



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

Flávia Regina Moraes da Silva

**Efeitos da exposição gestacional, lactacional e juvenil às
dietas com deficiência e suplementação de zinco e
suscetibilidade a carcinogênese da mama em fêmeas
Sprague-Dawley**

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

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan
Coorientador: Prof. Dr. Lucas Tadeu Bidinotto

**Botucatu
(2016)**

Flávia Regina Moraes da Silva

Efeitos da exposição gestacional, lactacional e juvenil
às dietas com deficiência e suplementação de zinco e
suscetibilidade a carcinogênese da mama em fêmeas
Sprague-Dawley

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

Orientador: Prof.Dr. Luis Fernando Barbisan
Coorientador: Prof.Dr. Lucas Tadeu Bidinotto

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, Flávia Regina Moraes da.

Efeitos da exposição gestacional, lactacional e juvenil às dietas com deficiência e suplementação de zinco e suscetibilidade a carcinogênese da mama em fêmeas Sprague-Dawley / Flávia Regina Moraes da Silva. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Luis Fernando Barbisan

Coorientador: Lucas Tadeu Bidinotto

Capes: 40105008

1. Mamas - Câncer. 2. Zinco. 3. Doenças por deficiência de zinco. 4. Deficiência de Zinco - Efeito fisiológico. 5. Gravidez - Complicações.

Palavras-chave: Carcinogênese mamária; Deficiência de zinco ; Suplementação de zinco .

Dedicatória

*Aos meus pais, por tornarem
tudo possível, desde sempre.*

Agradecimentos

*Primeiramente agradeço a **Deus** pela vida e saúde que ele tem me concedido para batalhar, pelas forças que me fizeram superar as dificuldades e não desistir, pela coragem de buscar meus sonhos e proteção que tem me sustentado e guiado até aqui.*

*Aos meus pais **José Carlos da Silva e Lurdes Aparecida Moraes da Silva**, pelo exemplo de caráter, pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional.*

*Aos meus irmãos, **Carlos Alexandre e Victor Paulo**, e cunhada **Mirtis** pelo incentivo, carinho e amizade.*

*Ao meu namorado **Cleófas Fernandes**, pelo incentivo, carinho e companheirismo durante este percurso. Obrigada por sempre acreditar na minha capacidade e por todo amor e dedicação.*

*Ao Dr. **Luis Fernando Barbisan**, meu orientador, pelos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), apoio e conhecimentos transmitidos durante a elaboração desta Tese. Agradeço pela confiança e críticas construtivas que contribuíram para meu crescimento profissional.*

*Ao Prof. Dr. **Lucas Tadeu Bidinotto**, meu coorientador, pela prontidão em ajudar, correções e contribuições valiosas para o bom desenvolvimento deste Trabalho.*

*Ao prof. Dr. **Robson Franciso Carvalho**, pela colaboração e concessão de uso de seu laboratório.*

*Às amigas **Nelci e Joyce**, pela amizade, companheirismo e convivência que renderam momentos muito divertidos.*

Aos todos meus amigos de laboratório pela amizade e momentos de descontração.

*Aos meus irmãos na fé que compartilharam muitos momentos durante esta jornada, me ajudando e fortalecendo com suas orações e ricas amizades, sempre torcendo pelo bom desenvolvimento deste trabalho: **Sara, Keila, Selma, Maria Helena, Alzira, Bete e Jefte**.*

*Ao Técnico de biotério **Paulo Cesar Georgete (PC)**, pelo auxílio nas atividades do biotério, tratamentos, sacrifícios e necropsias dos animais.*

*Aos funcionários do **Departamento de Morfologia e de Patologia**, e aos funcionários da Pós-Graduação, pelo auxílio e competência.*

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos!

