakistan.** J Pak Med Assoc. 2016 Jan;66(1):3-7.
- MUNOZ-VALVERDE, D.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, P.; GUTIERREZ-ARZAPALO, P. Y. et al. **Effect of fetal undernutrition and postnatal overfeeding on rat adipose tissue and organ growth at early stages of postnatal development.** Physiol Res. 2014 Dec 3.
- MURAPA, P.; DAI, J.; CHUNG, M. et al. **Anthocyanin-rich fractions of blackberry extracts reduce UV-induced free radicals and oxidative damage in keratinocytes.** Phytother Res. 2012 Jan;26(1):106-12.
- NAGATA, C.; IWASA, S.; SHIRAKI, M. et al. **Associations among maternal soy intake, isoflavone levels in urine and blood samples, and maternal and umbilical hormone concentrations (Japan).** Cancer Causes Control. 2006 Nov;17(9):1107-13

- NG, S. F.; LIN, R. C.; LAYBUTT, D. R. et al. **Chronic high-fat diet in fathers programs β -cell dysfunction in female rat offspring.** Nature. 2010 Oct 21;467(7318):963-6.
- NG, S. F.; LIN, R. C.; MALONEY, C. A. et al. **Paternal high-fat diet consumption induces common changes in the transcriptomes of retroperitoneal adipose and pancreatic islet tissues in female rat offspring.** FASEB J. 2014 Apr;28(4):1830-41.
- NOGUEIRA, F. N. **Sistema antioxidante e peroxidação lipídica em glândulas salivares de ratos diabéticos.** Tese de doutorado. São Paulo. 2004.
- NOVAKOVIC, B.; SAFFERY, R. **The ever growing complexity of placental epigenetics - role in adverse pregnancy outcomes and fetal programming.** Placenta. 2012 Dec;33(12):959-70.
- OHLUND, I.; HERNELL, O.; HÖRNELL, A.; STENLUND, H.; LIND, T. **BMI at 4 years of age is associated with previous and current protein intake and with paternal BMI.** Eur J Clin Nutr. 2010 Feb;64(2):138-45.
- ONG, T. P.; MORENO, F. S.; ROSS, S. A. **Targeting the epigenome with bioactive food components for cancer prevention.** J Nutrigenet Nutrigenomics. 2011;4(5):275-92.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **The top 10 causes of death.** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html>> acesso em: 26/01/2015.
- PAINTER, R. B.; ROSEBOOM, T. J.; VAN MONTFRANS, G. A. et al. **Microalbuminuria in adults after prenatal exposure to the dutch famine.** J Am Soc Nephrol. 2005 Jan; 16(1): 189–94.b
- PAINTER, R. C.; DE ROOIJ, S. R.; BOSSUYT, P. M. et al. **Early onset of coronary artery disease after prenatal exposure to the Dutch famine.** Am J Clin Nutr. 2006 Aug;84(2):322-7.
- PAINTER, R. C.; ROSEBOOM, T. J.; BLEKER, O. P. **Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: An overview.** Reprod Toxicol. 2005 Sep-Oct;20(3):345-52.
- PALATIANOU, M. E.; SIMOS, Y. V.; ANDRONIKOU, S. K.; KIORTSIS, D. N. **Long-term metabolic effects of high birth weight: a critical review of the literature.** Horm MetabRes. 2014 Dec;46(13):911-20.
- PALMER, J. R.; WISE, L. A.; HATCH, E. E. et al. **Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006 Aug;15(8):1509-14.
- PALUSZCZAK, J.; KRAJKA-KUŹNIAK, V.; BAER-DUBOWSKA, W. **The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells.** Toxicol Lett. 2010 Feb 1;192(2):119-25.
- PAPOUTSIS, A. J.; SELMIN, O. I.; BORG, J. L.; ROMAGNOLO, D. F. **Gestational exposure to the AhR agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces BRCA-1 promoter hypermethylation and reduces BRCA-1 expression in mammary tissue of rat offspring: Preventive effects of resveratrol.** Mol Carcinog. 2013 Oct 17.
- PARK, S. K.; GARCIA-CLOSAS, M.; LISSOWSKA, J. et al. **Intrauterine environment and breast cancer risk in a population-based case-control study in Poland.** Int J Cancer. 2006 Nov 1;119(9):2136-41.

