



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Muriele Bertagna Varuzza

**Exposição pós-natal ao Bisfenol A em fêmeas com
restrição proteica gestacional: efeitos sobre o
desenvolvimento mamário e suscetibilidade à
carcinogênese**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestra em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan
Coorientador: Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior

**Botucatu
2018**

Muriele Bertagna Varuzza

Exposição pós-natal ao Bisfenol A em fêmeas
com restrição proteica gestacional: efeitos
sobre o desenvolvimento mamário e
susceptibilidade à carcinogênese

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra
em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan
Coorientador: Prof. Dr. Luis Antonio Justulin Junior

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Varuzza, Muriele Bertagna.

Exposição pós-natal ao Bisfenol A em fêmeas com restrição proteica gestacional : efeitos sobre o desenvolvimento mamário e suscetibilidade à carcinogênese / Muriele Bertagna Varuzza. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Luis Fernando Barbisan

Coorientador: Luis Antonio Justulin Junior

Capes: 40105008

1. Desnutrição na gravidez. 2. Desreguladores endócrinos. 3. Mamas - Câncer. 4. Carcinogênese.

Palavras-chave: bisfenol A; câncer de mama; carcinogênese química experimental; desenvolvimento mamário; restrição proteica gestacional.

Eu dedico esse trabalho ao meu primo Tamiro (in memoriam) que sempre me cativou e incentivou a continuar no caminho pela busca do conhecimento científico.

Resumo

Perturbações no ambiente uterino e nos estágios iniciais da vida, por fatores nutricionais e/ou alterações hormonais, podem predispor os recém-nascidos a doenças crônicas na vida adulta. A restrição proteica gestacional (RPG) e a exposição ao Bisfenol A (BPA), nas fases pré e pós-natal, alteram o desenvolvimento mamário e aumentam a suscetibilidade a carcinogênese mamária. Assim, este trabalho investigou os possíveis efeitos da RPG e sua associação com a exposição pós-natal ao BPA sobre o desenvolvimento da glândula mamária e a suscetibilidade à carcinogênese mamária induzida pela 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA). Fêmeas prenhes da linhagem *Sprague-Dawley* foram alocadas em quatro grupos experimentais: dieta normoproteica (DNP); dieta hipoproteica (DHP); DNP+BPA e DHP+BPA. O BPA (1 mg/L) foi ministrado na água de beber à prole do dia pós-natal (DPN) 21 até o DPN 51. No DPN 51, fêmeas da prole (n=10/grupo) foram eutanasiadas para avaliação das glândulas mamárias, enquanto o restante (n=11/grupo) recebeu dose única de DMBA (30 mg/kg, i.g.), e foram eutanasiadas no DPN 250 para avaliação de tumores mamários. A RPG e a exposição ao BPA não alteraram o crescimento da árvore mamária, as unidades de brotos e ductos terminais (TEBs e TDs), a proliferação celular (Ki-67), a expressão do receptor de estrógeno β (RE- β) e área ocupada por fibras colágenas nas glândulas mamárias no DPN 51. Entretanto, nos grupos DHP e DNP+BPA houve redução na área correspondente ao tecido epitelial glandular e a associação (DHP+BPA) aumentou a área ocupada pelo *fat pad*. A exposição ao BPA (DNP+BPA e DHP+BPA) aumentou os índices apoptóticos, a RPG aumentou a expressão do receptor de estrógeno α (RE- α) e a associação (DHP+BPA) aumentou os receptores de progesterona (RP) nas glândulas mamárias no DPN 51. Os grupos DHP, DNP+BPA e DHP+BPA apresentaram menor latência tumoral. Além disso, os grupos que receberam BPA apresentaram maior incidência e multiplicidade tumoral. Considerando esses resultados, podemos concluir que a RPG e o BPA aumentaram a suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores mamários induzidos pela DMBA, mas a associação (DHP+BPA) não levou ao aumento do risco.

Palavras-chave: restrição proteica gestacional, bisfenol A, desenvolvimento mamário, câncer de mama, carcinogênese química experimental.

Abstract

Disturbances in the uterine environment and in the early stages of life, due to nutritional factors and/or hormonal changes, may predispose newborns to chronic diseases in adult life. Gestational protein restriction (GPR) and exposure to Bisphenol A (BPA), in the pre and postnatal phases alter breast development and increase susceptibility to mammary carcinogenesis. Therefore, the aim of this study was to investigate the possible effects of GPR and its association with postnatal exposure to BPA on mammary gland development and on susceptibility to 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) induced mammary carcinogenesis. For this purpose, pregnant females of the Sprague-Dawley strain were allocated into four experimental groups: normoprotein diet (NPD); hypoproteic diet (HPD); NPD+BPA and HPD+BPA. BPA (1 mg/L) was given in drinking water to offspring from postnatal day (PND) 21 to PND 51. At the PND 51, offspring females (n=10/group) were euthanized for mammary glands evaluation, while the remainder (n=11/group) received a single dose of DMBA (30 mg/kg, ig) and were euthanized at the PND 250 for breast tumors evaluation. GPR and BPA exposure did not alter the growth of the mammary tree, number of bud and terminal duct (TEBs and TDs), cell proliferation (Ki-67), expression of estrogen receptor β (ER- β) and collagen fibers area in the mammary glands at PND 51. However, in the HPD and NPD+BPA groups was a decreased area corresponding to the glandular epithelial tissue and the association (HPD+BPA) increased the fat pad. Exposure to BPA (NPD+BPA and HPD+BPA) increased apoptotic indexes, GPR increased estrogen receptors α expression (ER- α) while their association (HPD+BPA) increased progesterone receptors (PR) in the mammary glands. The groups HPD, NPD+BPA and HPD+BPA also showed lower tumor latency. In addition, the groups that received BPA presented higher tumor incidence and multiplicity. These results suggests that GPR and BPA exposure increased the susceptibility to mammary carcinogenesis induced by DMBA, but the association (HPD+BPA) did not increase the risk.

Key words: gestational protein restriction, bisphenol A, breast development, breast cancer, experimental chemical carcinogenesis.

Sumário

Capítulo I - Introdução

1. Revisão da Literatura	
1.1. Epidemiologia do Câncer	7
1.2. Câncer de Mama	8
1.3. Glândula Mamária	10
1.4. Carcinogênese Experimental	11
1.5. Restrição Proteica Gestacional	14
1.6. Bisfenol A	16
2. Referências	20
3. Objetivos	26

Capítulo II - Artigo

Introdução	29
<i>Materials e Métodos</i>	
Ética	31
Restrição Proteica Gestacional	31
Bisfenol A	31
Carcinogênese Química Experimental	31
Análise Morfológica da Glândula Mamária	32
Processamento Histológico das Glândulas Mamárias	32
Reação de Imunoistoquímica	32
Western Blot	33
Processamento Histológico dos Tumores Mamários	34
Análise Estatística.....	34
<i>Resultados</i>	
Experimentação Animal	34
Análise Morfométrica da Glândula Mamária	34
Análise Histológica da Glândula Mamária	34
Análise de Proliferação Celular e Apoptose	35
Análise dos Receptores de Progesterona e Estrógeno α e β	35

<i>Análise Histopatológica</i>	35
<i>Discussão</i>	36
<i>Agradecimentos</i>	39
<i>Referências</i>	39

Capítulo 1 – Introdução

1. Revisão da Literatura

1.1. Epidemiologia do Câncer

O câncer é uma doença crônico-degenerativa responsável por aproximadamente 14% das causas de morte no mundo, sendo a segunda doença de maior mortalidade, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (Torre et al., 2017). Em 2012, foram estimados 14 milhões de novos casos e 8 milhões de mortes por câncer em todo o mundo (Torre et al., 2016). Pesquisas recentes indicam crescimento progressivo nas taxas de morbidade e mortalidade relacionadas às neoplasias em nível mundial. Sua elevada taxa de morbidade/mortalidade se deve a inúmeros fatores incluindo, a mudança de estilo de vida decorrente do processo crescente de industrialização e redução nas taxas de mortalidade em geral, levando assim ao aumento da expectativa de vida e prevalência de doenças crônico-degenerativas, tais como o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, doença de Alzheimer e outros agravos relacionados ao envelhecimento e obesidade (Ferlay et al., 2015).

Estudos epidemiológicos e clínicos indicam as neoplasias de próstata, pulmão, estômago, esôfago, cólon e reto como as mais frequentes nos homens brasileiros, enquanto nas mulheres as neoplasias de mama, colo uterino, pulmão, estômago, cólon e reto prevalecem (Guerra et al., 2005; INCA 2018). O diagnóstico tardio e as dificuldades no tratamento do câncer auxiliam no aumento das taxas de mortalidade relacionadas a essa doença (Jemal et al., 2010; Cuzik, 2010; Ferlay et al., 2015). No Brasil, a estimativa segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), para o biênio 2018-2019 é a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer, sendo que os principais órgãos afetados serão mama em mulheres e próstata em homens (Figura 1). Esses dados populacionais estimulam os pesquisadores a tentarem entender melhor a evolução dessa doença para descobrir suas causas e/ou relacioná-la com fatores de risco, e a procurarem novos métodos de prevenção e tratamento.

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%	Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%	Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%	Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%	Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%	Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%	Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2018).

1.2. Câncer de Mama

Atualmente, a frequência de novos casos de câncer de mama tem aumentado exponencialmente em mulheres mais jovens de países desenvolvidos e em desenvolvimento (Ferlay et al., 2015; Torre et al., 2017). O tipo de câncer mais comum na população feminina é o de pele não melanoma, e em segundo lugar encontra-se o câncer de mama (INCA, 2018). Segundo dados da *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, o câncer de mama está entre os mais incidentes, destacando-se em regiões como América do Norte e Europa, e apresenta grande mortalidade, principalmente na África e Ásia (Figura 2). Em 2012, ocorreu cerca de 1,7 milhão de novos casos e mais de 500 mil mortes (Torre et al., 2016). Além de fatores genéticos, tais como alterações nos genes BRCA1 e BRCA2, outros fatores influenciam o risco para o desenvolvimento de câncer de mama como os reprodutivos (idade avançada, gravidez tardia, ausência de gravidez), obesidade, alcoolismo, sedentarismo, uso de hormônios exógenos (contraceptivos orais, terapia de reposição hormonal), menopausa tardia, hábitos alimentares e estilo de vida (Bouchardy et al., 2007; Ferlay et al., 2015; Torre et al., 2017). A incidência de câncer de mama aumenta rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, aumenta de forma mais lenta. Essa mudança pode ser atribuída ao início da menopausa em média aos 50 anos de idade (Cuzik, 2010). Estudos sugerem que a dieta, em especial o tipo e quantidade de gordura ingerida, pode estar relacionada aos diferentes índices de incidência e mortalidade por câncer de mama (Ferlay et al., 2015). Por ser uma doença altamente heterogênea, o câncer de mama é representado por neoplasias que possuem história natural diversa, histologia complexa e resposta variável às terapias convencionais (Parkin et al., 2005).

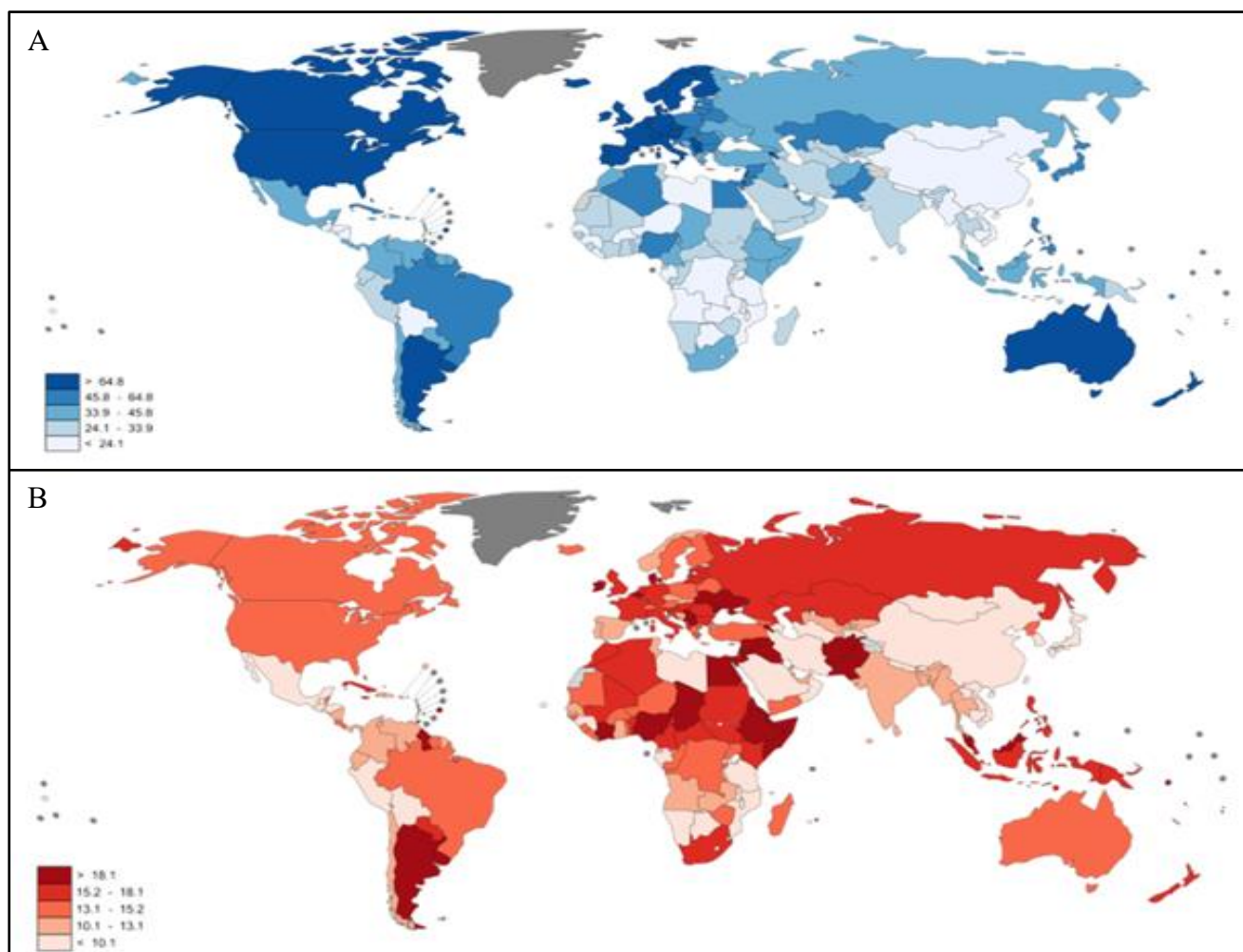


Figura 2. Estatísticas do câncer de mama (IARC, 2015). (A) Incidência e (B) Mortalidade; taxas estimadas por idade (mundo) por 100.000.

A história natural do câncer de mama envolve progressão através de estágios histopatológicos e clínicos bem definidos. No carcinoma do tipo ductal, a doença se inicia através de hiperproliferação ductal, com evolução para carcinoma *in situ* e/ou invasivo e, finalmente em doença metastática. Ductos normais da mama são compostos de membrana basal e uma camada de células mioepiteliais e uma de células epiteliais luminais. Perda de células mioepiteliais e membrana basal resultam em carcinoma invasivo, no qual células neoplásicas podem invadir tecidos adjacentes e migrar para órgãos distantes, eventualmente levando à metástase (Poliak, 2007).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de mama é o de maior variabilidade morfológica: existem aproximadamente 50 tipos histológicos. Os três tipos histológicos mais comuns são: carcinoma ductal invasivo, carcinoma ductal *in situ* e carcinoma lobular invasivo (Lakhani et al., 2012).

