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

Nutrição e origem desenvolvimentista do câncer de mama: consumo de ração com alto teor de gordura animal por ratas durante a gestação/lactação e suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária

Fábia de Oliveira Andrade

Tese para obtenção do título de doutor

Orientador: Prof. Dr. Thomas Prates Ong

São Paulo
2014

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

Nutrição e origem desenvolvimentista do câncer de mama: consumo de ração com alto teor de gordura animal por ratas durante a gestação/lactação e suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária

Fábia de Oliveira Andrade

Tese para obtenção do título de doutor

Orientador: Prof. Dr. Thomas Prates Ong

São Paulo
2014

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

Andrade, Fábia de Oliveira
A553n Nutrição e origem desenvolvimentista do câncer de mama: consumo de ração com alto teor de gordura animal por ratas durante a gestação/lactação e suscetibilidade da prole feminina à carcinogenese mamária / Fábia de Oliveira Andrade. -- São Paulo, 2014.
1v.(várias paginações).

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 2. Neoplasias mamárias I. T. II. Ong, Thomas Prates, orientador.

641.1 CDD

Nome: ANDRADE, Fábia de Oliveira

Título: Nutrição e origem desenvolvimentista do câncer de mama: consumo de ração com alto teor de gordura animal por ratas durante a gestação/lactação e suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária

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

Comissão Julgadora

_____
1° Examinador

_____
2° Examinador

_____
3° Examinador

_____
4° Examinador

_____
5° Examinador

São Paulo, ____de _____de 2014

Ao meu querido esposo Joás Lucas da Silva, pelo carinho, compreensão, paciência, dedicação e acima de tudo pelo amor.

Aos meus pais e irmãs pelo apoio e carinho

AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu forças para continuar mesmo diante de tantos obstáculos;

À minha família por ser meu porto seguro;

Ao meu esposo Joás por me apoiar nessa jornada oferecendo-me carinho, amor, companheirismo e compreensão em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. Thomas Prates Ong por acreditar em mim e me orientar por todos esses seis anos de caminhada;

Ao Prof. Tit. Fernando Salvador Moreno que muito contribuiu para meu crescimento científico;

Aos meus queridos amigos e companheiros de laboratório: Mariana, Luiza, Raquel, Vanessa, Gabriela, Kelly, Mayara, Aline, Juliana, Eduardo, Laura, Ernersto e Roberto por tantos momentos alegres e agradáveis e por sempre oferecerem um ombro para os momentos difíceis, conselhos e instruções sábios. Em especial à Camile que muito me ajudou durante meu mestrado e doutorado com dedicação e companheirismo, à Aline de Conti que tanto me ensinou em toda essa caminhada e à Juliana Miranda por sua grande amizade e carinho;

Aos técnicos Renato Heidor e Laila por tantas compras de reagentes e auxílio nas técnicas de laboratório;

À profa. Leena Hilakivi-Clarke por me acolher em seu laboratório por dez meses e compartilhar sua experiência e grande sabedoria científica, além de sua simpatia;

À profa. Sônia de Assis também pelo compartilhamento de sua experiência com modelo de programação fetal do câncer de mama e por sua amizade;

Ao meus queridos amigos do laboratório da profa. Hilaki-Clarke: Elissa Carney, Alisson Sumis, Xiyuan Zhang, Nguyen Nguyen, Wei Yu e Rong Hu por terem me acolhido com tanto carinho;

Ao Lu Jin pelas análises de bioinformática;

Ao prof. Jorge Mancini-Filho e à Rosângela Pavan Torres pelo auxílio com a análise de lipídeos da ração experimental;

Á prof. Ana Paula de Melo Loureiro e ao Tiago Franco de Oliveira pelo auxílio das análises de metilação global do DNA;

Ao prof. Eduardo Purgato pelas análises de perfil lipídico das glândulas mamárias;

À Estagiária Sandra de Jesus Santana pelo apoio no biotério;

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental pela dedicação a todos os alunos;

À todos os meus outros amigos que mesmo distantes fizeram parte dessa vitória;

À FAPESP pela bolsa de doutorado (Processo 2010/11742-0), bolsa BEPE (2012/03330-9) e auxílio à pesquisa (Processo 2011/23259-4).

Então vi eu que a sabedoria é mais excelente do que a estultícia, quanto a luz é mais excelente do que as trevas.

Eclesiastes 2:13

ANDRADE, F.O. **Nutrição e origem desenvolvimentista do câncer de mama: consumo de ração com alto teor de gordura animal por ratas durante a gestação/lactação e suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária**. 2014. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

RESUMO

O presente trabalho investigou se a exposição em períodos precoces da vida à ração com alto teor de gordura animal altera o risco de câncer de mama na vida adulta em ratas. Ratas mães foram expostas à ração com alto teor de gordura (ATG) à base de banha de porco (60 % de energia proveniente de gordura) ou uma dieta controle AIN93G (16 % de energia proveniente de gordura) durante a gestação ou gestação e lactação. A prole feminina com 7 semanas de idade foi induzida a carcinogênese mamária com o carcinógeno 7,12-dimeti-benz[*a*]antraceno. Comparado à prole do grupo controle, observou-se menor suscetibilidade à carcinogênese mamária na prole do grupo de ratas prenhas submetidas à ração ATG durante a gestação (menor incidência de neoplasias, multiplicidade e peso das neoplasias) ou gestação e lactação (menor multiplicidade). Prole feminina de ratas exposta à ração ATG durante a gestação apresentou menor crescimento da árvore epitelial mamária, proliferação celular (Ki67) e expressão de NFkB p65 e maior expressão de p21 e níveis globais de H3K9me3 na glândula mamária. Além disso, esta apresentou uma tendência na redução da razão *Rank/Rankl* (p=0,09) e níveis de progesterona sérica (p=0,07). Glândula mamária da prole feminina do grupo exposto à ração ATG durante a gestação e lactação apresentou menor número de TEBs, crescimento da árvore epitelial e razão BCL-2/BAX e maiores níveis de leptina em comparação à prole do grupo controle. Análise de lipidômica das glândulas mamárias revelou que exposição à ração ATG especificamente durante a gestação apresentou pequenos efeitos no perfil de ácidos graxos na prole feminina, enquanto que a exposição à essa ração durante a gestação e lactação promoveu menor concentração de ácidos graxos saturados (exceto ácido esteárico) e maior concentração de ácidos graxos polinsaturados da série n-6, monoinsaturados e ácido linoleico conjugado (CLA). De acordo com análise de dependência de redes diferencial (DDN) dos genes diferentemente expressos pela análise de "microarray" exposição à ração ATG em períodos precoces da vida altera a rede transcricional da glândula mamária na vida adulta. Especificamente, ratas expostas à ração ATG somente durante o período fetal apresentou aumento da expressão de *Hrh1*e *Repin1* em comparação ao controle. A prole exposta à ração durante o período fetal e lactacional apresentou maior e menor expressão de *Stra6* e *Tlr1* em comparação ao contole, respectivamente e menor expressão de *Crkrs* em comparação à prole exposta à ração somente durante o período fetal. Nossos dados confirmam que o risco de câncer de mama da prole pode ser programado pela alimentação materna. No entanto, ao contrário do que se esperava, exposição a altos níveis de gordura animal no início da vida diminuiu a suscetibilidade ao câncer de mama na vida adulta. Dentre os possíveis mecanismos envolvidos nessa proteção encontram-se a modulação da morfologia e perfil lipídico da glândula mamária, redução da proliferação celular e aumento dos níveis proteicos de reguladores do ciclo celular, modulação de marcas epigenéticas como H3K9me3, modulação da expressão gênica global com alteração de redes de sinalização, bem como regulação de vias de sinalização específicas como RANK/RANKL/NFκB. Porém esses mecanismos são dependentes do tempo e período de exposição.

Palavras-Chave: Câncer de mama, banha, dieta hiperlipídica, programação, epigenética, transcriptoma, lipidoma

ANDRADE, F.O. **Nutrition and developmental origin of breast cancer: consumption of lard-based high-fat diet by rats during gestation/lactation and the offspring's susceptibility to mammary carcinogenesis.** 2014. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

ABSTRACT

The present study investigated whether ea rly life exposure to high levels of animal fat changes breast cancer risk in adulthood in rats. Dams consumed a lard-based high-fat (HF) diet (60% fat-derived energy) or an AIN93G control diet (16% fat-derived energy) during gestation or gestation and lactation. Their 7-week-old female offspring were exposed to 7,12-dimethyl-benz[*a*]anthracene to induce mammary tumors. Compared to the control offspring, significantly lower susceptibility to mammary cancer development was observed in the offspring of dams fed on HF diet during gestation (lower tumor incidence, multiplicity and weight), or gestation and lactation (lower tumor multiplicity only). Mammary epithelial elongation, cell proliferation (Ki67), and expression of NFκB p65 were significantly lower, and p21 expression and global H3K9me3 levels were higher in the mammary glands of rats exposed to HF lard diet in utero. They also tended to have lower Rank/Rankl ratios (p=0.09) and serum progesterone levels (p=0.07) than control offspring. In the mammary glands of offspring of dams consuming the HF diet during both gestation and lactation, the number of terminal end buds, epithelial elongation and the BCL-2/BAX ratio were significantly lower, and serum leptin levels were higher than in the controls. Lipidomic analysis on mammary glands showed that exposure to a lard-based HF diet only during gestation had little effects on fatty acids profile on offspring, whereas this exposure during gestation and lactation promoted significant changes on the offspring's mammary glands. In general, it decreased SFA (except for stearic acid) and increased n-6 PUFA, MUFA and CLA concentrations in mammary gland. According to Differential dependency network (DDN), analysis of genes differently expressed by microarray, exposure to HF diet during early life changes the transcriptional network of the mammary gland in adulthood. Specifically, rats exposed to HF diet only during the fetal period showed increased expression of *Hrh1* e *Repin1* compared to the control. The offspring exposed to the HF diet *in utero* and nursing had higher and lower expression of *Stra6* and *Tlr1*, respectively, compared to the control and lower expression of *Crkrs* compared to the offspring exposed only *in utero*. Our data confirm that the breast cancer risk of offspring can be programmed by maternal dietary intake. However, contrary to our expectation, exposure to high levels of lard during early life decreased later susceptibility to breast cancer. The mechanisms involve modulation of mammary gland's morphology and lipid profile, decrease of cell proliferation and increase of cell cycle regulators, modulation of epigenetics marks as H3K9me3, modulation of global gene expression with alteration of transcriptional network and RANK/RANKL/NFκB pathway. However, these mechanisms are dependent on the duration and period of exposure.

Keywords: breast cancer, lard, high-fat diet, programming, epigenetics, transcriptome, lipidome

LISTA DE SIGLAS

AB	Botões alveolares
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
ATG	Alto teor de gordura animal
BAX	Proteína X associada ao BCL-2
BCL-2	B-Cell CLL/Linfoma 2
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG-EM	Cromatografia gasosa-Espectrometria de massa
CLA	Ácido linoleico conjugado
CO	Grupo controle
CRKRS	Quinase dependente de ciclina 12
DAD	Diode Array
DDN	Análise de dependência de redes diferencial
DHA	Ácido docosahexaenóico
DMBA	7,12-dimetilbenz[a]antraceno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferase
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
ER	Receptor de estrógeno
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
G	Grupo exposto à ração ATG durante o período gestacional
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GL	Grupo exposto à ração ATG durante o período gestacional e lactacional
GR1	Receptor de glicocorticoide

HAT	Acetil transferase de histonas
HCL	Ácido clorídrico
HDAC	Desacetilase de histonas
HDACis	Inibidores de desacetilases de histonas
HDM	Demetilases de histonas
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HER	Receptor do fator de crescimento epidermal do tipo 2
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPRT1	Hipoxantina fosforibosiltransferase
HRH1	Receptor de histamina 1
IGF-1	Fator de crescimento similar à insulina
IMC	Índice de massa corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Proliferação intraductal
IPA	Análise de vias integradas
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MGI	Informática de genoma de camundongo
MNU	Metil-nitrosouréia
MUFA	Ácido graxo monoinstaruado
NCI	National Cancer Institute
NFκB	Fator nuclear kappa B
Nrf2	Fator 2 relacionado ao NF-E2
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato- salino
PCA	Análise de componentes principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	Fosfatidilinosiltol-3-kinase

PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride
PR	Receptor de progesterona
PUFA	Ácido graxo polinsaturado
RAGS	Ração rica em ácidos graxos saturados
RANK	Receptor do fator de necrose tumoral
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear-kB
REPIN1	Iniciador de Replicação 1
RNA	Ácido ribonucleico
RPL13A	Proteína ribossomal L13a
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFA	Ácido graxo saturado
STRA6	Estimulado por ácido retinóico 6
TBP	Proteína de ligação ao TATA box
TD	Ducto terminal
TDLUs	Unidade lobular-ductal terminal
TEBs	Terminal End Buds
TLR1	Recepto Toll-Like 1
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE TABELAS

TABELAS DO ARTIGO 1

Tabela 1 Composição das rações controle (CO) e com alto teor de gordura animal (ATG)..... 56

Tabela 2 Distribuição de macronutrientes das rações controle (CO) e com alto teor de gordura animal (ATG)..... 56

Tabela 3 Sequência de Primers..... 61

Tabela 4 Efeitos da ração ATG em variáveis gestacionais..... 67

Tabela 5 Perfil de ácidos graxos da fração lipídica das rações CO e ATG..... 69

Tabela 6 Ingestão diária de ácidos graxos (g/animal) por ratas mães durante a gestação e lactação..... 69

Tabela 7 Efeitos da exposição materna à ração ATG sobre a carcinogênese mamária na prole feminina..... 73

TABELAS DO ARTIGO 2

Tabela 1 Ácidos graxos analisados na glândula mamária da prole feminina dos grupos CO, G e GL por CG-EM..... 101

Tabela 2 Sequência dos primers..... 104

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 Desenvolvimento da glândula mamária. Ductos lactíferos rudimentares se ramificam em ductos secundários em direção ao “fat pad”..... 12

FIGURAS DO ARTIGO 1

Figura 1 Desenho experimental..... 55

Figura 2 Ingestão calórica diária dos CO, G e GL durante a gestação e lactação.. 67

Figura 3 Níveis séricos de leptina e progesterona da prole feminina com 3 e 7 semanas de idade do grupos CO, G e GL..... 70

Figura 4 Incidência de tumores mamários na prole feminina dos grupo CO, G e GL..... 72

Figura 5 Morfologia da glândula mamária da prole feminina com 3 semanas de idade dos grupos CO, G e GL..... 75

Figura 6 Análise da expressão de Ki67 por imunoistoquímica e p21 e p27 por western blot..... 77

Figura 7 Análise da expressão das proteínas BCl-2 e BAX por western blot..... 78

Figura 8 Análise da expressão das proteínas ERα, ERβ e HER-2 por western blot..... 79

Figura 9 Avaliação da expressão das proteínas PR e NFkB p65 por western blot e da expressão gênica de Rank e RankL por qPCR..... 80

Figura 10 Análise de modificações pós-traducionais em histonas..... 81

FIGURAS DO ARTIGO 2

Figura 1	Análise de componentes principais (PCA) do perfil lipídico das glândulas mamárias da prole feminina dos grupos CO, G e GL.....	106
Figura 2	Perfil lipídico do tecido mamário da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, G e GL.....	107
Figura 3	Genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e G. **"**Heat maps " mostrando score de expressão gênica individual somente para os genes que foram diferentemente expressos.....	108
Figura 4	Genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e G.Análise de componentes principais dos genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupo CO e G.....	109
Figura 5	Análise biofuncional dos 20 genes mais diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e G.....	109
Figura 6	Genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e GL. **"**Heat maps " mostrando score de expressão gênica individual somente para os genes que foram diferentemente expressos.....	111
Figura 7	Genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e GL.Análise de componentes principais dos genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupo CO e GL.....	112
Figura 8	Análise biofuncional dos 20 genes mais diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e GL.....	112
Figura 9	Genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos G e GL. **"**Heat maps " mostrando score de expressão gênica individual somente para os genes que foram diferentemente expressos.....	114
Figura 10	Genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos G e GL.Análise de componentes principais dos genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupo G e GL.....	115
Figura 11	Análise biofuncional dos 20 genes mais diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos G e GL.....	115
Figura 12	Análise de dependência de redes diferencial (DDN) de genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e G.....	116
Figura 13	Análise de dependência de redes diferencial (DDN) de genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e GL..	117

Figura 14 Análise de dependência de redes diferencial (DDN) de genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos G e GL..... 118

Sumário

1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4
Nutrição e Câncer 4
Desenvolvimento da glândula mamária 11
Câncer de mama 14
Origem desenvolvimentista do câncer de mama 18
Origem desenvolvimentista do câncer de mama e nutrição 23
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 28
4. OBJETIVOS 44
Geral 44
Específicos 44
5. ORGANIZAÇÃO DA TESE 46
6. ARTIGO 1: Exposição à ração com alto teor de gordura animal (banha) durante os períodos fetal e lactacional modifica a suscetibilidade ao câncer de mama na vida adulta em ratas 47
Resumo 48
Abstract 49
Introdução 50
Material e Métodos 53
Protocolo experimental 53
Determinação do perfil lipídico das rações 57
Análise de níveis hormonais em ratas prenhas e em sua prole feminina 57
Indução da carcinogênese mamária 58
Análise da morfologia da glândula mamária da prole feminina 59
Análise da proliferação celular nas glândulas mamárias da prole feminina 59
Análise da expressão gênica em glândulas mamárias da prole feminina 60
Análise dos níveis de proteína nas glândulas mamárias da prole feminina 62
Análise dos níveis globais de acetilação e trimetilação de histonas nas glândulas mamárias da prole feminina 63
Análise do padrão de metilação global do DNA em glândulas mamárias da prole feminina 64
Análise estatística 66
Resultados 66
Efeitos da ração ATG em variáveis gestacionais 66
Composição de ácidos graxos das rações CO e ATG 68
Efeitos da exposição materna à ração ATG sobre os níveis hormonais da prole feminina 70

Efeitos da exposição materna à ração ATG sobre a carcinogênese mamária na prole feminina 71

Efeitos da exposição materna à ração ATG sobre a morfologia da glândula mamária da prole feminina 74

Efeitos da exposição materna à ração ATG sobre a proliferação celular, apoptose e níveis protéicos de p21 e p27 na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade 76

Efeitos da exposição materna à ração ATG sobre a expressão de ERα, ERβ e HER-2 e sobre a via PR-RANK-RANKL na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade 76

Efeitos da exposição materna à ração ATG sobre o padrão de metilação global e modificações pós-traducionais em histonas nas glândula mamárias da prole feminina com 7 semanas de idade 81

Discussão 82

Agradecimentos..... 88

Referências..... 89

7. ARTIGO 2: Perfil de ácidos graxos e padrão de expressão gênica global em ratas que foram expostas a ração com alto teor de gordura animal, durante o período fetal e lactacional, associados com o risco de câncer de mama na vida adulta 94

Resumo 95

Abstract..... 96

Introdução 97

Material e métodos 99

Protocolo Experimental..... 99

Análise do perfil de ácidos graxos na glândula mamária 100

Análise do padrão de expressão gênica global no tecido mamário da prole feminina dos grupos CO, G e GL 101

Validação de genes diferentemente expressos no tecido mamário da prole feminina dos grupos CO, G e GL 102

Análise estatística 104

Resultados 105

Perfil lipídico do tecido mamário da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, G e GL 105

Comparação da expressão gênica global do tecido mamário da prole feminina dos grupos CO e G 107

Comparação da expressão gênica global do tecido mamário da prole feminina dos grupos CO e GL 110

Comparação da expressão gênica global do tecido mamário da prole feminina dos grupos G e GL 113

Análise de DDN para os genes diferentemente expressos entre os tecidos mamários da prole feminina dos grupos CO e G 116

Análise de DDN para os genes diferentemente expressos entre os tecidos mamários da prole feminina dos grupos CO e GL..... 117

Análise de DDN para os genes diferentemente expressos entre os tecidos mamários da prole feminina dos grupos G e GL 118
Discussão 119
Agradecimentos 125
Referências 126
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS 133
9. ANEXOS 135

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é um importante problema de saúde pública, caracterizando a segunda e a quinta principal causa de morte morte por neoplasia entre as mulheres, em regiões desenvolvidas e menos desenvolvidas, respectivamente (OMS, 2008; FERLAY et al., 2013). A alimentação influencia diretamente o risco de desenvolvimento de câncer e o comportamento do tumor (DAVIS; MILNER, 2007). Desde 1930 estudos epidemiológicos têm demonstrado a relação entre dieta e risco de câncer, dentre eles o de mama (HILL, 1997). O consumo de frutas, vegetais, cereais, peixe, soja e chá verde parecem diminuir o risco de câncer de mama (RIBOLI;NORAT, 2003; TROCK; HILAKIVI-CLARKE; CLARKE, 2006; KHAN; AFAQ;HASAN MUKHTAR, 2008; BESSAOUD;DAURÈS;GERBER, 2008). Por outro lado, o consumo de gordura animal, principalmente de carne vermelha e produtos lácteos parece estar associado ao aumento do risco desse tipo de câncer (CHO et al., 2003). Observa-se que quanto maior o consumo per capita de gordura em um país, maior é a taxa de mortalidade por câncer de mama (CARROLL, 1975).

Processos diretamente relacionados ao desenvolvimento do câncer como proliferação celular, apoptose, angiogênese, metabolismo de carcinógenos, diferenciação celular, regulação hormonal, reparo do DNA e inflamação podem ser influenciados por componentes dos alimentos, por meio da regulação da expressão gênica, especialmente por mecanismos epigenéticos (ROSS, 2007; DAVIS; MILNER, 2007; DE CONTI et al.; 2011; ONG et al., 2011; ANDRADE et al., 2012). Há dois tipos mais comuns de modificações epigenéticas: aquela que ocorre em nível de DNA (metilação do DNA) e aquela que ocorre em nível de cromatina (modificações pós-traducionais de histonas) (MARTIN et al., 2013; CAPELL & BERGER,

2013). Nesse contexto, a elucidação dos mecanismos de interação gene-nutriente é de grande importância para se entender como a dieta modula o risco de desenvolvimento de doenças como o câncer (ROSS, 2010).

Como descrito para doenças crônicas não transmissíveis como as cardiovasculares, diabetes e obesidade (LANGLEY-EVANS; McMULLEN, 2010), também no caso do câncer de mama aventa-se a hipótese de que sua origem poderia ser fetal (HILAKIVI-CLARKE-2007). Em 1990, Trichopoulos sugeriu que alguns cânceres de mama se originariam já no ambiente intra-uterino, frente a exposições elevadas ao estrógeno (TRICHOPOULOS, 1990). Nesse sentido exposições hormonais no período pré-natal têm sido relacionadas à predisposição para o desenvolvimento de câncer de mama (YU et al., 2006; DE ASSIS et al., 2006; DE ASSIS; KHAN;HILAKIVI-CLARKE, 2006; HILAKIVI-CLARKE; DE ASSIS, 2006; HILAKIVI-CLARKE, 2007).

Também a dieta materna durante a gestação e lactação pode ser particularmente importante em modificar o ambiente fetal e, consequentemente, a suscetibilidade ao câncer de mama na idade adulta (YU et al., 2006). Evidências sugerem que os períodos precoces da vida são os momentos em que a glândula mamária está mais sensível a influência da alimentação (STARK et al., 2003; MICHELS et al., 2007; MESSINA; HILAVIKI-CLARKE, 2009). Nesse contexto, tem-se voltado a atenção para o impacto do consumo de lipídeos durante a gestação e lactação no risco para câncer de mama na prole, já que maior sensibilidade é observada quando exposição a esse macronutriente ocorre em períodos precoces da vida (MACLENNAN & MA, 2010).

Considera-se que exposição dietética intra-uterina, durante a fase de desenvolvimento da mama, possa reprogramar epigeneticamente a expressão gênica na glândula mamária, resultando em “Terminal End Buds” (TEBs) com suscetibilidade alterada à transformação maligna, com

aumento do número e de células proliferando nessa estrutura. Os genes que podem ser afetados nesse sentido incluem os que normalmente protegem as células da transformação maligna, destacando-se os que previnem a formação de adutos de DNA (genes antioxidantes ou que regulam o metabolismo celular), promovem reparo do DNA, induzem apoptose ou inibem a proliferação celular (DE ASSIS; HILAKIVI-CLARKE, 2006; HILAKIVI-CLARKE, 2007).

Assim, levando-se em consideração o consumo em excesso de gorduras, principalmente as saturadas, em nível mundial, e o contínuo aumento deste consumo em países em desenvolvimento (KEARNEY, 2010) incluindo nosso país, inclusive entre as gestantes (LACERDA et al., 2007; MARTINS & BENICIO, 2011), propôs-se avaliar o impacto do consumo de ração com alto teor de gordura animal por ratas, durante o período gestacional e lactacional, na suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária quimicamente induzida, bem como possíveis mecanismos celulares, moleculares e epigenéticos envolvidos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nutrição e Câncer

A alimentação influencia diretamente o risco de desenvolvimento de câncer e o comportamento do tumor (DAVIS; MILNER, 2007). Desde 1930 estudos epidemiológicos têm demonstrado a relação entre dieta e risco de câncer, dentre eles o de mama (HILL, 1997).

Após análise de evidências sobre alimentação e risco de câncer, o Fundo Mundial de Pesquisa do Câncer (WORLD CANCER RESEARCH FUND) estabeleceu metas e recomendações populacionais com objetivo de prevenção do câncer. Dentre as metas estabelecidas, a maioria está intimamente associada à alimentação: manter peso corporal adequado (IMC entre 18,5 e 24,9); praticar atividade física diariamente; evitar o consumo de alimentos e bebidas densamente energéticos; consumir no mínimo 5 porções (400g) de vegetais e frutas diariamente; consumir cereais integrais e leguminosas; reduzir o consumo de carne vermelha (menos que 500g por semana); reduzir o consumo de bebidas alcoólicas (2 drinques para homens e 1 drinque para mulheres); reduzir o consumo de sal (6g/dia); utilizar suplementos dietéticos apenas em casos específicos (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 2007).

Estima-se que a alimentação contribua na etiologia de 30 a 50% de todos os cânceres de mama (WILLETT, 2001; HILAKIVI-CLARKE, 2007). O consumo de frutas, vegetais, cereais, peixe, soja e chá verde parecem diminuir o risco de câncer de mama (TROCK; HILAKIVI-CLARKE; CLARKE, 2006, KHAN; AFAQ;HASAN MUKHTAR, 2008; BESSAOUD;DAURÈS;GERBER, 2008; ALBURQUEQUE et al., 2014). Por outro lado, o

consumo de gordura animal, principalmente de carne vermelha e produtos lácteos durante o período pré-menopausal parece estar associado ao aumento do risco desse tipo de câncer (CHO et al., 2003; GONZALEZ et al., 2010). Observa-se que quanto maior o consumo per capita de gordura em um país, maior é a taxa de mortalidade por câncer de mama (CARROL, 1975). Metanálise de diversos estudos, em modelos com animais, reforça o papel da gordura alimentar em promover o crescimento de neoplasias mamárias, sendo que este efeito não parece estar simplesmente associado ao aumento de ingestão calórica (FREEDMAN et al., 1990).

Em outros tipos de neoplasias, como de cólon, próstata, endométrio e ovário também se observa relação com o consumo de gordura (GERBER, 2009). Camundongos alimentados com dieta rica em gordura (60% de calorias provenientes de gordura) apresentaram significantemente maior crescimento de tumor de próstata induzido por xenoenxerto de células de câncer de próstata (LNCaP) em comparação com camundongos alimentados com dieta rica em carboidrato ou dieta controle, sendo que esse crescimento esteve acompanhado do aumento da expressão do oncogene Akt e fator de crescimento similar à insulina (IGF-I) (NARITA et al., 2008; HUANG et al., 2012). Porém, outros estudos não encontraram associação entre consumo de gordura saturada e crescimento de tumor em camundongos (LLOYD et al., 2010).

Dados contraditórios quanto ao consumo de gordura e câncer de mama também podem ser observados (WILLET, 2001). Metanálise, incluindo estudos de coorte e caso-controle, encontrou que o maior consumo de gordura total, saturada e de carne vermelha, esteve associado com aumento do risco de câncer de mama (BOYD et al., 2003). Por outro lado, outros estudos, incluindo uma metanálise, não têm observado essa relação (ALEXANDER et al., 2010; KEY et al., 2011; PARK et al., 2012;). Além disso, redução do consumo de gordura dietética não

diminuiu o desenvolvimento de câncer de mama em mulheres com risco elevado (MARTIN et al., 2011).

Assim, a influência da gordura dietética no desenvolvimento e progressão do câncer, inclusive de mama, parece ser muito controversa (ROMIEU, 2011; WILLET, 2001, GERBER, 2009). Deve-se levar em consideração a dificuldade de estudos epidemiológicos em quantificar o consumo deste nutriente (ROMIEU, 2011), bem como os diferentes tipos de ácidos graxos presentes na gordura dietética (saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA)) que podem influenciar de forma diferente o desenvolvimento do tumor (SUBURU; CHEN, 2012).

As principais fontes de SFA são produtos de origem animal como carne, leite, ovos, podendo ser encontrado também em óleo de côco e dendê. Os principais tipos de SFA são ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido láurico (12;0) e ácido mirístico (14:0) (SUBURU; CHEN, 2012). Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que SFA pode promover a carcinogênese por inibir as respostas celulares que são normalmente desencadeadas por dano no DNA, como por exemplo, a indução de apoptose. Mais especificamente, ácido palmítico e mirístico inibem a expressão de proteínas importantes para indução de morte celular como p21 e Bax, através de vias independentes de p53. Além disso, SFA induz, indiretamente, a transformação celular e aumenta a síntese endógena de SFA em células pré-neoplásicas/neoplásicas, o que promove a progressão do tumor, bem como possível resistência a drogas (MACLENNAN; MA, 2010).

Estudo caso-controle, o qual avaliou mulheres envolvidas no “Nurses’ Health Study II”, observou que aquelas que consumiam maior quantidade de gordura animal, rica em ácidos graxos saturados, apresentaram maior risco de desenvolvimento de câncer de mama, em comparação àquelas com menor consumo diário deste nutriente (CHO et al.,2003). Outros

estudos também encontraram associação positiva, apesar de fraca, entre o consumo de gordura saturada (30 a 40% do valor calórico total) e risco relativo para o desenvolvimento de câncer de mama (SMITH-WARNER, et al., 2001). Diferentemente, recentes metanálises e estudo de coorte não observaram associação entre consumo de gordura animal (35% valor calórico total) com o risco relativo de desenvolvimento de câncer de mama (ALEXANDER et al., 2010; PARK et al., 2011).

Alguns estudos em modelos animais suportam a hipótese que a gordura saturada promove, apesar de fraco, efeito promotor da carcinogênese mamária (FAY et al., 1997). Paradoxalmente, ácido esteárico (C18:0) um ácido graxo saturado de cadeia longa inibe o crescimento de células de câncer de mama em concentrações fisiológicas, através da indução do bloqueio do ciclo celular em fases G1 e G2, por induzir a expressão de proteínas, como p21 e p27 e inibir a expressão de Rho. Além, disso, ácido esteário reduziu a incidência, em ratas, de tumores mamários induzidos pelo carcinógeno N-Nitroso-N-methylurea (LI et al., 2011).

Em regiões mediterrâneas, têm-se registrado menor incidência de certos tipos de cânceres, como câncer de mama, cólon e próstata, a qual é atribuída ao padrão dietético dessa população. A dieta mediterrânea é caracterizada principalmente por alto consumo de alimentos de origem vegetal, baixo consumo de carne vermelha e alto consumo de óleo de oliva (TRICHOPOULOU et al., 2000). Os principais constituintes do óleo de oliva são os MUFA, em especial o ácido oleico (18:1, n-9), ao qual é atribuído, em parte, o papel protetor contra o câncer (SUBURU; CHEN, 2012). O consumo de óleo de oliva parece ser um indicador favorável para diversos tipos de cânceres, entre eles o de mama. Pessoas que consumem predominantemente óleo de oliva como lipídeo de adição apresentaram redução de risco de câncer de mama 5 vezes menor em comparação com aquelas com predominante consumo de manteiga (PELUCCHI et al., 2011).

Entre os PUFAs destacam-se os ácidos graxos essenciais da série ômega-6 e ômega-3. Alguns estudos descrevem efeitos anticarcinogênicos de dieta contendo baixa relação ômega-6/ômega-3, a qual não se aplica em uma dieta ocidental, que pode alcançar uma razão de 30:1 (SUBURU; CHEN, 2012). Sugere-se que o consumo de óleos vegetais contendo ácidos graxos da família ômega-6 promovam a carcinogênese mamária, e ao contrário, o consumo de óleo de peixe, rico em ácidos graxos da família ômega-3, promove efeitos inibitórios na carcinogênese (CARROLL; BRADEN, 1984; FAY et al., 1997; CHAJÈS et al., 2012; SCZANIECKA et al., 2012). Estudos epidemiológicos encontraram correlação inversa entre consumo de ômega-3 e incidência e mortalidade por câncer de mama, apesar de também existir controvérsias (WILLET, 1997; SIGNORI et al., 2011; SCZANIECKA et al., 2012).

Processos diretamente relacionados ao desenvolvimento do câncer como proliferação celular, apoptose, angiogênese, metabolismo de carcinógenos, diferenciação celular, regulação hormonal, reparo do DNA e inflamação podem ser influenciados por componentes dos alimentos, por meio da regulação da expressão gênica (ROSS, 2007; DAVIS; MILNER, 2007; DE CONTI et al.; 2011; ONG et al., 2011; ANDRADE et al., 2012).

O ácido oleico, por exemplo, inibe a expressão do receptor de fator de crescimento epiderminal-2 (HER2), sugerindo um mecanismo anticarcinogênico deste ácido graxo (MACLENNAN; MA, 2010). O ômega 3 atua como um fator antiinflamatório e ativando vias de transdução de sinal intracelular por alterar a composição das membranas celulares (FERGUSON, 2009). Efeitos antioxidantes também são mecanismos pelo quais compostos bioativos dos alimentos atuam na proteção contra o câncer. Dentre eles podem-se citar os polifenóis do chá verde, curcumina, genisteína, resveratrol e licopeno que apresentam efeito quimiopreventivo contra diversos tipos de câncer, inclusive o de mama. Esses antioxidantes modulam vias de

transdução de sinais inibindo proteínas importantes para a progressão do ciclo celular como NFκB, MAPKs, PI3K, cateninas e Nrf2. Também promovem o reparo de dano ao DNA, inibem marcadores de proliferação celular, metástase e angiogênese, além de induzir proteínas pró-apoptóticas (KHAN; AFAQ; MUKHTAR, 2008) e promover diferenciação celular e aumento da expressão de genes supressores de tumor (KWON *et al*., 2007).

Nesse contexto, a elucidação dos mecanismos de interação gene-nutriente é de grande importância para se entender como a dieta modula o risco de desenvolvimento de doenças como o câncer (DAVIS; MILNER, 2007; DELAGE; DASHWOOD, 2008). Disciplina pós-genômica denominada nutrigenômica tem como foco de estudo a influência dos diferentes tipos de nutrientes e compostos bioativos na expressão gênica e, consequentemente, no fenótipo (GILLIES, 2003; MARIMAN, 2006; KAPUT *et al*., 2007; LOVEGROVE; GITAU, 2008; SUBBIAH, 2008; FERGUSON, 2009).

Alterações genéticas que causam ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor representam mecanismos bem estabelecidos responsáveis pelo desencadeamento gradual do câncer em humanos. Contudo, somente eventos genéticos não podem explicar todo o processo de carcinogênese (KANAI; HIROHASHI, 2007), devendo-se também considerar os epigenéticos (BAYLIN; HERMAM, 2000; SPORN; SUH, 2002; KALEBIC, 2003; BAYLIN; OHM, 2006).

Por meio de mecanismos epigenéticos a expressão gênica é seletivamente ativada ou inativada sem alterar a sequência do DNA (DAWSON; KOUZARIDES, 2012). Epigenética é, dessa forma, definida como mudança na expressão gênica que é reversível e hereditária, sem qualquer alteração na sequência do DNA (SANTOS-ROSA; CALDAS, 2005; BAYLIN; OHM, 2006; HINSHELWOOD; CLARK, 2008; DAWSON; KOUZARIDES, 2012).

Há dois tipos mais comuns de modificações epigenéticas: aquela que ocorre em nível de DNA (metilação do DNA) e aquela que ocorre em nível de cromatina (modificações pós-traducionais de histonas) (MARTIN et al., 2013; CAPELL & BERGER, 2013). A metilação do DNA realizada por DNA metil-transferases (DNMT1, 3a, 3b e 3L) é a adição covalente de grupos metil que ocorre normalmente em dinucleotídeos CpGs. O remodelamento da cromatina ocorre via modificação de resíduos de histonas por enzimas, como por atividade de enzimas que adicionam um grupo acetil e metil, acetiltransferases de histonas (HATs) e metiltransferases de histonas (HMTs), respectivamente, e as que removem grupos acetil e metil, desacetilases de histonas (HDACs) and demetilases de histonas (HDMs), respectivamente (JUNIEN; NATHANIELSZ, 2007; DELAGE; DASHWOOD, 2008; MCKAY; MATHERS, 2011; SUVÀ; RIGGI; BERNSTEIN, 2013).

A hipermetilação do DNA normalmente promove uma estrutura de cromatina altamente condensada através do recrutamento de proteínas organizadoras do DNA, com consequente redução da expressão gênica, enquanto que a hipometilação do DNA causa descompactamento da cromatina promovendo rearranjos cromossomais que podem resultar em instabilidade, mudanças estruturais nos cromossomos e aumento na expressão gênica (BAYLIN; OHM, 2006; KANAI; HIROHASHI, 2007). A modulação da atividade de DNMT1 é importante tanto para a programação fetal como para a indução da tumorigênese, podendo ser acompanhado por metilação de novo de genes supressores de tumor por aumento da atividade de DNMT3a, levando à ativação aberrante de genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular (BURDGE; LILLYCROP; JACKSON, 2009).

Acetilação (particularmente nas caudas de histonas H3 e H4) tem sido ligada ao estado da cromatina que permite a transcrição ou que corresponde a regiões genômicas transcricionalmente

ativas (MINUCCI; PELICCI, 2006), enquanto que a desacetilação de histonas promove a inativação gênica por favorecer o estado condensado da cromatina (SEKHAVAT; SUN; DAVIE, 2007). Metilação em resíduos de histonas H3K4 e H3K79 estão associados a ativa transcrição gênica, por outro lado metilação de histonas H3K9, H3K27 e H4K20 ocorre em regiões silenciadas transcricionalmente (DELAGE; DASWHOOD, 2008).

Desenvolvimento da glândula mamária

A mama é um órgão bilateral que na fêmea é submetida a mudanças dramáticas em relação ao tamanho, estrutura e função no decorrer da vida pré-natal, infância, puberdade, gestação, lactação e regressão pós-menopausal (RUSSO; RUSSO, 2004). Cada estágio do desenvolvimento da glândula mamária representa uma janela de sensibilidade à fatores ambientais que modificam o risco de desenvolvimento de câncer de mama (RUSSO; RUSSO, 2004; MACLENNAN; MA, 2010, RUSSO; RUSSO, 2011).

O desenvolvimento da glândula mamária inicia-se, ainda, no período embrionário pela invaginação de brotos ectodérmicos para o interior do mesoderma, formando um sistema ductal rudimentar. Esse sistema rudimentar é composto por um ducto lactífero principal que se ramifica em múltiplos ductos secundários, os quais se originam do mamilo. Estes permanecem inativos até aproximadamente 3 semanas de idade, quando os hormônios estimulam a invasão e ramificação em direção ao “fat pad” (RUSSO; RUSSO, 1987; RUSSO et al., 1990; SMALLEY; ASHWORTH, 2003; MACLENNAN; MA, 2010). No final de cada ramificação ductal, encontram-se as estruturas de maior proliferação celular da glândula mamária, denominadas “Terminal End Buds” (TEBs) (RUSSO; RUSSO, 1996; MACLENNAN; MA, 2010). Após a 3ª semana de vida, as TEBs iniciam a divisão em 3 a 5 botões menores ou botões alveolares (AB) e

a progressiva diferenciação de TEBs em ABs é acentuada por cada ciclo estral que inicia na puberdade, que em ratas é por volta de 35 a 42 dias de vida (RUSSO; RUSSO, 1987) (Figura 1). Apesar da taxa de ramificação da glândula mamária ser reduzida após a puberdade, esta continua durante todos os anos reprodutivos da fêmea (MACLENNAN; MA, 2010).