- PAUL, C.; ROBAIRE, B. **Ageing of the male germ line.** *Nat Rev Urol.* 2013 Apr;10(4):227-34.
- PAUL, M. J.; TUTHILL, C.; KAUFFMAN, A. S.; ZUCKER, I. **Pelage insulation, litter size, and ambient temperature impact maternal energy intake and offspring development during lactation.** *Physiol Behav.* 2010 May 11;100(2):128-34.
- PETTAPIECE-PHILLIPS, R.; NAROD, S. A.; KOTSOPOULOS, J. **The role of body size and physical activity on the risk of breast cancer in BRCA mutation carriers.** *Cancer Causes Control.* 2015 Jan 13.
- PIRES, V. C.; GOLLÜCKE, A. P.; RIBEIRO, D. A. et al. **Grape juice concentrate protects reproductive parameters of male rats against cadmium-induced damage: a chronic assay.** *Br J Nutr.* 2013 May 9;110(5):1-10.
- PLATT, K. L.; EDENHARDER, R.; ADERHOLD, S. et al. **Fruits and vegetables protect against the genotoxicity of heterocyclic aromatic amines activated by human xenobiotic-metabolizing enzymes expressed in immortal mammalian cells.** *Mutat Res.* 2010 Dec 21;703(2):90-8.
- PORTHA, B.; CHAVEY, A.; MOVASSAT, J. **Early-life origins of type 2 diabetes: fetal programming of the beta-cell mass.** *Exp Diabetes Res.* 2011;2011:105076.
- PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L. et al. **Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples.** *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3273–9, 2003.
- PULEO, C. M.; SCHMEIDLER, J.; REICHENBERG, A. et al. **Advancing paternal age and simplex autism.** *Autism.* 2012 Jul;16(4):367-80.
- RAHAL, O. M.; PABONA, J. M.; KELLY, T. et al. **Suppression of Wnt1-induced mammary tumor growth and lower serum insulin in offspring exposed to maternal blueberry diet suggest early dietary influence on developmental programming.** *Carcinogenesis.* 2013 Feb;34(2):464-74.
- RAJENDRAN, P.; HO, E.; WILLIAMS, D. E.; DASHWOOD, R. H. **Dietary phytochemicals, HDAC inhibition, and DNA damage/repair defects in cancer cells.** *Clin Epigenetics.* 2011;3(1):4.
- RAMÍREZ-VÉLEZ, R. **In utero fetal programming and its impact on health in adulthood.** *Endocrinol Nutr.* 2012 Jun-Jul;59(6):383-93.
- RAVELLI, A. C.; VAN DER MEULEN, J. H.; OSMOND, C. et al. **Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally.** *Am J Clin Nutr.* 1999 Nov;70(5):811-6.
- REED, C. E.; FENTON, S. E. **Exposure to diethylstilbestrol during sensitive life stages: a legacy of heritable health effects.** *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2013 Jun;99(2):134-46.
- REICHENBERG, A.; GROSS, R.; WEISER, M. et al. **Advancing paternal age and autism.** *Arch Gen Psychiatry.* 2006 Sep;63(9):1026-32.
- RODRIGO, R.; MIRANDA, A.; VERGARA, L. **Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease.** *Clin Chim Acta* 2011;412(5-6):410-24.
- RØNN, P. F.; SMITH, L. S.; ANDERSEN, G. S. et al. **Birth Weight and Risk of Adiposity among Adult Inuit in Greenland.** *PLoS One.* 2014 Dec 31;9(12):e115976.

