UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Influência da deficiência ou suplementação com selênio durante o período gestacional de ratas na suscetibilidade da progênie feminina à carcinogênese mamária

Mariana Papaléo Rosim

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Thomas Prates Ong

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos

Área de Nutrição Experimental

Influência da deficiência ou suplementação com selênio durante o período gestacional de ratas na suscetibilidade da progênie feminina à carcinogênese mamária

Mariana Papaléo Rosim

Versão original

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. Thomas Prates Ong

São Paulo

2015

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

Rosim, Mariana Papaléo
R819i Influência da deficiência ou suplementação com selênio durante o período gestacional de ratas na suscetibilidade da progênie feminina à carcinogênese mamária / Mariana Papaléo Rosim. -- São Paulo, 2015.
109p.

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 3. Selênio I. T. II. Ong, Thomas Prates, orientador.

641.1 CDD

Mariana Papaléo Rosim

Influência da deficiência ou suplementação com selênio durante o período gestacional de ratas na suscetibilidade da progênie feminina à carcinogênese mamária

Comissão Julgadora daTese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Thomas Prates Ong

orientador/presidente

_____

1º examinador

_____

2º examinador

_____

3º examinador

_____

4º examinador

São Paulo, _____ de _____

Aos meus pais, Eliane e Sidney,

por todo amor, carinho e apoio durante todos esses anos

Agradecimentos

Ao meu marido Livingstone por me apoiar e me entender em todos os momentos, pela companhia, pelo amor e por me fazer muito feliz;

Aos meu pais Sidney e Eliane pela preocupação, pelas cobranças, pelo carinho e por sempre acreditarem em mim;

Ao meu irmão Ricardo pela parceria, pelas brigas, pelos conselhos e por ser meu companheiro em tantos momentos;

Ao meu avô Matheus pela torcida e por ser o melhor avô do mundo;

Ao Prof. Dr. Thomas Prates Ong por me orientar durante o doutorado, pelas oportunidades e pela confiança;

Ao Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno por sempre me acolher em seu laboratório e pela contribuição com minha formação científica

À Fábia de Oliveira Andrade pela amizade, pela paciência, por me ajudar em todas as situações, por me ajudar a delinear experimentos, me ensinar técnicas e por ser um modelo de dedicação e comprometimento;

À Camile pelo carinho, pelos conselhos, pelos abraços, pelas gordices, por me confortar todas as vezes em que eu chorei e por ter me ensinado a dividir meu espaço;

À Luiza, pelas risadas, pela ajuda com as rações, pelas esquisitices e por ser uma amiga tão especial;

Aos meus queridos amigos do departamento: Mayara, Raquel, Marina, Bianca, Gabriela, Kelly, Juliana, Vanessa, Graziela, Roberto, Ernesto, Aline, Laura, Eduardo, Renato e Thamyres, pela amizade, pelas conversas e cafés durante o dia;

Às Profas. Dras. Anna Karenina Azevedo Martins e Viviane Nunes pela amizade e por terem me ensinado o que é ciência;

À Profa. Dra. Leena Hilakivi-Clarke por me receber em seu laboratório na Georgetown University, pelo interesse no meu projeto e por contribuir com meu crescimento científico;

Aos meus amigos de Georgetown: Nguyen Nguyen, Tina Le, Elissa Carney, Madisa Macon, Idalia Cruz, Alan Zwart, Wei Yu e Xiyuan Zhang;

Ao Fábio Mendes pelas mensagens, vídeos, piadas, por se fazer tão presente na minha vida mesmo estando longe e ser um amigo sensacional;

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan pelas análises histopatológicas;

À Prof. Dra. Sílvia Cozzolino e ao técnico Alexandre Pimentel pelo auxílio nas análises de quantificação de selênio;

À Profa. Dra. Inar de Catro e sua aluna Marina Nogueira pelas análises de MDA;

Ao Prof. Dr. Marcelo Rogero pelas discussões sobre a formulação das rações;

À técnica Ivanir Pires pela imensa ajuda na confecção das rações;

À Profa. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro e ao Tiago Franco de Oliveira pelo auxílio nas análises de metilação global do DNA;

À Lourdinha pelo café e pela simpatia de todos os dias;

Aos funcionários do biotério, pelo auxílio e pela dedicação no cuidado com os animais;

A todos os funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental pelo auxílio e dedicação aos alunos

À FAPESP pela bolsa de Doutorado Direto (2011/16368-1) e bolsa BEPE (2014/18500-2)

“Anyone who has never made a mistake

has never tried anything new."

Albert Einstein

Rosim, M.P. **Influência da deficiência ou suplementação com selênio durante o período gestacional de ratas na suscetibilidade da progênie feminina à carcinogênese mamária**. 2015. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2015.

RESUMO

Fatores dietéticos como o selênio (Se) são apontados como importantes moduladores do risco de desenvolvimento do câncer de mama. Essa neoplasia pode apresentar sua origem no início do desenvolvimento e, assim, a alimentação materna poderia ter importantes repercussões na programação fetal da doença. A fim de verificar se diferentes concentração de selênio na dieta materna poderiam programar o risco da progênie feminina ao câncer de mama, ratas foram alimentadas com ração contendo 0,15 (CO), 1,0 (SUP) ou 0,05 (DEF) ppm de Se durante a gestação e sua progênie feminina iniciada com DMBA. A progênie do grupo SUP apresentou menor suscetibilidade à carcinogênese, indicado pelo menor número médio e multiplicidade de adenocarcinomas mamários ($p< 0,05$), enquanto a do grupo DEF apresentou maior suscetibilidade à carcinogênese, indicado pela maior incidência dos mesmos ($p< 0,05$). Mães do grupo DEF apresentaram menor concentração de Se no sangue ($p< 0,05$) e sua prole apresentou menor atividade da enzima GPx1 ($p< 0,05$). Além disso, observou-se na glândula mamária da progênie de 50 dias menor expressão (western blot e qPCR) de ERα, Her-2, EGFR e Ras no grupo SUP em comparação aos grupos CO e DEF ($p< 0,05$). Analisou-se, ainda, o padrão de metilação global do DNA (HPLC-DAD), expressão das enzimas DNMT1, 3a e 3b (qPCR), o padrão global de modificações pós traducionais em histonas (western blot) e o padrão de metilação da região promotora do gene $Er\alpha$ (modificação com bissulfito e pirossequenciamento) na glândula mamária da progênie de 50 dias. Não houve diferença no padrão de metilação global do DNA e expressão das enzimas DNMTs ($p>0,05$). Houve aumento na expressão de H4K16 acetilada nos grupos SUP e DEF ($p< 0,05$). Finalmente, em comparação a progênie do grupo DEF, a do grupo SUP apresentou região promotora de $Er\alpha$ com aumento marginal ($p=0,07$) na metilação de dois dinucleotídeos CpG. Conclui-se que o consumo de diferentes concentrações de Se na dieta materna tem impacto sobre a suscetibilidade da progênie ao câncer de mama na vida adulta através da modulação da expressão de receptores e oncogenes relacionados ao desenvolvimeto dessa neoplasia, além da influência em processos epigenéticos. Tais resultados apontam para a existência de uma "janela de programação" no início do desenvolvimento sensível a ação do Se, resultando em diminuição do risco de câncer de mama quando suplementado na dieta materna e o inverso quando de sua deficiencia.

Palavras-chave: Câncer de mama, programação fetal, dieta materna, selênio, epigenética.

Rosim, M.P. **Influence of selenium deficiency or supplementation during rat gestational period on the susceptibility of female offspring to mammary carcinogenesis**. 2015. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2015.

ABSTRACT

Based on epidemiological studies and animal models, the essential micronutrient selenium has been highlighted as a promising dietary factor associated to breast cancer risk reduction. Breast cancer may have its origin in early development and thus the maternal diet could have important implications in the fetal programming of the disease. In order to ascertain whether differences in selenium concentration in maternal diet could modulate the susceptibility of female offspring to breast cancer, a biological assay was conducted in which female rats were fed a diet with 0.15 (CO), 1.0 (SUP) or 0.05 (DEF) ppm of selenium during gestational period and the female offspring subjected to a mammary carcinogenesis model induced by DMBA. SUP group offspring presented decreased susceptibility to mammary carcinogenesis, as indicated by lower ($p< 0,05$) average number and multiplicity od adenocarcinomas, while the DEF group offspring had a greater susceptibility, as indicated by the increase ($p< 0,05$) in adenocarcinomas incidency. Mothers of the DEF group pesented lower ($p< 0,05$) Se blood concetrations and their offspring presented lower ($p<0,05$).GPx1 activity. In addition, there was a decrease ($p< 0,05$) in ERα, Her-2, EGFR and Ras expression (western blot and qPCR) in the mammary gland of 7 weeks old female SUP group offspring when compared to CO and DEF groups offspring. DNA global methylation pattern (HPLC-DAD), DNMT1, 3a e 3b expression (qPCR), global pattern of post-translational modification in histones (western blot) and methylation status of *Erα* promoter region (bisulfite modification and pyrosequencing) were also evaluated in the mammary gland of 7 weeks old offspring. There was no diffrence ($p>0,05$) in DNA global methylation pattern and DNMTs expression. There was an increase in acetilated H4K16 expression in groups SUP and DEF ($p< 0,05$). Lastly, when compared to DEF offspring, the SUP offspring presented a marginal increase in the methylation of two CpG dinucleotides in the *Erα* promoter region. In conclusion, the consumption of different selenium concentration in maternal diet plays a role in the progeny's breast cancer susceptibility through the modulation of receptors and oncogenes expression, in addition to modifications in epigenetic patterns. These results indicate the presence of a "programming window" in the beggining of development susceptible to selenium effects, resulting in decreased breast cancer risk when supplemented and the opposite when deficient.

Keywords: Breast cancer, fetal programming, maternal diet, selenium, epigenetics.

LISTA DE SIGLAS

AKT	*V-Akt Murine thymoma viral proto-oncogene 1*
BAX	Proteína X associada ao BCL-2
BCL-2	B-Cell CLL/Linfoma 2
BHT	Butil-hidróxido-tolueno
Brca1	*Breast cancer 1*
Cav-1	Caveolina-1
cdk4	Cyclin-dependent kinase 4
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CH3	Grupamento metil
CIS	Carcinoma *in situ*
c-JUN	*Transcription factor AP-1-like*
c-Myc	*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*
CO	Grupo controle (0,15 ppm Se)
CYP1A	Citocromo P450, familia 1, subfamilia A
CYP1B	Citocromo P450, familia 1, subfamilia B
DAD	*Diode Array*
DEF	Grupo deficiênte (0,05 ppm Se)
DMBA	7,12-dimetilbenz[a]antraceno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT1	DNA metil-transferase 1
DNMT3a	DNA metil-transferase 3a
DNMT3b	DNA metil-transferase 3b
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ácido Etilenidiaminotetracético
EGFR	Receptor de fator de crascimento epidermal
ERα	Receptor de estrógeno α
ERK	Extracellular regulated MAP kinase
EZH2	*Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
GADD153	*DNA damage inducible transcript 3*
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPx	Glutationa Peroxidase
GPx1	Glutationa peroxidase 1
GSTP1	Glutationa S-transferase P1
H&E	Hematoxilina e eosina
H3K27	Histona 3 lisina 27
H3K27me3	Histona 3 lisina 27 trimetilada
H3K4	Histona 3 lisina 4
H3K4me	Histona 3 lisina 4 metilada
H3K9	Histona 3 lisina 9
H3K9ac	Histona 3 lisina 9 acetilada

H3K9me2/3	Histona 3 lisina 9 di e trimetilada
H3K9me3	Histona 3 lisina 9 trimetilada
H4K16	Histona 4 lisina 16
H4K16ac	Histona 4 lisina 16 acetilada
H4K20	histona 4 lisina 20
H4K20me3	Histona 4 lisina 20 trimetilada
HAT	Enzima acetiltransferase
HCl	Ácido clorídrico
HDAC	Desacetilases de histonas
Her-2	Receptor do fator de crescimento epidermal do tipo 2
hMOF	*K(lysine) acetyltransferase 8*
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPRT	*Hipoxantina fodforibosiltransferase*
INCA	Instituto Nacional do Cancer
IQ	Instituto de Química
MDA	Malonaldeído
MgCl2	Cloreto de magnésio
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	*Mechanistic Target Of Rapamycin*
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaOH	Hidróxido de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
$p16^{INK4A}$	*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PI3K	Fosfatidilinosiltol-3-kinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonila
Pten	*Phosphatase and tensin homolog*
qPCR	PCR em tempo real
RASSF1A	*Ras association domain family 1*
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptor de progesterona
SAH	S-Adenosil-homocisteína
SAM	S-Adenosil-metionina
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
Se	Selênio
SELECT	*Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial*
SNP	*Single nucleotide polymorphism*
STAT5	*Signal Transducer and Activatior of Transcription 5*
SUP	Grupo suplementado (1 ppm Se)
Suv39h1	*Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1*
Suv4-20h2	*Suppressor Of Variegation 4-20 Homolog 2*
TBA	Ácido Tiobarbitúrico

Tbp	Proteína de ligação ao TATA box
TBS-T	*Tris-Buffered Saline* com Tween 20
TEBs	*Terminal end buds*
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UDLTs	Unidades ducto-lobulares terminais
USP	Universidade de São Paulo
ω-3	Ômega-3
ω-6	Ômega-6
ω-9	Ômega-9

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de primers utilizados para análise de expressão gênica..... 48

Tabela 2. Anticorpos utilizados em experimentos de análise da concentração de proteínas.. 49

Tabela 3. Características da ninhada..... 56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. **Representação esquemática da organização da glândula mamária**. 24

Figura 2. **Etapas-chave no desenvolvimento da glândula mamária**..... 26

Figura 3. **Etapas do desenvolvimento do câncer de mama** 27

Figura 4. **Desenho experimental.** 43

Figura 5. **Consumo de ração de ratas dos grupos CO, DEF e SUP durante o período pré-concepcional, gestacional e de lactação** 54

Figura 6. **Peso corpóreo de ratas dos grupos CO, DEF e SUP durante o período gestacional** 55

Figura 7. **Concentração de selênio no sangue de ratas prenhas dos grupos CO, DEF e SUP**..... 56

Figura 8. **Peso corpóreo da progênie feminina dos grupos CO, DEF e SUP** 57

Figura 9. **Concentração de selênio no sangue da progênie masculina e feminina dos grupos CO, DEF e SUP por ocasião do nascimento.** 58

Figura 10. **Concentração de selênio no plasma e atividade da enzima GPx nos eritrócitos da progênie masculina dos grupos CO, DEF e SUP com 3 semanas de vida.** 59

Figura 11. **Concentração de selênio no plasma (A), nos eritrócitos (B) e atividade da enzima GPx nos eritrócitos (C) da progênie masculina dos grupos CO, DEF e SUP com 7 semanas de vida.** 60

Figura 12. **Concentração de malonaldeído (MDA) no tecido hepático da progênie masculina dos grupos CO, DEF e SUP com 3 e 7 semanas de vida**. 61

Figura 13. **Incidencia de adenocarcinomas mamários em ratas iniciadas com DMBA.** 62

Figura 14. **Número médio e multiplicidade de adenocarcinomas mamários em ratas iniciadas com DMBA.** 63

Figura 15. **Classificação dos tumores mamário na progênie dos grupos CO, DEF e SUP.** 64

Figura 16. **Tipos histológicos mais frequentemente observados nos tumores mamários.** 65

Figura 17. **Classificação dos tumores mamário na progênie dos grupos CO, DEF e SUP.** 66

Figura 18. **Número de Terminal End Buds e tamanho da árvore epitelial da glândula mamária da progênie feminina dos grupos CO, DEF e SUP com 7 semanas de vida.** .. 67

Figura 19. **Marcadores de apoptose e proliferação na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanasdos grupos CO, DEF e SUP.** 67

Figura 20. **Expressão do Receptor de Estrógeno α (ERα) na glândula mamária da progênie de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** 68

Figura 21. **Expressão do receptor Her-2 na glândula mamária da progênie de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** 69

Figura 22. **Expressão de EGFR na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** 70

Figura 23. **Expressão dos receptores HER-2 e ERα em tumores mamários da progênie dos grupos CO, DEF e SUP iniciada com DMBA.** 70

Figura 24. **Expressão de Rassf1a na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** 71

Figura 25. **Expressão de RAS e PTEN na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** 72

Figura 26. **Expressão dos genes Brca1 e c-Myc na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** 72

Figura 27. **Expressão ERK e AKT na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** 73

Figura 28. **Expressão mTOR e c-JUN na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** 74

Figura 29. **Expressão Caveolina-1, STAT5 e c-RAF na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** 75

Figura 30. **Padrão global de modificações pós traducionais em resídos de histonas na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** . 76

Figura 31. **Expressão de EZH2 na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP..** 76

Figura 32. **Padrão global de modificações pós traducionais em resídos de histonas em tumores mamários da progênie feminina dos grupos CO, DEF e SUP induzida com DMBA.** 77

Figura 33. **Metilação global do DNA na glândula mamária e tecido hepático da progênie feminina dos grupos CO, DEF e SUP com 7 semanas de vida.** (..... 78

Figura 34. **Expressão dos genes DNMT1, 3a e 3b na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** 79

Figura 35. **Metilação da região promotora do gene Erα na glândula mamária e tecido hepático da progênie feminina dos grupos CO, DEF e SUP com 7 semanas de vida.**..80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 24
2.1 Câncer de mama 24
2.1.1 Desenvolvimento da glândula mamária e o câncer de mama 24
2.1.2 Câncer de mama e Epigenética 27
2.1.3 DMBA como modelo de estudo do câncer de mama 30
2.2 Câncer de mama e nutrição 31
2.2.1 Selênio e câncer de mama 33
2.3 Programação fetal 35
2.4 Programação fetal e nutrição 37
3. OBJETIVOS 40
3.1 Objetivo geral 40
3.2 Objetivos específicos 40
4. MATERIAL E MÉTODOS 42
4.1 Animais 42
4.2 Rações ofertadas durante o período gestacional 42
4.3 Protocolo experimental 42
4.4 Avaliação da concentração de Se no plasma, eritrócitos e sangue total 44
4.5 Atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx) 44
4.6 Análise das concentrações de malonaldeído no tecido hepático da progênie masculina de 3 e 7 semanas 45
4.7 Indução da carcinogênese mamária na progênie feminina 45
4.8 Análise macroscópica das mamas 46
4.9 Análise histopatológico dos tumores mamários da progênie feminina por meio de coloração por hematoxilina e eosina (H&E) 46
4.10 Morfologia da glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas 46
4.11 Avaliação da expressão gênica no tecido mamário da progênie feminina de 7 semanas 47
4.12 Análise do padrão global de modificações pós traducionais em histonas no tecido mamário da progênie feminina de 7 semanas e nos tumores mamários da progênie iniciada com DMBA 50
4.13 Análise do padrão de metilação global do DNA no tecido mamário da progênie feminina e tecido hepático da progênie masculina de 7 semanas 51

4.13.1 Extração do DNA 51

4.13.2 Hidrólise do DNA e quantificação de 5-metil-dC 51

4.14 Análise do estado de metilação da região regulatória do gene ERα por modificação com bissulfito e pirosequenciamento no tecido mamário da progênie feminina de 7 semanas 52

4.15 Análises estatísticas 53

5. RESULTADOS 54

5.1 Consumo de ração, peso corpóreo e concentração de Se sanguíneo de ratas mães dos grupos CO, DEF e SUP 54

5.2 Parâmetros da ninhada, consumo de ração, peso corpóreo e concentração sanguínea de selênio da progênie dos grupos CO, DEF e SUP 56

5.3 Análise de marcador (MDA) de estresse oxidativo 60

5.4 Desenvolvimento de tumores mamários em ratas iniciadas com DMBA 61

5.5 Contagem do número de TEBs na glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas 66

5.6 Análise de marcadores moleculares de proliferação e morte celular na glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas 67

5.7 Análise da expressão dos receptores ERα, HER-2 e EGFR na glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas 68

5.8 Análise da expressão dos receptores HER-2 e ERα nos adenocarcinomas mamários da progênie feminina iniciada com DMBA 70

5.9 Análise da expressão de oncogenes e genes supressores de tumor na glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas 71

5.10 Análise da expressão de intermediários da via do *Erα*, *Egfr* e *Ras* 73

5.11 Análise de marcadores epigenéticos 75

5.11.1 Análise do padrão de acetilação e metilação global de histonas na glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas e tumores mamários de ratas iniciadas 75

5.11.2 Análise do padrão de metilação global do DNA no tecido hepático e glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas 77

4.11.3 Análise da expressão de DNA metil-transferases na glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas 78

5.11.4 Análise do padrão de metilação da região promotora do gene *ERα* na glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas 79

6. DISCUSSÃO 81

6.1 Concentrações de Se e estresse oxidativo 81

6.2 Morfologia e marcadores de apoptose e proliferação da glândula mamária 83

6.3 Expressão dos receptores ERα, Her-2 e EGFR 84

6.4 Expressão de oncogenes e genes supressores de tumor 86
6.5 Proteínas relacionadas às vias do *Erα*, *Egfr* e *Ras* 87
6.6 Marcadores epigenéticos 89
6.6.1 Modificações em histonas 89
6.6.2 Modificações no padrão de metilação global e especifica do DNA 90
7. CONCLUSÃO 93

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um importante problema de saúde pública, compreendendo uma das principais causas de morte em nível global (OMS, 2015). Dentre os diversos tipos de câncer, as neoplasias mamárias são as mais frequentes entre mulheres; estima-se que em 2012 ocorreram cerca de 1,67 milhão de casos, o que compreende 25% do total de casos de câncer. No Brasil, o número de casos esperados para o ano de 2016 é de cerca de 57 mil (INCA, 2015).

O câncer de mama é uma doença multifatorial e, embora possa estar associado a fatores genéticos, estima-se que apenas 7% dos casos seja resultado de herança genética (HULKA; MOORMAN, 2001). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2015), cerca de um terço dos casos de câncer podem ser prevenidos por meio de mudanças no estilo de vida. Nesse sentido, um fator de destaque associado à modulação da susceptibilidade de indivíduos ao câncer de mama é a alimentação (DAVIS; MILNER, 2007). Alguns componentes da dieta que têm sido relacionados com essa modulação incluem ácidos graxos saturados e poliinsaturados (HILAKIVI-CLARKE et al., 2005; SIERI et al., 2008), fibras alimentares (PARK et al., 2009) e soja (TROCK; HILAKIVI-CLARKE; CLARKE, 2006). O selênio (Se) também apresenta papel promissor na redução do risco de diferentes tipos de câncer, inclusive o de mama (COMBS; LÜ, 2001; WHANGER, 2007; ALATISE; SCHRAUZER, 2010), por meio de sua ação antioxidante (RAYMAN, 2012) e modulação da expressão de oncogenes e genes supressores de tumor (DONG et al., 2002; LEE et al., 2005a).

Visto que o desenvolvimento da glândula mamária se inicia no período embrionário e esse órgão se encontra em constante remodelamento, o câncer de mama também foi apontado como tendo sua origem no início da vida (HILAKIVI-CLARKE; DE ASSIS, 2006; HILAKIVI-CLARKE, 2007). A alimentação materna durante o período gestacional é um importante fator capaz de alterar o ambiente intrauterino e dessa forma alterar a suscetibilidade de seus descendentes ao câncer de mama (HILAKIVI-CLARKE; DE ASSIS, 2006; HILAKIVI-CLARKE, 2007). Além disso, sabe-se que compostos bioativos de alimentos e nutrientes, como o selênio, podem modular mecanismos epigenéticos (ONG; MORENO; ROSS, 2011). Como o período de embriogênese é marcado por extensa reprogramação epigenética, uma modulação inadequada do epigenoma durante essa fase da vida altamente sensível teria importantes implicações para sua descendência, tanto no curto

como no longo prazo (NAFEE et al., 2008). Nesse sentido, aventa-se a hipótese de que a modulação do epigenoma pela alimentação e hormônios maternos poderia estar associada à origem do câncer de mama já no início da vida (BURDGE; LILLYCROP; JACKSON, 2009; CHIAM et al., 2009; HILAKIVI-CLARKE; DE ASSIS, 2006; LILLYCROP et al., 2005; WATERLAND; JIRTLE, 2004).

Assim, esse trabalho teve como objetivo analisar os efeitos da suplementação ou deficiência de selênio na dieta materna durante o período gestacional sobre a suscetibilidade da progênie feminina ao câncer de mama.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer de mama

2.1.1 Desenvolvimento da glândula mamária e o câncer de mama

A glândula mamária é constituída por dois compartimentos principais, o epitélio, formado por células basais e luminais e envolto pela membrana basal, e o "*fat pad*"; estroma composto por adipócitos e infiltrado por células vasculares endoteliais, fibroblastos e células do sistema imunológico (GJOREVSKI; NELSON, 2011; HENNIGHAUSEN; ROBINSON, 2005; POLYAK; KALLURI, 2010) (Figura 1). Um aspecto desse órgão que merece destaque é seu constante remodelamento, que pode ser influenciado em três pontos críticos; embriogênese, puberdade e gestação/lactação (GJOREVSKI; NELSON, 2011) (Figura 2).

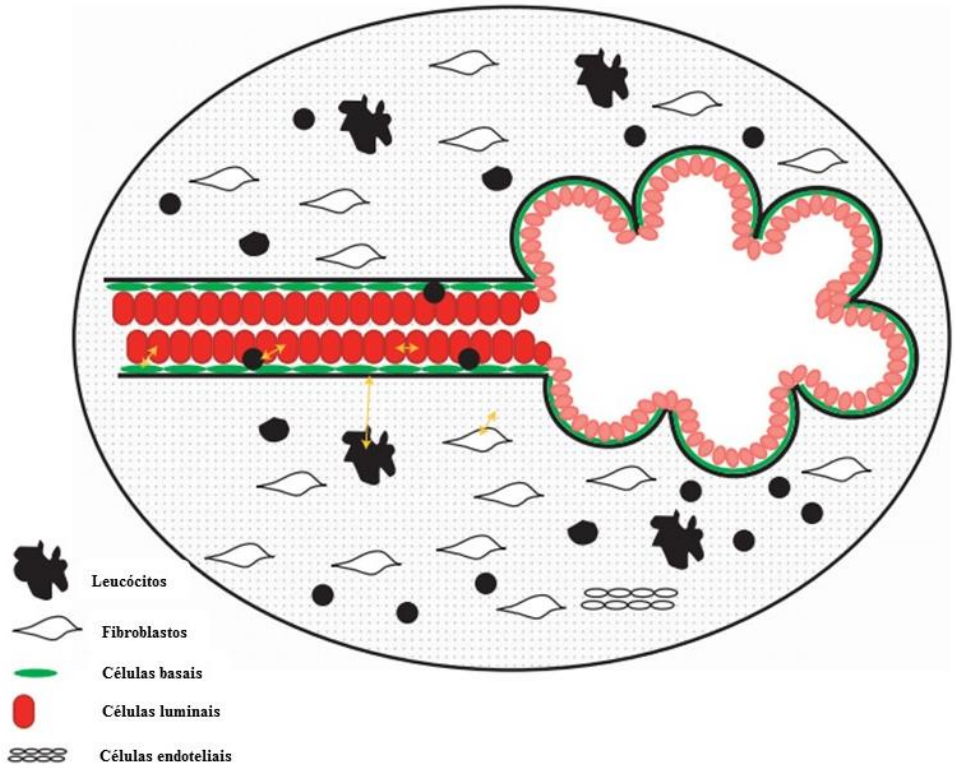

Figura 1. **Representação esquemática da organização da glândula mamária**. A árvore epitelial é envolvida pela membrana basal (representada pela linha preta) e composta pelas células basais e luminais. Ao redor da árvore epitelial encontra-se o estroma, formado por células do sistema imune, fibroblastos, células adiposas e endoteliais (adaptado de POLYAK; KALLURI, 2010).

Durante a embriogênese observa-se a formação de um sistema ductal rudimentar, onde as células epiteliais formam um ducto a partir do mamilo até o "*fat pad*", iniciando um processo de ramificação. A formação dessa estrutura se dá por meio da interação entre epitélio e mesênquima e a árvore epitelial rudimentar permanece quiescente até a puberdade (SILBERSTEIN, 2001; WATSON; KHALED, 2008).

Durante a puberdade, sob o efeito dos hormônios ovarianos, observa-se na glândula mamaria formação de estruturas denominadas unidades ducto-lobulares terminais (UDLTs) na extremidade dos ductos. Analogamente, observam-se estruturas semelhantes no tecido mamário de roedores, denominadas *terminal end buds* (TEBs). As TEBs são estruturas compostas por duas porções, uma região externa formada por uma única camada de células não diferenciadas (*stem cells*) e uma região mais interna, formada por múltiplas camadas de células epiteliais. As células que compõem essa estrutura apresentam alta taxa de proliferação e são responsáveis pela elongação e bifurcação dos ductos (RUSSO; RUSSO, 1980; WATSON; KHALED, 2008).

A glândula mamária atinge o ápice de seu desenvolvimento durante a gestação e lactação, momento em que ocorre diferenciação das células epiteliais em alvéolos, e se dá a produção e secreção do leite. Posteriormente, a glândula mamária sofre processo de involução, que une alta taxa de apoptose de células epiteliais ao remodelamento do estroma, resultando em características semelhantes àquelas anteriores à gestação (WATSON; KHALED, 2008; WISEMAN, 2002).

Postula-se que o câncer de mama tenha início nas TEBs/ULDTs, visto que essas estruturas são formadas por células com alto potencial proliferativo, apresentando maior taxa de formação de adutos e menor capacidade de reparo a danos ao DNA (RUSSO; RUSSO, 1980). Esta condição proporciona um ambiente ideal para acúmulo de modificações genéticas e epigenéticas, que levam à ativação de oncogenes e inibição de genes supressores de tumor.