1.3. Glândula Mamária

Nos ratos, as glândulas mamárias (seis complexos mamários, Figura 3) são formadas inicialmente pelo espessamento ectodérmico das cristas mamárias que darão origem ao broto mamário primário por volta do dia gestacional (DG) 12 e 14. A partir do DG 16 até o nascimento, as células epiteliais do broto se desenvolvem e se ramificam e o mesênquima adjacente começa a se diferenciar para formar o suporte para a ramificação ductal. O crescimento da glândula mamária é proporcional ao crescimento corpóreo, mas se torna duas a três vezes maiores que o crescimento corpóreo durante o período pós-natal antes do início da puberdade (aproximadamente no DPN 51), e exponencial durante a puberdade e gravidez (Hovey et al., 2002).

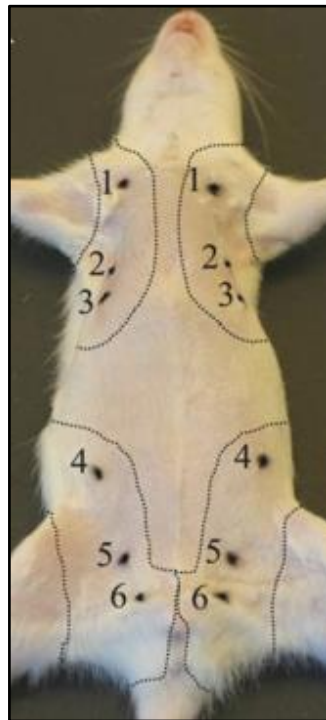


Figura 3. Apresentação dos complexos mamários de ratos (Hvid et al., 2011).

Durante o desenvolvimento da glândula mamária (Figura 4), brotos terminais (TEBs) crescem ativamente em estruturas ductais terminais, localizadas na borda crescente da glândula que se diferenciam em brotos alveolares (ABs) e posteriormente em lóbulos. Alguns TEBs também regridem a ductos terminais (TDs), que permanecem até futura diferenciação durante a gravidez e lactação (Russo & Russo, 1996; Russo & Russo 2004). A Figura 4 ilustra

o desenvolvimento da glândula mamária de ratas e o período de atuação dos principais hormônios (estrógeno, progesterona e prolactina).

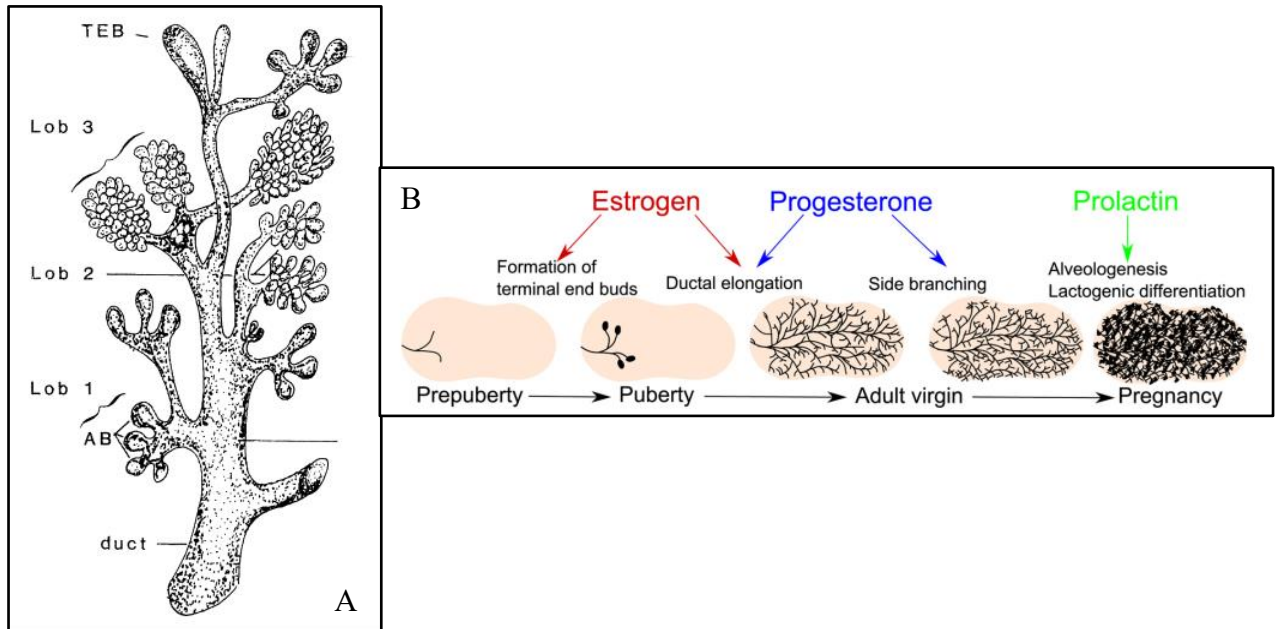


Figura 4. Glândula mamária. (A) Desenvolvimento da glândula mamária e (B) Função dos principais hormônios (Russo & Russo, 2004; Brisken et al., 2015).

1.4. Carcinogênese Experimental

O processo de carcinogênese química ocorre através de múltiplas etapas denominadas de iniciação, promoção e progressão. A iniciação e promoção estão bem estabelecidas experimentalmente. Entende-se por iniciação a interação de um agente químico ou físico com o DNA da célula-alvo. É um processo irreversível, porque altera permanentemente a estrutura do DNA, através de ligações covalentes, distorção ou quebra da molécula em fita simples ou dupla. A promoção ocorre quando tal alteração é expressa, ocorrendo o aparecimento de lesões focais de células alteradas ou lesões pré-neoplásicas (Pitot, 2007). Essas lesões apresentam importantes modificações em níveis moleculares e morfológicos, incluindo genes que controlam a proliferação celular, diferenciação e apoptose (Ray et al., 2007). Quando as lesões adquirem características de malignidade tem-se a fase de progressão (Pitot, 2007), na qual são observadas alterações no genoma, relacionadas à proliferação celular/apoptose,

invasividade, capacidade de produzir metástases e determinadas alterações bioquímicas, fornecendo substrato biológico para a manifestação clínica do câncer (Pitot, 2007).

Os modelos experimentais de neoplasias mamárias induzidas pela administração de carcinógenos químicos em roedores são ferramentas úteis para o estudo das múltiplas etapas da carcinogênese mamária e estudos de quimioprevenção desta neoplasia, com o objetivo de reverter ou prevenir a progressão dessa doença, como pode ser visto na Figura 5 (Mehta, 2000; Hui et al., 2010). A incidência, multiplicidade e tipos de tumores mamários são influenciados pela idade, tempo de exposição ao carcinógeno, história reprodutiva, desregulação endócrina, dieta e outros fatores que alteram o desenvolvimento e o grau de diferenciação da glândula mamária. As substâncias químicas mais utilizadas nos modelos experimentais de indução da carcinogênese mamária em fêmeas de ratos e camundongos são a 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) e a N-metil-N-nitrosourea (MNU). A exposição de ratas jovens no início da fase pubertal (entre dias pós-natal (DPN) 40 e 60) a esses carcinógenos aumenta a suscetibilidade das glândulas mamárias à iniciação do câncer, pois neste período há alta taxa de proliferação celular no epitélio glandular e a organogênese mamária está ativa (Russo & Russo, 1996; Russo & Russo, 2004).

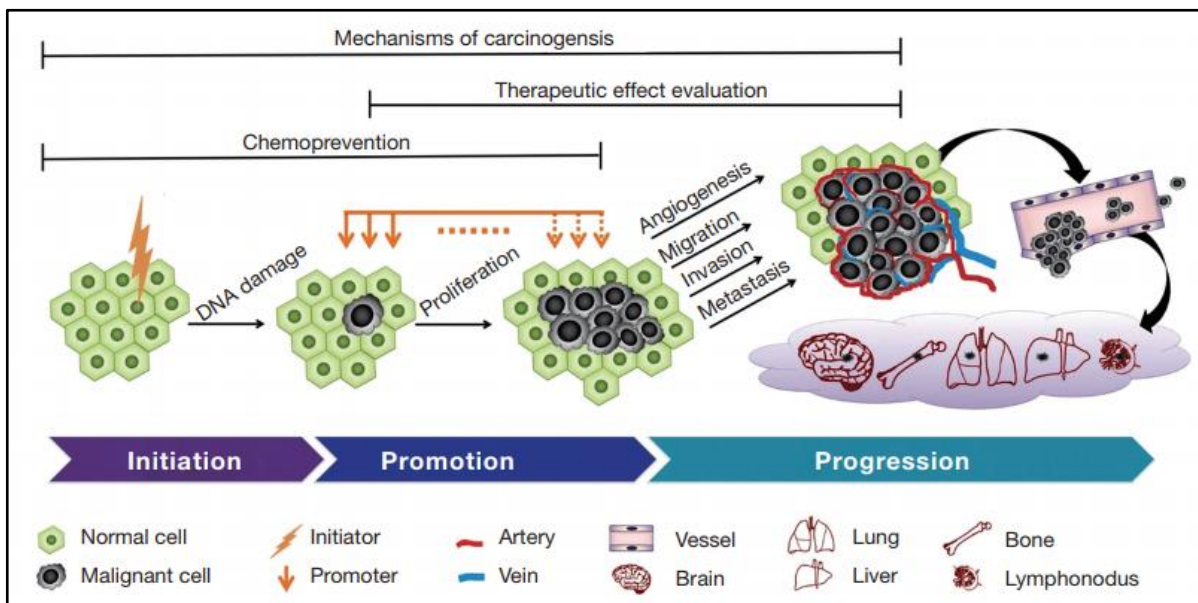


Figura 5. Ilustração das três fases da carcinogênese após a administração de carcinógenos e as várias aplicações de pesquisa baseadas em modelos animais (Liu et al., 2015).

Na indução pela DMBA, há o aumento da proliferação na estrutura do broto terminal (TEB) no epitélio mamário, juntamente com a formação de proliferação intradutal, carcinoma

in situ e invasivo (Figura 6). A carcinogênese da MNU revelou-se capaz de gerar carcinomas invasivos, bem como lesões mamárias em estágio inicial (Sharma et al., 2011). A MNU não requer ativação metabólica, sendo classificada como um agente de ação direta, ao contrário da DMBA, que é um carcinógeno indireto que requer ativação metabólica prévia por enzimas do citocromo P450 no fígado. Desta forma, a atividade carcinógena da DMBA é mais lenta quando comparada à MNU, o que resulta em um período de latência mais longo (Alvarado et al., 2017).

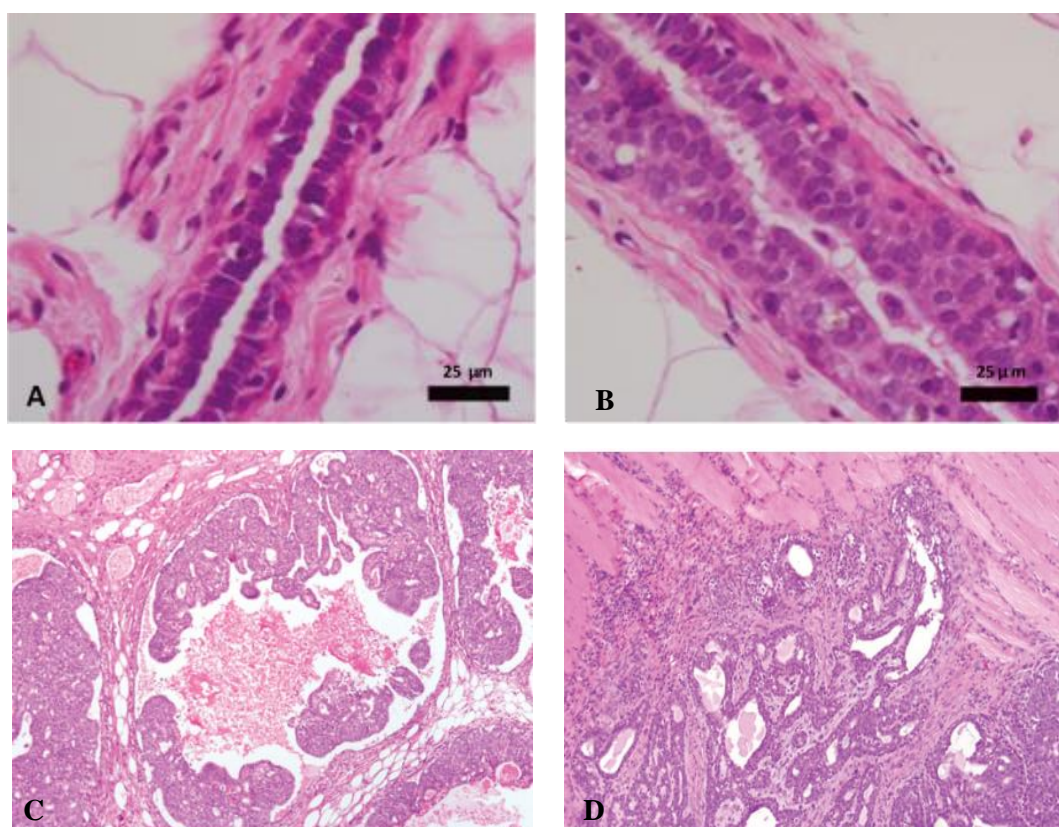


Figura 6. Fotomicrografia representativa da glândula mamária de ratas. (A) Ductos normais; (B) Hiperplasia ductal (lesão inicial); (C) Carcinoma *in situ* (Objetiva 20x) e (D) Carcinoma invasivo (Objetiva 20x) (Russo, 2015; Mandrup et al., 2016).

A DMBA é um carcinógeno sintético órgão-específico enquadrado na classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Figura 7). Sua metabolização pelas células animais resulta em um metabólito reativo carcinogênico com sítio reativo dihidrodiol epóxido. De fato, os dihidrodióis epóxidos têm potencial químico para formar íons carboxi-benzílicos, intermediários eletrofílicos que se ligam avidamente a sítios nucleofílicos celulares (Macejová & Brtko, 2001). *In vivo*, as células epiteliais mamárias presentes no TEB metabolizam a

DMBA resultando em metabólitos com radicais dihidrodióis epóxidos altamente reativos que causam danos irreparáveis no DNA dessas células, em decorrência da incapacidade em remover completamente os adutos de DNA induzidos pelos epóxidos reativos derivados da metabolização da DMBA (Macejová & Brtko, 2001). As neoplasias induzidas pela DMBA são em sua grande maioria (>90%) carcinomas hormônio-dependentes (Russo et al., 1994, Russo & Russo, 2004).

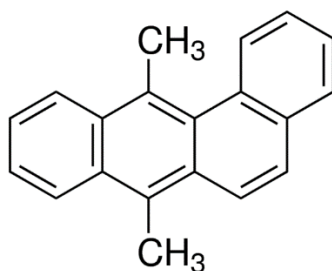


Figura 7. Estrutura química do hidrocarboneto policíclico aromático DMBA, de fórmula molecular $C_{20}H_{16}$ (Sigma-Aldrich, EUA).

1.5. Restrição Proteica Gestacional

Dados epidemiológicos e experimentais suportam a hipótese de que alterações no ambiente uterino e nos estágios iniciais da vida, por alterações hormonais e hábitos alimentares, podem predispor os recém-nascidos a muitas doenças crônicas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, hipertensão, entre outras (Barker, 2012). Alguns estudos têm demonstrado que o câncer de mama, que é considerado uma neoplasia da vida adulta, pode ser influenciado por alterações nutricionais, perturbações hormonais ou alterações genéticas ocorridas durante o desenvolvimento uterino e neonatal (Burdge et al., 2009).