- ROSEBOOM, T.; DE ROOIJ, S.; PAINTER, R. **The Dutch famine and its long-term consequences for adult health.** Early Hum Dev. 2006 Aug;82(8):485-91.
- ROSEBOOM, T. J.; VAN DER MEULEN, J. H.; OSMOND, C. et al. **Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine.** Am J Clin Nutr. 2000 Nov;72(5):1101-6.
- ROSSI, R. E.; PERICLEOUS, M.; MANDAIR, D. et al. **The role of dietary factors in prevention and progression of breast cancer.** Anticancer Res. 2014 Dec;34(12):6861-6875.
- RUSSO, J.; RUSSO, I. H. **Development of the human breast.** Maturitas. 2004 Sep 24;49(1):2-15.
- SANDERSON, M.; WILLIAMS, M. A.; MALONE, K. E. et al. **Perinatal factors and risk of breast cancer.** Epidemiology. 1996 Jan;7(1):34-7.
- SANTOS, F.; DEAN, W. **Epigenetic reprogramming during early development in mammals.** Reproduction, v. 127, p. 643-651, 2004.
- SARADHA, B.; MATHUR, P. P. **Effect of environmental contaminants on male reproduction.** Environ Toxicol Pharmacol 2006;21(1):34-41
- SARAIVA, L.A.; CASTELAN, F.P.; SHITAKUBO, R. et al. **Black leaf streak disease affects starch metabolism in banana fruit.** J. Agric. Food Chem. 61, 5582–5589, 2013.
- SCHENNINK, A.; TROTT, J. F.; BERRYHILL, G. E. et al. **Alcohol intake stimulates epithelial proliferation in an authentic model of the human breast.** Reprod Toxicol. 2014 Nov 1.pii: S0890-6238(14)00284-6.
- SCOCCIANI, C.; LAUBY-SECRETAN, B.; BELLO, P. Y. et al. **Female breast cancer and alcohol consumption: a review of the literature.** Am J Prev Med. 2014 Mar;46(3 Suppl 1):S16-25.
- SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; ZHANG, Y. et al. **Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro.** J Agric Food Chem. 2006 Dec 13;54(25):9329-39.
- SELLERS, R. S.; MORTION, D.; MICHAEL, B. et al. **Society of toxicologic pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies.** Toxicologic Pathology, 2007, 35:751-755.
- SHARMA, S., KELLY, T.K., JONES, P.A. **Epigenetics in Cancer.** Carcinogenesis 2010; 31(1): 27–36.
- SHIN, S.; JEON, J. H.; PARK, D. et al. **trans-Resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo.** Arch Pharm Res. 2008 Jan;31(1):83-7.
- SHIOVITZ, S.; KORDE, L. A. **Genetics of breast cancer: a topic in evolution.** Ann Oncol. 2015 Jan 20.
- SKAKKEBAEK, N. E.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; BUCK LOUIS, G. M. et al. **Male reproductive disorders and fertility trends: influences of environment and genetic susceptibility.** Physiol Rev. 2016 Jan;96(1):55-97.
- SKINNER, M. K. **Metabolic disorders: Fathers' nutritional legacy.** Nature. 2010 Oct 21;467(7318):922-3.

SOOKOIAN, S.; GIANOTTI, T. F.; BURGUEÑO, A. L.; PIROLA, C. J. **Fetal metabolic programming and epigenetic modifications: a systems biology approach.** *Pediatr Res.* 2013 Apr;73(4 Pt 2):531-42.

SOOKOIAN, S.; PIROLA, C. J. **Epigenetics of insulin resistance: an emerging field in translational medicine.** *Curr Diab Rep.* 2013 Apr;13(2):229-37.

SOUBRY, A.; MURPHY, S. K.; WANG, F. et al. **Newborns of obese parents have altered DNA methylation patterns at imprinted genes.** *Int J Obes (Lond).* 2013 Oct 25.

STEFĂNUȚ, M. N.; CĂȚA, A.; POP, R. et al. **Anti-hyperglycemic effect of bilberry, blackberry and mulberry ultrasonic extracts on diabetic rats.** *Plant Foods Hum Nutr.* 2013 Dec;68(4):378-84.

