RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 04/07/2017.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

Tassia Campos de Lima e Silva

Efeitos do resveratrol sobre o desenvolvimento e carcinogênese da glândula mamária na prole de ratas da linhagem Wistar expostas a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) na gestação

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan

2016

Tassia Campos de Lima e Silva

Efeitos do resveratrol sobre o desenvolvimento e carcinogênese da glândula mamária na prole de ratas da linhagem Wistar expostas a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) na gestação

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Barbisan

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Tassia Campos de Lima e.
Efeitos do resveratrol sobre o desenvolvimento e carcinogênese da glândula mamária na prole de ratas da linhagem Wistar expostas a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) na gestação / Tassia Campos de Lima e Silva. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Luis Fernando Barbisan
Capes: 40105008

1. Mamas - Câncer. 2. Carcinógenos. 3. Polifenóis. 4. Ratos Wistar.

Palavras-chave: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD); Carcinogênese mamária; Desenvolvimento mamário; Exposição gestacional/lactacional; Resveratrol.

À minha família,

Minha vida,

Laura, Jorginho e Jorge.

Aos meus pais,

Com amor

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, graças a **Ele** estamos aqui.

Ao meu marido e melhor amigo **Jorge** por sempre me incentivar, apoiar, compreender, e ter me ajudado a ver que eu não sou apenas mais uma na multidão.

Aos meus filhos **Laurinha e Jorginho**, por sempre me deixarem salvar as anotações antes de digitar o *reset*, e por seus sorrisos, a fonte da minha alegria e da minha vontade de sempre seguir.

Aos meus pais, irmãos, cunhadas e sobrinhos por estar sempre ao meu lado.

Ao meu professor e orientador **Luis Fernando Barbisan** pelo apoio, paciência, compreensão, conhecimento e aos professores **Nicodemos Telles, Mário Ribeiro e Marcia Guimarães** os ensinamentos que me foram repassados e a oportunidade junto a parceria **CAPES/UFPE/UNESP** da realização deste doutorado institucional.

Ao meu anjo da guarda **Vânia** pela ajuda e sugestões que sempre me tiravam da escuridão nos momentos de dificuldades.

Aos meus grandes amigos **Jeniffer, Valerium, Mayara, Tadeu, Elba, Gustavo, Katarina** que tenho o prazer de tê-los por todos esses anos e sei que nem mil anos irão tirá-los do meu coração, além dos meus amigos e companheiros da UFPE **Augusto, Sônia, Solange, Ednaldo** e meus alunitos **Mari, Igor, Lílian, Raquel** entre outros que tanto me incentivam, inclusive os colegas do laboratório de Morfologia.

Aos meus amigões Dinterianos **Luciana, Denise, Ivan, Jacqueline, Moises** entre outros amigos, que estiveram comigo durante todos estes anos, acompanhando-me e apoiando-me como verdadeiros irmãos.

A todos que me apoiaram e que sabiam a hora certa de me dizer uma palavra amiga, sem exceção, meus agradecimentos.

“Queira!
Basta ser sincero
E desejar profundo
Você será capaz
De sacudir o mundo
Vai! Tente outra vez!”
(Raul Seixas)

Resumo

O resveratrol (RES) destaca-se principalmente por suas propriedades anti-carcinogênica, anti-inflamatória, antioxidante e estrogênica, atuando inclusive como antagonista do receptor aril-hidrocarboneto (AhR). A 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) é considerada uma das dioxinas de maior toxicidade, possuindo grande relevância para estudos envolvendo a saúde humana e animal. Sua ação está associada à interação com o receptor aril-hidrocarboneto (AhR), responsável pelos efeitos adversos do TCDD sobre o crescimento e desenvolvimento mamário das mães na gestação/lactação e na prole de fêmeas de mães expostas. Portanto, o presente estudo objetivou identificar a capacidade do RES (gestação/lactação) de alterar os efeitos adversos do TCDD na glândula mamária da prole de fêmeas após exposição gestacional a esta dioxina; avaliar os efeitos isolados ou de associação da exposição ao TCDD (gestação) e ao RES (gestação/lactação) através de parâmetros morfológicos, imunoistoquímicos e moleculares na glândula mamária da prole de fêmeas no dia pós-natal (DPN) 22; avaliar os efeitos maternos do TCDD e/ou do RES sobre a susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama induzido pela administração de N-metil-N-nitrosourea (MNU, 50mg/kg no DPN 22 e 51) na vida adulta. Desta forma, fêmeas prenhes da linhagem Wistar foram divididas em quatro grupos experimentais (n=15 cada): Controle, TCDD, TCDD+RES e RES. O TCDD foi administrado em dose única no 15º dia gestacional (DG15) na dose de 1µg/kg e o RES foi administrado do DG10 ao DG21 na dose de 20 mg/Kg, ambos via gavagem. Fêmeas da geração F1 foram eutanasiadas no DPN 22 e DPN 160. No DPN 22, o tratamento materno ao TCDD alterou o desenvolvimento de estrutura mamária, mas sem modificar os niveis de proliferação celular ou expresssão do receptor de estrógeno alfa (RE-α) nas glândulas mamárias, quando comparado ao grupo controle. A análise de expressão gênica indica que alguns genes associados ativação de Ahr (Ahrr) e de apoptose (Bcl-2, Bax e caspase 3) apresentaram-se no grupo TCDD, quando comparado ao grupo controle, sendo os dois primeiros “up” e os ultimos “down” regulados. No DPN 160, maior numero de tumores mamários (multiplicidade) foram observados no grupo TCDD em relação aos demais grupos. De uma forma geral, os resultados indicam que as alterações mamárias induzidas na prole de fêmeas pelo TCDD foram influenciadas pelo tratamento materno com RES.

Palavras-chaves: Exposição gestacional/lactacional, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), Resveratrol, Desenvolvimento mamário, Carcinogênese mamária.

Abstract

Resveratrol (RES) stands out primarily for its anti- carcinogenic, anti-inflammatory, antioxidant and estrogenic properties, including acting as an antagonist of aryl hydrocarbon receptor (AhR). The 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is considered one of the dioxin with most toxicity, having great relevance to public human and animal health. Its biological action is associated with the interaction with AhR, responsible for the adverse effects of TCDD on mammary growth and development from mothers exposed during pregnancy/lactation and in female offspring. Therefore , this study aimed 1) to identify the capacity of RES (pregnancy/lactation treatment) to modify the adverse effects of TCDD in the mammary gland of female offspring after gestational exposure to this dioxin; 2) to evaluate the isolated effects or the association with TCDD (pregnancy exposure) RES (pregnancy/lactation treatment) through morphological parameters, immunohistochemical and molecular in the mammary gland of female offspring on postnatal day (PND) 22; 3) to identify maternal effects of TCDD and/or the RES on the susceptibility to the development of mammary cancer induced by administration of N- methyl-N- nitrosourea (MNU, 50mg/kg PND 22 and 51) in adulthood. Thus, pregnant female Wistar were divided into four groups (n=15 each): Control, TCDD, TCDD + RES and RES. TCDD was orally administered as a single dose on gestational day 15 (GD15) at 1µg/kg and RES was orally administered during GD10 to GD21 daily at dose of 20 mg/kg. Female F1 generation was euthanized at PND 22 to PND 160. At PND 22, Maternal TCDD exposure altered the development of mammary structure, but without modifying the cell proliferation or estrogen receptor alpha (ER -α) levels in the mammary glands when compared to the control group. Gene expression analysis indicates that some genes associated activation Ahr (Ahrr) and apoptosis (Bcl -2, Bax and caspase 3) were altered in the TCDD group compared to the control group, being the first two "up" and the last "down" regulated. At PND 160, a higher number of mammary tumors (multiplicity) were observed in TCDD group compared to other groups. Overall, the results indicate the mammary changes induced in the female offspring due to maternal TCDD exposure were influenced by maternal RES treatment.

Keywords: Pregnancy/lactation exposure, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), Resveratrol, Mammary gland development and carcinogenesis.