Modelos em roedores têm sido utilizados para investigar os efeitos de estilos de vida sobre o desenvolvimento mamário normal, fatores de risco e suscetibilidade à carcinogênese mamária. Dentre os fatores que determinam diferentes estilos de vida, têm-se investigado, especialmente, como os fatores nutricionais podem estar associados com aumento ou diminuição da iniciação ou promoção da carcinogênese mamária (Hilakivi-Clarke, 2007). Os fatores nutricionais, em destaque a desnutrição proteica, podem afetar a glândula mamária, visto que esta glândula passa por diversos processos morfogênicos, principalmente, durante o desenvolvimento, puberdade e gravidez (Russo & Russo, 2011).

A nutrição materna durante períodos críticos da morfogênese e diferenciação das estruturas mamárias podem aumentar ou reduzir o risco de desenvolvimento do câncer. Por exemplo, um risco aumentado para o desenvolvimento do câncer de mama induzido quimicamente foi observado na prole de fêmeas de mães alimentadas com dieta hiperlipídica ou que induzem obesidade, enquanto que a suplementação com nutrientes doadores de grupos metil podem reduzir o risco de câncer de mama na prole de fêmeas na vida adulta (Assis et al., 2006; Fernandez-Twinn et al., 2007).

A desnutrição gestacional e pós-natal é considerada um problema emergente em todo o mundo e não afeta apenas o crescimento fetal humano, mas também a saúde do adulto a longo prazo. Estudos mostram que bebês que possuem baixo peso ao nascer apresentam maior predisposição para desenvolver na vida adulta obesidade, resistência à insulina, doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (Agnoux et al., 2015). Esses fatores, além de prejudiciais por si, podem ainda aumentar o risco de câncer de mama através da alteração do ambiente hormonal do feto em desenvolvimento (Wolf et al., 2005). Experimentalmente, a diminuição dos níveis de insulina e fatores de crescimento semelhantes à insulina nas fases finais da gestação em ratas prenhes acarreta em redução no transporte de aminoácidos via placentária e prejuízo para o desenvolvimento fetal (Rosario et al., 2011).

Alguns estudos mostram que o baixo peso ao nascer também está associado ao desenvolvimento do câncer de mama (Innes et al., 2000), outros autores afirmam que o elevado peso ao nascer aumenta os riscos de câncer de mama na vida adulta, através do aumento da densidade do tecido mamário com maior quantidade de células que poderão sofrer mutações (Assis et al., 2006; Xu et al., 2009). Outros estudos mostram que a restrição proteica materna em ratos durante a vida fetal, leva a um aumento permanente do apetite, excesso de peso e morte prematura (Fernandez-Twinn et al., 2006). Filhotes nascidos de ratas alimentadas com dieta hipoproteica (dieta pobre em proteínas) durante a gestação apresentam menor peso ao nascer, porém demonstram ganho de peso acelerado, constatando que a nutrição durante períodos críticos de desenvolvimento tem forte impacto sobre a longevidade (McMillen & Robinson, 2005).

Estímulos ambientais e estilo de vida, como estresse, álcool, fumo, fármacos, hipóxia, nutrição e atividade física também influenciam na estruturação dos sistemas fisiológicos. Destes estímulos, a nutrição e o estilo de vida da mãe são determinantes para o desenvolvimento de padrões metabólicos e crescimento somático do feto (Fidalgo et al., 2010). Experimentalmente foi demonstrado que alterações epigenéticas induzidas pela dieta hipoproteica na gestação podem interferir no desenvolvimento das glândulas mamárias da

prole de fêmeas e aumentar a suscetibilidade à carcinogênese mamária na vida adulta (Zheng et al., 2012). Frequentemente são encontrados casos de gestantes que sofrem desnutrição durante o período gestacional, levando à necessidade de estudos dos possíveis efeitos tardios nos descendentes.

1.6. Bisfenol A

A produção e uso crescente de compostos químicos e a ineficiência de políticas de controle e/ou tratamento têm levado ao aparecimento dos chamados contaminantes emergentes no ambiente. Estes podem interferir no sistema endócrino de seres humanos e de outros animais, afetando seu crescimento e reprodução (Konieczna et al., 2015). Essas substâncias, conhecidas como desreguladores endócrinos (DEs), são definidas como substâncias químicas exógenas capazes de alterar funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, provocar efeitos adversos para a saúde dos organismos vivos ou à sua descendência (OECD, 2015). Em sua maioria são poluentes químicos provenientes de praguicidas, plásticos, detergentes, tintas e outros compostos industriais ou domésticos (Yonn et al., 2014). Pertencem ao grupo dos poluentes orgânicos persistentes (POPs) e têm rápida e vasta dispersão ambiental pela cadeia alimentar através dos recursos hídricos e alimentos contaminados (Mantovani et al., 1999; Nogueira et al., 1999).

A função hormonal mais afetada pelos DEs é a regulação dos hormônios esteroides, os quais determinam as características e o comportamento sexual de diferentes espécies. Os DEs mais conhecidos têm atividade estrogênica, sendo denominados xenoestrógenos. Os xenoestrógenos são compostos ambientais que podem mimetizar, *in vitro* e *in vivo*, o hormônio estrógeno 17 β -estradiol. O período compreendido entre os dias gestacionais (DG) 16 e 20 e a puberdade (dia pós-natal (DPN) 51) é o mais crítico para o desenvolvimento mamário e pode ser influenciado por vários fatores ambientais, entre eles o Bisfenol A. Essas substâncias podem agir em uma grande variedade de mecanismos incluindo processos dependentes e independentes de receptores (Yonn et al., 2014).

Algumas substâncias tóxicas modulam o sistema endócrino e ou afetam a replicação celular, agindo sobre sistemas de transdução de sinais, tanto na membrana como no núcleo, levando a alterações na expressão gênica (Jenkins et al., 2012), além de deleção e inserção de genes envolvidos em processos bioquímicos específicos, como são as respostas de órgãos/tecidos expostos a substâncias químicas com propriedades terapêuticas ou tóxicas (Naciff et al., 2005).

Evidências em humanos e em modelos experimentais com animais sugerem que a exposição *in útero* ou pós-natal a xenoestrógenos ambientais aumentam o risco de câncer de mama na vida adulta (Jenkins et al., 2012). Entre os DE, o Bisfenol A ou 2,2-bis-4-hidróxifenilpropano (BPA) é alvo de grande atenção em virtude da intensa exposição humana (Rochester, 2013). O BPA é um difenol (Figura 8) utilizado no processo de fabricação de plásticos policarbonato e resinas epóxi, que são encontrados em embalagens reutilizáveis de alimentos e bebidas, mamadeiras, forros de proteção, recipientes de metal de alimentos e bebidas enlatados, tubulação plástica, composição de cremes e selantes dentais e em muitos outros produtos (Mantovani et al., 1999).

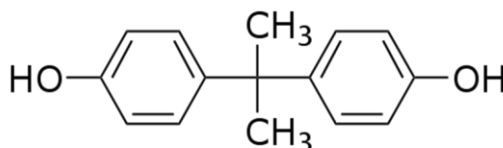


Figura 8. Estrutura química do BPA, de fórmula molecular $C_{15}H_{16}O_2$ (Sigma-Aldrich, EUA).

Estudos com roedores revelaram que a exposição precoce ao BPA tem aumentado a suscetibilidade à carcinogênese mamária na vida adulta (Prins et al., 2007; Soto et al., 2008; Betancourt et al., 2010; Jenkins et al., 2012; Acevedo et al., 2013), entretanto há pouca evidência para a atividade carcinogênica quando administrado em animais adultos. Estudos com células tumorais mamárias humanas em cultura expostas ao BPA produziram dados inconsistentes no que diz respeito às propriedades mutagênicas, de apoptose e de transcrição gênica (Singleton et al., 2006; Dairkee et al., 2008). O BPA muitas vezes apresenta uma curva dose-resposta em forma de “U” ou “U” invertido, portanto, a inconsistência dos resultados *in vitro* pode ser atribuída a variações nas doses utilizadas de BPA, alguns dos quais estão em níveis micromolares (Lapensee et al., 2009; Vandenberg, 2014). Assim, para suportar o argumento de que o BPA apresenta riscos para a saúde humana, é necessário estabelecer sua eficácia em concentrações ambientais relevantes. A Agência Ambiental Americana (EPA) estabeleceu 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corpóreo/dia de BPA como "dose de referência segura para o ser humano", mas os efeitos adversos para órgãos hormônio-dependentes vêm sendo descritos em diferentes ensaios *in vivo* usando exposições a BPA em doses relevantes para os seres humanos (Teeguarden & Hanson-Drury, 2013).

O mecanismo pela qual o BPA exerce sua atividade estrogênica é pouco conhecido. A afinidade do BPA ao receptor de estrogênio α (RE- α) ou β (RE- β) é de 10.000 e 1.000 vezes

menor do que o estradiol, respectivamente (Kuiper et al., 1998). Isto sugere que o BPA deveria mimetizar ou competir com os estrogênios endógenos em doses da ordem micromolares e atuando em períodos diferentes do desenvolvimento (Watson, 2005; Welshons et al., 2006; Lapensee et al., 2009). Em 2005, um estudo conduzido pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças Americano (CCD - EUA) examinou 394 americanos e relatou que BPA foi encontrado em 95% nas amostras de urina (Calafat et al., 2005), indicando que o homem é rotineiramente exposto a essa molécula. Em outro estudo, foi detectado BPA em 92,6% de 2.500 norte-americanos (Calafat et al., 2008). A concentração na urina foi em torno de 0,4 a 149 g/L com média geométrica de 2,6 g/L e significativamente maior em crianças e adolescentes quando comparados com adultos. Além disso, vários estudos detectaram a presença de BPA no soro de mulheres grávidas, sangue de cordão umbilical, líquido amniótico e plasma fetal; sugerindo que os embriões e fetos são expostos ao BPA durante a gestação (Engel et al., 2006). Além disso, o BPA tem sido detectado no leite humano (Sun et al., 2004); indicando que a exposição também ocorre durante o período de amamentação. Por causa de sua presença comum no meio ambiente e sua atividade estrogênica observada em ensaios *in vivo* e *in vitro*, os efeitos adversos potenciais da exposição ao BPA para a saúde humana são constante preocupação (Rochester, 2013).

A exposição à xenoestrógenos como o BPA durante o desenvolvimento pré e pós-natal pode contribuir para o aumento da incidência de infertilidade e anomalias do trato genital (Muñoz-de-Toro et al., 2005), além de ter efeitos deletérios em longo prazo no sistema endócrino e aumentar o risco de desenvolvimento de câncer de mama (Grassi et al., 2016).

A exposição de roedores em baixas doses (25 ou 250 ng/kg peso corpóreo) durante o desenvolvimento perinatal induziu a abertura vaginal precoce antes do início da puberdade, alteração do ciclo estral e diminuição dos níveis séricos de hormônio luteinizante em ratas ovariectomizadas (Honma et al., 2002; Markey et al., 2003). Em fêmeas de roedores da linhagem *Sprague-Dawley*, a exposição perinatal ao BPA alterou o desenvolvimento dos órgãos hormônio-sensíveis, incluindo o cérebro, vagina, ovários, útero e glândula mamária (Schonfelder et al., 2002; Markey et al., 2003; Muñoz-de-Toro et al., 2005; Susiarjo et al., 2007). BPA tem capacidade de atravessar a placenta e também está presente no líquido folicular, líquido amniótico e soro fetal durante a gestação de roedores (Takahashi & Oishi, 2000; Zalko et al., 2003). O embrião em desenvolvimento é particularmente suscetível a produtos químicos em geral e em particular a hormônios. Gilbert (1997) ressaltou que a organogênese, período de maior proliferação e diferenciação celular, pode ser afetada por produtos químicos que não tenham efeitos deletérios sobre o funcionamento normal de um

determinado órgão. A exposição perinatal ao BPA tem efeitos deletérios para os tecidos hormônio-dependentes de roedores (Markey et al., 2001; Ramos et al., 2003; Muñoz-de-Toro et al., 2005), alterando o desenvolvimento celular e a arquitetura da glândula mamária (Durando et al., 2007).

Baseado na hipótese que as doenças na idade adulta podem ter sua origem durante o desenvolvimento fetal, tem-se cogitado que a restrição proteica gestacional (RPG) e a exposição pós-natal ao Bisfenol A (BPA), presente através do contato com plásticos aquecidos e utensílios domésticos, poderiam interferir em períodos críticos do desenvolvimento das glândulas, quando há alta proliferação e eventos de diferenciação celular, favorecendo o processo de carcinogênese mamária induzida quimicamente na vida adulta.

2. Referências

- ACEVEDO, N., et al. Perinatally administered bisphenol a as a potential mammary gland carcinogen in rats. *Environ Health Perspect.* 121:1040–6, 2013.
- AGNOUX, AM., et al. Perinatal protein restriction affects milk free amino acid and fatty acid profile in lactating rats: potential role on pup growth and metabolic status. *J Nutr Biochem.* 26(7):784–795, 2015.
- ALVARADO, A., et al. Prognostic factors in MNU and DMBA-induced mammary tumors in female rats. *Pathol Res Pract.* 213:441–446, 2017.
- ASSIS, S., KHAN, G., HILAKIVI-CLARKE, E. High birth weight increases mammary tumorigenesis in rats. *Int J Cancer.* 119(7):1537-1546, 2006.
- BARKER, DJ. Developmental origins of chronic disease. *Public Health.* 126:185–189, 2012.
- BETANCOURT, AM., et al. In Utero Exposure to Bisphenol A Shifts the Window of Susceptibility for Mammary Carcinogenesis in the Rat. *Environ Health Perspect.* 118(11):1614-19, 2010.
- BOUCHARDY, C., et al. Recent increase of breast cancer incidence among women under the age of forty. *Br J Cancer.* 96:1743–1746, 2007.
- BRISKEN, C., HESS, K., JEITZINER, R. Progesterone and Overlooked Endocrine Pathways in Breast Cancer Pathogenesis. *Endocrinol.* 156(10):3442–50, 2015.
- BURDGE, GC., LILLYCROP, KA., JACKSON, AA. Nutrition in early life, and risk of cancer and metabolic disease: alternative endings in an epigenetic tale? *Br J Nutr.* 101:619–630, 2009.
- CALAFAT, AM., et al. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect.* 113, 391-5, 2005.
- CALAFAT, AM., et al. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol. *Environ Health Perspect.* 116, 39-44, 2008.
- CUZIK, J. Breast cancer prevention in the developing world. *Breast Cancer Res.* 12(4):S9, 2010.
- DAIRKEE, SH., et al. Bisphenol A induces a profile of tumor aggressiveness in high-risk cells from breast cancer patients. *Cancer Res.* 68:2076-80, 2008.
- DURANDO, M., et al. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect.* 115:80-6, 2007.
- ENGEL, SM., et al. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. *Reprod Toxicol.* 21:110-2, 2006.

FERLAY, J., et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 136(5):359-86, 2015.

FERNANDEZ-TWINN, DS., et al. Compensatory mammary growth following protein restriction during pregnancy and lactation increases early-onset mammary tumor incidence in rats. *Carcinogen*. 28(3):545-552, 2006.

FERNANDEZ-TWINN, DS., et al. Compensatory mammary growth following protein restriction during pregnancy and lactation increases early-onset mammary tumor incidence in rats. *Carcinogen*. 28:545–552, 2007.

FIDALGO, M., et al. Efeito do treinamento físico e da desnutrição durante a gestação sobre os eixos cranianos de ratos neonatos. *Rev Bras Med Esporte* 16:6, 2010.

GILBERT, SF. *Developmental Biology*. 5th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1997.

GRASSI, TF., et al. Global gene expression and morphological alterations in the mammary gland after gestational exposure to bisphenol A, genistein and indole-3-carbinol in female Sprague-Dawley offspring. *Toxicol Appl Pharmacol*. 303:101–109, 2016.