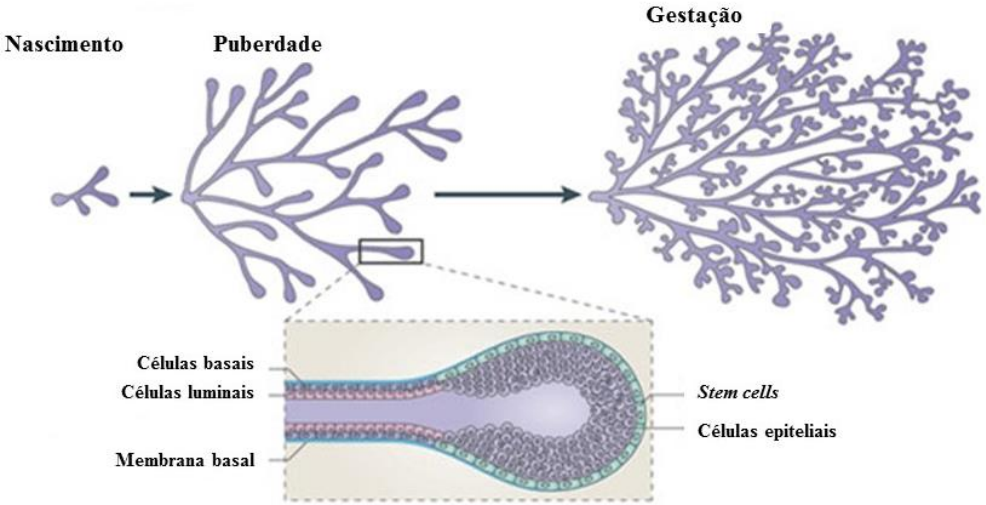

Figura 2. **Etapas-chave no desenvolvimento da glândula mamária.** O início do desenvolvimento da glândula mamária se dá durante a embriogênese, resultando em uma árvore epitelial rudimentar, que permanece quiescente até a puberdade, quando sofre influência dos hormônios ovarianos, e atinge desenvolvimento máximo durante a gestação/lactação. Detalhe para a composição das TEBs, que apresentam dois tipos celulares (Adaptado de Gjorevski e Nelson, 2011).

O desenvolvimento de neoplasias mamárias se dá de acordo com etapas bem definidas (ALLRED; MOHSIN; FUQUA, 2001; POLYAK, 2007) (Figura 3). Células das TEBs/ULDTs dão origem a hiperplasias atípicas, que por sua vez originam carcinomas *in situ*, que podem evoluir para metástase. A hiperplasia atípica apresenta aumento de tamanho em relação a ULDTs/TEBs normais, devido à proliferação e acúmulo de células epiteliais (YU; MOUW; WEAVER, 2011).

Ductos normais são formados pela membrana basal, uma camada de células mioepiteliais e uma camada de células epiteliais. Entretanto, no carcinoma *in situ* há diminuição no número de células mioepiteliais, enquanto células do estroma, como fibroblastos, linfócitos e células endoteliais estão presentes em maior quantidade. Adicionalmente, observa-se aumento no número de células tumorais, ocasionado pela promoção da proliferação ou pela inibição da morte celular, enquanto a membrana basal continua intacta (ALLRED; MOHSIN; FUQUA, 2001; POLYAK, 2007).

Já o carcinoma invasivo destaca-se pela perda da integridade da membrana basal, ausência de células mioepiteliais e invasão da matriz celular por células tumorais, acompanhadas de macrófagos e fibroblastos, até a corrente sanguínea ou linfática, podendo

dar origem a metástases (ALLRED; MOHSIN; FUQUA, 2001; POLYAK, 2007; YU; MOUW; WEAVER, 2011) (Figura 3).

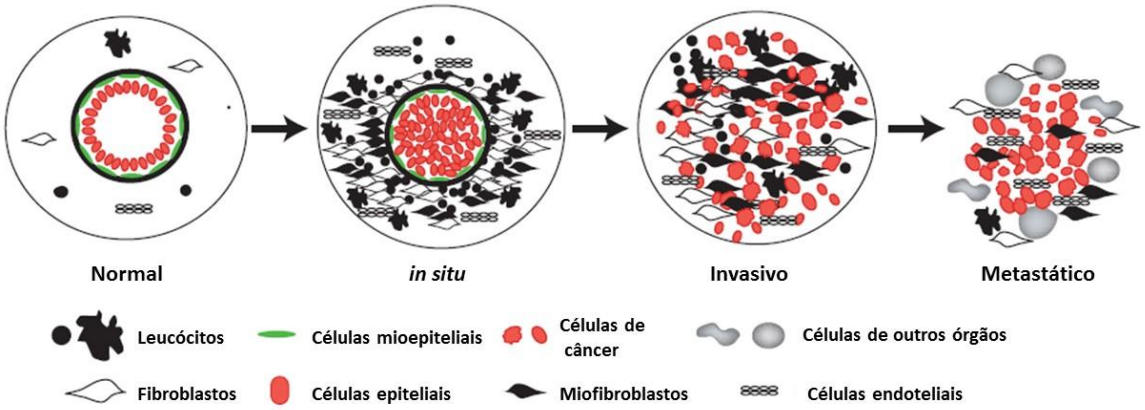

Figura 3. **Etapas do desenvolvimento do câncer de mama.** O câncer de mama de mama se dá por meio de etapas bem definida, em que ocorrem alterações nos tipos celulares, proporção de células e conformação do tecido (adaptado de Polyak e Kalluri, 2010).

2.1.2 Câncer de mama e Epigenética

Tradicionalmente, caracteriza-se o câncer como uma doença causada pela presença de células com acúmulo de alterações genéticas, denominadas células neoplásicas. Observa-se, adicionalmente, que alterações em mecanismos epigenéticos também podem estar envolvidas na iniciação e progressão do câncer. Assim, alterações genéticas e epigenéticas sofrem e exercem modulação mútua, permitindo início e instalação da neoplasia (YOU; JONES, 2012).

O termo epigenética refere-se a mudanças herdáveis na expressão de genes que não se dão por meio de alterações na sequência do DNA (CALLINAN; FEINBERG, 2006). Metilação de citosinas, modificações pós-tradução de histonas, como acetilação e metilação, e a ação de microRNAS (miRNAs) representam os principais processos epigenéticos (ESTELLER, 2007). A adição covalente de grupos metil (CH_3) ocorre normalmente na posição 5 de citosinas seguidas por guanina nos dinucleotídeos CpG (SHARMA; KELLY; JONES, 2010). Esses dinucleotídeos não estão distribuídos de forma aleatória no DNA: concentram-se em regiões denominadas ilhas CpG, localizadas em cerca de 60% dos promotores do genoma humano (WANG; LEUNG, 2004) e que em células normais

encontram-se não metilados (JONES; BAYLIN, 2002; STEARNS; ZHOU; DAVIDSON, 2007). A metilação do DNA é mediada pelas enzimas DNA metil-transferases (DNMTs), sendo as mais conhecidas a DNMT1, responsável pela manutenção da metilação após a replicação do DNA, e DNMT3a e 3b, responsáveis pela metilação *de novo* do DNA (RODRÍGUEZ-PAREDES; ESTELLER, 2011; SHARMA; KELLY; JONES, 2010). Em células normais observa-se que regiões repetitivas do DNA estão hipermetiladas, mecanismo que previne a instabilidade cromossômica por silenciar regiões não codificantes e elementos transponíveis (SUZUKI; BIRD, 2008). Além disso, a metilação do DNA é responsável por processos essenciais do desenvolvimento, como *imprinting* genômico e inativação do cromossomo X no sexo feminino (BIRD, 2002). A hipermetilção do DNA em regiões promotoras causa o silenciamento de determinados genes por impedir o acesso de fatores de transcrição ao promover uma estrutura de cromatina altamente condensada. O processo inverso denomina-se hipometilação (BAYLIN; OHM, 2006; SHARMA; KELLY; JONES, 2010).

Modificações pós-traducionais, como as induzidas por enzimas em resíduos de histonas causam remodelamento da cromatina pela modulação da capacidade de interação entre essas proteínas nucleares e o DNA. A acetilação de histonas leva à descondensação da cromatina e consequente aumento na expressão gênica, enquanto a desacetilação de histonas resulta na condensação da cromatina e inibição na transcrição gênica (DALVAI; BYSTRICKY, 2010; HOWE et al., 2001; KOUZARIDES, 2007). Essas modificações ocorrem, por exemplo, em resíduos de lisina como H3K9 (histona 3 lisina 9) e H4K16 (histona 4 lisina 16), pela ação de enzimas acetiltransferases (HAT) e desacetilases de histonas (HDAC). Além disso, determinados resíduos de lisina podem, ainda, ser metilados ou desmetilados, pela ação de histona metiltransferases e histona desmetilases. A trimetilação de determinados resíduos de lisina como H3K27 (histona 3 lisina 27) e H4K20 (histona 4 lisina 20) resultam no silenciamento gênico (DALVAI; BYSTRICKY, 2010; KOUZARIDES, 2007).

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes capazes de regular a expressão gênica por meio da ligação à região 3’ de mRNAs, levando à degradação desse mRNA ou à inibição de sua tradução (HE; HANNON, 2004). A desregulação na expressão de miRNAs

está relacionada ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, inclusive o câncer de mama (VAN SCHOONEVELD et al., 2015).

O equilíbrio entre as marcas epigenéticas observado em células normais sofre drásticas alterações em células neoplásicas, com a ocorrência simultânea de hipermetilação da região promotora de genes específicos e hipometilação global do DNA. Essas alterações resultam no silenciamento de genes supressores de tumor e no aumento da expressão de oncogenes envolvidos em mecanismos celulares essenciais, como controle de proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, além da perda de *imprinting*, reativação de elementos transponíveis e instabilidade cromossômica (ESTELLER; HERMAN, 2002; JOVANOVIC et al., 2010; RADPOUR et al., 2011; SADIKOVIC et al., 2008).

Nesse sentido, o gene *Rassf1a*, supressor de tumor, apresenta-se frequentemente silenciado por hipermetilação de seu promotor no câncer de mama (ESTELLER, 2007; FENG et al., 2009; RADPOUR et al., 2009; WIDSCHWENDTER; JONES, 2002). Além de estar envolvido em vias pró-apoptóticas mediadas por *Ras*, *Rassf1a* inibe tanto a transformação maligna de tumores quanto a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular por impedir o acúmulo de ciclina D1 (KIM et al., 2003; SHIVAKUMAR et al., 2002). Esse gene apresenta seu promotor hipermetilado em cerca de 70% dos casos de neoplasias mamárias (HELLER et al., 2009).

Outros genes supressores de tumor encontram-se silenciados devido à hipermetilação de suas regiões promotoras no câncer de mama. É o caso do *Brca1*, responsável por reparos de danos ao DNA (DENG, 2006; ESTELLER et al., 2000) e *Pten*, responsável pelo controle de proliferação e sobrevivência celular (GARCÍA et al., 2004; KHAN et al., 2004; SONG; SALMENA; PANDOLFI, 2012).

Verificou-se também que a expressão de genes envolvidos em processos epigenéticos encontrava-se alterada em casos de câncer de mama. Assim, Girault e colaboradores observaram aumento na expressão de DNMTs, em especial a DNMT3B no câncer de mama, o que indicaria que essa enzima exerce um papel de maior influência nesse tipo de neoplasia (GIRAULT et al., 2003).

Analises *in vitro* utilizando linhagens de células de câncer de mama relacionam o aumento da malignidade das mesmas ao aumento da acetilação de H4 e redução da trimetilação da histona H4K20, sendo que a perda de trimetilação foi acompanhada pela

diminuição na expressão das enzimas histona metil-transferases Suv39h1 e Suv4-20h2 (TRYNDYAK; KOVALCHUK; POGRIBNY, 2006). Essas alterações epigenéticas estão relacionadas à diminuição no controle de danos do DNA, instabilidade cromossômica e aumento no risco de desenvolvimento de tumores (PETERS et al., 2001). Por outro lado, outros estudos, mostraram que amostras de tecidos de câncer de mama apresentam diminuição na acetilação de H4K16 (ELSHEIKH et al., 2009), bem como menor expressão da enzima hMOF, responsável pela acetilação da mesma em humanos (PFISTER et al., 2008).

Kleer e colaboradores (2003) mostraram que a expressão de EZH2, enzima do complexo Polycomb, que tem ação de metiltransferase e é responsável pela trimetilação de H3K27, está superexpressa em amostras tecidos de câncer de mama invasivo e metastático. O aumento de expressão foi relacionado à maior proliferação de células tumorais, capacidade de crescimento celular independente de ancoragem e invasão celular (BACHMANN et al., 2006; KLEER et al., 2003).

2.1.3 DMBA como modelo de estudo do câncer de mama

Um dos principais modelos para estudo do câncer de mama em animais é baseado na iniciação com o carcinógeno 7,12,dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) em ratas da linhagem Sprague-Dawley (BARROS et al., 2004; CLARKE, 1997 ; RUSSO; RUSSO, 1987). O DMBA é um hidrocarboneto policíclico aromático que apresenta grande potencial imunossupressor e carcinogênico (GAO et al., 2005). Para exercer sua atividade carcinogênica, o DMBA precisa ser metabolicamente ativado através de enzimas do citocromo P450. Mais especificamente, a enzima CYP1A é responsável por sua ativação no fígado, enquanto a CYP1B é responsável por sua ativação em outros órgãos, como na glândula mamária (CHRISTOU et al., 1995; LAMBARD et al., 1991). Sua metabolização dá origem a intermediários epóxidos mutagênicos, responsáveis pela formação de adutos do DNA, que por sua vez, são responsáveis por mutações no DNA e pela transformação maligna celular.

Estudos mostram que a carcinogênese resultante da administração de DMBA em roedores tem início nas TEBs (RUSSO; RUSSO, 1987). Observa-se a maior captação de

carcinógeno pelo núcleo das células dessas estruturas, maior taxa de conversão de DMBA em epóxidos e capacidade reduzida no reparo de adutos de DNA (RUSSO; RUSSO, 1987).

A administração de DMBA ocorre em roedores entre 40-55 dias de vida, por tratar-se de um período com alta densidade e alta proliferação de TEBs, que é associada ao aumento na síntese de DNA, que por sua vez aumenta a taxa de ligação entre DNA e o carcinógeno (RUSSO; WILGUS; RUSSO, 1979). A maior parte dos tumores desenvolvidos a partir da administração de DMBA são adenocarcinomas que, assim como tumores mamários em humanos, são dependentes de hormônios ovarianos, bem como de alta taxa de proliferação celular e da idade de exposição ao carcinógeno, que pode ter sua efetividade modulada por diversos fatores ambientais, como alimentação (RUSSO et al., 1990).

2.2 Câncer de mama e nutrição

O câncer de mama é o tipo de câncer mais frequente em mulheres no mundo, sendo de 1,7 milhões a estimativa do número de casos diagnosticados por ano, enquanto o número de mortes é de cerca de 520 mil (TORRE et al., 2015; OMS, 2013). Embora conhecido como uma doença característica de países desenvolvidos, sua incidência em países em desenvolvimento corresponde a 50% da incidência global (JEMAL et al., 2011). No Brasil, o câncer de mama é a neoplasia de maior incidência entre mulheres, correspondendo a 22% do número de casos de câncer por ano, com cerca de 57 mil novos casos e 13 mil mortes por ano (INCA, 2015).

A incidência de câncer de mama varia muito entre mulheres que vivem em diferentes localidades. Assim, por exemplo, verificou-se que em países da África Central e Ásia Oriental a frequência é de cerca de 30 casos a cada 100.000 mulheres, enquanto na Europa Ocidental esse número é 90 casos a cada 100.000 mulheres (FERLAY et al., 2014; PARKIN; FERNÁNDEZ, 2006). Estudos realizados com indivíduos migrantes de países asiáticos para países ocidentais mostraram que as gerações posteriores à migração eram mais susceptíveis ao desenvolvimento do câncer de mama (PORTER, 2008). Essa maior susceptibilidade se mostrou proporcional à geração de descendentes de migrantes (ZIEGLER et al., 1993) ou ao seu nível de aculturação (TSENG et al., 2006) sendo que, em alguns casos, a incidência tornou-se semelhante à observada na região de imigração. Isso sugere que fatores ambientais

e comportamentais, além dos genéticos, teriam papel relevante na modulação do risco para essa neoplasia.

Alguns dos fatores relacionados ao estilo de vida que podem modular o risco de desenvolvimento de câncer de mama são: idade da menarca e da primeira gravidez, nuliparidade, uso de anticoncepcionais orais e de terapia de reposição hormonal, além da prática de exercícios físicos, consumo de álcool e dieta (BALLARD-BARBASH et al., 2009; KRUK, 2014; MADIGAN et al., 1995).

Um fator de destaque associado à modulação do risco de câncer é a alimentação. Estudos mostraram que, em países desenvolvidos, cerca de 30% dos casos de câncer estariam relacionados à dieta, enquanto que em países em desenvolvimento, fatores nutricionais seriam responsáveis por 20% dos casos (NAHLEH; BHATTI; MAL, 2011). Mais especificamente com relação ao câncer de mama, diversos estudos mostram que a dieta pode ser um fator relevante no risco de desenvolvimento da doença (PETRIC et al., 2015; LAMARTINIERE et al., 1995; SIERI et al., 2008; WITTE; HARDMAN, 2015).

Fatores dietéticos que têm sido relacionados com a modulação do risco de câncer de mama incluem, por exemplo, diferentes tipos de lipídios. Nesse sentido, estudos indicam que o alto consumo de ω-3, bem como um aumento na razão ω-3/ω-6 na dieta, estaria inversamente relacionado ao risco de câncer de mama (LI, 2015; WITTE; HARDMAN, 2015). Da mesma forma, o consumo de azeite de oliva extra virgem, rico em ω-9, resultou na diminuição na incidência dessa neoplasia (TOLEDO et al., 2015). Por outro lado, o consumo de ácidos graxos saturados, como palmítico e oleico, estão associados a aumento no risco de câncer de mama (SCZANIECKA et al., 2012).

O consumo de chá verde por mulheres norte americanas de origem asiática mostrou-se inversamente proporcional ao desenvolvimento de câncer de mama (WU et al., 2003). O tratamento de células de câncer de mama, com a epigalocatequina-3-galato, composto fenólico presente no chá verde, resultou em diminuição na proliferação celular pela interrupção do ciclo celular na fase G1, através da inibição das ciclinas D e E (THANGAPAZHAM et al., 2007). Esse composto ainda apresenta propriedades antioxidativas e de promoção de apoptose, também responsáveis por seu potencial quimiopreventivo (PETRIC et al., 2015). O alto consumo de fibras na dieta estaria relacionado à diminuição no risco de câncer de mama tanto em estudos epidemiológicos

(AUNE et al., 2012; PARK et al., 2009), como em modelos animais (COHEN et al., 1991). O mesmo foi observado com relação ao alto consumo de antioxidantes por mulheres no período pós menopausa (PANTAVOS et al., 2015). Merece destaque nesse sentido o micronutriente essencial selênio, que apresenta papel promissor na redução do risco de diferentes tipos de câncer, inclusive o de mama (ALATISE; SCHRAUZER, 2010; IP, 1998; LIU et al., 1991; WHANGER, 2007).

2.2.1 Selênio e câncer de mama

O (Se) foi descoberto em 1817 pelo químico Jöns Jacob Berzelius e foi considerado um elemento tóxico durante muitos anos. Apenas em 1957 observou-se que a ausência de selênio na dieta era responsável por necrose hepática observada em animais e a sua adição poderia reverter tal quadro, demonstrando que o selênio é um micronutriente essencial (SCHWARZ; FOLTZ, 1957).

Sabe-se que o Se desempenha função em diversos processos regulatórios do organismo, como manutenção do sistema imune e reprodutivo, além da modulação do risco de doenças, como as cardiovasculares e câncer (RAYMAN, 2012). Uma das formas através das quais esse micronutriente atua no organismo é por meio da ação de selenoproteínas; proteínas que apresentam o aminoácido selenocisteína em sua composição, como é o caso da glutationa peroxidase 1 (GPx1), selenoproteína responsável pela redução do peróxido de hidrogênio (ROTRUCK et al., 1973).

Embora o consumo de Se varie amplamente em âmbito mundial, de 7 a 4990 μg/dia devido a diferentes concentrações de selênio no solo de diferentes regiões, o consumo diário recomendado desse micronutriente é de 50-60 μg, quantidade necessária para a atividade máxima da GPx1 (RAYMAN, 2012). No entanto, a maior parte dos países no mundo apresenta consumo de selênio abaixo do recomendado (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011).

Na década de 1970, observou-se que a taxa de mortalidade causada por diversos tipos de câncer era menor em indivíduos que moravam em locais caracterizados pela alta concentração de Se no solo (SHAMBERGER; WILLIS, 1971). Porém, o interesse pelo potencial anticarcinogênico desse micronutriente foi realmente impulsionado com a publicação de Clark e colaboradores (1996) sobre os resultados do *Nutritional Prevention of*

Cancer Study, em que indivíduos cuja dieta foi suplementada com Se (levedura enriquecida com Se) em concentrações supranutricionais (200 μg) apresentaram uma incidência significativamente menor de câncer de pulmão, cólon e próstata.

Em 2001 iniciou-se o SELECT (*Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial*), estudo que analisou o efeito da suplementação com Se (selenometionina) no risco de câncer de próstata e cujos resultados mostraram que não houve, entretanto, proteção (LIPPMAN et al., 2009). Visto que parte dos estudos populacionais aponta para o efeito protetor do Se, tal resultado inesperado indica que são necessários mais estudos que considerem, inclusive, dose e forma química de Se a serem utilizadas, para se estabelecer uma relação entre este composto e o desenvolvimento de diferentes neoplasias (EL-BAYOUMY, 2009; HATFIELD; GLADYSHEV, 2009).

Mais especificamente em relação ao câncer de mama, observou-se que indivíduos portadores dessa neoplasia apresentam concentrações inferiores de Se no plasma e unhas em relação indivíduos saudáveis (ALATISE; SCHRAUZER, 2010; LOPEZ-SAEZ et al., 2008; MÄNNISTÖ et al., 2000; REJALI; JAAFAR; ISMAIL, 2007). Além disso, observou-se que o maior consumo de selênio, estimado a partir de questionário de frequência alimentar, resultou em menor incidência de mortalidade por câncer de mama em mulheres suecas portadoras da doença (HARRIS; BERGKVIST; WOLK, 2012), bem como em menor ocorrência de quebras no DNA de mulheres portadoras de polimorfismo no gene BRCA1 (KOTSOPOULOS et al., 2010; KOWALSKA et al., 2005).

Em modelos conduzidos em animais, a ação anticarcinogênica do Se mostrou-se dependente da dose administrada e, principalmente, da forma química em que o micronutriente se encontra (IP et al., 1991). Selenito e selenometionina constituem formas muito utilizadas em experimentos de quimioprevenção do câncer de mama (IP; HAYES, 1989). O consumo de dieta contendo de 3-5 ppm de selenito de sódio por ratas da linhagem Sprague-Dawley inibiu em 50% a carcinogênese mamária quimicamente induzida pelo carcinógeno DMBA (IP, 1981; LIU et al., 1991; THOMPSON et al., 1982). A selenometionina administrada nas mesmas concentrações, no entanto, foi menos eficiente do que o selenito, tanto em relação ao número de tumores, como à incidência dos mesmos em animais induzidos com DMBA. Esse efeito poderia ser explicado pelo fato da selenometionina ser incorporada em proteínas no lugar de metionina, reduzindo sua

metabolização a metilselenol, composto indicado como responsável pela ação anticarcinogênica do Se (IP; HAYES, 1989; THOMPSON; MEEKER; KOKOSKA, 1984). Por outro lado, a deficiência de Se na dieta (0,02-0,1 ppm) pode promover o desenvolvimento desse tipo de neoplasia em animais iniciados com DMBA (IP; DANIEL, 1985; IP, 1981).

Alguns dos possíveis mecanismos responsáveis pelo efeito protetor do Se contra o desenvolvimento de câncer foram tema de diversas revisões (EL-BAYOUMY, 2001; JACKSON; COMBS, 2008; RAYMAN, 2005), sendo eles a diminuição na formação de adutos de DNA pelo agente carcinogênico DMBA, o que explicaria a proteção na fase de iniciação da doença; efeito antioxidante por meio da enzima glutationa peroxidase; indução de apoptose e inibição da proliferação celular. Ainda, o Se pode modular diferentes alvos moleculares em linhagens de câncer de mama, como genes responsáveis pelo controle do ciclo celular como ciclina D1 e cdk4, bem como aqueles envolvidos com processos apoptóticos, como c-jun e GADD153 (DONG et al., 2002), bem como o gene que codifica para o receptor de estrógeno (ERα) (LEE et al., 2005a).

O Se se destaca também por sua influência em processos epigenéticos (DAVIS; UTHUS; FINLEY, 2000; XIANG et al., 2008; BARRERA et al., 2008). Em células LNCaP de câncer de próstata o tratamento com selenito inibiu a expressão de DNMT1, 3a e de HDAC, bem como induziu a desmetilação do promotor do gene GSTP1, envolvidos na proteção contra estresse oxidativo (XIANG et al., 2008). De forma interessante, o tratamento dessa mesma linhagem com selenometionina não alterou a expressão de GSTP1 (RAMACHANDRAN et al., 2007), ressaltando a importância da forma química de selênio. Em células tumorais de cólon Caco-2, o tratamento com Se reduziu a metilação do promotor do gene supressor de tumor $p16^{INK4A}$ (BARRERA et al., 2008), enquanto a deficiência de Se induziu hipometilação global do DNA (DAVIS; UTHUS; FINLEY, 2000).

2.3 Programação fetal

Programação fetal, também conhecida como hipótese desenvolvimentista de doenças crônicas ou ainda Hipótese de Barker, refere-se à constatação de que existem períodos específicos no desenvolvimento em que o organismo se encontra mais suscetível a alterações no ambiente. Dessa forma, estímulos e insultos durante esses breves períodos podem causar

alterações em estruturas e funções de órgãos e sistemas, alterações essas que podem modular o risco de desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta desse organismo (BARKER, 2004).

Diversos estudos, tanto epidemiológicos quanto em modelos animais, foram realizados para analisar o impacto de fatores ambientais na programação de doenças. Nesse sentido, a ocorrência de infecções virais no sistema nervoso central durante a infância foi relacionada ao desenvolvimento de esquizofrenia na idade adulta (DALMAN et al., 2008). Animais expostos a altas concentrações de glicocorticoides durante o período fetal apresentaram baixo peso ao nascer e tiveram seu metabolismo de glicose programado, como observado pela hiperglicemia e resistência à insulina na vida adulta (NYIRENDA et al., 1998). Ratos expostos a bisfenol-A durante o período embrionário tornaram-se mais suscetíveis ao surgimento de lesões pré-neoplásicas na próstata (HO et al., 2006).

Assim como outras doenças crônicas não transmissíveis, o câncer de mama pode apresentar sua origem no período embrionário. Em 1990, Trichopoulos sugeriu que o risco de desenvolvimento do câncer de mama estaria associado a concentração de estrógeno a que o indivíduo foi exposto durante o período gestacional. Tendo em vista que a concentração de estrógeno durante esse período pode ser indiretamente avaliada pelo peso ao nascer, gestação de gêmeos dizigóticos e ocorrência de eclampsia, entre outros fatores, notou-se que os dois primeiros estão associados a um aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama na vida adulta, enquanto o último foi relacionado à diminuição nesse risco (EKBOM et al., 1992). Do mesmo modo, filhas de mulheres que utilizaram o composto dietilestilbestrol, estrógeno sintético prescrito na década de 40 para mulheres que apresentavam risco de aborto, durante a gestação, apresentaram um aumento no risco de desenvolvimento de câncer de mama (PALMER et al., 2006).

Estudos experimentais também corroboram as observações de estudos epidemiológicos; ratas com maior concentração plasmática de estrógeno durante a gestação tiveram filhas que apresentaram maior suscetibilidade à carcinogênese mamária quimicamente induzida (HILAKIVI-CLARKE et al., 1997). A exposição *in utero* a altas concentrações de estrógeno causou em ratas aumento no número de TEBs, aumento na proliferação e diminuição de morte celular nessas estruturas, bem como alterações na expressão de genes como a caveolina-1 e seus alvos *downstream* (SHAJAHAN et al., 2010).

Dentre os diversos elementos capazes de alterar o ambiente intrauterino e, por meio disso, alterar a suscetibilidade da prole feminina ao câncer de mama na vida adulta, a alimentação materna apresenta papel de destaque.

2.4 Programação fetal e nutrição

Um dos principais exemplos do impacto da alimentação na programação fetal se deu em decorrência da Fome Holandesa. Durante o inverno de 1944-1945, em meio à Segunda Guerra Mundial, tropas alemãs impediram o fluxo de alimentos da zona rural à zona urbana da Holanda. Dessa forma, o consumo calórico da população da região caiu abruptamente de 2000 calorias para cerca de 400-800 calorias por dia, até que, ao final do cerco, a ingestão calórica retornou aos seus valores originais. Estudos mostraram que indivíduos expostos a essa restrição alimentar durante o período fetal apresentaram maiores índices de obesidade, resistência à insulina, aumento da pressão arterial e risco de doenças cardiovasculares na vida adulta (ROSEBOOM et al., 2001).

A alimentação materna vem sendo considerada um dos principais fatores de modulação do ambiente intrauterino e que poderia programar o risco de desenvolvimento de câncer de mama na progênie (HILAKIVI-CLARKE; DE ASSIS, 2006; HILAKIVI-CLARKE, 2007). Estudos conduzidos com ratas mostram que diferentes intervenções nutricionais durante o período gestacional podem aumentar a suscetibilidade da progênie feminina à carcinogênese mamária quimicamente induzida. Esse efeito se dá por meio da alteração na diferenciação da glândula mamária e expressão de genes relacionados à proliferação celular e apoptose (HILAKIVI-CLARKE; DE ASSIS, 2006; HILAKIVI-CLARKE, 2007).

Hilakivi-Clarke e colaboradores (1997) alimentaram ratas prenhas com dieta em que cerca de 40% das calorias eram provenientes de óleo de milho (rico em ácidos graxos ω–6) e observaram que, ao induzir a carcinogênese mamária na progênie feminina com o carcinógeno DMBA, a incidência de tumores foi maior e a latência de seu aparecimento foi menor, quando comparado à progênie do grupo controle (cerca de 15% das calorias totais provindas de óleo de milho). Ion e colaboradores (2010), por outro lado, observaram que o consumo de dieta com alto teor de ácidos graxos da família ω-3, provenientes do óleo de

canola, por ratas prenhas, reduziu o desenvolvimento tumoral no tecido mamário da progênie feminina.