Lista de Figuras- Capítulo I

Figura 1 - Mortalidade proporcional não ajustada por câncer de mama, homens e mulheres, Brasil, entre 1979 e 2013 19
Figura 2 - Taxas de mortalidade por câncer de mama, brutas e ajustadas por idade, pelas populações mundial e brasileira de 2010, por 100.000 homens e mulheres, Brasil, no ano de 2013. 20
Figura 3 - Representação da estrutura da glândula mamária normal humana 22
Figura 4 - Representação da estrutura da glândula mamária normal de rata 22
Figura 5 -Estrutura química das dioxinas 29
Figura 6 -Via de sinalização do AhR quando exposta ao TCDD 31
Figura 7 - Estruturas *cis* e *trans* do Resveratrol 34

Lista de Figuras - Capítulo II

Figura 1 - Montagem total da glândula mamária corada com *Carmine Alum Stain* 62

Figura 2 - Níveis de proliferalção celular pelo Ki-67 nas células epiteliais mamárias das glândulas mamárias abdominais nos diferentes grupos experimentais no DPN 22. 64

Figura 3 – Níveis de expressão do receptor de estrógeno alfa (RE-α) nas células epiteliais mamárias das glândulas mamárias abdominais nos diferentes grupos experimentais no DPN 22. 65

Figura 4 –Valores de expressão gênica dos genes Ahrr, Bcl-2, Bax e caspase 3 nos diferentes grupos experimentais. 66

Figura 5 –Número cumulativo e a semana de detecção de tumores mamários palpáveis nos diferentes grupos experimentais ao longo do estudo somados aos tumores identificados na necropsia. 67

Figura 6 - Incidência de tumores nos diferentes grupos experimentais ao longo das 18 semanas de estudo, somados aos tumores identificados na necropsia. 68

Figura 7 - Tipos histológicos de tumores mamários nos diferentes grupos experimenta 68

Figura 8 – Cumulativo dos tipos histológicos de tumores mamários nos diferentes gru 68

Figura 9 - Número de tumores mamários nas diferentes classes de peso nos quatro grupos experimentais ao final da 23ª semana do estudo. 70

Figura 10 - Padrão histológico representativo dos tumores mamários induzidos pela MNU 71

Lista de Tabelas- Capítulo II

Tabela 1- Dados de peso corpóreo, hormônios séricos e parâmetros de maturidade sexual de fêmeas das ninhadas de mães tratadas com TCDD e/ou Resveratrol. 61

Tabela 2- Dados de análise de montagem total das glândulas mamárias no DPN 22 de fêmeas das ninhadas de mães tratadas com TCDD e/ou RES. 63

Lista de abreviações

ABL - Brotos alveolar e lóbulos

AhR - Receptor aril-hidrocarboneto

CK - Citoqueratinas

DG - Dia gestacional

DMBA - 7,12-dimetilbenz(a)antraceno

DPN - Dia pós-natal

IHQ - Imunoistoquímica

MNU - N-metil-N-nitrosurea

PCB - Bifenilos policlorados

PCDD - dibenzo-p-dioxinas policloradas

PCDF - dibenzofuranos

RE - Receptor de estrógeno

RES - Resveratrol

SD - Sprague-Dawley

TCDD - 2,3,7,8 – tetraclorodibenzo-p-digoxina

TEB - Brotos terminais

TEM - Transição epitélio-mesenquimal

TEF – Fatores tóxicos de equivalência

TD - Ductos terminais

WF - Wistar-Furth

Lista de anexos

Anexo 1 – Protocolo de aprovação pelo Comitê de Ética em experimentação Animal (CEEA) da faculdade de Medicina de Botucatu

Anexo 2 – Delineamento experimental

Anexo 3 – Dados da extração de RNA das glândulas mamárias da prole de fêmeas do DPN 51 e eletroferograma representando RNAs

Anexo 4 – Genes avaliados, presentes no cartão microfluido TaqMan® Array e os processos com os quais eles estão relacionados

Sumário

Capítulo I - Revisão da literatura 15
1.O câncer de mama e saúde pública 16
2.Glândula mamária: morfogênese e carcinogênese 20
3.Eventos moleculares 24
4.Influencia dos contaminantes ambientais na regulação endócrina 27
5. O Resveratrol como fator protetor para câncer de mama 32
6.Referências 36
Objetivos 45

Capítulo 2 46
Artigo 47
Efeitos do resveratrol sobre o desenvolvimento e carcinogenênese da glândula mamária na prole de fêmeas da linhagem Wistar expostas a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) na gestação
Resumo 49
Abstract 50
1.Introdução 51
2. Material e Métodos 53
2.1. Animais e ambiente de experimentação 53
2.2. Delineamento experimental 53
2.3. Técnica de Montagem Total das Glândulas Mamárias no DPN 22 54
2.4. Analise Imunoistoquímica das Glândulas Mamárias no DPN 22 55
2.5. Dosagens bioquímicas de progesterona e estradiol no DPN 22 56
2.6. Extração, quantificação e análise da qualidade de RNA das glândulas mam 56
2.7. Síntese de cDNA 57
2.8. Expressão gênica por reação de RT-qPCR com o sistema Taqman Low density array (TLDA) 57
2.9. Carcinogênese Mamária 58
2.10. Análise estatística 59
3. Resultados 60
3.1. Dados gerais das mães e ninhadas 60
3.2. Análise da morfologia da glândula mamária no DPN 22 62
3.3. Índice de proliferação celular da expressão do receptor de estrógeno alfa (RE-α) na glândula mamária no DPN 22 63
3.4. Expressão gênica diferencial nas glândulas mamárias no DPN 22 66
3.5. Desenvolvimento de tumores mamários e análise histopatológica 67
4. Discussão 72
5. Conclusão 75
6. Agradecimentos 75
7. Referencias 76

Anexos 82

Capítulo I

Revisão da Literatura

1. O câncer de mama e saúde pública

O processo acelerado de industrialização, trazendo poluição ambiental, ocorrido principalmente no século passado (século XX) ocasionou em crescente inter-relação da economia das sociedades de vários países, desencadeando modificações nos padrões de vida no que concerne às condições de trabalho, alimentação e consumo de bens e produtos (Gaspar, 2015). Com a redução nas taxas de mortalidade e natalidade e aumento da expectativa de vida e envelhecimento populacional ocorreu significativamente alteração na demografia mundial (Waters, 2001). Tal processo de reorganização global foi determinante frente à modificação nos padrões de saúde/doença mundial. Esta modificação, definida como transição epidemiológica (Laurenti, 1990), foi caracterizada pela modificação no perfil de mortalidade com diminuição da taxa de doenças infecciosas e aumento concomitante da taxa de doenças crônico-degenerativas, especialmente as doenças cardiovasculares e o câncer (Guerra *et al.*, 2005).

A distribuição epidemiológica do câncer no Brasil espelha uma transição em andamento, envolvendo uma ampliação entre os tipos de cânceres normalmente associados ao status sócio-econômico tais como os de mama, próstata e cólon e reto e, simultaneamente, as taxas de incidência persistentemente elevadas de tumores geralmente associados com a pobreza tais como os de colo de útero, pênis, estômago e cavidade oral (Koifman e Koifman, 2003). Guerra *et al.*, 2005, sugere que essa distribuição seja resultante da exposição a um número elevado de distintos fatores ambientais relacionados, como agentes químicos, físicos e biológicos, e associados ao processo de industrialização, incluindo os relacionados às desigualdades sociais que pode levar ao déficit do auto-cuidado e pouca educação em saúde.

As doenças crônicas não transmissíveis, como doenças do aparelho circulatório, diabetes, câncer e doença respiratória crônica são as principais causas de óbitos mundiais,

gerando um elevado número de mortes precoces além da perda de qualidade de vida e gerando impactos econômicos na sociedade em geral (Malta *et al.*, 2011). Em 2008, das 57 milhões de mortes no mundo, 36 milhões (63%) foram decorrentes das doenças acima citadas (WHO, 2011).

O câncer é uma doença multifatorial, com características biológicas, clínicas e epidemiológicas, e, portanto, possuem fatores genéticos com possibilidades de prevenção e tratamento, que dependem do tipo e estágio de desenvolvimento da doença (Fonseca et al., 2010).

As neoplasias malignas apresentam-se como uma das principais causas de morbidade e mortalidade na população mundial vem assumindo um papel crescente entre as doenças que acometem a população feminina. No Brasil e no mundo, destaca-se o câncer de mama como causa de morte entre as mulheres adultas (Matos *et al.*, 2011).

O câncer de mama apresenta elevada incidência e mortalidade em todo o mundo, representando um importante problema de saúde pública. É o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres. Pode ser considerada a neoplasia mais temida pelas mulheres, devido à sua alta prevalência, impacto psicológico e comprometimento da percepção da sexualidade, feminilidade e da própria imagem pessoal (Pereira *et al.*, 2010).

Segundo estimativa do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2016), biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer sendo esperados aproximadamente 58 mil (28,1%) novos casos para câncer de mama com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres.

A Organização Mundial da Saúde (WHO), nas décadas de 60 e 70 registrou um aumento de 10 vezes nas taxas de incidência ajustadas por idade nos Registros de Câncer de Base Populacional de diversos continentes (INCA, 2006a). No Brasil, o câncer de

mama é a primeira causa de morte por câncer na população feminina, principalmente na faixa etária entre 40 e 69 anos (INCA, 2006b).

A Organização Mundial de Saúde estima que por ano, ocorram mais de 1.250.000 casos novos de câncer de mama em todo o mundo, o que o torna o câncer mais comum entre as mulheres (WHO, 2009). A elevação da incidência do câncer de mama no Brasil é um fato marcante no quadro de saúde pública de sua população, visto que observou um aumento relativo de 57% entre 1988 e 2000 (INCA, 2009). Esses dados continuam crescentes, uma vez que é observado o gráfico de mortalidade por câncer de mama dos últimos 34 anos expostos no DATASUS de 2016 (Brasil, 2015). (Figura 1).