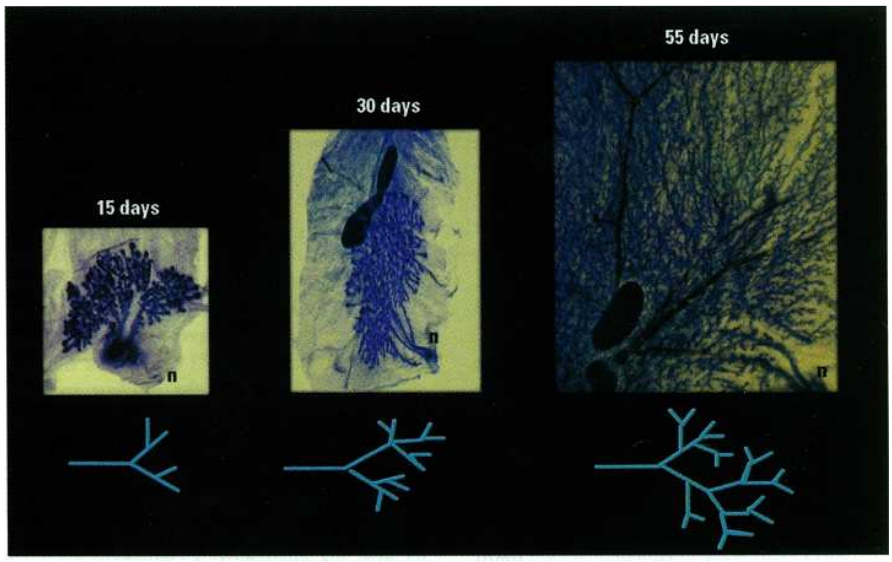


Figura 1: Desenvolvimento da glândula mamária. Ductos lactíferos rudimentares se ramificam em ductos secundários em direção ao "fat pad". (Fonte: RUSSO E RUSSO, 1996).

Os ductos mamários são estruturas tubulares com paredes compostas de dois principais tipos de células, as células epiteliais que compõem a camada interna revestindo o lúmen e as células miopiteliais que compõem a camada externa próxima à membrana basal (RUSSO; RUSSO, 1996). As células presentes nas TEBs são capazes de se diferenciarem tanto em células epiteliais quanto em mioepiteliais, sendo assim essa estrutura considerada um nicho de células tronco pluripontentes, (RUSSO; RUSSO, 1996; SMALLEY; ASHWORTH, 2003, RUSSO; RUSSO, 2011).

O leite materno apresenta papel importante no crescimento e desenvolvimento da glândula mamária da prole recém-nascida, já que este contém diversos fatores de crescimento como fator de crescimento epidermal (EGF), importante regulador da proliferação e diferenciação da glândula mamária (RUSSO; RUSSO, 1996). Estrógeno e progesterona também são responsáveis pelo desenvolvimento da glândula mamária. O estrógeno estimula o crescimento de ductos através de fatores de crescimento ou sensibilização à fatores mitogênicos extra-mamários, enquanto que a progesterona promove o crescimento lóbulo-alveolar. A prolactina, sob estímulo do estrógeno, parece também regular o desenvolvimento lóbulo-alveolar e exercer efeito direto no crescimento do parênquima mamário (RUSSO; RUSSO, 1996).

Durante a gestação, o último estágio de desenvolvimento, a glândula mamária sofre grande estímulo hormonal que promove ativa proliferação celular. Nesse período, há extensiva redução do número de TEBs que se dividem para formar ABs, os quais progressivamente são diferenciados em lóbulos (MACLENNAN; MA, 2010, RUSSO; RUSSO, 2011). A lactação retarda a reiniciação do ciclo estral e a ovulação após o parto. Durante esse período os níveis de prolactina são elevados e a expressão de seu receptor aumenta significativamente nas glândulas mamárias. Após o desmame, os níveis de prolactina retornam ao normal e os de estrógeno se elevam promovendo a reiniciação do ciclo estral (RUSSO; RUSSO, 1996).

O processo de diferenciação após a primeira gestação completa parece proteger contra o câncer de mama, pois mulheres nulíparas apresentam maior risco de desenvolvimento dessa neoplasia em comparação à mulheres primíparas ou multíparas (RUSSO; RUSSO, 2004, RUSSO; RUSSO, 2011). Em ratas virgens, apesar de muitas TEBs progredirem para ABs e lóbulos, uma boa parte nunca se diferencia, porém se tornam progressivamente menores e em forma de dedo, as quais são então, chamadas, de ductos terminais (TDs) (RUSSO et al., 1990).

Também em mulheres nulíparas e mesmo aquelas que pariram, lóbulos não diferenciados podem ser observados, sugerindo que essas estruturas não diferenciadas sejam possíveis alvos para transformação neoplásica em ratas e mulheres mais velhas (RUSSO et al., 1990).

O desenvolvimento da glândula mamária é comparável entre humanos e roedores, os quais podem, então, serem usados em pesquisa relacionadas à este órgão (MACLENNAN; MA, 2010). Em humanos, a ramificação da glândula mamária cessa por volta de 35 anos de idade ou durante a gestação, quando a diferenciação ocorre e a glândula se prepara para a lactação. As estruturas equivalentes às TEBs, em humanos são as "Unidades lobular-ductal terminal (TDLUs)". Essas estruturas são consideradas como sítios de iniciação da tumorigênese (RUSSO; RUSSO, 2004; HILAKIVI-CLARKE et al., 2005; MACLENNAN; MA, 2010), pois apresentam alta capacidade de proliferação proporcionado maior sensibilidade à formação de adutos de DNA e reduzida capacidade de reparo de danos no DNA (RUSSO; WILGUS; RUSSO,1979; HILAKIVI-CLARKE, 2007). Se a glândula mamária em desenvolvimento, que contém maior quantidade de TEBs-TDLUs, for exposta a um evento iniciador, maior será o risco de desenvolvimento da neoplasia mamária (HILAKIVI-CLARKE, 2007).

Câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais comum . Entre as mulheres estima-se que 1,67 milhões de novos casos foram diagnosticados em 2012, correspondendo a 25% de todos os casos de câncer (FERLAY et al., 2013). O câncer de mama caracteriza-se como a segunda e a quinta principal causa de morte morte por neoplasia entre as mulheres, em regiões desenvolvidas e menos desenvolvidas, respectivamente (OMS, 2008; FERLAY et al., 2013). De

acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos E.U.A. (NCI, 2014) a incidência e mortalidade por câncer de mama entre 2006 e 2011 foram de 124,5 e 22,6 a cada 100.000 mulheres por ano naquele país, respectivamente . Estima-se ainda que 12,2% das mulheres norte-americanas serão diagnosticadas com a doença em algum período da vida (ALTEKRUSE et al., 2010). No Brasil, a cada ano, cerca de 27,9% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA). A estimativa de casos novos em 2014 é de 57.120, com risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014). O aumento da incidência de câncer de mama em países em desenvolvimento parece ser devido ao aumento da expectativa de vida, aumento da urbanização e adoção de estilo de vida ocidental. (OMS, 2012).

A história natural do câncer de mama envolve progressão através de estágios patológicos e clínicos definidos, iniciando-se com hiperproliferação ductal, com evolução para carcinoma *in situ* e invasivo e, finalmente, em doença metastática. No carcinoma *in situ* as células mioepiteliais se apresentam epigeneticamente e fenotipicamente alteradas e em número reduzido, devido potencialmente à degradação da membrana basal. Além disso, fibroblastos estromais e miofibroblastos, linfócitos e células endoteliais apresentam-se em número aumentado. Perda de células mioepiteliais e da membrana basal está envolvida no desenvolvimento de carcinoma invasivo, no qual células neoplásicas podem invadir tecidos ao redor e migrar para órgãos distantes, levando eventualmente à metástase (POLYAK, 2007).

Os fatores de risco para o câncer de mama incluem: menarca precoce, nuliparidade, idade na primeira gestação e menopausa tardias, uso de anticoncepcionais orais e de terapia de reposição hormonal, envelhecimento, história familiar, etnia, exposição à radiação ionizante e alta densidade do tecido mamário (razão do tecido glandular e o tecido adiposo da mama) (BALLARD-BARBASH et al., 2009; INCA, 2014). Além desses, fatores relacionados ao estilo

de vida como tabagismo, ingestão de álcool, hábito alimentar, sedentarismo e excesso de peso têm sido relacionados ao desenvolvimento de câncer de mama (PATEL;SHARMA;JORDAN,2007; MARTIN-MORENO;SOERJOMATARAM; AGNUSSON, 2008; INCA 2014). Busca-se estabelecer quais estilos de vida poderiam reduzir o risco de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres com risco médio e direcionar a quimioprevenção para mulheres com alto risco. A necessidade de estratégias de redução do risco da doença deve ser enfatizada, visto que este tipo de câncer, além de ser o mais comum entre as mulheres, tem apresentado aumento significativo da sua incidência, especialmente nos países em desenvolvimento (CUZICK, 2008).

O metabolismo hormonal é um fator de grande destaque no câncer de mama, já que alta concentração de estradiol, tanto por síntese endógena ou por fontes exógenas está associada com maior risco. Assim, os fatores de risco para câncer de mama variam de acordo com status hormonal durante a vida da mulher, antes e após a menopausa, gestação e lactação. Além disso, o status hormonal influencia a taxa de proliferação e diferenciação do epitélio mamário nos vários estágios do desenvolvimento e diferenciação da glândula mamária, caracterizando diferente vulnerabilidade à carcinógenos dependendo do estágio de vida da mulher (GERBER, 2009). Mais recentemente, maior atenção tem sido dada ao papel da progesterona na promoção do câncer de mama. Este hormônio promove aumento da proliferação celular e morfogênse no epitélio luminal da glândula mamária (OBR & EDWARDS, 2012) por estimular a expansão de populações de células tronco adultas presentes nessa estrutura (JOSHI et al., 2010). Esse processo parece envolver o aumento da expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear-kB (RANKL) nas células luminais (Obr & Edwards, 2012) o qual é liberado para o meio

extracelular para se ligar aos receptores RANK nas células tronco, levando a ativação a jusante da via de sinalização IKK/IB/NFκB/cyclin D1 (SCHRAMEK et al., 2010).

O modelo de carcinogênese mamária em ratas tem sido considerado adequado para estudos de carcinogênese mamária humana (RUSSO et al., 1990). As características desse modelo permitem a elucidação de mecanismos envolvidos nos estágios de iniciação, promoção e progressão da carcinogênese e a transposição dos dados para humanos, a fim de desenvolver estratégias de prevenção e tratamento. As similaridades encontradas entre as neoplasias de ratas induzidas quimicamente e neoplasias humanas incluem: histotipo das neoplasias, presença de tipos de células que reagem com marcadores imunoistoquímicos similares e o comportamento da neoplasia (RUSSO et al., 1990; RUSSO; RUSSO, 2011).

Os principais modelos de carcinogênese mamária em ratas são os quimicamente induzidos pelos carcinógenos N-methylnitrosourea (NMU) e 7,12-dimethylbenz(*a*)anthracene (DMBA) em ratos Sprague-Dawley e Fischer 344. Nos carcinomas induzidos por DMBA, a incidência, latência, multiplicidade e histologia das neoplasias são dependentes da dose administrada por gavagem, podendo, a incidência, alcançar 100% com uma única dose. A suscetibilidade à carcinogênese induzida quimicamente é fortemente dependente da idade e é máxima quando administrada entre 45 a 60 dias de idade, período em que as TEBs estão se diferenciando em ABs com ativa organogênese e alta taxa de proliferação celular (RUSSO; WILGUS; RUSSO, 1979; RUSSO et al., 1990). A administração de DMBA nesse período inibe a diferenciação de TEBs à ABs, as quais se transformam em estruturas maiores chamadas de proliferação intraductal (IP). Estas por sua vez se tornam progressivamente maiores, culminando em confluência e formação de carcinomas *in situ*, podendo evoluir para carcinoma invasivo e ocasionalmente em metástase (RUSSO et al., 1990).

Por outro lado, TEBs que já se diferenciaram em AB antes da administração de DMBA não desenvolvem carcinomas, mas submetem-se a dilatação dando origem a lóbulos hiperplásicos ou dilatações císticas. Assim, carcinomas mamários originam-se em estruturas menos diferenciadas (TEBs), enquanto que lesões benignas, como adenomas, cistos e fibroadenomas originam-se de estruturas mais diferenciadas (ABs), indicando que o carcinógeno requer uma estrutura alvo adequada e o tipo de lesão depende da área da glândula mamária afetada (RUSSO; WILGUS; RUSSO, 1979; RUSSO et al., 1990).

No geral, as neoplasias mamárias em ratas induzidas quimicamente são adenocarcinomas ductais, fortemente hormônio dependente tanto para indução quanto para o crescimento, ou seja, ERα-positivos, e possuem características patológicas semelhantes às neoplasias do tipo adenocarcinomas em mulheres (RUSSO et al., 1990; RUSSO; RUSSO, 2011).

Origem desenvolvimentista do câncer de mama

A hipótese de "origem fetal das doenças no adulto" estabelece a relação entre ambiente intrauterino adverso com doença da prole na vida adulta. Este fenômeno, denominado "programação fetal" descreve o processo de estímulo *in útero* que constitui uma resposta permanente no feto promovendo maior suscetibilidade a doenças na vida adulta (ARMITAGE; TAYLOR; POSTO, 2005).

A influência do ambiente fetal no risco de desenvolvimento de doenças ao longo da vida foi primeiro sugerido por BARKER & OSMOND (1986) que observaram forte associação entre mortalidade infantil no período de 1921-25 e doença coronária no período de 1968-78, dependendo da localização geográfica. Seguindo essa lógica, dados epidemiológicos consistentes foram obtidos em grande estudo de coorte com pessoas que foram expostas, durante o período

fetal, à fome holandesa no momento da 2ª Guerra Mundial entre os anos de 1944-45. Restrição materna esteve associada ao desenvolvimento de diversas doenças nos descendentes, como as coronárias, hiperlipidemia, problemas de coagulação, obesidade; obstrução de vias aéreas, microalbuminúria e intolerância à glicose (PAINTER; ROSEBOOM; BLEKER, 2005).

Sugere-se que o baixo peso ao nascer reflita, indiretamente, condições intra-uterinas adversas, as quais promoveriam distúrbios no metabolismo que persistiriam e promoveriam maior suscetibilidade a diversas doenças na vida adulta (ARMITAGE; TAYLOR; POSTO, 2005). Vários estudos epidemiológicos e experimentais mostram associação entre baixo peso ao nascer e risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BARKER et al., 1989; CURHAN et al., 1996; McCANCE et al., 1994). Essa relação pode ser explicada pela hipótese do fenótipo econômico sugerido por HALES & BARKER (2001). É proposto que o feto se adapte à desnutrição materna promovendo um retardo no crescimento e permanentes mudanças no metabolismo, possibilitando o indivíduo a melhor sobreviver em um ambiente escasso no período pós-natal (GLUCKMAN; HANSON; BEEDLE, 2007). Quando este ambiente pós-natal não é escasso, como predito, e pelo contrário, o indivíduo apresenta uma alimentação densamente energética e com reduzido gasto, este irá desenvolver doenças como a obesidade e distúrbios no metabolismo de glicose (SWANSON et al., 2009; GLUCKMAN; HANSON; BEEDLE, 2007).

Porém, aventa-se que o alto peso ao nascer, também, esteja associado com aumento de obesidade e diabetes tipo 2, sugerindo que além de uma restrição alimentar, o excesso alimentar pode também programar o feto para o risco de desenvolvimento de doenças, como a síndrome metabólica, na vida adulta (CURHAN et al., 1996; McCANCE et al., 1994; ARMITAGE; TAYLOR; POSTO, 2005). Além disso, muitos fatores podem induzir mudanças na fisiologia e

anatomia durante o período fetal, com consequências ao longo da vida, sem necessariamente alterar o tamanho ao nascer (GLUCKMAN; HANSON; BEEDLE, 2007).

A hipótese do fenótipo econômico não provê explicação para alterada função da prole adulta pela supernutrição materna (ARMITAGE; TAYLOR; POSTO, 2005) com consequente alto peso ao nascer da prole, bem como não explica como eventos precoces na vida pode induzir mudanças fisiológicas sem alterar o tamanho ao nascer (GLUCKMAN; HANSON; BEEDLE, 2007). Assim, sugere-se a hipótese da "resposta adaptativa preditiva" que propõe que o feto faça mudanças *in útero* baseado no ambiente pós-natal predito. Quando esta resposta adaptativa é apropriada, o fenótipo é normal; entretanto, quando este ambiente predito é incompatível com o ambiente atual, a doença se manifesta (ARMITAGE; TAYLOR; POSTO, 2005).

Alteração do ambiente em outros períodos do desenvolvimento, como lactação, infância e puberdade, os quais são chamados de períodos de plasticidade do desenvolvimento pode também programar o fenótipo com modulação do risco de desenvolvimento de doenças. Significante maturação do organismo ocorre durante o período de amamentação, assim dieta materna durante esse período também tem profundo impacto na programação de doenças (ARMITAGE; TAYLOR; POSTO, 2005). Dieta rica em banha durante o período de amamentação promove na prole elevada pressão sanguínea, função endotelial deprimida e homeostase anormal de glicose (Khan et al., 2004; ARMITAGE; TAYLOR; POSTO, 2005). Neste contexto, mais recentemente, os termos "programação do desenvolvimento" e "origem desenvolvimentista da saúde e da doença" (DOHaD) são preferencialmente usados (ARMITAGE; TAYLOR; POSTO, 2005; GLUCKMAN; HANSON; BEEDLE, 2007; KAJANTIE, 2008).

Há fortes evidências que mudanças fisiológicas e estruturais obtidas através da manipulação do ambiente em períodos precoces da vida estão associadas com alterações

permanentes na expressão gênica regulada por fatores epigenéticos como metilação do DNA e modificações pós-traducionais de histonas como metilação e acetilação, já que estes fatores são de grande importância na biologia do desenvolvimento (GLUCKMAN; HANSON; BEEDLE, 2007; SWANSON et al., 2009).

Nos mamíferos, dois períodos são caracterizados por extensa reprogramação epigenética: a gametogênese e após a fertilização, em que ocorre ampla diferenciação celular (MICHELS; XUE, 2006; DELAGE; DASHWOOD, 2008). Após a fertilização, os genomas materno e paterno submetem-se a extensa desmetilação, seguida de metilação de novo por atividade de DNMT3a e 3b por volta do período de implantação. Padrões de metilação são mantidos através da mitose por atividade de DNMT1 (LILLYCROP et al., 2007).

Como descrito para doenças crônicas não transmissíveis como as cardiovasculares, diabetes e obesidade (LANGLEY-EVANS; McMULLEN, 2010), também no caso do câncer de mama aventa-se a hipótese de que sua origem poderia ser fetal (HILAKIVI-CLARKE-2007). Em 1990, Trichopoulos sugeriu que alguns cânceres de mama se originariam já no ambiente intra-uterino frente a exposições elevadas ao estrógeno (TRICHOPOULOS, 1990). Nesse sentido exposições hormonais no período pré-natal têm sido relacionadas à predisposição para o desenvolvimento de câncer de mama (YU et al., 2006; DE ASSIS et al., 2006; DE ASSIS; KHAN;HILAKIVI-CLARKE, 2006; HILAKIVI-CLARKE; DE ASSIS, 2006; HILAKIVI-CLARKE, 2007). Assim, por exemplo, filhas de mulheres que fizeram uso de dietilestilbestrol (estrógeno sintético) durante a gestação para evitar aborto espontâneo apresentaram risco aumentado para o câncer de mama (SANDERSON et al., 1998; PALMER et al.,2006).

Atualmente, alguns pesquisadores têm buscado entender os fatores de risco que estão associados com a programação do câncer de mama e assim prevenir de forma mais eficaz essa

neoplasia. Filhas de mães que sofrerem pré-eclâmpsia apresentam menor risco de desenvolvimento de câncer de mama na vida adulta. Além disso, fatores presentes no ambiente cultural das mães durante a gestação têm sido cada vez mais considerados potenciais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama na prole. Assim, o país de residência da mãe durante a gestação pode influenciar o risco de câncer de mama nas filhas indicando a importância das diferenças dos vários fatores étnicos/raciais no ambiente uterino (TROISI; POTISCHMAN; HOOVER, 2007).

Também a dieta materna durante a gestação e lactação pode ser particularmente importante em modificar o ambiente fetal e, consequentemente, a suscetibilidade ao câncer de mama na idade adulta (YU et al., 2006). Evidências sugerem que os períodos precoces da vida são os momentos em que a glândula mamária está mais sensível a influência da alimentação (STARK et al., 2003; MICHELS et al., 2007; MESSINA; HILAVIKI-CLARKE, 2009). Assim, diante da alta prevalência de câncer de mama e das evidências de sua possível origem fetal ou em períodos precoces da vida, como a lactação, tem se buscado em nível epidemiológico e experimental elucidar a associação da nutrição materna durante a gestação e lactação com o risco de desenvolvimento de câncer de mama nas descendentes. (LILLYCROP et al., 2005; HILAVIKI-CLARKE et al, 1997; 2006; DE ASSIS et al., 2006; KAHAN et al., 2007).

Alguns estudos encontraram relação direta entre alto peso ao nascer e incidência de câncer de mama, embora os mecanismos não sejam ainda completamente entendidos (MELLEMKJAER et al., 2003; AHLGREN et al., 2003; KAHAN et al., 2007; BURDGE; LILLYCROP; JACKSON, 2009). Metanálise de 26 estudos encontrou forte evidência entre peso ao nascer e risco de câncer de mama. O risco relativo estimado de desenvolvimento de câncer de mama para mulheres com alto peso ao nascer foi de 1,23 quando comparado a mulheres com

peso normal ao nascer (MICHELS; XUE, 2006). Diferente do observado para doenças cardiovasculares ou metabólicas, o baixo peso ao nascer parece reduzir o risco de câncer de mama (BURDGE; LILLYCROP; JACKSON, 2009).

O tecido adiposo apresenta funções endócrinas e metabólicas e assim influencia a síntese e biodisponibilidade de estrógeno e outros hormônios sexuais, insulina, IGF-1 e adipocinas como leptina e adiponectina. Esses hormônios e fatores de crescimento estão associados com o risco de câncer de mama (DE ASSIS et al., 2006), pois podem influenciar na glândula mamária o número de células embrionárias suscetíveis a carcinogênese (MICHELS; XUE, 2006; LOF et al., 2009).

A morfologia da glândula mamária pode ser alterada em um padrão que aumenta ou reduz a suscetibilidade à transformação maligna, incluindo aumento ou redução da proliferação, diferenciação celular e apoptose, ou do número de TEBs, que são os sítios de iniciação do câncer de mama (De ASSIS; HILAKIVI-CLARKE, 2006). As células tronco que compõem as TEBs possuem um longo tempo de vida útil e podem ser reprogramadas ainda durante o desenvolvimento precoce, como por exemplo, no período fetal ou durante a lactação. A programação dessas células pode ocorrer através de modificações epigenéticas que serão herdadas pelas células filhas após a divisão celular, dando origem a células luminais e mioepiteliais alteradas (HILAKIVI-CLARKE, 2007).

Origem desenvolvimentista do câncer de mama e nutrição

O período de exposição à diversos componentes alimentares é determinante do efeito destes em reduzir ou aumentar o risco de câncer de mama (De ASSIS; HILAKIVI-CLARKE, 2006). Em estudos conduzidos em animais, exposições a fatores dietéticos durante o período

fetal ou na puberdade, momentos em que a glândula mamária encontra-se em desenvolvimento e remodelação, alteram a suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores de mama (HILAKIVI-CLARKE, 2007). De forma semelhante, em humanos alguns resultados sugeriram que exposição à genisteína durante a infância reduziu o risco de câncer de mama tardio, embora esse efeito não tenha sido observado quando o consumo deste composto ocorreu especificamente durante a vida adulta (SHU et al., 2001; WU et al., 2002). Um link direto entre o feto e o ambiente intra-uterino é a transferência placentária de nutrientes da dieta materna. Assim, nutrição materna tem grande impacto no desenvolvimento do feto, incluindo o desenvolvimento da glândula mamária (MACLENNAN; MA, 2010).

A importância do período de exposição e risco de câncer de mama também é verdade para a gordura dietética. Maior sensibilidade é observada quando exposição a esse macronutriente ocorre em período intra-uterino, de pré-puberdade e puberdade (MACLENNAN; MA, 2010). Nesse contexto, tem-se voltado a atenção para o impacto do consumo de lipídeos durante a gestação e lactação com risco para câncer de mama na prole. Assim, por exemplo, ração indutora de obesidade (rica em óleo de soja e algodão) induziu aumento dos níveis de leptina em ratas Sprague-Dawley durante a gestação, resultando em maior incidência de neoplasias mamárias induzidas pelo DMBA tanto na mãe (DE ASSIS et al., 2006), quanto na prole feminina (De ASSIS; KHAN;HILAKIVI-CLARKE, 2006). Mais especificamente, nessas últimas observou-se nas primeiras 8 semanas de vida aumento do número de TEBs, bem como de células proliferando nessa estrutura mamária (De ASSIS; KHAN;HILAKIVI-CLARKE, 2006).

De forma semelhante, ração rica em ácidos graxos ômega 6 aumentou os níveis de estradiol em ratas gestantes, cuja prole feminina também apresentou maior predisposição ao desenvolvimento de câncer de mama induzido quimicamente (HILAVIKI-CLARKE et al.,

1997). Prole de camundongos fêmeas alimentadas com dieta suplementada com 10% p/p de óleo de canola (20% n-6,10% n-3) durante os períodos de gestação e lactação apresentaram menor suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores mamários, traduzidos em menor incidência, multiplicidade e peso dos tumores mamários (ION et al., 2010). Sugere-se que o ácido graxo da série ômega 3, o ácido docosahexaenóico (DHA), presente no leite materno, seja o principal responsável pela redução do risco de câncer de mama, através da amamentação, em mulheres pré-menopausadas. A suplementação desse ácido graxo em estágios precoces da vida como a lactação, parece exercer impacto direto no desenvolvimento da glândula mamária com consequente modificação do risco futuro de desenvolvimento de câncer neste órgão (MACLENNAN; MA, 2010).

Dieta, exposições ambientais e alterações endócrinas maternas podem aumentar o risco de câncer de mama por induzir no feto mudanças epigenéticas, que alterariam a sua suscetibilidade a fatores de iniciação do câncer de mama (LILLYCROP et al., 2005; HILAKIVI-CLARKE;DE ASSIS,2006; BURDGE; LILLYCROP; JACKSON, 2009).

Experimentos conduzidos em camundongos agouti foram importantes para demonstrar que a nutrição materna no período gestacional tem impacto profundo no padrão de metilação do genoma e, consequentemente, no fenótipo da prole, não apenas em relação ao padrão de coloração do pelo, mas também na suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (COONEY; DAVE; WOLFF, 2002; DOLINOY et al., 2006; BERNAL; JIRTLE, 2010). Restrição proteica durante o período fetal promoveu no fígado redução de 33% da metilação do promotor do gene GR1 (receptor de glicocorticóide), com aumento de sua expressão nos animais adultos. De acordo com os autores, esses resultados estão associados com redução da expressão de DNMT1 e alterações pós-traducionas em histonas, que promovem

ativação da transcrição, como aumento de acetilação de H3K9 (174%) e H4K9 (302%) (LILLYCROP et al., 2007). Em humanos e animais, ingestão de ácido fólico durante a gestação previne defeitos no tubo neural por favorecer a metilação de ilhas CpGs em determinadas regiões do genoma (CRACIUNESCU et al., 2004).

Consumo de ração rica em gordura (46% das calorias derivadas de óleo de milho) elevou em ratas prenhas os níveis de estrógeno, cuja prole feminina apresentou na idade adulta hipometilação de ER na glândula mamária, o que poderia estar relacionado ao maior desenvolvimento de câncer de mama quimicamente induzido (YENBUTR; HILAKIVI-CLARKE;PASSANITI, 1998). Considera-se que exposição dietética intra-uterina, durante a fase de desenvolvimento da mama, possa reprogramar epigeneticamente a expressão gênica na glândula mamária, resultando em TEBs com suscetibilidade alterada à transformação maligna, com aumento do número e de células proliferando nessa estrutura. Os genes que podem ser afetados nesse sentido incluem os que normalmente protegem as células da transformação maligna, destacando-se os que previnem a formação de adutos de DNA (genes antioxidantes ou que regulam o metabolismo celular), promovem reparo do DNA ou inibem a apoptose (De ASSIS; HILAKIVI-CLARKE, 2006; HILAKIVI-CLARKE, 2007). Alterações epigenéticas em genes que induzem a proliferação celular e inibem a diferenciação linhagem-específica são também alvos da exposição intra-uterina, já que sua superativação permite escape dos mecanismos de reparo celular (DE ASSIS; HILAKIVI-CLARKE, 2006).

Estudo de análise de expressão gênica global da glândula mamária da prole de mães que consumiram diferentes tipos de dieta rica gordura (39% das calorias em óleo de oliva ou em óleo de cártamo ou em manteiga) durante a gestação e lactação, observou alteração nas vias de proliferação celular e vias de checkpoint da fase G2/M do ciclo celular. Os genes que tiveram

sua expressão aumentada incluem marcadores de proliferação celular (ex: Ccnb1, Ccna2, Plk1, Aurkb, Top2a, Bub1) e genes regulados pela família de fatores de transcrição E2F (MEDVEDOVIC et al., 2009).

Apesar de se ressaltar a importância da elucidação dos mecanismos envolvidos nos efeitos das exposições dietéticas em fases precoces da vida na suscetibilidade ao câncer de mama para o estabelecimento de estratégias de redução do risco da doença (HILAKIVI-CLARKE, 2007), são ainda limitados os estudos conduzidos no campo emergente da nutrição e origem fetal e/ou precoce do câncer (BURDGE; LILLYCROP; JACKSON, 2009).

Deve-se levar em consideração o aumento, nas últimas décadas, do consumo de gorduras, principalmente as saturadas em nível global (OMS, 2003), bem como em nosso país, no qual se observa que 82% dos brasileiros consomem quantidades de ácidos graxos saturados superiores às recomendadas (IBGE, 2011). Mais especificamente, o grupo de gestantes também tem apresentado consumo elevado desse tipo específico de ácidos graxos (MARTINS; BENICIO, 2011), o que é de grande preocupação uma vez que diversas evidências apontam a dieta materna como um fator responsável pela modulação do risco de doenças na prole, inclusive o câncer de mama.

Nesse sentido, propôs-se avaliar o impacto do consumo de ração com alto teor de gordura animal por ratas, durante o período gestacional e lactacional, na suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária quimicamente induzida, bem como possíveis mecanismos celulares, moleculares e epigenéticos envolvidos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGAARD-TILLERY, K.M.et al.Developmental origins of disease and determinants of chromatin structure: maternal diet modifies the primate fetal epigenome. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.41, n.2, p.91-102, 2008.

ALBUQUERQUE, R.C.; BALTAR, V.T.; MARCHIONI, D.M. Breast cancer and dietary patterns: a systematic review. **Nutrition reviews**, Baltimore, v. 72, n.1, p.1-17, 2014.

AHLGREN, M. et al. Birth weight and risk of breast cancer in a cohort of 106,504 women. **International Journal of Cancer**, v.107, p.997–1000, 2003.

ALEXANDER, D.D. et al. A review and meta-analysis of red and processed meat consumption and breast cancer. **Nutrition Research Reviews**, v.23, p. 349–365, 2010.

ALLES, M.C. et al. Meta-Analysis and Gene Set Enrichment Relative to ER Status Reveal Elevated Activity of MYC and E2F in the ‘‘Basal’’ Breast Cancer Subgroup. **PLoS ONE**, v.4, n.3, p.1-13, 2009.

ALTEKRUSE, S.F. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/, based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010.

ALYAQOUB, F.S. et al. Prevention of mouse lung tumors and modulation of DNA methylation by combined treatment with budesonide and R115777 (ZarnestraMT). **Carcinogenesis**, England, v.28, n. 1, p.124-129, 2006.

AMERICAN OIL CHEMISTS’ SOCIETY. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists’ Society. 5th Ed. Champaign, USA, AOCS, 2004. [AOCS Official Method Cd 19-90 TBA Value].

ANDRADE, F.O. et al. Efficacy of the dietary histone deacetylase inhibitor butyrate alone or in combination with vitamin A against proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.45, n.9, p. 841-50, 2012.

ARMITAGE, J.A.; TAYLOR, P.D.; POSTON, L. Experimental models of development programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. **Journal of Physiology**, v.565, n.1, p.3-8, 2005.

ARMSTRONG, A. et al. Global DNA methylation measurement by HPLC using low amounts of DNA. **Biotechnology Journal**, v.6, p.113-117-2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis, Arlington, Official Method.n.996.06, cap.41, p.20-24A, 2002.

BAER, H.J.et al. Body fatness at young ages and risk of breast cancer throughout life. **American journal of epidemiology**, v.171, p.1183-1194, 2010.

BALLARD-BARBASH, R. et al. Physical Activity, Weight Control, and Breast Cancer Risk and Survival: Clinical Trial Rationale and Design Considerations. **Journal of the National Cancer Institute**, v.101, n.9, p.630-643, 2009.

BARBA, M. Et al. Fasting glucose and treatment outcome in breast and colorectal cancer patients treated with targeted agents: results from a historic cohort. **Annals of Oncology**, 2011.

BARCISZEWSKA, A.M. et al. Analysis of 5-Methylcytosine in DNA of Breast and Colon Cancer Tissues. **Life** , v.59, n.12, p.765 – 770, 2007.

BARKER, D.J. et al. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **Lancet**, v.2, n.8663, p.577-580, 1989.

BARKER, D.J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet**, v.1, p.1077-1081, 1986.

BAYLIN, S.B.; OHM, J.E. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nature reviews. Cancer**, England, v.6, n.2, p.107-116, 2006.

BERNAL, A.J.; JIRTLE, R.L. Epigenomic disruption: The effects of early developmental exposures. **Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology**, 2010. [Epub ahead of print]

BESSAOUD, F.; DAURÈS, J.P.; GERBER, M. Dietary Factors and Breast Cancer Risk: A Case Control Study Among a Population in Southern France. **Nutrition and cancer**, v.60, n2, p.177-187, 2008.

BLIGH, E.G; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v.37, n.8, p.911-917, 1959.

BOYD, N.F. et al. Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature. **British Journal of Cancer**, v.89, 1672 – 1685, 2003.

BURBEE, D.G. et al. Epigenetic Inactivation of RASSF1A in Lung and Breast Cancers and Malignant Phenotype Suppression. **Journal of the National Cancer Institute**, v.93,n.9, 2001.

BURDGE, G.C.; LILLYCROP, K.A.; JACKSON, A.A. Nutrition in early life, and risk of cancer and metabolic disease: alternative endings in an epigenetic tale? **British Journal of Nutrition**, v. 101, p.619–630, 2009.

CAPELL, B.C.; BERGER, S.L. Genome-wide epigenetics. **The Journal of investigative dermatology**, Baltimore, v133, n.6, p.e9, 2013.

CARROLL, K.K, BRADEN LM. Dietary fat and mammary carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, v.6, p.6:254–259, 1984.

CARROL, K.K. Experimental evidence of dietary factors and hormone-dependent cancers. **Cancer Research**, v.35, p.3374-3383, 1975.

CARVALHO, E.N.; CARVALHO, N.A.S.; FERREIRA, L.M. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 118, 2003.

CHAJÈS, V. et al. ω-3 and ω-6 Polyunsaturated fatty acid intakes and the risk of breast cancer in Mexican women: impact of obesity status. **Cancer Epidemiology**, Biomarkers & Prevention, v. 21, p.319-326, 2012.

CHEN, C.et al. Leptin incude growth of human ZR-75-1 breast cancer cells is associated with up-regulation of cyclin D1 and c-Myc and downregulation of tumor suppressor p53 and $p21^{WAF1/CIP}$. **Cancer Research treatment**, v.98, n.2, p.121-132, 2006.

CHI, P.; ALLIS, C.D.; WANG, G.G. Covalent histone modifications — miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. **Nature Reviews**, v. 10, p.457-469, 2010.

CHO, E. et al. Premenopausal Fat Intake and Risk of Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, United States, v.85, p. 1079-1085, 2003.

CHO, M. et al. Hypomethylation of the MN/CA9 promoter and upregulated MN/CA9 expression in human renal cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, v.85, n.4, p.563–567, 2001.

COONEY, C.A.; DAVE, A.A.; WOLFF, G.L. Maternal Methyl Supplements in Mice Affect Epigenetic Variation and DNA Methylation of Offspring. **Journal of Nutrition**, v.132, p.2393S-2400S, 2002.

COSTA I, SOLANAS M, ESCRICH E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12dimethylbenz(alpha)anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors. **Archives of pathology & laboratory medicine**, 126:915-27, 2002.

CRACIUNESCU, C.N. et al. Folic Acid Deficiency During Late Gestation Decreases Progenitor Cell Proliferation and Increases Apoptosis in Fetal Mouse Brain. **Journal of Nutrition**, v.134, p.162-166, 2004.

CURHAN, G.C. et al. Birth Weight and Adult Hypertension, Diabetes Mellitus, and Obesity in US Men. **Circulation**, v.94, p.3246-3250, 1996.

DAMMANN, R.; YANG, G.; PFEIFER, G.P. Hypermethylation of the CpG Island of Ras Association Domain Family 1A (RASSF1A), a Putative Tumor Suppressor Gene from the 3p21.3 Locus, Occurs in a Large Percentage of Human Breast Cancers. **Cancer Research**, v.61, p.3105–3109, 2001.

DAVIS, C.D.; MILNER, J.A. Biomarkers for diet and cancer prevention research: potentials and challenges. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.28, n.9, 1262-73, 2007.
De ASSIS, S.; HILAKIVI-CLARKE, L. Timing of Dietary Estrogenic Exposures and Breast Cancer Risk. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1089, p.14–35, 2006.

DAWSON, M.A; KOUZARIDES, T. Cancer Epigenetics: From mechanism to therapy. **Cell**, v. 150, n.1, p. 12-27, 2012.

De ASSIS, S.; KHAN, G.; HILAKIVI-CLARKE, L. High birth weight increases mammary tumorigenesis in rats. **International Journal of Cancer**, v.119, p.1537–1546, 2006.

De ASSIS, S. et al. Excessive Weight Gain during Pregnancy Increases Carcinogen-Induced Mammary Tumorigenesis in Sprague-Dawley and Lean and Obese Zucker Rats. **Journal of Nutrition**, v.136, p.998–1004, 2006.

De CONTI, A. Et al. Chemopreventive effects of the dietary histone deacetylase inhibitor tributyrin alone or in combination with vitamin A during the promotion phase of rat hepatocarcinogenesis. **Journal of Nutrition Biochemisty**, 2011. [Epub ahead of print]

DELAGE, B.; DASHWOOD, R.H. Dietary manipulation of histone structure and function. **Annual Review of Nutrition**, v.28, p.347-366, 2008.

DOHERTY, L.F. et al. In utero exposure to diethylstilbestrol(DES) or bisphenol-A(BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. **Hormones & Cancer**, v. 1, n.3, p.146-155, 2010.

DOLINOY, D.C. et al. Maternal Genistein Alters Coat Color and Protects Avy Mouse Offspring from Obesity by Modifying the Fetal Epigenome. **Environmental Health Perspectives**, v.114, n.4, p.567-572, 2006.

DUMONT, N. et al. Human mammary cancer progression model recapitulates methylation events associated with breast premalignancy. **Breast Cancer Research**, v.11, n.6, p.1-17, 2009.

DUNN, B.K.; VERMA, M.; UMAR, A. Epigenetics in cancer prevention: early detection and risk assessment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, United States, v.983, p.1-4, 2003.

EKBOM, A. et al. Intrauterine environment and breast cancer risk in women: a population-based study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, p.71-76,1997.

ELLINGER, J. et al. Prognostic relevance of global histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in renal cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, v.127, n.10, p.2360-2366, 2010.

ELSHEIKH, S.E. et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. **Cancer Research**, v.69, n.9, p.3802-3809, 2009.

FAY, M.P. et al. Effect of Different Types and Amounts of Fat on the Development of Mammary Tumors in Rodents: A Review. **Cancer Research**, v.57, p.3979-3988, 1997.

FERNANDEZ-TWINN, D.S. et al. Compensatory mammary growth following protein restriction during pregnancy and lactation increases early-onset mammary tumor incidence in rats. **Carcinogenesis**, v.28, p.545-552, 2007.

FERNANDEZ-VALDIVIA, R.; LYDON, J.P. From the ranks of mammary progesterone mediators, RANKL takes the spotlight. **Molecular and Cellular Endocrinology** xxx (2011) xxx–xxx.

FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet].Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: http://globocan.iarc.fr, accessed on 13/02/2014.

FRAGA, M.F. et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. **Nature Genetics**, v.37, n.4, p.391-400, 2005.

FREEDMAN, L.S.; CLIFFORD, C.; MESSINA, M. Analysis of Dietary Fat, Calories, Body Weigth, and the Development of Mammary Tumors in Rats and Mice: A Review. **Cancer Research**, v.50; p.5710-5719.

FULLGRABE, J.; KAVANAGH, E.; JOSEPH, B. Histone onco-modifications. **Oncogene**,v.30, p. 3391–3403, 2011.

GALLOU-KABANI, C. et al. Resistance to high-fat diet in the female progeny of obese mice fed a control diet during the periconceptual, gestation, and lactation periods. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, v.292, p.E1095-E1100, 2007.

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A.; BEEDLE, A.S. Early Life Events and Their Consequences for Later Disease: A Life History and Evolutionary Perspective. **American Journal of Human Biology**, v.19, p.1-19, 2007.
Gonzalez CA, Riboli E. Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. Eur J Cancer 2010 Sep; 46(14): 2555-62.

GU, Y.et al. Differential expression of decorin, EGFR and cyclin D1 during mammary gland carcinogenesis in TA2 mice with spontaneous breast cancer. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v.29, n,6, 2010.