A ingestão de álcool por ratas prenhas causou aumento no nível de 17β-estradiol no plasma das mesmas, assim como aumento, na progênie feminina, do número de TEBs, bem como da incidência e número de tumores, (HILAKIVI-CLARKE et al., 2004). Recentemente, verificou-se que a suplementação da dieta materna com ácido fólico aumentou o risco de desenvolvimento de tumores mamários nas filhas, aumentando a multiplicidade de tumores e diminuindo o período de latência do aparecimento dos mesmos (LY et al., 2011).

Estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa mostrou que o consumo de dieta rica em lipídios provindos de fonte animal (banha) por ratas no período de gestação ou gestação e lactação causou diminuição no risco de desenvolvimento de câncer de mama na progênie feminina (DE OLIVEIRA ANDRADE et al., 2014). Esse resultado foi acompanhado por diminuição na elongação da árvore epitelial mamária e diminuição na proliferação celular, além da modulação na expressão de proteínas e alteração da expressão global de H3K9me3.

Um dos mecanismos através dos quais a nutrição durante períodos-chave do desenvolvimento pode causar a programação de fenótipos na vida adulta é pela modulação de processos epigenéticos. Diversos estudos utilizando modelos animais foram realizados nesse sentido. Observa-se que larvas fêmeas de abelhas podem originar abelhas operárias ou rainhas. Seu destino é dependente da dieta recebida durante o período larval, sendo que essa influência da dieta é exercida por meio da modificação nos padrões de metilação do DNA (KUCHARSKI et al., 2008).

Experimentos com camundongos *Agouti* mostraram que a dieta materna durante o período gestacional tem profunda influência no padrão de metilação do genoma dos filhotes, alterando o padrão fenotípico da prole em relação à coloração da pelagem e, adicionalmente, seu metabolismo e suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças crônicas, como obesidade (COONEY; DAVE; WOLFF, 2002). Em ratas, a suplementação da alimentação materna com ácido fólico reverteu as alterações na metilação do DNA e em histonas induzidas por restrição proteica (CRACIUNESCU et al., 2004; LILLYCROP et al., 2007). A hipometilação do promotor do receptor de estrógeno α no tecido mamário de ratas jovens também pode ser modulado *in utero* com dieta materna com alto teor de ácidos graxos ω-6, resultando em

aumento do risco de câncer de mama (YENBUTR; HILAKIVI-CLARKE; PASSANITI, 1998).

A deficiência ou suplementação com Se durante o período gestacional poderia ter consequências fundamentais para o risco de desenvolvimento de câncer na progênie. Estudo pioneiro desenvolvido por Popova (2002), verificou que camundongos sujeitos a suplementação com selenito na água de beber durante a última semana de gravidez e dez dias após o parto causou na progênie masculina diminuição significativa no número de tumores espontâneos no fígado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar se o consumo de ração deficiente (0,05 ppm) ou suplementada (1 ppm) com selênio, sob a forma de selenato de sódio, por ratas durante o período gestacional influencia a suscetibilidade da prole feminina à carcinogênese mamária quimicamente induzida, bem como possíveis mecanismos celulares, moleculares e epigenéticos envolvidos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar as concentrações de selênio no sangue total de ratas prenhas expostas à ração deficiente (0,05 ppm) ou suplementada (1 ppm) com selênio durante o período gestacional;
- Determinar as concentrações de selênio no plasma e eritrócitos e atividade da enzima GPx nos eritrócitos da progênie de 3 e 7 semanas de ratas expostas à ração deficiente (0,05 ppm) ou suplementada (1 ppm) com selênio durante o período gestacional;
- Avaliar as concentrações de malonaldeído no fígado da progênie de ratas expostas à ração deficiente (0,05 ppm) ou suplementada (1 ppm) com selênio durante o período gestacional;
- Avaliar a morfologia da glândulas mamárias da progênie de ratas expostas à ração deficiente (0,05 ppm) ou suplementada (1 ppm) com selênio durante o período gestacional;
- Avaliar em glândulas mamárias da prole de ratas expostas à ração deficiente (0,05 ppm) ou suplementada (1 ppm) com selênio durante o período gestacinal:

- Padrão de metilação global do DNA

- Padrão de acetilação de histonas H4K16 e H3K9, de metilação de H4K20, H3K27, H3K9 e H3K4

-Expressão dos receptores ERα e HER-2

- Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose

-Expressão de oncogenes e genes supressores de tumor relacionados ao desenvolvimento de câncer de mama

-Estado de metilação da região regulatório do gene Erα

- Avaliar o desenvolvimento de neoplasias mamárias induzidas pelo carcinógeno DMBA na progênie de ratas expostas à ração deficiente (0,05 ppm) ou suplementada (1 ppm) com selênio durante o período gestacional;
- Realizar análise histopatológica dos tumores de mama da progênie de ratas expostas à ração deficiente (0,05 ppm) ou suplementada (1 ppm) com selênio durante o período gestacional;
- Avaliar padrão de acetilação de histonas H4K16 e H3K9, de metilação de H4K20, H3K27, H3K9 e H3K4 nos tumores mamários na progênie de ratas expostas à ração deficiente (0,05 ppm) ou suplementada (1 ppm) com selênio durante o período gestacional.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos e ratas da linhagem Sprague-Dawley, obtidos da colônia do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo (FCF/IQ-USP), mantidos em gaiolas de polipropileno com tampas de aço inoxidável e contendo maravalha previamente esterilizada. O ensaio biológico foi realizado nas dependências do biotério da FCF/IQ-USP, em ambiente com temperatura e umidade ambiental controladas, sob ciclo de 12hs claro-escuro. O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FCF-USP (Protocolo CEUA/FCF/326).

4.2 Rações ofertadas durante o período gestacional

Ratas prenhas da linhagem Sprague-Dawley dos grupos CO, SUP e DEF foram alimentadas com ração formulada com base na AIN-93G (Reeves et al., 1993), apresentando alterações apenas quanto à concentração de selenato de sódio no mix de minerais. Dessa forma, o grupo controle recebeu ração contendo 0,15 ppm de Se e o grupo SUP recebeu ração contendo 1 ppm de Se. Ao grupo DEF, no entanto, foi ofertada ração em que não houve o acréscimo de selenato de sódio, visto que a caseína apresenta quantidade residual de selênio, resultando em uma concentração de cerca de 0,05 ppm de Se.

4.3 Protocolo experimental

Após período de aclimatação (uma semana) as ratas foram distribuídas aleatoriamente em 3 grupos com quantidade inicial de 10 ratas cada (Figura 4) e iniciaram o consumo das respectivas rações experimentais. Após duas semanas, as ratas (8 semanas de idade) foram acasalas com ratos de 10 semanas de idade na proporção de 1 macho para cada 2 fêmeas por gaiola. O acasalamento foi realizado no período escuro e o dia gestacional foi determinado por presença de esperma no esfregaço vaginal.

Grupo CO: ratas que receberam durante a gestação ração AIN-93G contendo 0,15 ppm de Se sob a forma de selenato de sódio e cuja parte da progênie feminina foi eutanasiada com 7 semanas de idade e parte iniciada com DMBA e eutanasiada com 15 semanas de idade;

Grupo DEF: ratas que receberam durante a gestação ração AIN-93G contendo 0,05 ppm de Se sob a forma de selenato de sódio e cuja parte da progênie feminina foi eutanasiada com 7 semanas de idade e parte iniciada com DMBA e eutanasiada com 15 semanas de idade;

Grupo SUP: ratas que recebem durante a gestação ração AIN-93G contendo 1 ppm de Se sob a forma de selenato de sódio e cuja parte da progênie feminina foi eutanasiada com 7 semanas de idade e parte iniciada com DMBA e eutanasiada com 15 semanas de idade;

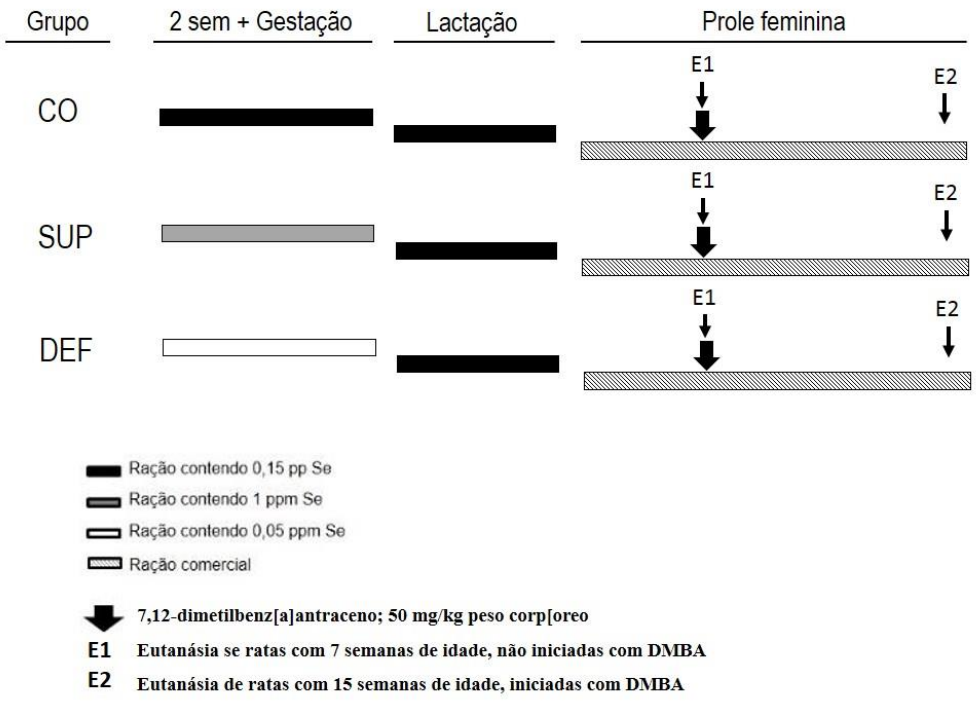

Figura 4. Desenho experimental.

Após o nascimento, parte da progênie foi mantida com a rata mãe (até 8 filhotes por mãe) em gaiolas de polipropileno com tampas de aço inoxidável contendo maravalha previamente esterilizada (1 gaiola para cada ninhada). A ração das mães dos grupos DEF e SUP foi modificada para a ração do grupo controle (0,15 ppm Se) a partir do nascimento e mantida até o final do período de lactação. A progênie de todos os grupos foi desmamada

após 3 semanas do nascimento, alimentada com ração comercial e mantida em gaiolas de polipropileno com tampas de aço inoxidável contendo maravalha previamente esterilizada. Vinte animais da progênie feminina de cada grupo foram submetidos ao modelo de carcinogênese mamária por meio de iniciação com DMBA, sendo eutanasiados com 15 semanas de idade. O restante da prole feminina foi eutanasiada com sete semanas de idade. A prole masculina foi eutanasiada com 3 e 7 semanas e o material colhido (plasma, eritrócitos e tecido hepático) para análises do estado nutricional da progênie.

4.4 Avaliação da concentração de Se no plasma, eritrócitos e sangue total

Para a avaliação da concentração de selênio, utilizaram-se amostras de sangue total de ratas prenhas no 17º dia de gestação e de sua progênie masculina e feminina no dia do nascimento, bem como de plasma da progênie masculina com 3 semanas de idade e plasma e eritrócitos da progênie masculina com 7 semanas de idade. As amostras foram transferidas para tubos contendo ácido nítrico e submetidas a aquecimento gradual de 50 a 150°C em bloco digestor. Após total digestão das amostras, adicionou-se ácido clorídrico (1,2N) e as amostras foram aquecidas até 200°C durante 2h, para a redução do Se VI a Se IV. Por fim, estas amostras foram diluídas para 25mL com água deionizada e submetidas à leitura por espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos acoplados a cela de quartzo (GONZAGA, 2002).

4.5 Atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx)

A determinação da atividade da GPx foi realizada em amostras de eritrócitos da prole masculina de 3 e 7 semanas de idade com o auxílio de kits comerciais (Ransel 505 – RANDOX Laboratories, Crumlin/UK) adaptados para o uso em analisador bioquímico automático (Liasys® MAS, Rome, Italy). O método se baseia na oxidação da glutationa reduzida por um hidroperóxido, catalisada pela GPx. Na presença da enzima e do cofator NADPH, a glutationa oxidada é imediatamente convertida à forma reduzida com a oxidação concomitante do NADPH em $NADH^+$ (PAGLIA; VALENTINE, 1967).

4.6 Análise das concentrações de malonaldeído no tecido hepático da progênie masculina de 3 e 7 semanas

Amostras de tecido hepático (100 mg) da prole masculina (n = 5/grupo), dos grupos CO, SUP e DEF, de 3 e 7 semanas, foram homogeneizadas e transferidas para um eppendorf de 1,5 mL contendo 12,5 µL de BHT 0,2% e 6,25 µL de NaOH 10N. As amostras foram aquecidas em banho a 60 ºC por 3 minutos. Após resfriamento em gelo por 10 minutos, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4ºC por 10 minutos. Após centrifugação, 500 µL do sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf de 2 mL, e adicionou-se 250 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6% a cada amostra. Novamente as amostras foram aquecidas em banho a 95ºC por 30 minutos. Após resfriamento em gelo por 10 minutos, foi realizada a extração de malondialdeído (MDA) com 750 µL de butanol por 15 segundos em vórtex na velocidade máxima. Após extração, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm a 4ºC por 10 minutos. 650 µL do sobrenadante foi filtrado utilizando-se microfiltro de 13 mm (Millex®, Millipore) e transferido para leitura em HPLC com detector DAD 532 ηm, coluna Phenomenex Reverse-phase C18(250 mm x 4,6 mm x 5 µm), fluxo de 1 mL/min. Os resultados são expressos em ng/mg de proteína.

4.7 Indução da carcinogênese mamária na progênie feminina

As neoplasias mamárias foram induzidas pelo modelo clássico que emprega o carcinógeno DMBA para iniciação da progênie feminina dos grupos CO, DEF e SUP com 7 semanas de idade. Os animais receberam, por intubação gástrica, uma dose única dose (50 mg/kg de peso corpóreo) de DMBA (Sigma, EUA) dissolvida em óleo de milho em volume final de 0,5mL (de OLIVEIRA ANDRADE et al., 2014). Após 7 semanas da indução da carcinogênese mamárias, os animais forma eutanasiados em câmera de CO_2. Após a eutanásia, as glândulas e neoplasias mamárias foram retiradas, lavadas em solução salina 0,9%. Um fragmento do material foi fixado em formalina tamponada neutra a 10% e o restante congelado em nitrogênio líquido e armazenado em “freezer” a –80ºC para futuras análises.

4.8 Análise macroscópica das mamas

Após quatro semanas da iniciação com DMBA, todos os animais foram apalpados a cada três dias de modo a se registrar a presença, localização e data de detecção de todas as neoplasias mamárias (WHITSETT; CARPENTER; LAMARTINIERE, 2006). Foram analisados: latência de aparecimento de neoplasias mamárias; incidência de neoplasias mamárias (número de animais com neoplasias/número total de animais), número médio (número de neoplasias/animal), multiplicidade (número de neoplasias/animal com tumores) e peso das neoplasias mamárias.

4.9 Análise histopatológico dos tumores mamários da progênie feminina por meio de coloração por hematoxilina e eosina (H&E)

Cortes de neoplasias mamárias foram fixados em formalina tamponada neutra a 10% e corados com H&E como descrito por Junqueira e Junqueira (1983). O exame histopatológico dos tecidos foi realizado classificando-as em papilífero, cribiforme, cribiforme/comedo, misto e tubular, além de carcinoma in situ (CIS), caracterizado por ser uma lesão inicial não invasiva (COSTA; SOLANAS; ESCRICH, 2002).

4.10 Morfologia da glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas

Uma das glândulas mamárias abdominais da prole feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP foi utilizada para montagem total para contagem de TEBs (Terminal End Buds). Para a montagem total, o tecido mamário foi incubado em fixador (6 partes de tanol 100%, 3 partes de clorofórmio e 1 parte de ácido acético glacial) por período *overnight*. Posteriormente as lâminas foram lavadas por 15 min em etanol 70, 50 e, por fim 30%. As lâminas foram então lavadas em água por 5 min e incubadas com carmine (Sigma-Aldrich) *overnight*. O material foi então lavado em água corrente para retirada de excesso de corante e lavado por 15 min em etanol 90, 95 e 100% e permaneceram no xilol para retirada de gordura do tecido. As TEBs foram contadas na periferia da árvore epitelial (DE ASSIS et al., 2010).

4.11 Avaliação da expressão gênica no tecido mamário da progênie feminina de 7 semanas

4.11.1 Expressão de mRNA por qPCR

A extração de RNA do tecido mamário foi realizada com RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen), de acordo com suas instruções e sua concentração e pureza foram determinadas por espectrofotometria (Nanodrop1000, ThermoScientific). A conversão do RNA para cDNA pela enzima transcriptase reversa foi realizada com High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) de acordo com instruções do fabricante, utilizaram-se 2 μg de RNA para a reação.

Adicionou-se ao cDNA (concentração final de 1,25 ng/μl) 5 μl de SYBR green Master mix (EvaGreen, Biotium) e 0.5 μl dos primers (5 μg/μl) (Tabela 1). A reação de amplificação foi realizada no aparelho Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e consistiu em duas etapas: etapa de 15 min a 95ºC e 40 ciclos de 95 ºC por 10 s e 60 ºC por 30 s. Cada amostra foi utilizada em triplicata. Os níveis absolutos de expressão gênica foram determinados utilizando-se uma curva relativa de concentração, a eficiência da reação foi considerada adequada entre 90-110%. Por meio do programa GENORM, os genes *Gapdh*, *Tbp*, *Actina* e *Hprt* foram testados e o gene *Gapdh* foi escolhido como o melhor candidato a gene de referência. O nível de expressão dos genes alvo foram normalizados pelo gene de referência *Gapdh*. Os primers foram desenhados utilizando-se o programa IDT tool primer design e confeccionados pela IDT (Integrated DNA Technologies, USA).

Tabela 1. Sequência de primers utilizados para análise de expressão gênica

Gene	Foward	Reverse
Actina	5' GAG ACC TTC AAC ACC CCA GC 3'	5' CAG TGG TAC GAC CAG AGG AC 3'
Brca1	5' AGA GTA AAT GCA CCC GAT GG 3'	5' TGC CCT CAG AAA AGT CAC AAG 3'
c-myc	5' CTC GCG TTA TTT GAA GCC TG 3'	5' TCG CAG ATG AAA TAG GGC TG 3'
DNMT3a	5' GGT CAT GTG GTT CGG AGA TG3'	5' AGG ACT TCG TAG GAG ATG GTG 3'
DNMT3b	5' AGA TAC TGT TGC TGT TTC GGG 3'	5' TGG TAG GAG ATG GAG ATG GTG 3'
ERα	5' GGC ACA TGA GTA ACA AAG GCA 3'	5' GGC ATG AAG ACG ATG AGC AT 3'
GAPDH	5' TCT CTG CTC CTC CCT GTT CT 3'	5' TAC GGC CAA ATC CGT TCA CA 3'
Her-2	5' AAA TCC CCG TGG CTA TCA AG 3'	5' GCT GTA CTG TGG ATG TCA GG 3'
HPRT	5' CCC CAA AAT GGT TAA GGT TGC 3'	5' AAC AAA GTC TGG CCT GTA TCC 3'
KI67	5' ATT CAG GCC CTG CGA AGC CG 3'	5' GCG TTG AAG GTA GGT GCC CCA 3'
Rassf1a	5' TTC ACC TGC CAT TAC CGA TG 3'	5' CTC AGT CTC AGC TTG GGA AAG 3'
Tbp	5' CAG GCA CCA CCC CCT TGT ATC CTTC 3'	5' AGA GCT CTG AGA GGC TGG TGT GGC 3'

4.11.2 Expressão de proteínas por western blot

Para a extração de proteínas totais, 100 mg de tecido macerado foram homogeneizados com 200 ml de tampão RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris base pH 7.5, 1% Igepal CA-630, 0.5% Na deoxcicolato), acrescido de coquetel inibidor de protease (Complete Mini, Roche, 1 tablete para 10 ml de RIPA), 1 mM de ortovanadato de sódio, 1 mM PMSF, 10 mM glicerofosfato e 250 mM prirofosfato de sódio. A solução foi mantida em gelo por 30 minutos e centrifugada por 10 minutos à velocidade máxima. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e a quantificação de proteína foi realizada utilizando-se o kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific). As amostras foram diluídas a uma concentração de 0,9 µg/µL em tampão RIPA e *Loading Buffer* (Invitrogen) já acrescido de β-mercaptoetanol (sigma) na proporção 4:1.

A separação e detecção das proteínas foi realizada por eletroforese (SDS-PAGE) em gel de poliacrilamida 4-12% (WG1402, Life Technologies, USA) e tampão de corrida Tris-glicina 1x, utilizando um tanque de eletroforese vertical (XCell4 SureLock™ Midi-Cell, Life Technologies, USA). Depois, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de

nitrocelulose com o aparelho iBlot2 (IB23001, Life Technologies, USA). A membrana foi bloqueada com leite desnatado diluído em TBS-T (5%) por uma hora a temperatura ambiente, sob agitação. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário (Tabela 2) diluído em TBS-T (1:1000), overnight a 4°C. A membrana foi incubada com o anticorpo secundário (Tabela 1) diluído em leite 5% (1:5000) por uma hora.

Para o controle, a membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (1:1000), overnight a 4°C sob agitação e, então com anticorpo anti-goat (1:5000) por uma hora a temperatura ambiente, sob agitação. A imunodetecção foi feita utilizando-se o reagente *Chemiluminescent HRP Antibody Detection reagent* (E2400, Denville Scientific Inc., USA) e o sinal capturado em filme (eba45, Radiomat).

Tabela 2. Anticorpos utilizados em experimentos de análise da concentração de proteínas

Anticorpo	Empresa	Código
Anti-Rabbit	Santa Cruz	sc-2030
Anti-Mouse	Santa Cruz	sc-2031
Anti-Goat	Santa Cruz	sc-2020
ACTINA	Santa Cruz	sc-1616
AKT	Cell Signaling	9272
BAX	UPSTATE	06-499x4
BCL-2	UPSTATE	554279
CAV-1	Cell Signaling	3238
c-JUN	Cell Signaling	9165
c-RAF	Cell Signaling	9422
EGFR	Cell Signaling	2232
ERα	Santa Cruz	sc-542
EZH2	Cell Signaling	4905
H3K27me3	Cell Signaling	4395
H3K4me	Cell Signaling	9723
H3K9ac	Abcam	61231

Tabela 2 (CONT.). Anticorpos utilizados em experimentos de análise da concentração de proteínas

Anticorpo	Empresa	Código
H3K9me2/3	Cell Signaling	5327
H4K16ac	Abcam	109463
H4K20me3	Cell Signaling	5737
HER-2	Invitrogen	H01011
ERK	Cell Signaling	4695
mTOR	Cell Signaling	2983
P-cJUN	Cell Signaling	9164
P-ERK	Cell Signaling	4730
P-mTOR	Cell Signaling	5536
PTEN	Cell Signaling	9559
RAS	Cell Signaling	3965
RASSF1AA	Abcam	180801
STAT5	Cell Signaling	9358

4.12 Análise do padrão global de modificações pós traducionais em histonas no tecido mamário da progênie feminina de 7 semanas e nos tumores mamários da progênie iniciada com DMBA

As histonas foram extraídas utilizando-se o kit *Histone Extraction Kit* (Abcam, ab113476), de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, incubou-se 100mg do tecido macerado com tampão de lise por 30 minutos e essa solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Ao sobrenadante, adicionou-se o tampão *Balance-DTT*. A concentração de histonas foi quantificada por meio do kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) e as amostras foram diluídas para a concentração de 0,3 µg/µL em tampão RIPA e *Loading Buffer* (Invitrogen) já acrescido de β-mercaptoetanol (sigma) na proporção 4:1.

A separação e detecção das modificações dos resíduos de histonas (acetilação das histonas H4K16 e H3K9 e trimetilação de H4K20, H3K9, H3K4 e H3K27) foi realizada por

meio da técnica de western blot (detalhada no item 3.11.2). Os anticorpos utilizados encontram-se na tabela 2. Utilizou-se a expressão de actina como controle para a normalização.

4.13 Análise do padrão de metilação global do DNA no tecido mamário da progênie feminina e tecido hepático da progênie masculina de 7 semanas

4.13.1 Extração do DNA

Amostras de tecido mamário e tecido hepático (100g) da progênie dos grupos CO, DEF e SUP de 7 semanas de vida foram incubadas com tampão de lise (Cell Lysis Solution, Qiagen) e proteinase K (20 mg/mL, Sigma Aldrich) sob agitação a 55 ºC por um período *overnight*. Posteriormente as amostras foram incubadas com RNAse A (15mg/mL, Sigma Aldrich) por uma hora sob agitação a 37 ºC. À solução acrescentou-se solução de precipitação de proteínas (Cell Protein Solution, Qiagen), o homogenato foi centrifugado a 16.000 rcf por 5 min a 4°C, ao sobrenadante acrescentou-se isopropanol gelado para precipitação do DNA e a solução foi centrifigada a 16.000 rcf por 5 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e precipitado lavado com etanol 70%. Centrifugou-se a solução novamente por 4 min a 5.000A rcf e o sobrenadante foi descartado. O DNA foi ressuspendido em água com desferroxamina (0,1 mM). As amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop1000, ThermoScientific).

4.13.2 Hidrólise do DNA e quantificação de 5-metil-dC

Foram hidrolisados 12 μg de DNA com tampão Tris– HCl/$MgCl_2$ 200 mM (pH 7,4) e DNAse 1 (Sigma Aldrich) por uma hora a 37ºC. O DNA foi incubado com fosfodiesterase (Sigma Aldrich) e fosfatase alcalina por uma hora a 37ºC. Alíquotas foram injetadas no Sistema analítico HPLC-DAD (Shimadzu Corporation) usando-se a coluna Luna C18(2) 250 mm x 4,6 mm ID, 5 microns (Phenomenex) com uma pré coluna C18 4,0 x 3,0 mm (Phenomenex) eluida com gradiente de ácido fórmico (0,1% em água) e CH_3OH (0 - 25 min, 0 - 18% CH_3OH; 25 – 27 min 18 - 0% CH_3OH, 27 - 37min, 0% CH_3OH) com fluxo de 1 mL/

min, 30 ° C. O detector DAD foi programado para 260 nm para quantificação de dC e 286 nm para quantificação de 5-metil-dC. A curva de calibração foi realizada em um intervalo de 0,5 a 6 nmol para dC e 0,005 para 0,4 nmol para 5-metil-dC.

4.14 Análise do estado de metilação da região regulatória do gene ERα por modificação com bissulfito e pirosequenciamento no tecido mamário da progênie feminina de 7 semanas

Inicialmente realizou-se a extração de DNA genômico, como detalhado no item 4.13.1. As amostras apresentaram razão 260/280 próximas a 2,0 e razão 260/230 entre 1,7 e 2,3. A empresa EpigenDx (MA, EUA) realizou a modificação com bissulfito e o pirosequenciamento. O DNA foi diluído para 45 µL e adicionou-se 5 µL de NaOH 3N, seguido por incubação de 30 minutos a 42 ºC para a desnaturação do DNA. Então, 100 µL de solução de bissulfito de sódio foram adicionados ao DNA e a solução foi incubada por 14 horas a 50ºC. O tratamento com bissulfito retira o grupo amina da citosina não metilada, sendo convertida em uracila, enquanto as citosinas metiladas são mantidas.

O DNA tratado foi purificado com a coluna *Zymogen* e eluído para 20 µl com T1E0.2 (1 mmol/L Tris, 0,2 mmol/L EDTA, pH 8,0) e 1 µl da solução foi utilizada para cada PCR. A PCR foi realizada com 0,2 µM de cada primer, sendo que um dos primers foi biotinilado para que o produto final da PCR pudesse ser purificado com microesferas de sepharose revestidas com estreptavidina. O produto da PCR foi ligado a *Streptavidin Sepharose HP* (GE Healthcare Life Sciences) e as microesferas contendo o resultado da PCR foram purificadas, lavadas e desnaturas com solução 0,2 M de NaOH e relavadas utilizando o *Pyrosequencing Vacuum Prep Tool* (Pyrosequencing, Qiagen) como recomendado pelo fabricante. 10 µl do produto da PCR foi sequenciado com o *Pyrosequencing PSQ96 HS System* (Pyrosequencing, Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. O estado de metilação de cada locus foi analisado individualmente como um SNP T/C utilizando o software *QCpG* (Pyrosequencing, Qiagen).

4.15 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (teste de Levene e Brown-Forsythe). Quando atendidos esses requisitos, às comparações foi aplicado o teste ANOVA seguido pelo Teste de Duncan. Quando não foi observada distribuição normal e, principalmente, a homogeneidade das variâncias, foi adotado teste estatístico não paramétrico de Kruskal Wallis ou Exato de Fisher. A análise estatística da incidência de tumores foi feita pelo teste de Kaplan-Meier (Kaplan-Meier survival analysis), seguido de Long Rank Test. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média e o nível de significância utilizado e de 5% ($p<0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no programa STATISTICA 8.0 (StatSoft).

5. RESULTADOS

5.1 Consumo de ração, peso corpóreo e concentração de Se sanguíneo de ratas mães dos grupos CO, DEF e SUP

O consumo de ração por ratas dos grupos CO, DEF e SUP foi acompanhado durante o período de pré-concepção, gestação e lactação (Figura 5A). Os três grupos apresentaram padrão de consumo semelhante. Não houve diferença (p>0,05) entre os três grupos quanto à média de consumo durante o período pré-concepcional (Figura 5B), de gestação (Figura 5C) e lactação (Figura 5D).