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar se a ingestão de dietas com deficiência ou suplementação de zinco, durante as fases de gestação, lactação e juvenil, interfere no desenvolvimento das glândulas mamárias e na susceptibilidade ao desenvolvimento de carcinogênese mamária induzida pela 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) em ratas da linhagem Sprague-Dawley (SD). Duas gerações, mães e prole de fêmeas receberam dietas com níveis adequados (35mg/Kg dieta), deficientes (3mg/Kg dieta) ou com suplementação (180mg/Kg dieta) de zinco durante a gestação. Após o desmame, as proles de fêmeas receberam as mesmas dietas das mães até o dia pós-natal (DPN) 51 ou 53. No DPN 51 fêmeas SD foram eutanasiadas para remoção das glândulas mamárias abdominais (D e E) ou receberam dose única de DMBA (50mg/kg; i.g.) para iniciação da carcinogênese e eutanasiadas no DPN 53 ou DPN 180. No dia DPN 53 as glândulas foram processadas para análises histológicas e imunoistoquímicas, e avaliação da expressão de genes relacionados a dano e reparo de DNA, apoptose, ciclo celular e sinalização de genes relacionados ao receptor de estrógeno e p53, por RT-qPCR com sistema Taqman Low density array (TLDA). Os tumores coletados ao longo do experimento e no DPN 180 foram processados para avaliação histológica. As fêmeas alimentadas com dieta deficiente de zinco apresentaram redução significativa no peso corpóreo nos DPNs 0, 10, 21 e 51. O número médio de brotos terminais (TEBs), ductos terminais (TEDs) e lóbulos alveolares (ABLs) mamários não diferiram entre as proles dos três grupos experimentais. No DPN 53, os índices de proliferação nas células epiteliais mamárias foram significativamente maiores no grupo que recebeu suplementação de zinco em relação ao grupo controle, enquanto os índices de células epiteliais em apoptose e RE- α positivas não diferiram entre os grupos. Além disso, a suplementação de zinco reduziu significativamente a expressão dos genes *Api5* e *Ercc1*, que atuam como inibidor de apoptose e reparo de DNA, respectivamente. No DPN 180, tanto a deficiência quanto a suplementação de zinco na dieta não alteraram a latência, incidência, multiplicidade ou volume dos tumores mamários induzidos pela DMBA em relação ao grupo controle. No entanto, a suplementação de zinco aumentou o número total de tumores em 72% quando comparado aos demais grupos. Portanto a suplementação de zinco durante as fases iniciais da vida e período juvenil aumentou marginalmente a suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores mamários.

Palavras-chave: Carcinogênese mamária, rato, deficiência de zinco e suplementação de zinco

Abstract

The present study was designed to evaluate whether dietary intake with zinc deficiency or supplementation during the pregnancy, lactation and juvenile stages interfere the development of mammary glands and susceptibility to the mammary carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) in female rats Sprague-Dawley (SD) rats. Two generations, dams and female offspring received dietary with zinc levels adequate (35 mg/kg diet), deficiency (3 mg/kg diet) or supplementation (180 mg/kg diet) during pregnancy. After weaning, the females offspring received the same diets as their dams until post natal day (PND) 51 or 53. On PND 51, females SD were euthanized for removal of the mammary glands (right and left) or received a single dose of DMBA (50mg/kg, ig) for initiation of mammary carcinogenesis and euthanized on PND 53 or PND 180. On PND 53, mammary glands were processed for histological and immunohistochemical analyses, as well as evaluation of the expression of genes related to DNA damage and repair, apoptosis, cell cycle and signaling related to estrogen receptor and p53 by RT-qPCR with Taqman Low density array (TLDA) system. Tumors collected throughout experiment or on PND 180 were processed for histological evaluation. The females fed with dietary zinc deficiency presented a significant reduction in body weight on PND 0, 10, 21 e 51. The mean number of the terminal buds (TEBs), terminal ducts (TEDs) and alveolar lobe (ABLs) in mammary gland did not differ among offspring of the three groups. On PND 53 the indexes of proliferation in the mammary glands epithelial cells were significantly higher in the zinc supplementation group in relation to the control group, while the indexes of apoptosis epithelial cell and positive ER- α did not differ among the groups. Also, dietary zinc supplementation significantly reduced the expression of the *Api5* and *Ercc1* genes related to apoptosis inhibitor and DNA repair, respectively. On PND 180 both dietary zinc deficiency as supplementation did not change the, latency, incidence, multiplicity or volume of DMBA-induced mammary tumors in relation to the control group. However, dietary zinc supplementation increased the total number of tumors in 72% compared to others groups. Therefore zinc supplementation during the early life and juvenile period marginally increased the susceptibility to the mammary tumors development.

Key words: Mammary carcinogenesis, rat, zinc deficiency and zinc supplementation.

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1 – Estrutura da mama feminina.....	20
Figura 2 – Representação esquemática do desenvolvimento embrionário da glândula mamária	22
Figura 3 – Tipos de câncer com maior incidência na população feminina e masculina para o ano de 2014.....	24
Figura 4 – Incidência brasileira de câncer de mama por 100.000 mulheres, estimada para ano de 2014.....	25
Figura 5 – Estrutura química do Hidrocarboneto policíclico aromático 7,12 dimetilbenz(o)antraceno (DMBA).....	29
Figura 6 – Rede de transporte de zinco na glândula mamária em resposta a lactação.....	32
Figura 7 – Papel da homeostase de zinco nas funções celulares que apontam para a iniciação e progressão do câncer de mama.....	35
Figura 8 – Diagrama da programação fetal.....	37