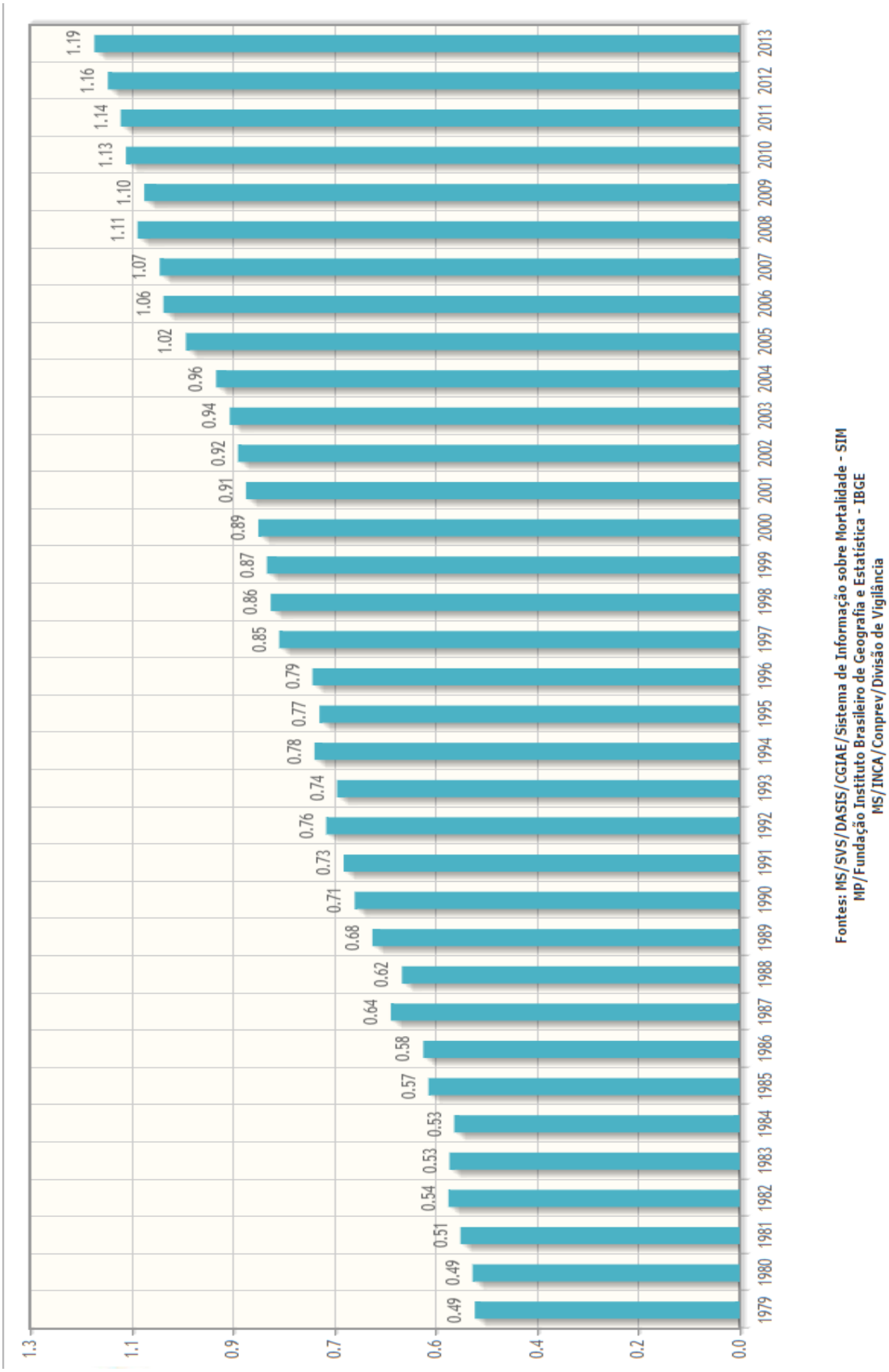

Figura 1- Mortalidade proporcional não ajustada por câncer de mama, homens e mulheres, Brasil, entre 1979 e 2013. (Brasil, 2015)

A idade é o principal fator de risco e, o número de casos aumenta de forma acelerada após os 50 anos. Sua ocorrência está relacionada ao processo de urbanização da sociedade, e nível socioeconômico (INCA, 2014) (Figura 2)

	Homens		Mulheres	
Faixa Etária	Número de Obito	Taxa Específica	Número de Obito	Taxa Específica
00 a 04	0	0	1	0,01
05 a 09	0	0	0	0
10 a 14	0	0	0	0
15 a 19	0	0	4	0,05
20 a 29	0	0	101	0,58
30 a 39	6	0,04	928	6,02
40 a 49	9	0,07	2.426	18,6
50 a 59	45	0,51	3.499	35,59
60 a 69	50	0,94	3.066	49,65
70 a 79	36	1,29	2.230	61,99
80 ou mais	35	3,05	1.949	106,66
Idade ignorada	0	0	2	0
Total	**181**	-	**14.206**	-
Taxa Bruta	-	**0,19**	-	**14,35**
Tx Padr. Mundial	-	**0,19**	-	**12,66**
Tx Padr. Brasil	-	**0,21**	-	**13,55**

Fontes: MS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade - SIM
MP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE
MS/INCA/Conprev/Divisão de Vigilância

Figura 2 - Taxas de mortalidade por câncer de mama, brutas e ajustadas por idade, pelas populações mundial e brasileira de 2010, por 100.000 homens e mulheres, Brasil, no ano de 2013. (Brasil, 2015)

2. Glândula mamária: morfogênese e Carcinogênese

A glândula mamária humana é composta de seis a dez sistemas de ductos principais. O epitélio escamoso queratinizado da pele submerge nos orifícios do mamilo e, abruptamente, modifica-se para uma dupla camada de epitélio cuboidal que reveste os ductos mamários. Nas mulheres adultas, os ductos terminais se ramificam em

conglomerados de pequenos ácinos, chamados de lóbulos. Os ductos terminais e os lóbulos mamários associados formam as unidades ducto-lobulares terminais. Dois tipos de células revestem os ductos e os lóbulos: as células mioepiteliais e as epiteliais luminais (Dimri *et al.,* 2005; Gobbi, 2012). As células mioepiteliais (contráteis) auxiliam na ejeção do leite durante a lactação e atuam como suporte estrutural aos lóbulos. As células epiteliais luminais revestem a luz dos alvéolos e ductos as células mioepiteliais ficam abaixo dessas e acima da lâmina basal. O estroma mamário é composto - dentre outras estruturas celulares - por fibroblastos e adipócitos (Dimri *et al.,* 2005; Gobbi, 2012). (Figura 3)

Nos ratos, a morfogênese das glândulas mamárias assemelha-se as humanas, uma vez que se inicia pelo espessamento ectodérmico das cristas mamárias que darão origem ao broto mamário primário (por volta do 12º ao 14º dia gestacional (DG). A partir do 16º DG até o nascimento, as células epiteliais do broto mamário 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 isomérico (proporcional ao crescimento corpóreo), mas se torna alomérico (i.e., duas a três vezes maiores que o crescimento corpóreo) durante o período pós-natal antes do início da puberdade, e exponencial durante a puberdade e gravidez (Imagawa *et al.* 1990, Knight e Sorensen 2001; Hovey *et al.* 2002). (Figuras 4)

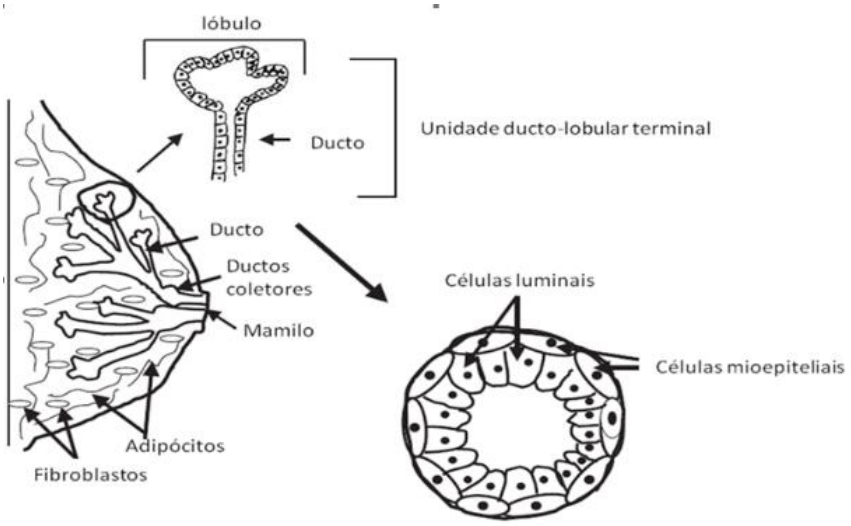

Figura 3 - Representação da estrutura da glândula mamária humana (Adaptado de Dimri *et al.*, 2005).

Figura 4 - Representação da estrutura da glândula mamária de roedor (Lima *et al.*, 2008).

Os períodos compreendidos entre o 16º-20º dia DG e a puberdade, nas ratas, são considerados cruciais para o desenvolvimento mamário e podem ser influenciados por vários fatores, inclusive ambientais (Brown *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 2001; Fenton *et al.*, 2002; Jenkins *et al.*, 2007; Lew *et al.*, 2009, 2011).

Durante o desenvolvimento da glândula mamária, brotos terminais (TEB) crescem ativamente em estruturas ductais terminais localizadas na borda crescente da glândula que se diferenciam em brotos alveolar e lóbulos (ABL) (Russo e Russo, 1994,1996). Alguns TEB também regridem a ductos terminais (TD), que permanecem até futura diferenciação durante a gravidez e lactação (Russo e Russo, 1994,1996).