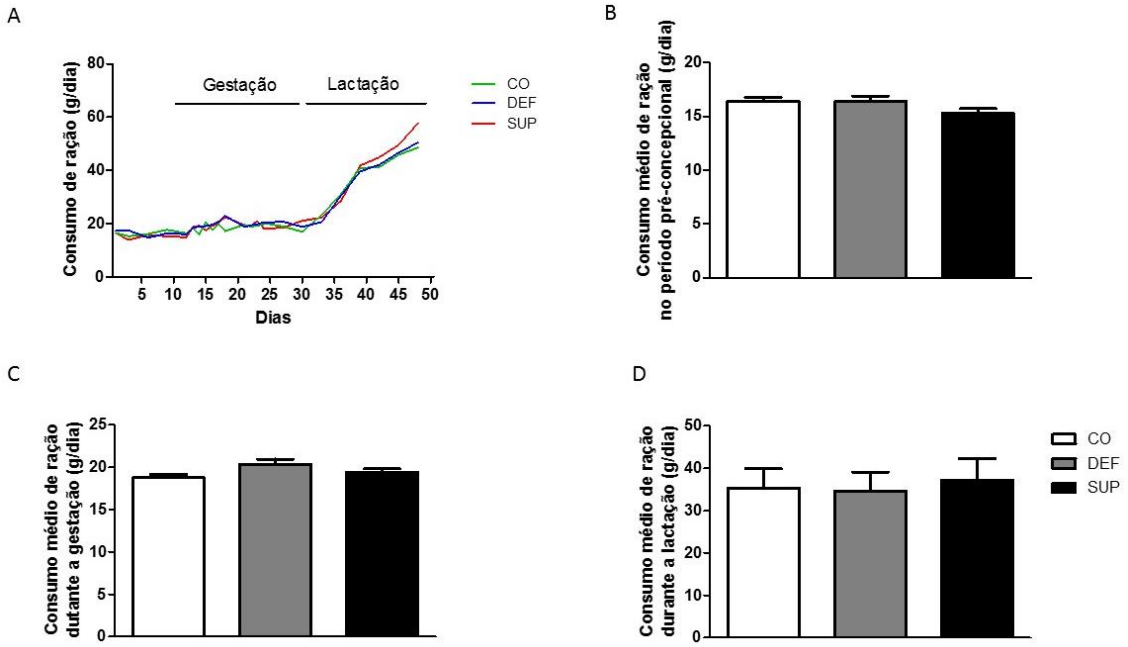

Figura 5. **Consumo de ração de ratas dos grupos CO, DEF e SUP durante o período pré-concepcional, gestacional e de lactação.** (A) O consumo de ração foi acompanhado durante o período pré-concepcional, gestacional e de lactação. (B) Consumo médio de ração durante o período pré-concepcional, (C) gestacional e (D) de lactação. Os dados foram expressos como média ± erro padrão. Não houve diferença significativa (Kruskal Wallis, p>0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

O ganho de peso das ratas dos grupos CO, DEF e SUP também foi acompanhado durante o período gestacional (Figura 6A). Os três grupos apresentaram ganho de peso semelhante. Não houve diferença (p>0,05) entre os grupos quanto à média de peso corpóreo durante o período gestacional (Figura 6B).

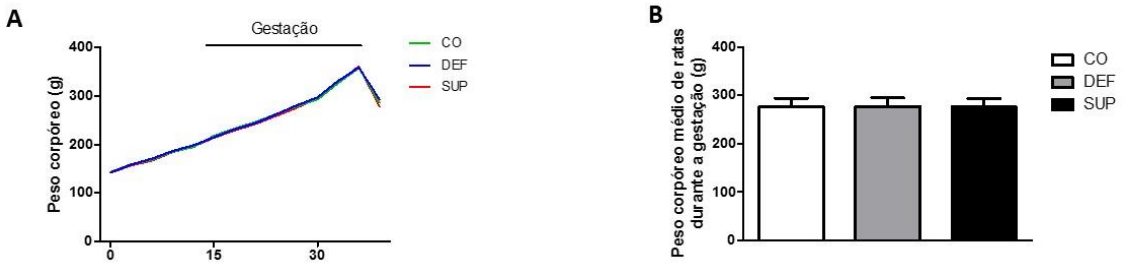

Figura 6. **Peso corpóreo de ratas dos grupos CO, DEF e SUP durante o período gestacional.** (A) O peso corpóreo das ratas foi acompanhado durante o período gestacional. (B) Peso corpóreo médio de ratas durante o período gestacional. Os dados foram expressos como média ± erro padrão. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis, p>0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

No 17º dia de gestação, amostras de sangue foram colhidas a fim de se quantificar a concentração de selênio (Figura 7). Ratas do grupo DEF apresentaram menores (p<0,05) concentrações de selênio no sangue em comparação às do grupo SUP e CO. Não houve diferença (p>0,05) entre a concentração de Se sanguíneo das ratas do grupo SUP e CO.

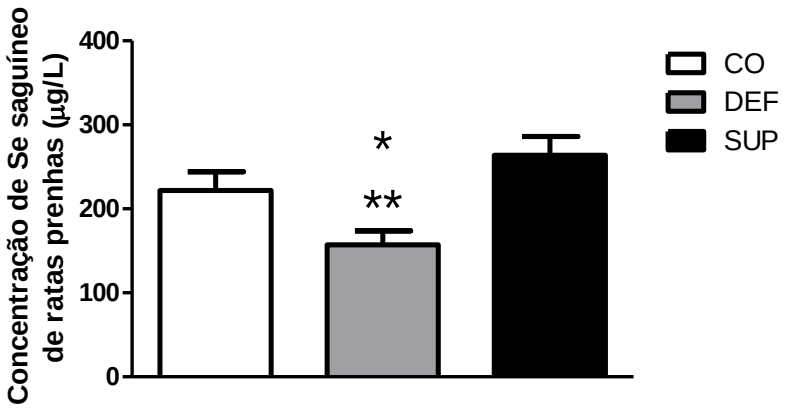

Figura 7. **Concentração de selênio no sangue de ratas prenhas dos grupos CO, DEF e SUP.** Os dados foram expressos como média ± erro padrão. Estatisticamente significativo quando comparado com o grupo CO* ou SUP** (ANOVA + Duncan, p<0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

5.2 Parâmetros da ninhada, consumo de ração, peso corpóreo e concentração sanguínea de selênio da progênie dos grupos CO, DEF e SUP

A Tabela 3 apresenta as características da ninhada dos grupos CO, DEF e SUP logo após seu nascimento. Não houve diferença (p>0,05) entre os grupos quanto ao número médio de filhotes por fêmeas, peso corpóreo da progênie masculina e feminina e razão nº de fêmeas/nº machos por mãe.

Tabela 3. Características da ninhada.

Grupo	nº total de mães	nº filhotes/mãe	nº fêmeas/ nº machos por mãe	Peso corpóreo fêmeas	Peso corpóreo machos
CO	09	10.7 ± 0.9	0,91 ± 0,4	6,4 ± 0,7	6,8 ± 0,7
DEF	08	10.4 ± 2.1	1,68 ± 1,26	6,7 ± 0,7	7 ± 0,8
SUP	06	10.8 ± 3.6	0,89 ± 0,35	6,5 ± 0,8	6,8 ± 0,7

Os resultados estão representados como média ± erro padrão. Não houve diferença entre os grupos (Kruskal Wallis, p>0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP – grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

A Figura 8 apresenta o peso corpóreo da progênie feminina dos grupos CO, DEF e SUP. A progênie feminina dos três grupos apresentou padrão de crescimento semelhante (Figura 8A). Não houve diferença (p>0,05) entre a progênie dos grupos quanto à média de peso corpóreo durante o ensaio biológico (Figura 8B).

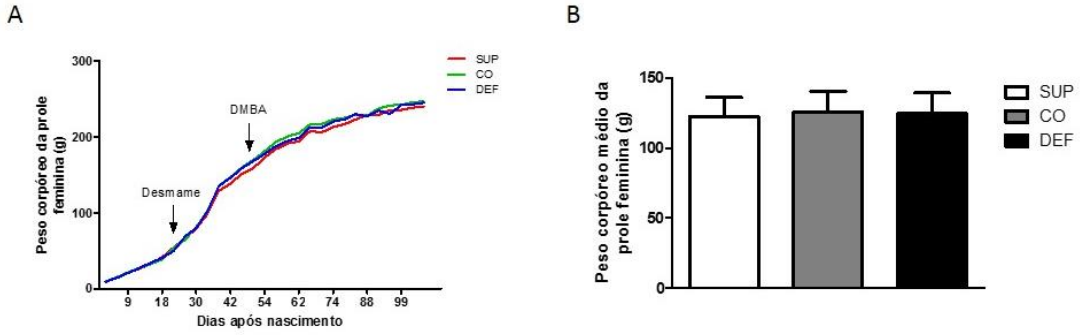

Figura 8. **Peso corpóreo da progênie feminina dos grupos CO, DEF e SUP.** (A) Peso corpóreo da progênie feminina durante ensaio biológico. (B) Peso corpóreo médio da progênie feminina. Os dados foram expressos como média ± erro padrão. Não houve diferença significativa (Kruskal Wallis, p>0,05). CO - grupo de ratas expostas a ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo de ratas expostas a ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo de ratas expostas a ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

Coletou-se sangue da progênie masculina e feminina dos grupos CO, DEF e SUP por ocasião do nascimento para verificação da concentração de selênio. Não houve diferença (p>0,05) entre a progênie dos grupos experimentais quanto às concentrações de Se sanguíneo (Figura 9).

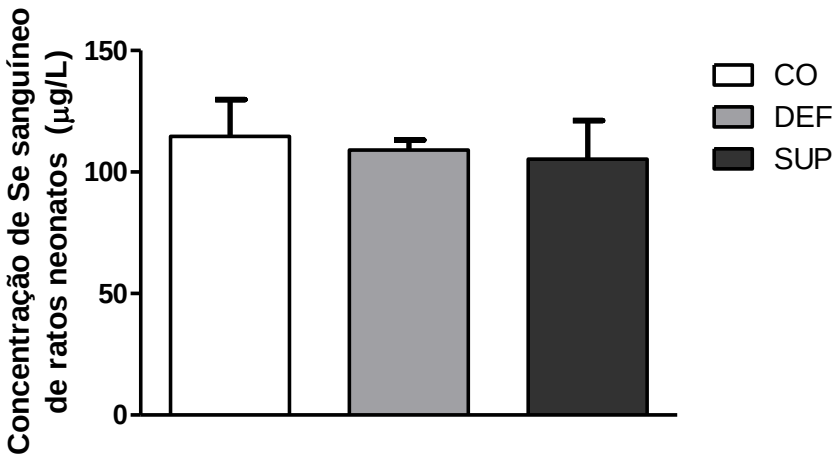

Figura 9. **Concentração de selênio no sangue da progênie masculina e feminina dos grupos CO, DEF e SUP por ocasião do nascimento.** Os dados foram expressos como média ± erro padrão. Não houve diferença entre os grupos experimentais (ANOVA, p>0,05). CO - grupo de ratas expostas a ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo de ratas expostas a ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo de ratas expostas a ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

A Figura 10 apresenta a concentração de selênio no plasma e a atividade da enzima antioxidante GPx nos eritrócitos da progênie masculina dos grupos CO, DEF e SUP com 3 semanas de vida. Em comparação à progênie do grupo CO, a progênie do grupo SUP apresentou maiores (p<0,05) concentrações de Se plasmático, enquanto a progênie do grupo DEF apresentou um aumento marginal (p=0,06) nas concentrações de Se plasmático (Figura 10A). A progênie de ratas do grupo DEF apresentou menor (p<0,05) atividade de GPx quando comparada à progênie do grupo CO, enquanto não foi observada diferença (p>0,05) entre as proles dos grupos CO e SUP (Figura 10B).

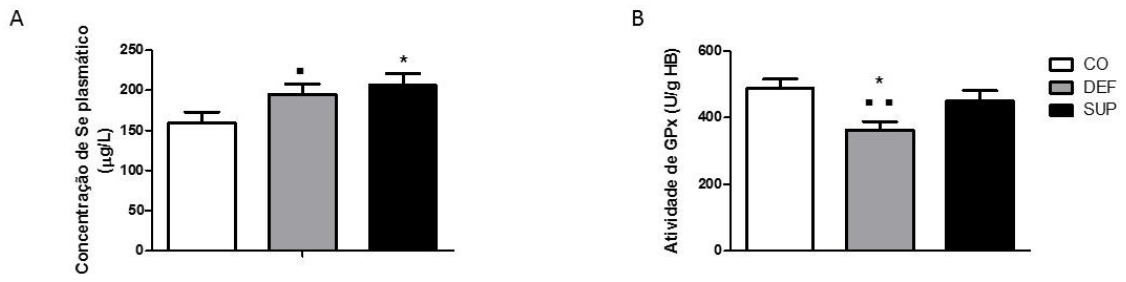

Figura 10. **Concentração de selênio no plasma e atividade da enzima GPx nos eritrócitos da progênie masculina dos grupos CO, DEF e SUP com 3 semanas de vida.** (A) Concentração de selênio no plasma e (B) Atividade da GPx nos eritrócitos. Os dados foram expressos como média ± erro padrão. *Estatisticamente significativo quando comparado com o grupo CO (ANOVA + Duncan, $p<0,05$). Marginalmente diferente comparado ao grupo CO▪ ou SUP▪▪. CO - grupo de ratas expostas a ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo de ratas expostas a ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo de ratas expostas a ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

Adicionalmente, realizou-se a quantificação das concentrações de Se plasmáticas (Figura 11A) e nos eritrócitos (Figura 11B) da prole masculina de 7 semanas dos grupos CO, SUP e DEF. A partir dessas análises, observou-se que a progênie com 7 semanas de vida do grupo SUP apresentou uma diminuição ($p<0,05$) na concentração plasmática de Se, quando comparado ao grupo CO e DEF, sendo que não houve diferença ($p>0,05$) entre esses dois grupos. Não foram observadas diferenças quanto a esse parâmetro nos eritrócitos desses animais.

Da mesma forma que a prole com 3 semanas de idade, a progênie de 3 semanas do grupo DEF continuou a apresentar menor ($p<0,05$) atividade da enzima GPx quando comparada à progênie dos grupos CO e SUP (Figura 11C), embora sua concentração de Se tanto no plasma como em eritrócitos não seja inferior ($p>0,05$) àquelas apresentadas pela progênie dos grupos CO e SUP. Não houve diferença ($p>0,05$) com relação à atividade de GPx entre os grupos CO e SUP.

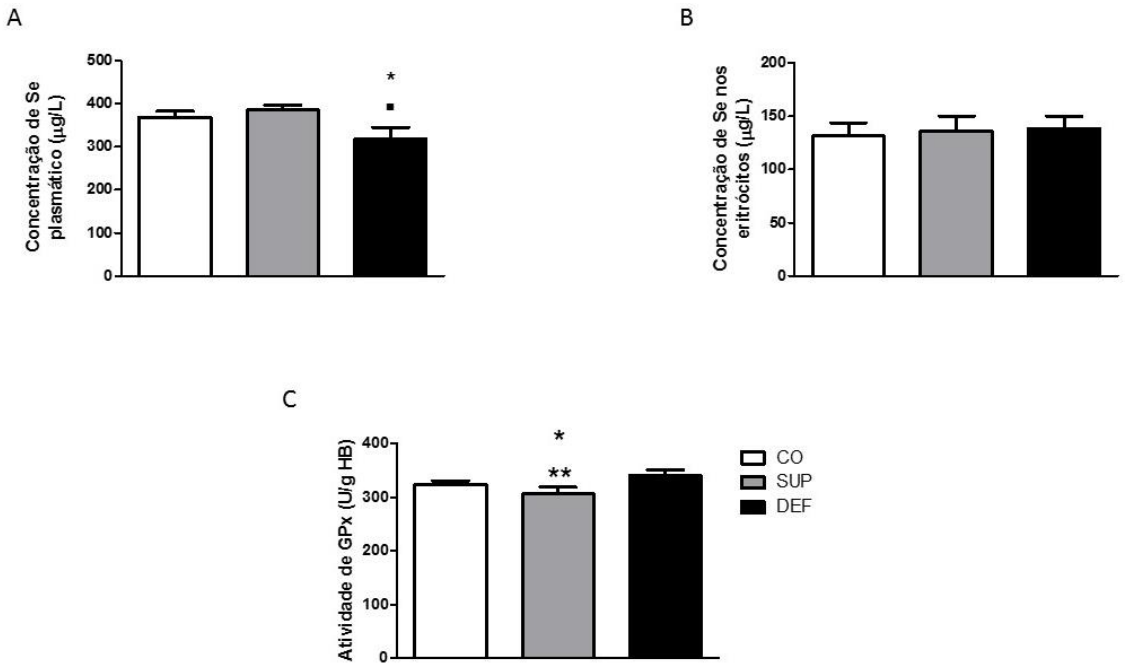

Figura 11. **Concentração de selênio no plasma (A), nos eritrócitos (B) e atividade da enzima GPx nos eritrócitos (C) da progênie masculina dos grupos CO, DEF e SUP com 7 semanas de vida.** Os dados foram expressos como média ± erro padrão. Estatisticamente significativo quando comparado com o grupo CO* e SUP** (ANOVA + Duncan, p<0,05). Marginalmente diferente do grupo CO▪. CO - grupo de ratas expostas a ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo de ratas expostas a ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo de ratas expostas a ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

5.3 Análise de marcador (MDA) de estresse oxidativo

Tendo em vista que foi observada uma diminuição na atividade da enzima GPx na progênie do grupo DEF, tanto de 3 como 7 semanas de vida, decidiu-se por realizar experimento para a quantificação da concentração hepática de MDA, produto final da peroxidação lipídica, na prole masculina de 3 semanas (Figura 12A) e 7 semanas (Figura 12B) dos grupos CO, DEF e SUP. Não foi observada diferença (p>0,05) entre a progênie dos três grupos experimentais.

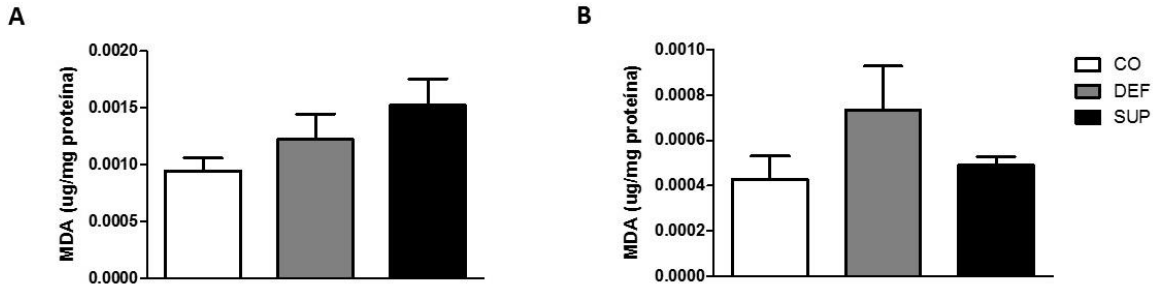

Figura 12. **Concentração de malonaldeído (MDA) no tecido hepático da progênie masculina dos grupos CO, DEF e SUP com 3 (A) e 7 (B) semanas de vida.** Os dados foram expressos como média ± erro. Não houve diferença significativa. (ANOVA, p>0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

5.4 Desenvolvimento de tumores mamários em ratas iniciadas com DMBA

A Figura 13 apresenta os dados de incidência de adenocarcinomas mamários na prole feminina dos grupos CO, DEF e SUP iniciada com DMBA. Verifica-se que a progênie feminina do grupo DEF apresentou maior ($p<0,05$) incidência de adenocarcinomas mamários em comparação à progênie dos grupos CO e SUP. Não foi observada diferença significativa ($p>0,05$) entre esses dois últimos grupos.

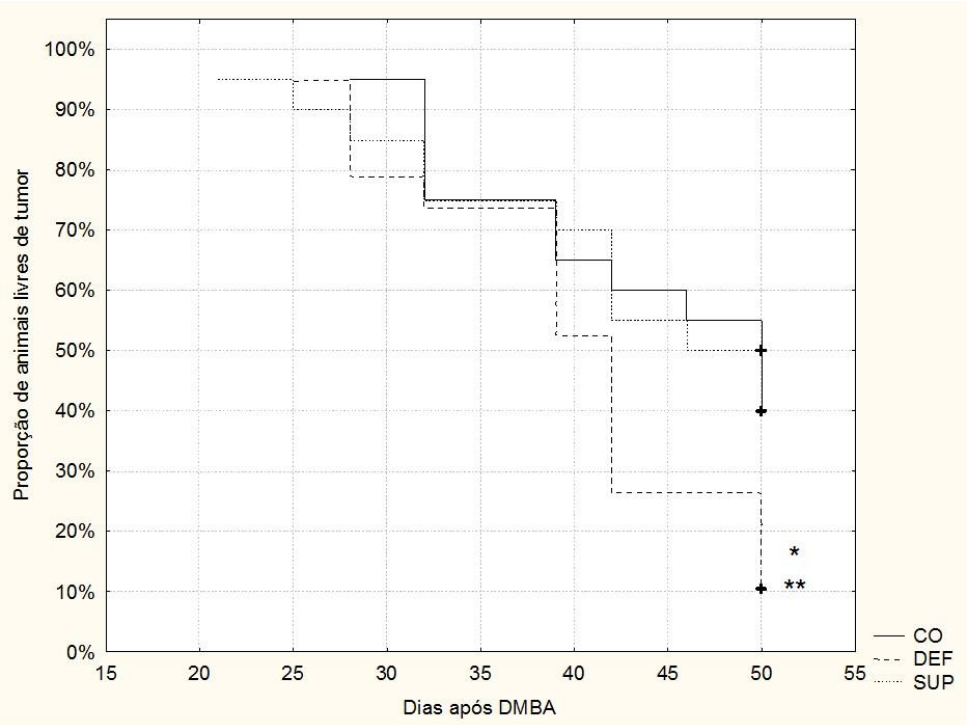

Figura 13. **Incidencia de adenocarcinomas mamários em ratas iniciadas com DMBA.** (Kaplan-Meier, p<0,05). Estatisticamente significativo quando comparado com o grupo CO* ou SUP** (Log-rank test, p<0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

Observa-se na Figura 14A que a progênie do grupo SUP apresentou menor (p< 0,05) número médio de adenocarcinomas mamários em relação à progênie feminina do grupo DEF e apresentou uma diferença marginal (p=0,06) quando comparada à progênie do grupo CO. Não houve diferença (p>0,05) entre a progênie feminina dos grupos DEF e CO em relação a esse parâmetro. A progênie do grupo SUP também apresentou menor (p< 0,05) multiplicidade de adenocarcinomas mamários quando comparada a do grupo CO e uma diminuição marginal (p=0,08) quando comparada a do grupo DEF (Figura 14B).

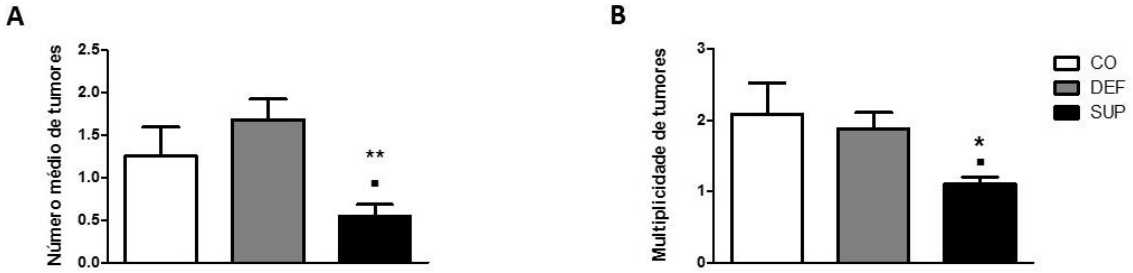

Figura 14. **Número médio e multiplicidade de adenocarcinomas mamários em ratas iniciadas com DMBA.** (A) Relação entre o número de adenocarcinomas mamários e o número de ratas em cada grupo. (B) Relação entre o número de adenocarcinomas mamários e o número de ratas com adenocarcinomas mamários em cada grupo. Os dados foram expressos como média ± erro. Estatisticamente significativo quando comparado ao grupo CO* e DEF** (ANOVA + Duncan, $p<0,05$) e diferença marginal quando comparado ao grupo CO▪ (ANOVA + Duncan, $p= 0,06$). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

De acordo com a classificação histológica, constatou-se que os animais apresentavam seis tipos de adenocarcinomas mamários; papilíferos, cribformes, cribforme/comedo, mistos, tubulares e CIS (carcinoma *in situ*). Todos classificam-se como neoplasias epiteliais malignas invasivas, com exceção daqueles classificados como CIS, que correspondem a neoplasias epiteliais malignas não invasivas (RUSSO et al., 1990). Não houve diferença ($p>0,05$) na proporção de cada tipo de adenocarcinoma mamário encontrado nos três grupos experimentais, apenas no caso de tumores classificados com CIS, encontrados apenas na progênie do grupo SUP (Figura 15). As imagens dos tipos de adenocarcinomas mamários encontrados em maior frequência ($p<0,05$) nas amostras estão representadas na Figura 16.

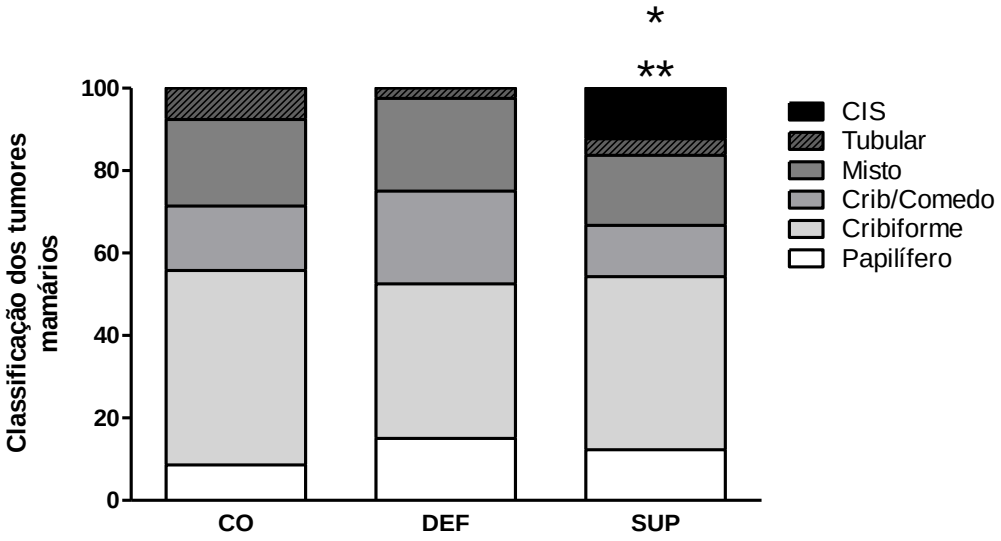

Figura 15. **Classificação dos tumores mamário na progênie dos grupos CO, DEF e SUP.** Os dados foram expressos como porcentagem do número total de tumores. Estatisticamente significativo quando comparado aos grupos CO* e DEF** apenas em realação aos tumores CIS (Exato de Fisher, p< 0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

Além disso, os tumores analisados foram classificados de acordo com sua malignidade, em grau 1 e 2, sendo que não foram observados tumores de grau 3. A classificação em graus histológicos se dá a partir da análise de três parâmetros. O primeiro deles é o padrão histológico do tumor, ou seja, a porcentagem do tumor em que houve a formação de glândulas acinares. O segundo é a grau nuclear, em que a morfologia dos núcleos celulares é analisada. O terceiro critério a ser analisado é a taxa de células em mitose no tecido tumoral (ELSTON; ELLIS, 1991; Pathology Reporting of Breast Disease, 2005). De forma geral, a análise do grau histológico verifica o quão diferente o tecido tumoral se encontra em comparação ao tecido mamário normal.

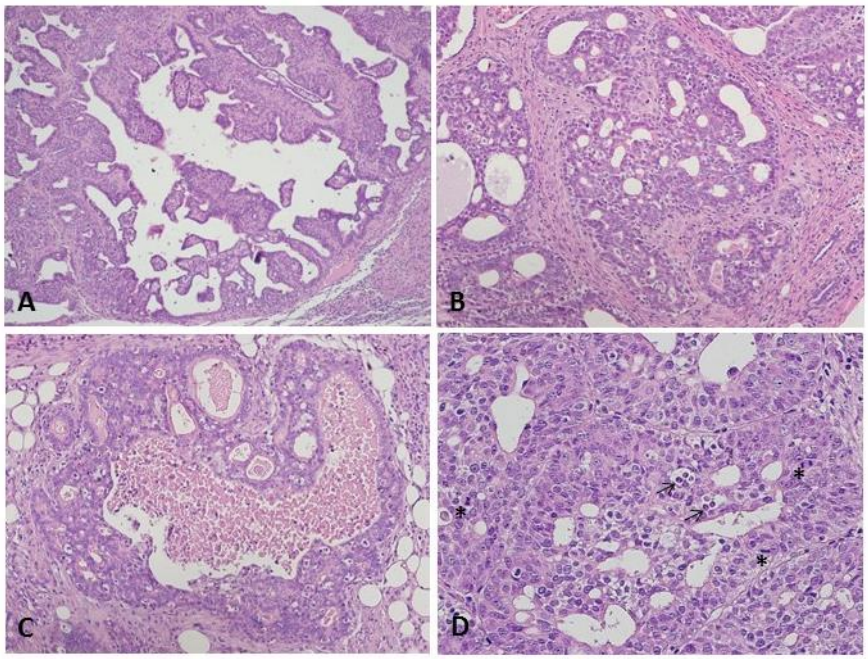

Figura 16. **Tipos histológicos mais frequentemente observados nos tumores mamários.** A) Padrão papilífero; B) Padrão cribiforme; C) Padrão cribiforme/comedo; D) Adenocarcinoma mamário mostrando nucleos com pleomorfismo moderado, nucléolos evidentes e com figuras de mitose frequentes (*) e grupos de células apoptóticas (seta).