GUERRA, MR., et al. The risk of cancer in Brazil: tendencies and recent epidemiologic studies. *Rev Bras de Cancerol*. 51:227-34, 2005.

HILAKIVI-CLARKE, L. Nutritional modulation of terminal end buds: its relevance to breast cancer prevention. *Curr. Cancer Drug Targets* 7:465–74, 2007.

HONMA, S., et al. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol*. 16:117-22, 2002.

HOVEY, RC., TROTT, JF., VONDERHAAR, BK. Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7:17–38, 2002.

HUI, C., et al. Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo. *Nutrition and cancer*. 68:1128-36, 2010.

HVID, H., et al. An alternative method for preparation of tissue sections from the rat mammary gland. *Experiment Toxicol Pathol*. 63:317–324, 2011.

IARC - International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>, 2015.

INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estatísticas do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>, 2018.

INNES, K., BYERS, T., SCHYMURA, M. Birth Characteristics and Subsequent Risk for Breast Cancer in Very Young Women *J. Epidemiol*. 152(12):1121-1128, 2000.

JEMAL, A., et al. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 19:1893-907, 2010.

JENKINS, S., et al. Endocrine-active chemicals in mammary cancer causation and prevention. *J Steroid Biochem Mol. Biol.* 129:191–200, 2012.

KONIECZNA, A., RUTKOWSKA, A., RACHOŃ, D. Health risk of exposure to Bisphenol A. *National Institute Public Health.* 66(1):5-11, 2015.

KUIPER, GG., et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.* 139, 4252-63, 1998.

LAKHANI, S., et al. WHO classification of tumours of the breast. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2012.

LAPENSEE, EW., et al Bisphenol A at Low Nanomolar Doses Confers Chemoresistance in Estrogen Receptor- α -Positive and -Negative Breast Cancer Cells. *Environ Health Perspect.* v.117, 2009.

Liu Y., et al. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quanti Imag Med Surgery.* 5(5):708– 29, 2015.

MACEJOVÁ, D., BRTKO, J. Chemically Induced Carcinogenesis: A Comparison of 1-methyl-1-nitrosurea, 7,12-dimethylbenzanthracene, diethylnitroso-amine and azoxymethan models (Minireview). *Endroc Regul.* 35:53-59, 2001.

MANDRUP, K., et al. Low-dose effects of bisphenol A on mammary gland development in rats. *Androl.* 1:11, 2016.

MANTOVANI, A., et al. Problems in testing and risk of endocrine disrupting chemicals with regard to developmental toxicology. *Chemosphere.* 39:1293-00, 1999.

MARKEY, CM., et al. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod.* 65:1215-23, 2001.

MARKEY, CM., et al. Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. *Evol Dev.* 5:67-75, 2003.

MCMILLEN, IC., ROBINSON, JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev.* 85(2):571-633, 2005.

MEHTA, RG. Experimental basis for the prevention of breast cancer. *Eur J Cancer.* 36:1275-82, 2000.

MUÑOZ-DE-TORO, M., et al. Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinol.* 146:4138-47, 2005.

NACIFF, JM., et al. Evaluation of the Gene expression changes induced by 17 α -ethynyl estradiol in the immature uterus/ovaries of the rat using high-density oligonucleotide arrays. *Birth Defects Research*. 74:164-184, 2005.

NOGUEIRA, J.M.F. Desreguladores endócrinos: efeitos adversos e estratégias de monitorização dos sistemas aquáticos. *Química*. 65-71, 1999.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development. Guidance Document on the Assessment of Chemicals for Endocrine Disruption Version 9. Disponível em: <http://www.oecd.org/dataoecd/63/8/46436593.pdf>, 2015.

PARKIN, DM., et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 55:74-108, 2005.

PITOT, HC. Adventures in hepatocarcinogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2:1-29, 2007.

POLIAK, K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest, United States*. 117:3155-63, 2007.

PRINS, GS., et al. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reprod Toxicol*. 23:374-82, 2007.

RAMOS, JG., et al. Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinol*. 144:3206-15, 2003.

RAY, RS., et al. Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: chemopreventive activity of vanadium in vivo and in vitro. *Int J Cancer*. 120:13-23, 2007.

ROCHESTER, J.R. Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod Toxicol*. 42:132-55, 2013.

ROSARIO, FJ., et al. Maternal protein restriction in the rat inhibits placental insulin, mTOR, and STAT3 signaling and down-regulates placental amino acid transporters. *Endocrinol*. 152(3):1119-29, 2011.

RUSSO, J. Significance of Rat Mammary Tumors for Human Risk Assessment. *Toxicol Pathol*. 43:145-170, 2015.

RUSSO, J., RUSSO, IH. Pregnancy-induced changes in breast cancer risk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16:221-233, 2011.

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

RUSSO, IH., RUSSO, J. Mammary Gland Neoplasia in Long-Term Rodent Studies. *Environ Health Perspect.*, 104:938-67, 1996.

RUSSO, J., ROMERO, A., RUSSO, I.H. Architectural Pattern of the Normal and Cancerous Breast under the Influence of Parity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 3:219-224, 1994.

SCHONFELDER, G., et al. In utero exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina. *Neoplasia*. 4:98-102, 2002.

SHARMA, D., et al. Quantification of Epithelial Cell Differentiation in Mammary Glands and Carcinomas from DMBA- and MNU-Exposed Rats. *PLoS ONE*, 6(10):e26145, 2011.

SINGLETON, DW., et al. Gene expression profiling reveals novel regulation by bisphenol-A in estrogen receptor-alpha-positive human cells. *Environ Res*. 100:86-92, 2006.

SOTO, AM., et al. Does breast cancer start in the womb? *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 102:125-33, 2008.

SUN, Y., et al. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr*. 18:501-7, 2004.

SUSIARJO, M., et al. Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genet*. 3:5, 2007.

TAKAHASHI, O., OISHI, S. Disposition of orally administered 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environ Health Perspect*. 108:931-5, 2000.

TEEGUARDEN, JG., HANSON-DRURY, S. A systematic review of Bisphenol A “low dose” studies in the context of human exposure: a case for establishing standards for reporting “low-dose” effects of chemicals. *Food Chem Toxicol*. 62:935–48, 2013.

TORRE, LA., et al. Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 26(4):444-57, 2017.

TORRE, LA., et al. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends - An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 25(1):16-27, 2016.

VANDENBERG, LN. Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol a as a case study. *Dose Response*. 12:259–76, 2014.

WATSON, CS., et al. Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor-alpha: estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens. *Steroids* 70:364-71, 2005.

WELSHONS, WV., NAGEL, SC., VOM SAAL, FS. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinol*. 147:S56–S69, 2006.

WOLF, I., et al. Diabetes mellitus and breast cancer. *Lancet Oncol*. 6(2):103–111, 2005.

XU, X., et al. Birth Weight as a Risk Factor for Breast Cancer: A Meta-Analysis of 18 Epidemiological Studies. *J Women's Health*. 18:8, 2009.

YOON, K., et al. Estrogenic endocrine-disrupting chemicals: molecular mechanisms of actions on putative human diseases. *J Toxicol Environ. Health. B. Crit. Rev.* 17:127–74, 2014.

ZALKO, D., et al. Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environm Health Perspect.* 111:309-19, 2003.

ZHENG, S., et al. A gestational low-protein diet represses p21(WAF1/Cip1) expression in the mammary gland of offspring rats through promoter histone modifications. *Br J Nutr.* 108:998–1007, 2012.

3. Objetivos

Objetivo Geral

Investigar os possíveis efeitos da restrição proteica gestacional (RPG) e sua associação com a exposição pós-natal ao Bisfenol A (BPA) sobre o desenvolvimento das glândulas mamárias e a suscetibilidade à carcinogênese química mamária em fêmeas da linhagem *Sprague-Dawley*.

Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da RPG e sua associação com o BPA na morfogênese da glândula mamária e nos níveis de proliferação celular (Ki-67) e apoptose (morfologia) nas fêmeas da prole;

- Caracterizar a expressão dos receptores de estrógeno α (RE- α), estrógeno β (RE- β) e progesterona (RP) nas glândulas mamárias através de análise imunoistoquímica e/ou *Western blot* nas fêmeas da prole;

- Avaliar latência, incidência, multiplicidade e tipos histológicos de tumores mamários em modelo de câncer de mama induzido quimicamente com 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) nas fêmeas da prole.

Capítulo 2 – Artigo

Postnatal exposure to Bisphenol A in females with gestational protein restriction: effects on breast development and susceptibility to carcinogenesis

Muriele B. Varuzza^{1,2}, Joyce R. Zapaterini², Laura Kass³, Ketlin T. Colombelli², Caroline N. Barquilla², Luis A. Justulin Jr.², Luis F. Barbisan².

¹UNESP – Univ. Estadual Paulista, Botucatu Medical School, Department of Pathology, Botucatu, São Paulo, Brazil.

²UNESP – Univ. Estadual Paulista, Botucatu Biosciences Institute, Department of Morphology, Botucatu, São Paulo, Brazil.

³UNL – Universidad Nacional del Litoral, School of Biochemistry and Biological Sciences, Human Pathology Department, Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL, CONICET-UNL), Santa Fe, Argentina.

* To whom correspondence should be addressed.

Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 18618-689 Botucatu, SP, Brazil.

E-mail address: barbisan@ibb.unesp.br

Perturbações no ambiente uterino e nos estágios iniciais da vida, por fatores nutricionais e/ou alterações hormonais, podem predispor os recém-nascidos a doenças crônicas na vida adulta. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da restrição proteica gestacional (RPG) e da exposição ao Bisfenol A (BPA) no desenvolvimento das glândulas mamárias e suscetibilidade ao câncer de mama. Ratas prenhes receberam dieta normoproteica ou hipoproteica durante o período gestacional e as fêmeas das proles receberam BPA na água de beber (1mg/L) do dia pós-natal (DPN) 21 ao 51. No DPN 51, parte das ratas foram eutanasiadas para avaliação das glândulas mamárias e o restante recebeu dose única de 7,12-dimetilbenzoantraceno (DMBA 30 mg/kg i.g.), sendo eutanasiadas no DPN 250 para avaliação dos tumores mamários. Os dados obtidos foram analisados pelos testes ANOVA ou Qui-quadrado ($p < 0,05$). A RPG e a exposição ao BPA não alteraram o crescimento da árvore mamária, número médio de TEBs e TDs, expressão do RE- β , índices de proliferação

celular e área estromal nas glândulas mamárias no DPN 51. RPG e BPA reduziram a área epitelial glandular quando comparado ao grupo controle e a associação aumentou o fat pad. BPA aumentou o índice apoptótico; RPG aumentou a expressão do RE- α e a associação dos tratamentos aumentou a expressão do RP nas glândulas mamárias. Os grupos que sofreram RPG, exposição ao BPA ou a associação das intervenções apresentaram menor latência tumoral. Além disso, os grupos que receberam BPA apresentaram maior incidência e multiplicidade tumoral. Considerando esses resultados, a RPG e a exposição ao BPA aumentaram a suscetibilidade à carcinogênese, mas a associação das intervenções não aumentou o risco.

Introdução

Atualmente, a incidência de novos casos de câncer de mama tem aumentado exponencialmente em mulheres mais jovens de países de baixa e média renda [1]. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer, a estimativa para o biênio 2018-2019 é a ocorrência de aproximadamente 60 mil novos casos de câncer de mama nas mulheres. Além de fatores genéticos, tais como alterações nos genes BRCA1 e BRCA2, outros fatores influenciam o risco para o desenvolvimento de câncer de mama como os fatores reprodutivos (menarca precoce, menopausa tardia e uso de hormônios exógenos), hábitos alimentares e estilo de vida (obesidade, alcoolismo, sedentarismo) [2]. Por ser uma doença altamente heterogênea, o câncer de mama é representado por neoplasias que possuem história natural diversa, histologia complexa e resposta variável às terapias convencionais [3].

Dados epidemiológicos e experimentais suportam a hipótese de que alterações no ambiente uterino e nos estágios iniciais da vida, por alterações hormonais e hábitos alimentares, podem predispor os recém-nascidos a muitas doenças crônicas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, hipertensão, entre outras [4]. Alguns estudos têm demonstrado que o câncer de mama pode ser influenciado por alterações nutricionais, perturbações hormonais ou programação genética ocorrendo durante o desenvolvimento uterino e neonatal [5].

A desnutrição gestacional é considerada um problema emergente em todo o mundo e não afeta apenas o crescimento fetal, mas também a saúde do adulto. Experimentalmente, a restrição proteica gestacional (RPG) materna em ratos durante a vida fetal, leva a um aumento permanente do apetite, excesso de peso e morte prematura [6], além de alterações epigenéticas que podem interferir no desenvolvimento das glândulas mamárias da prole de fêmeas e aumentar a suscetibilidade à carcinogênese na vida adulta [7].

O xenoestrógeno Bisfenol A (BPA) é alvo de grande atenção em virtude da intensa exposição humana. Sendo considerado um desregulador endócrino, ele é capaz de alterar funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, provocar efeitos adversos para a saúde dos organismos vivos ou à sua descendência [8]. O BPA é utilizado no processo de fabricação de plásticos policarbonato e resinas epóxi, que são encontrados em mamadeiras, utensílios domésticos, alimentos e bebidas enlatados, tubulação plástica, composição de cremes e selantes dentais e em muitos outros produtos [9], e através da ineficiência de políticas públicas de tratamento tornou-se um contaminante emergente no ambiente. O período compreendido entre o dia gestacional (DG) 16 e 20 e a puberdade é o mais crítico para o desenvolvimento mamário e pode ser influenciado por vários fatores ambientais, entre eles a exposição ao Bisfenol A, uma vez que esse xenoestrógeno pode mimetizar, *in vitro* e *in vivo*, o hormônio estrógeno 17 β -estradiol [10]. Evidências em humanos e em modelos experimentais com animais sugerem que a exposição *in útero* ou pós-natal ao BPA aumentam o risco de câncer de mama na vida adulta [11].

Modelos em roedores têm sido utilizados para investigar o desenvolvimento mamário normal, fatores de risco e suscetibilidade à carcinogênese mamária, especialmente como os fatores nutricionais podem estar associados com aumento ou diminuição da iniciação ou promoção da carcinogênese mamária [12]. A 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) é um carcinógeno sintético órgão-específico utilizado na elaboração de modelos experimentais de carcinogênese de mama. A metabolização desse composto químico resulta em um metabólito que causa danos irreparáveis no DNA das células dos brotos terminais (TEBs), em decorrência da incapacidade dessas células em remover completamente os adutos de DNA, levando ao desenvolvimento de carcinomas hormônio-dependentes [13, 14]. Essas lesões apresentam importantes modificações em níveis moleculares e morfológicos, incluindo genes que controlam a proliferação celular, diferenciação e apoptose [15].

Baseado na hipótese que as doenças na idade adulta têm sua origem durante o desenvolvimento fetal, o objetivo desse trabalho foi investigar os possíveis efeitos da RPG e sua associação a exposição pós-natal ao BPA, sobre o desenvolvimento das glândulas mamárias e a suscetibilidade à carcinogênese mamária induzida pela DMBA. Isso poderá auxiliar na compreensão de como o câncer de mama pode se desenvolver tendo como precursores eventos nos estágios precoces de desenvolvimento intrauterino e pós-natal inicial.

Materiais e Métodos

Ética. Os procedimentos experimentais deste estudo obedeceram aos Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu (CEUA nº 1157/2015).