Enquanto TEB são considerados locais primários de atividade cancerígena na glândula mamária, um dos mais importantes fatores que determinam a sensibilidade da glândula mamária aos estímulos neoplásicos é a sua fase de diferenciação durante a exposição ao agente carcinogênico (Russo e Russo, 1994,1996). A técnica de montagem total da glândula mamária de roedores tem sido utilizada há décadas como ferramenta para a detecção e avaliação de alterações no crescimento ductal/alveolar, padronização e morfogênese (Russo e Russo, 1994,1996; Rasmussen *et al.,* 2000). O processo de montagem total em roedores é particularmente utilizado na triagem e análise do desenvolvimento das glândulas mamárias, que não pode ser detectado ou analisado facilmente a nível histológico. Além disso, se a alteração morfológica se manifesta em apenas uma pequena região da glândula mamária, ou em uma pequena fração em determinado número de animais, a técnica de montagem total é essencial para detectar e analisar essas mudanças.

As neoplasias mamárias quimicamente induzidas são, em geral, carcinomas hormônios-dependentes. A incidência, multiplicidade e tipos de tumores mamários são influenciados por idade, tempo de exposição ao cancerígeno, história reprodutiva, desregulação endócrina, dieta e outros fatores que alteram o desenvolvimento e o grau de diferenciação das glândulas mamárias (Russo e Russo 1994, 1996). As substâncias químicas mais utilizadas nos modelos experimentais para indução da carcinogênese mamária em fêmeas de ratos e camundongos são a 7,12-dimetilbenz(a)antraceno

(DMBA) e a N-metil-N-nitrosoureia (MNU) e as linhagens de eleição são fêmeas da linhagem de ratos Sprague-Dawley e Wistar-Furth (Russo e Russo 1994; Costa et al. 2002). Estudos experimentais indicam que substâncias ambientais como xenoestrógenos e praguicidas e dioxinas podem promover neoplasias de mama induzidas quimicamente em roedores (Cooper *et al.*, 2007; Salehi *et al.*, 2008).

Caracterizado com doença multifatorial, o câncer de mama envolve mutações gênicas especificas (5%) de todos os casos documentados de câncer de mama e 50% podem ser atribuídos a fatores de risco que incluem idade, estilo de vida, história reprodutiva, estrógenos endógenos ou xenoestrógenos, dietas, exposição ambiental, idade da menarca ou menopausa (Bouchardy *et al.*, 2008; Al-Dhaheri *et al.* 2008.; Cuzick, 2010; Riesop *et al.*, 2015).

As neoplasias da glândula mamária podem ser divididas em invasivas ou não-invasivas (ou *in situ*). Os carcinomas *in situ* são constituídos por células neoplásicas limitadas aos ductos ou lóbulos mamários, não ultrapassando a membrana basal. Por outro lado, os carcinomas invasivos ultrapassam a membrana basal, invadindo o estroma adjacente e com capacidade de disseminação à distância por vias hematogênica e/ou linfática (Paiva, 2011). Aproximadamente, 80% das neoplasias de mama são de origem ductal e 10% lobular (Gobbi, 2012).

3. Eventos moleculares

Os eventos moleculares associados ao processo de carcinogênese mamária, incluindo a iniciação, promoção e progressão, não estão bem estabelecidos e muitas alterações genéticas têm sido descritas (Schultz e Weber 1999; Domchek e Weber 2002). Essas alterações compreendem mutações, amplificações e deleções gênicas, envolvendo

oncogênese e genes supressores tumorais, entre eles, os genes receptores de estrógenos e erb-B2 (HER2/neu).

Através de critérios imunoistoquímicos/moleculares, as neoplasias de mama se enquadram em cinco grandes grupos distintos: Luminal A, Luminal B, HER2, *basal-like* e *normal-like*. O nome "luminal" deriva da similaridade de expressão entre estes tumores e o epitélio luminal da mama normal, que frequentemente expressa as citoqueratinas (CKs) 8 e CK18. O subtipo luminal pode ser subdivido em pelo menos duas classes: luminal A e luminal B. Os tumores luminais A (aproximadamente 40% deste tipo tumoral) são aqueles com elevada expressão dos receptores hormonais, menor expressão de genes relacionados com proliferação celular e melhor prognóstico (Sotiriou *et al.*, 2003; Voduc *et al.*, 2010). O subtipo luminal B apresenta menor expressão dos genes relacionados ao receptor de estrógeno (RE), expressão variada do gene *HER-2* e expressão de genes relacionados ao *cluster* de fatores proliferativos. Assim, o subtipo luminal B tem se mostrado mais agressivos e com prognóstico pior que os luminais A (Voduc *et al.*, 2010).

Dentre os tumores não-luminais, foram identificados três subtipos com expressões gênicas distintas: subtipos *basal-like*, ERBB2+ *e normal-like.* Os tumores *basal-like* se caracterizam pela ausência de expressão dos receptores hormonais e do HER-2 e também pela expressão de marcadores típicos das células mioepiteliais (CK basais - CK5, CK14 e CK17, P-caderina, p63 e laminina) (De Brot *et al.*, 2009). O diagnóstico de um tumor basal-*like* (triplo negativo) indica um o pior prognóstico em relação ao subtipos referidos anteriormente. Em especial, os tumores *basal-like* são muitas vezes resistentes à quimioterapia e são capazes de produzir metástases no pulmão e cérebro (Solomayer *et al.*, 2000; Voduc *et al.*, 2010). O subtipo ERBB2+ se caracteriza pela expressão de genes localizados na região 17q22.24, que inclui o *HER-2* e o *GRB7*. Os tumores do subtipo

ERBB2+ apresentam características agressivas e prognóstico ruim. Atualmente, com o uso rotineiro do trastuzumabe – que inibe o receptor de trasmembrana HER-2 – estes tumores apresentam melhor prognótico por ser menos agressivo. Os tumores classificados como subtipo *normal-like* apresentam elevada expressão de genes de tecido adiposo e de outros tipos celulares não epiteliais expressos na mama normal. (Solomayer *et al.*, 2000; Voduc *et al.*, 2010).

Um subtipo diferente de neoplasia mamária foi identificado em 2010 denominado *Claudin-low*. Estes tumores são caracterizados por expressão diminuída ou ausente de genes de adesão celular (por exemplo, Claudinas 3, 4, 7 e E-caderina) e marcadores de superfície celular de células luminais diferenciadas (EpCAM e MUC1). Os tumores *Claudin-low* têm características de células-tronco mamárias ($CD44^{+}/CD24^{-/low}$ e $ALDH1A1^{+}$), além da expressão aumentada de marcadores característicos da transição epitélio-mesenquimal (TEM) (Prat *et al.*, 2010), refere que o uso exógeno dos fatores de crescimento tais como TGF-β (fator de crescimento e transformação beta) e TNF-α (fator de necrose tumoral alfa) foi capaz de induzir a TEM em células de câncer mamário luminal, gerando tumores com características de células-tronco de câncer de mama ($CD44^{+}/CD24^{-/low}$), com fenótipo *claudin-low* e resistentes ao tratamento com quimioterapia citotóxica, sugere-se a agressividade devido a indiferenciação celular (Asiedu *et al.*, 2011).

Desde a última década, tem sido adotada uma classificação fenotípica baseada em achados de imunohistoquímica (IHQ) e que se correlaciona com achados de expressão gênica por *microarray*. Alguns autores sugerem o uso de 5 marcadores: receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), HER-2, CK5/6 e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Desta forma, os tumores do subtipo luminal se caracterizam por RE e/ou RP positivos, os tumores ERBB2+ se caracterizam por HER-2

positivo e os tumores basal-símilecom triplo negatividade para RE, RP e HER-2 e expressão aumentada da CK5/6 e/ou EGFR (Nielsen *et al.*, 2004, Paiva, 2011). De forma simplificada, o Goldhirsch e colaboradores (2011) sugerem a seguinte classificação baseada em achados de IHQ:Luminal A: RE+ e/ou RP+ e HER-2-; Luminal B (HER-2+): RE+ e/ou RP+ com HER-2 superexpresso ou amplificado; Luminal B (HER-2-): RE+ e/ou RP+, HER-2- e Ki-67 elevado; Basal-símile: RE-, RP-, HER-2- com diferenciação ductal; ERBB2+: HER-2 superexpresso ou amplificado, com RE- e RP (positivo ou negativo).

4. Influência dos contaminantes ambientais na regulação endócrina

Evidências em humanos e em modelos experimentais murinos sugerem que a exposição *in útero* a xenostrógenos ambientais aumentam o risco de câncer de mama na vida adulta (Birnbaum e Fenton 2003; Hilakivi-Clarke *et al.* 2013). Os xenoestrógenos são compostos ambientais que podem mimetizar *in vitro* e *in vivo*, o hormônio estrógeno 17β estradiol (E2). Esses compostos constituem parte de um amplo grupo de agentes químicos denominados de desreguladores endócrinos devido a sua ação perturbadora do processo de homeostase hormonal e de fatores teciduais específicos (Birnbaum e Fenton 2003; Singleton *et al.* 2006).