STEPHENS, T. V.; WOO, H.; INNIS, S. M.; ELANGO, R. **Healthy pregnant women in Canada are consuming more dietary protein at 16- and 36-week gestation than currently recommended by the Dietary Reference Intakes, primarily from dairy food sources.** *Nutr Res.* 2014 Jul;34(7):569-76.

STOUT, S. A.; ESPEL, E. V.; SANDMAN, C. A. et al. **Fetal programming of children's obesity risk.** *Psychoneuroendocrinology.* 2014 Dec 17;53C:29-39.

STRAKOVSKY, R. S.; PAN, Y. X. **In utero oxidative stress epigenetically programs antioxidant defense capacity and adulthood diseases.** *Antioxid Redox Signal.* 2012 Jul 15;17(2):237-53.

SU, Y.; SHANKAR, K.; SIMMEN, R. C. **Early soy exposure via maternal diet regulates rat mammary epithelial differentiation by paracrine signaling from stromal adipocytes.** *J Nutr.* 2009 May;139(5):945-51.

SUH, J. H.; ROMAIN, C.; GONZÁLEZ-BARRIO, R. et al. **Raspberry juice consumption, oxidative stress and reduction of atherosclerosis risk factors in hypercholesterolemic golden Syrian hamsters.** *Food Funct.* 2011 Jul;2(7):400-5.

SWANSON, J. M.; ENTRINGER, S.; BUSS, C.; WADHWA, P. D. **Developmental origins of health and disease: environmental exposures.** *Semin Reprod Med.* 2009 Sep;27(5):391-402.

THOMPSON, J. A.; SARR, O.; PIORKOWSKA, K.; GROS, R.; REGNAULT, T. R. **Low birth weight followed by postnatal over-nutrition in the guinea pig exposes a predominant player in the development of vascular dysfunction.** *J Physiol.* 2014 Dec 15;592(Pt 24):5429-43.

TITUS-ERNSTOFF, L.; EGAN, K. M.; NEWCOMB, P. A. et al. **Early life factors in relation to breast cancer risk in postmenopausal women.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Feb;11(2):207-10.

TREMELLEN, K. **Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective.** *Hum Reprod Update.* 2008 May-Jun;14(3):243-58.

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

VANDE LOOCK, K.; CIARDELLI, R.; DECORDER, I. et al. **Preterm newborns show slower repair of oxidative damage and paternal smoking associated DNA damage.** *Mutagenesis.* 2012 Sep;27(5):573-80.