Dessa forma, os animais submetidos à carcinogênese quimicamente induzida apresentaram tumores mamários classificados em grau 1 e 2, sendo que houve um número superior ($p < 0,05$) de tumores de grau 1 em todos os grupos experimentais. Não houve diferença ($p > 0,05$) na proporção de tumores de grau um e grau 2 entre os grupos (Figura 17).

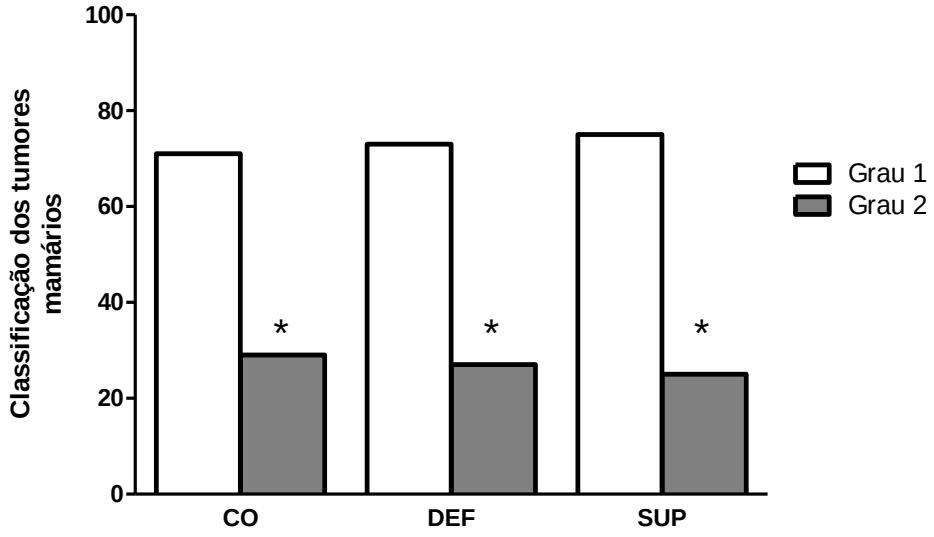

Figura 17. **Classificação dos tumores mamário na progênie dos grupos CO, DEF e SUP.** Os dados foram expressos como porcentagem do número total de tumores. Estatisticamente significativo quando comparado ao próprio grupo (Exato de Fisher, p< 0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

5.5 Contagem do número de TEBs na glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas

Realizou-se análise do número de TEBs (Figura 18A) e do tamanho da árvore epitelial (Figura 18B) a partir da montagem total de mamas da progênie dos grupos CO, DEF e SUP com 7 semanas de vida (Figura 18). Não houve diferença (p>0,05) entre a progênie dos grupos em relação a esses dois parâmetros.

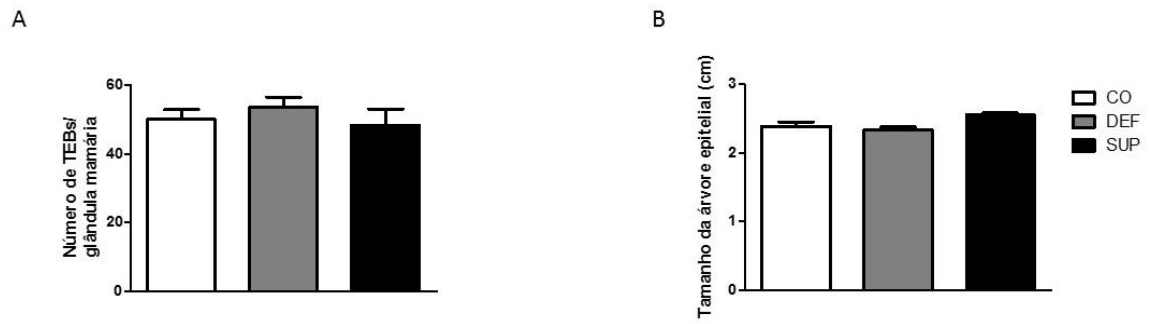

Figura 18. **Número de Terminal End Buds e tamanho da árvore epitelial da glândula mamária da progênie feminina dos grupos CO, DEF e SUP com 7 semanas de vida.** (A) Número de TEBs (B) Tamano da árvore epitelial. Os dados foram expressos como média ± erro. Não houve diferença entre os grupos (ANOVA, p>0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

5.6 Análise de marcadores moleculares de proliferação e morte celular na glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas

Não foram observadas diferenças entre a progênie dos grupos CO, DEF e SUP (p>0,05) com relação a razão entre a expressão das proteínas BCL-2 e BAX (Figura 19A). Da mesma forma, não houve diferença (p>0,05) quanto aos níveis de mRNA do gene Ki67 entre a progênie dos grupos experimentais (Figura 19B).

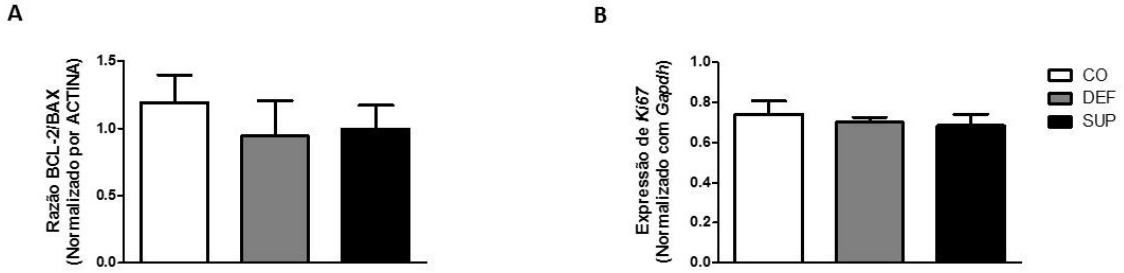

Figura 19. **Marcadores de apoptose e proliferação na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanasdos grupos CO, DEF e SUP.**A) Razão entre BCL-2 e BAX B) Níveis de mRNA do gene *Ki67*. Os valores foram normalizados com actina e estão expressos como média ± erro. Não houve diferença significativa. (ANOVA, p>0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

5.7 Análise da expressão dos receptores ERα, HER-2 e EGFR na glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas

Observou-se que o *Erα* encontrou-se menos (p<0,05) expresso na glândula mamária da progênie do grupo SUP quando comparado a do grupo CO e DEF, tanto em nível de mRNA (Figura 20A) como em nível protéico (Figura 20B).

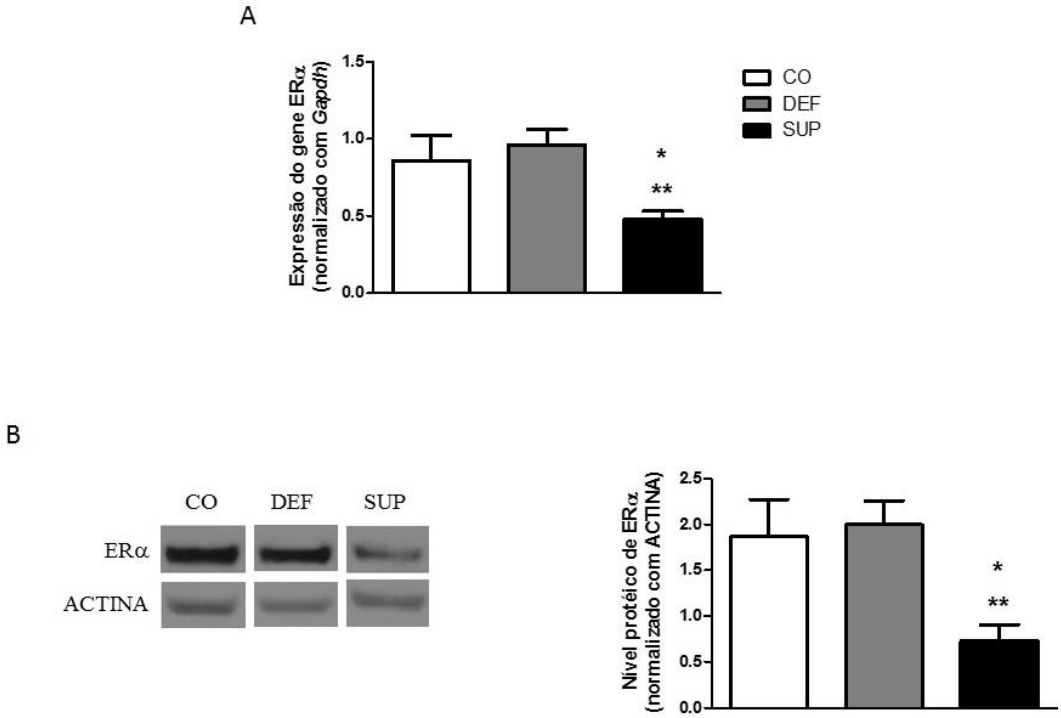

Figura 20. **Expressão do Receptor de Estrógeno α (ERα) na glândula mamária da progênie de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** (A) Nìveis de mRNA do gene *Erα* normalizados com *Gapdh*. (B) Expressão protéica de ERα normalizada com ACTINA. Os valores estão expressos como média ± erro padrão. Estatisticamente significativo quando comparado aos grupos CO* e DEF** (ANOVA+Duncan, p<0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

Resultados semelhantes foram observados em relação à expressão do receptor HER-2 (Figura 21), em que a sua expressão em nível de mRNA (Figura 21A) e de proteína (Figura 21B) foi menor (p<0,05) na progênie do grupo SUP em realação à progênie dos outros grupos. No entanto, a expressão gene *Her-2* em nível de mRNA (Figura 21A), mas não de

proteína (Figura 21B), foi menor (p<0,05) na progênie do grupo DEF em comparação à progênie do grupo CO.

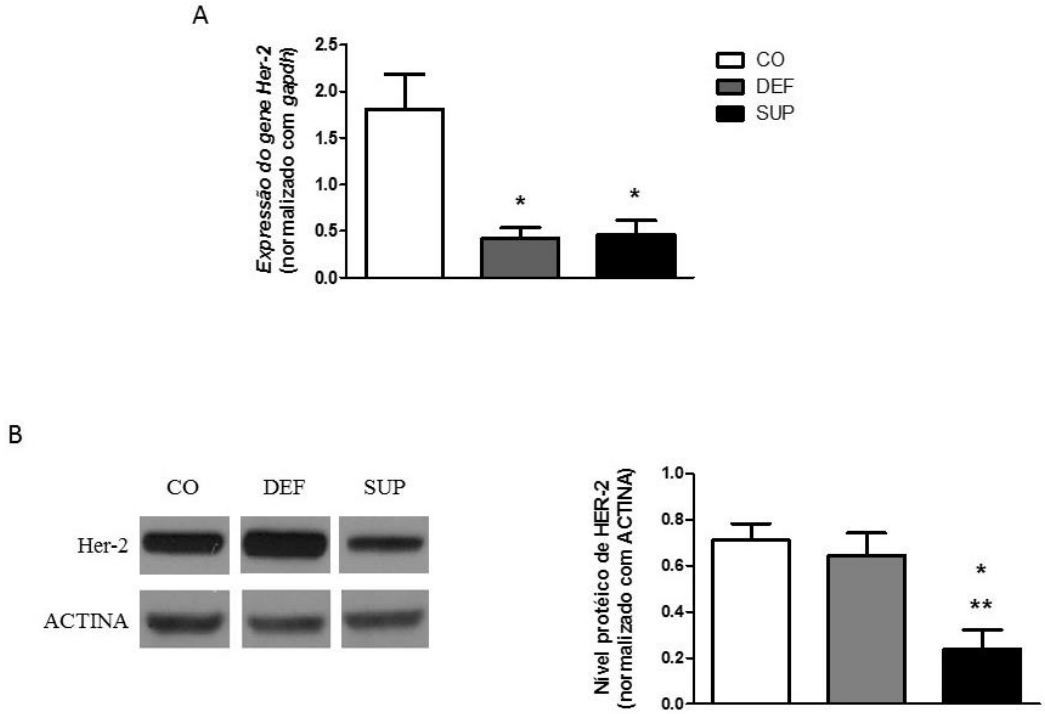

Figura 21. **Expressão do receptor Her-2 na glândula mamária da progênie de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** (A) Níveis de mRNA do gene *Her-2* normalizada com *Gapdh*. (B) Expressão protéica de HER-2 normalizada com proteína ACTINA. Os valores estão expressos como média ± erro. Estatisticamente significativo quando comparado aos grupos CO* e DEF** (ANOVA+Duncan, p<0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

A expressão de EGFR em nível de proteína também foi menor (p<0,05) na progênie do grupo SUP quando comparada à progênie dos outros grupos experimentais (Figura 22).

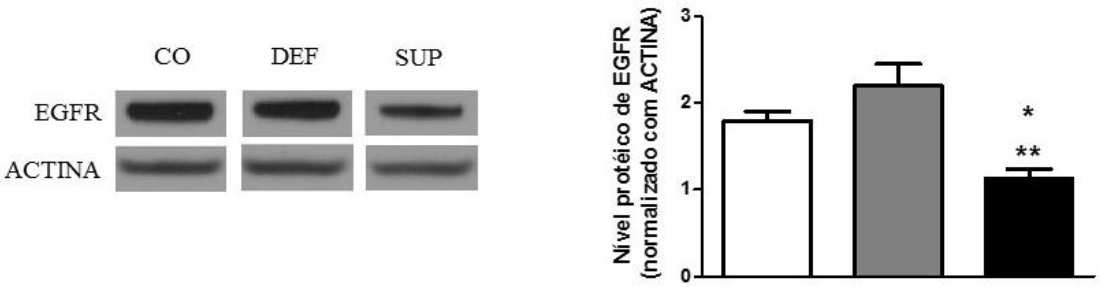

Figura 22. **Expressão de EGFR na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** Expressão de EGFR normalizada com ACTINA. Os valores estão expressos como média ± erro. Estatisticamente significativo quando comparado aos grupos CO* e DEF** (ANOVA+Duncan, p<0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

5.8 Análise da expressão dos receptores HER-2 e ERα nos adenocarcinomas mamários da progênie feminina iniciada com DMBA

Embora tenha sido observada diminuição na expressão dos receptores HER-2 e ERα na glândula mamária da progênie de 7 semanas do grupo SUP, não houve diferenças (p>0,05) com relação à expressão dos mesmos nos tumores mamários da progênie dos 3 grupos experimentais (Figura 23).

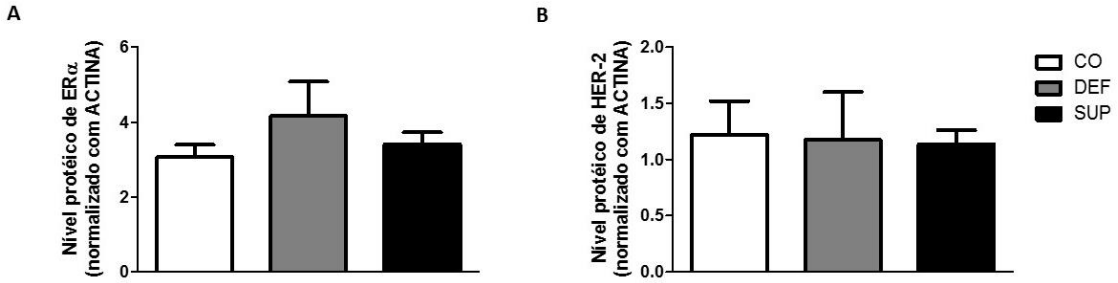

Figura 23. **Expressão dos receptores HER-2 e ERα em tumores mamários da progênie dos grupos CO, DEF e SUP iniciada com DMBA.** (A) Expressão de ERα normalizada pela expressão de ACTINA (B) Expressão de HER-2 normalizada com ACTINA. Os valores estão expressos como média ± erro. Não houve diferença significativa (ANOVA, p>0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

5.9 Análise da expressão de oncogenes e genes supressores de tumor na glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas

Embora tenha sido observada maior (p<0,05) expressão de mRNA do gene *Rassf1a* na progênie do grupo DEF quando comparado a do grupo CO (figura 24A), essa diferença não se manteve em nível protéico (Figura 24B). Não foram observadas diferenças (p>0,05) entre a progênie do grupo SUP e CO quanto à expressão de RASSF1A.

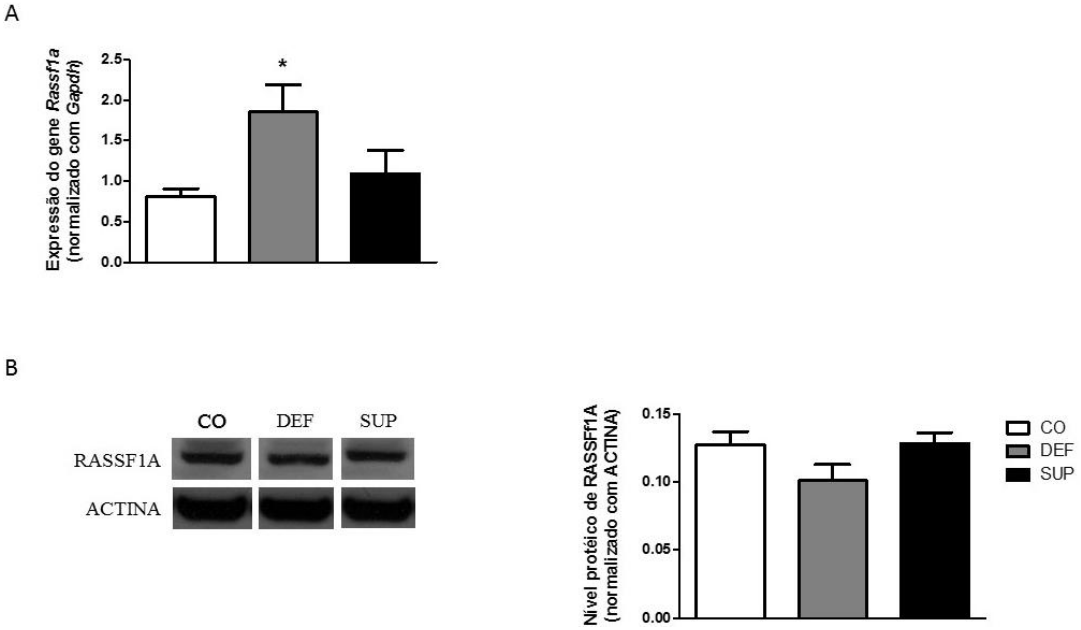

Figura 24. Expressão de *Rassf1a* na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP. (A) Níveis de mRNA do gene *Rassf1a* com *Gapdh*. (B) Expressão protéica de RASSF1A normalizada com ACTINA. Os valores estão expressos como média ± erro. Estatisticamente significativo quando comparado ao grupo CO* (ANOVA+Duncan, p<0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

A progêne do grupo SUP apresentou menor (p<0,05) expressão de RAS em nível de proteína quando comparado à progênie do grupo CO e uma tendência (p=0,07) de menor expressão quando comparada à do grupo DEF (Figura 25A). Não houve diferença (p>0,05) na expressão de PTEN entre a progênie feminina dos grupos experimentais (Figura 25B).

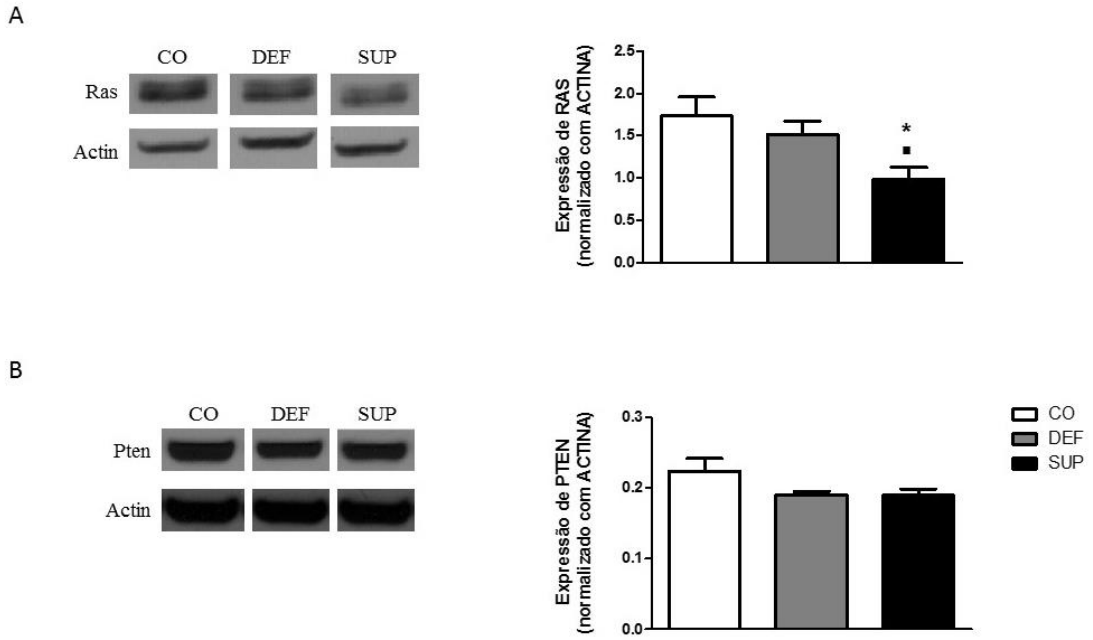

Figura 25. **Expressão de RAS e PTEN na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP. (**A) Expressão de RAS normalizada com ACTINA. (B) Expressão de PTEN normalizada com ACTINA. Os valores estão expressos como média ± erro. Estatisticamente significativo quando comparado ao grupo CO* (ANOVA+Duncan, p<0,05) e diferença marginal quando comparado ao grupo DEF▪ (Anova+Duncan, p=0,07). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

Não houve diferença (p>0,05) com relação à expressão dos genes *Brca1* (Figura 26A) e *c-Myc* (Figura 26B) entre a progênie feminina dos 3 grupos.

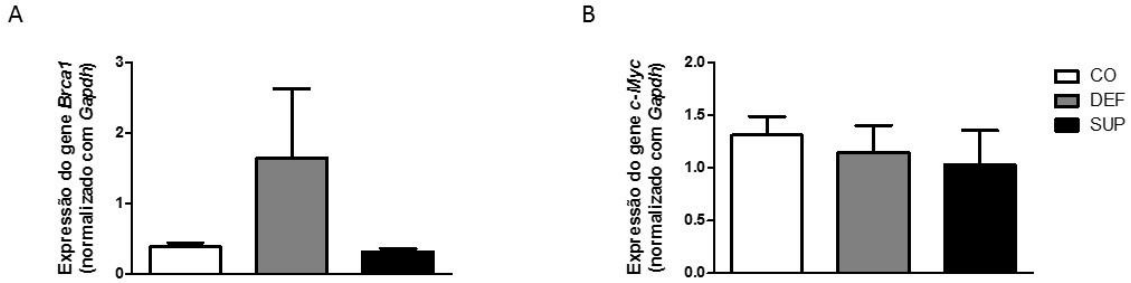

Figura 26. **Expressão dos genes *Brca1* e *c-Myc* na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** (A) Expressão de *Brca1* normalizada com *Gapdh*. (B) Expressão de *c-Myc* normalizada com *Gapdh*. Os valores estão expressos como média ± erro. Não houve diferença significativa (ANOVA, p>0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

5.10 Análise da expressão de intermediários da via do *Erα*, *Egfr* e *Ras*

Não houve diferença (p>0,05) quanto à relação entre P-ERK/ERK (Figura 27A) e expressão de AKT entre a prole feminina dos grupos experimentais (Figura 27B). Também não houve diferença (p>0,05) quanto à relação P-mTOR/mTOR (Figura 28A) e P-cJUN/cJUN (Figura 28B), bem como quanto à expressão das proteínas caveolina-1 (CAV-1) (Figura 29D), STAT5 (Figura 29B) e c-RAF (Figura 29C) entre a progênie dos grupos CO, DEF e SUP.

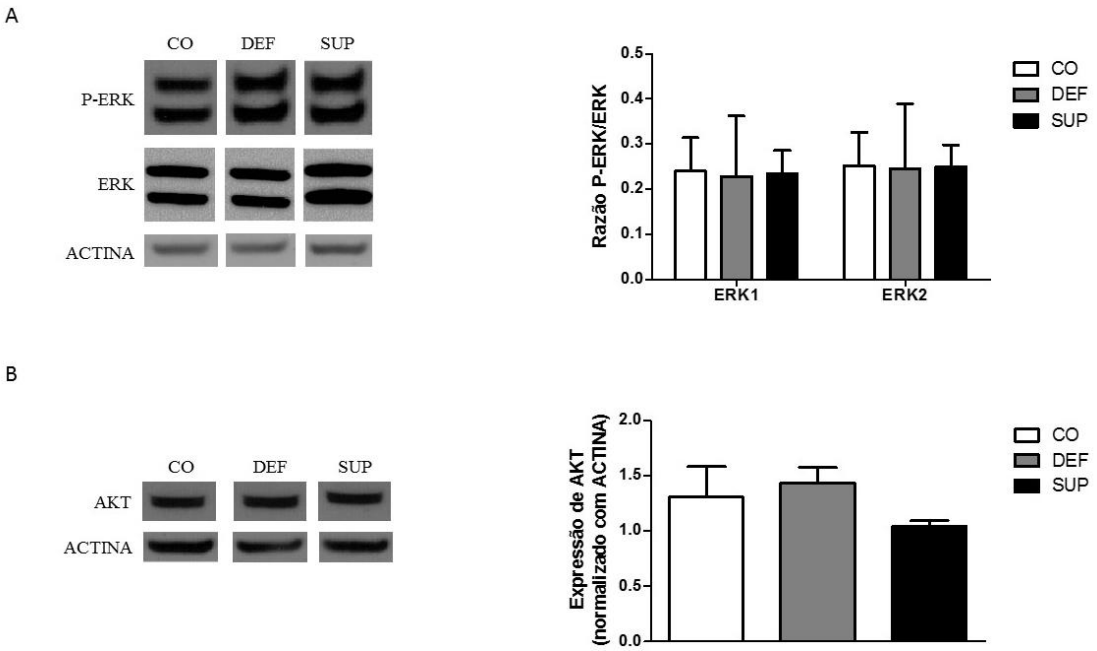

Figura 27. **Expressão ERK e AKT na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** (A) Razão entre a expressão P-ERK1 e 2 e ERK1 e 2. (B) Expressão de AKT normalizada com ACTINA. Os valores estão expressos como média ± erro. Não houve diferença significativa (ANOVA, p>0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

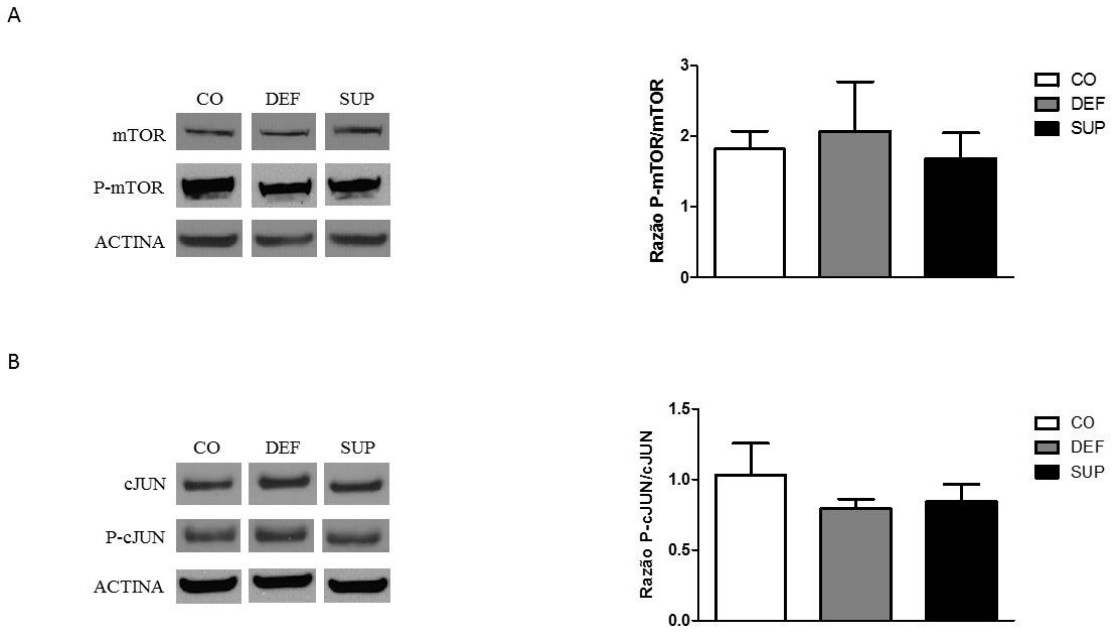

Figura 28. **Expressão mTOR e c-JUN na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** (A) Razão entre a expressão P-mTOR e mTOR total. (B) Razão entre a expressão P-cJUN e cJUN total. Os valores estão expressos como média ± erro. Não houve diferença significativa (ANOVA, $p>0,05$). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

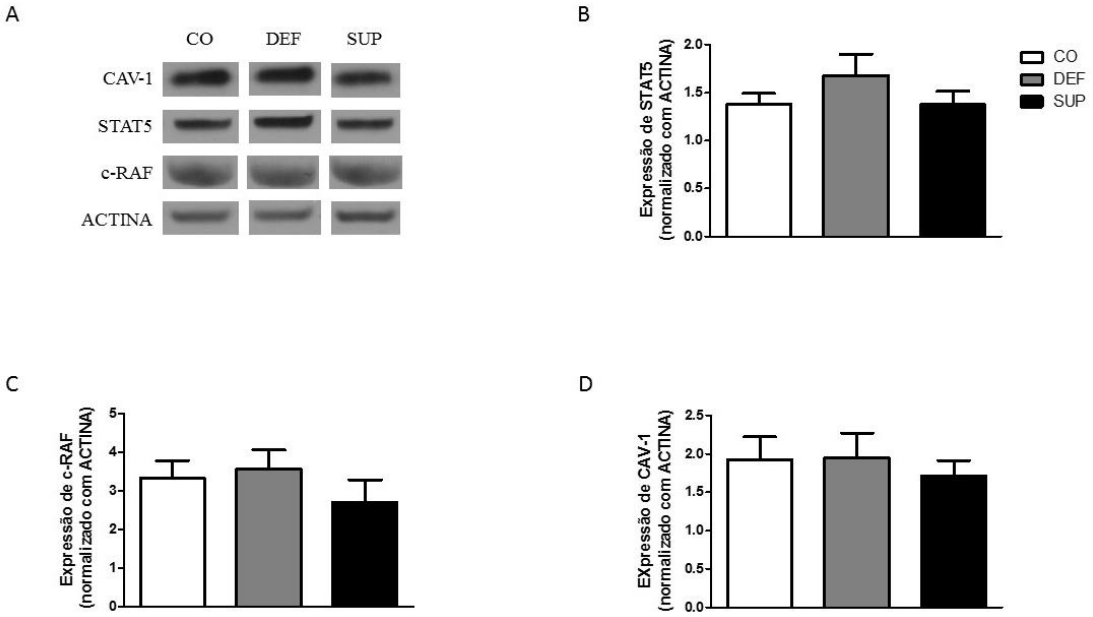

Figura 29. **Expressão Caveolina-1, STAT5 e c-RAF na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** (B) Expressão de STAT5. (C) Expressão de c-RAF (D) Expressão de Caveolina-1. Os valores estão expressos como média ± erro e normalizados com ACTINA. Não houve diferença significativa (ANOVA, p>0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm durante período pré-concepcional e gestacional.