Os efeitos que os compostos estrogênicos exercem na susceptibilidade ao câncer dependem da idade e do tempo de exposição. A exposição pré-natal ao dietiestilbestrol tem sido associada com o aumento do risco de câncer de mama, enquanto que a exposição neonatal reduziu a incidência de tumores mamários espontâneos (Lamartiniere e Holland 1992; Jenkins *et al.*, 2012). Estudos epidemiológicos e experimentais têm relatado que alterações no estado nutricional no desenvolvimento fetal podem aumentar a susceptibilidade para o aparecimento de doenças na vida adulta. Baseado na ênfase que

as doenças na idade adulta têm sua origem durante o desenvolvimento fetal e em combinação com dados epidemiológicos tem-se cogitado a hipótese de que a exposição pré-natal a fatores dietéticos (como ingesta excessiva de gorduras, embutidos e alimentos industrializados) e químicos sintéticos *"estrogen-like"* os xenoestrógenos podem iniciar o processo de carcinogênese mamária na vida adulta, sugere-se como consequência do padrão de metilação de DNA (Godfrey e Barker 2001; Zadik 2003; Hilakivi-Clarke *et al.* 2013).

Estudos experimentais indicam que substâncias ambientais como xenoestrógenos e praguicidas e dioxinas incluindo a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) podem promover neoplasias de mama induzidas quimicamente em roedores (Brown *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 2001; Fenton *et al.*, 2002; Vorderstrasse *et al.*, 2004; Cooper *et al.*, 2007; Jenkins *et al.*, 2007; Salehi *et al.*, 2008; Lew *et al.*, 2009, 2011).

As Dioxinas são contaminantes unicamente produzidos por processos industriais, compreendendo a incineração, branqueamento de papel e celulose, e fabricação de alguns pesticidas, herbicidas e fungicidas (Gilpin *et al.*, 2003).

Dioxinas e compostos semelhantes como o dibenzo-ρ-dioxinas policloradas (PCDDs), dibenzofuranos (PCDFs), bifenilos policlorados (PCBs) formam um abrangente grupo de substâncias que são estruturalmente relacionadas e biologicamente persistentes, as quais induzem um grande espectro de respostas e possuem um mecanismo de ação em comum (Van den Berg *et al.*, 1998, Czuczwa *et al.*, 1984; Schecter *et al.*, 1988; Ferrario e Byrne, 2000).

Sua estrutura química consiste em dois anéis de benzeno conectados por dois átomos de oxigênio e contém de quatro a oito cloros. As dioxinas tóxicas e os PCDFs possuem cloros nas posições 2, 3, 7 e 8. PCDDs, PCDFs, e alguns PCBs foram conferidos a dioxinas com fatores tóxicos de equivalência (TEFs) baseados na sua potência relativa

em relação à dioxina mais tóxica, o 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-ρ-dioxina (TCDD), a qual é atribuída um TEF de 1 (Van den Berg *et al.*, 1998) (Figura 5).

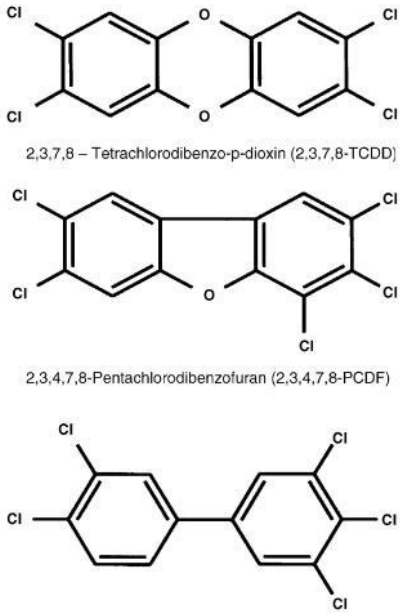

Figura 5 - Estrutura química das dioxinas (Van den Berg *et al.*, 1998).

Além de serem resistentes à deterioração biológica e ambiental, as dioxinas são compostos lipofílicos. Um total de 75 congêneres de dioxinas e 135 congêneres de furano compõem a complexa mistura de dioxinas, dos quais 7 e 10 congêneres são, respectivamente, capazes de se ligar e ativar o receptor citosólico aril-hidrocarboneto (AhR) (Van den Berg et al. 2006). Dos 209 congêneres de bifenilos policlorados (PCB), doze têm o potencial de ativar o AhR (Van den Berg et al. 2006).

A meia-vida das dioxinas é dose-dependente, sendo a eliminação mais rápida em elevadas concentrações, contudo, varia com a composição corporal, em que grande quantidade de gordura corporal leva ao aumento da persistência no organismo por ser lipofílico (Emond *et al.*, 2005; Aylward *et al.*, 2005).

As dioxinas exercem seus efeitos através da ligação de alta afinidade com o AhR. Esse receptor, pertencente à família de proteínas PAS dependente de ligante envolvido na

regulação da expressão de um grande número de genes. Membros da família PAS são conhecidos por serem “sensores biológicos”, onde a ligação do AhR com substâncias tóxicas a ele, induz ou reprime a transcrição de vários genes e resultam em uma cascata de respostas tóxicas (Carlson *et al.,* 2002). A ativação do AhR também interage com proteínas de controle do ciclo celular como quinases celulares específicas, e outras proteínas envolvidas na apoptose (Puga *et al.,* 2005).

Estudos com células de camundongos transgênicos com AhR ativos ou camundongos nos quais atividade do AhR foram bloqueadas, sugerem que o AhR é uma proteína-chave na regulação do desenvolvimento e da homeostase (Andersson *et al.,* 2002, 2003).

Existe uma relação entre AhR e o TCDD, estudos em animais mostram que o TCDD é considerado o contaminante ambiental com maior toxicidade e, dessa forma, também apresenta efeitos consideráveis para a saúde humana (Denison *et al.,* 2003; Schecter *et al.,* 2006). O TCDD não se comporta como um carcinógeno completo, pois ele altera a sinalização celular envolvendo mudanças pronunciadas no padrão de fosforilação, regulando o crescimento e apoptose. Assim, o TCDD se liga ao fator de transcrição AhR, o qual está ligado no citoplasma através de duas proteínas *“Heat Shock”* (HSP) de 90kDa e uma proteína de interação (XAP2). O complexo ligante-AhR é transportado para o núcleo, onde o complexo se dissocia e o AhR se dimeriza com o translocador nuclear de AhR (ARNT) junto com um co-regulador para amplificar a transcrição gênica de elementos de resposta a dioxina (DRE) (Carlson *et al.,* 2002; Gasiewicz *et al.,* 2003; Mimura *et al.,* 2003) (Figura 6).

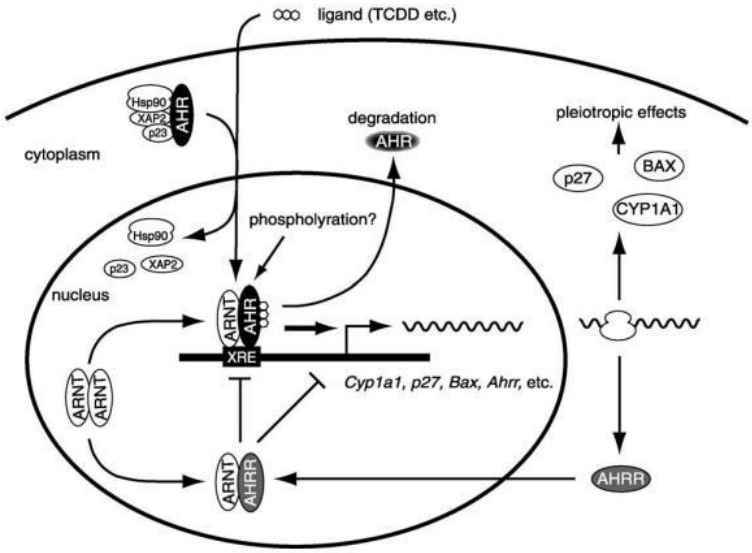

Figura 6 - Via de sinalização do AhR quando exposta ao TCDD (Mimura *et al.*, 2003).

O TCDD é um agonista do AhR, considerado suspeito de ser responsável por numerosas doenças em humanos, como cânceres, imunossupressão, aterosclerose, osteoporose, doenças dermatológicas e falhas no sistema reprodutor (Mimura *et al.*, 2003).

Diversos mecanismos são propostos para elucidar a toxicidade do TCDD e seus congêneres (Safe *et al.*, 1990). O maior efeito bioquímico do TCDD mostrou ser a indução do citocromo P-450, associados com monooxigenases e proteínas relacionadas (Poland e Kimbrough, 1984). Estudos mostram que, o AhR mediou os sistemas da xantina oxidase e da xantina desidrogenase, relacionando-se com estresse oxidativo em ratos tratados com TCDD (Sugihara *et al.*, 2001). Estudos anteriores mostraram que a administração aguda de doses únicas de TCDD em animais experimentais induziu a produção de espécies reativas de oxigênio (Bagchi *et al.*, 1993; Alsharif *et al.*, 1994), peroxidação lipídica (Stohs *et al.*, 1990) e danos ao DNA (Wahba *et al.*, 1988).

A administração de TCDD durante o período de gestação acarreta em alterações no desenvolvimento da glândula mamária (ramificação ductal, alveologênese e lactogênese) das mães e no desenvolvimento e susceptibilidade a carcinogênese mamária

induzida quimicamente na prole de fêmeas em ratos e camundongos (Brown *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 2001; Fenton *et al.*, 2004; Vorderstrasse *et al.*, 2004; Lew *et al.*, 2011). O período tardio de desenvolvimento mamário (DPN 15) na gravidez parece ser o de maior susceptibilidade aos efeitos deletérios da administração do TCDD em ambas mães e prole de fêmeas, acarretando para a prole um menor aporte nutricional responsável pelo baixo peso corpóreo ao nascer e ganho de peso corpóreo durante a fase de lactação (Fenton *et al.*, 2004; Vorderstrasse *et al.*, 2004; Lew *et al.*, 2011).