HALES, C.N.; BARKER, D.J. The thrifty phenotype hypothesis. **British Medical Bulletin**, v.60, p.5–20, 2001.

HARDY, R.W.et al. Fatty acids and breast cancer cell proliferation. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 422, 57–69, 1997.

HELLER, G. et al. CDK10 Is Not a Target for Aberrant DNA Methylation in Breast Cancer. **Anticancer Research**, v.29, p.3939-3944, 2009.

HESSON, L. et al. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. **Oncogene**, v.23, p.2408–2419, 2004.

HILAKIVI-CLARKE, L.; DE ASSIS, S. Fetal origins of breast cancer. TRENDS **in Endocrinology and Metabolism**, v.1, n.9, p.340-348, 2006.

HILAKIVI-CLARKE, L. et al. Mechanisms Mediating the Effects of Prepubertal (n-3) Polyunsaturated Fatty Acid Diet on Breast Cancer Risk in Rats. **Journal of Nutrition**, v.135, p.2946S-2952S, 2005.

HILAKIVI-CLARKE, L.et al. Nutritional modulation of the cell cycle and breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v.11, p.603–622, 2004.

HILAVIKI-CLARKE, L. Nutritional Modulation of Terminal End Buds: Its Relevance to Breast Cancer Prevention. **Current Cancer Drug Targets**, v.7, p. 465-474, 2007.

HILAVIKI-CLARKE, L.et al. A maternal diet high in n-6 polynsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v.94, p.9372-9377, 1997.

HILL, M.J.; Nutrition and Human Cancer. **Annals New York Academy Of Sciences**, v.833, p.68-78, 1997.

HINSHELWOOD, R.A.; CLARK, S.J. Breast cancer epigenetics: normal human mammary epithelial cells as a model system. **Journal of Molecular Medicine**, Netherlands, v.86, n.12, p.1315-1328, 2008.

HSU, S.-M., RAINE, L., FANGER, F. A. A comparative estudy of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimunoassay antibodies. **American Journal of Clinical Pathology**,v.75, p.734-8, 1981.

HUANG, M. et al. A High-Fat Diet Enhances Proliferation of Prostate Cancer cells and Activates MCP-1/CCR2 Signaling. **The Prostate**, 2012. [Epub ahead of print]

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: **Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil**. Rio de Janeiro, 2011.

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

ION, G.; AKINSETE, J.A.; HARDMAN, W.E. Maternal consumption of canola oil suppressed mammary gland tumorigenesis in C3(1)Tag mice offispring. **BMC Cancer**, v.6, n.81, p.1-12, 2010.

JACKSON, K. et al. DNA Hypomethylation Is Prevalent Even in Low-Grade Breast Cancers. **Cancer Biology & Therapy**, v.3, n.12, p.1225-1231, 2004.

JEE, S.H.et al. Fasting serum glucose level and cancer risk in Korean men and women. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v.293, n.2,p.194–202, 2005.

JOSHI, P.A.; JACKSON, H.W.; BERISTAIN, A.G. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. **Nature**, v.465, p.803-807, 2010.

JUNIEN, C.; NATHANIELSZ, P. Report on the IASO Stock Conference 2006: early and lifelong environmental epigenomic programming of metabolic syndrome, obesity and type II diabetes. **Obesity reviews**, v.8, p.487-502, 2007.

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

KADOTA, M. et al. Delineating Genetic Alterations for Tumor Progression in the MCF10A Series of Breast Cancer Cell Lines. **PLoS ONE**, v.5, n.2, p.1-10, 2010.

KAJANTIE, E. Early-life events. Effects on aging. **Hormones**, v.7, p.101-113, 2008.

KANAI, Y.; HIROHASHI, S. Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state. **Carcinogenesis**, England, v.28, n.12, p.2434-2442, 2007.

KAPOOR-VAZIRANI, P. et al. Role of hMOF-dependent histone H4 lysine 16 acetylation in the maintenance of TMS1/ASC gene activity. **Cancer Research,** v.68, n.16, p.6810-6821, 2008.

KEY, T.J.et al. Dietary fat and breast cancer: comparison of results from food diaries and food-frequency questionnaires in the UK Dietary Cohort Consortium. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, p.1043-1052, 2011.

KEARNEY J. Food consumption trends and drivers. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, Londres, v. 365, n. 1554, p. 2793-807, 2010.

KHAN, G. et al. Maternal flaxseed diet during pregnancy or lactation increases female rat offspring's susceptibility to carcinogen-induced mammary tumorigenesis. **Reproductive Toxicology**, v.23, p.397-406, 2007.

KHAN, I.Y.et al. A high fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.288, p.127-133, 2004.

KHAN, N,; AFAQ, F.; MUKHTAR, H.Cancer Chemoprevention Through Dietary Antioxidants: Progress and Promise. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.10, n.3, p.475-510, 2008.

KHAN, Y.et al. High-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v.288, p.R127–R133, 2005.

KIM, DH.et al. Relationship of Ras Association Domain Family 1 Methylation and K-Ras Mutation in Primary Non-Small Cell Lung Cancer. **Cancer Research**, v.63, p.6206–6211, 2003.

KIM, H.S. et al. Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 Induces G1 Cell Cycle Arrest with Inhibition of Cyclindependent Kinase 2 and 4 in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. **Horm Metab Res**, v.42, p.165 – 172, 2010.

KUROIWA-TRZMIELINA, J. et al. Chemoprevention of rat hepatocarcinogenesis with histone deacetylase inhibitors: efficacy of tributyrin, a butyric acid prodrug. **International Journal of Cancer**, United States, v,124, n.11, p.2520-2527, 2009.

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

LARSSON, S.C.; MANTZOROS, C.S.; WOLK, A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer:a meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v.121, p.856–862, 2007.

LEESON, C.P. et al. Duration of breast feeding and arterial distensibility in early adult life: population based study. **British Medical Journal**, v.322, p.643-647, 2001.

LESZINSKI, G. et al. Relevance of Histone Marks H3K9me3 and H4K20me3 in Cancer. **Anticancer Research**, v.32, n.5, p.2199-2205, 2012.

LI, C. et al. Prevention of carcinogenesis and inhibition of breast cancer tumor burden by dietary stearate. **Carcinogenesis**, v.32, p.1251-1258, 2011.

LILLYCROP, K.A.; BURDGE, G.C. The effect of nutrition during early life on the epigenetic regulation of transcription and implications for human diseases. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v.4, p.248-260, 2011.

LILLYCROP, K.A. et al. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. **Journal of Nutrition**, v.135, n.6, p.1382-1386, 2005.

LILLYCROP, K.A.et al. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a proteinrestricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. **Br Journal of Nutrition**, v.97, n.6, p.1064-1073, 2007.

LLOYD, J.C.et al. Effect of Isocaloric Low Fat Diet on Prostate Cancer Xenograft Progression in a Hormone Deprivation Model. **The Journal of Urology**, v. 183, p.1619-1624, 2010.

LO, C-Y. et al. A maternal high-fat diet during pregnancy in rats results in a greater risk of carcinogen-induced mammary tumors in the female offspring than exposure to a high-fat diet in postnatal life. **International Journal of Cancer**, v.125, p.767–773, 2009.

LOF, M. et al. Dietary fat intake and gestational weight gain in relation to estradiol and progesterone plasma levels during pregnancy: longitudinal study in Swedish women. **BMC Women's Health**, v.9, n.10, p1-9, 2009.

MACCIO, A.; MADEDDU, C. Obesity, Inflammation, and Postmenopausal Breast cancer: therapeutics implications. Scientific World Journal, v. 11, p.2020-2036, 2011.

MACLENNAN, M.;DAVID WL MA. Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast câncer. Breast Cancer Research, v.12, n.211, p.1-10, 2010.

MCKAY, J.A.; MATHERS, J.C. Diet induced epigenetic changes and their implications for Health. **Acta Physiology**, v.202, p. 103–118, 2011.

MARTIN FL. Epigenetic influences in the aetiology of cancers arising from breast and prostate: a hypothesised transgenerational evolution in chromatin accessibility. **ISRN Oncology**, v. 2013, p.1-13, 2013..

MARTIN, L.J.et al. A Randomized Trial of Dietary Intervention for Breast Cancer Prevention. **Cancer Research**, v. 71, p. 123-133, 2011.

MARTIN-MORENO, J.M.; SOERJOMATARAM, I.; MAGNUSSON, G. Cancer causes and prevention: A condensed appraisal in Europe in 2008. **European Journal of Cancer, England**, v.44, n.10, p.1390-1403, 2008.

MARTINS, A.P.B.; BENICIO, M.H.D. Influência do consumo alimentar na gestação sobre a retenção de peso pós-parto. **Revista de Saúde Pública**, v.45, n.5, p.870-877, 2011.

MCCORMACK, V.A.et al. Fetal growth and subsequent risk of breast cancer: results from long term follow up of Swedish cohort. **British Medical Journal**, v. 326, n.248, p.1-6, 2003.

MELLEMKJAER, L.et al.Birth weight and risk of early-onset breast cancer (Denmark). **Cancer Causes and Control**, v.14, p.61–64, 2003.

MESSINA, M.; HILAKIVI-CLARKE, L. Early intake appears to be the key proposed protective effects of soy intake against breast cancer. **Nutrition and cancer**, v.61, n.6, p.792-798, 2009.

MICHELS, K,B.; XUE, F. Role of bithweight in the etiology of breast cancer. **International Journal of Cancer**, v.119, p.2007-2025, 2006.

MICHELS, K.B.et al. Diet and Breast Cancer: A Review of the Prospective Observational Studies. **Cancer**, v.109, p.2712-49, 2007. Supplement 12.

MINUCCI, S.; PELICCI, P.G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. **Nature Reviews**. Cancer, England, v.6, n.1, p.38-51, 2006.

MOTT, G.E. et al. Cholesterol metabolism in adult baboons is influenced by infant diet. **Journal of Nutrition**, v.120, p.243-251, 1990.

MUNZEL, P. et al. Genomic alterations of the c-myc protooncogene in relation to the overexpression of c-erbB2 and Ki-67 in human breast and cervix carcinomas. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v.117, n.6, p.603-607, 1991b.

MUNZEL, P.A. et al. Site-specific hypomethylation of c-myc protooncogene in liver nodules and inhibition of DNA methylation by N-nitrosomorpholine. **Biochemical pharmacology**, v.42, n.2, p.365-371, 1991a.

NARITA, S. et al. Candidate Genes Involved in Enhanced Growth of Human Prostate Cancer Under High Fat Feeding Identif ied by Microarray Analysis. **The Prostate**, v.68, p.321-335, 2008.

NICULESCU, M.D.; LUPU, D.S. High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. **International Journal of Developmental Neuroscience**, n.27, p.627-633, 2009.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. SEER Stat Fact Sheets: Breast Cancer.Disponível em <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html> Acesso em: 16 Abr. 2014.

NIELSEN, T.S. et al. Prepubertal exposure to cow's milk reduces susceptibility to carcinogen-induced mammary tumorigenesis in rats. **International Journal of Cancer**, v.0, p.000-000, 2010.

OBR, A.E.; EDWARDS, D.P. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. **Molecular and cellular endocrinology**, Amsterdam, v. 357, n. 1-2, p. 4-17, 2012.

OLIVEIRA, T.W.S. et al. A Perinatal Palatable High-Fat Diet Increases Food Intake and Promotes Hypercholesterolemia in Adult Rats. **Lipids**, v. 46, p.1071-1074, 2011.

OLIVO, S.; HILAKIVI-CLARKE, L. Opposing effects of prepubertal low- and high-fat n -3 polyunsaturated fatty acid diets on rat mammary tumorigenesis. **Carcinogenesis**, v.26, n.9, p.1563–1572, 2005

OLIVO-MARSTON, S.E. et al. Gene signaling pathways mediating the opposite effects of prepubertal low and high fat n-3 polyunsaturated fatty acid diets on mammary cancer risk. **Cancer Prevention Research**, v.1, n.7, p.532–545, 2008.

ONG, T.P. et al. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. **Carcinogenesis**, England, v.27, v.6, p. 1194-203, 2006.

ONG, T.P.; MORENO, F.S.; ROSS, S.A. Targeting the Epigenome with Bioactive Food Components for Cancer Prevention. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v.4, p.275-292, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Diet, **Nutrition and the prevention of Chronic diseases**: WHO Technical Report Series. Geneva, 2003. 149 p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **World Health Statistics**. Geneva, 2008.112 p.

ORGANIZACÃO MUNDIAL DA SAÚDE(OMS). Breast cancer: prevention and control. Disponível em < http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index.html>. Acesso em 11/05/2012.

PAINTER, R.C.; ROSEBOOM, T.J.; BLEKER, O.P. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: An overview. **Reproductive Toxicology**, v. 20, p.345-352, 2005.

PALMER, J.R. et al. Prenatal Diethylstilbestrol Exposure and Risk of Breast Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, United States, v.15, n.8, p.1509-1514, 2006.

PARK, S.K.et al. Intrauterine environments and breast cancer risk: meta-analysis and systematic review. **Breast Cancer Research**, v.10, n.1, p.1-34, 2008.

PARK, S.Y. et al. Dietary fat and breast cancer in postmenopausal women according to ethnicity and hormone receptor status: the Multiethnic Cohort Study. **Cancer Prevention Research**, v. 5, p.216-228, 2012.

PATEL, R.R.; SHARMA, C.G.N.; JORDAN, V.C. Optimizing the antihormonal treatment and prevention of breast cancer. **Breast Cancer**, New Zealand, v.14, n.2, p.13-122, 2007.

PELUCCHI, C. et al. Olive oil and cancer risk: an update of epidemiological findings through 2010. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p.805-812, 2011.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, v.117, n.11, p.3155-3163, 2007.

POTISCHAMN, N.;TROISI, R. In-utero and early life exposures in relation to risk of breast cancer. **Cancer Causes and Control**, v.10, p.561-573, 1999.

RAPP, K. et al. Fasting blood glucose and cancer risk in a cohort of more than 140000 adults in Austria. **Diabetologia**, v.49, n.5, p.945–952, 2005.

RIBOLI, E.; NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. **Am J Clin Nutr**, v.78, p.559S-569S, 2003.

RIJNKELS, M.et al. The epigenetic landscape of mammary developmental and functional differentiation. **Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia**, v.15, n.1, p.85-100, 2010.

ROMIEU, I. Diet and Breast Cancer. **Salud pública de México**. v.53, p.430-439, 2011.

ROSS, S.A. Evidence for the relationship between diet and cancer. **Exp Oncol**. 2010 Sep;32(3):137-42.

RUDER, E.H.et al. Examining Breast Cancer Growth and Lifestyle Risk Factors: Early Life, Childhood, and Adolescence. **Clinical Breast Cancer**, v.8, n.4, p.334–342, 2008.

RUSSO, I.H.; RUSSO, J. Pregnancy-In duced Changes in Breast Cancer Risk. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.16, p. 221-233, 2011.

RUSSO, IH.; RUSSO, J. Mammary Gland Neoplasia in Long-Term Rodent Studies. **Environmental Health Perspectives**, v.104, n.9, p.938-957, 1996.

RUSSO, J. et al. Comparative Study of Human and Rat Mammary Tumorigenesis. **Laboratory Investigation**, v.62, n.3, p. 244-273, 1990.

RUSSO, J.; RUSSO, I.H. Biological and Molecular Bases of Mammary Carcinogenesis. **Laboratory Investigation**, v.57, n.2, p.112-137, 1987.

RUSSO, J.; RUSSO, IH. Development of the human breast. **Maturitas**, v.49, p.2-15, 2004.

RUSSO, J.; WILGUS, G.; RUSSO, I.H. Susceptibility of the Mammary Gland to Carcinogenesis. **The American Journal of Pathology**, v.96, p.721-736, 1979.

SANDERSON, M.et al. Weight at birth and adolescence and premenopausal breast cancer risk in a low-risk population. **British Journal of Cancer**, v.86, p.84-88, 2002.

SANDERSON, M.et al. Maternal factors and breast cancer risk among young women. **Paediatric and perinatal epidemiology**, England, v.12, n.4, p.397-407, 1998.

SANGARAMOORTHY, M.et al. Early life factors and breast cancer risk in Hispanic women: the role of adolescent body size. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention**, 2011.

SANTOS, F.; DEAN, W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. **Reproduction**, v. 127, p. 643-651, 2004.

SANTOS-ROSA, H.; CALDAS, C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. **European Journal of Cancer**, England, v.41, n,16, p.2381-2402, 2005.

SAXENA, N.K.et al. Leptin-induced Growth Stimulation of Breast Cancer Cells Involves Recruitment of Histone Acetyltransferases and Mediator Complex to CYCLIN D1 Promoter via Activation of Stat3. **The Journal of Biological Chemistry**, v.282, n.18, p. 13316–13325, 2007.

SCHRAMEK, D. et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. **Nature**, v. 468, n.7320, p. 98-102, 2010.

SCZANIECKA, A.K. et al.. Dietary intake of specific fatty acids and breast cancer risk among postmenopausal women in the VITAL cohort. **Nutrition and cancer**, Filadélfia, v. 64, n.8, p. 1131-42, 2012.

SEKHAVAT, A.; SUN, J.M.; DAVIE, J.R. Competitive inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A and butyrate. **Biochemistry and cell biology**, Canada, v. 85, n.6, p.751-752, 2007.

SHAW, M.A.; RASMUSSEN, K.M.; MYERS, T.R. Consumption of a High Fat Diet Impairs Reproductive Performance in Sprague-Dawley Rats. **Journal of Nutrition**, v.127, p.64 – 69, 1997.

SHIVAKUMAR, L.et al. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. **Journal of molecular cell biology**, United States, v.22, n.12, p.4309-4318, 2002.

SHU, X.O.et al. Soyfood Intake during Adolescence and Subsequent Risk of Breast Cancer among Chinese Women. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 10, p. 483–488, 2001.

SIGNORI, C.et al. Chemoprevention of breast cancer by fish oil in preclinical models: trials and tribulations. **Cancer Research,** v. 71, p.6091-6096, 2011.

SMALLEY, M.; ASHWORTH, A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. **Nature**, v.3, p.832-844, 2003.

SMITH-WARNER, S.A.et al. Types of dietary fat and breast cancer: a pooled analysis of cohort studies. **International Journal of Cancer**, v. 92, p.767-774, 2001.

SMITH-WARNER, S.A. et al. Types of dietary fat and breast cancer: a pooled analysis of Cohort studies. **International Journal of Cancer**, v.92, p.767–774, 2001.

STARK, A.H.et al. Olive Oil Consumption During Pregnancy and Lactation in Rats Influences Mammary Cancer Development in Female Offspring. **Nutrition and Cancer**, v.46, n.1,p.59–65, 2009.

STATTIN, P.et al. Prospective study of hyperglycemia and cancer risk. **Diabetes Care**, v.30, n.3, p.561–567, 2007.

STENDAH, M.et al. p27Kip1 is a predictive factor for tamoxifen treatment response but not a prognostic marker in premenopausal breast cancer patients. **International Journal of Cancer,** 2010 Mar 3. [Epub ahead of print].

STOLL, B.A. Teenage obesi ty in relation to breast cancer risk. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v.22, p.1035 -1040, 1998.

STRAKOVSKY, R.S.et al. Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate c arboxykinase gene expre ssion and histone modification in neonatal offspring rats. **Journal of Physiology**, v.589, n.11, p.2707–2717, 2011.

SU, H-M.; HSIEH, P-H.; CHEN, H-F. A maternal high n-6 fat diet with fish oil supplementation during pregnancy and lactation in rats decreases breast cancer risk in the female offspring. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p;1033 – 1037, 2010.

SUBURU, J.; CHEN, Y.Q. Lipids and prostate cancer. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, 2012. [Epub ahead of print]

SULLIVAN, E.L.et al. Chronic Consumption of a High-Fat Diet during Pregnancy Causes Perturbations in the Serotonergic System and Increased Anxiety-Like Behavior in Nonhuman Primate Offspring. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n.10, p.3826 -3830, 2010.

SUVÀ, M.L.; RIGGI, N.; BERNSTEIN, B.E. Epigenetic reprogramming in cancer. **Science**. v. 339, p.1567-15790, 2013.

SWANSON, J.M.et al. Developmental Origins of Health and Disease: Environmental Exposures. **Seminars in reproductive endocrinology**, v.27, p. 391–402, 2009.

SZYFA, M.; PAKNESHANB, P.; RABBANI, S.A. DNA methylation and breast cancer. **Biochemical Pharmacology**, v.68, p.1187–1197, 2004.

TAMASHIRO, K.L.K.et al. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat of fspring. **Diabetes**, v.58, p.1116–1125, 2009.

THIEBAUT, A.C.M.et al. Dietary Fat and Postmenopausal Invasive Breast Cancer in the National Institutes of Health – AARP Diet and Health Study Cohort . **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, p.451-462, 2007.

TRICHOPOULOS, D. Hypothesis: does breast cancer originate in utero? **Lancet**, v.335, n.8695, p939-940, 1990.

TRICHOPOULOU, A. et al.Cancer and Mediterranean dietary traditions. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 9, p. 869-873, 2000.

TRICHOPOULUS, D. et al. Early life events and conditions and breast cancer risk: From epidemiology to etiology. **International Journal of Cancer**, v. 122, p.481–485, 2008.

TROCK, B.J.; HILAKIVI-CLARKE, L.; CLARKE, R. Meta-Analysis of Soy Intake and Breast Cancer Risk. **Journal of the National Cancer Institute**, v.98, p.459-471, 2006.

TROISI, R.; POTISCHMAN, N.; HOOVER, R.N. Exploring the Underlying Hormonal Mechanisms of Prenatal Risk Factors for Breast Cancer: A Reviewand Commentary. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention**, v.16, p.1700-1712, 2007.

UMETANI, N.et al. Methylation of p16 and Ras Association Domain Family Protein 1a during Colorectal Malignant Transformation. **Molecular Cancer Research**, v. 4., n.5.; 303-209, 2006.

VASTENHOUW, N.L.; SCHIER, A.F. Bivalent histone modifications in early embryogenesis. **Current Opinion in Cell Biology**, v.24, p.1-13, 2012.

VATTEN, L.J.et al. Size at birth and risk of breast cancer: prospective population-based study. **International Journal of Cancer**, v.114, p.461-464, 2005.

VRIELING, A.et al. Adult weight gain in relation to breast cancer risk by estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis. **Breast Cancer Research Treatment**, v.123, p.641–649, 2010.

WANG, R.et al. SREBP-1c Mediates the Effect of Insulin on the Expression of Cidea in Mouse Hepatocytes. **Biochemical Journal Immediate Publication**,2010. [Epub ahead of print]

WATERLAND, R.A.; GARZA, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 69, p.179–197, 1999.

WEI, Y.et al. Loss of trimethylation at lysine 27 of histone H3 is a predictor of poor outcome in breast, ovarian, and pancreatic cancers. **Molecular Carcinogenesis**, v.47, n.9, p.701-706, 2008.

WHITSETT T, CARPENTER M, LAMARTINIERE CA. Resveratrol, but not EGCG, in the diet suppresses DMBA-induced mammary cancer in rats. **Journal of Carcinogenesis**, v. 5, n.15, 2006.

WICKRAMASINGHE, N.S.; JO, H.; MCDONALD, J.M.; HARDY, R.W. Stearate inhibition of breast cancer cell proliferation. A mechanism involving epidermal growth factor receptor and G-proteins. **The American Journal of Pathology**, v.148, p.987–995, 1996.

WILLET, W.C. Specific fatty acids and risks of breast and prostate cancer: dietary intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 66, p.1557S-1563S, 1997.

WILLETT, W.C. Diet and breast cancer. **Journal of Internal Medicine**, v.249, p. 395-411, 2001.

WU, A. H.et al. Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. **Carcinogenesis**, v.23, p.1491-1496, 2002.

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. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.106, p.93–102, 1998.

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. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.106, p.93–102, 1998.

YU, B.et al. Maternal dietary exposure to fiber during pregnancy and mammary tumorigenesis among rat offspring. **International Journal of Cancer**, v.119, p.2279-2286, 2006.

ZENG, L. et al. Saturated fatty acids modulate cell response to DNA damage: implication for their role in tumorigenesis. **PLoS One**, v.3, p.e2329, 2008.

4. OBJETIVOS

Geral

Avaliar se o consumo de ração com alto teor de gordura animal (banha) por ratas, durante o período gestacional ou gestacional e lactacional, altera a suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária quimicamente induzida, bem como possíveis mecanismos celulares, moleculares e epigenéticos envolvidos.

Específicos

- Determinar os níveis séricos de estradiol, leptina e progesterona em ratas prenhas expostas ou não à ração com alto teor de gordura animal (banha), bem como em sua prole.

- Avaliar o desenvolvimento de neoplasias mamárias, induzidas pelo carcinógeno DMBA, em ratas expostas ou não à ração com alto teor de gordura animal (banha) durante o período fetal e lactacional.

- Realizar análise histopatológica dos tumores de mama de ratas expostas ou não à ração com alto teor de gordura animal (banha) durante o período fetal e lactacional e iniciadas com DMBA.

- Avaliar a morfologia, proliferação celular e apoptose em glândulas mamárias de ratas jovens expostas ou não à ração com alto teor de gordura animal (banha) durante o período fetal e lactacional.

- Avaliar em glândulas mamárias de ratas jovens expostas ou não à ração com alto teor de gordura animal (banha) no período fetal e lactacional:
    - Padrão de metilação global do DNA;
    - Padrão de acetilação de histonas H3K9 e H4K16 e trimetilação de histonas H3K9, H3K27 e H3K4;
    - Expressão a nível de proteína dos receptores hormonais de progesterona (PR), estrógeno (ERα e ERβ) e fator de crescimento epidermal (HER-2).
    - Expressão gênica global;
    - Perfil de ácidos graxos (Lipidoma).

5. ORGANIZAÇÃO DA TESE

Este estudo está estruturado no formato de dois artigos científicos, os quais juntos respondem aos objetivos do trabalho. O primeiro artigo intitulado por "Exposição à ração com alto teor de gordura animal (banha) durante os períodos fetal e lactacional modifica a suscetibilidade ao câncer de mama na vida adulta em ratas" relata que prole feminina de ratas mães que consumiram ração com alto teor de gordura animal durante a gestação e gestação e lactação apresenta menor suscetibilidade ao câncer de mama na vida adulta. Maior proteção foi observada na prole do grupo de mães que foram expostas à ração experimental somente durante a gestação, enquanto que a contínua exposição durante a lactação reduziu os efeitos protetores. Dentre os possíveis mecanismos envolvidos nessa proteção encontram-se a alteração do número de TEBs, crescimento da árvore mamária epitelial, redução da proliferação celular, aumento de apoptose e modificações pós-traducionais de histonas.

O segundo artigo intitulado por "Perfil de ácidos graxos e padrão de expressão gênica global em glândulas mamárias de ratas expostas à ração com alto teor de gordura animal, durante o período fetal e lactacional, associados ao risco de câncer de mama na vida adulta" relata que a exposição à ração com alto teor de gordura animal a base de banha durante períodos precoces da vida altera o lipidoma e o transcriptoma da glândula mamária da prole feminina no período de puberdade (7 semanas de vida) e essas alterações no perfil de ácidos graxos e no padrão de expressão gênica global poderiam estar associados com a redução da suscetibilidade ao câncer de mama na vida adulta. Ainda, o período específico de exposição promove impactos diferentes no organismo, reforçando o conceito de diferentes janelas de suscetibilidade durante o desenvolvimento.

6. ARTIGO 1: Exposição à ração com alto teor de gordura animal (banha) durante os períodos fetal e lactacional modifica a suscetibilidade ao câncer de mama na vida adulta em ratas [Publicado no Journal of Nutritional Biochemistry]

Exposure to lard-based high-fat diet during fetal and lactation periods modifies breast cancer susceptibility in adulthood in rats

Fábia de Oliveira Andrade[1]; Camile Castilho Fontelles[1]; Mariana Papaléo Rosim[1]; Tiago Franco de Oliveira[1]; Ana Paula de Melo Loureiro[1]; Jorge Mancini Filho[1]; Marcelo Macedo Rogero[2]; Fernando Salvador Moreno[1,3]; Sonia de De assis[4]; Luiz Fernando Barbisan[5]; Leena Hilakivi-Clarke[4]; Thomas Prates Ong[1,3].

[1]Faculdade de Ciências Farmacêuticas e [2]Escola de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; [3]Núcleo de Apoio à Pesquisa em Alimentos e Nutrição (NAPAN), São Paulo, Brasil; [4]Georgetown University Lombardi Comprehensive Cancer Center, Washington D.C., USA; [5]Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, Brasil.

Apoio Financeiro: Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 2010/11742-0; 2011/23259-4; 2012/03330-9).

Palavras-chave: câncer de mama, dieta com alto teor de gordura, programação fetal, via do RANK / RANKL, H3K9me3

Resumo

O presente estudo investigou se a exposição precoce à ração com alto teor de gordura animal aumenta o risco de câncer de mama na vida adulta em ratas. Ratas mães foram expostas à ração com alto teor de gordura (ATG) à base de banha de porco (60 % de energia proveniente de gordura) ou uma dieta controle AIN93G (16 % de energia proveniente de gordura) durante a gestação ou gestação e lactação. A prole feminina com 7 semanas de idade foi induzida à carcinogênese mamária com o carcinógeno 7,12-dimetil-benz[*a*]antraceno. Ratas prenhas expostas à ração ATG apresentaram maiores níveis de leptina circulantes em comparação à ratas prenhas do grupo controle. Comparado à prole do grupo controle, observou-se menor suscetibilidade à carcinogênese mamária na prole do grupo de ratas prenhas submetidas à ração ATG durante a gestação (menor incidência de neoplasias, multiplicidade e peso das neoplasias) ou gestação e lactação (menor multiplicidade). Prole feminina de ratas exposta à ração ATG durante a gestação apresentou menor crescimento da árvore epitelial mamária, proliferação celular (Ki67) e expressão de NFkB p65 e maior expressão de p21 e níveis globais de H3K9me3 na glândula mamária. Além disso, esta apresentou uma tendência na redução da razão *Rank/Rankl* (p=0,09) e níveis de progesterona sérica (p=0,07) comparada à prole feminina do grupo controle. Glândula mamária da prole feminina do grupo exposto à ração ATG durante a gestação e lactação apresentou menor número de TEBs, crescimento da árvore epitelial e razão BCL-2/BAX e maiores níveis de leptina em comparação à prole do grupo controle. Nossos dados confirmam que o risco de câncer de mama da prole pode ser programado pela alimentação materna. No entanto, ao contrário do que se esperava, exposição a altos níveis de gordura animal no início da vida diminuiu a suscetibilidade ao câncer de mama na vida adulta.

Abstract

The present study investigated whether early life exposure to high levels of animal fat increases breast cancer risk in adulthood in rats. Dams consumed a lard-based high-fat (HF) diet (60% fat-derived energy) or an AIN93G control diet (16% fat-derived energy) during gestation or gestation and lactation. Their 7-week-old female offspring were exposed to 7,12-dimethyl-benz[*a*]anthracene to induce mammary tumors. Pregnant dams consuming a HF diet had higher circulating leptin levels than pregnant control dams. However, compared to the control offspring, significantly lower susceptibility to mammary cancer development was observed in the offspring of dams fed a HF diet during pregnancy (lower tumor incidence, multiplicity and weight), or pregnancy and lactation (lower tumor multiplicity only). Mammary epithelial elongation, cell proliferation (Ki67), and expression of NFκB p65 were significantly lower, and p21 expression and global H3K9me3 levels were higher in the mammary glands of rats exposed to a HF lard diet *in utero*. They also tended to have lower *Rank*/*Rankl* ratios (p=0.09) and serum progesterone levels (p=0.07) than control offspring. In the mammary glands of offspring of dams consuming a HF diet during both pregnancy and lactation, the number of terminal end buds, epithelial elongation and the BCL-2/BAX ratio were significantly lower, and serum leptin levels were higher than in the controls. Our data confirm that the breast cancer risk of offspring can be programmed by maternal dietary intake. However, contrary to our expectation, exposure to high levels of lard during early life decreased later susceptibility to breast cancer.

Introdução

O câncer de mama é um importante problema de saúde pública no mundo e o tipo mais comum de câncer entre as mulheres, correspondendo a 25% de todos os cânceres nessa população (FERLAY et al., 2013). Embora a origem do câncer de mama permanece desconhecida, muitos fatores de risco foram identificados, incluindo fatores genéticos, hormonais e ambientais, especialmente a nutrição (TEEGARDEN; ROMIEU; LELIEVRE, 2012; PETO, 2001). Estima-se que 38% dos cânceres de mama podem ser prevenidos por fatores dietéticas (AICR, 2010).

Estudos epidemiológicos iniciais suportam a hipótese de que elevada ingestão de gordura dietética está associada com o risco de câncer de mama (LUBIN; WAX; MODAN, 1986). Meta-análise de diferentes estudos com modelos animais reforçou a idéia de que as gorduras dietéticas promovem o crescimento de tumores mamários (FREEDMAN, 1990). No entanto, outros estudos observaram resultados conflitantes sobre o papel da gordura dietética no câncer de mama, e ainda, diferentes tipos de gorduras parecem ter efeitos opostos sobre esta doença (HULKA, 1989; WILLET, 2001). Por exemplo, o consumo de gordura animal, que consiste principalmente de ácidos graxos saturados (SFA), está associada ao aumento do risco de câncer de mama em alguns estudos (CHO et al., 2003; GONZALEZ; RIBOLI, 2010), mas não em outros (LOF et al., 2007; KEY et al., 2011; PARK et al., 2012). Além disso, redução na ingestão de gordura na dieta não impediu o desenvolvimento do câncer de mama em mulheres com alto risco (MARTIN et al., 2011).

Como descrito para muitas doenças crônicas não transmissíveis, incluindo as doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade (HALES; BARKE, 2001; LANGLEY-EVANS; MCMULLEN, 2010), o câncer de mama também pode ter sua origem no período fetal

(HILAKIVI-CLARKE; De ASSIS, 2006). Em 1990, Trichopoulos (1990) sugeriu que alguns cânceres da mama são programados durante o desenvolvimento fetal pelo ambiente intra-uterino, especificamente pela exposição a níveis elevados de estrógenos. Propõe-se, ainda, que tanto a desnutrição materna como o excesso alimentar materno, durante a gestação, pode reprogramar epigeneticamente a expressão gênica na glândula mamária, resultando em aumento do número de "Terminal End Buds" (TEBS) com consequente aumento da suscetibilidade à transformação maligna (DE DE ASSIS; HILAKIVI-CLARKE, 2006).

Sugere-se que exposição à dieta com alto teor de gordura durante o período intra-uterino possa modular o risco de câncer de mama na vida adulta, possivelmente devido a maior sensibilidade da glândula mamária aos lipídeos durante o desenvolvimento inicial (MACLENNAN, 2010). Exposições maternas à dieta enriquecida com óleo de milho, o qual contém grande quantidade de n-6 ácidos graxos polinsaturados ácidos (PUFA) , ou Crisco , que contém gordura saturada (óleo de algodão) e PUFA (óleo de soja), foram associadas com maiores níveis de estrógeno e de leptina durante a gestação, respectivamente, e, consequentemente maior suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária (HILAKIVI-CLARKE et al., 1997; De ASSIS, et al., 2006). Por outro lado, suplementação com óleo de peixe ou canola, fontes alimentares importantes de n- 3 ácidos graxos, durante a lactação ou gestação e lactação diminuiu a suscetibilidade ao câncer de mama na prole do sexo feminino (OLIVO, HILAKIVI-CLARKE, 2005; ION; AKINSETE; HARDMAN, 2010).

Em 2003, o consumo de óleos de origem vegetal foi 2,3 vezes maior e o consumo de gordura animal foi 4,5 vezes maior em países industrializados comparado aos países em desenvolvimento (KEARNEY, 2010). Estima-se que a relação entre a ingestão de óleo vegetal nos países industrializados e em desenvolvimento continuará a ser o mesmo para os próximos 10

anos. No entanto, a relação entre a ingestão de gordura animal vai cair para 1,6, porque o consumo de gordura animal no Ocidente está diminuindo enquanto o consumo nos países em desenvolvimento está aumentando (KEARNEY, 2010). Não se sabe se o aumento do consumo materno de gordura animal durante a gestação afeta o risco de câncer de mama entre as filhas.

Controle da expressão gênica por meio de mecanismos epigenéticos como a metilação do DNA e modificações em histonas durante períodos precoces da vida podem determinar o destino celular (GLUCKMAN; HANSON; BEEDLE, 2007; WADHWA et al., 2009; VASTENHOUW & SCHIER, 2012). Ingestão materna de gordura e/ou seus efeitos sobre o ambiente hormonal fetal pode afetar o risco de desenvolvimento de câncer de mama da prole através da indução de mudanças epigenéticas nos genes que controlam o crescimento da glândula mamária e determinam a sua suscetibilidade à essa neoplasia.

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos do consumo materno de ração com alto teor de gordura animal (ATG) durante a gestação ou gestação e lactação sobre a suscetibilidade à carcinogênese mamária na prole feminina, e as mudanças associadas na morfologia da glândula mamária, marcadores epigenéticos e expressão gênica. Os resultados sugerem que o maior consumo de gordura por ratas mães durante a gestação reduziu a suscetibilidade à carcinogênese mamária (menor incidência e multiplicidade, e maior latência) na prole feminina, e durante a gestação e lactação reduziu a multiplicidade de tumor mamário na prole feminina. Ambas as exposições reduziram o elongamento epitelial mamário da prole. Redução da suscetibilidade ao câncer de mama na prole exposta à ração ATG somente *in útero* foi associada à redução da proliferação celular (Ki67) e expressão de NFkB p65 e maior expressão de p21 e níveis globais de H3K9me3, em comparação à prole do grupo controle. Prole feminina exposta à ração ATG *in útero* e durante a lactação apresentou menor número de TEBs e da razão BCL-2/BAX. Estes

resultados sugerem que a ingestão materna de altos níveis de gordura durante a gestação ou gestação e lactação pode reduzir a suscetibilidade à carcinogênese mamária na prole feminina, porém os mecanismos envolvidos parecem ser dependentes do período de exposição.

Material e Métodos

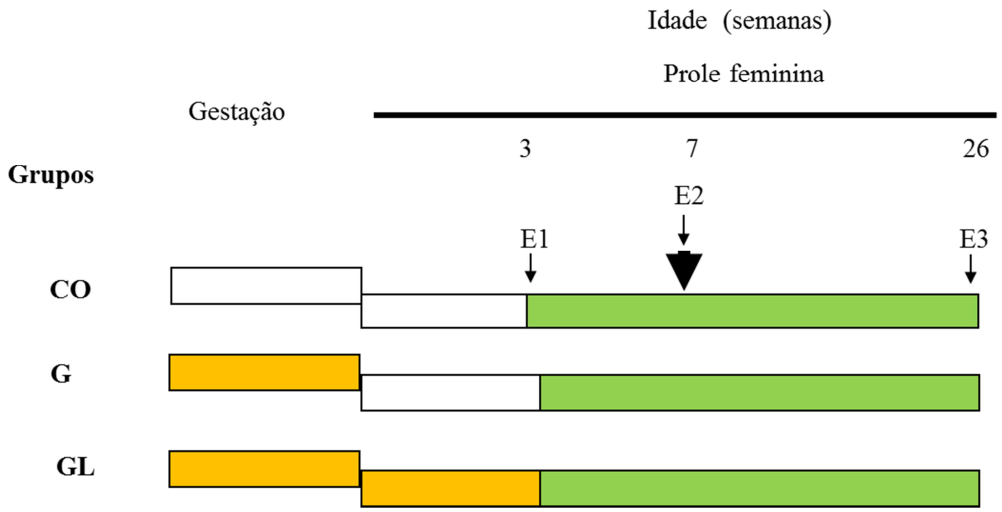
Protocolo experimental

Ratos machos e fêmeas da linhagem Sprague-Dawley foram obtidos a partir da colônia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Brasil e foram mantidos em atmosfera de 55 ± 10% de umidade relativa, a 22 ± 2 ° C, com ciclo 12h claro/escuro (luzes acesas às 07:00 horas), recebendo água e ração comercial (Nuvital , Brasil) *ad libitum*. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Número do protocolo 283/2010). Os animais foram acasalados na proporção de 1 macho para cada 2 fêmeas por gaiola e o dia gestational 0 foi determinado pela presença de esperma nos esfregaços vaginais.

Antes do acasalamento, as fêmeas foram divididas em 3 grupos (n = 20 por grupo): CO (ratas expostas à ração-controle [AIN- 93G] durante a gestação e lactação; controles), G (ratas expostas à ração com alto teor de gordura [ATG] durante a gestação) e GL (ratas expostas à ração ATG durante a gestação e lactação) (Figura 1). A ração ATG é baseada na AIN- 93G (REEVES et al., 1993) com adição de banha, o que representa uma dieta ocidental rica em gordura animal (SULLIVAN et al., 2010) (Tabela 1 e 2). Nas rações CO e ATG, 10% e 60% das calorias totais foram provinientes de lípidos, respectivamente. Em um estudo piloto, observou-se que os ratos do grupo de ração com alto teor de gordura consumia aproximadamente 30 % menos

(g) comparado a ratos submetidos à ração controle. Dessa forma, apesar da maior densidade energética da ração ATG (5,2 kcal/g) em comparação com a ração controle (3,9 kcal/g), o consumo diário de energia não diferiu entre os grupos. Para assegurar a ingestão comparável de micro e macronutrientes entre os grupos, os ingredientes (exceto para o amido e banha) foram normalizados de acordo com a densidade energética de cada dieta, como mostrado na Tabela 1. Além disso, porque a ração ATG é altamente suscetível à oxidação, o teor de tertibutilhidroquinona foi aumentado (PANG;CHOI;PARK, 2008). Para adaptação à dieta experimental, ratas fêmeas foram alimentadas com as rações CO ou ATG por cinco dias antes do acasalamento. Durante a lactação, a ração das ratas mães do grupo G foi alterada para AIN93-G , enquanto as rações dos grupos CO e GL permaneceram AIN93-G e ATG, respectivamente.