Capítulo II

Figura 1 – Fotomicrografia do esfregaço vaginal após 12 horas de acasalamento, considerado positivo.....	68
Figura 2 – Protocolo experimental.....	70
Figura 3 – Montagem total mostrando a extensão da árvore epitelial em relação a superfície do linfonodo.....	74
Figura 4 – Fotomicrografia da mama de ratas Sprague Dawley com 51 dias de idade preparadas pela montagem total.....	74
Figura 5 – Extensão da árvore epitelial em relação à superfície do linfonodo.....	83
Figura 6 – Marcação imunoistoquímica e índice de proliferação celular nas glândulas mamárias por Ki67.....	84
Figura 7 – Corte histológico em HE e índice de apoptose nas glândulas mamárias.....	85
Figura 8 – Marcação imunoistoquímica e índice de Rea nas glândulas mamárias.....	86
Figura 9 – Expressão do gene Api5 nas glândulas mamárias do DPN 53.....	88
Figura 10 – Expressão do gene Ercc1 nas glândulas mamárias do DPN 53.....	88
Figura 11 – Rede formada pelos genes Api5 e Ercc1.....	89
Figura 12 – Evolução do peso corpóreo dos diferentes grupos experimentais.....	90
Figura 13 – Número cumulativo e a semana de detecção de tumores mamários palpáveis nos diferentes grupos experimentais.....	91
Figura 14 – Incidência de tumores nos diferentes grupos experimentais.....	91
Figura 15 – Proporção de animais livres de tumores.....	92
Figura 16 – Padrão histológico dos tumores mamários induzidos pela DMBA.....	93
Figura 17 – Número de animais que apresentaram tumores mamários de diferentes volumes.....	94

Lista de Tabelas

Capítulo II

Tabela 1 – Composição das rações semi-purificadas.....	71
Tabela 2 – Dados reprodutivos das mães e prole exposta às dietas com diferentes doses de zinco.....	81
Tabela 3 – Efeitos da exposição às dietas com diferentes doses de zinco na estrutura da glândula mamária, desde as fases iniciais da vida até o DPN 51.....	82
Tabela 4 – Dosagens bioquímicas de progesterona e estradiol nos diferentes grupos experimentais.....	87
Tabela 5 – Consumo médio estimado de ração e água e ganho de peso corpóreo de fêmeas iniciadas com a DMBA durante o período do DPN 53 ao 180.....	90
Tabela 6 – Dados de latência, incidência, multiplicidade e tipos histológicos de neoplasias mamárias induzidas pela DMBA nos diferentes grupos experimentais.....	94

Lista de Anexos

Anexo 1 – Protocolo de aprovação pelo Comitê de Ética na experimental animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de Botucatu.....	115
Anexo 2 – Dados da extração de RNA das glândulas mamárias da prole de fêmeas do DPN 53, e eletroferograma representando RNAs de boa qualidade.....	116
Anexo 3 – Genes avaliados, presentes no cartão microfluido TaqMan® Array e os processos com os quais eles estão relacionaodos.....	117

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABC	Avidina-Biotina-Peroxidase
ABLs	lóbulos alveolares
AhR	Receptor do Hidrocarboneto Aril
ARNT	Translocador nuclear do receptor do hidrocarboneto aril
BMP4	Proteína morfogênica óssea 4
cDNA	DNA complementar
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
CEEA	Comitê de Ética na experimentação animal
CYP450	Cytochrome P450
D e E	Direita e esquerda
DG	Dia gestacional
DL	Dia lactacional
DMBA	7,12-dimetilbenz(a)antraceno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPN	Dia pós-natal
EMT	Transição mesenquimal epitelial
HE	Hematoxilina-eosina
HER-2	Humam Epidermal Growth Factor Receptor 2
IM	Índice de marcação
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MMPs	Matrix metalloproteinases
MNU	N-metil-N-nitrosoureia
MT	Metalotioneína
MTF1	Metal-regulatory transcription factor 1
NaCl	Cloreto de Sódio
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos

PR	Progesterona
PTHlH	Proteína relacionada com hormônio paratireóide
RE- α	Receptor de estrógeno
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Reação em cadeia quantitativa da polimerase com transcrição reversa
SD	Sprague-Dawley
SOD Cu/Zn	Superóxido dismutase com Cobre/ Zinco
TDLU1	Unidade lobular ductal terminal 1
TEBs	Broto terminais
TEDs	Ductos terminais
TLDA	TaqMan Low Density Array
WHO	World Health Organization