5. O Resveratrol como fator protetor para câncer de mama

Os mecanismos pelos quais os fatores dietéticos conferem proteção contra câncer de mama são ainda considerados complexos. Segundo o Guia alimentar para a população brasileira (Brasil, 2014) o menor risco de câncer de mama está associado com o consumo maior de verduras e legumes por conter nutrientes, como vitaminas, fibras e outros compostos, que auxiliam as defesas naturais do corpo podendo destruir, bloquear ou reverter a ação dos agentes carcinogênicos (INCA, 2016). Os alimentos que contém estas propriedades são chamados alimentos funcionais, nutracêuticos ou alimentos planejados (Padilha e Pinheiro, 2004).

Na última década, tem-se correlacionado o consumo de frutas e legumes a atividades antioxidantes e consequentemente com propriedade anticancerígena ou quimioprotetora, por serem ricos em substâncias antioxidantes. Como a uva (*Vitis vinifera* L.), que se tornou um forte aliado na prevenção de certos tipos de cânceres, devido sua atividade antioxidante, apresenta em sua composição polifenóis, dentre eles o trans-resveratrol (trans-3.4’,5-trihidroxiestilbeno) que é o isômero mais ativo, relacionado à prevenção do câncer e sua principal fonte é o vinho vermelho (Schleier, 2004, Duzionni *et al.*, 2010).

O resveratrol (3,5,4-trihidroxiestilbeno) é um polifenol natural que pode ser encontrado em pelo menos 72 espécies diferentes de plantas (distribuídos em 32 gêneros e 12 famílias), incluindo aquelas que são frequentemente consumidas por seres humanos, tais como amendoins, *cranberries*, mirtilos, e sobretudo nas uvas e no vinho tinto (Dercks *et al.*, 1989; Stervbo *et al.*, 2007). Sua quantidade é relativamente mais alta na uva, onde a concentração na casca atinge de 50 a 100µg por grama de uva fresca, e a concentração no vinho tinto chega a 1,5 a 3mg/litro (Jeandet *et al.*, 2012). Sua síntese é regulada pela presença de fatores estressores, como dano mecânico, contaminação por fungos e radiação ultra-violeta (360nm). Nas plantas ele atua como fitoalexinas, mostrando uma capacidade de inibir o desenvolvimento de certas infecções por fungos (Jeandet *et al.*, 2012).

A estrutura química do revesratrol consiste na união de dois anéis fenólicos unidos por uma ligação dupla de estireno, formando o 3,5,4'-trihidroxiestilbeno. Essa ligação dupla é a responsável pelas formas isoméricas *cis* e *trans* do Resveratrol, sendo o isômero trans o mais abundante e considerado a forma mais ativa biologicamente (Aggarwal *et al.*, 2004) (Figura 7). Teixeira e colaboradores (2014) deram atenção ao fato de que o Resveratrol também é um constituinte da medicina popular que foi reconhecida eficiente frente às actividades biológicas, tais como antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatórios, anticancerígenos e atividades de proteção cardiovascular, em apoio da utilização de compostos fenólicos na indústria farmacêutica, de alimentos e indústrias de cosméticos

Suas propriedades estão sendo estudadas *in vitro*, valendo destacar propriedades anticancerígena, antiagregação de plaquetas, anti-inflamatória e antialérgica (Gambini *et al.*, 2013). Além disso, destaca-se sua potente atividade antioxidante, estrogênica e com

atividade antagonista ao AhR (Casper *et al.,* 1999), visto que a estrutura química do resveratrol é semelhante ao TCDD, um agonista desse receptor (Figura 7).

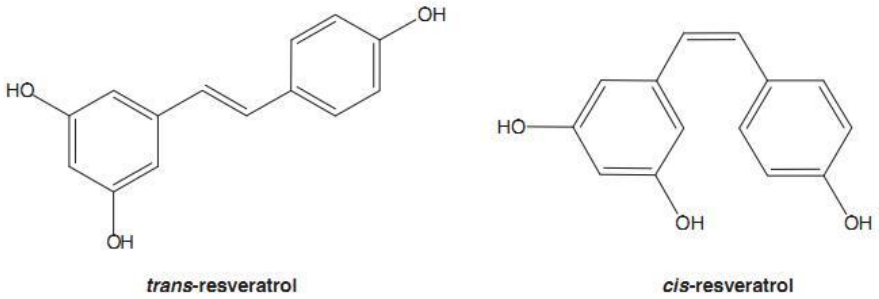

Figura 7: Estruturas *cis* e *trans* do Resveratrol (Gambini *et al.,* 2013).

Estudos com resveratrol em modelos experimentais de câncer (como hepático, de mama e de próstata) tem mostrado efeitos benéficos suprimindo as fases de iniciação, promoção e progressão de tumores e ativação da via apoptótica e modulação de expressão gênica (Gollucke *et al.,* 2013; Aluyen *et al.,* 2012; Whitlock e Baek, 2012; Aggarwal *et al.,* 2000).

O resveratrol tem demonstrado efeitos antitumorais em vários modelos de carcinogênese química em roedores, incluindo os modelos de mama (Carter *et al.,* 2014). Bhat e colaboradores (2001) demonstraram que a administração intragástrica (i.g.) de resveratrol (100 mg/kg/p.c.) antes e após a iniciação da carcinogênese mamária pela administração da *N*-metil *N*-nitrosoureia (MNU), aumentou a latência e reduziu a multiplicidade de tumores mamários em fêmeas da linhagem Sprague-Dawley (SD).No estudo de Banerjee e colaboradores (2002), a suplementação com resveratrol na dieta (0,001%), antes e após a iniciação da carcinogênese mamária pela administração da 7,12-dimetilbenz(a) antraceno (DMBA), resultou no aumento da latência e redução na multiplicidade de tumores mamários em fêmeas SD.

Diante desse cenário, o presente estudo se justifica no sentido de ampliar os conhecimentos sobre os efeitos benéficos do RES em um modelo de exposição gestacional ao TCDD, tendo em vista que ambos competem pelo mesmo receptor (AhR) e teriam efeitos antagônicos, o que teoricamente poderia diminuir os efeitos nocivos do TCDD para a diferenciação e desenvolvimento da glândula mamária. Assim, avaliamos o potencial preventivo do RES sobre o desenvolvimento da glândula mamária da prole de fêmeas expostas ao TCDD durante a fase inicial da morfogênese mamária e a susceptibilidade a carcinogênese mamária induzida pela N-metil-N-nitrosourea (MNU).

6- Referências

AGGARWAL, B. B.; TAKADA, Y.; OOMMEN, O.V. From chemoprevention to chemotherapy: common targets and common goals. **Expert Opin Investig. Drugs**. 2004;13:1327–38.

AL-DHAHERI, W. S.; HASSOUNA, I.; AL-SALAM, S.; KARAM, S. M. (2008). Characterization of breast cancer progression in the rat. **Ann N Y Acad Sci** 1138, 121-31.

ALSHARIF, N. Z.; SCHLUETER, W. J.; STOHS, S. J**.** Stimulation of NADPH-dependent reactive oxygen species formation and DNA damage by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat peritoneal lavage cells. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 1994;26:392–397.

ALUYEN, J. K.; TON, Q. N.; TRAN, T.; YANG, A. E.; GOTTLIEB, H. B.; BELLANGER, R. A. Resveratrol: potential as anticancer agent**. J Diet Suppl**, 2012;9:45-56.

ANDERSSON, P.; MCGUIRE, J. *et al*. A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci**. USA. 2002;99:9990-9995.

ANDERSSON, P.; RIDDERSTAD, A. *et al*. A constitutively active aryl hydrocarbon receptor causes loss of peritoneal B1 cells. **Biochm. Biophys. Res. Commun**. 2003;302:336-341.

ASIEDU, M. K.; INGLE, J. N.; BEHRENS, M. D.; RADISKY D. C.; KNUTSON K. L. TGF□/TNF□-mediated epithelial–mesenchymal transition generates breast cancer stem cells with a claudinlow phenotype. **Cancer Res**. 2011;71(13):4707-19.

AYLWARD, LL.; BRUNET, RC. *et al*. Concentration-dependent TCDD elimination kinects in humans: toxicokinect modeling for moderately to highly exposed adults from Seveso, Italy, and Vienna, Austria, and impact on dose estimates for the NIOSH cohort. **J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol**. 2005;15:51-65.

BAGCHI, M.; STOHS, S.J. In vitro induction of reactive oxygen species by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, endrin and lindane in rat peritoneal macrophages and hepatic mitochondria and microsomes. **Free Rad. Biol. Med**. 1993;14:11–18.

BANERJEE, S.; BUESO-RAMOS, C.; AGGARWAL, B.B. Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9**.Cancer Research**. 2002;62:4945–4954.

BHAT, K.P.L.; KOSMEDER II, J.W.; PEZZUTO, J.M. **Biologial Effects of Resveratrol. Antioxidants & Redox Signaling**. 2001;3(6):1041-64.