Ainda, para evitar o efeito do tamanho da ninhada, cada rata mãe foi mantida somente com 6 filhotes do sexo feminino que foram desmamados no dia pós-natal 21. Após o desmame a prole feminina de todos os grupos consumiram ração de laboratório comercial comum para roedores (Nuvital , Brasil) (Figura 1). Ratas mães que apresentaram canibalismo ou não ficaram prenhas foram excluídas do estudo. O peso corporal foi registrado três vezes por semana e o consumo alimentar foi registrado diariamente e uma vez por semana para as mães durante a gestação e lactação e para a prole feminina, respectivamente.



Ratas mães que receberam, ao longo da gestação e/ou lactação, ração controle com 10% de calorias provenientes de lipídeos;

Ratas mães que receberam, ao longo da gestação e lactação, ração com alto teor de gordura animal (ATG) com 60% de calorias provenientes de lipídeos;

Prole feminina das ratas dos grupos CO, G e GL que receberam ração comercial comum para roedores (Nuvital; Paraná, Brasil);

1,2 – dimetilbenz[*a*]antraceno (DMBA): 50 mg/kg de peso corpóreo;

E1 Eutanásia de ratas, com 3 semanas de idade, não iniciadas com DMBA;

E2 Eutanásia de ratas, com 3 semanas de idade, não iniciadas com DMBA;

E3 Eutanásia de ratas, com 26 semanas de idade, iniciadas com DMBA.

Figura 1: Desenho experimental

Tabela 1: Composição das rações controle (CO) e com alto teor de gordura animal (ATG)

Ingredientes	**CO**		**ATG**	
	g/Kg	**g/1000Kcal**	**g/Kg**	**g/1000Kcal**
Amido de milho	529,486	133.51	121.667	23.22
Caseína	200	50.43	264	50.43
Sacarose	100	25.22	132	25.22
Óleo de soja	70	17.65	92	17.65
Banha	0	0.00	257	49.02
Fibra	50	12.61	66	12.61
Mix de mineral (AIN-93G-MX)	35	8.83	46	8.83
Mix de vitamina (AIN-93-VX)	10	2.52	13	2.52
L-cistina	3	0.76	4	0.76
Bitartarato de colina	2,5	0.63	3.3	0.63
Tert-Butilhidroquinona (BHT)	0,014	0.002	0.037	0.007
Total	1000	252.15	1000	190.88

Tabela 2: Distribuição de macronutrientes das rações controle (CO) e com alto teor de gordura animal (ATG)

Macronutrientes	**CO**		**ATG**	
	% por peso	**% de calorias**	**% por peso**	**% de calorias**
Carboidrato	64,7	65	27,7	21
Proteína	18,7	19	24,7	19
Lipídeo	7,0	16	34,9	60
Kcal/g	3,9		5,2	

Determinação do perfil lipídico das rações

O perfil lipídico das rações CO e ATG foi determinado de acordo com a AOAC (2002). Os ácidos graxos foram esterificados em ésteres metílicos de acordo com a Hartman & Lago (1973), e a sua composição foi analisada por cromatografia gasosa (GC 17 A Shimadzu / Classe GC 10, Japão) equipado com detector de ionização de chama (FID) e Supelcowax ® 10 coluna capilar de sílica fundida (30 mm x 0,25 milímetros ID). A temperatura foi fixada em 170 º C, aumentada para 225 º C a uma velocidade de 1ºC/min e mantida durante 25 min. As temperaturas do vaporizador e do detector foram de 250ºC e 270ºC, respectivamente. Hélio foi utilizado como gás de transporte (1 mL/min). A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção com a mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos. Cada determinação foi realizada em triplicata, utilizando três amostras diferentes para cada ração.

Análise de níveis hormonais em ratas prenhas e em sua prole feminina

O sangue de ratas prenhas e filhotes fêmeas foi coletado por punção da cauda no 17° dia gestacional e nas 3ª e 7ª semanas pós-parto por punção cardíaca durante a eutanásia, respectivamente. O soro foi obtido e mantido a -80ºC até à sua utilização. Os níveis de estradiol e progesterona foram determinados utilizando kits de radioimunoensaio para ratos da Siemens Medical Solutions Diagnostics (Munique, Alemanha), enquanto os níveis de leptina foram determinados utilizando Kit RADPK-81K da Millipore (Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Indução da carcinogênese mamária

A indução de neoplasias mamárias na prole feminina das ratas dos grupos CO, G e GL (n = 24/grupo) foi realizada utilizando-se o modelo clássico que emprega o carcinógeno DMBA. Esse é bem caracterizado e amplamente utilizado, inclusive, em estudos com nutrientes. A carcinogênese foi induzida quando as ratas completaram 7 semanas de idade. Os animais receberam, por intubação gástrica, dose única (50 mg/kg de peso corpóreo) de DMBA (Sigma, EUA) (De ASSIS; KHAN; HILAKIVI-CLARKE, 2006). A DMBA foi dissolvida em óleo de milho em volume final de 0,5 mL. Foram avaliadas a latência de aparecimento de tumores, o número de animais com tumores (incidência do tumor) e o número de tumores por animal (multiplicidade de tumores). Os animais que desenvolveram ou não tumor foram eutanasiados com 26 semanas de idade. Quando se apresentaram moribundos ou quando as neoplasias mamárias alcançaram 10% do peso corporal (HILAKIVI-CLARKE, 1997; DE ASSIS; KHAN;HILAKIVI-CLARKE, 2006), os animais foram eutanasiados antes da data prevista. A eutanásia dos animais ocorreu em câmera de CO_2. Após a eutanásia, as glândulas e neoplasias mamárias foram retiradas, lavadas em solução salina a 0,9%, à temperatura de aproximadamente 4°C. Um fragmento do material foi fixado em formalina tamponada neutra a 10% e o restante congelado em nitrogênio líquido e armazenado em “freezer” a –80°C para análises futuras. Análise histopatológica do tumor foi realizada de acordo com RUSSO & RUSSO (2000).

Análise da morfologia da glândula mamária da prole feminina

A morfologia da glândula mamária indica o nível de suscetibilidade para o desenvolvimento de câncer. Em particular, o número de TEBs e o maior elongamento da árvore epitelial mamária são associados com o aumento do risco de desenvolvimento de tumores mamários (HILAKIVI-CLARKE, 2007; NIELSEN *et al*., 2010). Preparações de montagem total foram obtidos a partir de glândulas mamárias abdominais da prole feminina com 3 e 7 semanas de idade como descrito por De ASSIS (2010). TEBs foram contados a partir de preparações da montagem total de acordo com RUSSO e RUSSO (1987) (n = 12/grupo). O crescimento da árvore epitelial mamária foi medido a partir do mamilo até o final da árvore epitelial mamária para ratas com 3semanas de idade e a partir do linfonodo até o final da árvore epitelial mamária para ratas com 7 semanas de idade.

Análise da proliferação celular nas glândulas mamárias da prole feminina

A proliferação celular foi avaliada em tecidos mamários obtidos da prole feminina com 7 semanas de idade (n = 5 por grupo) por imunoistoquímica para Ki67. Tecidos mamários foram fixados em formol tamponado 10% , incluídos em parafina e seccionados. Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados gradualmente com álcoois (100%, 95%, 70%, 50%), seguidos de recuperação antigênica em tampão de citrato pH 6,0 (0,5 % de Tween) em panela de pressão durante 20 minutos. Os tecidos foram incubadas com H_2O_2 a 3% por 10 min. Possíveis ligações inespecíficas foram bloqueadas por 30 minutos com bloqueador de proteína (DAKO , EUA). O tecido foi incubado por uma noite com o anticorpo monoclonal primário anti-rato para

Ki67 (Dako , EUA) a uma diluição de 1:50 . Após várias lavagens, o tecido foi tratado com anticorpo secundário biotinilado anti - IgG anti-mouse (Vector Laboratories, EUA) por 30 min à temperatura ambiente, seguido por tratamento com reagentes Vectastain ABC (Vector Laboratories , EUA) durante 30 minutos à temperatura ambiente. O tecido foi lavado e corado com 3,3 ' - diaminobenzidina (DAKO , EUA) por 4 minutos e, em seguida, lavado e contrastado com hematoxilina (Vector Laboratories , EUA). Índice de proliferação foi determinado pelo cálculo da porcentagem de células com coloração positiva para Ki67 em 1.000 células por estrutura (lóbulo ou ducto). A marcação foi analisada com auxílio do programa Image J (NIH , EUA).

Análise da expressão gênica em glândulas mamárias da prole feminina

O RNA da glândula mamária foi extraído com RNeasy Lipid Mini Kit (QIAGEN , EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, e a sua qualidade foi confirmada usando Agilent 2100 Bioanalyzer e RNA 6000 LabChips, a partir dos quais os números de integridade do RNA (RIN) foram calculados. RNA foi incubado com DNAse por 20 minutos, e a reação foi finalizada com EDTA 0,02 M , a 75°C por 10 min. RNA tratado (1 µg) foi utilizada para a síntese de cDNA usando kit de transcrição reversa (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de expressão de genes alvo foram medidos através de PCR em tempo real (7900HT Fast Real-Time PCR System; Applied Biosystems). cDNA (2 mL) a uma concentração final de 5 ng/mL foi misturado com 5 mL EvaGreen qPCR Mastermix (Applied Biosystem Materiais , EUA) e 0,5 mL de 5 mmol primers sense e antisense em placas de 384 poços. As reações de PCR foram iniciadas com 95°C

por 15 min seguidas da etapa de amplificação com 40 ciclos de 95°C por 15 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg. Cada amostra foi analisada em triplicata. Os níveis de expressão gênica foram determinados utilizando o método de quantificação relativa por curva padrão, e a eficiência da reação foi considerada adequada quando estava entre 90-110 % e o valor de R quadrado foi superior a 0,98. Antes da análise dos genes alvos, relizou-se ensaio com genes endógenos como *18S rRNA*, *GAPDH*, *Tpb* , *β-actina* , *Hrpt1* e *Rpl13a* para identificar o melhor controle endógeno para o experimento em questão, utilizando o software geNorm. Com base neste ensaio, os níveis de expressão de genes alvo foram normalizados para o gene *GAPDH*. "Primers" foram desenhados utilizando a ferramenta de desenho de primers IDT, exceto para 18S *rRNA* que foram baseados em WANG (2008). As sequências dos "primers" estão listadas na tabela 3.

Tabela 3: Sequência de Primers

Gene	**Sequência**	
	Sense	**Anti-sense**
Rank	5'-ATATGCCTGCATCCCCTGAA-3'	5'-TAGCCATCCGTTGAGTTGGA-3'
Rankl	5'-CTGGTGAGGAAATTAGCGTCCAG-3'	5'-AAGCCCCAAAGTACGTCGC-3'
Gapdh	5'-TCTCTGCTCCTCCCTGTTCT-3'	5'-TACGGCCAAATCCGTTCACA-3'
Tbp	5'-CTTGACCTAAAGACCATTGCAC-3'	5'-CACACCATTTTCCCAGAACTG-3'
β-actin	5'-GCCAACCGTGAAAAGATGAC-3'	5'-CAGAGGCATACAGGGACAAC-3'
Hprt1	5'-GCCCTTGACTATAATGAGCACT-3'	5'-CCGCTGTCTTTTAGGCTTTG-3'
Rpl13a	5'-GGGCAGGTTCTAGTATTGGATG-3'	5'-CCTCACAGCGTACAACCAC-3'

Análise dos níveis de proteína nas glândulas mamárias da prole feminina

Os níveis das proteínas BAX, BCL-2 (apoptose), p21Cip1, p27Kip1 (proliferação celular) receptor de estrogênio α (ERα), receptor de estrógeno β (ERβ), receptor de progesterona (PR), Receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER -2) e fator nuclear Kappa B (unidade NFkB p65) foram avaliados por western blot em tecidos mamários obtidos da prole feminina com 7 semanas de idade (n=5 por grupo). A proteína total foi extraída a partir de tecidos mamários utilizando tampão RIPA com inibidor de protease (Roche, Suíça), glicerofosfato (10 mM), ortovanadato de sódio (1 mM), pirofosfato (5 mM) e PMSF (1 mM). As amostras foram vortexadas com o tampão durante 5 minutos, incubadas em gelo durante 30 minutos e centrifugada por 10 minutos a alta velocidade. A proteína presente no sobrenadante foi quantificada com o BCA Protein Assay Reagent (Pierce , EUA). Os extratos de proteína foram separadas em gel desnaturante de poliacrilamida 4-12 % (SDS -PAGE). As proteínas foram transferidas usando o Sistema iBlot ® 7 minutos (Invitrogen , EUA), e bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado por 1 h à temperatura ambiente. As membranas foram incubadas com anticorpos primários contra BAX , p27, NFkB p65 (Santa Cruz Biotechnology , EUA); BCL - 2 (Beckman Coulter , EUA); ERα, ERβ, HER-2 (Cell Signaling Technology, EUA); p21 (Oncogene Research Products , EUA) e PR (anticorpos Abcam, Reino Unido) em diluições de 1:2.000 a 4 ° C por uma noite. Após diversas lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP) (1:5.000, Santa Cruz Biotechnology, EUA), à temperatura ambiente por 1 h. As membranas foram reveladas utilizando reagente de detecção de quimioluminescência de anticorpo HRP (Denville Scientific Inc., USA) e expostas à filme Kodak de auto-radiografia. A densidade óptica das bandas foi quantificada utilizando o software

Quantity One (Bio-Rad , EUA). Para controle da quantidade de carregamento, as proteínas de interesse forma normalizadas para a β-actina.

Análise dos níveis globais de acetilação e trimetilação de histonas nas glândulas mamárias da prole feminina

Níveis globais de acetilação das histonas H3 lisina 9 (H3K9) e H4 lisina 16 (H4K16) e os níveis globais de trimetilação de H3K9, H3 lisina 27 (H3K27) e H3 lisina 4 (H3K4) foram avaliados por western blot em tecidos mamários obtidos a partir da prole feminina com 7 semanas de idade (n=6 por grupo). Para extração de histonas, cerca de 150 mg de glândula mamária foram homogeneizadas com 600 µL de tampão de lise gelado [HEPES (10mM; pH = 7,9; USB, EUA); Triton X – 100 (1%, USB, EUA); $MgCl_2$ (1,5 mM; Sigma Aldrich, EUA); KCl (10 mM; Merck, Alemanha); Butirato de sódio (5 mM; Sigma Aldrich, EUA); DTT (0,5 mM; Invitrogen, EUA); PMSF (1,5 mM; Sigma Aldrich, EUA) Inibidor de Protease (1µg/mL; Sigma Aldrich, EUA); Inibidor de Fosfatase, (1µg/mL; Sigma Aldrich, EUA)] por 20-30 minutos e centrifugado por 5 minutos a 5000g e 4ºC. Após centrifugação o precipitado foi coletado, lavado com 500 µL de tampão de lise gelado e incubado com HCl 0,2 N por uma noite a 4°C. Após este período as amostras foram centrifugadas por 5 min a 15000g a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o pH ajustado para 7 (25 µL de NaOH 2M para cada 200 µL de solução). As histonas foram quantificadas pelo método de Bradford de acordo com o protocolo do fabricante (Thermo Scientific, EUA) e armazenadas a -80ºC.

Os extratos de proteína foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 15% e tampão Tris-glicina 1X, utilizando-se uma cuba de eletroforese vertical (Mini PROTEAN®System, Bio Rad, EUA). Posteriormente, as proteínas

foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose Hybond-ECLTM (Amersham Biosciences, EUA), com poro de diâmetro de 0,20µm, no decorrer de 35 min. O bloqueio da membrana foi realizado com reagente próprio presente no sistema de quimioluminescência ECL (Enhanced Chemiluminescence, GE Heathcare, Reino Unido) por 1 h em temperatura ambiente, sob agitação. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com os anticorpos primários anti-acetil H3K9 e H4K16 (Upstate, EUA) (1:5000) diluído em reagente ECL, por uma noite a 4°C. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase HRP anti-imunoglobulina de coelho (GE Healthacare, Reino Unido) na diluição 1:10000 em reagente ECL por 1 h. A membrana foi então incubada com anticorpo primário anti-H1(Upstate, EUA) na diluição de 1:5000 em reagente ECL por 1 h à 37°C e sob agitação, o qual serve para controle da técnica, e em seguida incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase HRP anti-imunoglobulina de rato (GE Healthacare, Reino Unido) na diluição 1:10000 em ECL por 1 h, em 37°C e sob agitação. A imunodetecção foi feita utilizando-se o sistema de quimioluminescência ECL. O sinal foi captado utilizando o sistema de aquisição de imagens ImageQuant 400 (GE Healthcare, Reino Unido). Para marcação dos anticorpos primários anti-trimetil H3K9, H3K27 e H3K4 realizou o procedimento de “stripping”. Para tanto a membrana foi incubada com solução de SDS 2% contendo 100mM de β-mercaptoetanol a 60°C por 30 min e o western blot seguido a partir do bloqueio.

Análise do padrão de metilação global do DNA em glândulas mamárias da prole feminina

Metilação global do DNA foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com leitor de “Diode Array” (DAD) nos tecidos mamários da prole feminina com 7

semanas de idade (n = 6 por grupo). Para a extração do DNA, cerca de 100 mg de tecido mamário foi homogeneizado com tampão de lise (Gentra Puregene Kit, QIAGEN, EUA) contendo 0,5 mM de deferoxamina (Sigma Aldrich, EUA) . As amostras homogeneizadas foram incubadas com proteinase K (20 mg/mL, Sigma Aldrich , EUA) durante a noite à temperatura ambiente. As amostras foram tratadas com RNase A (15 mg/mL, Sigma Aldrich , EUA) por 2h , e a proteína foi precipitada com solução de precipitação de proteínas (Gentra Puregene Kit , QIAGEN, EUA). O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 min a 4°C, e o DNA precipitado com isopropanol gelado. Após centrifugação, tampão Tris (Tris 10 mM com um deferoxamina mM , pH = 7,0) e clorofórmio (96 %): álcool isoamílico (4 %) foram adicionados ao precipitado. Após centrifugação, 5 M de NaCl e 70% de etanol foram adicionados ao sobrenadante, o qual foi incubado por uma noite. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 3000 rpm, e o DNA foi ressuspenso em água com 0,1 mM de deferoxamina. As amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop1000, ThermoScientific). DNA (5 mg) foi hidrolisada com tampão Tris incluindo HCl/$MgCl_2$ 200 mM (pH 7,4) e DNAse 1 (Sigma Aldrich , EUA) durante 1 h a 37°C. O DNA foi incubado com a fosfodiesterase (Sigma Aldrich , EUA) e fosfatase alcalina por 1 h a 37°C. As aliquotas de DNA hidrolisado foram injetadas no sistema analítico HPLC -DAD (Shimadzu Corporation , Japão), utilizando uma coluna Luna C18 (2), 250 mm x 4,6 mm DI , 5 microns (Phenomenex , Torrance , CA), com pré - coluna C18 de 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex , Torrance , CA), eluídos com um gradiente de ácido fórmico (0,1 % em água) e CH_3OH (0 - 25 min , 0-18 % de CH_3OH ; 25 - 27 min 18-0 % CH_3OH , 27-37 min , 0 % de CH_3OH), com uma taxa de fluxo de 1 mL/min , a 30 °C. O detector DAD foi fixado em 260 nm para quantificação de dC e em 286 nm para a quantificação do 5-metil-dC. As curvas de

calibração foram realizadas em intervalos de 0,05-6 nmol por dC e 0,005-0,4 nmol de 5 - metil - dC.

Análise estatística

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (SEM), e todas as análises foram conduzidas no programa ESTATÍSTICA 8.0 (Statsoft, EUA). Comparações múltiplas entre grupos foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) seguida de teste post hoc de Duncan, e as comparações entre dois grupos foram realizadas pelo teste *t* de Student. ANOVA de análises repetidas foi aplicada para a avaliação da ingestão calórica e Curva de Kaplan-Meier e teste Log-Rank foram aplicados para determinar diferenças em relação à incidência de tumores. Análise de proporções foi realizada com o teste de Fisher. Para todas as análises de dados, $p \leq 0,05$ foi aplicado como limite de significância estatística.

Resultados

Efeitos da ração ATG em variáveis gestacionais

A ingestão calórica não diferiu ($p > 0,05$) entre as ratas mães dos grupos CO, G e GL (Figura 2). Devido ao controle homeostático da ingestão alimentar e gasto energético, é bem descrito que ratas grávidas que consomem ração com alto teor de energia reduzem o consumo alimentar, a fim de ajustar sua ingestão de calorias (ARMITAGE; TAYLOR; POSTON, 2005). Isso sugere que os efeitos relatados da exposição à ração ATG durante a gestação ou gestação e lactação parece estar relacionado ao aumento do consumo de gordura e não da ingestão calórica.

O ganho de peso durante a gestação, número de filhotes /mãe, relação fêmeas/machos e o peso da prole ao nascer não foram diferentes (p>0,05) entre os grupos (Tabela 4). A exposição materna à ração ATG marginalmente aumentou os níveis de leptina das mães (p = 0,07) no 17° dia gestacional, mas não afetou os níveis de estradiol (p> 0,05) (Tabela 4).

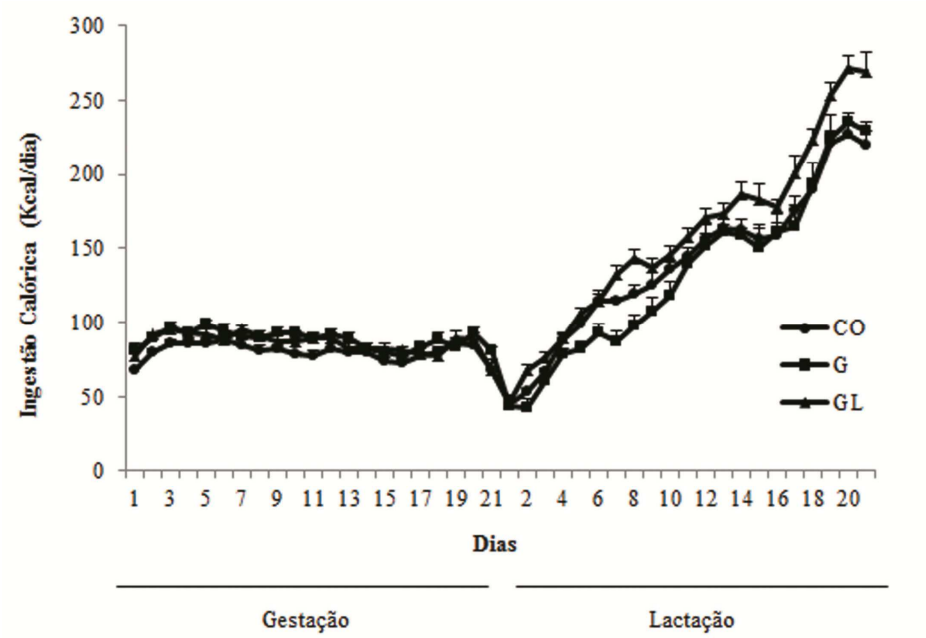


Figura 2: Ingestão calórica diária dos CO, G e GL durante a gestação e lactação. Não houve diferenças estatisticamente significantes (p≥ 0,05) entre os grupos de acordo com ANOVA de análises repetidas. Os dados estão expressos como média ± SEM (n = 11-13).

Tabela 4: Efeitos da ração ATG em variáveis gestacionais

Variáveis	Grupo		
	CO	G	GL
Ganho de peso durante a gestação (g)	152.2 ± 9.3	157.6 ± 5.4	146.8 ± 7.1
Níveis gestacionais dos hormônios:			
Estradiol (pg/mL)	36.4 ± 4.3	34.4 ± 2.5	40.4 ± 2.2
Leptina (ng/mL)	6.8 ± 1.3	13.8 ± 2.1[#]	13.5 ±3.1[#]
Número de filhotes por mãe	12.5 ± 1.0	12.8 ± 0.5	12.3 ± 0.94
Razão fêmeas/machos	1.32 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.5 ± 0.4
Peso ao nascer:			
Machos	7.2 ± 0.1	7.1 ± 0.2	6.9 ± 0.1
Fêmeas	7.1 ± 0.2	6.8 ± 0.1	6.8 ± 0.2

Os dados apresentados foram obtidos a partir de 11, 13 e 12 ratas mães dos grupos CO, G e GL, respectivamente. Para níveis hormonais n = 6 por grupo. Os dados estão expressos em média ± S.E.M. [#]Diferença marginal (p = 0,07) em relação ao grupo CO de acordo com ANOVA seguida do teste de Duncan.

Composição de ácidos graxos das rações CO e ATG

A composição de ácidos graxos foi determinada na fração lipídica das rações. A ração controle contêm 17 % , 27 % e 55 % (% de gordura total) de SFA, monoinsaturados (MUFA) e PUFA, respectivamente, enquanto que a ração ATG contêm 37% , 38% e 24% destes ácidos graxos, respectivamente (Tabela 5). Ingestão de gordura total diária durante a gestação por ratas mães do grupo CO foi de 1,42g e por ratas mães dos grupos G e GL 2,70g e 2,63g, respectivamente (Tabela 6). Durante a lactação, o consumo de gordura total foi de 2,49 g no grupo CO, 2,36 g no grupo G e 4,84 g no grupo GL (Tabela 5). Ratas mães expostas à ração ATG durante a gestação consumiram maior quantidade de SFA (4,2 vezes) e MUFA (2,7 vezes) ($p \leq 0,05$) e menor quantidade de PUFA (1,2 - vezes) ($p > 0,05$) em comparação com o grupo CO (Tabela 6). De forma similar, mães expostas à ração ATG durante a lactação consumiram neste período maior quantidade de SFA (4,3 vezes) e MUFA (2,8 vezes) ($p \leq 0,05$) e menor quantidade de PUFA (1,2 - vezes) ($p > 0,05$) em comparação com o grupo CO (Tabela 6).

Tabela 5: Perfil de ácidos graxos da fração lipídica das rações CO e ATG

Fórmula	**Nome**	**% da fração lipídica**	
		CO*	**ATG***
14:0	Mirístico	0,31±0,01	1,15±0.05
16:0	Palmítico	12,17 ± 0,13	21,98 ± 0,45
16:1	Palmitoléico	0,13 ± 0,01	1,10 ± 0,04
17:0	Margárico	-	0,34 ± 0,01
18:0	Esteárico	3,58 ± 0,06	13,67 ± 0,12
18:1(n-9)	Oléico	24,06 ± 0,02	33,01 ± 0,35
18:1(n-7)	Vacênio	2,7 ± 0,09	3,77 ± 0,59
18:2 (n-6)	Linoleico	51,32 ± 0,20	22,3 ± 0,39
18:3 (n-3)	α-Linolênico	4,1 ± 0,02	1,46 ± 0,04
20:0	Eicosanóico	0,24 ± 0,03	0,15 ± 0,03
20:1 (n-9)	Eicosenóico	0,13 ± 0,04	0,37 ± 0,05
20:2	Eiocosadienóico	-	0,21 ± 0,04
22:0	Docosanóico	0,31 ± 0,04	-
n.i	Não Identificado	0,96 ± 0,14	0,49 ± 0,03
	Saturados	**16,61 ± 0,09**	**37,28 ± 0,56**
Totais	**Monoinsaturados**	**27,02 ± 0,10**	**38,26 ± 0,14**
	Polinsaturados	**55,42 ± 0,22**	**23,98 ± 0,39**

* As amostras foram analisadas em triplicata

Tabela 6: Ingestão diária de ácidos graxos (g/animal) por ratas mães durante a gestação e lactação

Ácidos graxos	Gestação			Lactação		
	CO	G	GL	CO	G	GL
SFA	0.24 ±0.01	1.01± 0.01[a]	0.99 ±0.02[a]	0.42±0.01	0.40±0.01	1.81±0.05[a]
MUFA	0.39 ±0.01	1.04± 0.01[a]	1.01± 0.02[a]	0.67±0.01	0.64±0.02	1.86±0.05[a]
PUFA	0.79 ±0.02	0.65±0.01[a]	0.63±0.01[a]	1.40 ±0.03	1.32±0.04	1.17±0.03[a]

Os dados apresentados foram obtidos a partir de 11, 13 e 12 ratas mães dos grupos CO, G e GL, respectivamente. Os dados estão expressos em média ± S.E.M. [a]Diferença estatisticamente significante em relação ao grupo CO de acordo com o teste de Kruskal Wallis.

Efeitos da exposição materna à ração ATG sobre os níveis hormonais da prole feminina

Os níveis de estradiol sérico não diferiu entre os grupos (p> 0,05, dados não mostrados). Em comparação com a prole dos grupos CO e G, prole feminina com 3 e 7 semanas de idade do grupo GL apresentou maiores níveis séricos de leptina (Figura 3a). Em comparação com a prole feminina do grupo CO, prole feminina com 7 semanas de idade do grupo G apresentou diminuição marginal (p=0,07) dos níveis séricos de progesterona (Figura 3b).

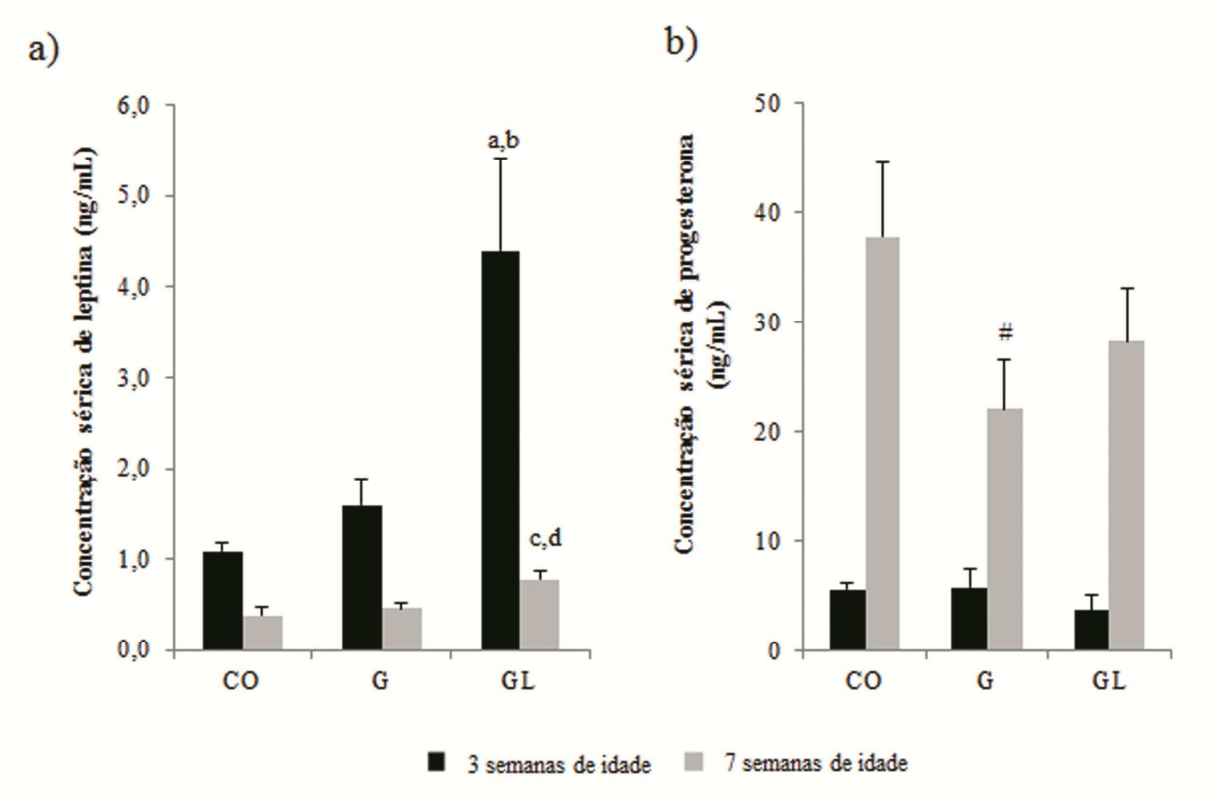


Figura 3: a) Níveis séricos de leptina da prole feminina com 3 e 7 semanas de idade do grupos CO, G e GL. Diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$) em comparação com [a]CO e [b]G (3 semanas de idade) e [c]CO e [d]G (7 semanas de idade), de acordo com ANOVA seguida do teste de Duncan. b) Níveis séricos de progesterona da prole feminina com 3 e 7 semanas de idade do grupos CO, G e GL. [#]Diferença marginal (p=0,07) em comparação com o grupo CO (7 semanas de idade) de acordo com ANOVA seguida do teste de Duncan. Os dados são expressos como a média ± SEM (n = 6 por grupo).

Efeitos da exposição materna à ração ATG sobre a carcinogênese mamária na prole feminina

Prole feminina de ratas mães expostas à ração ATG somente durante a gestação (G) apresentou menor ($p \leq 0,05$) incidência de tumores mamários e multiplicidade (Figura 4, Tabela 7) em comparação com o grupo CO, e maior ($p \leq 0,05$) latência do primeiro tumor comparado à prole exposta à ração ATG durante a gestação e lactação (grupo GL). Além disso, prole feminina do grupo G apresentou menor ($p \leq 0,05$) peso de tumores em comparação ao grupo CO. Comparado com o grupo CO, prole feminina do grupo GL apresentou menor ($p \leq 0,05$) multiplicidade de tumor mamário (Tabela 7). Em todos os grupos, tumores mamários foram predominantemente malignos e classificados como adenocarcinomas tubulares ou papilares. Comparado com o grupo G, prole feminina do grupo GL apresentou maior proporção ($p \leq 0,05$) de adenocarcinomas mamários de grau 2.

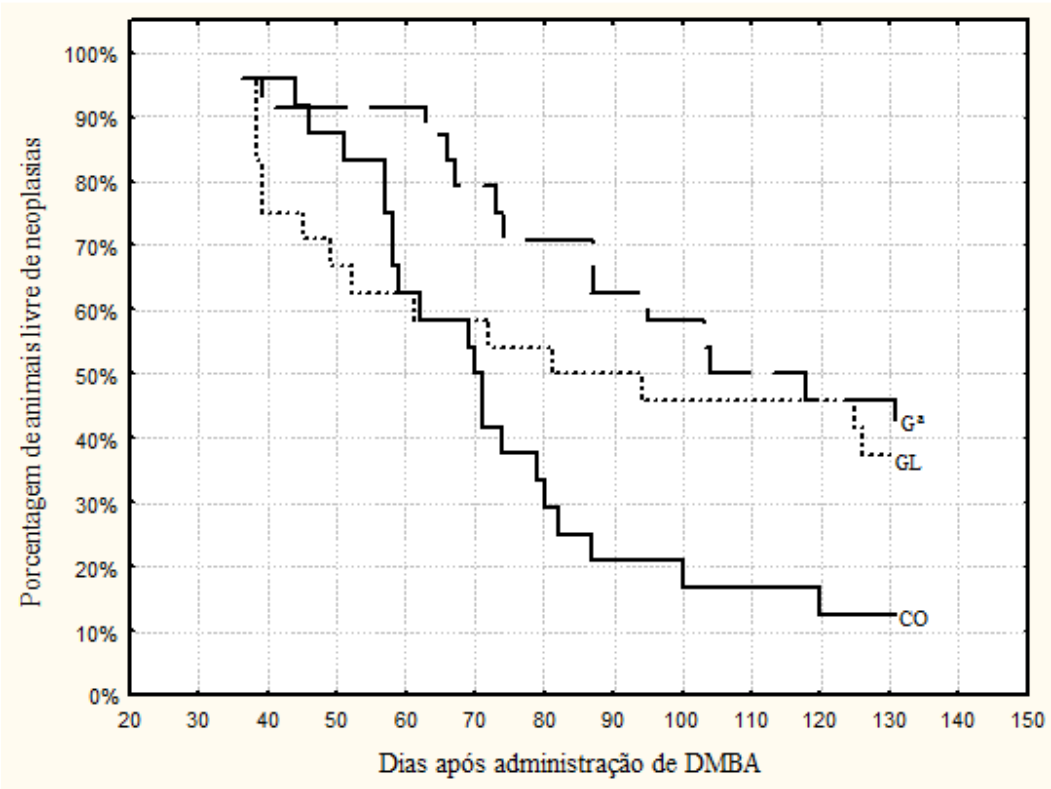


Figura 4: Incidência de tumores mamários na prole feminina dos grupo CO, G e GL (n=24 por grupo). [a]Diferença estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo CO de acordo com a análise de Kaplan-Meier e teste log rank.

Tabela 7: Efeitos da exposição materna à ração ATG sobre a carcinogênese mamária na prole feminina

	Grupo		
Parâmetros	CO	G	GL
Número de ratos	24	24	24
Tempo de aparecimento do primeiro tumor (dias)	68±3.9	82±5.6[b]	62±6.3
Multiplicidade[1] (No./rat)	2.3±0.3	1.2±0.3[a]	1.4±0.3[a]
Peso dos tumores:			
≤0.50g	43.6%	65.6%	46.9%
0.51-2.0g	38.2%	21.9%[c]	25.0%
≥2.1g	18.2%	12.5%	28.1%
Número total de tumores	56	29	35
Benignos	3.4%	12.5%	12.9%
Malignos	96.6%	87.5%	87.1%
Tipos histológicos[2]			
Tubular,	50.9%	39.2%	59.3%
Papilar	35.1%	53.6%	29.6%
Cribiforme	7.0%	0%	7.4%
Misturado	7.0%	7.2%	3.7%
Estadiamento[2]			
1	73.7%	78.6%	48.2%
2	21.0%	10.7%	37.0%[d]
3	5.3%	10.7%	14.8%

[1]Multiplicidade: número de tumores/ número total de ratos por grupo. Diferença significativa ($P \leq 0,05$) em relação ao grupo [a]CO e [b]GL de acordo com ANOVA seguida do teste de Duncan e comparados com [c]CO e grupo [d]G acordo com o teste exato de Fisher.
[2]de tumores malignos

Efeitos da exposição materna à ração ATG sobre a morfologia da glândula mamária da prole feminina

A prole feminina com 3 semanas de idade dos grupos G e GL apresentou menor número de TEBs comparada a prole do grupo CO, embora a significância estatística ($p \leq 0,05$) só foi alcançada no grupo GL (Figura 5c). Em comparação com o grupo CO, o elongamento da árvore mamária epitelial foi menor na prole com 3 semanas de idade do grupo G ($p \leq 0,05$) e GL ($p = 0,06$) (Figura 5d). Não houve diferença ($p > 0,05$) em nenhum dos parâmetros morfológicos mamários analisados entre a prole dos grupos CO, G e GL com 7 semanas de idade (dados não mostrados).