5.11 Análise de marcadores epigenéticos

5.11.1 Análise do padrão de acetilação e metilação global de histonas na glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas e tumores mamários de ratas iniciadas

Observou-se uma maior (p<0,05) expressão da histona H4K16 acetilada na glândula mamária da progênie dos grupos SUP e DEF quando comparados ao grupo CO. Não se observou diferença (p>0,05) nos padrões de metilação e acetilação dos outros resíduos analisados entre os grupos experimentais (Figura 30).

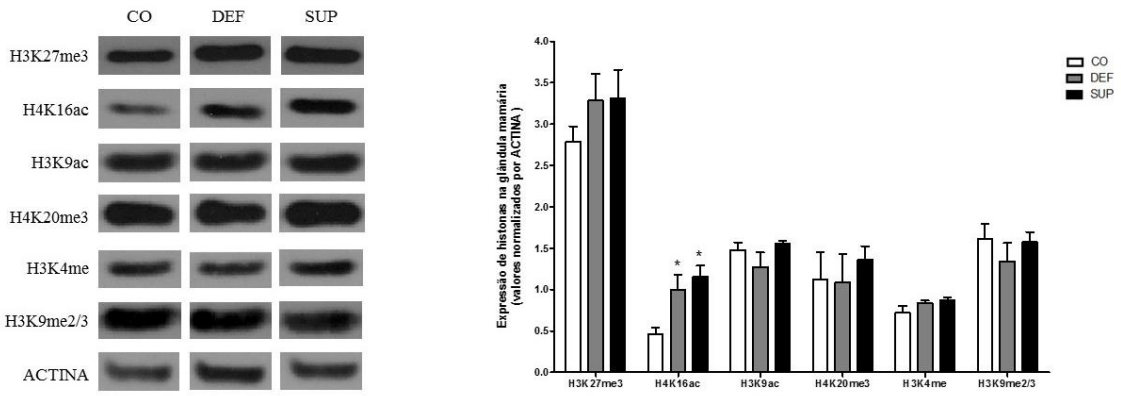

Figura 30. **Padrão global de modificações pós traducionais em resídos de histonas na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** (A) Os valores estão expressos como média ± erro e foram normalizados com ACTINA. Estatisticamente significativo quando comparado aos grupos CO* (ANOVA+Duncan, p<0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

Não foram observadas diferenças (p<0,05) na expressão da enzima histona metiltransferase EZH2 na glândula mamária da progênie feminina dos grupos experimentais (Figura 31). Esse dado está de acordo com a ausênica de diferença na expressão de H3K27me3 observada entre os grupos.

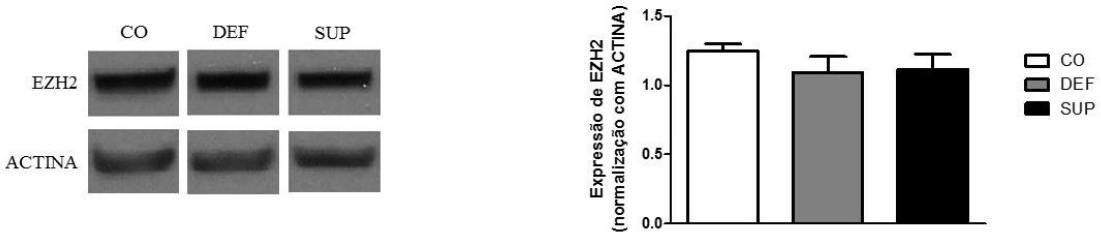

Figura 31. **Expressão de EZH2 na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** (A) Os valores estão expressos como média ± erro e foram normalizados com ACTINA. Não houve diferença significativa. (ANOVA, p>0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

Visto que a modificação no padrão global de acetilação e metilação de histonas em tumores mamários está relacionado à malignidade e ao prognóstico do tumor, realizou-se a

análise desses parâmetros em tumores mamários na progênie dos grupos CO, DEF e SUP iniciados com DMBA. Não foram observadas diferenças (p>0,05) nos padrões de metilação e acetilação nos resíduos de histona analisados entre os grupos experimentais (Figura 32).

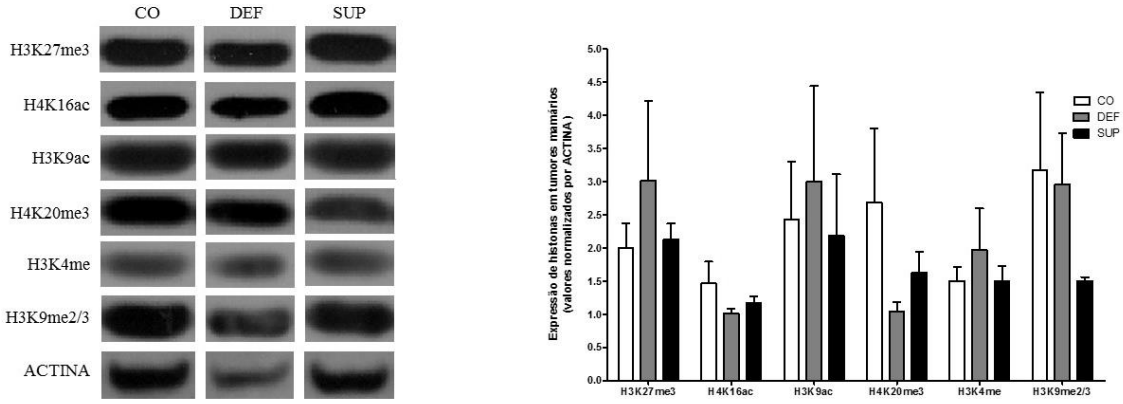

Figura 32. **Padrão global de modificações pós traducionais em resídos de histonas em tumores mamários da progênie feminina dos grupos CO, DEF e SUP induzida com DMBA.** (A) Os valores estão expressos como média ± erro padrão e foram normalizados com ACTINA. Não houve diferença significativa. (ANOVA, p>0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

5.11.2 Análise do padrão de metilação global do DNA no tecido hepático e glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas

Não houve diferença (p>0,05) quanto ao estado de metilação global do DNA do tecido mamário (Figura 33A) e do tecido hepático (Figura 33B) da progênie feminina dos grupos CO, DEF e SUP com 7 semanas de vida.

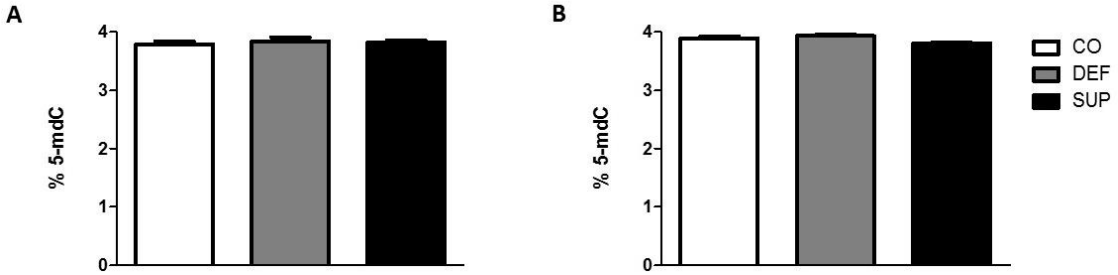

Figura 33. **Metilação global do DNA na glândula mamária e tecido hepático da progênie feminina dos grupos CO, DEF e SUP com 7 semanas de vida.** (A) Metilação global do DNA na glândula mamária e (B) tecido hepático. Os dados foram expressos como média ± erro padrão. Não houve diferença significativa. (ANOVA, p>0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

4.11.3 Análise da expressão de DNA metil-transferases na glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas

Não houve diferenças (p>0,05) na expressão das enzimas DNMT1, 3a e 3b entre a progênie dos grupos CO, DEF e SUP (Figura 34). Esse dado está de acordo com a ausência de diferença no padrão de metilação global observada entre os grupos.

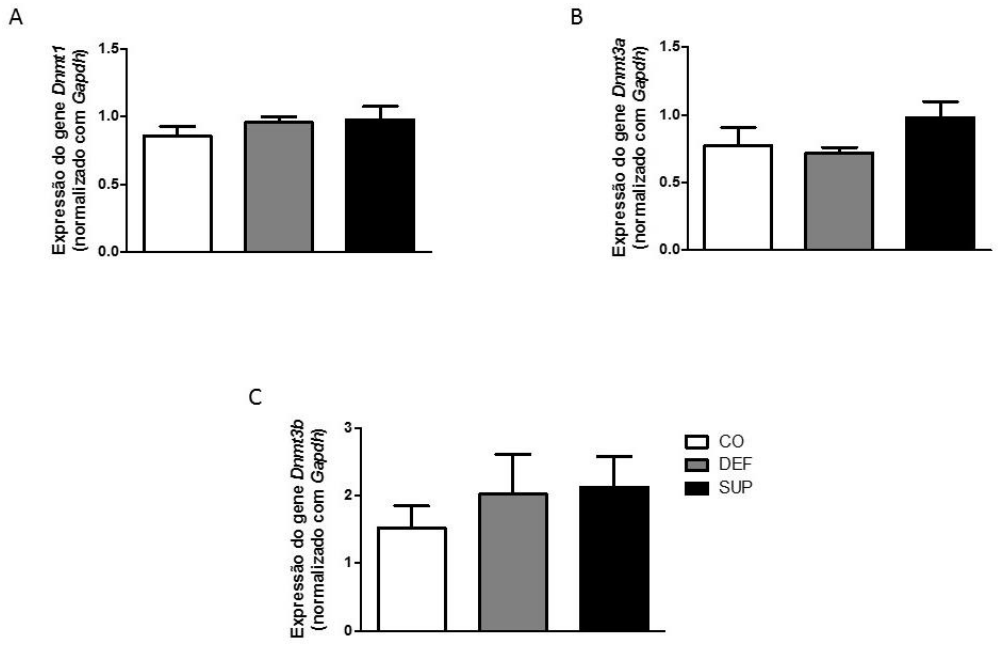

Figura 34. **Expressão dos genes *DNMT1, 3a* e *3b* na glândula mamária da progênie feminina de 7 semanas dos grupos CO, DEF e SUP.** (A) Expressão de *DNMT1* normalizada com *Gapdh*. (B) Expressão de *DNMT3a* normalizada por *Gapdh* (C) Expressão de *DNMT3b* normalizada com *Gapdh*. Os valores estão expressos como média ± erro. Não houve diferença significativa (ANOVA, p>0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

5.11.4 Análise do padrão de metilação da região promotora do gene $ER\alpha$ na glândula mámaria da progênie feminina de 7 semanas

Duas sequências da região regulatória do gene Erα foram analisadas com relação ao estado de metilação dos dinucleotídeos CpG. A região localizada na posição entre -2431 e -2400 do codon ATG, contendo 4 dinucleotídeos CpG, não apresentou metilação em nenhuma das amostras analisadas (dado não apresentado). O estado de metilação da região regulatória localizada na posição entre -2320 a -2263 do códon ATG, contendo 6 dinucleotídeos CpG, está representado no Figura 35.

Não houve diferença (p>0,05) na metilação dos nucleotídeos -51, -50 e -47 entre a prole feminina dos grupos experimentais. Porém observou-se um aumento marginal (p=0,07) na metilação do dinucleotídeo -49 e -46 na progênie feminina do grupo SUP em comparação

a do DEF e diminuição marginal (p=0,07) na metilação no dinucleotídeo -48 na progênie do grupo DEF em comparação à progênie do grupo CO.

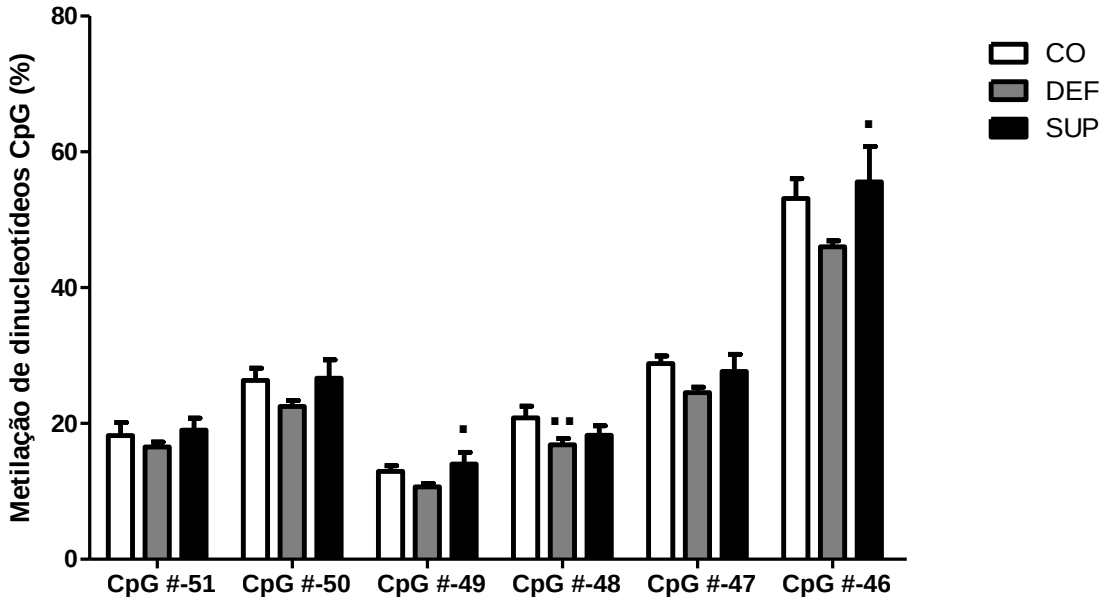

Figura 35. **Metilação da região promotora do gene $Er\alpha$ na glândula mamária e tecido hepático da progênie feminina dos grupos CO, DEF e SUP com 7 semanas de vida.** Os dados foram expressos como média ± erro. Diferença marginal quando comparado ao grupo DEF▪ e CO▪▪ (Anova+Duncan, p=0,07). Não houve diferença significativa. (ANOVA, p>0,05). CO - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,15 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; DEF - grupo em que as ratas receberam ração contendo 0,05 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional; SUP - grupo em que as ratas receberam ração contendo 1 ppm Se durante período pré-concepcional e gestacional.

6. DISCUSSÃO

Embora seja conhecida a importância do selênio no início do desenvolvimento (BOGDEN et al., 2006; BOSTEDT; SCHRAMEL, 1990; GRAZUL-BILSKA et al., 2009) poucos estudos relacionaram a exposição a diferentes concentrações desse micronutriente durante o período intrauterino e o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta. Mais especificamente com relação ao câncer, até o momento apenas um estudo (POPOVA, 2002) teve como tema o efeito do consumo de concentração supranutricional de selênio durante a gestação e a diminuição do surgimento de tumores hepáticos em sua prole masculina. Tendo em vista que ainda não existem estudos sobre os possíveis efeitos do selênio na dieta materna sobre a programação do câncer de mama, os resultados aqui apresentados mostram que tanto a suplementação como a deficiência de selênio durante a gestação modularam o risco de desenvolvimento de câncer de mama na prole feminina; a deficiência de Se resultou em um aumento na incidência de animais com adenocarcinomas, enquanto a suplementação resultou em menor número médio e multiplicidade de adenocarcinomas por rata. Além disso, a suplementação com selênio resultou em um número estatisticamente significativo de tumores não invasivos na progênie do grupo SUP.

6.1 Concentrações de Se e estresse oxidativo

A fim de observar possíveis efeitos da intervenção ainda na mãe, uma amostra do sangue desses animais foi colhida no 17º dia de gestação para a quantificação da concentração de Se. A menor concentração de Se no sangue de ratas alimentadas com dieta deficiente em Se está de acordo com resultados obtidos por outros pesquisadores em estudos prévios, em que se verificou que o consumo de rações deficientes em Se contendo 0,025 ppm ou 0,005 ppm por ratas prenhas resultou em reduções de 40 e 90%, respectivamente, nas concentrações sanguíneas do micronutriente (BATES et al., 2000; SMITH; PICCIANO, 1986).

Uma possível explicação para a ausência de aumento da concentração desse micronutriente no grupo SUP seria a de que a maior oferta de Se teria sido suficiente para a ativação mecanismos homeostáticos que poderiam ter atuado no sentido de se manter estável

as concentrações do micronutriente, por meio do aumento de sua excreção ou mesmo a diminuição da mobilização de tecidos como o fígado.

Diferentemente de resultados de estudos prévios (BATES et al., 2000; SMITH; PICCIANO, 1986), em que se verificou que a progênie de ratas submetidas a deficiência de Se apresentavam reduções nas concentrações sanguíneas do micronutriente, não houve diferença entre a progênie dos grupos CO e DEF quanto às concentrações de Se no sangue. Esses resultados estão, no entanto, de acordo com os obtidos por Delgado e colaboradores (2011), em que a progênie de ratas alimentadas com dieta contendo 0,01ppm de Se apresentou concentrações séricas de Se semelhantes à progênie do grupo controle, tendo sido isso associado a uma redução de excreção urinária de Se associada à manutenção da homeostasia do mineral. A manutenção dos níveis sanguíneos de Se em situação de deficiência dietética desse micronutriente estaria relacionada à necessidade de manutenção adequada a atividade da enzima glutationa peroxidase em situações de aumento do estresse oxidativo como no próprio período gestacional (OJEDA et al., 2009).

De maneira interessante, os resultados obtidos pela análise da atividade da enzima GPx não refletem diretamente aqueles observados nas análises da concentração de Se plasmática, visto que a expressão e atividade da enzima glutationa peroxidase, selenoproteína envolvida no controle de estresse oxidativo (RAYMAN, 2000), está diretamente relacionada ao consumo de selênio na dieta (BARNES et al., 2009; LEI et al., 1995; MORIARTY; REDDY; MAQUAT, 1998). Dessa forma, seria esperado que maiores concentrações plasmáticas de Se refletissem em maior atividade da enzima GPx. Por outro lado, a deficiência durante o período in útero pode ter causado alterações fisiológicas que acarretaram na menor atividade de GPx durante a vida jovem/adulta, deixando esses animais mais vulneráveis a danos causados por estresse oxidativo.

Tendo em vista a diminuição na atividade da enzima GPx na progênie do grupo DEF, tanto de 21 como 50 dias de vida, aventou-se a hipótese de que os animais submetidos à deficiência de selênio durante o período fetal encontrar-se-iam em uma situação de estresse oxidativo, o que em última análise teria culminado com o aumento da suscetibilidade desses animais à carcinogênese mamária. A fim de verificar essa hipótese, avaliaram-se os níveis de MDA no fígado dos animais de 21 e 50 dias. O MDA é um dos principais produtos secundários da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, sendo considerado um marcador

de estresse oxidativo e diversos estudos mostram uma correlação inversa entre a concentração de selênio e atividade de GPx com as concentrações de MDA (JOVANOVIĆ et al., 2013; RÜKGAUER; NEUGEBAUER; PLECKO, 2001). No entanto, não houve diferença na concentração de MDA no fígado da progênie dos grupos experimentais.

6.2 Morfologia e marcadores de apoptose e proliferação da glândula mamária

Terminal End Buds (TEBs) são estruturas presentes nas glândulas mamárias de ratos que correspondem às TDLUs (Terminal Ductal Lobular Units) em humanos e são reconhecidas como sendo o local de início da carcinogênese (RUSSO; RUSSO, 1980). A carcinogênese quimicamente induzida por DMBA se inicia nas TEBs por duas características dessa estrutura; por sua alta taxa de proliferação e pela baixa capacidade de remover adutos de DNA formados pelo carcinógeno (RUSSO et al., 1990). Dessa forma, o número de TEBs presente na glândula mamária está diretamente relacionado à suscetibilidade do indivíduo em desenvolver câncer de mama (HILAKIVI-CLARKE, 2007). Além disso, a crescimento de árvore epitelial se dá através da alta taxa de proliferação das células que compõem as TEBs, portanto o tamanho da árvore epitelial também está relacionado ao risco de desenvolvimento do câncer de mama.

O número de TEBs pode ser modulado por componentes da dieta materna, como ácido fólico (SIERI et al., 2008), ácidos graxos saturados (DE OLIVEIRA ANDRADE et al., 2014) e poli-insaturados (HILAKIVI-CLARKE et al., 2005). A ausência de diferença entre a progênie dos diferentes grupos em relação a esses parâmetros indica que a modulação da suscetibilidade ao câncer de mama pelas diferentes concentrações de selênio não se dá pela modificação em aspectos morfológicos desse órgão.

BCL-2 e BAX são membros da família BCL-2, que apresenta importante papel no controle de apoptose (DANIAL, 2007). Como essas proteínas exercem funções contrárias, um aumento na ração BCL-2/BAX representaria uma diminuição na taxa de apoptose. O balanço entre as taxas de apoptose e proliferação celular é essencial para o desenvolvimento e manutenção da homeostase da glândula mamária e uma perturbação nesse balanço podem implicar em aumento no risco de desenvolvimento de câncer de mama (ANANTHANARAYANAN et al., 2006; HANAHAN; WEINBERG, 2011). No entanto,

observou-se que os efeitos do selênio na dieta materna não influenciaram apoptose e proliferação celular na glândula mamária de ratas jovens.

Visto que um dos meios pelos quais o selênio exerce sua função anticarcinogênica é através da regulação da apoptose (SINHA; EL-BAYOUMY, 2004), esperava-se que a progênie do grupo DEF apresentasse uma diminuição na razão BCL-2/BAX. Por outro lado, os resultados de proliferação e morte celular do grupo SUP estão de acordo com estudos anteriores, em que células normais de mama não foram afetadas pelo tratamento com selênio, sendo que a diferença só foi observada em células pré-malignas (IP; THOMPSON; GANTHER, 2000).

6.3 Expressão dos receptores ERα, Her-2 e EGFR

A sinalização do estrógeno por meio do receptor de estrógeno (ER) é essencial para o desenvolvimento da glândula mamária. Camundongos *knockout* $ER^{-/-}$ apresentaram diminuição na proliferação celular e consequente diminuição no crescimento ductal, além de diminuição na diferenciação da árvore epitelial (MALLEPELL et al., 2006). Por meio do ER, o estrógeno induz a expressão de anfiregulina, proteína que se liga ao EGFR, agindo de forma parácrina na indução de proliferação de células vizinhas (CIARLONI; MALLEPELL; BRISKEN, 2007).

Estudos também correlacionaram a expressão de ER e o risco de desenvolvimento do câncer de mama. Nesse sentido, comparações entre epitélio de glândulas mamárias normais em pacientes com câncer de mama e tumores benignos de mama mostraram que o primeiro grupo apresenta níveis maiores de expressão de ER (KHAN et al., 1998). Além disso, Lawson e colaboradores (1999) avaliaram diferenças na expressão de ER em mulheres caucasianas e japonesas, concluindo que essa última população, que apresenta menor risco de câncer de mama, apresenta também menor expressão de ER. Nossos resultados estão de acordo com esses estudos, visto que a diminuição na expressão de ERα foi associada à diminuição no desenvolvimento de adenocarcinomas mamários. Porém, ao contrário do esperado não houve um aumento na expressão desse receptor na progênie do grupo DEF.

Por outro lado, os resultados aqui apresentados vão de encontro com resultados em que o feto foi exposto a ambiente com altas concentrações de estrógeno, como a prole de

animais que consumiram dieta hiperlipídica ou estrógeno sintético durante a gestação. Nesses estudos a prole apresentou uma diminuição na expressão de ER, o que levou ao aumento no número de TEBs, já que o ER também desempenha importante papel na diferenciação, e ao aumento no desenvolvimento de tumores mamários (HILAKIVI-CLARKE et al., 1998).

Também se observou uma associação entre a expressão do receptor HER-2 e o risco de desenvolvimento de adenocarcinomas na progênie de 50 dias do grupo SUP. Sabe-se que o aumento na expressão desse receptor está relacionado ao aumento na suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores mamários, visto que sua sinalização afeta a população de *stem cells* na glândula mamária, aumentando essa população através da modulação de mecanismos de controle da proliferação, o que resultaria em um aumento no número de alvos de eventos carcinogênicos (KORKAYA et al., 2008). No entanto, em relação aos níveis proteicos, não se observou diferença na expressão de HER-2 entre a progênie do grupo CO e DEF.

De forma curiosa, houve uma diminuição na expressão de mRNA também no grupo DEF quando comparado ao grupo CO. Essa incongruência entre níveis de mRNA e níveis de proteína poderia ser resultado de aumento na taxa de tradução devido à diminuição na expressão de miRNAs, e diminuição nas taxas de degradação de proteínas, por exemplo (HE; HANNON, 2004).

EGFR apresentou o mesmo padrão de expressão do ERα e Her-2. Assim como o HER-2, o EGFR é um membro da família erbB de receptores tirosina quinase e exerce papel de destaque no desenvolvimento da glândula mamária, mais especificamente em relação ao crescimento ductal da árvore epitelial (TROYER; LEE, 2001). A exposição no período pré-pubertal à genisteína, responsável por diminuição no risco de câncer de mama, resultou em diminuição na expressão de EGFR em estruturas menos diferenciadas da glândula mamária (BROWN et al., 1998). No mesmo sentido, a exposição *in utero* ao bisfenol A, composto conhecido por aumentar o risco de desenvolvimento de tumores mamários, resultou em aumento na expressão de EGFR (BETANCOURT et al., 2010). Em concordância com esses estudos, a diminuição na expressão de EGFR está relacionada com o menor risco de desenvolvimento de adenocarcinomas mamários observado na progênie do grupo SUP.

Como foi vista essa diminuição na expressão de receptores na glândula mamária de ratas jovens, decidiu-se por avaliar a expressão de ERα e Her-2 nos adenocarcinomas mamários da prole induzida com DMBA. A modificações observadas em ratas com 7 semana

não se mantiveram após a indução. Estudos com a linhagem celular de câncer de mama MCF-7 mostraram que o tratamento com selênio diminui a expressão (tanto em relação aos níveis de mRNA como de proteína) de $Er\alpha$ e diminuiu a ligação entre esse receptor ao DNA (LEE et al., 2005b; SHAH et al., 2005). O Her-2 encontra-se superexpresso em cerca de 30% dos casos de câncer de mama, estando relacionado à sua capacidade de formar metástases e a um pior prognóstico (SLAMON et al., 1989). Esses resultados, somados aos resultados das análises histopatológicas dos adenocarcinomas mostram que não há uma diferença na agressividade e prognóstico entre as neoplasias dos animais iniciados dos grupos CO, DEF e SUP.

6.4 Expressão de oncogenes e genes supressores de tumor

Visto que que tanto a suplementação com a deficiência em selênio resultou na modulação no risco de câncer de mama na progênie feminina, decidiu-se avaliar a expressão de oncogenes e genes supressores de tumor que exercem papel de destaque no desenvolvimento do câncer de mama.

Assim como no caso da expressão do receptor HER-2, a diferença nos níveis de mRNA do gene *Rassf1a* não foi acompanhada de alterações em nível proteico, o que poderia ser explicado por uma diferença na taxa de tradução ou de degradação de proteínas. Um dos mecanismos de ação do *Rassf1a* é através da diminuição na expressão do $Er\alpha$ (THALER et al., 2012). Embora tenha sido observada diferença na expressão desse receptor, ela parece não ser dependente de *Rassf1a*. Ao contrário do que foi observado no presente trabalho, nosso grupo de pesquisa já mostrou que o tratamento de células de câncer de mama com selenito de sódio resultou em aumento na expressão desse gene supressor de tumor (DE MIRANDA et al., 2014).

Os outros dois genes supressores de tumor analisados, *Pten* e *Brca1*, também apresentaram padrão de expressão diferente do esperado. A expressão do gene *Pten* pode ser modulada por componentes da dieta, como a genisteína, modulando dessa forma o risco de desenvolvimento de câncer de mama (DAVE et al., 2005). Além disso, a exposição a mirtilo em pó na dieta materna aumentou a expressão de PTEN na glândula mamária da prole de 21 dias (RAHAL et al., 2013). No entanto, embora fosse esperado que a progênie do grupo SUP

apresentasse um aumento na expressão de *Pten* e o contrário fosse observado na prole do grupo DEF, não houve diferença na expressão desse gene.

Com relação ao gene *Brca1*, observa-se um aumento em sua expressão na glândula mamária da prole do grupo DEF, embora esse aumento não seja significativo. Esse gene supressor de tumor está envolvido em mecanismos como reparos de danos ao DNA e progressão do ciclo celular (DENG, 2006) sendo que um dos mecanismos de ação seria a inibição da expressão de ERα e RP (receptor de progesterona) (CALVO; BEATO, 2011), além inibir a expressão do miRNA-155, conhecido micro RNA oncogênico, por meio de mecanismos epigenéticos (CHANG et al., 2011). Pôde-se observar, no entanto, que os níveis de RNA do *Brca1* não influenciaram a expressão de *ERα*, visto que seu aumento na prole do grupo DEF resultaria em diminuição na expressão desse receptor no mesmo grupo. Seria interessante investigar os níveis de proteína BRCA1 para averiguar se o padrão da expressão de mRNA se mantem em nível proteico.