BIRNBAUM, L.S.; FENTON, S.E. Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. **Environmental Health Perspectives**. 2003;111:389-94.

BOUCHARDY, C.; FIORETTA, G.; RAPITI, E; VERKOOIJEN, HM.; RAPIN, C.H.; SCHMIDLIN, F.; MIRALBELL, R.; ZANETTI, R. Recent trends in prostate cancer mortality show a continuous decrease in several countries**. Int J Cancer**. 2008;123:421-9.

BOYD, N. (1999). Câncer de mama (Ivo Carelli Filho, Trad.). Em UICC - União Internacional Contra o Câncer, **Manual de oncologia clínica** (pp. 360- 81). São Paulo: Springer-Velag; Fundação Oncocentro de São Paulo.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-2013**. INCA, 2015. Disponível em: https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/(acesso em 03 de janeiro de 2016).

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. **Guia alimentar para a população brasileira** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 156 p. : il.

BROWN, N.M.; MANZOLILLO, P.A.; ZHANG, J.X.; WANG, J.; LAMARTINIERE, C.A. Prenatal TCDD and predisposition to mammary cancer in the rat. **Carcinogenesis**. 1998;19(9):1623–1629.

CARLSON, D.B.; PERDEW, G.H. A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling? Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins**. J. Biochem. Mol. Toxicol.** 2002;16:317–325.

CARTER, L. G.; D'ORAZIO, J. A.; PEARSON, K. J. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. **Endocrine-related câncer**. 2014;21(3):R209-R225.

CASPER, R.F.; QUESNE, M.; ROGERS, I.; SHIROTA, T.; JOLIVET,A.; Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. **Mol. Pharmacol**. 1999 ;56:784-790.

COOPER, R.L.; LAWS, S.C.; DAS, P.C.; NAROTSKY, M.G.; GOLDMAN, J.M.; LEE Tyrey, E.; STOKER, T.E.; Atrazine and reproductive function: mode and mechanism of action studies.**Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**. 2007;80:98-112.

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.**Arch Pathol Lab Med**. 2002;126:915-27.

CUZICK, J.; Breast cancer prevention in the developing world. **Breast Cancer Res**. 2010;20:12.

CZUCZWA, J. M.; MCVEETY B. D. *et al*. Polychlorinated dibenzo-ρ-dioxins and dibenzofurans in sediments from Siskiwit Lake, Isle Royale. **Science**. 1984;226: 568-569.

DE BROT, M.; SOARES, F. A.; STIEPCICH, M. M. Á.; CÚRCIO, V. S.; GOBBI, H. Carcinomas mamários de tipo basal: perfil clínico-patológico e evolutivo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** 2009;55(5): 529-534.

DENISON, M. S; NAGY, S. R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. **Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.** 2003;43:309-334.

DERCKs W.; CREASY, LL. **Physiol. Mol. Plant Pathol**. 1989, 34: 203-13.

DIMRI, G; BAND, H.; Band V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. **Breast Cancer Res**. 2005;7(4):171-9.

DOMCHEK, S. M.; WEBER, B. L. Recent advances in breast cancer biology. **Current opinion in oncology** 14, 589-93. . (2002).

EMOND, C.; MICHALEK, JE.; BIRNBAUM, LS.; DE VITO, MJ. Comparison of the use of a physiologically based pharmacokinect model and a classical pharmacokinect model for dioxin exposure assessments. **Environ. Health Perspect**. 2005 ;113 (12):1666-1674.

FENTON, SE.; HAMM, JT.; BIRNBAUM, LS.; YOUNGBLOOD, GL. Persistent abnormalities in the rat mammary gland following gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). **Toxicol. Sci.** 2002;67:63–74.

FERRARIO, J.; BYRNE, C. 2,3,7,8-Dibenzo-ρ-dioxins in mined clay products from United States: evidence for possible natural origin. **Environ. Sci. Technol**. 2000; 34:4524-32.

FONSECA, LAM.; ELUF-NETO J.; WUNSCH FILHO,V. Tendências da mortalidade por câncer nas capitais dos estados do Brasil, 1980-2004. **Rev Assoc Med Bras.,** 2010;56(3):309-12. http://www.scielo.br/pdf/ramb/v56n3/v56n3a15.pdf (Acesso em 06 de junho de 2011).

GAMBINI, J.; LÓPEZ-GRUESO, R.; OLASO-GONZÁLEZ, O.; INGLÉS M.; ABDELAZID, K.; EL ALAMI, M.; BONET-COSTA, V.; BORRÁS, C.; VIÑA, J., Resveratrol: Distribution, properties and perspectives. **Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.**in press. 2013.

GASIEWICZ, T.A.; PARK, S-K. Ah receptor: involvement in toxic responses. In: Schecter A and Gasiewicz TA, (eds) Dioxins and Health**. John Wiley and Sons, Inc**., 491–532. 2003.

GASPAR, R.C. The trajectory of the world's economy: from recovery in the post-war period to contemporary challenges. **Cadernos Metrópole**. 2015;17(33):265-296.

GILPIN, R.K.; WAGEL, D.J. *et al*, Production, distribution, and fate of polychlorinated dibenzo-ρ-dioxins, dibenzofurans, and related organohalogens in the environment. In: SCHEETER, A.; GASIEWICZ, TA. (Eds), **Dioxins and Health**. Wiley, Hoboken, NJ, pp. 89-136, 2003.

GOBBI, H. Classification of tumours of the breast: an update based on the new 2012 World Health Organization Classification. **Bras Patol Med Lab**. 2012;48(6):463-74.

GODFREY, K.M; BARKER, D.J. Fetal programming and adult health. **Public Health Nutr**. 2001;4:611-24.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W.C.; COATES, A.S.; GELBER, R.D.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H.J. *et al*. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of Oncology,** Jun 27, 2011.

GOLLUCKE, A.P.; AGUIAR, O.; BARBISAN, L.F.; RIBEIRO, D.A. Use of grape polyphenols against carcinogenesis: putative molecular mechanisms of action using in vitro and in vivo test systems. **J. med. food**. 2013;16:199-205.

GUERRA, M.R.; GALLO, C.V.M.; MENDONÇA, G.A.S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev Bras Cancerol**. 2005; 51(3): 227-34.

HILAKIVI-CLARKE, L.; ASSIS S. de; WARRI, A. Exposures to synthetic estrogens at different times during the life, and their effect on breast cancer risk. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2013;18:25-42.

HOVEY, R.C.; TROTT, J.F.; VONDERHAAR, B.K. Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. **J Mammary Gland Biol. Neoplasia** 2002;7:17-38.

IMAGAWA, W.; BANDYOPADHYAY, G.K.; NANDI, S. Regulation of mammary epithelial cell growth in mice and rats. **Endocr. Rev**. 1990;11:494–523.

INCA - Instituto Nacional de Câncer (2006a). **Incidência de câncer no Brasil**: estimativa 2006. http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/(Acesso em 06 de junho de 2011).

INCA - Instituto Nacional de Câncer (2006b). **Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama "Viva Mulher". http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=140(Acesso em 06 de junho de 2012).**

INCA - Instituto Nacional de Câncer (2014). **INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014**. http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site+/home+/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014/(Acesso em 06 de junho de 2015).

INCA - Instituto Nacional de Câncer (2016). **Incidência de câncer no Brasil**: estimativa 2016.

http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/(Acesso em 06 de abril de 2016).

INCA. **Controle do Câncer de Mama**: Documento de Consenso. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer; 2004.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER; Ministério da Saúde. **Estimativa 2010** - Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2009. Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/base.asp (Acesso em 06 de junho de 2011).

JEANDET, P.; DELAUNOIS, B.; AZIZ, A.; DONNEZ, D.; VASSEROT, Y.; CORDELIER, S.; COUROT, E. Metabolic engineering of yeast and plants for the production of the biologically active hydroxystilbene, resveratrol.**J Biomed Biotechnol, in press**. 2012

JENKINS, S.; BETANCOURT, AM.; WANG, J.; LAMARTINIERE, CA. Endocrine-active chemicals in mammary cancer causation and prevention.**J Steroid Biochem Mol Biol**. 2012;129:191-200.

JENKINS, S.; ROWELL, C.; WANG, J.; LAMARTINIERE, CA. Prenatal TCDD exposure predisposes for mammary cancer in rats. **Reprod. Toxicol**. 2007;23:391–396.

KNIGHT, C. H.; SORENSEN, A. Windows in early mammary development: Critical or not? **Reproduction.** 2001;122:337–345.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. **Mutat Res**. 2003 Nov;544(2-3):305-11.

LAMARTINIERE, C.A.; HOLLAND, M.B. Neonatal diethylstilbestrol prevents spontaneously developing mammary tumors. In **Proceedings of the First International Symposium on Hormonal Carcinogenesis**, pp 305–308. Eds JJ Li, S Nandi and SA Li. New York: Springer-Verlag1992.

LAURENTI, R. Transição demográfica e transição epidemiológica. **Anais do 1º Congresso Brasileiro de Epidemiologia**; 1990 set 2-6; Campinas, Brasil. Rio de Janeiro: Abrasco; 1990:143-65.