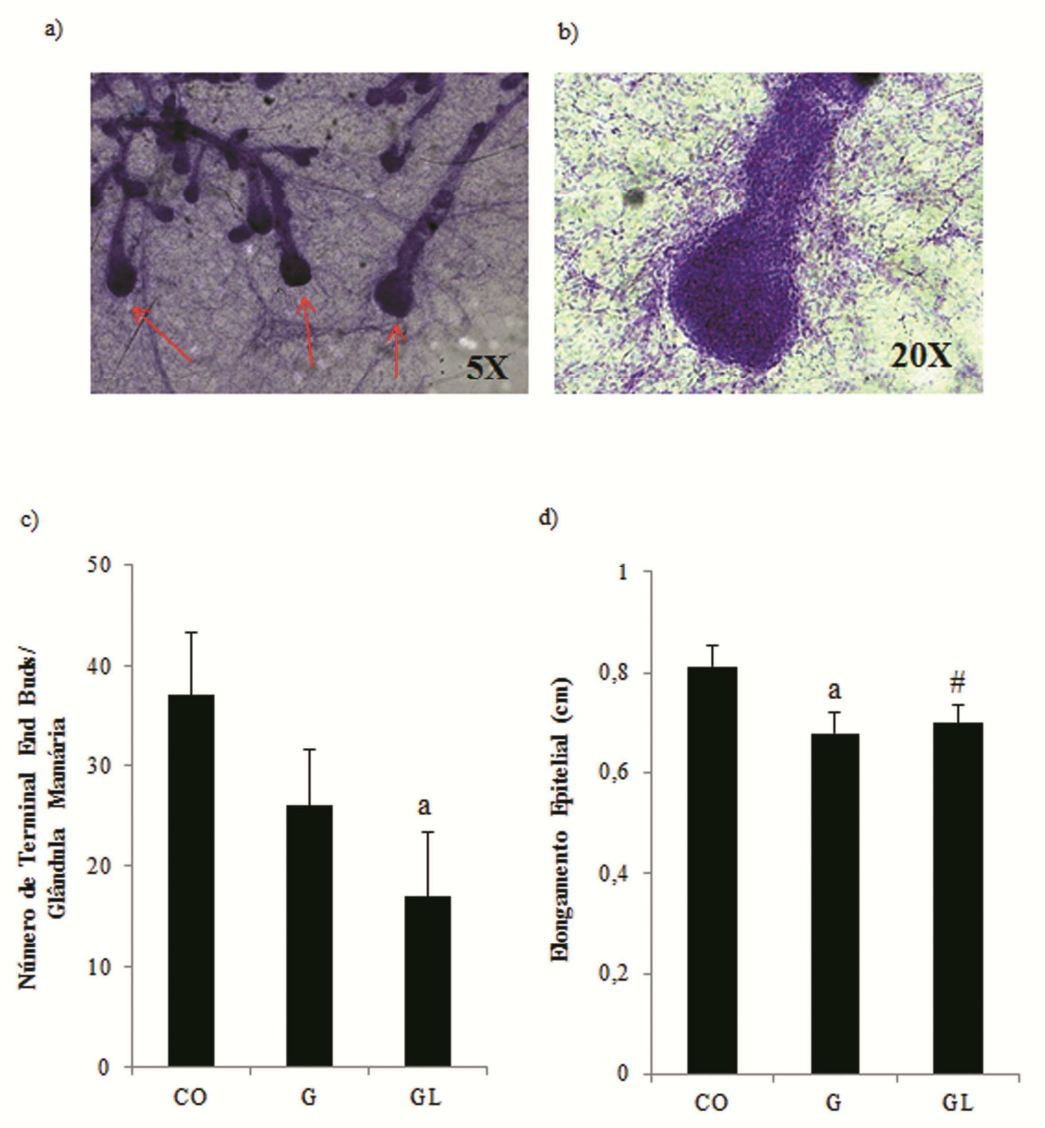


Figura 5: Morfologia da glândula mamária da prole feminina com 3 semanas de idade dos grupos CO, G e GL. Fotomicrografia de Terminal End Buds [a, 5X] e [b, 20X]. c) Número de Terminal End Buds por glândula mamária. d) Elongamento epitelial (cm) da glândula mamária. [a]Diferença estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) e [#]Diferença marginal ($p = 0,06$) em comparação ao grupo CO de acordo com ANOVA seguida do teste de Duncan. Os dados estãossos como a média ± SEM (n = 8-11).

Efeitos da exposição materna à ração ATG sobre a proliferação celular, apoptose e níveis protéicos de p21 e p27 na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade

Observou-se menor ($p \leq 0,05$) proliferação celular tanto nos lóbulos e ductos das glândulas mamárias da prole feminina do grupo G em comparação ao grupo CO (Figuras 6a e b). Ainda, a prole feminina do grupo G apresentou maior expressão das proteínas p21 ($p \leq 0,05$) e p27 ($p=0,07$) em comparação com grupo CO (Figura 6c e d). Glândulas mamárias da prole feminina do grupo GL apresentou menor ($p \leq 0,05$) razão entre as proteínas anti-apoptose BCL-2 e proteína pró-apoptótica BAX em comparação com o grupo CO (Figura 7). A prole feminina do grupo G seguiu a mesma tendência, embora as diferenças não foram estatisticamente significantes ($p>0,05$).

Efeitos da exposição materna à ração ATG sobre a expressão de ERα, ERβ e HER-2 e sobre a via PR-RANK-RANKL na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade

Western blotting foi usado para avaliar os efeitos a longo prazo da exposição a ração ATG no início da vida sobre a expressão de ER, HER-2 e PR e qPCR para avaliar a razão da expressão de *Rank/Rankl*. Não houve diferenças ($p> 0,05$) entre os grupos em relação à expressão de ERα, ERβ e HER-2 (Figura 8). Comparado com à prole feminina do grupo CO, a prole feminina do grupo G apresentou redução dos níveis da subunidade p65 NFkB ($p \leq 0,05$) e menor razão da expressão de *Rank/Rankl* ($p=0,09$), porém não houve diferença ($p> 0,05$) em relação a expressão PR (Figura 9). Estas alterações não foram observadas na prole feminina do grupo GL, exposta à gordura animal durante o período fetal e lactacional.

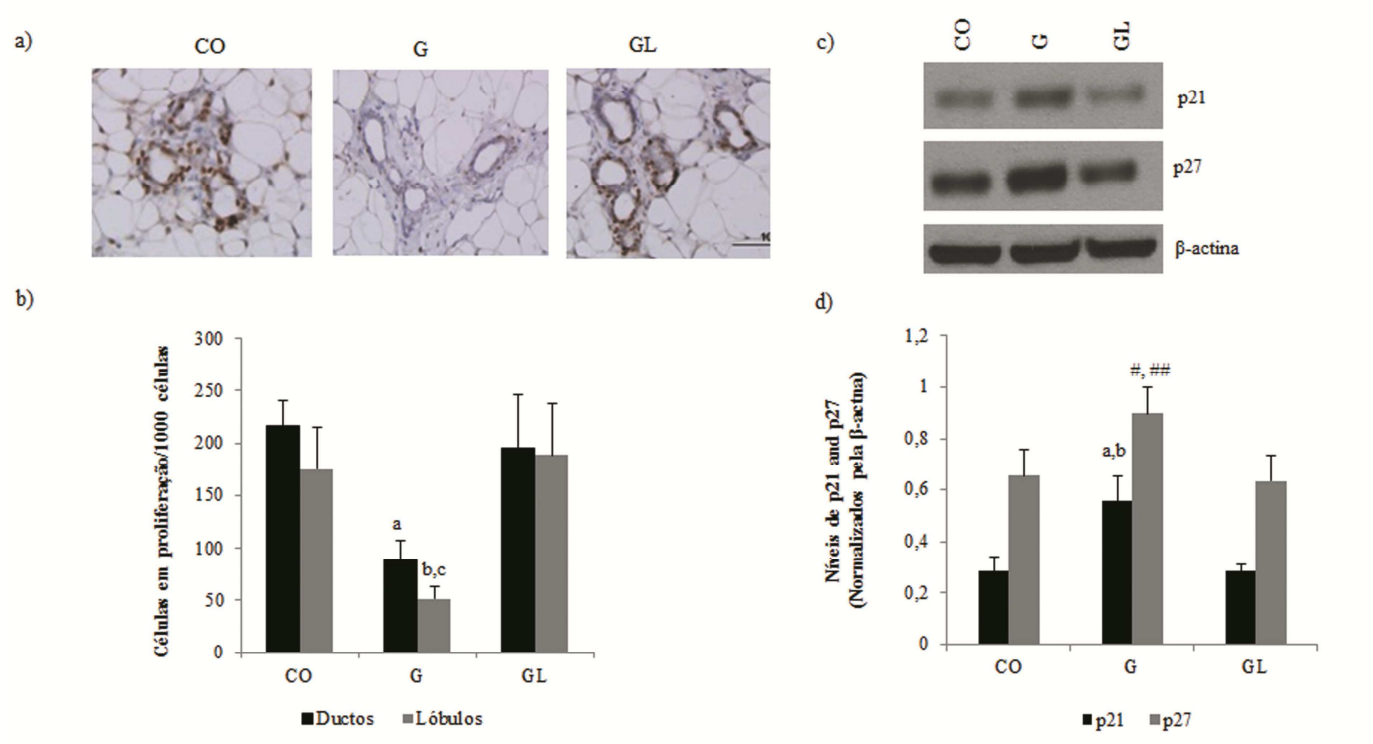


Figura 6: Análise da expressão de Ki67 por imunoistoquímica e p21 e p27 por western blot. Fotomicrografia (40X) da marcação com Ki67 (a), e a quantificação da proliferação celular (b) nas glândulas mamárias da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, G e GL. Diferença estatisticamente significante em relação ao grupo [a]CO (ductos) e [b]CO e [c]GL (lóbulo) de acordo com ANOVA seguida do teste de Duncan. Imunoblot com marcação para p21 e p27(c) e quantificação (d) da expressão das proteínas p21 e p27 em glândulas mamárias da prole feminina com 7 semanas dos grupos CO, G e GL. Diferença estatisticamente significante comparado aos grupos [a]CO e [b]GL e diferença marginal comparado aos grupos [#]CO (p=0,08) e [##]GL (p=0,07) de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Duncan. Os dados estão expressos como a média ± SEM (n = 6 por grupo para análise de Ki67, n=5 por grupo para análise de Western blot).

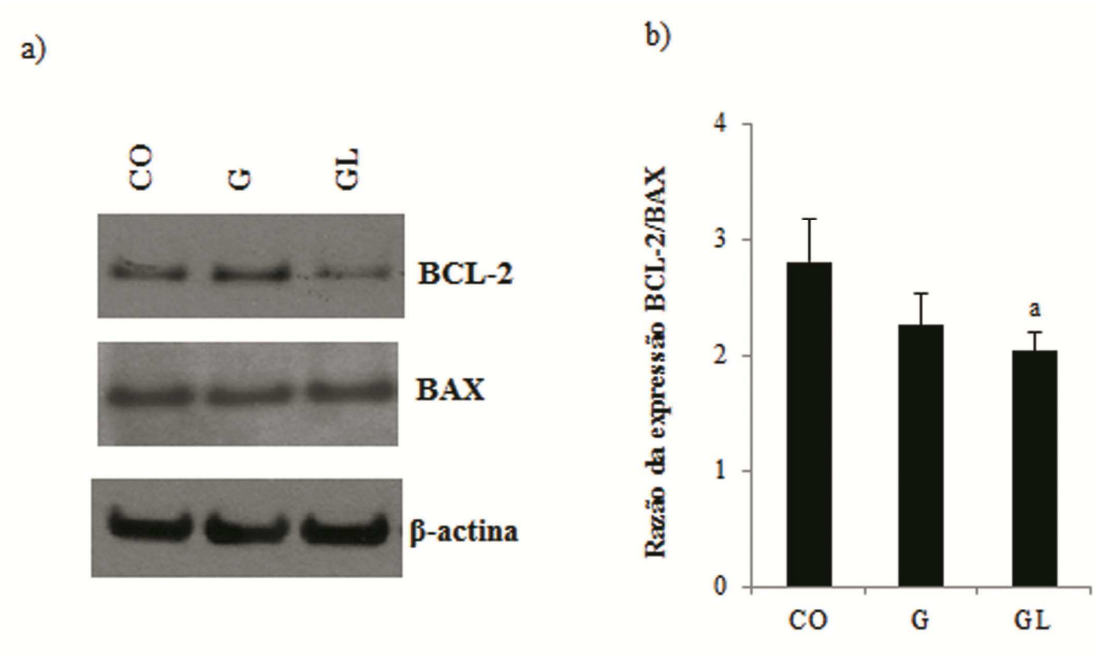


Figura 7: Análise da expressão das proteínas BCl-2 e BAX por western blot. Imunoblot com marcação para BCL-2 e BAX (a) e a razão da expressão de BCL-2/BAX (b) em glândulas mamárias da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, G, e GL. Os dados estão expressos como a média ± SEM (n = 5 por grupo). [a]Diferença estatisticamente significante de acordo com ANOVA seguida do teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

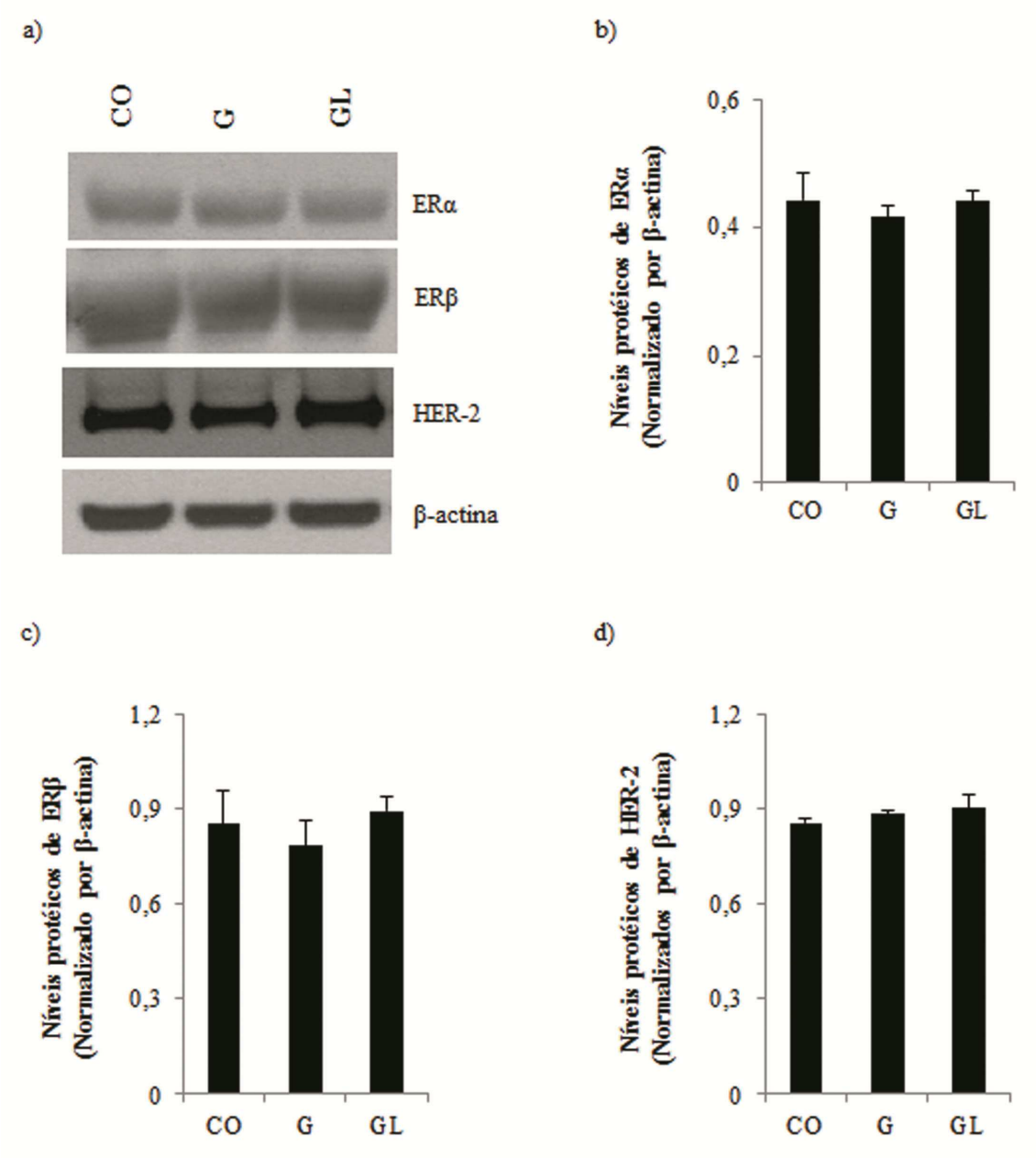


Figura 8: Análise da expressão das proteínas ERα, ERβ e HER-2 por western blot. Imunoblot com marcação para ERα, ERβ e HER-2 (a) e quantificação da expressão de ERα (b), ERβ (c) e HER2 (d) nas glândulas mamárias da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, G e GL. Os dados estão expressos como média ± SEM (n=5 por grupo). Sem diferenças estatisticamente significantes (p> 0,05) entre os grupos de acordo com ANOVA.

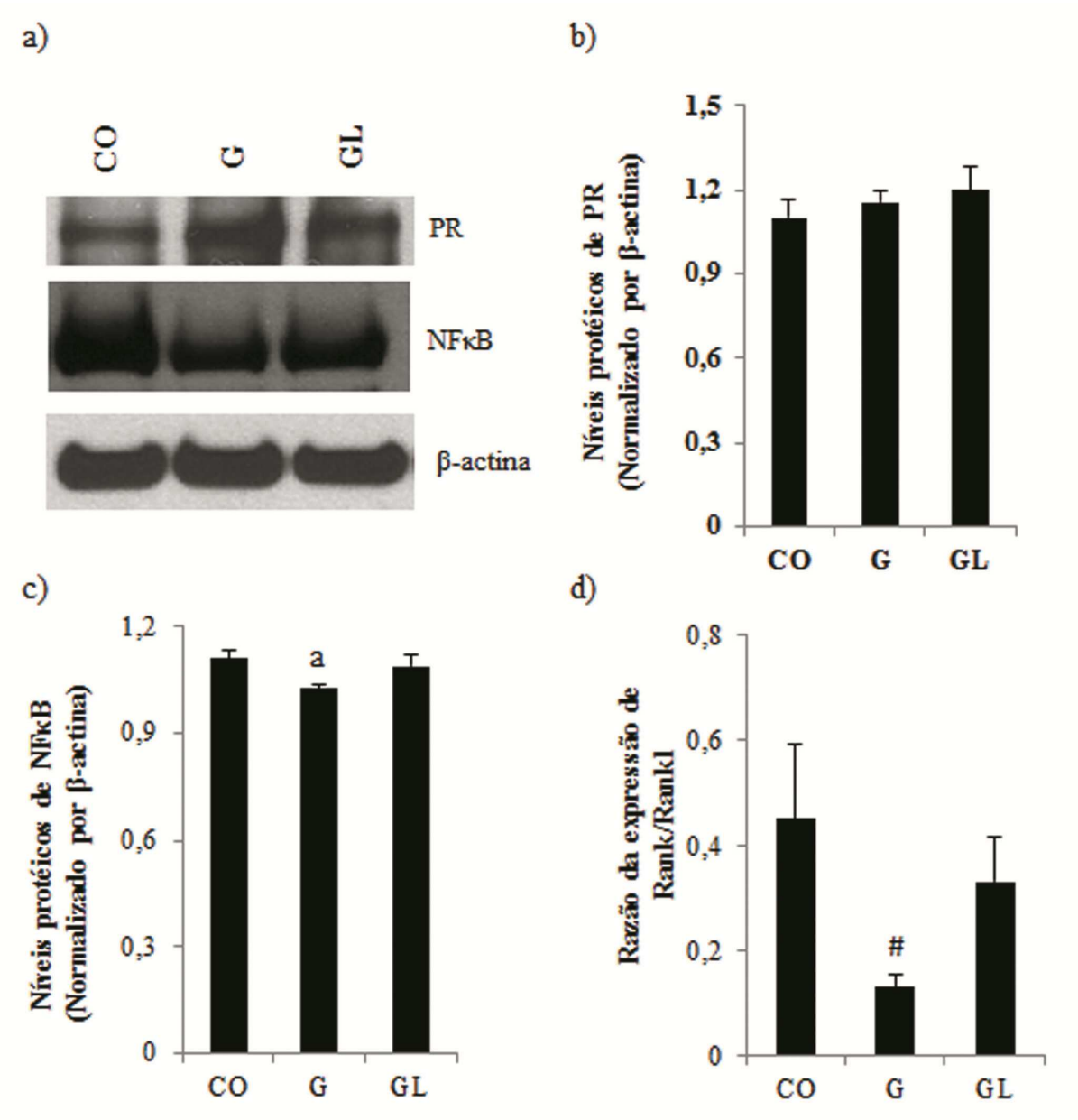


Figura 9: Avaliação da expressão das proteínas PR e NFkB p65 por western blot e da expressão gênica de Rank e RankL por qPCR. Imunoblot com marcação para PR e NFkB p65 (a) e quantificação de PR (b), NFkB subunidade p65 (c) e razão da expressão gênica de *Rank/Rankl* (d) nas glândulas mamárias da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, G, GL. Os dados estão expressos como média ± SEM (n = 5 por grupo). Diferenças [a]significantes ($p \leq 0,05$) e [#]marginais ($p = 0,09$) em comparação com o grupo de CO de acordo com o teste *t* de Student.

Efeitos da exposição materna à ração ATG sobre o padrão de metilação global e modificações pós-traducionais em histonas nas glândula mamárias da prole feminina com 7 semanas de idade

Exposição materna à ração ATG não alterou o padrão de metilação global do DNA em glândulas mamarias da prole feminina (dados não mostrados). Comparado ao grupo CO, prole feminina do grupo G apresentou maiores ($p \leq 0,05$) níveis H3K9me3 na glândula mamária, enquanto que não foram observadas diferenças em relação H3K9ac, H4K16ac, H3K27me3 e H3K4me3 (Figura 10). Nenhuma diferença foi observada nessas marcas epigenéticas entre a prole feminina dos grupos CO e GL.

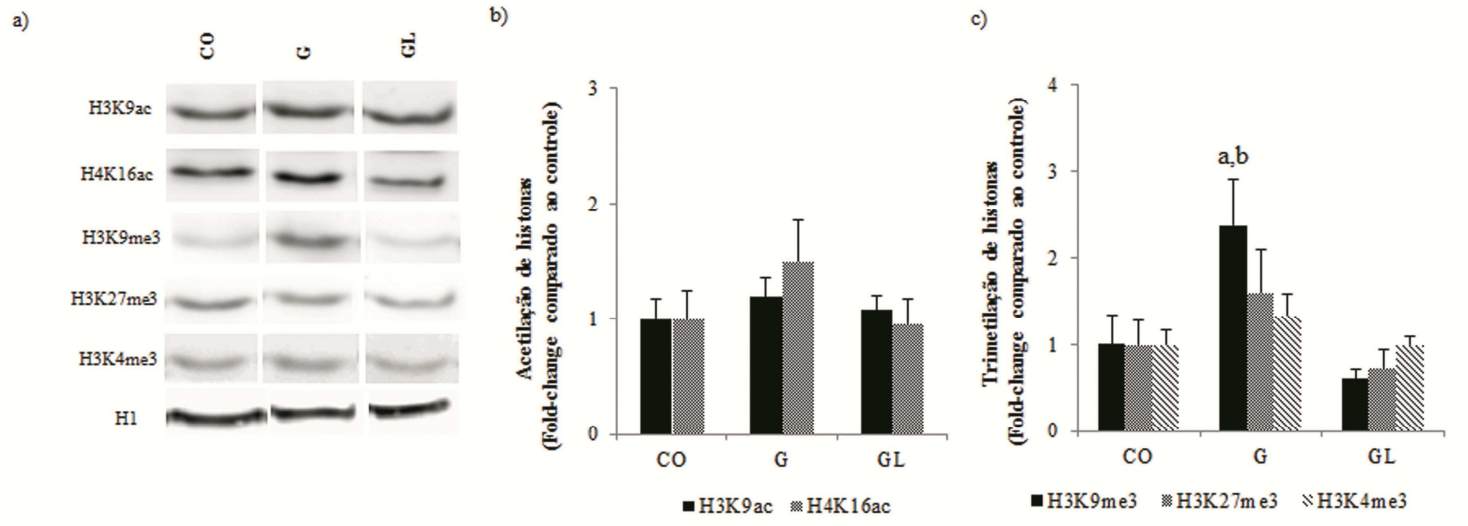


Figura 10: Análise de modificações pós-traducionais em histonas. Imunoblot com marcação para H3K9ac, H4K16ac, H3K9me3, H3K27me3 e H3K4me3 (a), quantificação dos níveis de acetilação das hitonas H3K9 e H4K16 (b) e quantificação dos níveis de trimetilação das histonas H3K9, H3K27 e H3K4 (c) nas glândulas mamárias da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, G e GL. Os dados estão expressos como média ± SEM (n=5 por grupo). Diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$) em comparação ao grupo [a]CO e [b]GL de acordo com ANOVA seguida do teste de Tukey.

Discussão

Observou-se neste trabalho que a prole feminina de ratas que consumiram altos níveis de gordura animal durante a gestação ou durante a gestação e lactação apresentou menor risco de desenvolvimento de câncer de mama. Mais especificamente, a prole feminina exposta à ração com alto teor de gordura animal somente durante o período fetal apresentou redução de todos os parâmetros de carcinogênese mamária como maior latência de aparecimento do primeiro tumor comparado a prole feminina exposta à ração durante o período fetal e lactacional e menor incidência, multiplicidade e peso dos tumores comparado ao grupo controle. Por outro lado, a prole feminina exposta à ração com alto teor de gordura animal durante o período fetal e lactacional apresentou redução somente da multiplicidade. O risco reduzido da prole exposta à ração ATG durante o período fetal foi associado com redução do elongamento da árvore epitelial mamária, redução da proliferação celular e expressão de NFkB p65 e maior expressão de p21 e níveis de H3K9me3 nas glândulas mamárias. O risco reduzido à carcinogênese mamária observada na prole feminina exposta à ração durante o período fetal e lactacional foi associado com redução do elongamento da árvore epitelial mamária. Ainda, a glândula mamária desse grupo apresentou menor número de TEBs e menor razão da expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2/proteína pró-apoptótica BAX comparado ao grupo controle. Nossos dados confirmam estudos prévios que observaram que o risco de desenvolvimento de câncer de mama pode ser programado, ainda, durante o período fetal ou período pós natal precoce por ingestão alimentar materna (TRICHOPOULOS, 1990; HILAKIVI-CLARKE et al., 1997; De ASSIS & HILAKIVI-CLARKE, 2006; DE ASSIS et al., 2012). Porém, diferente do esperado prole feminina de ratas mães que consumiram ração com alto teor de gordura animal a base de banha

(ácidos graxos saturados e monoinstarudos) apresentaram menor suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama na vida adulta.

Análise do perfil de ácidos graxos da ração ATG usada neste estudo indicou que ácidos graxos saturadas (principalmente palmítico [16:0] e esteárico [C18:0]) e monoinsaturados (principalmente oléico [18:1 n-9]) compõem 37% e 38% dos ácidos graxos totais, respectivamente. Não há uma associação evidente entre o consumo de gordura durante a vida adulta, especialmente de origem animal, com o risco de desenvolvimento de câncer de mama (LÖF et al., 2007; PARK et al., 2012). Embora estudos epidemiológicos observaram associação entre consumo dos ácidos graxos saturados palmítico e esteárico e aumento do risco de câncer de mama (SAADATIAN-ELAHI et al., 2004; SCZANIECKA et al., 2012) dados opostos foram observados em estudos *in vitro* e *in vivo*. Especificamente, tratamento de células de câncer de mama com palmitato promoveu morte celular e inibiu o crescimento celular (HARDY et al., 2000; KOURTIDIS et al., 2009). Estearato inibiu a progressão do ciclo celular por induzir a expressão de $p21^{CIP1/WAF1}$ e $p27^{KIP1}$ *in vitro* e em modelo *in vivo* de carcinogênese mamária induzida com N-Nitroso-*N*-metiluréia em ratos (WICKRAMASINGHE et al., 1996; LI et al., 2011).

Até o momento nenhum estudo investigou o impacto da exposição à ração com alto teor de gordura animal proveniente de banha durante períodos precoces da vida no risco de câncer de mama na vida adulta. MEDVEDOVIC et al. (2009) observaram que o consumo isocalórico de dieta com alto teor de lipídios à base de manteiga e óleo de oliva, ricos em ácidos graxos palmítico e n-9 MUFA, respectivamente, por ratas durante a gestação e lactação e pela prole durante os 7 primeiros meses de vida, aumentou a proliferação celular na glândula mamária da prole feminina. Por outro lado, consumo de ração baseada em óleo de oliva por ratas mães por 5

semanas antes da gestação, durante a gestação e lactação diminuiu a suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária induzida quimicamente (STARK et al., 2003). Nós sugerimos que alta ingestão de tanto ácidos graxos saturados e monoinsaturados e menor consumo de polinsaturados por ratas mães expostas à ração ATG baseada em banha foi associado com efeitos protetores contra o câncer de mama observados na prole feminina.

O período de exposição à gordura dietética representa um fator de grande influência na suscetibilidade ao câncer de mama (De ASSIS & HILAKIVI-CLARKE, 2006). Exposição à ração com alto teor de óleo de milho, rica em n-6 PUFA, durante o período fetal (HILAKIVI-CLARKE et al., 1997) ou durante o período fetal e lactacional (STARK et al., 2003), mas não durante a pré-puberdade (OLIVO & HILAKIVI-CLARKE, 2005) aumentou a suscetibilidade à carcinogênese mamária em ratas na vida adulta. É provável que o tempo de exposição à ração ATG à base de banha é, de forma similar, importante na determinação dos efeitos no risco de desenvolver câncer de mama na vida adulta. Os efeitos protetores observados foram parcialmente perdidos na prole feminina exposta à ração ATG durante o período fetal e lactacional.

Maior número de TEBs na glândula mamária é frequentemente associado com aumento do risco de câncer de mama, possivelmente porque essa estrutura é o sítio de iniciação da neoplasia (RUSSO & RUSSO, 1987; HILAKIVI-CLARKE, 2007). Elongamento da árvore epitelial mamária reflete rápido crescimento da glândula mamária direcionada por TEBs (WILLIAMS & DANIEL, 1983). Ingestão materna de ração com alto teor de gordura (óleo de milho e Crisco) aumentou o número de TEBs na glândula mamária da prole, o qual foi associado com maior suscetibilidade à carcinogênese mamária (HILAKIVI-CLARKE et al., 1997, De ASSIS; KHAN; HILAKIVI-CLARKE, 2006). No presente estudo, o número de TEBs

apresentou-se reduzido e o elogamento epitelial retardado na glândula mamária da prole feminina com 3 semanas de idade das ratas mães que consumiram ração ATG, consistente com o menor risco de desenvolvimento de câncer de mama observado.

Exposição à gordura dietética durante as fases de desenvolvimento pode promover alteração da expressão de genes envolvidos no ciclo celular e apoptose na glândula mamária, com consequente programação da suscetibilidade à doenças na vida adulta como o câncer (HILAKI-CLARKE, 2007). No presente estudo, nós observamos redução da proliferação celular e aumento da expressão de proteínas reguladores do ciclo celular como p21 e p27 na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade de mães que consumiram ração ATG durante a gestação. p21 e p27 são inibidores de quinases dependentes de ciclinas e proteínas chaves no processo de inibição da progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S (ABUKHDEIR; PARK, 2008). Redução da expressão dessas proteínas é associada com maior agressividade de tumores de mama e metástase (DRESSLER et al., 2013). Contínua exposição à ração ATG durante a gestação e lactação diminuiu a razão de expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2/pró-apoptótica BAX na glândula mamária da prole feminina com 7 semanas de idade. Nossos dados sugerem que exposição materna à ração com alto teor de gordura animal durante a gestação e gestação e lactação diminuiu o risco de câncer de mama na prole por inibir a proliferação celular e induzir apoptose, respectivamente.

Maiores níveis séricos de leptina em ratas prenhas induzidas por ração rica em gordura, à base de Crisco, foram associados com aumento do risco de câncer de mama na prole (De ASSIS; HILAKIVI-CLARKE, 2006, De ASSIS; KHAN; HILAKIVI-CLARKE, 2006). Em nosso estudo, os níveis de leptina sérica foram maiores, mas não estatisticamente significante, em ratas prenhas expostas à ração ATG. Esses resultados são inesperados já que nós observamos redução

do risco de câncer de mama na prole feminina de ratas mães que consumiram ração ATG durante a gestação ou gestação e lactação. O papel de maiores níveis de leptina *in útero* no risco de câncer de mama na vida adulta deverá ser investigado futuramente.

Progesterona está associada com aumento da proliferação celular e morfogênse no epitélio luminal da glândula mamária (OBR & EDWARDS, 2012). No presente estudo, nós observamos que a prole feminina de ratas mães que consumiram ração ATG durante a gestação apresentou menores níveis de progesterona comparado à prole feminina do grupo controle. Sugere-se que a indução da carcinogênese por progesterona involva a expansão de populações de células tronco adultas da glândula mamária (JOSHI et al., 2010) através da estimulação da expressão do receptor ativador do ligante fator nuclear-kB (RANKL) nas células luminais (OBR & EDWARDS, 2012). RANKL é liberado para o meio extracelular e se liga aos receptores RANK nas células tronco, levando a ativação a jusante da via de sinalização IKK/IB/NFκB/cyclin D1 para estimular a proliferação celular (SCHRAMEK et al., 2010). Interessantemente, em nosso estudo, redução dos níveis de progesterona foi acompanhada por diminuição da razão de expressão *Rank/Rankl* e expressão da subunidade p65 do NFκB, sugerindo que essa via foi suprimida e pode estar associada com redução da carcinogênese mamária na prole feminina de ratas que consumiram ração ATG durante a gestação.

Alterações dos padrões globais de modificações em histonas durante fases precoces de desenvolvimento são associadas com processos celulares que medeiam o desenvolvimento e diferenciação da glândula mamária (RIJNKELS et al., 2010; VASTENHOUW & SCHIER, 2012). Nós observamos neste estudo que o consumo materno da ração ATG somente durante a gestação promoveu aumento dos níveis de H3K9me3 na glândula mamária da prole feminina, porém a significância funcional desta marca epigenética na modulação do risco de câncer de

mama permanece a ser elucidada. Níveis elevados desta modificação pós-traducional em histona causa repressão transcricional (FÜLLGRABE, KAVANAGH, JOSEPH, 2011) e são associados com inibição do potencial tumorigênico de células de câncer de mama da linhagem MCF-7 (KHANAL et al., 2013). Por outro lado, altos níveis de H3K9me3 foram observados no soro de pacientes com câncer de mama (LESZINSKI et al., 2012) e aumento dessa modificação promoveu migração e invasão de células de câncer de mama (YOKOYAMA et al., 2013). Assim, permanece a necessidade de elucidar se alguns oncogenes foram silenciados por modificações em histonas da glândula mamária de ratas expostas à ração ATG em períodos precoces da vida. Embora nós não observamos diferenças no padrão global de metilação do DNA, é de fundamental importância que futuros estudos investiguem possíveis alterações nos níveis de metilação em regiões promotoras de oncogenes e genes supressores de tumor.

Em conclusão, nossos dados reforçam achados prévios que a dieta materna durante a gestação pode determinar a suscetibilidade da prole ao desenvolvimento de câncer de mama na vida adulta (HILAKI-CLARKE, 2007). Nós observamos que a prole feminina de ratas que consumiram ração com quantidade elevada de banha durante a gestação apresentou reduzido risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias induzidas por DMBA. Será de grande importância confirmar , em estudos futuros, se os efeitos protetoras dessa ração se aplicam em outros modelos de câncer de mama como por exemplo modelos de camundongos modificados geneticamente. Devido outros estudos demonstrarem que consumo materno de dieta com alto teor de gordura saturada aumenta a incidência de doenças cardiovasculares e disfunções metabólicas na prole (TAYLOR et al., 2004; ARMITAGE; TAYLOR; POSTON, 2005; KHAN et al., 2003), não é aconselhado que mães durante a gestação consuma altos níveis de banha para proteger as filhas contra o câncer de mama. Outros estudos deverão focar na identificação da

combinação ótima de ácidos graxos dietéticos, bem como a quantidade que pode ser recomendada para gestantes a fim de reduzir o risco de doenças nas filhas; que provavelmente envolverá altos níveis de ácidos graxos monoinsaturados, n-3 PUFA, alguns tipos de ácidos graxos saturados e menores quantidades de n-6 PUFAS.

Agradecimentos

Á Sandra de Jesus Santana e Rosangela Pavan Torres pelo suporte técnico. Este trabalho foi financiado pela Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) com bolsas de estudos (processos: 2010/11742-0 e 2012/03330-9) e projeto auxílio (processo: 2011/23259-4).

Referências

ABUKHDEIR, A.M.; PARK, B.H. P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. **Expert reviews in molecular medicine**, Cambridge, v. 10, 2008.

AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH (AICR). The continuous update project, 2010.

ARMITAGE, J.A.; TAYLOR, P.D.; POSTON, L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. **The Journal of physiology**, Londres, v. 565, p. 3-8, 2005.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST (AOAC). Official methods of analysis, Arlignton, Official method. 2002; n996.06, 41: 20-24A.

CHO, E. et al. Premenopausal fat intake and risk of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.95, n.14, p.1079-85, 2003.

De ASSIS, S. et al. Changes in mammary gland morphology and breast cancer risk in rats. **Journal of visualized experiments**, Boston, v. 16, n.44, 2010.

De ASSIS, S. et al. High-fat or ethinyl-oestradiol intake during pregnancy increases mammary cancer risk in several generations of offspring. **Nature Communication**, v.3, n.1052, 2012.

De DE ASSIS, S.; HILAKIVI-CLARKE, L. Timing of dietary estrogenic exposures and breast cancer risk. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Nova York, v. 1089, p. 14-35, 2006.

De DE ASSIS, S.; KHAN, G.; HILAKIVI-CLARKE, L. High birth weight increases mammary tumorigenesis in rats. **International journal of cancer**, v. 119, n. 7, p. 1537-46, 2006.

DRESSLER, A.C. et al. Tuberin and p27 expression in breast cancer patients with or without BRCA germline mutations. **Journal of cancer research and clinical oncology**, Berlin, v. 139, n. 8, p. 1349-55, 2013.

FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet].Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: http://globocan.iarc.fr, accessed on 13/02/2014.

FREEDMAN, L.S.; CLIFFORD, C.; MESSINA, M. Analysis of dietary fat, calories, body weight, and the development of mammary tumors in rats and mice: a review. **Cancer research**, Chicago, v.50, n.18, p.5710-9, 1990.

FÜLLGRABE, J.; KAVANAGH, E.; JOSEPH, B. Histone onco-modifications. **Oncogene**, v.30, n.31, p. 3391-403, 2011.

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A.; BEEDLE, A.S. Non-genomic transgenerational inheritance of disease risk. **Bioessays**, v. 29, n.2, p. 145-54, 2007.

GONZALEZ, C.A.; RIBOLI, E. Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. **European journal of cancer**, Nova York, v. 46, n.14, p. 2555-62, 2010.

HALES, C.N.; BARKER, D.J. The thrifty phenotype hypothesis. **British medical bulletin**, Londres, v.60, p. 5-20, 2001.

HARDY, S.; LANGELIER, Y.; PRENTKI, M. Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. **Cancer Research**, v. 60, n.22, p. 6353-8, 2000.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory practice**, Londres, v. 22, n.6, p. 475-6, 1973.

HILAKIVI-CLARKE L. Nutritional modulation of terminal end buds: its relevance to breast cancer prevention. **Current cancer drug targets**, Hilversum, v. 7, v.5, p. 465-74, 2007.

HILAKIVI-CLARKE, L. et al. A maternal diet high in n - 6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 94, n.17, p. 9372-7, 1997.

HILAKIVI-CLARKE, L.; De DE ASSIS, S. Fetal origins of breast cancer. **Trends in endocrinology and metabolism**, Nova York, v. 17, n.9, p. 340-8, 2006.

HULKA, B.S. Dietary fat and breast cancer: case-control and cohort studies. **Preventive medicine**, Nova York, v.18, n.2, p.180-93,1989.

ION, G.; AKINSETE, J.A.; HARDMAN, W.E. Maternal consumption of canola oil suppressed mammary gland tumorigenesis in C3(1) TAg mice offspring. **BMC Cancer**, v.10, n.81, p.1-12, 2010.

JOSHI, P.A. et al. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. **Nature**, v. 465, n. 7299, p. 803-7, 2010.

KEARNEY, J. Food consumption trends and drivers. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, Londres, v. 365, n.1554, p. 2793-807, 2010.

KEY, T.J. et al. Dietary fat and breast cancer: comparison of results from food diaries and food-frequency questionnaires in the UK Dietary Cohort Consortium. **The American journal of clinical nutrition**, Bethesda, v. 94, n.4, p. 1043-52, 2011.

KHAN, I.Y. et al. Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats.

Hypertension, v. 41, n.1, p. 168-75, 2003.

KHANAL, P. et al. Prolyl isomerase Pin1 negatively regulates the stability of SUV39H1 to promote tumorigenesis in breast cancer**. FASEB journal** , Bethesda, v. 27, n.11, p. 4606-18, 2013.

KOURTIDIS, A. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma protects ERBB2-positive breast cancer cells from palmitate toxicity. **Breast Cancer Research**, v.11, n.2, 2009.

LANGLEY-EVANS, S.C.; McMULLEN, S. Developmental origins of adult disease. **Medical principles and practice**, Nova York, v. 19, n.2, p.87-98, 2010.

LESZINSKI, G. et al. Relevance of histone marks H3K9me3 and H4K20me3 in cancer. **Anticancer Research**, v. 32, n.5, p. 2199-205, 2012.

LI, C. et al. Prevention of carcinogenesis and inhibition of breast cancer tumor burden by dietary stearate. **Carcinogenesis**, v.32, n.8, p. 1251-8, 2011.

LÖF, M. et al. Dietary fat and breast cancer risk in the Swedish women's lifestyle and health cohort. **British journal of cancer**, Londres, v.97, n.11, p.1570-6, 2007.

LUBIN, F.; WAX, Y.; MODAN, B. Role of fat, animal protein, and dietary fiber in breast cancer etiology: a case-control study. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 77, n.3, p.605-12, 1986.

MacLENNAN, M.; MA, D.W. Role of dietary fatty acids in mammary gland development and breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, Boston, v. 12, n.5, p.1-10, 2010.

MARTIN, L.J. et al. A randomized trial of dietary intervention for breast cancer prevention. **Cancer Research**, v. 71, n.1, p.123-33, 2011.

MEDVEDOVIC, M. et al. Influence of fatty acid diets on gene expression in rat mammary epithelial cells. **Physiological genomics**, Bethesda, v. 38, n.1, p. 80-8, 2009.