- VANHEES, K.; VAN SCHOOTEN, F. J.; VAN WAALWIJK VAN DOORN-KHOSROVANI, S. B. et al. **Intrauterine exposure to flavonoids modifies antioxidant status at adulthood and decreases oxidative stress-induced DNA damage.** *Free Radic Biol Med.* 2013 Apr;57:154-61.
- VANHEES, K.; VONHÖGEN IG VAN SCHOOTEN, F. J.; GODSCHALK, R. W. **You are what you eat, and so are your children: the impact of micronutrients on the epigenetic programming of offspring.** *Cell Mol Life Sci.* 2014 Jan;71(2):271-85.
- VÁZQUEZ-ARAÚJO, L.; CHAMBERS, E.; ADHIKARI, K.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A. **Sensory and physicochemical characterization of juices made with pomegranate and blueberries, blackberries, or raspberries.** *J Food Sci.* 2010 Sep;75(7):S398-404.
- VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. **Antioxidant strategies in the epididymis.** *Mol Cell Endocrinol* 2004;216(1-2):31-9.
- WALSH, J. M.; BYRNE, J.; MAHONY, R. M. et al. **Leptin, fetal growth and insulin resistance in non-diabetic pregnancies.** *Early Hum Dev.* 2014 Jun;90(6):271-4.
- WANG, G.; WALKER, S. O.; HONG, X. et al. **Epigenetics and early life origins of chronic noncommunicable diseases.** *J Adolesc Health.* 2013 Feb;52(2 Suppl 2):S14-21.
- WANG, S. Y.; LIN, H. S. **Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage.** *J Agric Food Chem.* 2000 Feb;48(2):140-6.
- WATKINS, A. J.; SINCLAIR, K. D. **Paternal low protein diet affects adult offspring cardiovascular and metabolic function in mice.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014 May 15;306(10):H1444-52.
- WEBER, E. M.; ALGERS, B.; HULTGREN, J.; OLSSON, I. A. **Pup mortality in laboratory mice--infanticide or not?** *Acta Vet Scand.* 2013 Nov 20;55:83.
- WEBER, E. M.; ALGERS, B.; WÜRBEL, H.; HULTGREN, J.; OLSSON, I. A. **Influence of strain and parity on the risk of litter loss in laboratory mice.** *Reprod Domest Anim.* 2013 Apr;48(2):292-6.
- WENDEL, A. **Glutathione peroxidase.** *Methods Enzymol.* 77, 325–333, 1981.
- WOZNIAK, D. F.; CICERO, T. J.; KETTINGER, L.; MEYER, E. R. **Paternal alcohol consumption in the rat impairs spatial learning performance in male offspring.** *Psychopharmacology (Berl).* 1991;105(2):289-302.
- WU, X.; RAHAL, O.; KANG, J. et al. **In utero and lactational exposure to blueberry via maternal diet promotes mammary epithelial differentiation in prepubescent female rats.** *Nutr Res.* 2009 Nov;29(11):802-11.
- WU, Y.; LIU, X.; LUO, H. et al. **Advanced paternal age increases the risk of schizophrenia and obsessive-compulsive disorder in a Chinese Han population.** *Psychiatry Res.* 2012 Aug 15;198(3):353-9.
- XIE, Y. J.; HO, S. C.; LIU, Z. M.; HUI, S. S. **Birth weight and blood pressure: 'J' shape or linear shape? Findings from a cross-sectional study in Hong Kong Chinese women.** *BMJ Open.* 2014 Sep 8;4(9):e005115.

XUE, F.; MICHELS, K.B. **Intrauterine factors and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis of current evidence.** Lancet Oncol. v. 8, p. 1088-1100, 2007.

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 Dec 1;106(1-2):93-102.

YESSOUFOU, A.; SOULAIMANN, N.; MERZOUK, S. A. et al. **N-3 fatty acids modulate antioxidant status in diabetic rats and their macrosomic offspring.** Int J Obes (Lond). 2006 May;30(5):739-50.

ZEH, J. A.; BONILLA, M. M.; ADRIAN, A. J. et al. **From father to son: transgenerational effect of tetracycline on sperm viability.** Sci Rep. 2012;2:375.

ZINI, A.; PHILLIPS, S.; COURCHESNE, A. et al. **Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay.** Fertil Steril 2009;91(6):2495-500.

9. APÊNDICES

APÊNDICE A. QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

A quantificação de fenólicos totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Swain e Hillis, 1959), baseado na redução do reagente Folin-Ciocalteu (complexo fosfomolibdato-fosfotungstato) pelos compostos fenólicos a produto de coloração azul (molibdênio e tungstênio) em meio alcalino. Para tanto, 250 μ L de extrato de amora-preta (metanol 70% acidificado em 0.2% de ácido acético), em diluição adequada, foi adicionado a 250 μ L de Reagente de Folin e 2.0 mL de água deionizada. Posteriormente, foi adicionado 250 μ L de uma solução saturada de carbonato de sódio e mantido em banho-maria 37°C durante 30 min. Em seguida procedeu-se a leitura da absorbância a 765 nm em espectrofotômetro (Hewlett Packard, 8453). O teor de fenólicos totais foi expresso em ácido gálico equivalente (GAE), utilizando uma curva de calibração. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mg GAE equivalente/100g ou 100mL.

APÊNDICE B. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH

O método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila, Sigma-Aldrich), descrito por Brand-Williams *et al.* (1995), é baseado na redução do radical DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) pelos compostos antioxidantes com descoloração da coloração violeta para amarela, proporcional à concentração da substância redutora amostra. Foram adicionados em microplaca de 96 cavidades de fundo “U” 40 μ L de extrato, previamente diluídos, e 200 μ L de solução DPPH (0,4925 mg DPPH/ 25 mL metanol), mantidos a temperatura ambiente, em ausência de luz, durante 20 minutos. Posteriormente, foi realizada a leitura em leitor de microplaca (Benchmark Plus, Microplate Spectrophotometer, Japan) em comprimento de onda de 517 nm. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como μ mol Trolox equivalente/100 g ou 100 mL, utilizando curva de calibração.