Sumário

Capítulo I – Revisão da Literatura	19
1. A glândula mamária.....	20
2. Fatores de risco e evidências epidemiológicas para o câncer de mama.....	24
3. Carcinogênese química.....	27
4. Impactos da deficiência e suplementação de zinco no câncer de mama.....	30
5. Programação fetal e efeitos da deficiência de zinco sobre a vida fetal e pós-natal..	37
6. Referências.....	40
Objetivos.....	58
Capítulo II.....	60
Artigo.....	61
Early in life dietary zinc supplementation or deficiency and susceptibility to mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rat.....	62
Abstract.....	63
1. Resumo.....	64
2. Introdução.....	65
3. Objetivos.....	67
3. Objetivos específicos.....	67
4. Material e métodos.....	67
4.1. Animais e ambiente de experimentação.....	67
4.2. Delineamento experimental.....	68
4.3. Preparo da ração com adição de zinco.....	70
4.4. Período gestacional, lactacional e juvenil até o DPN 51 e 53.....	71
4.5. Período adulto DPN 51 ao 180.....	72
4.6. Montagem total da mama.....	73
4.7. Análises histológica e imunoistoquímica.....	75

4.8. Dosagens bioquímicas de progesterona e estradiol.....	75
4.9. Extração, quantificação e análise da qualidade de RNA das glândulas.....	75
4.10. Síntese de cDNA.....	76
4.11. Expressão gênica por reação de RT-qPCR com o sistema Taqman Low Density Array (TLDA).....	76
4.12. Análise estatística.....	78
5. Resultados.....	78
5.1. Fase gestacional, lactacional e juvenil.....	78
5.2. Análise morfométrica e estrutural da mama (Montagem Total).....	82
5.3. Índices de proliferação celular e apoptose e análise de RE α	83
5.4. Avaliação da expressão gênica por Taqman Low density Array (TLDA).....	87
5.4.1. Extração de RNA.....	87
5.4.2. Análise quantitativa da expressão gênica.....	87
5.5. Fase adulta.....	89
5.5.1. Dados obtidos durante o período em biotério.....	89
5.5.2. Desenvolvimento de tumores e análise histopatológica.....	90
6. Discussão.....	95
7. Conclusões.....	101
8. Referências.....	102
Anexos.....	114

Capitulo I

Revisão da Literatura

1. A glândula mamária

As glândulas mamárias são apêndices epidérmicos que evoluíram a mais de 300 milhões de anos atrás em mamíferos, provavelmente a partir de glândulas sudoríparas apócrinas. Estas glândulas distinguem de todos os outros órgãos, pois apresentam estrutura anatômica única capaz de secretar leite para alimentação do recém-nascido (Ofstedal, 2002).

O tecido mamário é constituído pela porção glandular ou epitelial, associada a um sistema de ductos responsáveis pelo transporte de leite, e pelos tecidos estromais/ conjuntivos (**Figura 1**). Nas mulheres, a parte glandular apresenta de 15 a 20 lobos, dentro dos quais existem muitos lóbulos pequenos, que contém de 10 a 100 alvéolos, cujas células secretoras são responsáveis pela produção do leite materno (Hondermark, 2003; Hassiotou; Geddes, 2012). Os lóbulos são interligados através de ductos intralobulares, extralobulares e galactóforos e, estes, conduzem o leite ao mamilo (Hondermark, 2003).

Este órgão secretor é composto de diferentes tipos de células epiteliais que crescem a partir do mamilo para a camada de gordura, formada por adipócitos e infiltrado por células endoteliais vasculares e fibroblastos, bem como células do sistema imunológico, as quais são importantes para o desenvolvimento e função mamária (**Figura 1**) (Polyak; Kalluri, 2010; Macias; Hinck, 2012).