OBR, A.E.; EDWARDS, D.P. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. **Molecular and cellular endocrinology**, Amsterdam, v. 357, n. 1-2, p. 4-17, 2012.

OLIVO, S.E.; HILAKIVI-CLARKE, L. Opposing effects of prepubertal low- and high-fat n-3 polyunsaturated fatty acid diets on rat mammary tumorigenesis. **Carcinogenesis**, v.26, n.9, p. 1563-72, 2005.

PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. Ilex paraguariensis extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of biochemistry and biophysics**, Nova York, v. 476, n.2, p. 178-85, 2008.

PARK, S.Y. et al. Dietary fat and breast cancer in postmenopausal women according to ethnicity and hormone receptor status: the Multiethnic Cohort Study. **Cancer prevention research**, Filadélfia, v. 5, n.2, p. 216-28, 2012.

PETO, J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. **Nature**, Londres, v.411, n.6835, p.390-5, 2001.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v.123, n.11, p. 1939-51,1993.

RIJNKELS, M. et al. The epigenetic landscape of mammary gland development and functional differentiation. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, Nova York, v. 15, n.1, p. 85-100, 2010.

RUSSO, J.; RUSSO, I.H. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, Nova York, v. 5, n.2, p. 187-200, 2000.

RUSSO, J.; RUSSO, I.H. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. **Laboratory investigation**, Baltimore, v. 57, n.2, p.112-37, 1987.

SAADATIAN-ELAHI, M. et al. Biomarkers of dietary fatty acid intake and the risk of breast cancer: a meta-analysis. **International journal of cancer**, Geneva, v.111, n.4, p. 584-91, 2004.

SCHRAMEK, D. et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. **Nature**, v. 468, n.7320, p. 98-102, 2010.

SCZANIECKA, A.K. et al.. Dietary intake of specific fatty acids and breast cancer risk among postmenopausal women in the VITAL cohort. **Nutrition and cancer**, Filadélfia, v. 64, n.8, p. 1131-42, 2012.

STARK, A.H. et al. Olive oil consumption during pregnancy and lactation in rats influences mammary cancer development in female offspring. Nutrition and Cancer, v. 46, n.1, p.59-65, 2003.

SULLIVAN, E.L. et al. Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. **The Journal of neuroscience**, Washington, DC, v. 30, n.10, p. 3826-30, 2010.

TAYLOR, P.D. et al. Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, Bethesda, v. 288, n. 1, p.134-9, 2005.

TEEGARDEN, D.; ROMIEU, I.; LELIÈVRES S.A. Redefining the impact of nutrition on breast cancer incidence: is epigenetics involved? **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v.25, n.1,

p.68-95, 2012.

TRICHOPOULOS, D. Hypothesis: does breast cancer originate in utero? **Lancet**, v.335, n. 8695, p. 939-40, 1990.

VASTENHOUW, N.L.; SCHIER, A.F. Bivalent histone modifications in early embryogenesis. **Current opinion, in cell biology**, Londres, v. 24, n.3, p. 374-86, 2012.

WADHWA, P.D. et al. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. **Seminars in reproductive endocrinology**, Nova York, v. 27, n.5, p. 358-68, 2009.

WANG, X.Y. et al. Musashi1 modulates mammary progenitor cell expansion through proliferin-mediated activation of the Wnt and Notch pathways. **Molecular biology of the cell**, Bethesda, v. 28, n.11, p. 3589-99, 2008.

WICKRAMASINGHE, N.S. et al. Stearate inhibition of breast cancer cell proliferation. A mechanism involving epidermal growth factor receptor and G-proteins. **The American journal of pathology**, Filadélfia, v. 148, n.3, p. 987-95,1996.

WILLETT, W.C. Diet and cancer. **Oncologist**, Dayton, v.5, n.5, p. 393-404, 2000.

WILLIAMS, J.M.; DANIEL, C.W. Mammary ductal elongation: differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. **Developmental biology**, Nov York, v. 97, n.2, p. 274-90, 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The global burden of disease: 2004 update, 2008.

YOKOYAMA, Y. et al. Cancer-associated upregulation of histone H3lysine 9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo. **Cancer science**, Tokyo, v. 104, n.7, p. 889-95, 2013.

7. ARTIGO 2: Perfil de ácidos graxos e padrão de expressão gênica global em ratas que foram expostas a ração com alto teor de gordura animal, durante o período fetal e lactacional, associados com o risco de câncer de mama na vida adulta

Lipidomic fatty acid profile and global gene expression pattern in mammary gland of rats that were exposed to lard-based high fat diet during fetal and lactation periods associated to breast cancer risk in adulthood

Fábia de Oliveira Andrade[1]; Sonia de Assis[2] ; Lu Jin[2]; Camile Castilho Fontelles[1]; Eduardo Purgatto[1]; Leena Hilakivi-Clarke[2]; Thomas Prates Ong[1,3].

[1]Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; [2]Georgetown University Lombardi Comprehensive Cancer Center, Washington D.C., USA; [3] Núcleo de Apoio à Pesquisa em Alimentos e Nutrição (NAPAN), São Paulo, Brazil.

Apoio Financeiro: Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 2010/11742-0; 2011/23259-4; 2012/03330-9).

Palavras-Chave: Câncer de mama, gordura animal, programação fetal, expressão gênica global, lipidômica

Resumo

Nós previamente observamos que prole feminina de ratas que consumiram ração com alto teor de gordura animal (ATG; 60% de calorias provinientes de lipídeos) durante a gestação ou gestação e lactação apresentaram menor risco de desenvolvimento de câncer de mama. A fim de melhor esclarecer esses efeitos protetores inesperados por exposição à banha durante os períodos precoces da vida, nós aplicamos ferramentas de lipidômica e nutrigenônica para investigar o perfil de ácidos graxos e o padrão de expressão gênica global da glândula mamária da prole feminina. Exposição à ração ATG promoveu, em geral, menor concentração de ácidos graxos saturados (exceto ácido esteárico) e maior concentração de ácidos graxos polinsaturados da série n-6, monoinstarurados e ácido linoleico conjugado (CLA) na glândula mamária de ratas expostas à ração ATG durante períodos precoces da vida, principalmente durante o período fetal e lactacional. De acordo com análise de dependência de redes diferencial (DDN) dos genes diferentemente expressos pela análise de "microarray" exposição à ração ATG em períodos precoces da vida altera a rede transcricional da glândula mamária na vida adulta. Especificamente, ratas expostas à ração ATG somente durante o período fetal apresentou aumento da expressão de *Hrh1*e *Repin1* em comparação ao controle. A prole exposta à ração durante o período fetal e lactacional apresentou maior e menor expressão de *Stra6* e *Tlr1*em comparação ao controle, respectivamente e menor expressão de *Crkrs* em comparação à prole exposta à ração somente durante o período fetal. Dessa forma, a exposição à ração ATG durante períodos precoces da vida altera o perfil de ácidos graxos e a rede transcricional na glândula mamária de ratas jovens e essas alterações lipidômicas e de expressão gênica poderiam estar associadas com a reduzida suscetibilidade ao câncer de mama na vida adulta.

Abstract

We have previously shown that female offspring of rat dams consumed a lard-based high-fat (HF) diet (60% fat-derived energy) during pregnancy or during pregnancy and lactation were at a reduced risk of developing mammary cancer. In order to better clarify these unexpected protective effects by early life lard exposure, we have applied a lipidomics and nutrigenomics approach to investigate the fatty acid profile and global gene expression pattern in the mammary tissue of the female offspring of dams that consumed a lard-based high fat diet during gestation or gestation and lactation periods. Exposure to a lard-based HF diet promotes decreases in SFA (except for stearic acid) and increases in n-6 PUFA, MUFA and CLA concentrations in mammary gland of rats exposed to the HF diet in early life, mainly *in utero* and nursing. According to Differential dependency network (DDN) analysis of genes differently expressed by microarray, exposure to HF diet during early life changes the transcriptional network of the mammary gland in adulthood. Specifically, rats exposed to HF diet only during the fetal period showed increased expression of *Hrh1*e *Repin1* compared to the control. The offspring exposed to the HF diet *in utero* and nursing had higher and lower expression of *Stra6* and *Tlr1*, respectively, compared to the control and lower expression of *Crkrs* compared to the offspring exposed only *in utero*. We conclude that exposure to a lard-based HF during early life changes the fatty acid profile and transcriptional network in mammary gland in young adult rats and these lipidomic and gene expression alterations could be associated with the observed reduced susceptibility to breast cancer in adulthood.

Introdução

O consumo de gordura está aumentando em todo o mundo (VADIVELOO et al., 2013). Entre os períodos de 1995-1997 a 2001-2003 o percentual global de ingestão calórica a partir de gordura total aumentou quase 2% e importantes contribuidores para essa alteração alimentar são os óleos vegetais e a gordura animal (WOLMARANS, 2009). Atenção especial tem sido dada à gordura animal, importante fonte de ácidos graxos saturados (SFA) (WOLMARANS, 2009), visto que o consumo excessivo desse tipo de ácido graxo está associado com diversas doenças, incluindo as cardiovasculares e diabetes (SALTER, 2013; PAQUET et al, 2013).

Entretanto os efeitos da gordura alimentar no risco de câncer de mama não estão completamente esclarecidos (FREEDMAN et al., 1990; BOYD et al., 2003; LOF et a., 2007; KEY et al., 2011; PARK et al., 2012). Especificamente para a gordura animal, efeitos contraditórios são relatados. Consumo elevado de gordura animal, principalmente carne vermelha e produtos lácteos, foi associado ao aumento modesto do risco de câncer de mama (CHO et al., 2003; BOYD et al., 2003; GONZALEZ & RIBOLI, 2010). Por outro lado, outros estudos epidemiológicos não observaram associação entre o consumo de gordura animal e SFA com essa doença (LOF et al., 2007; ALEXANDER et al., 2010a, ALEXANDER et al., 2010b ; KEY et al., 2011; PARK et al., 2012). Estudos de análises lipidômicas observaram que pacientes com câncer de mama apresentaram diferentes perfis de ácidos graxos no soro e membrana dos eritrócitos, sugerindo que alterado metabolismo de lipídeos é um importante fator durante a carcinogênese mamária (PALA et al., 2001; LV & YANG, 2012).

Consumo materno de gordura alimentar durante os períodos de gestação e/ou lactação é outro fator que pode modular o risco de câncer de mama na vida adulta (De ASSIS et al., 2006;

ION et al., 2010). Estudos prévios com animais mostraram que exposição intrauterina à ração com alto teor de gordura à base de óleo de milho, fonte de ácido linoléico, aumentou a suscetibilidade à carcinogênese mamária na vida adulta (HILAKIVI-CLARKE et al., 1997; De ASSIS et al., 2012). Em adição, consumo materno de rações à base de óleo de canola ou oliva durante a gestação e lactação reduziu o desenvolvimento de câncer de mama quimicamente induzido na prole (STARK et al., 2009; MABASA et al., 2013). Sugere-se que a alteração da suscetibilidade ao câncer de mama, por exposição durante períodos precoces da vida à gordura, possa estar associada com a modulação da expressão de oncogenes e de genes supressores de tumor (HILAKIVI-CLARKE et al., 2007; MEDVEDOVIC et al., 2009). Análise de nutrigenômica com avaliação da expressão gênica global é uma estratégia útil na identificação de redes de sinalização funcionalmente relevantes que podem estar envolvidas no desenvolvimento do câncer de mama sob exposição nutricional durante o período intrauterino (OLIVO-MARSTON et al., 2008).

Nós observamos previamente que prole feminina de ratas que consumiram ração com alto teor de gordura animal (ATG) a base de banha (60% de calorias provinientes de lipídeos) durante a gestação ou durante a gestação e lactação apresentaram menor risco de desenvolvimento de câncer de mama (ANDRADE et al., 2014). No grupo de ratas que foram expostas à ração ATG somente durante o período intrauterino todos os aspectos da carcinogênese mamária foram reduzidos como incidência, multiplicidade e peso dos tumores comparado ao grupo controle, bem como maior latência de aparecimento do primeiro tumor comparado ao grupo exposto à ração ATG durante o período fetal e lactacional. Neste último grupo, observou-se redução da multiplicidade de tumores comparado ao controle, sugerindo menor proteção comparado ao grupo exposto à ração ATG somente *in utero* (ANDRADE et al., 2014). A fim de melhor

esclarecer esses efeitos protetores inesperados por exposição à banha durante os períodos precoces da vida, nós aplicamos ferramentas de lipidômica e nutrigenônica para investigar o perfil de ácidos graxos e o padrão de expressão gênica global da glândula mamária da prole feminina de ratas que consumiram ração ATG durante a gestação e durante a gestação e lactação

Material e métodos

Protocolo Experimental

O protocolo experimental foi previamente descrito em detalhes (ANDRADE et al., 2014). Resumidamente, ratas fêmeas da linhagem Sprague-Dawley foram divididas em 3 grupos antes do acasalamento: CO (ratas fêmeas expostas à ração controle [AIN-93G] durante a gestação e lactação); G (ratas fêmeas expostas à ração com alto teor de gordura animal [ATG] durante a gestação e ração AIN-93G durante a lactação) e GL (ratas fêmeas expostas à ração ATG durante a gestação e lactação). A ração ATG é baseada na AIN-93G (REEVES et al., 1993) com adição de banha. Nas rações CO e ATG 10% e 60% de calorias totais são provinientes de lipídeos, respectivamente. A distribuição de ácidos graxo na ração ATG foi de 37%, 38% e 24% de saturados, monoinsaturados e polinsaturados, respectivamente, enquanto que para a ração CO, essa distribuição foi de 17%, 27% e 55%, respectivamente. Tecidos mamários foram obtido das proles femininas com 7 semanas de idade dos grupos CO, G e GL, as quais foram alimentadas com ração comercial comum para roedores (Nuvital; Paraná, Brasil).

Análise do perfil de ácidos graxos na glândula mamária

Lipídeos foram extraídos dos tecidos mamários obtidos da prole feminina com 7 semanas de idade (n=4 por grupo) usando o método de Folch. Cerca de 50 mg de tecido foi macerado com nitrogênio líquido, misturados com 1 ml de clorofórmio:metanol (2:1); 25µL de PMSF; 10µL de padrão C19 diluído em diclorometano e incubado por uma noite a 4˚C. A fração orgânica contendo os lipídeos foi coletada. A derivatização dos ácidos graxos a metil ésteres (FAMEs) foi realizada de acordo com o protocolo de ICHIHARA & FUKUBAYASHI (2010) com algumas modificações. A fração orgânica da extração de ácidos graxos foi seca em corrente de N_2, ressuspendida em 200 µl de tolueno e transferida para um *vial* de reação. Uma alíquota de 1,5 ml de metanol e 0,3 ml de HCl 8% em metanol (v/v) foi adicionada. O vial foi fechado e aquecido a 100°C por 1 hora. Após resfriar, 1 mL de hexano e 1 ml de água ultrapura foram adicionados, o vial foi fechado, agitado vigorosamente em vórtex por 1 min e mantido a temperatura ambiente até completa separação das fases. A fase orgânica superior foi coletada e transferida para um tubo de ensaio, seca em corrente de N_2, ressuspendida com 50 µL de hexano e transferida para um *vial*. As amostras foram injetada no sistema cromatográfico acoplado ao detector de massas (Agilent 6890 /Agilent 5973 Mass Selective Detector) em modo com divisor de amostras (*split* 5:1) a 250°C. A coluna usada foi a DB-5MS (30 m × 0.25 mm inner diameter, 0.25 µm film thickness; Agilent). Hélio foi usado como gás carreador a um fluxo de 1 ml/min. Durante a corrida, a temperatura do forno foi mantida inicialmente a 70°C por 0,5 min., aumentada até 175°C a 5°C/min. e, em seguida, até 280°C a 2°C/min, sendo mantida, ao final, por 0,5 min. Os metil ésteres de ácidos graxos foram identificados e por comparação de tempos de retenção com seus respectivos padrões (Supelco, Inc.) e busca na biblioteca de espectros de massas NIST

2008. As análises foram feitas em triplicata e cada FAME foi quantificado com base em curvas-padrão feita com os respectivos padrões autênticos (Supelco, Inc.). Os ácidos graxos analisados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Ácidos graxos analisados na glândula mamária da prole feminina dos grupos CO, G e GL por CG-EM

Ácido graxo	Sinônimo	Ácido graxo	Sinônimo
Caprílico	C8:0	Alpha-Linolênico	C18:3
Cáprico	C10:0	Araquídico	C20:0
Undecílico	C11:0	Eicosenóico	C20:1
Laurico	C12:0	Eicosadienóico	C20:2
Tridecílico	C13:0	Dihomo-γ-linolênico	C20:3
Mirístico	C14:0	Araquidônico	C20:4
Meristoléico	C14:1	Eicosapentaenóico (EPA)	C20:5
Pentadecílico	C15:0	Heneicosílico acid	C21:0
Pentadecenóico	C15:1	Beénico	C22:0
Palmitoléico	C16:1	Erúcico	C22:1
Cis-10-Heptadecenóico	C17:1	Docosadienóico	C22:2
Esteárico	C18:0	Docosahexaenóico (DHA)	C22:6
cis-13-Octadecenóio	C18:1	Tricosílico	C23:0
Oleico	C18:1	Lignocérico	C24:0
Linoleico	C18:2	Nervônico	C24:1
trans-10, *cis*-12-octadecenóico	C18:2 (t10c12)		

Análise do padrão de expressão gênica global no tecido mamário da prole feminina dos grupos CO, G e GL

O RNA da glândula mamária foi extraído do tecido mamário da prole feminina com 7 semanas de idade (n-5 por grupo) com RNeasy Lipid Mini Kit (QIAGEN , EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, e a sua qualidade foi confirmada usando Agilent 2100 Bioanalyzer e RNA 6000 LabChips, a partir dos quais os números de integridade do RNA (RIN)

foram calculados. RNA total de alta qualidade foi hibridizado com Chip da Affymetrix (Affymetrix Rat Genome 230 2.0 GeneChip) de acordo com o protocolo do fabricante. Dados de expressão foram normalizados pelo método da intensidade logarítimica de erro da sonda (PLIER) como implementado pela Affymetrix (http://www.affymetrix.com/). Test *t* de Student e "fold-changes" foram calculados para comparar 30.000 transcritos e variantes entre CO x G, CO x GL e G x GL, e genes apresentando $p \leq 0,05$ (univariada, bi-caudal) e fold-change >=1.5 foram considerados diferentemente expressos. Análise de Componentes Principais (PCA) foi obtida com o grupo de dados afim de sumarizar a variação da expressão gênica sob influência da exposição à ração ATG durante a gestação e lactação na glândula mamária da prole feminina (RAYCHAUDHURI et al., 2000). Para a análise de dependência de redes diferencial (DDN do inglês "Differential dependency network") MATLAB e Cytoscape foram utilizados para análise e visualização, respectivamente (ZHANG et al., 2011). Os parâmetros usados para a análise de DDN foram K=1, p value cutoff=0.01, threshold=0.25. Anotação funcional e termos da ontologia gênica foram avaliados usando IPA (Integrated Pathaway analysis; Ingenuity® Systems, www.ingenuity.com) e Mouse Genome Informatics (MGI) data base (http://www.informatics.jax.org/), respectivamente.

Validação de genes diferentemente expressos no tecido mamário da prole feminina dos grupos CO, G e GL

RNA foi incubado com DNAse por 20 minutos, e a reação foi finalizada com EDTA 0,02 M , a 75 ° C por 10 min. RNA tratado (1 ug) foi utilizada para a síntese de cDNA usando kit de transcrição reversa (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; Applied Biosystems,

EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de expressão de genes alvo foram medidos através de PCR em tempo real (7900HT Fast Real-Time PCR System; Applied Biosystems). cDNA (2 mL) a uma concentração final de 5 ng/mL foi misturado com 5 mL EvaGreen qPCR Mastermix (Applied Biosystem Materiais , EUA) e 0,5 mL de 5 mmol primers sense e antisense em placas de 384 poços. As reações de PCR foram iniciadas com 95°C por 15 min seguidas da etapa de amplificação com 40 ciclos de 95°C por 15 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 30 seg. Cada amostra foi analisada em triplicata. Os níveis de expressão gênica foi determinada utilizando o método de expressão relativa utilizando curva padrão, e a eficiência da reação foi considerada adequada quando estava entre 90-110 % e o valor de R quadrado foi superior a 0,98. Antes da análise dos genes alvos, relizou-se ensaio com genes endógenos como *18S rRNA*, *GAPDH*, *Tpb*, *β-actina*, *Hrpt1*, genes *Rpl13a* para identificar o melhor controle endógeno para o experimento em questão, utilizando o software geNorm. Com base neste ensaio, os níveis de expressão de genes alvo foram normalizados para o gene *GAPDH*. “Primers” foram desenhados utilizando a ferramenta de desenho de primers IDT, exceto para *18S rRNA* que foram baseados em WANG (2008). As sequências dos “primers” estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2: Sequência dos primers

Gene	Sequência	
	Sense	**Anti-sense**
Hrh1	5'-AGTCTGTGGCTGAGGGAGAT-3'	5'-TCCGCCGACAAGTATTCAGG-3'
Repin 1	5'- AGTCACTTGATTGCAGCGGA-3'	5'-AGTCAGTGCAGCTATGCAGG-3'
Pam	5'-AGTGTCCGTGGTTCTCATTAC-3'	5'-GACTCTTCCAGAACTTGACTCG-3'
Stra6	5'-GAGGACTCACAGGGCCAATC-3'	5'-GACTATGGCTTGGCGAGAGG-3'
Crkrs	5'-CTTGCTCGGCTCTATAACTCTG-3'	5'-ACCCACAGCTCCAAACATC-3'
Tlr1	5'-GCAAACCTTACCAGAGTGCC-3'	5'- GACCCTCAGTTTGGACAACAAG-3'
Gapdh	5'-TCTCTGCTCCTCCCTGTTCT-3'	5'-TACGGCCAAATCCGTTCACA-3'
Tbp	5'-CTTGACCTAAAGACCATTGCAC-3'	5'-CACACCATTTTCCCAGAACTG-3'
β-actin	5'-GCCAACCGTGAAAAGATGAC-3'	5'-CAGAGGCATACAGGGACAAC-3'
Hprt1	5'-GCCCTTGACTATAATGAGCACT-3'	5'-CCGCTGTCTTTTAGGCTTTG-3'
RPL13A	5'-GGGCAGGTTCTAGTATTGGATG-3'	5'-CCTCACAGCGTACAACCAC-3'

Análise estatística

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (SEM) e todas as análises foram conduzidas no programa ESTATÍSTICA 8.0 (Statsoft, EUA), com exceção das análises de microarray. Comparações múltiplas entre grupos foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) seguida de teste post hoc de Duncan, e as comparações entre dois grupos foram realizadas pelo teste *t* de Student. Para todas as análises de dados, $p \leq 0,05$ foi aplicado como limite de significância estatística. PCA foi também utilizada para a separação de possíveis "clusters" a partir do perfil lipídico das glândulas mamárias da prole feminina dos grupos CO, G e GL.

Resultados

Perfil lipídico do tecido mamário da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, G e GL

O perfil lipídico da glândula mamária claramente foi hábil em diferenciar a prole feminina do grupo GL em comparação aos grupos CO e G, como pode ser observado pela PCA (Figura 1). A diferenciação do grupo GL foi principalmente devido a influência dos seguintes ácidos graxos: ácidos graxos saturados (SFA) esteárico, mirístico, láurico, beénico, heneicosílico e pentadecílico; ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) meristoléico, *cis*-13-octadecenóico, heptadecenóico e oléico; ácidos graxos polinsaturados (PUFA) da série ômega-3 docosahexaenóico, eicosatrienóico, eicosapentaenóico e linolênico; PUFA da série ômega-6 araquidônico, linoleico, eicosadienóico; e ácido linoleico conjugado (CLA) 10-*trans*;12-*cis*-octadecenóico (Figura 1). Ainda, a pequena diferenciação entre a prole feminina do grupo G e CO é devida principalmente à influência dos ácidos graxos láurico, mirístico, heneicosílico, beénico, lignocérico e docosahexaenóico (Figura 1).

De acordo com a análise estatística por ANOVA, 15 ácidos graxos apresentaram concentrações diferentes nos tecidos mamários da prole feminina dos grupos CO, G e GL (Figura 2). Mais especificamente, comparado ao grupo CO, a prole feminina do grupo G apresentou maiores ($p \leq 0,05$) níveis de ácido araquidônico (ômega-6) e menores ($p \leq 0,05$) níveis de ácidos graxos láurico e mirístico (SFA) no tecido mamário. Ainda, comparado ao grupo CO, a prole feminina do grupo GL apresentou maiores ($p \leq 0,05$) níveis de esteárico (SFA), meristoléico, *cis*-10-heptadecenóico, *cis*-13-octadecenóico, oléico e eicosenóico (MUFA), homo-

γ-linolênico, linoleico, araquidônico e eicosadienóico (omega-6) e *trans*-10, *cis*-12-octadecenoic (CLA) e menores (p≤0,05) níveis dos ácidos graxos láurico, mirístico, heneicosílico e beénico (SFA) (Figura 2). Comparado ao grupo G, a prole feminina do grupo GL apresentou maiores (p≤0, 05) níveis de esteárico (SFA), meristoléico, *cis*-10-heptadecenóico, *cis*-13-octadecenóico e eicosenóico (MUFA), homo- γ -linolênico, linoléico e eicosadienóico (omega-6), e 10 *trans*,12 *cis*-octadecanóico (CLA) e menores (p≤0,05) níveis de ácidos graxos láurico e mirístico (SFA) (Figura 2).

a) b)

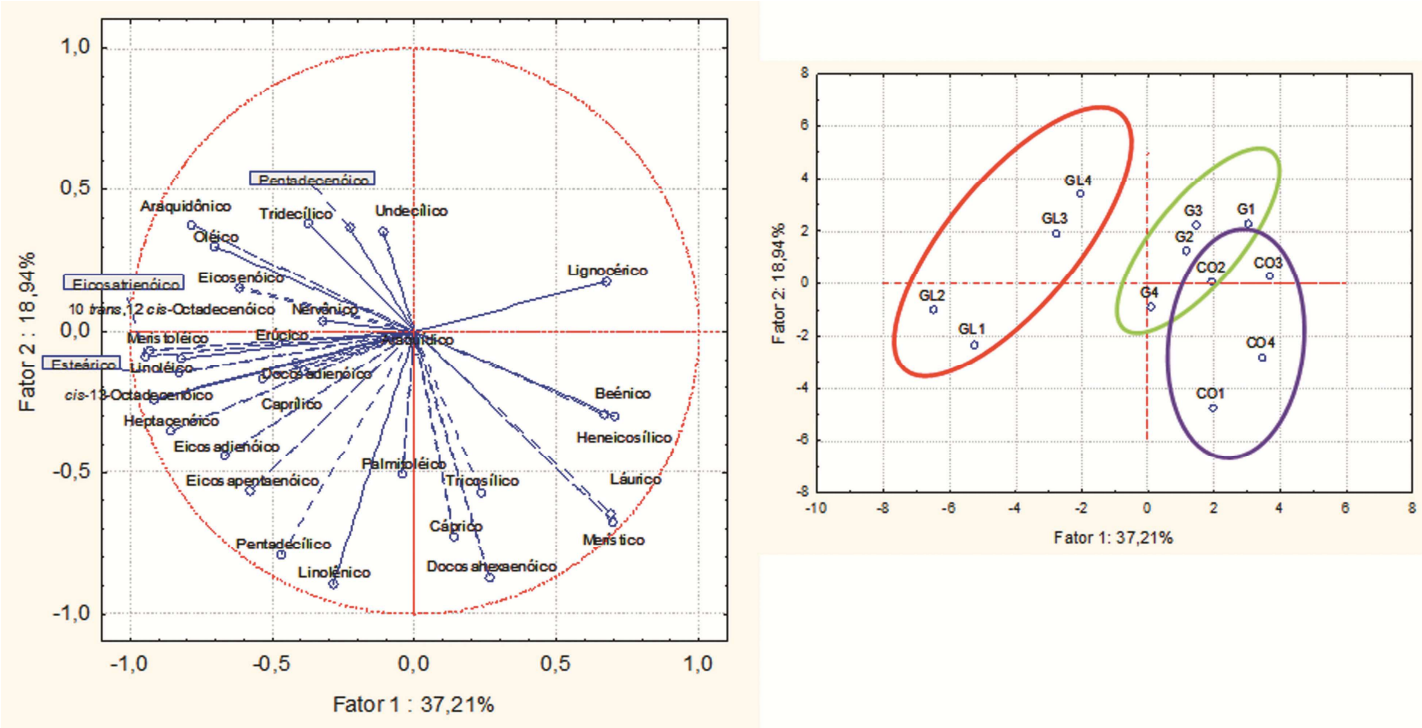


Figura 1: Análise de componentes principais (PCA) do perfil lipídico das glândulas mamárias da prole feminina dos grupos CO, G e GL . PCA por ácidos graxos (a) e por grupos (b). O primeiro componente principal (PC1) e PC2 foram responsáveis por 37,21% e 18,94% da variação, respectivamente.

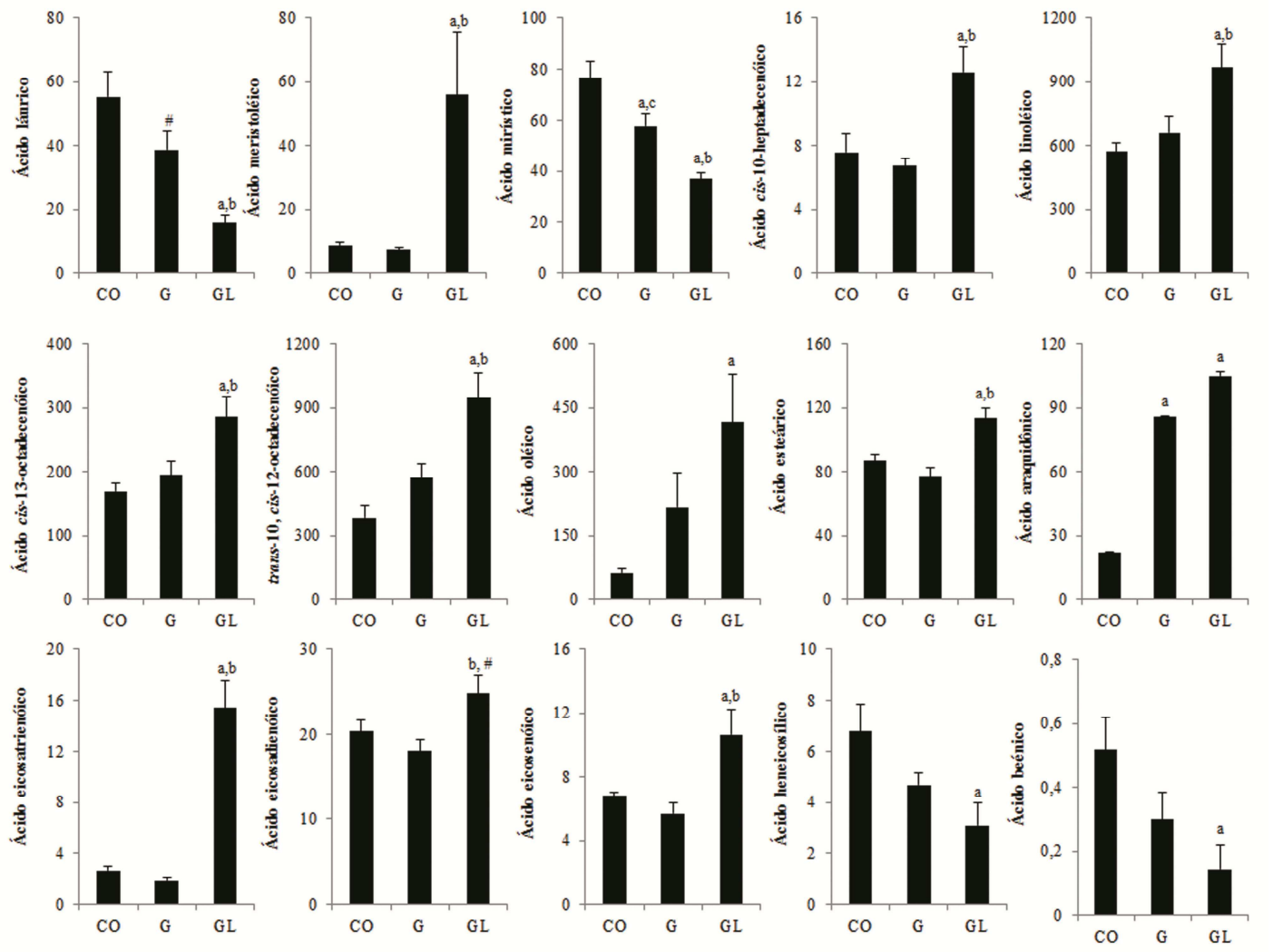


Figura 2: Perfil lipídico do tecido mamário da prole feminina com 7 semanas de idade dos grupos CO, G e GL. Os dados estão expressos como média ± SEM (n = 4). Diferença estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo [a]CO, [b]G e [c]GL. [#] Marginal (p =0,09) diferença em relação ao CO de acordo com ANOVA seguida pelo teste de Duncan.

Comparação da expressão gênica global do tecido mamário da prole feminina dos grupos CO e G

Nós identificamos 51 genes diferentemente expressos entre os tecidos mamários da prole feminina dos grupos CO e G (Figura 3). Comparado ao grupo CO, prole feminina do grupo G apresentou 25 genes com expressão reduzida e 26 genes com expressão aumentada. PCA dos

genes diferentemente expressos mostrou que o padrão de expressão gênica foi hábil em separar as amostras experimentais em dois clusters distintos, incluindo as amostras do grupo G (1° cluster) e amostras do grupo CO (2° cluster) (Figura 4). Os 20 genes mais diferentemente expressos estão envolvidos em vias de sinalização importantes que estão relacionadas com a carcinogênese como *replicação do DNA, morte e sobrevivência celular e devenvolvimento celular*. Ainda, genes envolvidos no *metabolismo de lipídeos* também apresentaram-se diferentemente expressos entre os grupos CO e G (Figura 5 e Anexo 1).

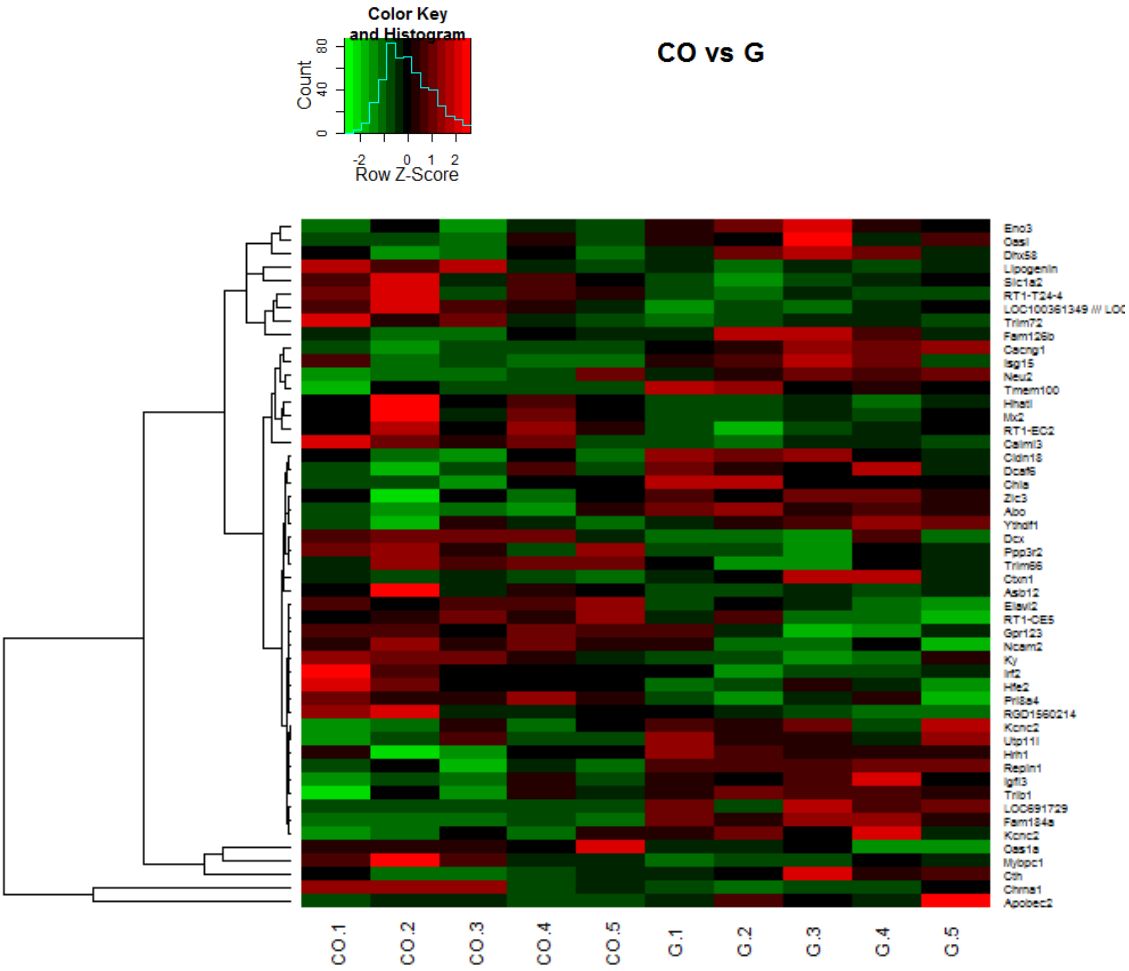


Figure 3: Genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e G. **"**Heat maps " mostrando score de expressão gênica individual somente para os genes que foram diferentemente expressos.

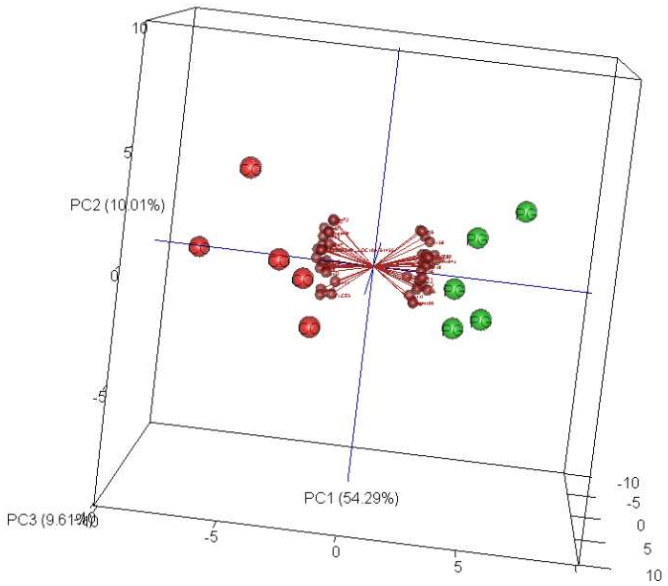


Figura 4: Genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e G.Análise de componentes principais dos genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupo CO e G. O perfil de expressão gênica foi capaz de discriminar dois "clusters" separando as amostras do grupo CO (vermelho) das amostras do grupo G (verde). O primeiro componente principal (PC1), PC2 e PC3 representam 54,29%, 10,01% e 9,61% da variação, respectivamente.

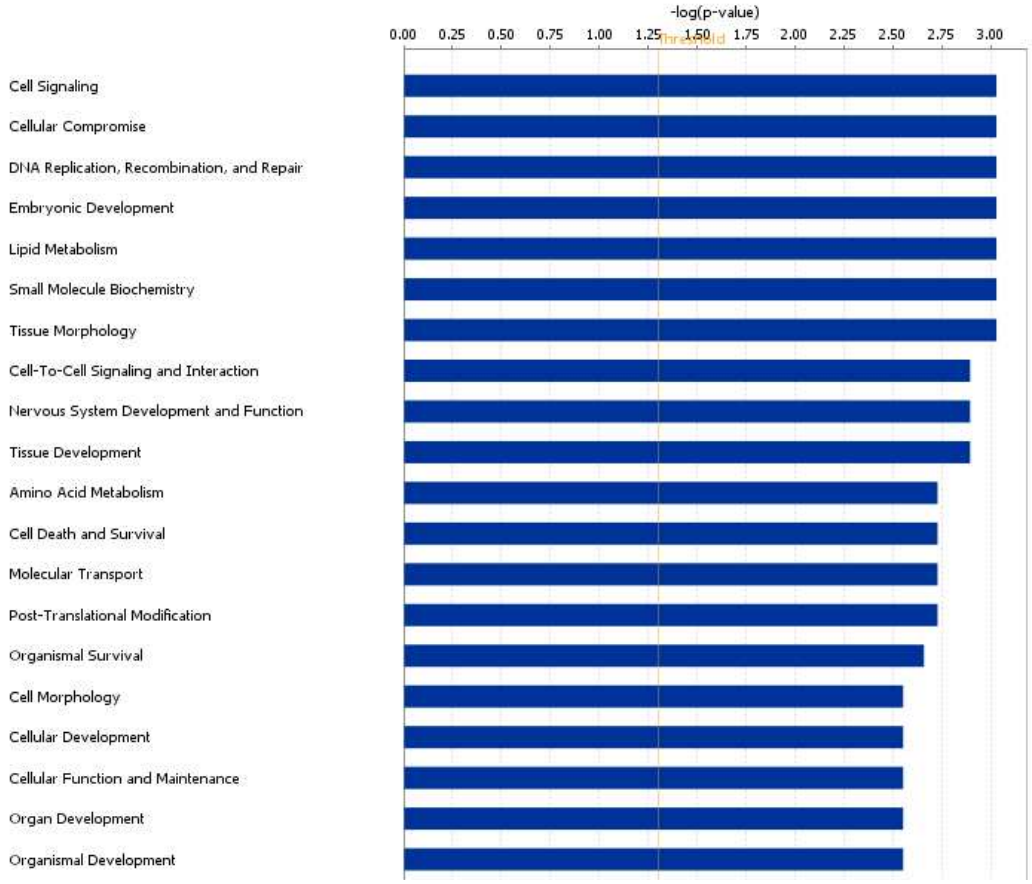


Figura 5: Análise biofuncional dos 20 genes mais diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e G.