APÊNDICE C. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ORAC

O método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), descrito por Prior *et al.* (2003), avalia a capacidade antioxidante considerando a habilidade do extrato em proteger a fluoresceína da oxidação pelo radical peroxila. Alíquotas de 25 µL de amostra foram pipetadas em microplaca de 96 cavidades. Em seguida, com o auxílio de injetor automático, foram adicionados 150 µL de fluoresceína e 25 µL de AAPH (2,2'-azobis-2-methyl-propanamide, dihydrochloride, Sigma-Aldrich) a 37 °C em leitor de microplaca (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc., EUA). O decaimento da fluorescência foi monitorado em intervalos de 1 min durante 60 min em comprimento de excitação de 493 nm e emissão em 515 nm. A capacidade antioxidante foi calculada a partir da área sob a curva (AUC) através da curva de calibração do Trolox. Foi realizada triplicata de análise. Os resultados foram expressos em µmol Trolox equivalente/100g ou 100 mL.

APÊNDICE D. QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES

A extração de flavonoides foi realizada de acordo com o método descrito por Arabbi *et al.* (2004). Assim, aproximadamente 5g de amostra de amora-preta previamente triturada em nitrogênio líquido, em duplicata, foi extraída em 100mL de metanol 70% acidificado com 0.2% de ácido acético, com a utilização de homogeneizador do tipo Turrax (Brinkmann Homogenizer, Suíça) e posterior filtração a vácuo. O resíduo remanescente foi reextraído mais duas vezes com 50 mL de metanol 70%. Este extrato foi combinado e concentrado em rotaevaporador (Rotaevaporador, R-3 HB, Buchi, Suíça) a 40°C até a completa evaporação do metanol. O extrato concentrado foi, então, ressuspensionado em água milliQ em quantidade suficiente para 50 mL. Uma alíquota deste extrato foi eluída em coluna de 1g de Poliamida (CC 6, Macherey-Nagel), preparados em seringa própria de 6mL (HPLC Technology). As colunas foram pré-condicionadas pela passagem de metanol, seguida de água deionizada. Após a passagem dos extratos, a coluna foi lavada com 20 mL de água deionizada. A eluição dos flavonoides foi realizada com 50 mL de metanol, seguida por 50 mL de metanol: hidróxido de amônia (95,5:0,5, v:v). Os eluatos foram completamente secos através de rotaevaporação sob vácuo a 40°C, ressuspensionados em 1 mL de metanol para a fração metanol e 400 µL de metanol para a fração metanol:amônia e filtrados utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd.,

Bedford, E.U.A.) de 0,43 μ m de poro. O conteúdo obtido, em duplicata, foi utilizado para a quantificação de flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de arranjo de diodo (CLAE/DAD) (sistema Agilent 1260, com injetor automático e bomba quaternária, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). Foi utilizada a coluna Prodigy 5 μ ODS3 (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido), com fluxo de 1 mL/min, temperatura de 25 °C, e eluição com gradiente de solventes constituído por A: ácido fórmico 0,5% em água e D: acetonitrila acidificado com 0,5% ácido fórmico. A corrida foi monitorada nos comprimentos de onda de 270 nm e 525 nm (Hassimotto *et al.*, 2007). Utilizaram-se os padrões cianidina-3-glucosídeo (Extrasynthese, Genay, France), quercetina e ácido elágico (Sigma-Aldrich). Os flavonoides foram identificados através da similaridade do espectro de absorção e tempo de retenção.