O *c-myc* é um oncogene regulador por estrógeno e está associado a diversos processos regulatórios, como proliferação e diferenciação celular e apoptose (DANG, 2012). Estudos anteriores mostraram que o tratamento de células de câncer de mama com Se sob a forma de ácido metilselenínico inibiu a transcrição de *c-myc* através da diminuição dos níveis de mRNA de ERα (LEE et al., 2005b; SHAH et al., 2005). No entanto, a diminuição na expressão de ERα causada pela suplementação de selênio não modificou a expressão desse oncogene.

O oncogene *Ras*, por outro lado, apresentou-se diminuído na progênie do grupo SUP. Esse oncogene tem como principais ativadores *upstream* os membros da família erbB de receptores, sendo que sua ativação constitutiva se dá pela desregulação na expressão de EGFR e HER-2 em tumores mamários (ELENBAAS, 2001; HOADLEY et al., 2007). Esse oncogene está relacionado ao aumento da instabilidade cromossômica em células de mama pré-malignas (ZENG et al., 2010).

6.5 Proteínas relacionadas às vias do *Erα*, *Egfr* e *Ras*

Como a exposição a diferentes concentrações de selênio através da dieta materna resultou em diminuição na expressão ERα, EGFR e RAS, avaliou-se a expressão de proteínas

relacionadas a suas principais vias de sinalização: a via RAF-MEK-ERK relacionada a regulação do crescimento celular, apoptose e diferenciação, e a via do PI3K-AKT relacionada a sobrevivência celular e crescimento, entrada no ciclo celular, que pode levar à ativação do mTOR activation (revisado em CASTELLANO; DOWNWARD, 2011).

Quando o receptor de estrógeno é ativado por meio de um ligante, principalmente estrógeno, ocorrem dois tipos de resposta; a resposta não-genômica, que é mediada pelo receptor localizado na membrana e citoplasma e pela ativação de mensageiros secundários, ou a resposta genômica, mediada pelo receptor de estrógeno nuclear (FORYST-LUDWIG; KINTSCHER, 2010). A sinalização do EGFR e a não-genômica do ERα podem ocorrer pelas mesmas vias ativadas por RAS; pela ativação da via do ERK (LEVIN, 2003; RAZANDI et al., 2003) ou do PI3K-AKT-mTOR (HYNES; BOULAY, 2006). Adicionalmente, o ERα pode modular a expressão gênica pela resposta genômica, em que o receptor interage com o complexo do fator de transcrição AP-1, composto pelo proto-oncogene C-JUN, na região promotora de genes alvo, como o *c-myc* (SIEWIT et al., 2010).

Embora fosse esperada uma diminuição na expressão dessas proteínas envolvidas nas vias de sinalização, visto que os ativadores dessa via se encontram menos expressos na prole do grupo SUP, não houve diferença nesse parâmetro em nenhum dos marcadores avaliados. Visto que as vias analisadas são importantes para um grande número de processos moleculares e podem ser ativadas ou inibidas por diversos genes, a ausência de diferença poderia ser explicada pela interferência desses outros fatores (LUO; MANNING; CANTLEY, 2003). Além disso, os genes estudados; *Erα*, *Egfr* e *Ras* participam de diversas vias de sinalização (BLOBEL, 2005; YARDEN, 2001). Dessa forma, a diminuição na expressão dos mesmos pode resultar na inibição ou ativação de outras vias, que poderiam ser responsáveis pelos resultados observados nos grupos experimentais.

A caveolina é um dos principais componentes de estruturas da membrana celular denominadas caveolas, importantes para a transdução de vias de sinalização (SIMONS; TOOMRE, 2000). A menor expressão de caveolina está relacionada ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer, entre eles o de mama, agindo por meio da expressão e ativação de ERα. Estudos utilizando linhagens de câncer de mama mostraram que a menor expressão de caveolina-1 (CAV-1) levou ao aumente na expressão de ERα, contribuindo para a transformação maligna dessas células (ZHANG et al., 2005). Além disso, a exposição *in*

utero a estrógeno reduziu a expressão de CAV-1 e aumentou a de ERα na glândula mamária da prole e esses efeitos foram associados a um aumento na programação do câncer de mama (SHAJAHAN et al., 2010). Por outro lado, a exposição pré-pubertal de estrógeno causou efeito oposto na expressão dessas proteínas, levando à diminuição no risco de câncer de mama (SHAJAHAN et al., 2010). Adicionalmente, observou-se que a CAV-1 pode interagir com EGFR, diminuindo sua expressão (COUET; SARGIACOMO; LISANTI, 1997). Entretanto, as diferentes dietas maternas, embora tenham modulado a expressão tanto de ERα como EGFR, não resultaram em alterações na expressão de CAV-1.

Da mesma forma, não foi observada diferença na expressão de STAT5, proteína que tem papel fundamental no desenvolvimento da glândula mamária na gestação e lactação, pela modulação da proliferação e diferenciação celular (CUI et al., 2004). Esse fator transcricional pode participar também da transformação celular e carcinogênese quando desregulado (IAVNILOVITCH et al., 2004). Como o EGR e estradiol, através do EGFR e ER respectivamente, podem modular a ativação de STAT5 (BJÖRNSTRÖM; SJÖBERG, 2002; GALLEGO et al., 2001) seria esperado observar uma diferença na expressão de STAT5 na prole feminina do grupo SUP, porém não houve diferença entre nenhum dos diferentes grupos.

6.6 Marcadores epigenéticos

6.6.1 Modificações em histonas

Visto que marcadores epigenéticos estão relacionados ao padrão de expressão gênica por meio de alterações na conformação da cromatina, modificações pós-traducionais em resíduos de histonas são importantes marcadores associados ao risco de desenvolvimento de câncer de mama (DALVAI; BYSTRICKY, 2010; HOWE et al., 2001; KOUZARIDES, 2007).

Sabe-se também que o selênio é um fator capaz de alterar o padrão dessas modificações. Nesse sentido, macrófagos tratados com selênio apresentaram uma diminuição na acetilação de H4K16, que foi relacionado à diminuição desse marcador na região promotora de genes pró-inflamatórios (NARAYAN et al., 2015). Como a acetilação de

H4K16 encontra-se aumentada na glândula mamária tanto na prole do grupo DEF como SUP, torna-se ainda necessário avaliar o padrão dessa marca na região promotora de genes associados ao desenvolvimento de câncer de mama.

O tratamento de linhagem LNCaP de câncer de próstata com selenito de sódio diminuiu a atividade de histona desacetilase, aumentando os níveis de acetilação da H3K9 e diminuindo os níveis de metilação da mesma, marcas que resultam em aumento na expressão gênica (XIANG et al., 2008). Por outro lado, como observado no presente estudo, a suplementação com selênio e folato não alterou a metilação e acetilação da histona H3K9 no tecido hepático de camundongos (BERMINGHAM et al., 2013).

Além disso, sabe-se que o período embrionário é marcado por extensa reprogramação do epigenoma (NAFEE etal., 2008). Nesse sentido, De Oliveira-Andrade et al. (2014) mostraram que a dieta materna foi responsável pelo aumento na acetilação de H3K9 na glândula mamária da prole que apresentou menor risco de câncer de mama.

Embora não tenha sido observada diferença na expressão de H3K27 trimetilada, a expressão da histona metiltransferase EZH2, membro do grupo *Polycomb*, foi analisada. O aumento na expressão dessa enzima está relacionado ao aumento da suscetibilidade ao câncer de mama (DING et al., 2006). A exposição durante o período fetal a estrógeno sintético, responsável por aumento no risco de desenvolvimento dessa neoplasia na idade adulta, foi responsável pelo aumento na expressão de EZH2 (DOHERTY et al., 2010). No entanto, o aumento no desenvolvimento de adenocarcinomas mamários na progênie do grupo DEF não foi acompanhada por mudanças na expressão dessa histona metiltransferase.

A ausência de alteração nos padrões metilação e acetilação de resíduos de histonas nos adenocarcinomas da prole dos grupos CO, DEF e SUP iniciada com DMBA está de acordo com os dados referentes ao grau dos tumores e à expressão dos receptores HER-2 e ERα, indicando que não há diferença de malignidade e prognóstico nos tumores entre os grupos.

6.6.2 Modificações no padrão de metilação global e especifica do DNA

Visto que a exposição a diferentes concentrações de selênio durante o período fetal através da dieta materna causou modificações na expressão de Erα e o fato de que o selênio

é conhecido por ter efeito sobre processos epigenéticos, aventou-se a possibilidade de que a diminuição na expressão de ERα estaria relacionada a alterações no estado de metilação da região regulatória desse gene. A região localizada na posição de -2320 a -2263 do códon ATG, correspondente ao Exon 1 do ERα, exerce função regulatória na expressão desse gene, sendo altamente suscetível a mudanças no padrão de metilação de citosinas (YENBUTR; HILAKIVI-CLARKE; PASSANITI, 1998).

Poucos estudos avaliaram a modulação do risco de câncer de mama por meio da interferência da dieta materna no padrão de metilação de regiões regulatórias do gene ERα. A prole de ratas alimentadas com dieta hiperlipídica durante o período gestacional apresentaram diminuição na metilação do Exon 1 da região 5' UTR do gene ERα na glândula mamária, o que foi relacionado ao aumento na suscetibilidade desses animais ao câncer de mama (YENBUTR; HILAKIVI-CLARKE; PASSANITI, 1998).

A análise desse parâmetro mostra que a suplementação e deficiência de selênio na dieta materna podem levar a alterações no estado de metilação da região regulatória do ERα. No entanto, mais estudos são necessários para determinar se essas modificações são suficientes para causar a diminuição da expressão desse gene, ou se a combinação com outros mecanismos é necessária para obter tal efeito.

Descreve-se que o selênio é capaz de modular o padrão de metilação do DNA tanto através do metabolismo de um carbono como pela modulação da atividade das DNA metiltransfersaes. Nesse sentido, Davis e Uthus (2003) mostraram que a deficiência de selênio apresenta efeitos inversos à deficiência de folato no metabolismo de um carbono; com diminuição na concentração de homocísteína pelo aumento de sua conversão à cistationina pela via de transulfuração e aumento da razão SAM/SAH. Contrário a essas observações, no entanto, animais que receberam dieta suplementada em selênio apresentaram maiores níveis de metilação global, bem como maior atividade da enzima metiltransferase tanto no fígado como no cólon, sendo o oposto observado em animais que receberam dieta deficiente em selênio (DAVIS; UTHUS, 2003).

Estudos utilizando células de câncer de próstata observaram resultados que vão de encontro aos apresentados por Davis e Uthus, em que a oferta de selênio diminuiu a atividade de DNMTs (XIANG et al., 2008), embora sua deficiência em células de câncer de cólon tenha levado à hipometilação global do DNA (DAVIS; UTHUS; FINLEY, 2000). Da mesma

forma, o tratamento de células de câncer de mama com diferentes formas de selênio diminuiu a expressão da enzima DNMT1 (DE MIRANDA et al., 2014). Porém, embora a suplementação e deficiência de selênio tenham efeitos sobre o estado de metilação do DNA, não foram observadas diferenças no padrão global de metilação do DNA e na expressão de DNA metiltransferases 1, 3a e 3b.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a exposição a diferentes concentrações de selênio através da dieta materna durante a gestação pode programar o risco de câncer de mama da progênie feminina na vida adulta. A suplementação da dieta materna com selênio diminuiu o risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias na prole feminina na vida adulta. Essa programação foi associada à modulação de mecanismos celulares e moleculares, com diminuição na expressão dos receptores ERα, HER-2 e EGFR na glândula mamária desses animais com 7 semana de idade não iniciadas com DMBA. Além disso, a diminuição na expressão de ERα pode estar relacionada a mudanças no padrão de metilação de sua região regulatória. Por outro lado, a deficiência de selênio na dieta materna promoveu um aumento na incidência de adenocarinomas mamários em sua prole feminina, acompanhado por diminuição na expressão de GPx no início da vida.

Visto que o câncer de mama é um problema de saúde pública, que causam danos não apenas relacionados à saúde, mas também em âmbito financeiro e emocional, nossos resultados apontam para a possibilidade de estabelecimento de medidas de redução do risco do câncer de mama já no início da vida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALATISE, O. I.; SCHRAUZER, G. N. Lead exposure: a contributing cause of the current breast cancer epidemic in Nigerian women. **Biological trace element research**, v. 136, n. 2, p. 127–39, ago. 2010.

ALLRED, D. C.; MOHSIN, S. K.; FUQUA, S. A. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. **Endocrine-related cancer**, v. 8, n. 1, p. 47–61, mar. 2001.

ANANTHANARAYANAN, V.; DEATON, R. J.; YANG, X. J.; PINS, M. R.; GANN, P. H. Alteration of proliferation and apoptotic markers in normal and premalignant tissue associated with prostate cancer. **BMC cancer**, v. 6, n. 1, p. 73, 17 jan. 2006.

AUNE, D.; CHAN, D. S. M.; GREENWOOD, D. C.; VIEIRA, A. R.; ROSENBLATT, D. A. N.; VIEIRA, R.; NORAT, T. Dietary fiber and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO**, v. 23, n. 6, p. 1394–402, jun. 2012.

BACHMANN, I. M.; HALVORSEN, O. J.; COLLETT, K.; STEFANSSON, I. M.; STRAUME, O.; HAUKAAS, S. A.; SALVESEN, H. B.; OTTE, A. P.; AKSLEN, L. A. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 24, n. 2, p. 268–73, 10 jan. 2006.

BALLARD-BARBASH, R.; HUNSBERGER, S.; ALCIATI, M. H.; BLAIR, S. N.; GOODWIN, P. J.; MCTIERNAN, A.; WING, R.; SCHATZKIN, A. Physical activity, weight control, and breast cancer risk and survival: clinical trial rationale and design considerations. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 9, p. 630–43, 6 maio 2009.

BARKER, D. J. P. The developmental origins of adult disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 6 Suppl, p. 588S–595S, dez. 2004.

BARNES, K. M.; EVENSON, J. K.; RAINES, A. M.; SUNDE, R. A. Transcript analysis of the selenoproteome indicates that dietary selenium requirements of rats based on selenium-regulated selenoprotein mRNA levels are uniformly less than those based on glutathione peroxidase activity. **The Journal of nutrition**, v. 139, n. 2, p. 199–206, fev. 2009.

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

BATES, J. M.; SPATE, V. L.; MORRIS, J. S.; ST GERMAIN, D. L.; GALTON, V. A. Effects of selenium deficiency on tissue selenium content, deiodinase activity, and thyroid hormone economy in the rat during development. **Endocrinology**, v. 141, n. 7, p. 2490–500, jul. 2000.

BAYLIN, S. B.; OHM, J. E. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 2, p. 107–16, fev. 2006.

BERMINGHAM, E. N.; BASSETT, S. A.; YOUNG, W.; ROY, N. C.; MCNABB, W. C.; COONEY, J. M.; BREWSTER, D. T.; LAING, W. A.; BARNETT, M. P. G. Post-weaning selenium and folate supplementation affects gene and protein expression and global DNA methylation in mice fed high-fat diets. **BMC medical genomics**, v. 6, n. 1, p. 7, 5 jan. 2013.

BETANCOURT, A. M.; ELTOUM, I. A.; DESMOND, R. A.; RUSSO, J.; LAMARTINIERE, C. A. In utero exposure to bisphenol A shifts the window of susceptibility for mammary carcinogenesis in the rat. **Environmental health perspectives**, v. 118, n. 11, p. 1614–9, nov. 2010.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & development**, v. 16, n. 1, p. 6–21, 1 jan. 2002.

BJÖRNSTRÖM, L.; SJÖBERG, M. Signal transducers and activators of transcription as downstream targets of nongenomic estrogen receptor actions. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 16, n. 10, p. 2202–14, out. 2002.

BLOBEL, C. P. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 6, n. 1, p. 32–43, jan. 2005.

BOGDEN, J. D.; KEMP, F. W.; CHEN, X.; STAGNARO-GREEN, A.; STEIN, T. P.; SCHOLL, T. O. Low-normal serum selenium early in human pregnancy predicts lower birth weight. **Nutrition Research**, v. 26, n. 10, p. 497–502, out. 2006.

BOSTEDT, H.; SCHRAMEL, P. The importance of selenium in the prenatal and postnatal development of calves and lambs. **Biological trace element research**, v. 24, n. 2, p. 163–71, fev. 1990.

BROWN, N. M.; WANG, J.; COTRONEO, M. S.; ZHAO, Y. X.; LAMARTINIERE, C. A. Prepubertal genistein treatment modulates TGF-alpha, EGF and EGF-receptor mRNAs and proteins in the rat mammary gland. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 144, n. 1-2, p. 149–65, 25 set. 1998.

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? **The British journal of nutrition**, v. 101, n. 5, p. 619–30, mar. 2009.

CALLINAN, P. A.; FEINBERG, A. P. The emerging science of epigenomics. **Human molecular genetics**, v. 15 Spec No, p. R95–101, 15 abr. 2006.

CALVO, V.; BEATO, M. BRCA1 Counteracts Progesterone Action by Ubiquitination Leading to Progesterone Receptor Degradation and Epigenetic Silencing of Target Promoters. **Cancer Research**, v. 71, n. 9, p. 3422–3431, 29 abr. 2011.

CASTELLANO, E; Downward J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. Genes Cancer, v.2, n. 3, p. 261-74, Mar. 2011

CHANG, S.; WANG, R.-H.; AKAGI, K.; KIM, K.-A.; MARTIN, B. K.; CAVALLONE, L.; HAINES, D. C.; BASIK, M.; MAI, P.; POGGI, E.; ISAACS, C.; LOOI, L. M.; MUN, K. S.; GREENE, M. H.; BYERS, S. W.; TEO, S. H.; DENG, C.-X.; SHARAN, S. K. Tumor suppressor BRCA1 epigenetically controls oncogenic microRNA-155. **Nature medicine**, v. 17, n. 10, p. 1275–82, out. 2011.

CHIAM, K.; TILLEY, W. D.; BUTLER, L. M.; BIANCO-MIOTTO, T. The dynamic and static modification of the epigenome by hormones: a role in the developmental origin of hormone related cancers. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1795, n. 2, p. 104–9, abr. 2009.

CHRISTOU, M.; SAVAS, U.; SCHROEDER, S.; SHEN, X.; THOMPSON, T.; GOULD, M. N.; JEFCOATE, C. R. Cytochromes CYP1A1 and CYP1B1 in the rat mammary gland: Cell-specific expression and regulation by polycyclic aromatic hydrocarbons and hormones. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 115, n. 1, p. 41–50, nov. 1995.

CIARLONI, L.; MALLEPELL, S.; BRISKEN, C. Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 13, p. 5455–60, 27 mar. 2007.

CLARK, L.C.; COMBS, G.F.; TURNBULL, B.W.; SLATE, E.H.; CHALKER, D.K.; CHOW, J.; DAVIS, L.S.; GLOVER, R.A.; GRAHAM, G.F.; GROSS, E.G.; KRONGRAD, A.; LESHER, J.L.; PARK, H.K.; SANDERS,

B.B.; SMITH, C.L.; TAYLOR, J.R. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. JAMA 276:1957-1963. 1996.

CLARKE, R. Animal models of breast cancer: experimental design and their use in nutrition and psychosocial research. **Breast cancer research and treatment**, v. 46, n. 2-3, p. 117–33, jan. 1997.

COHEN, L. A.; KENDALL, M. E.; ZANG, E.; MESCHTER, C.; ROSE, D. P. Modulation of N-nitrosomethylurea-induced mammary tumor promotion by dietary fiber and fat. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 7, p. 496–501, 3 abr. 1991.

COMBS GF, Jr, LÜ J. Selenium as a cancer preventive agent Selenium: Molecular Biology and Role in Health. New York: Kluwer Academic Publishers; 205–217.Hatfield D (ed). 2001

COONEY, C. A.; DAVE, A. A.; WOLFF, G. L. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 8 Suppl, p. 2393S–2400S, ago. 2002.

COSTA, I.; SOLANAS, M.; ESCRICH, E. Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz(alpha)anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 126, n. 8, p. 915–27, ago. 2002.

COUET, J.; SARGIACOMO, M.; LISANTI, M. P. Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 48, p. 30429–38, 28 nov. 1997.

CRACIUNESCU, C. N.; BROWN, E. C.; MAR, M.-H.; ALBRIGHT, C. D.; NADEAU, M. R.; ZEISEL, S. H. Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 1, p. 162–6, jan. 2004.

CUI, Y.; RIEDLINGER, G.; MIYOSHI, K.; TANG, W.; LI, C.; DENG, C.-X.; ROBINSON, G. W.; HENNIGHAUSEN, L. Inactivation of Stat5 in mouse mammary epithelium during pregnancy reveals distinct functions in cell proliferation, survival, and differentiation. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 18, p. 8037–47, set. 2004.

DALMAN, C.; ALLEBECK, P.; GUNNELL, D.; HARRISON, G.; KRISTENSSON, K.; LEWIS, G.; LOFVING, S.; RASMUSSEN, F.; WICKS, S.; KARLSSON, H. Infections in the CNS during childhood and the risk of subsequent psychotic illness: a cohort study of more than one million Swedish subjects. **The American journal of psychiatry**, v. 165, n. 1, p. 59–65, jan. 2008.

DALVAI, M.; BYSTRICKY, K. The role of histone modifications and variants in regulating gene expression in breast cancer. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 15, n. 1, p. 19–33, mar. 2010.

DAN, C.V. MYC on the Path to Cancer. **Cell**, v. 149, n. 1, p 22-35. Mar, 2012.

DANIAL, N. N. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 24, p. 7254–63, 15 dez. 2007.

DAVE, B.; EASON, R. R.; TILL, S. R.; GENG, Y.; VELARDE, M. C.; BADGER, T. M.; SIMMEN, R. C. M. The soy isoflavone genistein promotes apoptosis in mammary epithelial cells by inducing the tumor suppressor PTEN. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 10, p. 1793–803, out. 2005.

DAVIS, C. D.; MILNER, J. A. Biomarkers for diet and cancer prevention research: potentials and challenges. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 9, p. 1262–73, set. 2007.

DAVIS, C. D.; UTHUS, E. O. Dietary folate and selenium affect dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation, global DNA methylation and one-carbon metabolism in rats. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 9, p. 2907–14, set. 2003.

DAVIS, C. D.; UTHUS, E. O.; FINLEY, J. W. Dietary selenium and arsenic affect DNA methylation in vitro in Caco-2 cells and in vivo in rat liver and colon. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 12, p. 2903–9, dez. 2000.

DE ASSIS, S.; WARRI, A.; CRUZ, M. I.; HILAKIVI-CLARKE, L. Changes in mammary gland morphology and breast cancer risk in rats. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 44, p. e2260, 16 jan. 2010.

DE MIRANDA, J. X.; ANDRADE, F. DE O.; CONTI, A. DE; DAGLI, M. L. Z.; MORENO, F. S.; ONG, T. P. Effects of selenium compounds on proliferation and epigenetic marks of breast cancer cells. **Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 28, n. 4, p. 486–91, out. 2014.

DE OLIVEIRA ANDRADE, F.; FONTELLES, C. C.; ROSIM, M. P.; DE OLIVEIRA, T. F.; DE MELO LOUREIRO, A. P.; MANCINI-FILHO, J.; ROGERO, M. M.; MORENO, F. S.; DE ASSIS, S.; BARBISAN, L. F.; HILAKIVI-CLARKE, L.; ONG, T. P. Exposure to lard-based high-fat diet during fetal and lactation periods modifies breast cancer susceptibility in adulthood in rats. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 6, p. 613–22, jun. 2014.

DENG, C.-X. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 5, p. 1416–26, jan. 2006.

DING, L.; ERDMANN, C.; CHINNAIYAN, A. M.; MERAJVER, S. D.; KLEER, C. G. Identification of EZH2 as a molecular marker for a precancerous state in morphologically normal breast tissues. **Cancer research**, v. 66, n. 8, p. 4095–9, 15 abr. 2006.

DOHERTY, L. F.; BROMER, J. G.; ZHOU, Y.; ALDAD, T. S.; TAYLOR, H. S. 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. 146–55, jun. 2010.

DONG, Y.; GANTHER, H. E.; STEWART, C.; IP, C. Identification of molecular targets associated with selenium-induced growth inhibition in human breast cells using cDNA microarrays. **Cancer research**, v. 62, n. 3, p. 708–14, 1 fev. 2002.

EKBOM, A.; TRICHOPOULOS, D.; ADAMI, H. O.; HSIEH, C. C.; LAN, S. J. Evidence of prenatal influences on breast cancer risk. **Lancet (London, England)**, v. 340, n. 8826, p. 1015–8, 24 out. 1992.

EL-BAYOUMY, K. The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. **Mutation research**, v. 475, n. 1-2, p. 123–39, 18 abr. 2001.

EL-BAYOUMY, K. The negative results of the SELECT study do not necessarily discredit the selenium-cancer prevention hypothesis. **Nutrition and cancer**, v. 61, n. 3, p. 285–6, jan. 2009.

ELENBAAS, B. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. **Genes & Development**, v. 15, n. 1, p. 50–65, 1 jan. 2001.

ELSHEIKH, S. E.; GREEN, A. R.; RAKHA, E. A.; POWE, D. G.; AHMED, R. A.; COLLINS, H. M.; SORIA, D.; GARIBALDI, J. M.; PAISH, C. E.; AMMAR, A. A.; GRAINGE, M. J.; BALL, G. R.; ABDELGHANY, M. K.; MARTINEZ-POMARES, L.; HEERY, D. M.; ELLIS, I. O. Global Histone Modifications in Breast Cancer Correlate with Tumor Phenotypes, Prognostic Factors, and Patient Outcome. **Cancer Research**, v. 69, n. 9, p. 3802–3809, 14 abr. 2009.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, n. 5, p.

403–10, nov. 1991.

ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nature reviews. Genetics**, v. 8, n. 4, p. 286–98, abr. 2007.

ESTELLER, M.; HERMAN, J. G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. **The Journal of pathology**, v. 196, n. 1, p. 1–7, jan. 2002.

ESTELLER, M.; SILVA, J. M.; DOMINGUEZ, G.; BONILLA, F.; MATIAS-GUIU, X.; LERMA, E.; BUSSAGLIA, E.; PRAT, J.; HARKES, I. C.; REPASKY, E. A.; GABRIELSON, E.; SCHUTTE, M.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 7, p. 564–9, 5 abr. 2000.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; BAO, Y.; BROADLEY, M. R.; COLLINGS, R.; FORD, D.; HESKETH, J. E.; HURST, R. Selenium in human health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 7, p. 1337–83, 1 abr. 2011.

FENG, J.; HU, L.-H.; LU, J.; LI, Y.-R.; XIE, F. [Diagnostic value of BRCA1 and p16 gene methylation in sporadic breast cancer]. **Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer**, v. 28, n. 4, p. 436–40, abr. 2009.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM I, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN D, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–86, 13 set. 2014.

FORYST-LUDWIG, A.; KINTSCHER, U. Metabolic impact of estrogen signalling through ERalpha and ERbeta. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 122, n. 1-3, p. 74–81, out. 2010.

GALLEGO, M. I.; BINART, N.; ROBINSON, G. W.; OKAGAKI, R.; COSCHIGANO, K. T.; PERRY, J.; KOPCHICK, J. J.; OKA, T.; KELLY, P. A.; HENNIGHAUSEN, L. Prolactin, growth hormone, and epidermal growth factor activate Stat5 in different compartments of mammary tissue and exert different and overlapping developmental effects. **Developmental biology**, v. 229, n. 1, p. 163–75, 1 jan. 2001.

GAO, J.; LAUER, F. T.; DUNAWAY, S.; BURCHIEL, S. W. Cytochrome P450 1B1 is required for 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene (DMBA) induced spleen cell immunotoxicity. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 86, n. 1, p. 68–74, jul. 2005.

GARCÍA, J. M.; SILVA, J.; PEÑA, C.; GARCIA, V.; RODRÍGUEZ, R.; CRUZ, M. A.; CANTOS, B.; PROVENCIO, M.; ESPAÑA, P.; BONILLA, F. Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. **Genes, chromosomes & cancer**, v. 41, n. 2, p. 117–24, out. 2004.

GIRAULT, I.; TOZLU, S.; LIDEREAU, R.; BIÈCHE, I. Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 12, p. 4415–22, 1 out. 2003.

GJOREVSKI, N.; NELSON, C. M. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 9, p. 581–93, set. 2011.

GONZAGA, I.B. Avaliação nutricional relative ao selênio em crianças com dieta enriquecida de castanha-do-Brasil (Bertholletia axcelsa, L.). Tese de Doutorado. FCF/USP. São Paulo157p. 2002.

GRAZUL-BILSKA, A. T.; CATON, J. S.; ARNDT, W.; BURCHILL, K.; THORSON, C.; BOROWCZYK, E.; BILSKI, J. J.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P.; VONNAHME, K. A. Cellular proliferation and vascularization in ovine fetal ovaries: effects of undernutrition and selenium in maternal diet. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 137, n. 4, p. 699–707, 1 abr. 2009.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HARRIS, H. R.; BERGKVIST, L.; WOLK, A. Selenium intake and breast cancer mortality in a cohort of Swedish women. **Breast cancer research and treatment**, v. 134, n. 3, p. 1269–77, ago. 2012.

HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. The Outcome of Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT) reveals the need for better understanding of selenium biology. **Molecular interventions**, v. 9, n. 1, p. 18–21, fev. 2009.

HE, L.; HANNON, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nature reviews. Genetics**, v. 5, n. 7, p. 522–31, jul. 2004.

HELLER, G.; ZIEGLER, B.; BRANDSTETTER, A.; NOVAK, S.; RUDAS, M.; HENNIG, G.; GEHRMANN, M.; ACHT, T.; ZÖCHBAUER-MÜLLER, S.; FILIPITS, M. CDK10 is not a target for aberrant DNA methylation in breast cancer. **Anticancer research**, v. 29, n. 10, p. 3939–44, out. 2009.