Restrição Proteica Gestacional. Ratos machos e fêmeas adultos da linhagem *Sprague-Dawley* foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (Campinas – SP) e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu, em caixas de polietileno, com substrato de maravalha autoclavada, em condições controladas de luminosidade e temperatura média de 25°C, sendo fornecida água filtrada e ração *ad libitum*. Após acasalamento e constatação da prenhez, 30 ratas (n=15 por grupo) foram colocadas aleatoriamente em gaiolas individuais e foram alimentadas durante toda a gestação com ração normoproteica para ratos (grupo DNP: 17% de proteína) ou com ração hipoproteica (grupo DHP: 6% de proteína). As dietas eram isocalóricas e normossódicas (0,2%) e a ração base utilizada foi a AIN-93 modificada [16]. As formulações das rações se encontram descritas na Tabela 1. A partir do nascimento e durante a fase lactacional, todos os animais (mães e proles) foram alimentados com ração normoproteica e água filtrada *ad libitum*.

Bisfenol A. A segunda fase experimental iniciou-se após o desmame no dia pós-natal (DPN) 21, quando fêmeas oriundas de mães alimentadas com DNP e DHP foram reagrupadas (Figura 1): DNP; DHP; DNP+BPA e DHP+BPA. Os animais dos grupos DNP e DHP receberam água *ad libitum* com etanol a 0,001%. Essa concentração de etanol é considerada não tóxica para os ratos e já foi utilizada em trabalhos prévios [17, 18, 19]. Os animais dos grupos DNP+BPA e DHP+BPA receberam água *ad libitum* com BPA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em água com etanol a 0,001%, na concentração de 1 mg de BPA para 1 L de água. No DPN 51, fêmeas das ninhadas de cada grupo (n=10, 1 fêmea/ninhada) foram eutanasiadas por secção dos vasos da base do coração após prévia sedação (Tiopental sódico 180 mg/kg).

Carcinogênese Química Experimental. Para a iniciação da carcinogênese mamária, no DPN 51, as ratas (n=11, 1 fêmea/ninhada) receberam, em cada grupo, uma dose única do carcinógeno DMBA (Sigma-Aldrich, EUA) dissolvido em Óleo de Canola, por via

intragástrica na dose 30 mg/kg de peso corpóreo [20]. Os animais seguiram até o final do experimento, sendo eutanasiados no DPN 250 por secção dos vasos da base do coração após prévia sedação (Tiopental sódico 180 mg/kg). Cada fêmea foi avaliada clinicamente (apalpada) em dias alternados, durante todo o período experimental, com o intuito de detectar o desenvolvimento dos tumores mamários, sendo registrado o dia de aparecimento e sua localização anatômica.

Análise Morfológica da Glândula Mamária. Glândulas mamárias no DPN 51 (n=5 animais/grupo) foram coletadas e fixadas em formalina tamponada à 10% para análise morfológica. Lâminas de vidro contendo as glândulas mamárias da prole passaram pelas etapas de coloração com *Carmin Alum Stain*, desidratação, permanência no xilol até o tecido adiposo da glândula mamária apresentar transparência e montagem com lamínula em resina sintética. A análise morfométrica das glândulas mamárias consistiu em avaliar o seu desenvolvimento através de medidas de comprimento da árvore mamária (longitudinal, transversal e lateral) entre o final da borda do linfonodo e as margens mais externas da glândula mamária em lupa com objetiva de 1x (Leica, Japão) acoplada a um sistema de captura e análise de imagens. A análise das estruturas mamárias foi realizada aleatoriamente em 10 campos microscópicos dos animais de cada grupo em microscópio óptico de luz com objetiva de 10x (Olympus Corporation, Japão). Em cada análise foram identificados e quantificados os TEBs (brotos terminais: estrutura ductal maior que 100 µm de diâmetro e que apresentam de 3 a 6 camadas de células epiteliais) e TDs (ductos terminais: diâmetro menor que 100 µm e com 1 ou 3 camadas de células epiteliais), de acordo com os critérios de [21] (Figura 2).

Processamento Histológico das Glândulas Mamárias. Glândulas mamárias no DPN 51 (n=5 animais/grupo) foram coletadas e fixadas em formalina tamponada a 10% para processamento histológico. Lâminas contendo cortes de 5 µm foram levadas à estufa a 60°C e passaram pelos processos de desparafinização e hidratação, coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina ou com Picrosirius e Hematoxilina de Harris, lavagem em água corrente, desidratação e montagem com lamínulas em resina sintética.

Reação de Imunoistoquímica. Glândulas mamárias no DPN 51 (n=5 animais/grupo) foram coletadas e fixadas em formalina tamponada à 10% para análise imunoistoquímica. Lâminas silanizadas contendo cortes de 5 µm foram levadas à estufa a 60°C e passaram pelos processos

de desparafinização e hidratação, recuperação antigênica com tampão citrato 0,1M em panela de pressão Pascal (Dako Cytomation, Dinamarca), bloqueio de peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% em tampão fosfato salina (PBS), bloqueio de ligações inespecíficas em solução de leite desnatado a 1% em PBS, incubação *overnight* com anticorpo primário policlonal de coelho anti-Ki-67 (Abcam, EUA) ou anti-PR (LETH, Argentina) diluído em Albumina Bovina Sérica (BSA) a 3%, lavagem com PBS, incubação com o sistema de detecção por polímeros Easy Path (Immunobioscience, EUA), revelação com solução de 3'3'-diaminobenzidina tetracloridrato (DAB), contra-coloração com Hematoxilina de Harris, lavagem em água corrente, passagem em água amoniacal, desidratação e montagem com lamínula em resina sintética. Os índices de imunomarcção foram determinados dividindo-se o número de células positivas por 300 células epiteliais nas glândulas, para cada animal nos diferentes grupos experimentais. A análise foi realizada em microscópio óptico de luz com analisador de imagem *Cell Sens Standard Imaging System* (Olympus, Japão).

Western Blot. Glândulas mamárias no DPN 51 (n=5 animais/grupo) foram coletadas e armazenadas à -80°C. As amostras congeladas foram homogeneizadas em tampão de extração (Tris-HCl 50mM, NaCl 0,2M, Triton X-100 a 0,1%, CaCl₂ 10mM e inibidor de protease, Sigma-Aldrich, EUA). A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford. As alíquotas de homogeneizados foram diluídas em tampão de amostras, aquecidas, aplicadas no gel de SDS-poliacrilamida, separadas em *SDS-PAGE* em sistema de eletroforese *Mini Protein III* (BioRad, USA) e transferidas para membranas de nitrocelulose *Hybond ECL* (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido). As membranas contendo as amostras passaram pelos processos de bloqueio de ligações inespecíficas em solução de leite desnatado a 3% em solução salina tris tamponada Tween (TBS-T), incubação *overnight* das membranas com anticorpo monoclonal de coelho anti-RE- α , anti-RE- β ou β -actina (Santa Cruz Biotechnology, EUA) diluído em Albumina Bovina Sérica (BSA) a 3%, lavagem com TBS-T, incubação com anticorpos secundários conjugados específicos de acordo com os anticorpos primários utilizados e revelação das proteínas imunorreativas com o reagente de detecção de *Western Blot Amersham ECL* (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido). Os sinais foram capturados por um sistema *G:BOX Chemi* (Syngene, Reino Unido) controlado por um software automático (GeneSys, Reino Unido). As intensidades de banda das proteínas alvo (RE- α e RE- β) foram quantificadas usando o software de análise de densitometria (Image J, Áustria) utilizando a expressão da β -actina como controle endógeno.

Processamento Histológico dos Tumores Mamários. Tumores mamários obtidos no DPN 250 foram coletados e fixados em formalina tamponada à 10% para processamento histológico. Lâminas contendo cortes de 5 µm foram levadas à estufa a 60°C e passaram pelos processos de desparafinização e hidratação, coloração com Hematoxilina de Harris e Eosina, desidratação e montagem com lamínulas em resina sintética. O diagnóstico e características histopatológicas das neoplasias mamárias foram analisados com base em critérios histopatológicos pré-estabelecidos [22].

Análise Estatística. Os parâmetros foram analisados através do uso do programa estatístico *Jandel Sigma Stat* (Jandel Corporation, EUA). Os dados quantitativos foram comparados entre os diferentes grupos experimentais utilizando-se testes de ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguidos pelo teste de Tukey; Qui-quadrado ou teste de Fisher para análise dos dados de incidência tumoral; Log Rank para o parâmetro número de animais livres de tumores. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Resultados

Experimentação Animal. Durante o período experimental foram avaliados o ganho de peso das fêmeas da prole e o consumo de água contendo a solução de BPA (1 mg/L). Durante esse período, não houve diferenças estatísticas em relação à ingestão de BPA ($p=0,560$) ou ganho de peso das fêmeas nos diferentes grupos experimentais (Tabela 2). Após a administração da DMBA e até o final do experimento (DPN 250) não foram observadas diferenças na evolução de peso corpóreo entre os grupos experimentais (Figura 3, $p=0,860$).

Análise Morfométrica da Glândula Mamária. O grau de desenvolvimento da glândula mamária das fêmeas da prole no DPN 51 ($n=5$ animais/grupo) não sofreu influência das diferentes intervenções (DHP e BPA), não apresentando diferenças estatísticas, entre os grupos experimentais, nas medidas de crescimento da árvore mamária ($p>0,05$) (Figura 4), número médio de TEBs ($p=0,445$) ou TDs ($p=0,321$), como pode ser visto na Figura 5.

Análise Histológica da Glândula Mamária. A análise histológica no DPN 51 ($n=5$ animais/grupo) baseou-se na proporção da área ocupada por tecido adiposo (*fat pad*), tecido estromal composto por fibras colágenas e epitélio das estruturas ducto-alveolares das glândulas mamárias, como demonstrado de forma representativa na Figura 6. Os tratamentos

não promoveram alterações na área ocupada pelo estroma ($p=0,145$) e apenas o grupo DHP+BPA apresentou aumento significativo da área ocupada pelo *fat pad* ($p=0,004$). Os grupos DHP e DNP+BPA apresentaram área ocupada pelo tecido epitelial da glândula reduzida quando comparado ao grupo controle DNP e o grupo DHP+BPA teve essa redução intensificada ($p=0,001$), como pode ser visto na Figura 7.

Análise de Proliferação Celular e Apoptose. Os índices de proliferação celular e de apoptose foram calculados em células epiteliais das glândulas mamárias no DPN 51 ($n=5$ animais/grupo) através da imunomarcação com o Ki-67 ou característica morfológica de apoptose. O índice apoptótico (Figura 8) mostrou-se maior nos grupos que foram expostos ao BPA (DNP+BPA e DHP+BPA) quando comparado aos demais grupos (DNP e DHP), como pode ser visto na Figura 8 ($p=0,003$). Os índices de marcação pelo Ki-67 (Figura 9) foram similares entre os grupos experimentais ($p=0,218$). A Figura 10 mostra imagens representativas da imunomarcação nos diferentes grupos.

Análise dos Receptores de Progesterona e Estrógeno α e β . A expressão dos receptores de progesterona (RP) e receptores de estrógeno α e β (RE- α e RE- β) foi quantificada nas glândulas mamárias no DPN 51 ($n=5$ animais/grupo). Os índices de marcação de RP mostraram-se significativamente maiores nas glândulas mamárias do grupo DHP+BPA ($p=0,001$) (Figura 11). A Figura 12 mostra imagens representativas da reação imunoistoquímica nos diferentes grupos. Como pode ser visto na Figura 13, o grupo DHP teve aumento significativo da expressão do RE- α em relação aos demais grupos ($p=0,001$). Entretanto, as diferentes intervenções não alteraram a expressão do RE- β ($p=0,803$), como demonstrado na Figura 14.

Análise Histopatológica. Após a administração da DMBA no DPN 51, o aparecimento de tumores foi monitorado até a eutanásia das fêmeas no DPN 250 ($n=11$ animais/grupo). A Figura 15 ilustra a porcentagem de animais sem tumores ao longo do tempo (latência tumoral), mostrando que o grupo DHP+BPA teve a menor latência tumoral, pois o primeiro tumor apareceu na 12ª semana de vida, seguido dos grupos DNP+BPA e DHP (13ª e 14ª semana, respectivamente), quando comparados ao grupo controle DNP ($p=0,003$). Após a retirada dos tumores, eles foram classificados segundo os tipos histológicos predominantes: tumores mamários (adenocarcinoma, fibroadenoma e fibroma) e tumores de zimbal. A Tabela 3 apresenta dados sobre os tipos histológicos, incidência e multiplicidade dos tumores

mamários. Os grupos que receberam BPA (DNP+BPA e DHP+BPA) apresentaram maior incidência tumoral quando comparados ao grupo controle DNP, entretanto essa diferença só foi significativa no grupo DNP+BPA ($p=0,032$). Com relação à multiplicidade tumoral, os grupos que receberam o BPA (DNP+BPA e DHP+BPA) apresentaram maior número de tumores quando comparados ao grupo controle DNP ($p=0,007$ e $p=0,018$, respectivamente). Os principais tipos histológicos encontrados de adenocarcinomas papilífero, cribriforme, tubular e comedo estão ilustrados na Figura 16.

Discussão

Estudos recentes investigam a possibilidade de fatores nutricionais e ambientais serem capazes de causar efeitos deletérios à saúde dos organismos em desenvolvimento. A nutrição materna durante o período gestacional é um fator importante para o desenvolvimento embrionário e fetal, e o mesmo também pode sofrer influências de fatores ambientais. Esses fatores reprogramam as respostas celulares e teciduais, aumentando a suscetibilidade a doenças na vida adulta [12, 23, 24]. No presente estudo foi avaliado o desenvolvimento da glândula mamária através de parâmetros morfométricos e histológicos, que consistem em medidas de comprimento da árvore mamária e contagem das principais estruturas mamárias terminais (TEBs e TDs). A RPG e a exposição ao BPA não foram capazes de causar alterações significativas nesses parâmetros. Segundo Fernandez-Twinn et al. [25], a subnutrição fetal resulta em retardo no desenvolvimento da árvore mamária, porém, frente a uma nutrição pós-natal adequada, o organismo desenvolve um mecanismo compensatório para recuperar o crescimento debilitado após a 5ª semana de vida. Esse mecanismo é chamado de *catch-up*. Portanto, sugere-se que, a não alteração no desenvolvimento da glândula mamária observada no presente estudo seja devido a este mecanismo. A DHP e o BPA reduziram a área ocupada pelo tecido epitelial da glândula mamária quando comparado ao grupo controle DNP e a associação dos tratamentos (DHP+BPA) foi capaz de intensificar essa redução. Além da redução do tecido epitelial, o grupo DHP+BPA apresentou aumento significativo da área ocupada pelo *fat pad*. Em relação a área ocupada por colágeno, esta manteve-se similar entre os grupos experimentais. Bautista et al. [26] e Beinder et al. [27] demonstraram que a RPG diminuiu a área ducto-alveolar e aumentou o tecido adiposo e estromal. Por outro lado, o BPA é capaz de aumentar o número de TEBs [28], causar hiperplasias ductais [29] e aumentar a densidade estromal [30], entretanto essas alterações são dependentes das concentrações de BPA ministradas e período de exposição.

O índice de proliferação celular nas células epiteliais da glândula mamária, avaliado através do imunomarcador nuclear Ki-67, foi semelhante independente dos tratamentos com o BPA e/ou com a RPG. Esses resultados podem ser atribuídos ao fato de que o aumento no índice proliferativo ocorre quando há exposição ao BPA durante um intervalo maior tempo, observando-se, portanto, seus efeitos deletérios quando o animal atinge a vida adulta [30]. Conforme será discutido mais adiante, nossos dados referentes à suscetibilidade ao desenvolvimento tumoral mamário corroboram com tal hipótese. Em relação ao índice apoptótico, os grupos que receberam BPA (DNP+BPA e DHP+BPA) aumentaram as taxas de apoptose no epitélio mamário, quando comparado aos respectivos grupos controles (DNP e DHP), como descrito anteriormente na literatura [28, 30].