LEW, B.J.; COLLINS, L.L.; O'REILLY, M.A.; LAWRENCE, B.P. Activation of the aryl hydrocarbon receptor during different critical windows in pregnancy alters mammary epithelial cell proliferation and differentiation. **Toxicol Sci** 2009;111(1):151–162

LEW, B.J.; MANICKAM, R.; LAWRENCE, B.P. Activation of the aryl hydrocarbon receptor during pregnancy in the mouse alters mammary development through direct effects on stromal and epithelial tissues. **Biol Reprod**. 2011; 84:1094-102.

LEWIS, B. C.; HUDGINS, S.; LEWIS, A.; SCHORR, K.; SOMMER, R.; PETERSON, R. E.; FLAWS JA.; FURTH, PA. In utero and lactational treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin impairs mammary gland differentiation but does not block the response to exogenous estrogen in the postpubertal female rat. **Toxicol. Sci.** 2001;62; 46–53.

LIMA, M. C. et al. Glândula mamária do mocó (Kerodon rupestris - Wied Neuwied, 1820): aspectos morfológicos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Brasil, dec. 2008; 45:88-93. ISSN 1678-4456. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26734>. Acesso em: 02 june 2016. doi:http://dx.doi.org/10.11606/S1413-95962008000700012.

LUANDA, J.D.; VISBAL, A.P.; LEWIS, M.T. Methods for preparing fluorescent and neutral red-stained whole mounts of mouse mammary glands.**J Mammary Gland Biol Neoplasia.** 2009;14:411-15.

MALTA, D.C.; MORAIS NETO, O.L.D.; SILVA JUNIOR, J.B.D. Apresentação do plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2011 a 2022. **Epidemiologia e Serviços de Saúd**e. 2011;20(4):425-438. http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?pid=S1679-49742011000400002&script=sci_arttext&tlng=en(Acesso em 06 de abril de 2016).

MATOS, J.C.D.; PELLOSO, S.M.; CARVALHO, M.D.D.B. Fatores associados à realização da prevenção secundária do câncer de mama no Município de Maringá, Paraná, Brasil. **Cad. saúde pública.** 2011;27(5):888-898. http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2011000500007&lng=pt (Acesso em 06 de abril de 2016).

MIMURA, J.; FUJII-KURIYAMA, Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD exposure. **Biochim. Biophys. Acta**. 2003;1619:263-268.

NIELSEN, T.O.; HSU, F.D.; JENSEN, K.; CHEANG, M.; KARACA, G.; HU, Z.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; LIVASY, C.; COWAN, D.; DRESSLER, L.; AKSLEN, LA.; RAGAZ, J.; GOWN, AM.; GILKS, CB.; VAN DE RIJN, M.; PEROU, C.M. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res**. 2004;10:5367–5374. [PubMed]

PADILHA P. C. C.; PINHEIRO R.L. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 2004;50(3):251-260.

PAIVA, C. E. TESE DE DOUTORADO: **Avaliação dos marcadores TGF-β1 e TGF-βRII em carcinomas mamários localmente avançados e sua associação com fatores clínico-patológicos.** 2011. Tese (Doutorado em Patologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

PEREIRA, R.N.; RAHAL, R.M.S.; REITAS JUNIOR, R. de; RODRIGUES, D.C.N.; CORREA, R. S.; MENDONÇA, B. Título**: Ansiedade de Mulheres Frente a Campanha de Rastreamento de Câncer de Mama em Goiânia**. http://www.sbpcnet.org.br/livro/63ra/conpeex/pivic/trabalhos/ROSEANA_.PDF, 2010.

POLAND, A.; KIMBROUGH, R.D. Biological mechanisms of dioxin action. **Bambury Report 18.** Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, p. 500. 1984.

PRAT, A.; PARKER, J.; KARGINOVA, O.; FAN, C.; LIVASY, C.; HERSCHKOWITZ, J.; *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res**. 2010;12(5):R68.

PUGA, A.; TOMLINSON, CR. *et al*. Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. **Biochem. Pharmacol**. 2005;69:199-207.

RASMUSSEN, S.B.; YOUNG, L.J.T; SMITH, G.H. Preparing mammary gland whole ounts from mice. In**: IP MM**, ASCH,B.B., editors. Methods in mammary gland biology and breast cancer research. Boston: Kluwer Academic/Plenum; 2000:75–85.

RIESOP, D.; HIRNER, AV.; RUSCH, P.; BANKFALVI, A. Zinc distribution within breast cancer tissue: A possible marker for histological grading**? J Cancer Res Clin Oncol**. 2015;141:1321-31.

RUSSO, J.; RUSSO I.H. Toward a physiological approach to breast cancer prevention. **Cancer Epidemiol Biomarkers** Prev. 1994;3:353-64.

_____ Experimentally induced mammary tumors in rats**. Breast cancer research and treatment**. 1996;39:7-20.

SAFE, S. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs).**Crit Rev Toxicol**. 1990;21:51-88.

SALEHI, F.; TURNER, M.C.; PHILLIPS, K.P.; WIGLE, D.T.; KREWSKI, D.; ARONSON, K.J. Review of the etiology of breast cancer with special attention to organochlorines as potential endocrine disruptors.**J Toxicol Environ Health B Crit Rev**.2008;11: 276-300.

SCHECTER, A.; RYAN, J.J. Polychlorinated dibenzo-ρ-dioxin and dibenzofurans levels in human adipose tissues from workers 32 years after occupational exposure to 2,3,7,8-TCDD. **Chemosphere**. 1988;17:915-920.

SCHECTER, A.L.B; *et al*. **Dioxins**: an overview. Environ. Res. 2006;101(3):419-28.

SCHLEIER, R. **Constituintes fitoquímicos de Vitis vinifera** l (UVA). Monografia apresentada para obtenção do título de Especialista em Fitoterapia no IBEHE / FACIS. IBEHE, 2004.

SCHULTZ, L. B.; WEBER, B. L. Recent advances in breast cancer biology. **Current opinion in oncology** 11, 429-34. (1999).

SINGLETON, D.W.; FENG, Y.; YANG, J.; PUGA, A.; LEE, A.V.; KHAN, S.A. Gene expression profiling reveals novel regulation by bisphenol-A in estrogen receptor-alpha-positive human cells. **Environ Res**. 2006;100:86-92.

SOLOMAYER, E.F.; DIEL, I.J.; MEYBERG, G.C.; GOLLAN, C.; BASTERT, G. Metastatic breast cancer: clinical course, prognosis and therapy related to the first site of metastasis. **Breast Cancer Res**. 2000;59:271-8.

SOTIRIOU, C.; NEO, S-Y.; MCSHANE, L.M.; KORN, E.L.; LONG, P.M.; JAZAERI A. *et al.* Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a populationbased study. **Proc Natl Acad Sci** USA. 2003;100(18):10393-8.

STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. **Food Chemistry**. 2007;101(2):449-457.

STOHS, S.J.; SHARA, M.A.; ALSHARIF, N.Z.; WAHBA, Z.Z.; AL-BAYATI, Z.A.; 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in female rats. **Toxicol Appl Pharmacol**. 1990;106:126-35.

SUGIHARA, K.; KITAMURA, S.; YAMADA, T.; OHTA, S.; YAMASHITA, K.; YASUDA, M.; FUJII-KURIYAMA, Y. Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated induction of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin. Biochem. Biophys. **Res. Comm**. 2001;281:1093–1099.

TEIXEIRA, A.; BAENAS, N.; DOMINGUEZ-PERLES, R.; BARROS, A.; ROSA, E.; MORENO, D. A.; GARCIA-VIGUERA, C. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. **International journal of molecular sciences**, 2014;15(9): 15638-15678.

VAN DEN BERG, M.; PETERSON, RE.*et al.* Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. Environ. **Health Perspect.** 1998;106: 775-792.

VAN DEN BERG, M.; BIRNBAUM, L. S. *et al*. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. **Toxicol. Sci**. 2006;93(2): 223-41.

VODUC, KD.; CHEANG, MCU.; TYLDESLEY, S.; GELMON, K.; NIELSEN, TO.; KENNECKE, H.; Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **J Clin. Oncol**. 2010;28(10):1684-91.

VORDERSTRASSE, B.A.; FENTON, S.E.; BOHN, A.A.; CUNDIFF, J.A.; LAWRENCE, B.P. A novel effect of dioxin: Exposure during pregnancy severely impairs mammary gland differentiation. **Toxicol. Sci**. 2004;78: 248–257.

WAHBA, Z.Z.; LAWSON, T.A. STOHS, S.J. Induction of hepatic DNA single strand breaks in rats by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD).**Cancer Lett.** 1988;39: 281-6.

WATERS, W.F. Globalization, socioeconomic restructuring, and community health**. J Community Health**. 2001 Apr;26(2):79-92.

WHITLOCK, N.C.; BAEK, S.J. The anticancer effects of resveratrol: modulation of transcription factors.**Nutr Cancer.** 2012;64:493-502.

WHO - World Health Organization. Global status report on non communicable diseases 2010.Geneva: **World Health Organization**; 2011.

WHO - World Health Organization. **Cancer - Fact sheet** N°297. Geneva: WHO; 2009. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/print.html (acesso em 03 de janeiro de 2012).

ZADIK, Z. Maternal nutrition, fetal weight, body composition and disease in later life. **J Endocrinol Invest**. 2003; 26:941-5.