Comparação da expressão gênica global do tecido mamário da prole feminina dos grupos CO e GL

Nós identificamos 101 genes diferentemente expressos entre os tecidos mamários da prole feminina dos grupos CO e GL (Figura 6). Comparado ao grupo CO, prole feminina do grupo GL apresentou 46 genes com expressão reduzida e 55 genes com expressão aumentada. PCA dos genes diferentemente expressos mostrou que o padrão de expressão gênica foi hábil em separar as amostras experimentais em dois clusters distintos, incluindo as amostras do grupo GL (1° cluster) e amostras do grupo CO (2° cluster) (Figura 7). Os 20 genes mais diferentemente expressos estão envolvidos em vias de sinalização importantes que estão relacionadas com a carcinogênese como *desenvolvimento de órgãos, desenvolvimento embrionário, desenvolvimento de tecidos e morte e sobrevivência celular*. Ainda, genes envolvidos *no metabolismo de lipídeos e carboidratos* também apresentaram-se diferentemente expressos entre os grupos CO e G (Figura 8 e Anexo 2).

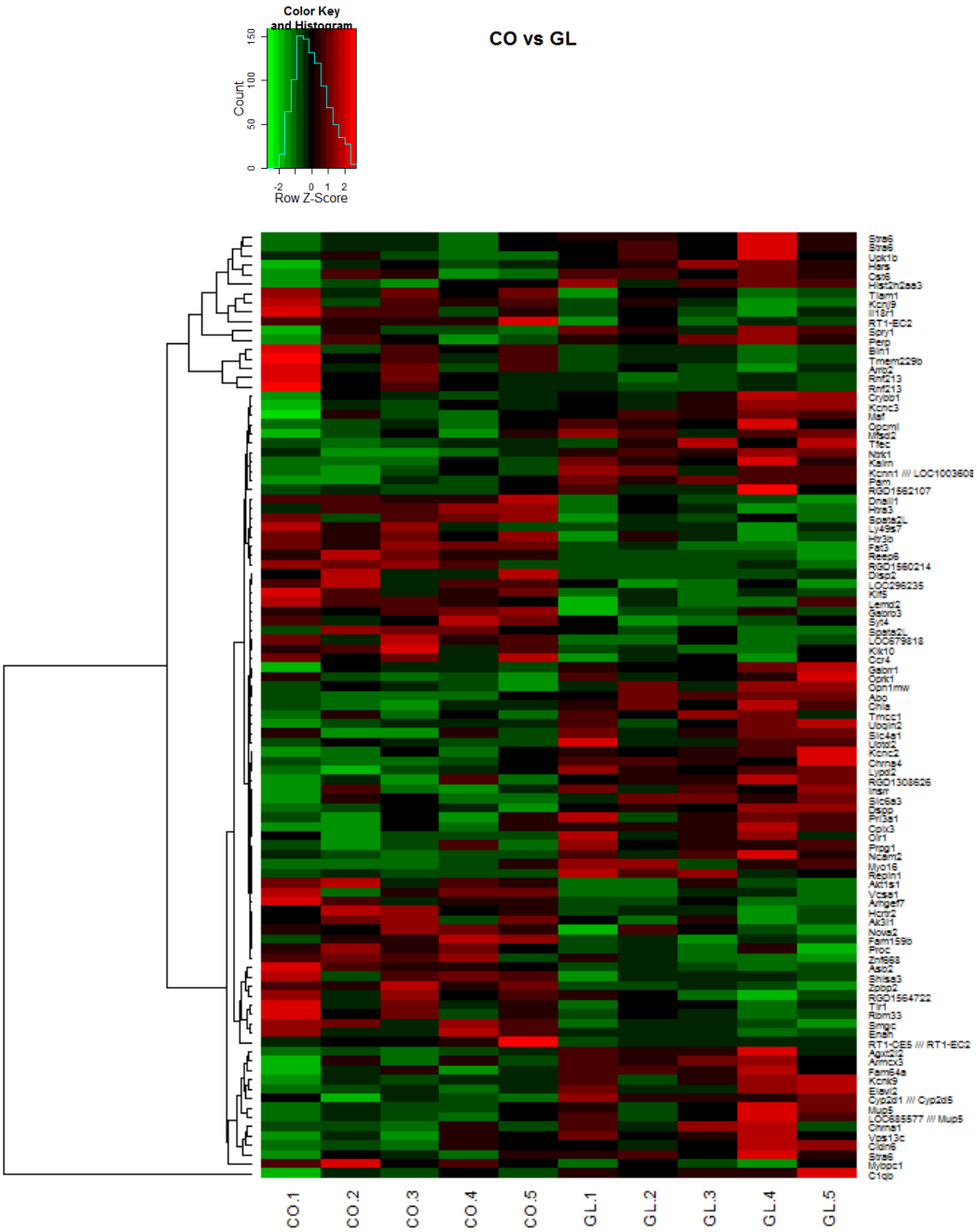


Figure 6: Genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e GL. **"**Heat maps " mostrando score de expressão gênica individual somente para os genes que foram diferentemente expressos.

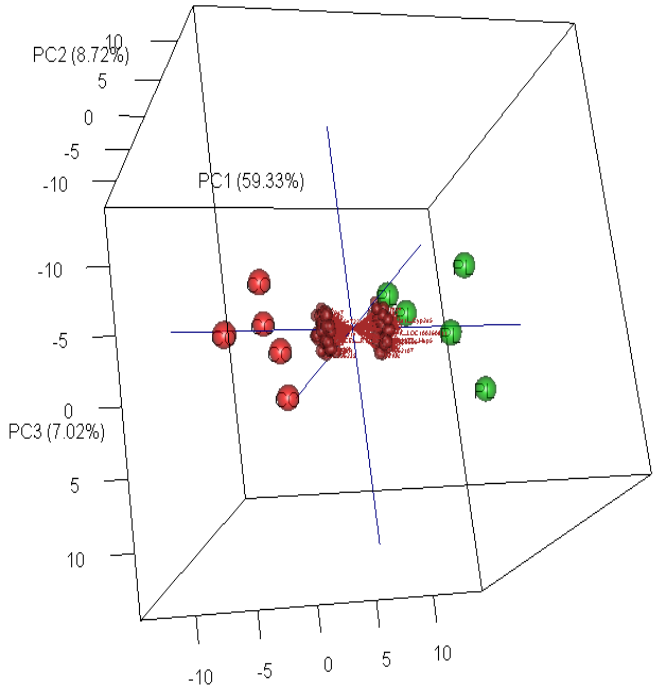


Figura 7: Genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e GL.Análise de componentes principais dos genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupo CO e GL. O perfil de expressão gênica foi capaz de discriminar dois "clusters" separando as amostras do grupo CO (vermelho) das amostras do grupo GL (verde). O primeiro componente principal (PC1), PC2 e PC3 representam 59,33%, 8,72% e 7,02% da variação, respectivamente.

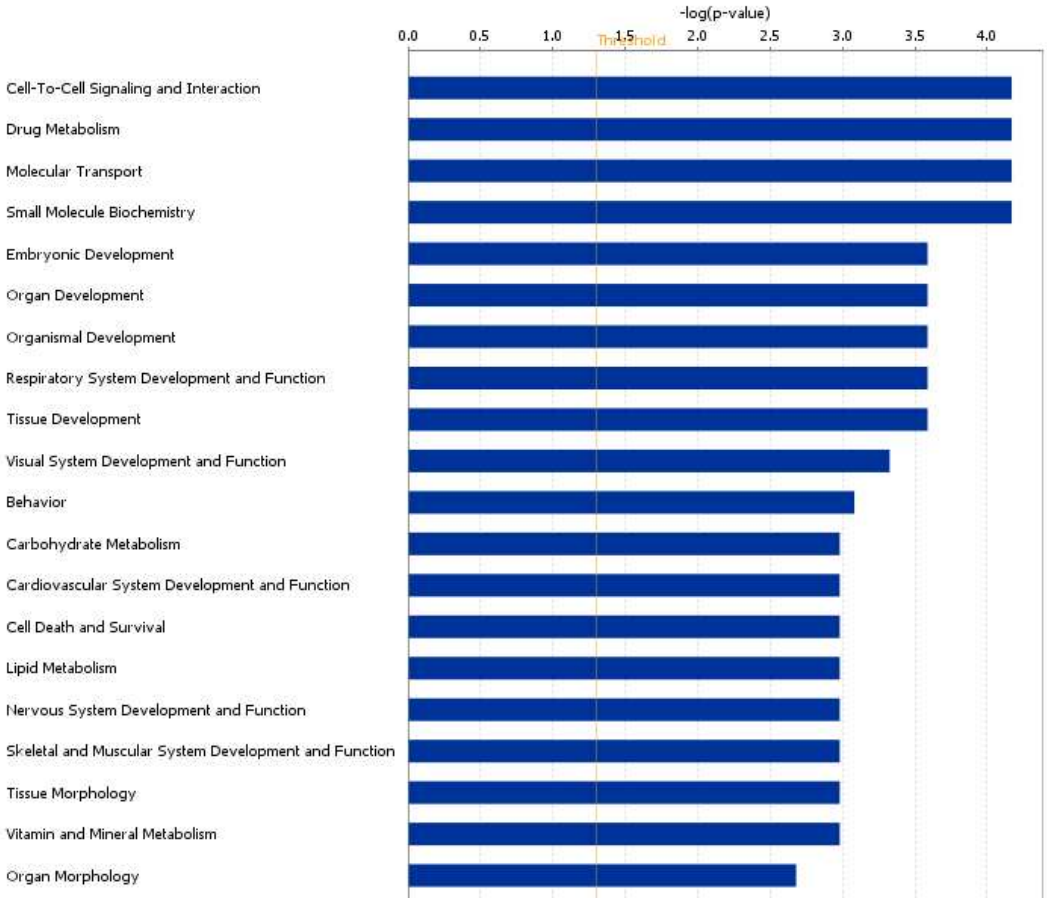


Figura 8: Análise biofuncional dos 20 genes mais diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e GL.

Comparação da expressão gênica global do tecido mamário da prole feminina dos grupos G e GL

Nós identificamos 100 genes diferentemente expressos entre os tecidos mamários da prole feminina dos grupos G e GL (Figura 9). Comparado ao grupo G, prole feminina do grupo GL apresentou 83 genes com expressão reduzida e 17 genes com expressão aumentada. PCA dos genes diferentemente expressos mostrou que o padrão de expressão gênica foi hábil em separar as amostras experimentais em dois clusters distintos, incluindo as amostras do grupo G (1° cluster) e amostras do grupo GL (2° cluster) (Figura 10). Os 20 genes mais diferentemente expressos estão envolvidos em vias de sinalização importantes que estão relacionadas com a carcinogênese como *câncer, morfologia tumoral e celular, crescimento celular e proliferação, morte e sobrevivência celular, replicação, recombinação e reparo do DNA*, entre outras. (Figura 11 e Anexo 3).

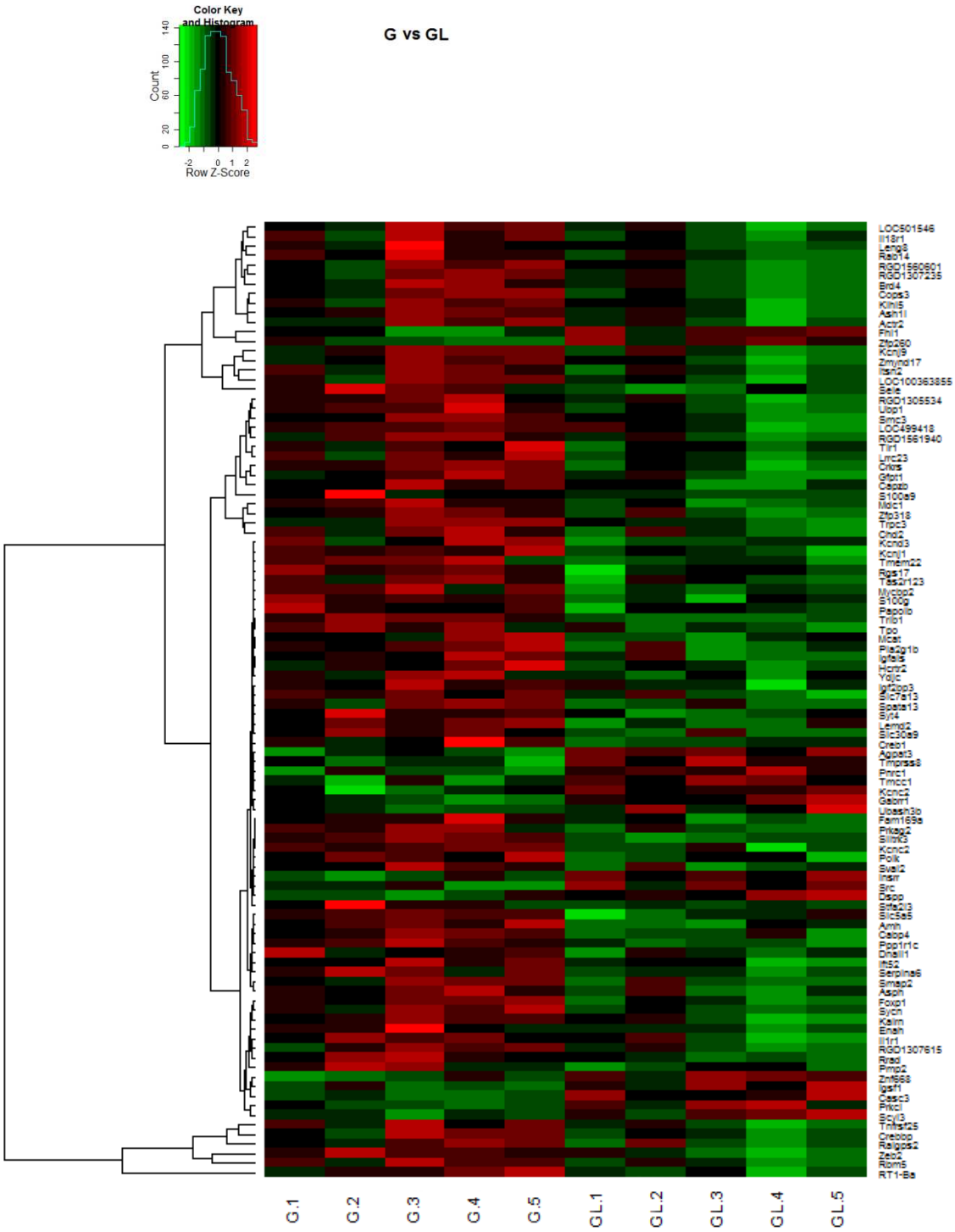


Figure 9: Genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos G e GL. **"**Heat maps " mostrando score de expressão gênica individual somente para os genes que foram diferentemente expressos.

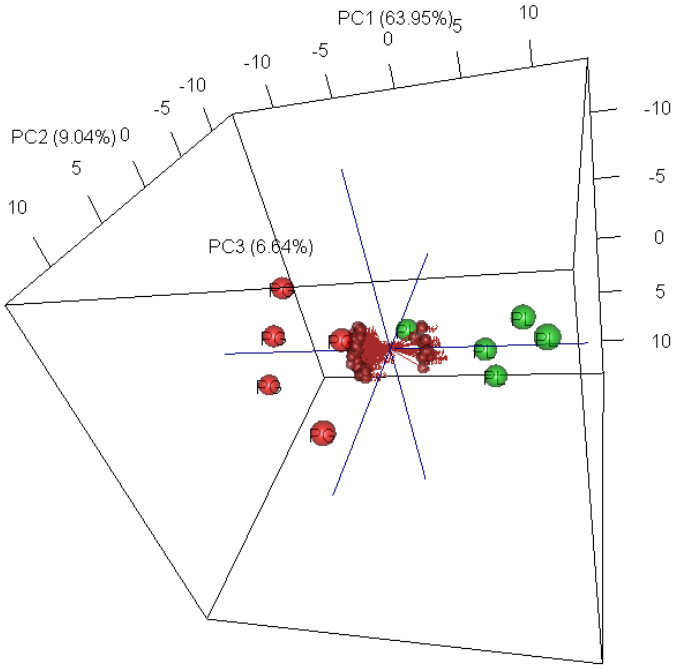


Figura 10: Genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos G e GL.Análise de componentes principais dos genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupo G e GL. O perfil de expressão gênica foi capaz de discriminar dois "clusters" separando as amostras do grupo G (vermelho) das amostras do grupo GL (verde). O primeiro componente principal (PC1), PC2 e PC3 representam 63,95%, 9,04% e 6,64% da variação, respectivamente.

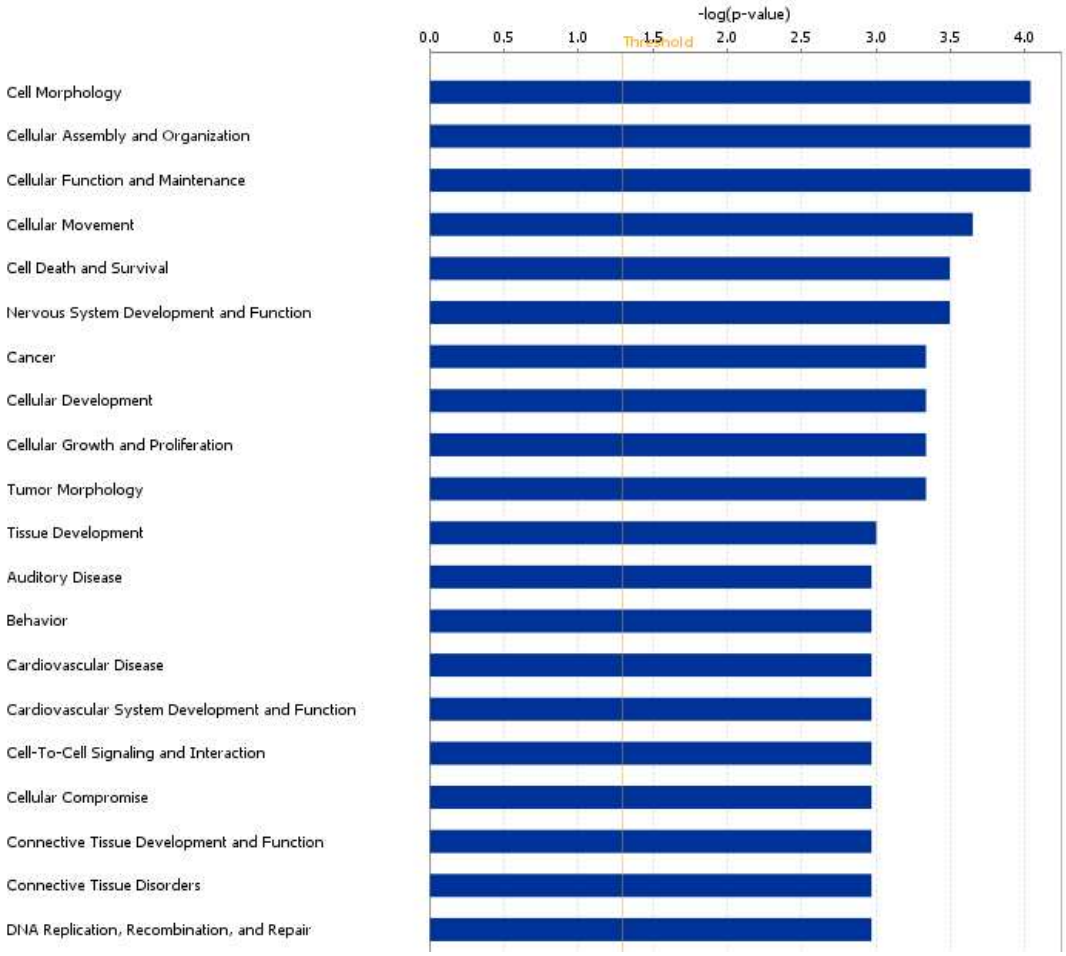


Figura 11: Análise biofuncional dos 20 genes mais diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos G e GL.

Análise de DDN para os genes diferentemente expressos entre os tecidos mamários da prole feminina dos grupos CO e G

Análise de DDN foi utilizada para detectar alterações topológicas estatisticamente significantes na rede transcricional entre os grupos CO e G (ZHANG et al., 2011a). De acordo com essa análise, houve mudanças na rede transcricional da prole feminina exposta à ração ATG durante o período intrauterino (grupo G) em comparação ao grupo CO (Figura 12a) consistindo de 7 conexões (conexões vermelhas) que existem somente no grupo CO e 9 conexões (conexões verdes) que existem somente no grupo G. Genes *Hrh1* e *Repin1* apresentaram aumento da expressão na glândula mamária da prole feminina do grupo G em comparação ao grupo CO (Figura 12b,c), os quais foram validados por PCR em tempo real (*Hrh1* p≤0,5; *Repin 1* p=0,08) (Figure 12b,c).

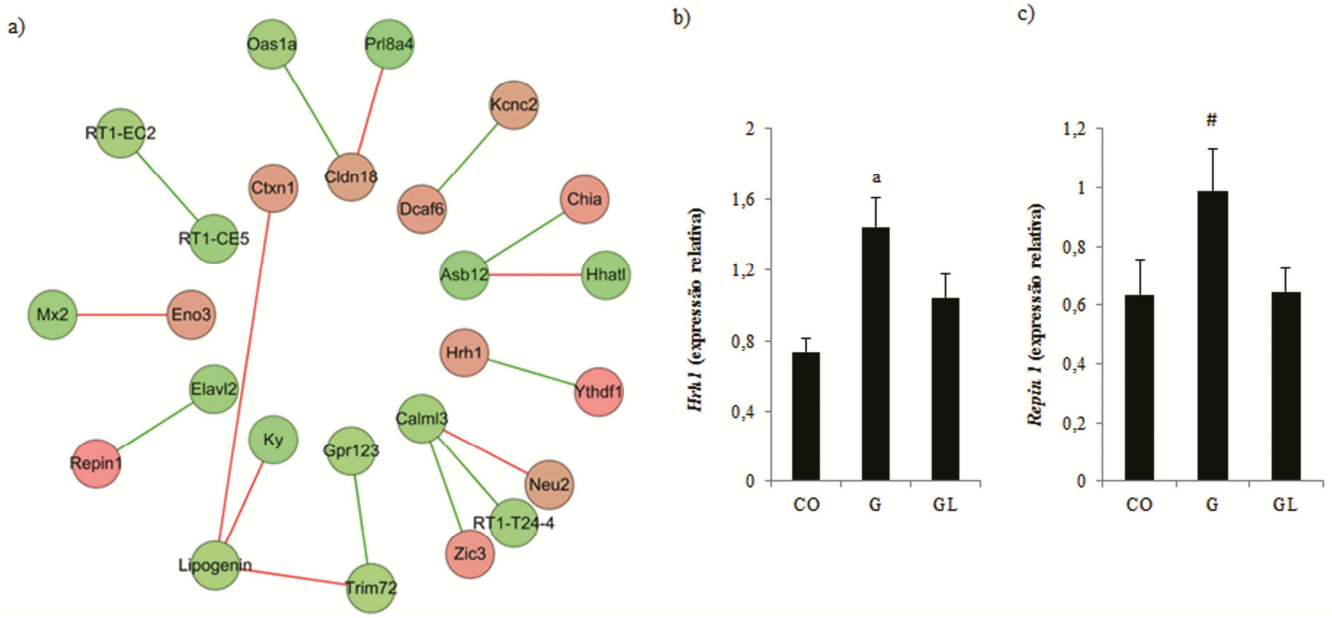


Figura 12: a) Análise de dependência de redes diferencial (DDN) de genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e G. Círculo verde significa que o gene é menos expresso e círculo vermelho significa que o gene é mais expresso no grupo G. Linhas de conecção indicam relação de regulação entre os genes. As linhas vermelhas e verdes representam as relações regulatórias que só existem sob a condição CO e G, respectivamente. Expressão relativa dos genes *Hrh1* (b), e *Repin 1* (c). Os dados estão expressos como média ± SEM (n=5). [a]Diferença estatisticamente significante (p ≤ 0,05) e [#]marginal (p = 0,084) diferença em relação ao grupo CO de acordo com ANOVA seguida pelo teste de Duncan.

Análise de DDN para os genes diferentemente expressos entre os tecidos mamários da prole feminina dos grupos CO e GL

De acordo com a análise de DDN, houve mudanças na rede transcricional da prole feminina exposta à ração ATG durante o período fetal e lactacional (grupo GL) em comparação ao grupo CO (Figura 13a) consistindo de 10 conexões (conexões vermelhas) que existem somente no grupo CO e 2 conexões (conexões verdes) que existem somente no grupo GL. Genes *Pam* e *Stra6* apresentaram aumento da expressão na glândula mamária da prole feminina do grupo GL em comparação ao grupo CO (Figura 13b,c). Apesar de os dois genes mostrarem maior expressão no grupo GL em comparação ao grupo CO por PCR em tempo real, somente *Stra6* alcançou diferença estatística (*Stra6* p≤0,5; *Pam* p=0,33) (Figure 13b,c).

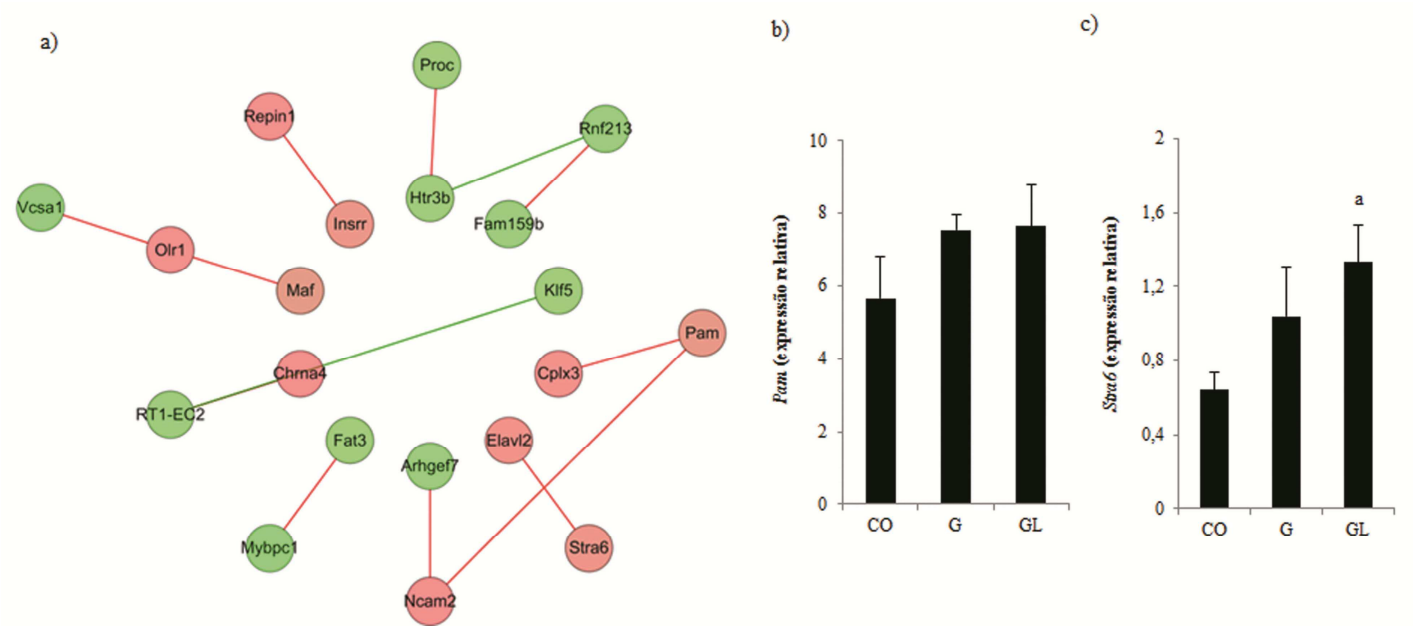


Figura 13: a) Análise de dependência de redes diferencial (DDN) de genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos CO e GL. Círculo verde significa que o gene é menos expresso e círculo vermelho significa que o gene é mais expresso no grupo GL. Linhas de conecção indicam relação de regulação entre os genes. As linhas vermelhas e verdes representam as relações regulatórias que só existem sob a condição do CO e GL, respectivamente. Expressão relativa dos genes *Pam* (b), e *Stra6* (c). Os dados estão expressos como média ± SEM (n = 5). [a]Diferença estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo CO de acordo com o teste *t* de Student.

Análise de DDN para os genes diferentemente expressos entre os tecidos mamários da prole feminina dos grupos G e GL

De acordo com a análise de DDN, houve mudanças na rede transcricional da prole feminina exposta à ração ATG durante o período fetal e lactacional (grupo GL) em comparação ao grupo exposto a essa ração somente no período fetal (grupo G) (Figura 14a) consistindo de 3 conexões (conexões vermelhas) que existem somente no grupo G e 6 conexões (conexões verdes) que existem somente no grupo GL. Genes *Crkrs* e *Tlr1* apresentaram menor expressão na glândula mamária da prole feminina do grupo GL em comparação ao grupo G (Figura 14a). Apesar de os dois genes mostrarem menor expressão no grupo GL em comparação ao grupo G por PCR em tempo real, somente *Crkrs* alcançou diferença estatística comparado ao grupo G (*Crkrs* p≤0.5; *Tlr1* p=0.1) (Figura 14b, c). Entretanto, a expressão de *Tlr1* foi significantemente menor (p≤0,5) no grupo GL em comparação ao grupo CO (Figura 14c).

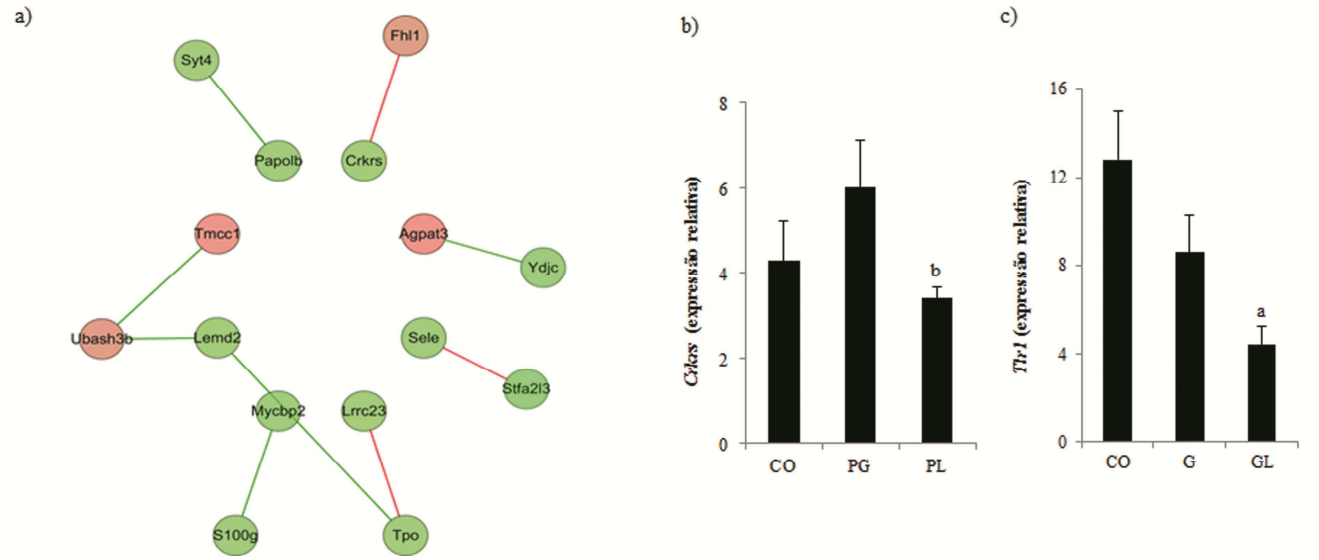


Figura 14: a) Análise de dependência de redes diferencial (DDN) de genes diferentemente expressos entre a prole feminina dos grupos G e GL. Círculo verde significa que o gene é menos expresso e círculo vermelho significa que o gene é mais expresso no grupo GL. Linhas de conecção indicam relação de regulação entre os genes. As linhas vermelhas e verdes representam as relações regulatórias que só existem sob a condição do G e GL, respectivamente. Expressão relativa dos genes *Crkrs* (b) e *Tlr1* (c). Os dados estão expressos como média ± SEM (n=5). Diferença estatisticamente significante (p ≤ 0,05) em relação ao grupo [a]CO e [b]G de acordo com ANOVA seguida de teste de Duncan.

Discussão

Nós observamos previamente que o alto consumo materno de gordura animal durante a gestação e durante a gestação e lactação reduziu a suscetibilidade da prole feminina ao desenvolvimento de câncer de mama (ANDRADE et al., 2014). No presente estudo nós aplicamos ferramentas de lipidômica e nutrigenônica para melhor esclarecer os resultados inesperados. De acordo com os dados obtidos, diferenças significantes foram observadas quanto ao perfil de ácidos graxos e padrão de expressão gênica no tecido mamário da prole feminina exposta à ração com alto teor de gordura animal durante períodos precoces da vida, especialmente quando essa exposição foi durante o período fetal e lactacional.

O desenvolvimento de câncer de mama envolve alterações no metabolismo de ácidos graxos (BAKKER et al., 1997; BOUGNOUX et al., 2008). Perfil lipídico alterado no soro ou tecido adiposo mamário têm sido relatado em pacientes com câncer de mama e têm sido considerado potencial biomarcador de risco e prognóstico (LV & YANG, 2012). Embora os efeitos do consumo de lipídeos materno na programação do câncer de mama têm sido descritos, não há informação na literatura quanto ao impacto desse tipo de intervenção no perfil de ácidos graxos da glândula mamária da prole submetida à programação. Dessa forma, o presente estudo avaliou o perfil de ácidos graxos no tecido mamário da prole feminina exposta à ração ATG em períodos precoces da vida pela técnica de CG/EM que é amplamente aplicada como ferramenta de estudo de metabolômica. Essa ferramenta permite o melhor entendimento do impacto dos ácidos graxos em sistemas biológicos em relação aos mecanismos de ação (LV & YANG, 2012).

De acordo com os nossos resultados, exposição à ração ATG especificamente durante a gestação promoveu pequenos efeitos no perfil de ácidos graxos da glândula mamária da prole

feminina, enquanto que exposição à ração ATG durante a gestação e lactação promoveu significantes alterações no perfil de ácidos graxos da prole. As principais alterações envolveram a redução da concentração de alguns SFA (exceto para ácido esteárico) e aumento das concentrações de n-6 PUFA, MUFA e CLA. Embora alguns estudos clínicos associaram o aumento de SFA no soro e tecido adiposo com maior risco de câncer de mama (BAKKER et al., 1997; PETREK et al., 1997; LV & YANG, 2012), outros não observaram essa associação (KLEIN et al., 2000; PALA et al., 2001), ou observaram efeitos protetores (BOUGNOUX et al., 1992; MAILLARD et al., 2002). O aumento dos níveis de n-6 PUFA nos tecidos mamários foi inesperado, já que essa classe de ácidos graxos é associado com o aumento do risco de câncer de mama. Total n-6 PUFA no soro e tecido adiposo foi positivamente associado com esta doença (SIMONSEN et al., 1998; LV & YANG, 2012). Análise específica do tecido adiposo de mama mostrou que maior concentração de ácidos linoléico e araquidônico aumentaram o risco de desenvolvimento de câncer de mama (MAILLARD et al., 2002; BOUGNOUX et al., 2008). Em adição, consumo materno de óleo de milho, fonte de n-6 PUFA, durante a gestação, aumentou a suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária (HILAKIVI-CLARKE et al., 1997).

Os níveis aumentados de MUFA (oléico, *cis*-10-hectadecenóico, *cis*-13-octadecenóico e eicosenóico) e CLA *trans*-10, *cis*-12-octadecenóico podem estar associados com o efeito da exposição, nos período precoces da vida, à ração ATG na programação da menor suscetibilidade à carcinogênese mamária na vida adulta. Ácido oléico é o principal componente da dieta mediterrânea, o qual tem sido associado com efeito protetor contra o câncer de mama (BOCCA et al., 2010; ESCRICH et al., 2011; HEINZE & ACTIS, 2012). Resultados de estudo clínico mostram que concentração elevada de ácido oléico no tecido adiposo da mama foi associada com menor risco para o desenvolvimento da doença (MAILLARD et al, 2002). No contexto de

programação do câncer de mama, consumo de ração à base de óleo de oliva por 5 semanas antes da gestação e durante a gestação e lactação reduziu o desenvolvimento de câncer de mama induzido quimicamente na prole (STARK *et al*., 2009). Poucos dados estão disponíveis na literatura em relação aos outros MUFAs. Em um estudo, ácido eicosenóico apresentou potencial efeitos anti-inflamatórios em macrófagos (PEREIRA et al., 2014). Por outro lado,o ácido graxo *trans*-10, *cis*-12-octadecenóico representa um agente quimiopreventivo promissor contra o câncer de mama e seus efeitos têm sido observados em modelos *in vitro* e *in vivo* (KELLEY et al., 2007). Seus mecanismos de ação incluem indução de apoptose e modulação da via de sinalização do receptor de estrógeno α (KELLEY et al., 2007; BOCCA et al., 2010)

Poucos estudos até o momento avaliaram os efeitos da nutrição na vida precoce no padrão de expressão gênica global na vida adulta, especialmente no contexto de programação do câncer de mama. Exposição à ração rica em gordura (à base de manteiga, óleo de oliva ou óleo de cártamo; 39% de energia proveniente de gordura) no período intra-uterino e até 50 dias de vida pós-natal significantemente alterou a expressão gênica na glândula mamária de ratas adultas (por exemplo: Ciclina B1 e Ciclina A2) e essa alteração foi associada com aumento da proliferação celular, um biomarcador do risco de câncer de mama (MEDVEDOVIC et al. 2009). Filhotes de ratos alimentados com ração com baixo (16% de energia provinientes de gordura) ou alto (39% energia provinientes de gordura) teor de n-3PUFA durante o período pré-pubertal (dias 5-25 pós-natal), apresentou redução e aumento da carcinogênese mamária quimicamente induzida, respectivamente (OLIVO & HILAKIVI-CLARKE et al, 2005). Esses efeitos foram associados com aumento da expressão de genes antioxidantes incluindo tiorredoxina e heme oxigenase e redução da expressão de genes de reparo do DNA como BRCA1 nas glândulas

mamárias de ratas exposta à ração com baixo e alto teor de n-3 PUFA, respectivamente (OLIVO-MARSTON et al., 2008).

Análise de DDN é uma ferramenta útil para detectar mudanças topológicas significantes na rede transcricional sob diferentes condições, podendo dessa forma auxiliar no entendimento da patogênese do câncer de mama (Zhang et al., 2011). No presente estudo, alterações na expressão gênica foram avaliadas nos tecidos mamários normais, antes da indução da carcinogênese mamária, sugerindo que os resultados obtidos poderia ter papel na predição da suscetibilidade a essa doença mais tarde na vida. Genes selecionados a partir da análise de DDN incluem: *Hrh1*, *Repin1*, *Stra6*, *Pam*, *Crkrs* e *Tlr1*.

Os genes *Hrh1* e *Repin1* apresentaram maior expressão na glândula mamária de ratas expostas à ração ATG durante o período fetal em comparação à ratas do grupo controle. *Hrh1* é um receptor de histamina que pertence à superfamília de receptores acoplados a proteína G e é o principal mediador das reações de histamina (MIZUGUCHI et al., 2011). Em humanos *Hrh1* localiza-se no cromossomo 3p junto com diversos genes supressores de tumor e o aumento de sua expressão foi associado com inibição da capacidade tumorigênica de células de câncer de ovário (OV90) (CODY et al., 2007). Aumento da expressão de *Hrh1* nas glândulas mamárias da prole feminina exposta à ração ATG *in utero* comparado ao controle poderia estar associado com a menor suscetibilidade ao câncer de mama na vida adulta. Iniciador de replicação 1 (*Repin 1*) codifica uma proteína que contém sítios de ligação ao DNA com estrutura de dedos de zinco, a qual foi descoberta como proteína de 60kDa da região de iniciação da replicação (RIP60) (RUSCHKE et al., 2010; KLOTING et al., 2007). *Repin 1* regula a expressão de genes envolvidos na adipogênese, formação e fusão de “lipid droplet”, e transporte de glicose e ácidos

graxos nos adipócitos (RUSCHKE et al., 2010). Entretanto não há informação quanto as ações de *Repin1* no contexto do câncer de mama.