Em alguns casos, os efeitos da exposição precoce ao BPA não são evidenciados até a idade adulta, quando os órgãos dependentes de hormônio são expostos a situações endócrinas particulares, como gravidez ou tratamento hormonal exógeno. A expressão anormal de genes sensíveis a esteroides e mediada pelo BPA levaria a uma desregulação da via de sinalização hormonal com consequências negativas em longo prazo para a função uterina adulta e saúde reprodutiva [31]. Dentre os hormônios mais importantes, a progesterona e o estrógeno promovem proliferação e diferenciação celular nas células epiteliais da mama normal [32]. No presente estudo, a imunomarcagem do RP mostrou-se aumentada na glândula mamária no grupo DHP+BPA quando comparada aos demais grupos. Com relação aos REs, o grupo DHP apresentou aumento significativo da expressão do RE- α em relação aos demais grupos. Entretanto, o RE- β não sofreu alteração frente as diferentes intervenções. O BPA é capaz de alterar a expressão dos RP e REs, entretanto essa alteração é dependente da idade das ratas, uma vez que há alteração dos níveis circulantes desses hormônios durante as diferentes fases de desenvolvimento [20, 33, 34, 35].

É cada vez mais evidente que o ambiente *in utero* e pós-natal pode programar a suscetibilidade ao câncer de mama na vida adulta [23]. Além de alterações nas taxas de maturação da glândula mamária, formação tardia do lúmen, crescimento ductal aumentado e capacidade de resposta à exposição estrogênica secundária, também foi observado aumento de suscetibilidade à carcinogênese mamária na fase adulta em roedores expostos precocemente ao BPA [23, 11, 36, 35]. Os dados encontrados no presente estudo corroboram com o estudo de Fernandez-Twinn et al. [25], que indicam que proles de fêmeas mantidas com dieta hipoproteica até o desmame apresentaram maior risco de desenvolvimento de adenocarcinomas mamários. Observamos nesse estudo menor período de latência para o desenvolvimento dos tumores mamários nos grupos tratados em relação ao grupo controle. O

grupo DHP desenvolveu seu primeiro tumor na 14^a semana de vida, enquanto que no grupo controle DNP, o primeiro tumor apareceu apenas na 31^a semana de vida. Da mesma forma que a RPG, a exposição ao BPA também aumentou a suscetibilidade ao câncer de mama, uma vez que o grupo DNP+BPA teve o aparecimento do primeiro tumor na 13^a semana de vida, contrastando com o grupo controle DNP. Além disso, a associação DHP+BPA também foi um fator importante para a suscetibilidade a carcinogênese mamária, pois os animais desse grupo tiveram desenvolvimento tumoral mamário ainda mais precoce quando comparado ao grupo controle DNP; o primeiro tumor apareceu na 12^a semana de vida. Além de menor período de latência dos tumores, o grupo DHP+BPA apresentou maior multiplicidade tumoral, e o grupo DNP+BPA, maior incidência e multiplicidade tumoral, com o desenvolvimento de 18 e 20 adenocarcinomas, respectivamente, demonstrando, portanto, que os tratamentos contribuíram para o desenvolvimento da carcinogênese mamária.

A avaliação histológica dos diferentes tipos de tumores mamários é uma ferramenta importante para o conhecimento da natureza e desenvolvimento do tumor [22]. Nesse estudo foram encontrados três tipos diferentes de tumores mamários segundo a classificação dos tipos histológicos: fibroma, fibroadenoma e adenocarcinoma. A lesão de maior importância e alvo do estudo são os adenocarcinomas, comuns após a iniciação pela DMBA. Os adenocarcinomas são lesões malignas que se originam no epitélio glandular e têm como características principais o polimorfismo estrutural, perda do padrão túbulo-alveolar, escassez estromal, áreas de necrose, mitoses e potencial invasivo. Eles são subdivididos em 6 categorias: tubular, papilífero, cribriforme, comedo, cístico e sólido. Além dos tipos histológicos descritos acima, também foram encontrados carcinomas mamários com padrão estrutural misto, como descrito por Costa et al. [37]. Tanto a dieta hipoproteica (DHP) quanto a exposição ao BPA (DNP+BPA e DHP+BPA) não alteraram a evolução histopatológica dos tumores mamários, pois os tipos histológicos se mantiveram semelhantes entre os grupos.

Considerando esses resultados, podemos concluir que o BPA promoveu apoptose e a RPG aumentou a expressão do RE- α nas glândulas mamárias; a RPG e o BPA foram capazes de alterar a morfologia da glândula mamária e aumentar a suscetibilidade à carcinogênese mamária induzida pela DMBA e a associação das intervenções aumentou a expressão do RP.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro, ao Paulo César Georgete pelo suporte técnico durante o período experimental e à Dra. Laura Kass da Universidad Nacional del Litoral pela colaboração nas análises.

Referências

1. TORRE, LA., et al. Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 26(4):444-57, 2017.
2. BOUCHARDY, C., et al. Recent increase of breast cancer incidence among women under the age of forty. *Br J Cancer.* 96:1743–1746, 2007.
3. PARKIN, DM., et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 55:74-108, 2005.
4. BARKER, DJ. Developmental origins of chronic disease. *Public Health.* 126:185–189, 2012.
5. BURDGE, GC., LILLYCROP, KA., JACKSON, AA. Nutrition in early life, and risk of cancer and metabolic disease: alternative endings in an epigenetic tale? *Br J Nutr.* 101:619–630, 2009
6. FERNANDEZ-TWINN, DS., et al. Compensatory mammary growth following protein restriction during pregnancy and lactation increases early-onset mammary tumor incidence in rats. *Carcinogen.* 28(3):545-552, 2006.
7. ZHENG, S., et al. A gestational low-protein diet represses p21(WAF1/Cip1) expression in the mammary gland of offspring rats through promoter histone modifications. *Br J Nutr.* 108:998–1007, 2012.
8. YOON, K., et al. Estrogenic endocrine-disrupting chemicals: molecular mechanisms of actions on putative human diseases. *J Toxicol Environ. Health. B. Crit. Rev.* 17:127–74, 2014.
9. MANTOVANI, A., et al. Problems in testing and risk of endocrine disrupting chemicals with regard to developmental toxicology. *Chemosphere.* 39:1293-00, 1999.
10. ROCHESTER, J.R. Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod Toxicol.* 42:132–55, 2013.
11. JENKINS, S., et al. Endocrine-active chemicals in mammary cancer causation and prevention. *J Steroid Biochem Mol. Biol.* 129:191–200, 2012.

12. HILAKIVI-CLARKE, L. Nutritional modulation of terminal end buds: its relevance to breast cancer prevention. *Curr. Cancer Drug Targets* 7:465–74, 2007.
13. RUSSO, J., ROMERO, A., RUSSO, I.H. Architectural Pattern of the Normal and Cancerous Breast under the Influence of Parity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 3:219-224, 1994.
14. MACEJOVÁ, D., BRTKO, J. Chemically Induced Carcinogenesis: A Comparison of 1-methyl-1-nitrosurea, 7,12-dimethylbenzanthracene, diethylnitroso-amine and azoxymethan models (Minireview). *Endroc Regul.* 35:53-59, 2001.
15. RAY, RS., et al. Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: chemopreventive activity of vanadium in vivo and in vitro. *Int J Cancer.* 120:13-23, 2007.
16. REEVES, PG., NIELSEN, FH., FAHEY, GC. JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 123:1939-51, 1993.
17. AYYANAN, A., et al. Perinatal Exposure to Bisphenol A Increases Adult Mammary Gland Progesterone Response and Cell Number. *Mol Endocrinol.* 25(11): 1915–1923, 2011.
18. KASS, L., et al. Prenatal Bisphenol A exposure delays the development of the male rat mammary gland. *Reprod Toxicol.* 54:37–46, 2015.
19. GOMEZ, AL., et al. Perinatal Exposure to Bisphenol A or Diethylstilbestrol Increases the Susceptibility to Develop Mammary Gland Lesions After Estrogen Replacement Therapy in Middle-Aged Rats. *Horm Canc.* 8:78–89, 2017.
20. BETANCOURT, AM., et al. In Utero Exposure to Bisphenol A Shifts the Window of Susceptibility for Mammary Carcinogenesis in the Rat. *Environ Health Perspect.* 118(11):1614-19, 2010.
21. RUSSO, IH., RUSSO, J. Mammary Gland Neoplasia in Long-Term Rodent Studies. *Environ Health Perspect.*, 104:938-67, 1996.
22. RUSSO, J. Significance of Rodent Mammary Tumors for Human Risk Assessment. *Toxicol Pathol.* 43(2):145–170, 2015.
23. FONTELLES, CC., et al. Paternal programming of breast cancer risk in daughters in a rat model: opposing effects of animal- and plant-based high-fat diets. *Breast Cancer Res.* 18(1):71, 2016.
24. LOPES, GAD. et al. Fetal developmental programming: insights from human studies and experimental models. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 30(6):722-728, 2017.

25. FERNANDEZ-TWINN, DS., et al. Compensatory mammary growth following protein restriction during pregnancy and lactation increases early-onset mammary tumor incidence in rats. *Carcinogen*. 28:545–552, 2007.
26. BAUTISTA, CJ., et al. Protein Restriction in the Rat Negatively Impacts Long-chain Polyunsaturated Fatty Acid Composition and Mammary Gland Development at the End of Gestation. *Arch Med Res*. 44:429-36, 2013.
27. BEINDER, L., et al. Detection of Expressional Changes Induced by Intrauterine Growth Restriction in the Developing Rat Mammary Gland via Exploratory Pathways Analysis. *PLoS ONE*. 9(6): e100504, 2014.
28. MORAL, R., et al. Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. *J Endocrinol*. 196, 101–12, 2008.
29. DURANDO, M., et al. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect*. 115:80-6, 2007.
30. IBRAHIM, MAA., ELBAKRY, RH., BAYOMY, NA. Effect of bisphenol A on morphology, apoptosis and proliferation in the resting mammary gland of the adult albino rat. *Int. J. Exp. Pathol*. 97:27–36, 2016.
31. VIGEZZI, L., et al. A deregulated expression of estrogen-target genes is associated with an altered response to estradiol in aged rats perinatally exposed to bisphenol A. *Mol Cell Endocrinol*. 426:33-42, 2016.
32. RUSSO, J., Lynch, H., Russo, IH. Mammary gland architecture as a determining factor in the susceptibility of the human breast to cancer. *Breast J*. 7(5):278-91, 2001.
33. LAMARTINIERI, CA., et al. Exposure to the Endocrine Disruptor Bisphenol A Alters Susceptibility for Mammary Cancer. *Horm Mol Biol Clin Investig*. 5(2):45–52, 2011.
34. MENDOZA-RODRÍGUEZ, CA., et al. Administration of bisphenol A to dams during perinatal period modifies molecular and morphological reproductive parameters of the offspring. *Reprod Toxicol*. 31:177–83, 2011.
35. KASS, L., et al. Perinatal exposure to xenoestrogens impairs mammary gland differentiation and modifies milk composition in Wistar rats. *Reprod Toxicol*. 33:390–400, 2012.
36. ACEVEDO, N., et al. Perinatally administered bisphenol a as a potential mammary gland carcinogen in rats. *Environ Health Perspect*. 121:1040–6, 2013.
37. COSTA, I, SOLANAS, M., ESCRICH, E. Histopathologic Characterization of Mammary Neoplastic Lesions Induced With 7,12 Dimethylbenz(a)anthracene in the Rat: A Comparative Analysis With Human Breast Tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 126, 2002.

Tabela 1. **Diets.** Composição das dietas normoproteica (AIN-76A) e hipoproteica (AIN-93) utilizadas durante o período experimental.

Ingredientes (g/kg)	Normoproteica (17% de proteína)	Hipoproteica (6% de proteína)
Caseína (84% de proteína)	202	71,5
Amido	397	480
Dextrina	130,5	159
Sacarose	100	121
L-cistina	3	1
Fibra pH 101 ou 102	50	50
Óleo de soja	70	70
Mistura de sais AIN93G*	35	35
Mistura de vitaminas AIN93G*	10	10
Cloridrato/Bitartarato de Colina	2,5	2,5

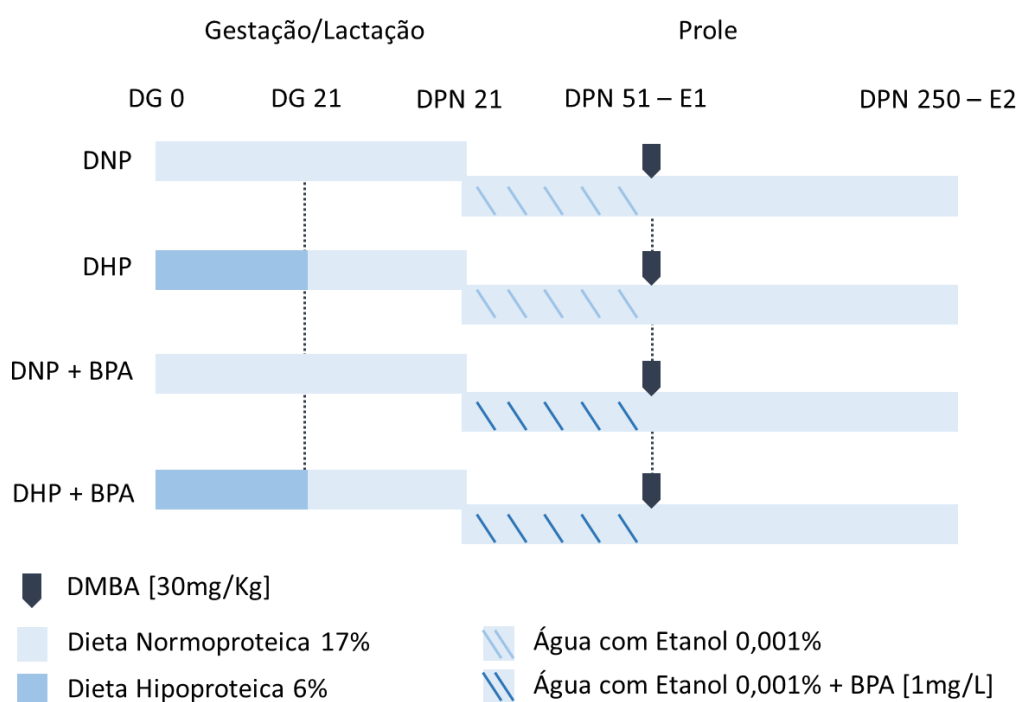


Figura 1. **Delineamento Experimental.** DNP: dieta normoproteica; DHP: dieta hipoproteica; DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A; DG: dia gestacional; DPN: dia pós-natal; E1: eutanásia (10 animais/grupo); E2: eutanásia (11 animais/grupo); DMBA: 7,12-dimetilbenzantraceno.

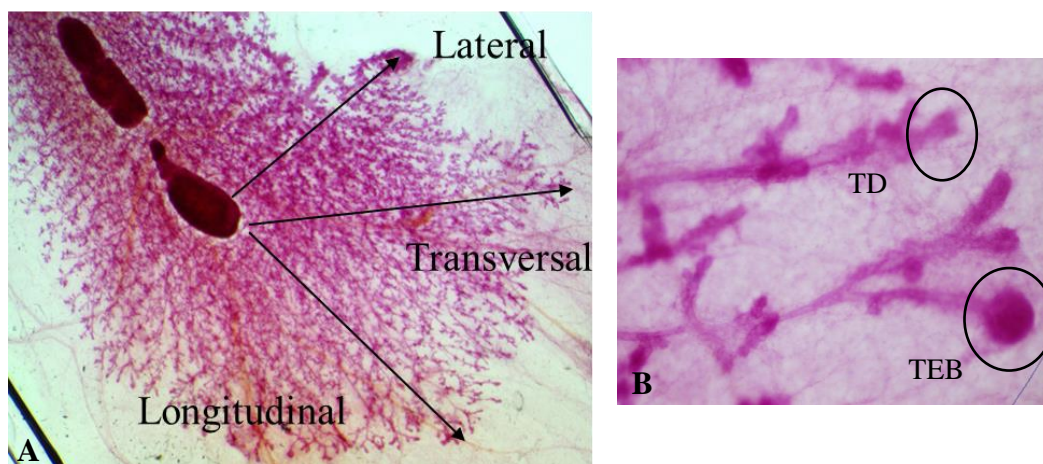


Figura 2. **Análise morfométrica.** (A) Medidas realizadas para crescimento lateral, transversal e longitudinal. Objetiva 0,8x. (B) Brotos terminais (TEBs) e ductos terminais (TDs). Objetiva 4x.