APÊNDICE E. QUANTIFICAÇÃO DE ELAGITANINOS (ÁCIDO ELÁGICO TOTAL)

A quantificação de ácido elágico (AE) total foi realizada pelo método de Pinto *et al.* (2008), onde aproximadamente 0.5g de amostra, em triplicata, foi extraída com 25mL de acetona 80% em homogeinizador do tipo Turrax (Brinkmann Homogenizer, Suíça) e posteriormente filtrado sob vácuo. Uma alíquota de 2 mL deste extrato foi seca sob fluxo de nitrogênio. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de ácido trifluoracético 2M. Em seguida, os extratos foram autoclavados a 120 °C por duas horas. Adicionou-se 2 mL de álcool terc butílico e secos sob fluxo de nitrogênio. Os extratos foram posteriormente ressuspensos em 1 mL de metanol grau HPLC e filtrados utilizando-se filtros de polietileno com membrana PTFE (Millipore Ltd., Bedford, E.U.A.) de 0.45 μ m de poro para análise em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), como descrito no APÊNDICE D. Os resultados foram expressos em mg AE/100g ou mL.

APÊNDICE F. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) foi realizada utilizando hipoxantina, enzima xantina oxidase e citocromo C (Ewing e Janero, 1995). Nesta reação, que ocorre em condições aeróbicas, a enzima xantina

oxidase atua sobre a hipoxantina gerando $O_2^{\bullet-}$. Esse ânion age sobre o citocromo C, reduzindo o Fe^{3+} à Fe^{2+} . A SOD captura o $O_2^{\bullet-}$, inibe a formação de Fe^{2+} (Nogueira, 2004). Foram adicionados em cubetas de quartzo 1mL de meio de SOD, que foi composto por tampão fosfato de potássio 0.05M pH 7.8. Além disso, adicionou-se 10 μ L de xantina oxidase. A reação foi iniciada com a adição de 15 μ L de amostra, previamente diluídas, e monitorada a cada 1 minuto. A leitura da absorbância foi realizada a 550nm em espectrofotômetro (Hewlett Packard, 8453). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Uma unidade de atividade enzimática (UA) corresponde à variação de 0.1 Abs. O resultado foi expresso como UA/min/g proteína.

APÊNDICE G. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE (CAT)

A determinação da atividade enzimática da catalase (CAT) foi baseada no método espectrofotométrico descrito por Adamo *et al.* (1989). O método baseia-se no acompanhamento da decomposição do H_2O_2 a 37°C (Nogueira, 2004). Foram adicionados em cubetas de quartzo 640 μ L de tampão fosfato 50mM pH 7,0, 340 μ L de H_2O_2 . A reação foi iniciada com a adição de 10 μ L de amostra, previamente diluídas e, monitorada a cada 1 minuto. A leitura da absorbância foi realizada a 240 nm em espectrofotômetro (Hewlett Packard, 8453). Todas as análises foram realizadas em quintuplicata. Uma unidade de atividade enzimática (UA) corresponde à variação de 0.1 Abs. O resultado foi expresso como UA/min/g proteína.

APÊNDICE H. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

A determinação da atividade glutathiona peroxidase (GPx) foi realizado de acordo com Wendel (1981). O método baseia-se na oxidação da glutathiona reduzida pelo peróxido de terbutila, catalisada pela GPx, gerando GSSG a 37°C. Na presença da enzima e do cofator NADPH, a GSSG é imediatamente convertida à forma reduzida (GSH) pela glutathiona redutase, com a oxidação concomitante do NADPH em $NADP^+$ (Donadio, 2011; Nogueira, 2004). Foram adicionados em cubetas de quartzo 1mL de meio de GPx, que foi composto por tampão Tris HCl 0.1M EDTA 0.5 mM pH 8.0. Além disso, adicionou-se 10 μ L de extrato, previamente diluídos. A reação foi iniciada

com a adição de 10 μ L de peróxido de terbutila 0.5mM e monitorada a cada 1 minuto. A leitura da absorbância foi realizada a 340 nm em espectrofotômetro (Hewlett Packard, 8453). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Uma unidade de atividade enzimática (UA) corresponde à variação de 0.1 Abs. O resultado foi expresso como UA/min/g proteína.