Os genes *Stra6* e *Pam* apresentaram maior expressão e *Tlr1* menor expressão nas glândulas mamárias de ratas expostas à ração ATG durante o período fetal e lactacional comparado a animais do grupo controle. *Stra6* é um gene induzido por ácido retinóico que codifica um receptor celular para proteína de ligação ao retinol permitindo sua internalização para o meio intracelular e está associado com ações anti-câncer dos retinóides (CARRERA et al., 2013). A expressão de Stra6 pode ser aumentada por dano no DNA e participa da indução de morte celular por p53 (CARRERA et al., 2013). Assim, aumento da expressão de *Stra6* nas glândulas mamárias de ratas expostas à ração ATG durante o período fetal e lactacional pode estar associado com a menor multiplicidade de tumores mamários observados nesse grupo (ANDRADE et al., 2014). Peptilglicina mono-oxigenase α-amidado (PAM) é uma enzima dependente de cobre, com função chave na modificação de peptídeos secretados através da α-amidação na região C-terminal (CZYZYK et al., 2005). Expressão de PAM foi observada em linhagens de células de câncer de mama como MCF-7 e ZR-75-1 sugerindo que esta enzima poderia participar na ativação de fatores de crescimento promovendo sinais de proliferação autócrinos e parácrinos (DU et al., 2001). A maior expressão de *Pam* nas glândulas mamárias de ratas expostas à ração ATG durante o período fetal e lactacional poderia ter prevenido este grupo de alcançar a mesma proteção contra o câncer de mama observada no grupo exposto somente durante o período fetal (ANDRADE et al. 2014).

Tlr1 codifica uma proteína que é membro da família dos receptores Toll-like (TLR) (TAKEDA et al., 2003) os quais são usualmente liberados durante processos de estresse celular e são considerados como padrão molecular associado ao dano, participando de processos como

proliferação celular, sobrevivência, apoptose, angiogênese, remodelamento e reparo tecidual (KUTIKHIN, 2011). Dependendo do contexto genes *Tlr* podem estar associados com proteção contra o câncer ou promoção do câncer (ZHANG et al., 2011b; KUTIKHIN, 2011; PRADERE et al., 2013). Interessantemente dimerização de TLR3 com TLR1 é ativada por SFA, mas inibida por PUFA (LEE et al., 2004). A alteração do perfil lipídico nas glândulas mamárias dos animais expostos à ração ATG durante períodos precoces da vida poderia ter mediado a redução da expressão de *Tlr1*.

O gene *Crkrs* apresentou redução da expressão na glândula mamária de ratas que foram expostas à ração ATG durante o período fetal e lactacional comparada àquelas que foram expostas à ração somente durante o período fetal. Crkrs ou quinase dependente de ciclina CDK12 forma um complexo com a ciclina K que regula a expressão de genes de resposta ao DNA como BRCA1, protegendo, assim, as células da instabilidade genômica (Blazek et al. 2011). Em linhagens de células de câncer de mama, o silenciamento de *Crkrs* promoveu resistência à terapia endócrina com o tamoxifeno (Iorns et al., 2009). Esse dado pode explicar, parcialmente, porque a contínua exposição à ração ATG até o período lactacional promoveu menor proteção contra o câncer de mama comparado com a exposição somente durante o período fetal.

Com os resultados obtidos neste estudo nós concluímos que exposição à ração com alto teor de gordura animal a base de banha durante períodos precoces da vida altera o lipidoma e o transcriptoma da glândula mamária da prole feminina no período de puberdade (7 semanas de vida) e essas alterações no perfil de ácidos graxos e no padrão de expressão gênica global poderiam estar associados com a redução da suscetibilidade ao câncer de mama na vida adulta observada previamente (ANDRADE et al.,2014). Ainda, o período específico de exposição

promove impactos diferentes no organismo, reforçando o conceito de diferentes janelas de susceptibilidade durante o desenvolvimento. Finalmente, o papel dos genes que foram diferentemente expressos após a exposição à ração ATG durante os períodos precoces da vida não são claramente envolvidos no processo de carcinogênese mamária e deverão ser melhor elucidados em estudos futuros.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) com bolsas de estudos (processos: 2010/11742-0 e 2012/03330-9) e projeto auxílio (processo: 2011/23259-4).

Referências

ALEXANDER, D.D. et al. A review and meta-analysis of red and processed meat consumption and breast cancer. **Nutrition research reviews**, Cambridge, v. 23, p. 349-65, 2010a.

ALEXANDER, D.D. et al. Summary and meta-analysis of prospective studies of animal fat intake and breast cancer. **Nutrition research reviews**, Cambridge, v. 23, n.1, p. 169-79, 2010b.

ANDRADE, F.O. et al. Exposure to lard-based high-fat diet during fetal and lactation periods modifies breast cancer susceptibility in adulthood in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry** (Aceito para publicação).

BAKKER, N.; VAN'T VEER, P.; ZOCK, P.L. Adipose fatty acids and cancers of the breast, prostate and colon: an ecological study. EURAMIC Study Group. International Journal of Cancer, Geneva, v. 72, n.4, p.587-91, 1997.

BOCCA, C. et al.CLA reduces breast cancer cell growth and invasion through ERalpha and PI3K/Akt pathways. **Chemico-biological interactions**, Amsterdam, v.183, n.1, p. 187-93, 2010.

BOUGNOUX, P. et al. Prognostic significance of tumor phosphatidylcholine stearic acid level in breast carcinoma. **Breast cancer research and treatment**, Boston, v. 20, n.3, p. 185-94,1992.

BOUGNOUX, P.; HAJJAJI, N.; COUET, C. The lipidome as a composite biomarker of the modifiable part of the risk of breast cancer. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, Edinburgh, v.79, n.3-5, p.93-6, 2008.

BOYD, B.F. et al. Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature. **British Journal of Cancer**, v. 89, p. 1672 – 1685, 2003.

BLAZEK, D. et al.The Cyclin K/Cdk12 complex maintains genomic stability via regulation of expression of DNA damage response genes. **Genes & development**, v. 25, n.20, p. 2158-72, 2011.

CARRERA S et al. Stra6, a retinoic acid-responsive gene, participates in p53-induced apoptosis after DNA damage. **Cell death and differentiation**, Londres, v. 20, n.7, p.910-9, 2013.

CHO, E. et al. Premenopausal fat intake and risk of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 95, n.14, p. 1079-85, 2003.

CODY, N.A. et al. Transfer of chromosome 3 fragments suppresses tumorigenicity of an ovarian cancer cell line monoallelic for chromosome 3p. **Oncogene**, v.26, n.4, p. 618-32, 2007.

CZYZYK, T.A. et al. Deletion of peptide amidation enzymatic activity leads to edema and embryonic lethality in the mouse. **Developmental biology**, Nova York, v.287, n.,2, p.301-13, 2005.

De DE ASSIS, S.; KHAN, G.; HILAKIVI-CLARKE, L. High birth weight increases mammary tumorigenesis in rats. **International journal of cancer**, Geneva, v. 119, n.7, p. 1537-46, 2006.

De DE ASSIS, S. et al. High-fat or ethinyl-oestradiol intake during pregnancy increases mammary cancer risk in several generations of offspring. **Nature Communication**, v.3, n.1053, 2012.

DU, J. ET AL.; KEEGAN, B.P.; NORTH, W.G. Key peptide processing enzymes are expressed by breast cancer cells. **Cancer Letter**, v.165, n.2, p. 211-8, 2001.

ESCRICH, E. et al. Modularoty effects and molecular mechanisms of olive oil and other dietary lipids in breast cancer. **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 17, n.8, p. 813-30, 2011.

FREEDMAN, L.S.; CLIFFORD, C.; MESSINA, M. Analysis of dietary fat, calories, body weight, and the development of mammary tumors in rats and mice: a review. **Cancer Research**, v. 50, n.18, p. 5710-9, 1990.

GONZALEZ, C.A.; RIBOLI, E. Diet and cancer prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. **European journal of cancer**, Nova York, v. 46, n.14, p. 2555-62, 2010.

HEINZE, V.M.;, ACTIS, A.B. Dietary conjugated linoleic acid and long-chain n=3 fatty acids in mammary and prostate cancer protection: a review. **International journal of food sciences and nutrition**, Basingstoke, v. 63, n.1, p. 66-78, 2012.

HILAKIVI-CLARKE, L. et al. A maternal diet high in n - 6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 94, n. 17, p. 9372-7, 1997.

HILAKIVI-CLARKE, L. Nutritional modulation of terminal end buds: its relevance to breast cancer prevention. **Current cancer drug targets**, Hilversum, v. 7, n.5, p. 465-74, 2007.

ICHIHARA, K.; FUKUBAYASHI, Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. **Journal of Lipid Research**, v.51, p.635-640, 2010.

ION, G.; AKINSETE, J.A; HARDMAN, W.E. Maternal consumption of canola oil suppressed mammary gland tumorigenesis in C3(1)Tag mice offispring. **BMC Cancer**, v.6, n.81, p.1-12, 2010.

IORNS, E. et al. CRK7 modifies the MAPK pathway and influences the response to endocrine Therapy.Carcinogenesis, v.30, n.10, p. 1696-701, 2009.

KELLEY, N.S.; HUBBARD, N.E.; ERICKSON, K.L. Conjugated linoleic acid isomers and cancer. **The Journal of nutrition**, v. 137, n.12, p. 2599-607, 2007.

KEY TJ et al.Dietary fat and breast cancer: comparison of results from food diaries and food-frequency questionnaires in the UK Dietary Cohort Consortium. **The American journal of clinical nutrition**, Bethesda, v.94, n.4, p. 1043-52, 2011.

KLEIN, V. et al. Low alpha-linolenic acid content of adipose breast tissue is associated with an increased risk of breast cancer. **European journal of cancer**, Oxford, v.36, n.3, p. 335-40, 2000.

KLÖTING, N.; WILKE, B.; KLÖTING, I. Triplet repeat in the Repin1 3'-untranslated region on rat chromosome 4 correlates with facets of the metabolic syndrome. **Diabetes/metabolism research and reviews, v. 23**, n.5, p.406-10, 2007.

KUTIKHIN, A.G. Association of polymorphisms in TLR genes and in genes of the Toll-like receptor signaling pathway withcancer risk. **Human immunology**, Nova York, v.72, n.11,p. 1095-116, 2011.

LEE, J.Y. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor-2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 279, n.17, p. 16971-9, 2004.

LÖF, M. et al. Dietary fat and breast cancer risk in the Swedish women's lifestyle and health cohort. **British journal of cancer**, Londres, v. 97, n.11, p.1570-6, 2007.

LV, W.; YANG, T. Identification of possible biomarkers for breast cancer from free fatty acid profiles determined by GC-MS and multivariate statistical analysis. **Clinical biochemistry**, Toronto, v. 45, n.1-2, 127-33, 2012.

MABASA, L. et al. Maternal dietary canola oil suppresses growth of mammary carcinogenesis in female rat offspring. **Nutrition and Cancer**, v. 65, n.5, p.695-701, 2013.

MAILLARD, V. et al. N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France. **International journal of cancer**, Geneva, v.98, n.1, p.78-83, 2002.

MEDVEDOVIC, M. et al. Influence of fatty acid diets on gene expression in rat mammary epithelial cells. **Physiological genomics**, Bethesda, v.38, n.1, p.80-8, 2009.

MIZUGUCHI, H. Involvement of protein kinase Cdelta/extracellular signal-regulated kinase/poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) signaling pathway in histamine-induced up-regulation of histamine H1 receptor gene expression in HeLa cells. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 286, n.35, p. 30542-51, 2011.

OLIVO, S.E.; HILAKIVI-CLARKE, L. Opposing effects of prepubertal low- and high-fat n-3 polyunsaturated fatty acid diets on rat mammary tumorigenesis. **Carcinogenesis**, v. 26, n.9, p. 1563-72, 2005.

OLIVO-MARSTON, S.E. et al. Gene signaling pathways mediating the opposite effects of prepubertal low-fat and high-fat n-3polynsaturated fatty acid diets on mammary cancer risk. **Cancer prevention research**, Filadélfia, v.1, n.7, p.532-45, 2008.

PALA, V. et al. Erythrocyte membrane fatty acids and subsequent breast cancer: a prospective Italian study. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.93, p. 1088–1095, 2001.

PAQUET, C.; PROPSTING, S.L.; DANIEL, M. Total n-3 fatty acid and SFA intakes in relation to insulin resistance in a Canadian First Nation at risk for the development of type 2 diabetes. **Public health nutrition**, Wallingford, 2013. Mar 21:1-5. [Epub ahead of print]

PARK, S.Y. et al. Dietary fat and breast cancer in postmenopausal women according to ethnicity and hormone receptor status: the Multiethnic Cohort Study. **Cancer prevention research**, Filadélfia, v.5, p. 216-28, 2012.

PEREIRA, D.M. et al. Anti-inflammatory effect of unsaturated fatty acids and Ergosta-7,22-dien-3-ol from Marthasterias glacialis: prevention of CHOP-mediated ER-stress and NF-κB activation. **PLoS One**, v. 9, n.2, p.e88341, 2014.

PETREK, J.A. et al. Fatty acid composition of adipose tissue, an indication of dietary fatty acids and breast cancer prognosis. **Journal of clinical oncology**, Nova York, v. 15, n.4, p. 1377-84, 1997.

PRADERE, J.P.; DAPITO, D.H.; SCHWABE, R.F. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. **Oncogene**. 2013 Aug 12. [Epub ahead of print]

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of nutrition,** v. 123, n.11, p. 1939-51, 1993.

RUSCHKE, K. et al. Repin 1 maybe involved in the regulation of cell size and glucose transport in adipocyte. **Biochemical and biophysical research communications**, Nova York, v.400, n.2, p.246-51, 2010.

SALTER A.M. Dietary fatty acids and cardiovascular disease. **Animal,** v. 7 Suppl 1, p. 163-71, 2013.

SIMONSEN, N. et al. Adipose tissue omega-3 and omega-6 fatty acid content and breast cancer in the EURAMIC study. European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Breast Cancer. **American journal of epidemiology**, Baltimore, v. 147, n.4, p. 342-52, 1998.

STARK, A.H. et al. Olive Oil Consumption During Pregnancy and Lactation in Rats Influences Mammary Cancer Development in Female Offspring. **Nutrition and Cancer**, v.46, n.1, p.59–65, 2009.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual review of immunology**, v. 21, p. 335-76, 2003.

VADIVELOO, M. et al. Trends in dietary fat and high-fat food intakes from 1991 to 2008 in the Framingham Heart Study participants. **The British journal of nutrition, Cambridge, v. 19, p.1-11**, 2013.

WANG, J. et al. Dietary fat, cooking fat, and breast cancer risk in a multiethnic population. **Nutrition and Cancer**, v. 60, n.4, p. 492-504, 2008.

WOLMARANS, P. Background paper on global trends in food production, intake and composition. **Annals of nutrition & metabolism**, Nova York, v. 55, n.1-3, p. 244-72, 2009.

ZHANG, B. et al. DDN: a caBIG® analytical tool for differential network analysis. **Bioinformatics**, v. 27, n.7, p. 1036-8, 2011.a

ZHANG, Y. et al. TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. The Journal of immunology, Baltimore, v. 186, n.4, p. 1963-9, 2011b.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo confirmou a hipótese de que exposições dietéticas em períodos precoces da vida influenciam o risco de desenvolvimento de câncer de mama na vida adulta. Porém, diferente do esperado, exposição a altos níveis de gordura animal (banha) durante os períodos fetal e lactacional, parece reduzir a suscetibilidade à carcinogênese mamária na vida adulta. Ainda, deve-se levar em consideração a janela de desenvolvimento na qual o individuo está sendo exposto a uma determinada alteração alimentar, visto que a modulação da suscetibilidade às doenças podem diferir dependendo do período de exposição. Como observado neste trabalho, o risco de desenvolver o câncer de mama foi diferente para ratas que foram expostas à ração ATG somente durante a gestação e durante a gestação e lactação. Observou-se que a prole feminina exposta à ração ATG somente durante o período fetal apresentou redução de todos os parâmetros de carcinogênese mamária como menor incidência, multiplicidade e peso dos tumores comparado ao grupo controle e maior latência de aparecimento do primeiro tumor comparado a prole feminina exposta à ração durante o período fetal e lactacional. Por outro lado, a prole feminina exposta à ração ATG durante o período fetal e lactacional apresentou redução somente da multiplicidade.

Com base na teoria das "respostas adaptativas preditivas", na qual propõe-se que o feto faça adaptações, *in útero* ou períodos precoces da vida, baseado no ambiente pós-natal predito (ARMITAGE; TAYLOR; POSTON, 2005), supõe-se que a ração com alto teor de gordura animal poderia ter promovido adaptações que favoreceram a menor suscetibilidade ao câncer de mama na vida adulta. Sugerimos que os mecanismos envolvidos nessa proteção envolvem a modulação da morfologia e perfil lipídico da glândula mamária, redução da proliferação celular e aumento dos níveis protéicos de reguladores do ciclo celular como p21 e p27, modulação de

marcas epigenéticas como H3K9me3, modulação da expressão gênica global com alteração de redes de sinalização, bem como regulação de vias de sinalização específicas como RANK/RANKL/NFκB. Porém esses mecanismos são dependentes do tempo e período de exposição.

Apesar de efeitos protetores contra o câncer de mama terem sido observados na prole, não é aconselhável que mães durante a gestação consuma altos níveis de banha, já que diversos outros estudos demonstraram que esse padrão alimentar está associado com maior risco de doenças cardiovasculares e disfunções metabólicas na prole (KHAN et al., 2003; TAYLOR et al., 2004; ARMITAGE; TAYLOR; POSTON, 2005). Por outro lado, sugere-se que o perfil e quantidade de específicos ácido graxos devem ser considerados em estudos futuros para a determinação da dieta adequada para gestantes e lactantes.

9. ANEXOS

Anexo 1: Top 20 genes differently expressed between CO and G groups

Probeset	Gene Symbol	**Description**	Fold-Change	*p*value	Gene Ontology term
1386920_x_at	Prl8a4	prolactin family 8, subfamily a, member 4	-177.2308	0.009904	biological_process, hormone activity, receptor binding
1391429_at	Hfe2	hemochromatosis type 2	-42.99594	0.031843	BMP signaling pathway, iron ion homeostasis, positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, coreceptor activity, protein binding
1391784_at	Repin1	replication initiator 1	18.42767	0.002795	DNA replication, regulation of fatty acid transport, regulation of glucoseimport in response to insulin stimulus, metal ion binding, DNA binding
1374989_at	Asb12	ankyrin repeat and SOCS box-containing 12	-9.637769	0.029026	intracellular signal transduction, molecular_function
1371492_at	Apobec2	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2	3.817093	0.034074	DNA demethylation, mRNA modification, mRNA processing, catalytic activity, hydrolase activity, metal ion binding, zinc ion binding
1384734_at	Ncam2	neural cell adhesion molecule 2	-3.417476	0.01753	cell adhesion, locus ceruleus development, midbrain development, multicellular organismal development, noradrenergic neuron differentiation, parasympathetic nervous system development, positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, regulation of respiratory gaseous exchange, regulation of transcription, DNA-dependent, somatic motor neuron differentiation, sympathetic nervous system development, DNA binding,
1386907_at	Eno3	enolase 3, beta, muscle	3.091933	0.011265	Glycolysis, phosphopyruvate hydratase complex, lyase activity, magnesium ion binding, metal ion binding, phosphopyruvate hydratase activity, protein heterodimerization activity, protein homodimerization activity
1389694_at	Ky	kyphoscoliosis peptidase	-2.745841	0.012212	muscle organ development,

					neuromuscular junction development, proteolysis, hydrolase activity, peptidase activity
1385524_at	Fam184a	family with sequence similarity 184, member A	2.648402	5.83E-05	biological_process, molecular_function
1370558_a_at	Kcnc2	potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 2	2.478329	0.037454	potassium ion transmembrane transport, protein homooligomerization, regulation of action potential, voltage-gated potassium channel complex, delayed rectifier potassium channel activity
1369693_a_at	Slc1a2	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	-2.14904	0.033694	adult behavior, amino acid transmembrane transport, cellular response to extracellular stimulus, D-aspartate import, dicarboxylic acid transport, L-amino acid transport, L-glutamate import, multicellular organismal aging, multicellular organism growth, nervous system development, positive regulation of glucose import, response to amino acid stimulus, response to drug, response to light stimulus, response to wounding, sodium ion transmembrane transport, telencephalon development, visual behavior, sodium:dicarboxylate symporter activity
1383413_at	Hhatl	hedgehog acyltransferase-like	-2.138653	0.024508	negative regulation of N-terminal protein palmitoylation, protein binding
1379215_at	Ythdf1	YTH domain family, member 1	2.128898	0.021887	biological_process, molecular_function
1369202_at	Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2	-2.077149	0.035171	defense response to virus, GTP catabolic process, innate immune response, negative regulation of viral genome replication, response to type I interferon, response to virus, GTPase activity, GTP binding, nucleotide binding
1385277_x_at	Dhx58	DEXH (Asp-Glu-X-His) box polypeptide 58	2.019419	0.018201	defense response to virus, innate immune response, negative regulation of innate immune response, negative regulation of MDA-5 signaling pathway,

					negative regulation of RIG-I signaling pathway, negative regulation of type I interferon production, positive regulation of MDA-5 signaling pathway, positive regulation of RIG-I signaling pathway, positive regulation of type I interferon production, regulation of innate immune response, ATP binding, DNA binding, double-stranded RNA binding, helicase activity, hydrolase activity, acting on acid anhydrides, metal ion binding, nucleic acid binding, RNA binding
1386518_at	Irf2	interferon regulatory factor 2	-2.003309	0.043785	regulation of transcription, DNA-dependent, focal adhesion, DNA binding, regulatory region DNA binding, sequence-specific DNA binding transcription factor activity
1374248_at	Mybpc1	myosin binding protein C, slow type	-2.001699	0.045512	muscle contraction, cytoskeleton, structural constituent of cytoskeleton
1384836_at	Calml3	calmodulin-like 3	-1.957229	0.01437	biological_process, calcium ion binding, metal ion binding
1382314_at	Isg15	ISG15 ubiquitin-like modifier	1.955133	0.031591	defense response to bacterium, defense response to virus, ISG15-protein conjugation, modification-dependent protein catabolic process, negative regulation of protein ubiquitination, negative regulation of viral genome replication, positive regulation of erythrocyte differentiation, regulation of interferon-gamma production, response to type I interferon
1382453_at	Zic3	Zic family member 3	1.9409	0.035828	anterior/posterior pattern specification, cell differentiation, determination of digestive tract left/right asymmetry, determination of left/right asymmetry in nervous system, determination of left/right symmetry, heart looping, lung development, multicellular organismal development,

					nervous system development, pattern specification process, positive regulation of transcription, DNA-dependent, positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, DNA binding, metal ion binding, nucleic acid binding, protein binding, sequence-specific DNA binding transcription factor activity

Anexo 2: Top 20 genes differently expressed between CO and GL groups

Probeset	Gene Symbol	Description	Fold-Change	*P*value	Gene Ontology term
1391784_at	Repin1	replication initiator 1	14.40881	0.005474	DNA replication, regulation of fatty acid transport, regulation of glucose import in response to insulin stimulus, DNA binding, metal ion binding, nucleic acid binding
1369114_at	Vcsa1	variable coding sequence A1	-5.83391	0.030522	No information
1388040_a_at	Myo16	myosin XVI	4.096838	0.023722	negative regulation of cell proliferation, negative regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle, neuron projection morphogenesis, phosphatidylinositol 3-kinase cascade, myosin complex, perinuclear region of cytoplasm, actin binding, ATP binding, motor activity, nucleotide binding, protein complex binding
1375766_at	Akt1s1	AKT1 substrate 1 (proline-rich)	-3.852792	0.010428	negative regulation of cell size, negative regulation of protein kinase activity, negative regulation of TOR signaling cascade, neurotrophin TRK receptor signaling pathway, Notch signaling pathway, regulation of neuron apoptotic process, protein complex, TORC1 complex
1384734_at	Ncam2	neural cell adhesion molecule 2	3.527913	0.006864	cell adhesion, locus ceruleus development, midbrain development, multicellular organismal development, noradrenergic neuron differentiation, parasympathetic nervous system development, positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, regulation of respiratory gaseous exchange, regulation of transcription, DNA-dependent, somatic motor neuron differentiation, sympathetic nervous system development, DNA binding,
1368602_at	Slc6a3	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 3	3.266895	0.009794	adenohypophysis development, dopamine biosynthetic process, dopamine catabolic process, dopamine transport, lactation, locomotory behavior, monoamine transport, neurotransmitter transport, positive regulation of multicellular organism growth, prepulse inhibition, regulation of dopamine metabolic process, response to cAMP, response to cocaine, response to ethanol, sensory perception of smell, transmembrane transport,

					dopamine:sodium symporter activity, dopamine transmembrane transporter activity, drug binding, monoamine transmembrane transporter activity, protease binding,neurotransmitter:sodium symporter activity, receptor binding
1368683_at	Olr1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	2.866539	0.026619	cell adhesion, cell death, inflammatory response, leukocyte cell-cell adhesion, lipoprotein metabolic process, extracellular region, extrinsic to plasma membrane, carbohydrate binding, low-density lipoprotein receptor activity
1374248_at	Mybpc1	myosin binding protein C, slow type	-2.765163	0.023335	muscle contraction, cytoskeleton, structural constituent of cytoskeleton
1368744_a_at	Dspp	dentin sialophosphoprotein	2.546896	0.008069	biomineral tissue development, cellular response to cell-matrix adhesion, extracellular matrix, extracellular region, proteinaceous extracellular matrix
1369252_a_at	Chrna4	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 4 (neuronal)	2.542725	0.005586	B cell activation, behavioral response to nicotine, calcium ion transport, cation transport, cognition, DNA repair, exploration behavior, ion transmembrane transport, locomotory behavior, membrane depolarization, neurological system process, protein heterooligomerization, regulation of action potential, regulation of dopamine secretion, regulation of inhibitory postsynaptic membrane potential, regulation of membrane potential, respiratory gaseous exchange, response to hypoxia, response to nicotine, response to oxidative stress, sensory perception of pain, signal transduction, synaptic transmission, cholinergic, acetylcholine-gated channel complex, cell junction, dendrite, external side of plasma membrane, integral to membrane, neuronal cell body, postsynaptic membrane, acetylcholine-activated cation-selective channel activity, acetylcholine binding, acetylcholine receptor activity, drug binding, extracellular ligand-gated ion channel activity, ion channel activity, protein binding
1384779_at	Cplx3	complexin 3	2.357024	0.01236	Exocytosis, insulin secretion, neurotransmitter transport, regulation of neurotransmitter secretion, synaptic vesicle exocytosis, transmembrane transport, cell junction, cytosol, synapse, neurotransmitter transporter

					activity, SNARE binding, syntaxin binding
1370782_a_at	Prpg1	proline-rich proteoglycan 1	2.355862	0.024722	No information
1375702_at	Arhgef7	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	-2.250503	0.019401	intracellular signal transduction, lamellipodium assembly, nervous system development, positive regulation of apoptotic process, positive regulation of GTPase activity, regulation of Rho protein signal transduction, cell junction, cell projection, cytoplasm, neuronal cell body, neuron projection, protein complex, guanyl-nucleotide exchange factor activity, phospholipid binding, protein binding, protein kinase binding, Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity
1381677_at	Elavl2	ELAV like neuron-specific RNA binding protein 2	2.233142	0.007706	nucleic acid binding, RNA binding
1396164_at	Znf668	zinc finger protein 668	2.228238	0.026435	regulation of transcription, DNA-dependent, transcription, DNA-dependent, nucleus, DNA binding, metal ion binding, nucleic acid binding
1381318_at	Chia	chitinase, acidic	2.201731	0.00414	apoptotic process, carbohydrate metabolic process, chitin catabolic process, inflammatory response, metabolic process, polysaccharide catabolic process, positive regulation of chemokine secretion, production of molecular mediator involved in inflammatory response, cytoplasm, extracellular region,extracellular space, catalytic activity, chitinase activity, chitin binding, hydrolase activity, acting on glycosyl bonds, hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds, kinase binding
1373514_at	Rnf213	ring finger protein 213	2.199512	0.013735	Cytoplasm, ATP binding, ligase activity, metal ion binding, nucleoside-triphosphatase activity, nucleotide binding, nucleotide binding, zinc ion binding
1369280_at	Kcnk9	potassium channel, subfamily K, member 9	2.162206	0.046972	cellular response to hypoxia, ion transmembrane transport, potassium ion transmembrane transport, reduction of cytosolic calcium ion concentration, regulation of ion transmembrane transport, response to drug, integral to membrane, plasma membrane, open rectifier potassium channel activity, potassium channel activity, protein C-terminus binding, protein heterodimerization activity, protein homodimerization activity, voltage-

					gated ion channel activity, ion transport, potassium ion transmembrane transport, regulation of ion transmembrane transport, synaptic vesicle, potassium channel activity, voltage-gated ion channel activity
1384564_at	Fam159b	family with sequence similarity 159, member B	-2.077167	0.02886	biological_process, integral to membrane, molecular_function
1385475_a_at	Stra6	stimulated by retinoic acid 6	2.072532	0.01337	adrenal gland development, alveolar primary septum development, artery morphogenesis, blood vessel development, cognition, developmental growth,diaphragm development, digestive tract morphogenesis, ductus arteriosus closure, ear development, embryonic camera-type eye formation, embryonic digestive tract development, eyelid development in camera-type eye, face morphogenesis, feeding behavior, female genitalia development, head development, head morphogenesis, heart development, kidney development, learning, lung development, neuromuscular process, nose morphogenesis, paramesonephric duct development, positive regulation of behavior, pulmonary artery morphogenesis, pulmonary valve morphogenesis, smooth muscle tissue development, transport, uterus morphogenesis, ventricular septum development, vocal learning, integral to membrane, protein complex, receptor activity, vitamin transporter activity

Anexo 3: Top 20 genes differently expressed between G and GL groups

Probeset	Gene Symbol	Description	Fold-Change	*p*value	Gene Ontology term
1398649_at	Slitrk3	SLIT and NTRK-like family, member 3	-3.215364	7.45E-05	Axonogenesis, integral to membrane, molecular_function
1369515_s_at	Insrr	insulin receptor-related receptor	2.667702	0.010781	actin cytoskeleton reorganization, cellular response to alkalinity, cellular response to alkalinity, male sex determination, phosphorylation, protein autophosphorylation, protein phosphorylation, transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway, integral to membrane, ATP binding, insulin receptor substrate binding, kinase activity, nucleotide binding, phosphatidylinositol 3-kinase binding, protein kinase activity, protein tyrosine kinase activity, transferase activity, transferase activity, transferring phosphorus-containing groups, transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity
1387125_at	S100a9	S100 calcium binding protein A9	-2.462473	0.01727	actin cytoskeleton reorganization, activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process, apoptotic process, autophagy,chemotaxis, inflammatory response, innate immune response, leukocyte chemotaxis, leukocyte migration involved in inflammatory response, neutrophil aggregation, neutrophil chemotaxis, positive regulation of inflammatory response, positive regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway, regulation of integrin biosynthetic process, cytoplasm, cytoskeleton, extracellular region, membrane, nucleus, antioxidant activity, calcium ion binding, metal ion binding
1385678_at	Polk	polymerase (DNA directed) kappa	-2.447941	0.018499	DNA repair, DNA replication, metabolic process, nucleotide-excision repair, DNA gap filling, response to DNA damage stimulus, nucleus, damaged DNA binding, DNA binding, DNA-directed DNA polymerase activity, metal ion binding, nucleotidyltransferase activity, transferase activity, cell cycle, cell division, DNA replication, mitosis, response to drug, nucleus, DNA binding, DNA-directed DNA polymerase activity, metal ion binding, nucleotidyltransferase activity, transferase activity
1381046_at	Asph	aspartate-beta-hydroxylase	-2.317992	0.023007	activation of cysteine-type endopeptidase activity, activation of store-operated calcium channel activity, calcium ion transmembrane transport, cellular response to calcium ion, face morphogenesis, limb morphogenesis,

					negative regulation of cell proliferation, oxidation-reduction process, palate development, pattern specification process, peptidyl-amino acid modification, peptidyl-aspartic acid hydroxylation, positive regulation of calcium ion transport into cytosol, positive regulation of intracellular protein transport, positive regulation of proteolysis, positive regulation of transcription, DNA-dependent, regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium-release channel activity, regulation of protein depolymerization, regulation of protein stability, response to ATP, cortical endoplasmic reticulum, cytoplasm, integral to endoplasmic reticulum membrane, integral to membrane, calcium ion binding, oxidoreductase activity, oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen, incorporation of two atoms of oxygen, protein binding
1391204_at	Smap2	small ArfGAP2	-2.281372	0.032942	extracellular matrix organization, positive regulation of cell-substrate adhesion, signal transduction, basement membrane, extracellular matrix, interstitial matrix, proteinaceous extracellular matrix, calcium ion binding, glycosaminoglycan binding, heparin binding, metal ion binding, regulation of ARF GTPase activity, cytoplasm, nucleus, ARF GTPase activator activity, GTPase activator activity, metal ion binding, zinc ion binding, chromatin modification, histone H2A acetylation, histone H4 acetylation, regulation of growth, regulation of transcription, DNA-dependent, transcription, DNA-dependent, mitochondrion, NuA4 histone acetyltransferase complex,molecular_function
1387352_at	Src	v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog	2.236486	0.046873	activation of protein kinase B activity, adherens junction organization, bone resorption, branching involved in mammary gland duct morphogenesis, cell adhesion, cell cycle, cell migration, cell proliferation, cellular response to progesterone stimulus, forebrain development, intracellular protein kinase cascade, negative regulation of anoikis, negative regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process, negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway, negative regulation of focal adhesion assembly, negative regulation of intrinsic apoptotic signaling pathway, negative regulation of protein homooligomerization, negative

					regulation of transcription, DNA-dependent, neurotrophin TRK receptor signaling pathway, oogenesis, peptidyl-serine phosphorylation, peptidyl-tyrosine phosphorylation, positive regulation of apoptotic process, positive regulation of canonical Wnt receptor signaling pathway, positive regulation of cell adhesion, positive regulation of cyclin-dependent protein kinase activity, positive regulation of cytokine secretion, positive regulation of DNA biosynthetic process, positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade, positive regulation of gene expression, positive regulation of glucose metabolic process, positive regulation of insulin receptor signaling pathway, positive regulation of intracellular protein kinase cascade, positive regulation of MAP kinase activity, positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity, positive regulation of podosome assembly, positive regulation of protein autophosphorylation, positive regulation of protein kinase B signaling cascade,positive regulation of protein transport, positive regulation of smooth muscle cell migration, positive regulation of transcription, DNA-dependent, progesterone receptor signaling pathway, protein autophosphorylation, protein phosphorylation, regulation of intracellular estrogen receptor signaling pathway, regulation of protein binding, response to interleukin-1, transcytosis, uterus development, caveola, cytoplasm, cytoskeleton, late endosome, lysosome, membrane, mitochondrial inner membrane, mitochondrion, neuron projection, nucleus, postsynaptic density, ATP binding, cell adhesion molecule binding, enzyme binding, ephrin receptor binding, estrogen receptor binding, heme binding, identical protein binding, insulin receptor binding, ion channel binding, kinase activity, non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity, nucleotide binding, phosphoprotein binding, protein binding, protein complex binding, protein C-terminus binding, protein domain specific binding, protein kinase activity, protein kinase C binding, protein tyrosine kinase activity, receptor binding, SH2 domain binding, transferase activity, transferase activity, transferring phosphorus-containing groups
1375835_at	Prkag2	protein kinase, AMP-	-2.151184	0.012987	fatty acid biosynthetic process, fatty acid

		activated, gamma 2 non-catalytic subunit			metabolic process, glycogen metabolic process, intracellular protein kinase cascade, lipid metabolic process, negative regulation of protein kinase activity, phosphorylation, positive regulation of peptidyl-threonine phosphorylation, positive regulation of protein kinase activity, protein phosphorylation, regulation of catalytic activity, regulation of fatty acid metabolic process, regulation of glycolysis, AMP-activated protein kinase complex, adenyl nucleotide binding, ADP binding, AMP-activated protein kinase activity, AMP binding, ATP binding, cAMP-dependent protein kinase inhibitor activity, cAMP-dependent protein kinase regulator activity, kinase activity, nucleotide binding, phosphorylase kinase regulator activity, protein kinase activator activity, protein kinase binding, transferase activity
1368744_a_at	Dspp	dentin sialophosphoprotein	2.12836	0.013976	biomineral tissue development, cellular response to cell-matrix adhesion, extracellular matrix, extracellular region, proteinaceous extracellular matrix
1380480_at	Agpat3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	2.105374	0.004499	lipid metabolic process, metabolic process, phospholipid biosynthetic process, endoplasmic reticulum, integral to membrane, membrane, nucleus, 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase activity, transferase activity, transferring acyl groups
1378922_at	Ydjc	YdjC homolog (bacterial)	-2.085488	0.03795	carbohydrate metabolic process, cellular_component, hydrolase activity, acting on carbon-nitrogen (but not peptide) bonds
1395333_at	Pmp2	peripheral myelin protein 2	-2.017533	0.04411	membrane organization, transport, cytoplasm, cholesterol binding, fatty acid binding, lipid binding, transporter activity
1392748_at	Tmcc1	transmembrane and coiled-coil domain family 1	1.969379	0.023666	biological_process, integral to membrane, molecular_function, biological_process,
1396701_at	Kalrn	kalirin, RhoGEF kinase	-1.943895	0.031479	Axonogenesis, intracellular signal transduction, nervous system development, phosphorylation, protein phosphorylation, regulation of dendrite development, regulation of Rho protein signal transduction, cytoplasm, cytoskeleton, neuronal cell body, neuron projection, perinuclear region of cytoplasm, ATP binding, enzyme binding, guanyl-nucleotide exchange factor activity, kinase activity, metal ion binding, nucleotide binding, phospholipid binding, protein kinase activity, protein serine/threonine kinase activity, Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity, transferase activity, transferase activity, transferring phosphorus-

					containing groups
1371291_at	Creb1	cAMP responsive element binding protein 1	-1.934708	0.014481	Axonogenesis, cell differentiation, cellular response to growth factor stimulus, lactation, lung epithelium development, lung saccule development, mammary gland development, negative regulation of transcription by competitive promoter binding, pituitary gland development, positive regulation of fat cell differentiation, positive regulation of hormone secretion, positive regulation of lipid biosynthetic process, positive regulation of multicellular organism growth, positive regulation of RNA polymerase II transcriptional preinitiation complex assembly, positive regulation of transcription, DNA-dependent, positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter, positive regulation of transforming growth factor beta3 production, protein phosphorylation, protein stabilization, regulation of apoptotic process, regulation of cell size, regulation of circadian rhythm, regulation of transcription, DNA-dependent, response to drug, response to organic substance, secretory granule organization, transcription, DNA-dependent, transcription from RNA polymerase II promoter, transforming growth factor beta receptor signaling pathway, Type I pneumocyte differentiation, chromatin, mitochondrion, nuclear chromatin, nuclear euchromatin, transcription factor complex, cAMP response element binding, DNA binding, double-stranded DNA binding, protein binding, RNA polymerase II activating transcription factor binding, RNA polymerase II distal enhancer sequence-specific DNA binding, sequence-specific DNA binding, sequence-specific DNA binding transcription factor activity, transcription factor binding, transcription regulatory region DNA binding,
1370257_at	Pla2g1b	phospholipase A2, group IB, pancreas	-1.92977	0.016717	fatty acid biosynthetic process, lipid catabolic process, lipid metabolic process, metabolic process, multicellular organismal lipid catabolic process, phosphatidylcholine metabolic process, phospholipid catabolic process, phospholipid metabolic process, positive regulation of DNA replication, cell surface, extracellular region, extracellular space, secretory granule, calcium-dependent phospholipase A2 activity, calcium ion binding, hydrolase activity, metal ion binding, phospholipase A2 activity, receptor binding
1397192_at	Mycbp2	MYC binding protein 2, E3	-1.916323	0.002447	branchiomotor neuron axon guidance, cell

		ubiquitin protein ligase			morphogenesis involved in neuron differentiation, central nervous system projection neuron axonogenesis, motor neuron axon guidance, regulation of cytoskeleton organization, regulation of protein localization, regulation of transcription, DNA-dependent, transcription, DNA-dependent, axon, microtubule cytoskeleton, nucleus, ligase activity, metal ion binding, protein binding, protein homodimerization activity, ubiquitin-protein ligase activity, zinc ion binding
1387939_at	Pnrc1	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	1.879867	0.006489	biological_process, cellular_component, molecular_function
1368339_at	S100g	S100 calcium binding protein G	-1.860186	0.005724	apical plasma membrane, basolateral plasma membrane, calcium ion binding, metal ion binding, vitamin D binding
1378756_at	Papolb	poly (A) polymerase beta (testis specific)	-1.838177	0.035264	metabolic process, mRNA polyadenylation, mRNA processing, mRNA splicing, via spliceosome, RNA 3'-end processing, RNA polyadenylation, termination of RNA polymerase II transcription, cytoplasm, endoplasmic reticulum, nucleus, ATP binding, metal ion binding, nucleotide binding, nucleotidyltransferase activity, polynucleotide adenylyltransferase activity, protein binding, RNA binding, transferase activity