Tabela 2. **Dados de biotério.** Peso corpóreo, ganho de peso e consumo de BPA.

Parâmetros	Grupos experimentais				p
	DNP	DHP	DNP+BPA	DHP+BPA	
Peso Corpóreo (g)					
DPN 21	53,82 ± 5,02	47,00 ± 7,91	44,09 ± 9,96	56,00 ± 6,87	
DPN 51	171,09 ± 13,00	173,91 ± 17,99	169,18 ± 17,17	176,73 ± 14,40	
DPN 245	304,00 ± 24,93	285,50 ± 23,33	297,22 ± 27,27	304,50 ± 32,59	
Ganho de peso (g)					
DPN 21-51 ^a	115 ± 16,69	128 ± 11,12	125 ± 11,79	123 ± 11,61	0,860
Consumo de BPA					
(µg/kg/dia) ^b	0	0	85,55 ± 1,60	83,36 ± 1,45	0,560

DNP: dieta normoproteica; DHP: dieta hipoproteica; DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A; DPN: dia pós-natal. ^{a,b} Não houve diferenças estatísticas. Dados expressos em Média ± DP.

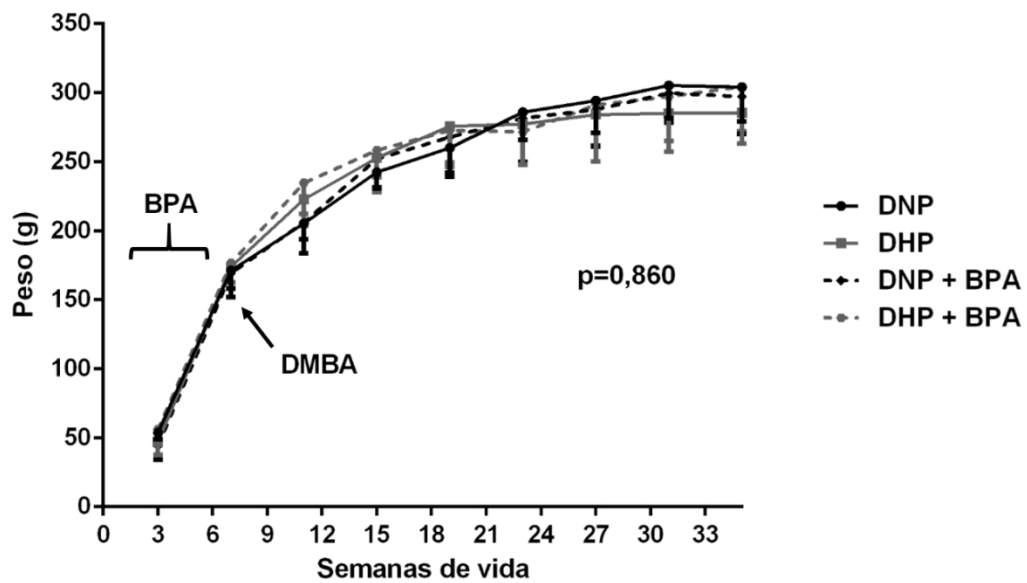


Figura 3. **Ganho de peso.** Gráfico de ganho de peso durante o período experimental (250 dias), administração do BPA e iniciação com DMBA. Dados expressos em Média \pm DP. DNP: dieta normoproteica; DHP: dieta hipoproteica; DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A; DMBA: 7,12-dimetilbenzantraceno.

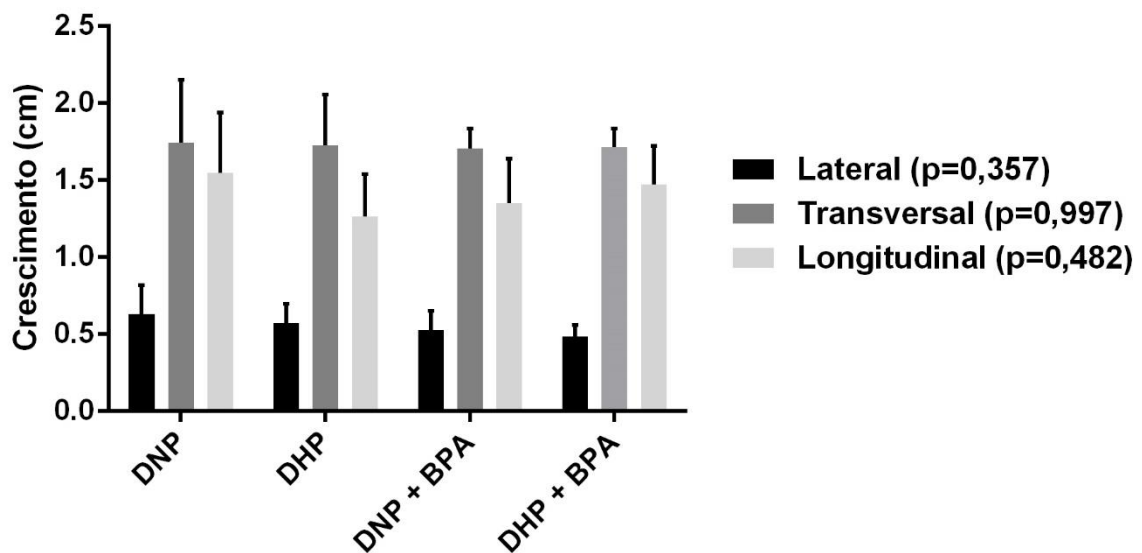


Figura 4. **Desenvolvimento da glândula mamária.** Gráfico de medidas de comprimento da árvore mamária. Dados expressos em Média \pm DP. DNP: dieta normoproteica; DHP: dieta hipoproteica; DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A.

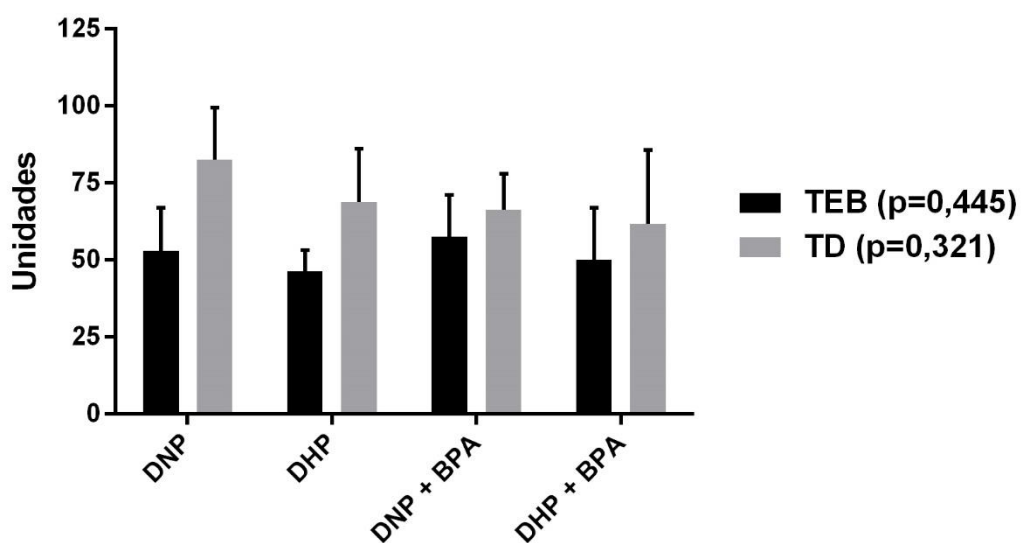


Figura 5. **Desenvolvimento da glândula mamária.** Gráfico de contagem dos brotos terminais (TEBs) e ductos terminais (TDs) na extremidade da árvore mamária. Dados expressos em Média \pm DP. DNP: dieta normoproteica; DHP: dieta hipoproteica; DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A.

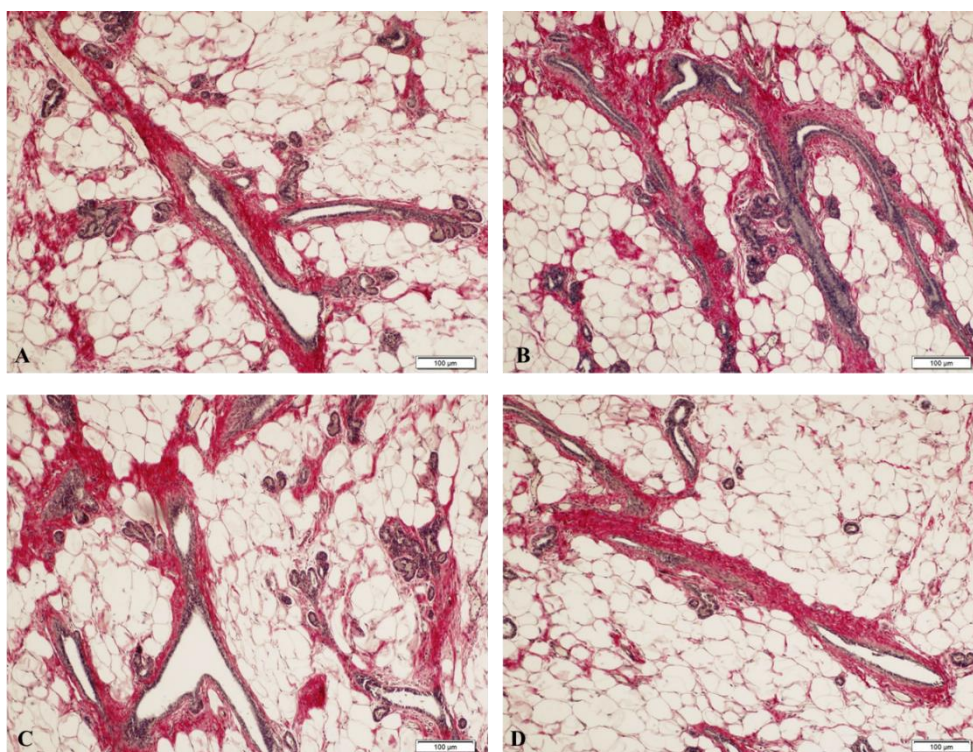


Figura 6. **Morfologia da glândula mamária.** Coloração Picosirius-Hematoxilina, objetiva 10x. (A) DNP: dieta normoproteica; (B) DHP: dieta hipoproteica; (C) DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; (D) DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A.

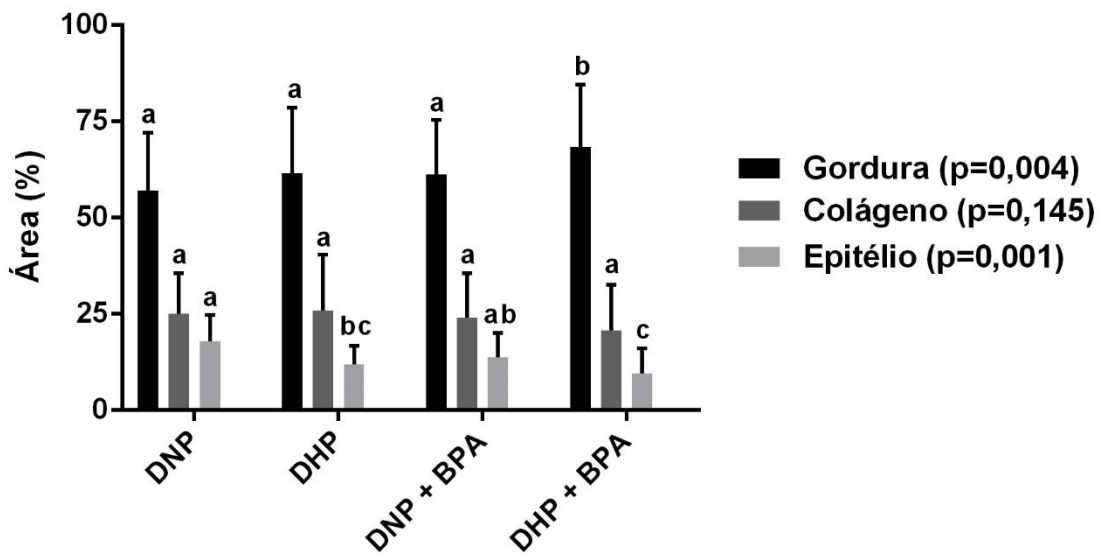


Figura 7. **Morfologia da glândula mamária.** Proporção de área ocupada pelo tecido adiposo, fibras colágenas e epitélio das glândulas mamárias. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os grupos. Dados expressos em Média \pm DP. DNP: dieta normoproteica; DHP: dieta hipoproteica; DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A.

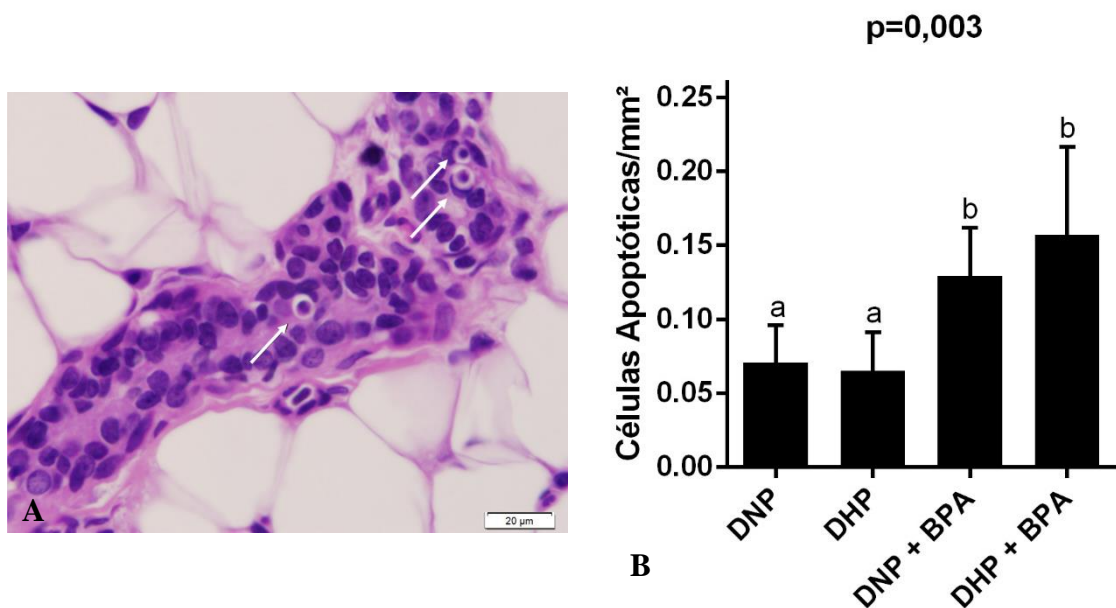


Figura 8. **Análise de apoptose.** (A) Células em apoptose (seta). Coloração Hematoxilina-Eosina, objetiva 40x. (B) Porcentagem de células apoptóticas. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os grupos. Dados expressos em Média \pm DP. DNP: dieta normoproteica; DHP: dieta hipoproteica; DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A.