HENNIGHAUSEN, L.; ROBINSON, G. W. Information networks in the mammary gland. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 9, p. 715–725, set. 2005.

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

HILAKIVI-CLARKE, L.; CABANES, A.; DE ASSIS, S.; WANG, M.; KHAN, G.; SHOEMAKER, W. J.; STEVENS, R. G. In utero alcohol exposure increases mammary tumorigenesis in rats. **British journal of cancer**, v. 90, n. 11, p. 2225–31, 1 jun. 2004.

HILAKIVI-CLARKE, L.; CLARKE, R.; ONOJAFE, I.; RAYGADA, M.; CHO, E.; LIPPMAN, M. A maternal diet high in n - 6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 17, p. 9372–7, 19 ago. 1997.

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

HILAKIVI-CLARKE, L.; OLIVO, S. E.; SHAJAHAN, A.; KHAN, G.; ZHU, Y.; ZWART, A.; CHO, E.; CLARKE, R. Mechanisms Mediating the Effects of Prepubertal (n-3) Polyunsaturated Fatty Acid Diet on Breast Cancer Risk in Rats. **J. Nutr.**, v. 135, n. 12, p. 2946S–2952, 1 dez. 2005.

HILAKIVI-CLARKE, L.; STOICA, A.; RAYGADA, M.; MARTIN, M. B. Consumption of a high-fat diet alters estrogen receptor content, protein kinase C activity, and mammary gland morphology in virgin and pregnant mice and female offspring. **Cancer research**, v. 58, n. 4, p. 654–60, 15 fev. 1998.

HO, S.-M.; TANG, W.-Y.; BELMONTE DE FRAUSTO, J.; PRINS, G. S. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. **Cancer research**, v. 66, n. 11, p. 5624–32, 1 jun. 2006.

HOADLEY, K. A.; WEIGMAN, V. J.; FAN, C.; SAWYER, L. R.; HE, X.; TROESTER, M. A.; SARTOR, C. I.; RIEGER-HOUSE, T.; BERNARD, P. S.; CAREY, L. A.; PEROU, C. M. EGFR associated expression profiles vary with breast tumor subtype. **BMC genomics**, v. 8, n. 1, p. 258, 31 jan. 2007.

HOWE, L.; AUSTON, D.; GRANT, P.; JOHN, S.; COOK, R. G.; WORKMAN, J. L.; PILLUS, L. Histone H3 specific acetyltransferases are essential for cell cycle progression. **Genes & development**, v. 15, n. 23, p. 3144–54, 1 dez. 2001.

HULKA, B. S.; MOORMAN, P. G. Breast cancer: hormones and other risk factors. **Maturitas**, v. 38, n. 1, p. 103–113, fev. 2001.

HYNES, N. E.; BOULAY, A. The mTOR pathway in breast cancer. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 11, n. 1, p. 53–61, jan. 2006.

IAVNILOVITCH, E.; CARDIFF, R. D.; GRONER, B.; BARASH, I. Deregulation of Stat5 expression and activation causes mammary tumors in transgenic mice. **International Journal of Cancer**, v. 112, n. 4, p. 607–619, 20 nov. 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Tipos de Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>. Acesso em 15 de Agosto. 2015.

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

IP, C. Prophylaxis of mammary neoplasia by selenium supplementation in the initiation and promotion phases of chemical carcinogenesis. **Cancer research**, v. 41, n. 11 Pt 1, p. 4386–90, nov. 1981.

IP, C. Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. **The Journal of nutrition**, v. 128, n. 11, p. 1845–54, nov. 1998.

IP, C.; DANIEL, F. B. Effects of Selenium on 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced Mammary Carcinogenesis and DNA Adduct Formation. **Cancer Res.**, v. 45, n. 1, p. 61–65, 1 jan. 1985.

IP, C.; HAYES, C. Tissue selenium levels in selenium-supplemented rats and their relevance in mammary cancer protection. **Carcinogenesis**, v. 10, n. 5, p. 921–5, maio 1989.

IP, C.; HAYES, C.; BUDNICK, R. M.; GANTHER, H. E. Chemical form of selenium, critical metabolites, and cancer prevention. **Cancer research**, v. 51, n. 2, p. 595–600, 15 jan. 1991.

IP, C.; THOMPSON, H. J.; GANTHER, H. E. Selenium Modulation of Cell Proliferation and Cell Cycle Biomarkers in Normal and Premalignant Cells of the Rat Mammary Gland. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 9, n. 1, p. 49–54, 1 jan. 2000.

JACKSON, M. I.; COMBS, G. F. Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 11, n. 6, p. 718–26, nov. 2008.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69–90, jan. 2011.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature reviews. Genetics**, v. 3, n. 6, p. 415–28, jun. 2002.

JOVANOVIĆ, I. B.; VELIČKOVIĆ, M.; VUKOVIĆ, D.; MILANOVIĆ, S.; VALČIĆ, O.; GVOZDIĆ, D. Effects of Different Amounts of Supplemental Selenium and Vitamin E on the Incidence of Retained Placenta, Selenium, Malondialdehyde, and Thyronines Status in Cows Treated with Prostaglandin F2α for the Induction of Parturition. **Journal of veterinary medicine**, v. 2013, p. 867453, jan. 2013.

JOVANOVIC, J.; RØNNEBERG, J. A.; TOST, J.; KRISTENSEN, V. The epigenetics of breast cancer. **Molecular oncology**, v. 4, n. 3, p. 242–54, jun. 2010.

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

KHAN, S. A.; ROGERS, M. A.; KHURANA, K. K.; MEGUID, M. M.; NUMANN, P. J. Estrogen receptor

expression in benign breast epithelium and breast cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 1, p. 37–42, 7 jan. 1998.

KHAN, S.; KUMAGAI, T.; VORA, J.; BOSE, N.; SEHGAL, I.; KOEFFLER, P. H.; BOSE, S. PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 112, n. 3, p. 407–10, 10 nov. 2004.

KIM, W. H.; SUH, J. H.; KIM, T. IL; SHIN, S. K.; PAIK, Y. H.; CHUNG, H. W.; KIM, D. Y.; JEONG, J. H.; KANG, J. K.; KIM, H.; KIM, N. K. Colorectal flat neoplasia. **Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver**, v. 35, n. 3, p. 165–71, mar. 2003.

KLEER, C. G.; CAO, Q.; VARAMBALLY, S.; SHEN, R.; OTA, I.; TOMLINS, S. A.; GHOSH, D.; SEWALT, R. G. A. B.; OTTE, A. P.; HAYES, D. F.; SABEL, M. S.; LIVANT, D.; WEISS, S. J.; RUBIN, M. A.; CHINNAIYAN, A. M. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11606–11, 30 set. 2003.

KORKAYA, H.; PAULSON, A.; IOVINO, F.; WICHA, M. S. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. **Oncogene**, v. 27, n. 47, p. 6120–30, 16 out. 2008.

KOTSOPOULOS, J.; CHEN, Z.; VALLIS, K. A.; POLL, A.; GHADIRIAN, P.; KENNEDY, G.; AINSWORTH, P.; NAROD, S. A. Toenail selenium status and DNA repair capacity among female BRCA1 mutation carriers. **Cancer causes & control : CCC**, v. 21, n. 5, p. 679–87, maio 2010.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693–705, 23 fev. 2007.

KOWALSKA, E.; NAROD, S. A.; HUZARSKI, T.; ZAJACZEK, S.; HUZARSKA, J.; GORSKI, B.; LUBINSKI, J. Increased rates of chromosome breakage in BRCA1 carriers are normalized by oral selenium supplementation. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 14, n. 5, p. 1302–6, maio 2005.

KRUK, J. Lifestyle components and primary breast cancer prevention. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 15, n. 24, p. 10543–55, jan. 2014.

KUCHARSKI, R.; MALESZKA, J.; FORET, S.; MALESZKA, R. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 319, n. 5871, p. 1827–30, 28 mar. 2008.

LAMARTINIERE, C. A.; MOORE, J.; HOLLAND, M.; BARNES, S. Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 208, n. 1, p. 120–3, jan. 1995.

LAMBARD, S. E.; BURNETT, A. K.; WOLF, C. R.; CRAFT, J. A. The role of specific cytochromes P450 in the formation of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-protein adducts in rat liver microsomes in vitro. **Biochemical pharmacology**, v. 42, n. 8, p. 1529–35, 27 set. 1991.

Lawson, J.S.; Field, A.S.; Champion, S.; Tran, D.; Ishikura, H.; Trichopoulos D. Low oestrogen receptor alpha expression in normal breast tissue underlies low breast cancer incidence in Japan. **Lancet**, v. 354, n. 9192, p. 1787-8. Nov 1999.

LEE, S. O.; NADIMINTY, N.; WU, X. X.; LOU, W.; DONG, Y.; IP, C.; ONATE, S. A.; GAO, A. C. Selenium disrupts estrogen signaling by altering estrogen receptor expression and ligand binding in human breast cancer cells. **Cancer research**, v. 65, n. 8, p. 3487–92, 15 abr. 2005a.

LEI, X. G.; EVENSON, J. K.; THOMPSON, K. M.; SUNDE, R. A. Glutathione peroxidase and phospholipid

hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. **The Journal of nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1438–46, jun. 1995.

LEVIN, E. R. Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 17, n. 3, p. 309–17, mar. 2003.

LI, D. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and non-communicable diseases: meta-analysis based systematic review. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 24, n. 1, p. 10–5, jan. 2015.

LILLYCROP, K. A.; PHILLIPS, E. S.; JACKSON, A. A.; HANSON, M. A.; BURDGE, G. C. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. **The Journal of nutrition**, v. 135, n. 6, p. 1382–6, jun. 2005.

LILLYCROP, K. A.; SLATER-JEFFERIES, J. L.; HANSON, M. A.; GODFREY, K. M.; JACKSON, A. A.; BURDGE, G. C. Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and . **The British journal of nutrition**, v. 97, n. 6, p. 1064–73, jun. 2007.

LIPPMAN, S. M. et al. Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). **JAMA**, v. 301, n. 1, p. 39–51, 7 jan. 2009.

LIU, J. Z.; GILBERT, K.; PARKER, H. M.; HASCHEK, W. M.; MILNER, J. A. Inhibition of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors and DNA adducts by dietary selenite. **Cancer research**, v. 51, n. 17, p. 4613–7, 1 set. 1991.

LOPEZ-SAEZ, J.-B.; MARTINEZ-RUBIO, J. A.; ALVAREZ, M. M.; CARRERA, C. G.; DOMINGUEZ VILLAR, M.; DE LOMAS MIER, A. G.; DOMÉNECH, C.; SENRA-VARELA, A. Metabolic profile of breast cancer in a population of women in southern Spain. **The open clinical cancer journal**, v. 2, p. 1–6, jan. 2008.

LUO, J.; MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer. **Cancer Cell**, v. 4, n. 4, p. 257–262, out. 2003.

LY, A.; LEE, H.; CHEN, J.; SIE, K. K. Y.; RENLUND, R.; MEDLINE, A.; SOHN, K.-J.; CROXFORD, R.; THOMPSON, L. U.; KIM, Y.-I. Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on mammary tumor risk in the offspring. **Cancer research**, v. 71, n. 3, p. 988–97, 1 fev. 2011.

MADIGAN, M. P.; ZIEGLER, R. G.; BENICHOU, J.; BYRNE, C.; HOOVER, R. N. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 22, p. 1681–5, 15 nov. 1995.

MALLEPELL, S.; KRUST, A.; CHAMBON, P.; BRISKEN, C. Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 7, p. 2196–201, 14 fev. 2006.

MÄNNISTÖ, S.; ALFTHAN, G.; VIRTANEN, M.; KATAJA, V.; UUSITUPA, M.; PIETINEN, P. Toenail selenium and breast cancer-a case-control study in Finland. **European journal of clinical nutrition**, v. 54, n. 2, p. 98–103, fev. 2000.

MORIARTY, P. M.; REDDY, C. C.; MAQUAT, L. E. Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 5, p. 2932–9, maio 1998.

NAFEE, T. M.; FARRELL, W. E.; CARROLL, W. D.; FRYER, A. A.; ISMAIL, K. M. K. Epigenetic control of fetal gene expression. **BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology**, v. 115, n. 2, p. 158–68, jan. 2008.

NAHLEH, Z.; BHATTI, N. S.; MAL, M. How to reduce your cancer risk: mechanisms and myths. **International journal of general medicine**, v. 4, p. 277–87, jan. 2011.

NARAYAN, V.; RAVINDRA, K. C.; LIAO, C.; KAUSHAL, N.; CARLSON, B. A.; PRABHU, K. S. Epigenetic regulation of inflammatory gene expression in macrophages by selenium. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 26, n. 2, p. 138–45, fev. 2015.

NYIRENDA, M. J.; LINDSAY, R. S.; KENYON, C. J.; BURCHELL, A.; SECKL, J. R. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. **The Journal of clinical investigation**, v. 101, n. 10, p. 2174–81, 15 maio 1998.

OJEDA, M.L.; NOGALES, F.; VÁZQUEZ, B.; DELGADO, M.J.; MURILLO, M.L.; CARRERAS, O. Alcohol, gestation and breastfeeding: selenium as an antioxidant therapy. **Alcohol Alcohol**, v. 44, n. 3, p. 272-7. May-Jun 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Breast cancer: prevention and control. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html>. Acesso em 17 de Agosto. 2015.

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, n. 5, p. 275–92, jan. 2011.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 70, n. 1, p. 158–69, jul. 1967.

PALMER, J. R.; WISE, L. A.; HATCH, E. E.; TROISI, R.; TITUS-ERNSTOFF, L.; STROHSNITTER, W.; KAUFMAN, R.; HERBST, A. L.; NOLLER, K. L.; HYER, M.; HOOVER, R. N. Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 15, n. 8, p. 1509–14, ago. 2006.

PANTAVOS, A.; RUITER, R.; FESKENS, E. F.; DE KEYSER, C. E.; HOFMAN, A.; STRICKER, B. H.; FRANCO, O. H.; KIEFTE-DE JONG, J. C. Total dietary antioxidant capacity, individual antioxidant intake and breast cancer risk: the Rotterdam Study. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 136, n. 9, p. 2178–86, 1 maio 2015.

PARK, Y.; BRINTON, L. A.; SUBAR, A. F.; HOLLENBECK, A.; SCHATZKIN, A. Dietary fiber intake and risk of breast cancer in postmenopausal women: the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. **The American journal of clinical nutrition**, v. 90, n. 3, p. 664–71, 1 set. 2009.

PARKIN, D. M.; FERNÁNDEZ, L. M. G. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer. **The breast journal**, v. 12 Suppl 1, p. S70–80, jan. 2006.

PETERS, A. H.; O'CARROLL, D.; SCHERTHAN, H.; MECHTLER, K.; SAUER, S.; SCHÖFER, C.; WEIPOLTSHAMMER, K.; PAGANI, M.; LACHNER, M.; KOHLMAIER, A.; OPRAVIL, S.; DOYLE, M.; SIBILIA, M.; JENUWEIN, T. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. **Cell**, v. 107, n. 3, p. 323–37, 2 nov. 2001.

PETRIC, R.; BRAICU, C.; RADULY, L.; ZANOAGA, O.; DRAGOS, N.; MONROIG, P.; DUMITRASCU, D.; BERINDAN-NEAGOE, I. Phytochemicals modulate carcinogenic signaling pathways in breast and hormone-related cancers. **OncoTargets and therapy**, v. 8, p. 2053–66, jan. 2015.

PFISTER, S.; REA, S.; TAIPALE, M.; MENDRZYK, F.; STRAUB, B.; ITTRICH, C.; THUERIGEN, O.; SINN, H. P.; AKHTAR, A.; LICHTER, P. The histone acetyltransferase hMOF is frequently downregulated in

primary breast carcinoma and medulloblastoma and constitutes a biomarker for clinical outcome in medulloblastoma. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 122, n. 6, p. 1207–13, 15 mar. 2008.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 11, p. 3155–63, nov. 2007.

POLYAK, K.; KALLURI, R. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 11, p. a003244, nov. 2010.

POPOVA, N. V. Perinatal selenium exposure decreases spontaneous liver tumorogenesis in CBA mice. **Cancer Letters**, v. 179, n. 1, p. 39–42, maio 2002.

PORTER, P. "Westernizing" Women's Risks? Breast Cancer in Lower-Income Countries. **N Engl J Med.** 17;358(3):213-6, Jan. 2008.

RADPOUR, R.; BAREKATI, Z.; KOHLER, C.; LV, Q.; BÜRKI, N.; DIESCH, C.; BITZER, J.; ZHENG, H.; SCHMID, S.; ZHONG, X. Y. Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. **PloS one**, v. 6, n. 1, p. e16080, jan. 2011.

RADPOUR, R.; KOHLER, C.; HAGHIGHI, M. M.; FAN, A. X. C.; HOLZGREVE, W.; ZHONG, X. Y. Methylation profiles of 22 candidate genes in breast cancer using high-throughput MALDI-TOF mass array. **Oncogene**, v. 28, n. 33, p. 2969–78, 20 ago. 2009.

RAHAL, O. M.; PABONA, J. M. P.; KELLY, T.; HUANG, Y.; HENNINGS, L. J.; PRIOR, R. L.; AL-DWAIRI, A.; SIMMEN, F. A.; SIMMEN, R. C. M. Suppression of Wnt1-induced mammary tumor growth and lower serum insulin in offspring exposed to maternal blueberry diet suggest early dietary influence on developmental programming. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 2, p. 464–74, fev. 2013.

RAMACHANDRAN, K.; NAVARRO, L.; GORDIAN, E.; DAS, P. M.; SINGAL, R. Methylation-mediated silencing of genes is not altered by selenium treatment of prostate cancer cells. **Anticancer research**, v. 27, n. 2, p. 921–5, jan. 2007.

RAYMAN, M.P. The importance of selenium to human health.. Lancet, v, 356, n. 9225, p. 233-41. Jul 2000.

RAYMAN, M. P. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n. 4, p. 527–42, nov. 2005.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **Lancet (London, England)**, v. 379, n. 9822, p. 1256–68, 31 mar. 2012.

RAZANDI, M.; PEDRAM, A.; PARK, S. T.; LEVIN, E. R. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 4, p. 2701–12, 24 jan. 2003.

REJALI, L.; JAAFAR, M. H.; ISMAIL, N. H. Serum selenium level and other risk factors for breast cancer among patients in a Malaysian hospital. **Environmental health and preventive medicine**, v. 12, n. 3, p. 105–10, maio 2007.

RODRÍGUEZ-PAREDES, M.; ESTELLER, M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. **Nature medicine**, v. 17, n. 3, p. 330–9, 7 mar. 2011.

ROSEBOOM, T. J.; VAN DER MEULEN, J. H.; RAVELLI, A. C.; OSMOND, C.; BARKER, D. J.; BLEKER, O. P. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 185, n. 1-2, p. 93–8, 20 dez. 2001.

ROTRUCK, J. T.; POPE, A. L.; GANTHER, H. E.; SWANSON, A. B.; HAFEMAN, D. G.; HOEKSTRA, W.

G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 179, n. 4073, p. 588–90, 9 fev. 1973.

RÜKGAUER, M.; NEUGEBAUER, R. J.; PLECKO, T. The relation between selenium, zinc and copper concentration and the trace element dependent antioxidative status. **Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 15, n. 2-3, p. 73–8, jan. 2001.

RUSSO, J.; GUSTERSON, B. A.; ROGERS, A. E.; RUSSO, I. H.; WELLINGS, S. R.; VAN ZWIETEN, M. J. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 62, n. 3, p. 244–78, mar. 1990.

RUSSO, J.; RUSSO, I. H. Influence of differentiation and cell kinetics on the susceptibility of the rat mammary gland to carcinogenesis. **Cancer research**, v. 40, n. 8 Pt 1, p. 2677–87, ago. 1980.

RUSSO, J.; RUSSO, I. H. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 57, n. 2, p. 112–37, ago. 1987.

RUSSO, J.; WILGUS, G.; RUSSO, I. H. Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis: I Differentiation of the mammary gland as determinant of tumor incidence and type of lesion. **The American journal of pathology**, v. 96, n. 3, p. 721–36, set. 1979.

SADIKOVIC, B.; AL-ROMAIH, K.; SQUIRE, J. A.; ZIELENSKA, M. Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer. **Current genomics**, v. 9, n. 6, p. 394–408, set. 2008.

SCHWARZ, K.; FOLTZ, C. M. SELENIUM AS AN INTEGRAL PART OF FACTOR 3 AGAINST DIETARY NECROTIC LIVER DEGENERATION. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 12, p. 3292–3293, jun. 1957.

SCZANIECKA, A. K.; BRASKY, T. M.; LAMPE, J. W.; PATTERSON, R. E.; WHITE, E. Dietary intake of specific fatty acids and breast cancer risk among postmenopausal women in the VITAL cohort. **Nutrition and cancer**, v. 64, n. 8, p. 1131–42, jan. 2012.

SHAH, Y. M.; AL-DHAHERI, M.; DONG, Y.; IP, C.; JONES, F. E.; ROWAN, B. G. Selenium disrupts estrogen receptor (alpha) signaling and potentiates tamoxifen antagonism in endometrial cancer cells and tamoxifen-resistant breast cancer cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 4, n. 8, p. 1239–49, ago. 2005.

SHAJAHAN, A. N.; GOEL, S.; DE ASSIS, S.; YU, B.; CLARKE, R.; HILAKIVI-CLARKE, L. Changes in mammary caveolin-1 signaling pathways are associated with breast cancer risk in rats exposed to estradiol in utero or during prepuberty. **Hormone molecular biology and clinical investigation**, v. 2, n. 2, p. 227–234, jun. 2010.

SHAMBERGER, R. J.; WILLIS, C. E. Selenium distribution and human cancer mortality. **CRC critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 2, n. 2, p. 211–21, jun. 1971.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27–36, jan. 2010.

SHIVAKUMAR, L.; MINNA, J.; SAKAMAKI, T.; PESTELL, R.; WHITE, M. A. The RASSF1A Tumor Suppressor Blocks Cell Cycle Progression and Inhibits Cyclin D1 Accumulation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 12, p. 4309–4318, 15 jun. 2002.

SIERI, S. et al. Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **Am J Clin Nutr**, v. 88, n. 5, p. 1304–1312, 1 nov. 2008.

SIEWIT, C. L.; GENGLER, B.; VEGAS, E.; PUCKETT, R.; LOUIE, M. C. Cadmium promotes breast cancer

cell proliferation by potentiating the interaction between ERalpha and c-Jun. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 24, n. 5, p. 981–92, maio 2010.

SILBERSTEIN, G. B. Postnatal mammary gland morphogenesis. **Microscopy research and technique**, v. 52, n. 2, p. 155–62, 15 jan. 2001.

SIMONS, K.; TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 1, n. 1, p. 31–9, out. 2000.

SINHA, R.;, EL-BAYOUMY, K. Apoptosis is a critical cellular event in cancer chemoprevention and chemotherapy by selenium compounds. **Curr Cancer Drug Targets,** v. 4, n. 1, p. 13-28. Feb, 2004.

SLAMON, D. J.; GODOLPHIN, W.; JONES, L. A.; HOLT, J. A.; WONG, S. G.; KEITH, D. E.; LEVIN, W. J.; STUART, S. G.; UDOVE, J.; ULLRICH, A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 244, n. 4905, p. 707–12, 12 maio 1989.

SMITH, A. M.; PICCIANO, M. F. Evidence for increased selenium requirement for the rat during pregnancy and lactation. **The Journal of nutrition**, v. 116, n. 6, p. 1068–79, jun. 1986.

SONG, M. S.; SALMENA, L.; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 13, n. 5, p. 283–96, maio 2012.

STEARNS, V.; ZHOU, Q.; DAVIDSON, N. E. Epigenetic regulation as a new target for breast cancer therapy. **Cancer investigation**, v. 25, n. 8, p. 659–65, dez. 2007.

SUZUKI, M. M.; BIRD, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nature reviews. Genetics**, v. 9, n. 6, p. 465–76, jun. 2008.

THALER, S.; SCHMIDT, M.; SCHAD, A.; SLEEMAN, J. P. RASSF1A inhibits estrogen receptor alpha expression and estrogen-independent signalling: implications for breast cancer development. **Oncogene**, v. 31, n. 47, p. 4912–22, 22 nov. 2012.

THANGAPAZHAM, R. L.; SINGH, A. K.; SHARMA, A.; WARREN, J.; GADDIPATI, J. P.; MAHESHWARI, R. K. Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer letters**, v. 245, n. 1-2, p. 232–41, 8 jan. 2007.

THOMPSON, H. J.; MEEKER, L. D.; BECCI, P. J.; KOKOSKA, S. Effect of short-term feeding of sodium selenite on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in the rat. **Cancer research**, v. 42, n. 12, p. 4954–8, dez. 1982.

THOMPSON, H. J.; MEEKER, L. D.; KOKOSKA, S. Effect of an inorganic and organic form of dietary selenium on the promotional stage of mammary carcinogenesis in the rat. **Cancer research**, v. 44, n. 7, p. 2803–6, jul. 1984.

TOLEDO, E. et al. Mediterranean Diet and Invasive Breast Cancer Risk Among Women at High Cardiovascular Risk in the PREDIMED Trial. **JAMA Internal Medicine**, v. 175, n. 11, p. 1, 14 set. 2015.

TORRE, L. A.; BRAY, F.; SIEGEL, R. L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 4 fev. 2015.

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, n. 7, p. 459–71, 5 abr. 2006.

TROYER, K. L.; LEE, D. C. Regulation of mouse mammary gland development and tumorigenesis by the ERBB signaling network. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 6, n. 1, p. 7–21, jan. 2001.

TRYNDYAK, V. P.; KOVALCHUK, O.; POGRIBNY, I. P. Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins. **Cancer biology & therapy**, v. 5, n. 1, p. 65–70, jan. 2006.

TSENG, M.; BYRNE, C.; EVERS, K. A.; LONDON, W. T.; DALY, M. B. Acculturation and breast density in foreign-born, U.S. Chinese women. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 15, n. 7, p. 1301–5, jul. 2006.

VAN SCHOONEVELD, E.; WILDIERS, H.; VERGOTE, I.; VERMEULEN, P. B.; DIRIX, L. Y.; VAN LAERE, S. J. Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 21, 18 jan. 2015.

WANG, Y.; LEUNG, F. C. C. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 20, n. 7, p. 1170–7, 1 maio 2004.

WATERLAND, R. A.; JIRTLE, R. L. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 20, n. 1, p. 63–8, jan. 2004.

WATSON, C. J.; KHALED, W. T. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. **Development (Cambridge, England)**, v. 135, n. 6, p. 995–1003, mar. 2008.

WHANGER, P. D. Selenium and its relationship to cancer: an update. **British Journal of Nutrition**, v. 91, n. 01, p. 11, 9 mar. 2007.

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

WIDSCHWENDTER, M.; JONES, P. A. DNA methylation and breast carcinogenesis. **Oncogene**, v. 21, n. 35, p. 5462–82, 12 ago. 2002.

WISEMAN, B. S. Stromal Effects on Mammary Gland Development and Breast Cancer. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1046–1049, 10 maio 2002.

WITTE, T. R.; HARDMAN, W. E. The effects of omega-3 polyunsaturated Fatty Acid consumption on mammary carcinogenesis. **Lipids**, v. 50, n. 5, p. 437–46, maio 2015.

WU, A. H.; YU, M. C.; TSENG, C.-C.; HANKIN, J.; PIKE, M. C. Green tea and risk of breast cancer in Asian Americans. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 106, n. 4, p. 574–9, 10 set. 2003.

XIANG, N.; ZHAO, R.; SONG, G.; ZHONG, W. Selenite reactivates silenced genes by modifying DNA methylation and histones in prostate cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 11, p. 2175–81, nov. 2008.

YARDEN, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. **European Journal of Cancer**, v. 37, p. 3–8, set. 2001.

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, n. 1-2, p. 93–102, 1 dez. 1998.

YOU, J. S.; JONES, P. A. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? **Cancer cell**, v. 22, n. 1, p. 9–20, 10 jul. 2012.

YU, H.; MOUW, J. K.; WEAVER, V. M. Forcing form and function: biomechanical regulation of tumor evolution. **Trends in cell biology**, v. 21, n. 1, p. 47–56, jan. 2011.

ZENG, X.; SHAIKH, F. Y.; HARRISON, M. K.; ADON, A. M.; TRIMBOLI, A. J.; CARROLL, K. A.; SHARMA, N.; TIMMERS, C.; CHODOSH, L. A.; LEONE, G.; SAAVEDRA, H. I. The Ras oncogene signals centrosome amplification in mammary epithelial cells through cyclin D1/Cdk4 and Nek2. **Oncogene**, v. 29, n. 36, p. 5103–12, 9 set. 2010.

ZHANG, X.; SHEN, P.; COLEMAN, M.; ZOU, W.; LOGGIE, B. W.; SMITH, L. M.; WANG, Z. Caveolin-1 down-regulation activates estrogen receptor alpha expression and leads to 17beta-estradiol-stimulated mammary tumorigenesis. **Anticancer research**, v. 25, n. 1A, p. 369–75, jan. 2005.

ZIEGLER, R. G.; HOOVER, R. N.; PIKE, M. C.; HILDESHEIM, A.; NOMURA, A. M.; WEST, D. W.; WU-WILLIAMS, A. H.; KOLONEL, L. N.; HORN-ROSS, P. L.; ROSENTHAL, J. F.; HYER, M. B. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 22, p. 1819–27, 17 nov. 1993.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF/67/2011

São Paulo, 06 de julho de 2011.

Ilmo(a) Sr(a).
Prof. Dr. Thomas Prates Ong
FBA

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP, em reunião realizada em 04 de julho de 2011, **APROVOU** o projeto "Nutrição materna e programação fetal do câncer: influência da deficiência ou suplementação com selênio durante o período gestacional de ratas na suscetibilidade da progênie feminina à carcinogênese mamária" (Protocolo CEUA/FCF/326), apresentado por Vossa Senhoria, devendo apenas, ser excluído o nome do candidato à pós-graduação, do Formulário de Registro.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

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