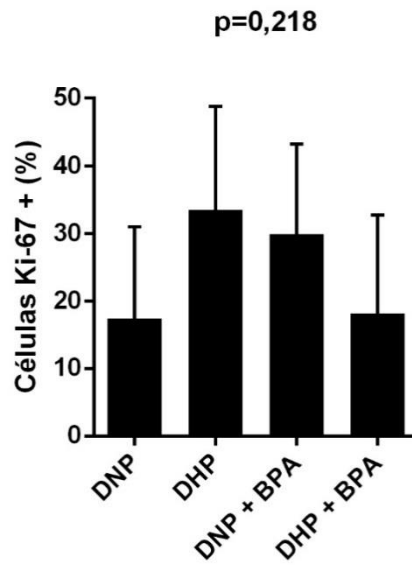


Figura 9. **Proliferação celular.** Porcentagem de marcação de proliferação celular (Ki-67). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos. Dados expressos em Média \pm DP. DNP: dieta normoproteica; DHP: dieta hipoproteica; DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A.

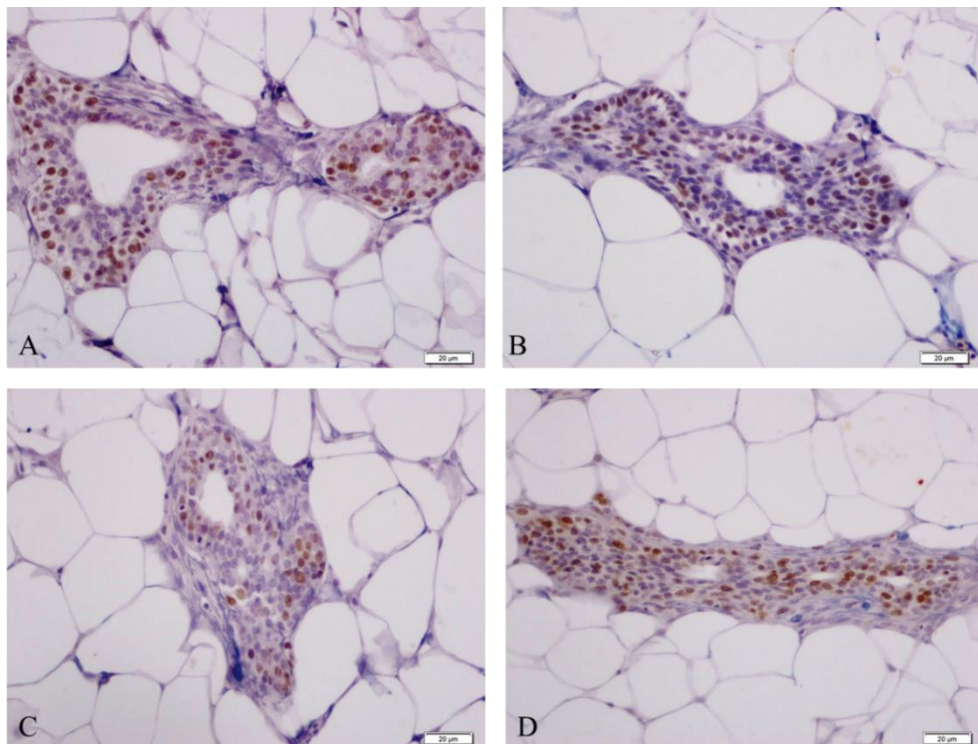


Figura 10. **Proliferação celular.** Marcação imunoistoquímica para Ki-67. Objetiva 40x. (A) DNP: dieta normoproteica; (B) DHP: dieta hipoproteica; (C) DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; (D) DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A.

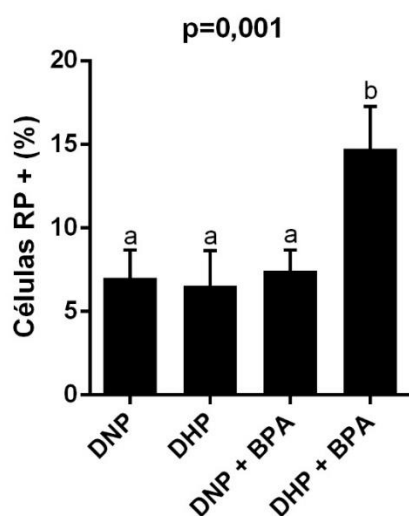


Figura 11. **Receptor de Progesterona.** Porcentagem de marcação do receptor de progesterona (RP). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os grupos. Dados expressos em Média \pm DP. DNP: dieta normoproteica; DHP: dieta hipoproteica; DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A.

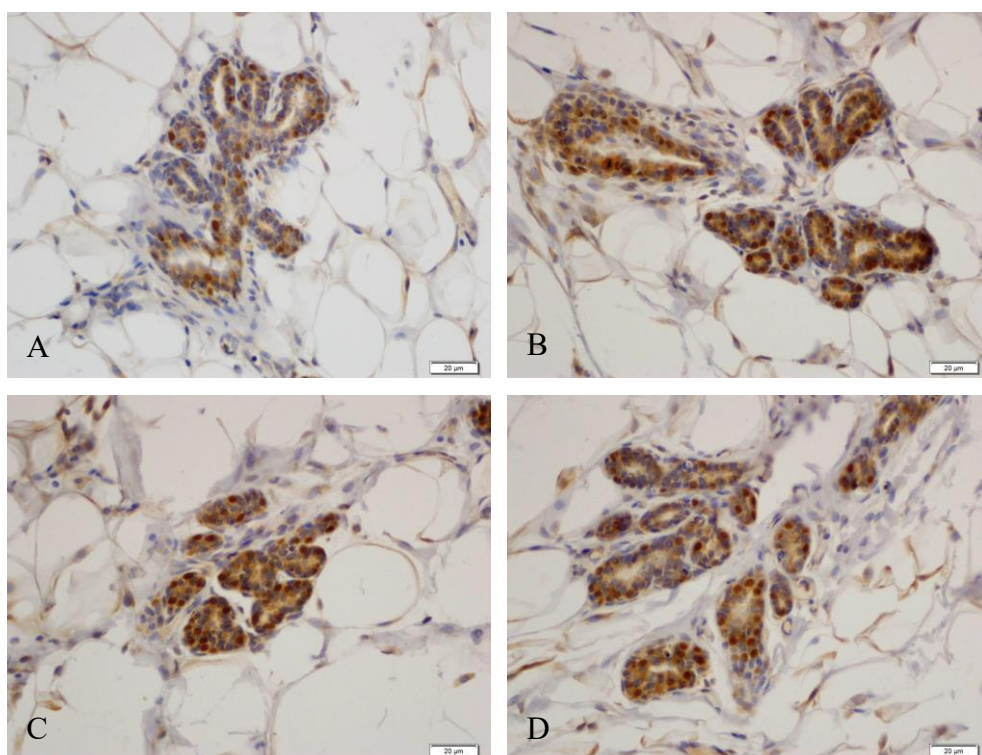


Figura 12. **Receptor de Progesterona.** Marcação imunohistoquímica para RP. Objetiva 40x. (A) DNP: dieta normoproteica; (B) DHP: dieta hipoproteica; (C) DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; (D) DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A.

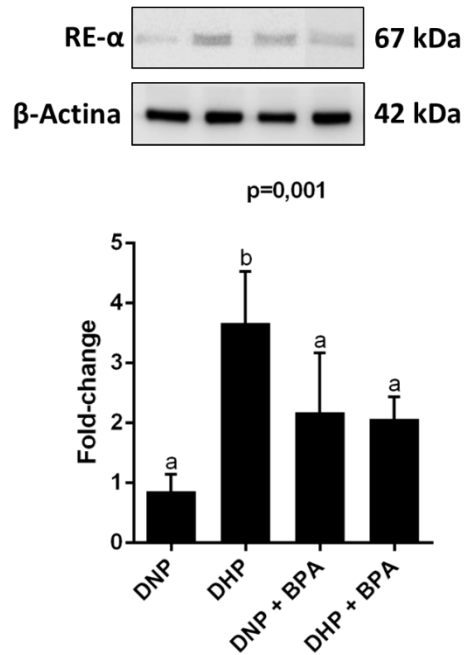


Figura 13. **Receptor de Estrógeno- α** . *Fold-change* da expressão proteica do receptor de estrógeno- α (RE- α). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os grupos. DNP: dieta normoproteica; DHP: dieta hipoproteica; DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A.

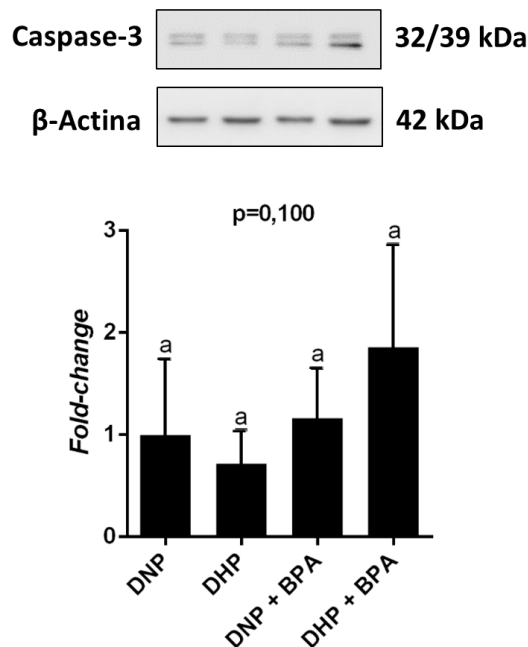


Figura 14. **Receptor de Estrógeno- β** . *Fold-change* da expressão proteica do receptor de estrógeno- β (RE- β). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os grupos. DNP: dieta normoproteica; DHP: dieta hipoproteica; DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A.

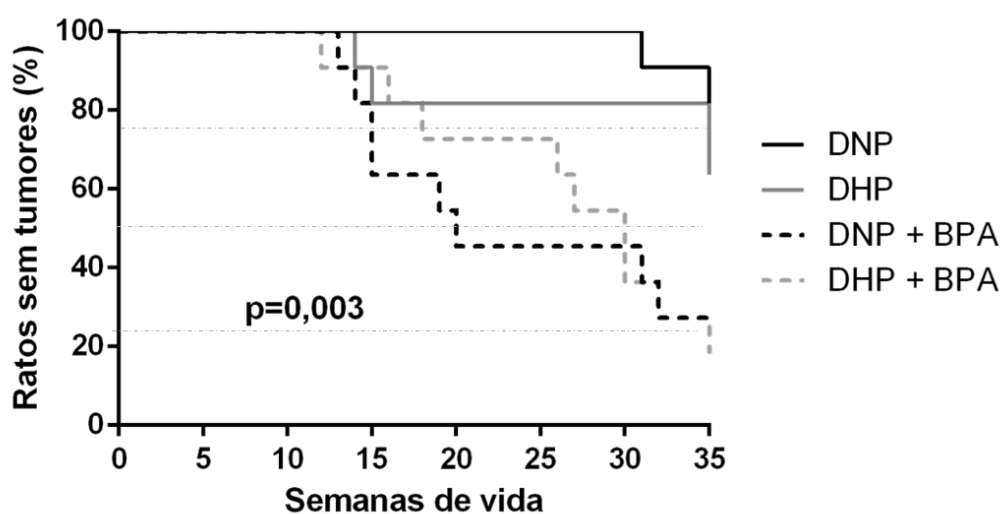


Figura 15. **Latência tumoral.** Gráfico de aparecimento dos tumores. DNP: dieta normoproteica; DHP: dieta hipoproteica; DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A.

Tabela 3. **Dados de carcinogenicidade.** Parâmetros observados nos diferentes grupos experimentais após a administração da DMBA.

Parâmetros	Grupos experimentais				p
	DNP	DHP	DNP+BPA	DHP+BPA	
Número de ratos	11	11	11	11	
Aparecimento do primeiro tumor (semanas)	31	14	13	12	
Incidência tumoral (%)	18 ^a	36 ^a	73 ^b	64 ^a	0,032
Número total de adenocarcinomas mamários	2	10	20	18	
Multiplicidade (nº de tumores/total de animais)	0,18 ^a	0,91 ^a	1,82 ^b	1,64 ^b	0,007 0,018
Tipos histológicos					
Adenocarcinoma tubular	1	4	5	3	
Adenocarcinoma papilífero	1	4	5	5	
Adenocarcinoma cribriforme	0	0	7	4	
Adenocarcinoma comedo	0	0	1	0	
Adenocarcinoma papilífero/tubular	0	1	1	4	
Adenocarcinoma cribriforme/tubular	0	0	1	1	

Parâmetros	Grupos experimentais				p
	DNP	DHP	DNP+BPA	DHP+BPA	
Adenocarcinoma cribriforme/comedo	0	1	0	1	
Fibroma	0	0	1	0	
Fibroadenoma	0	0	1	1	
Tumor de Zimbal	0	1	1	1	

Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os grupos. DNP: dieta normoproteica; DHP: dieta hipoproteica; DNP+BPA: dieta normoproteica e Bisfenol A; DHP+BPA: dieta hipoproteica e Bisfenol A; DMBA: 7,12-dimetilbenzantraceno.

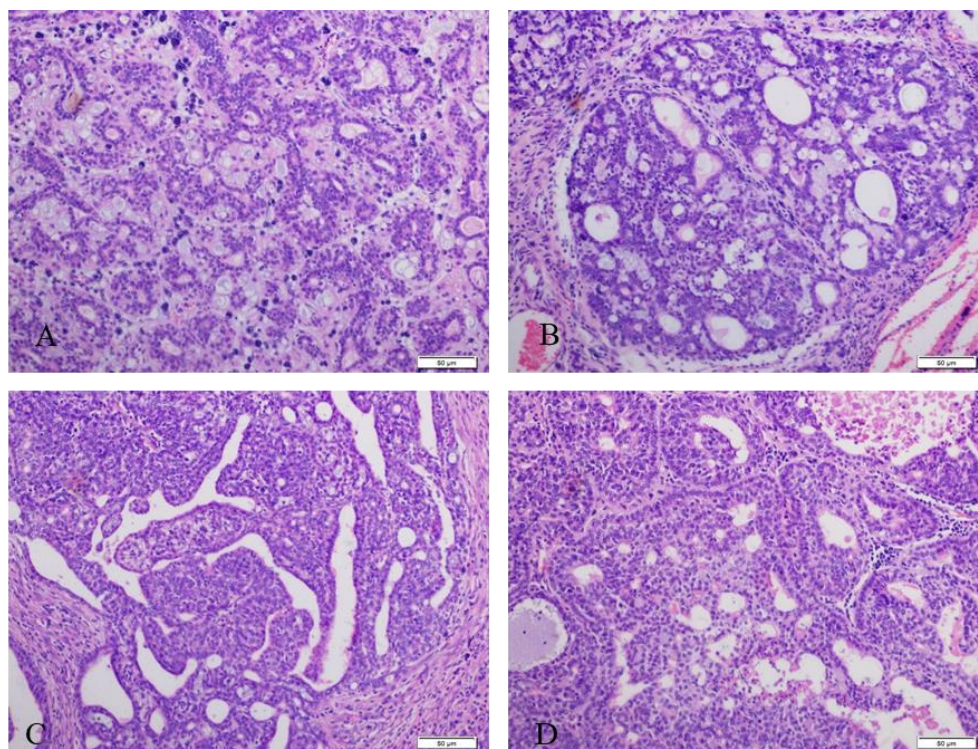


Figura 16. **Tipos histológicos de lesões mais prevalentes nas glândulas mamárias.** Objetiva 20x. (A) Adenocarcinoma Papilífero; (B) Adenocarcinoma Cribriforme; (C) Adenocarcinoma Tubular; (D) Adenocarcinoma Comedo.