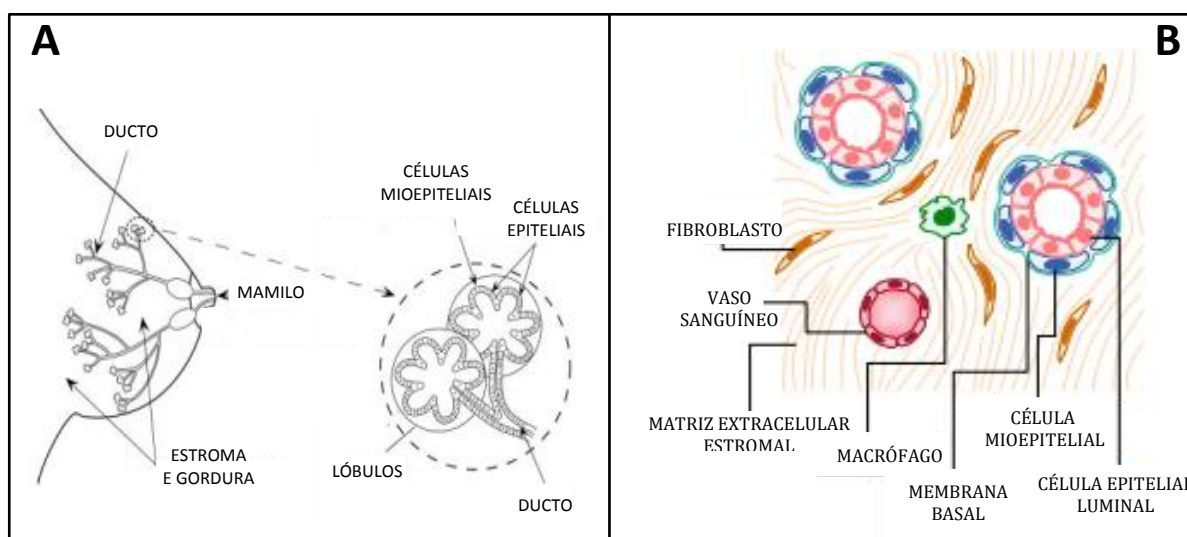


Figura 1. Estrutura da mama feminina. (A): esquema anatômico, (B): esquema do tecido mamário com estruturas epiteliais, consistindo de células luminas centrais rodeadas por células mioepiteliais e inclusas em uma membrana basal contínua, e estroma contendo fibroblastos, células imunes, assim como vasos sanguíneos e linfáticos. Fonte: (A) Adaptado de Hondermarck (2003) (B) adaptado de Cichon et al. (2010).

O desenvolvimento do tecido mamário é semelhante entre os mamíferos e várias informações foram obtidas em estudos com murinos (Nguyen et al., 1995), o que fornece esclarecimentos sobre a biologia da mama humana (Macias; Hinck, 2012). O curso do desenvolvimento da glândula mamária pode ser descrito em estágios diferencialmente regulados, incluindo a fase embrionária, puberal e reprodutiva (Macias; Hinck, 2012).

Durante a embriogênese, a morfogênese da glândula baseia-se na sinalização coordenada entre o epitélio e o mesênquima subjacente (estroma embrionário) (Ercan et al., 2011), o qual fornece sinais indutores de diferenciação das células epiteliais mamárias. (Macias; Hinck, 2012). O primeiro passo para a morfogênese mamária em murinos é o espessamento da ectoderme ventral, referido como linha mamária bilateral (Robinson, 2007; Watson; Khaled, 2008; Cowin; Wysolmerski, 2010; Propper et al., 2013). Por volta do 11,5º dia gestacional esta estrutura dá origem aos placódios (**Figura 2**), que consiste em várias camadas de células em forma de colunas, que surgem pela migração e agregação subsequente de células ectodérmicas em agrupamentos superficiais na linha mamária (Propper, 1978; Cowin; Wysolmerski, 2010). Nos seres humanos, as linhas mamárias são caracterizadas como cristas elevadas na superfície do ectoderma que persistem apenas na área peitoral onde formam os placódios mamários (Líška et al., 2015). Entre as 7º e 8º semanas, o parênquima mamário começa a invadir o estroma subjacente formando um disco mamário primitivo. A partir da proliferação mamária se originam os brotos epiteliais (Líška et al., 2015). Enquanto os seres humanos apresentam apenas um par de placódio que se desenvolvem em duas mamas, os camundongos e ratos possuem 5 e 6 pares de placódios, respectivamente, distribuídos ventralmente ao longo dos membros anteriores e posteriores, que se desenvolvem em 10 e 12 glândulas mamárias funcionais, respectivamente (Russo; Russo, 1996; Ercan et al., 2011).

Em murinos, os placódios expandem-se em forma arredondada e invaginam-se no mesênquima subjacente por volta 14º ou 15,5º dia gestacional (Cowin; Wysolmerski, 2010; Macias; Hinck, 2012) para formar estrutura de broto mamário que cresce e conecta-se a epiderme como mostrado na **Figura 2**. As células mesenquimais condensam-se na região em torno do epitélio que recobre o broto, este por sua vez, estende-se e ramifica-se na camada de gordura subjacente, possibilitando o início de uma ramificação rudimentar e de um sistema ductal, por volta do 16º a 18º dia gestacional em fêmeas de camundongos (**Figura 2**) (Balinsky, 1950; Sakakura, 1987; Ahn, 2015). A formação do lúmen é inicialmente observada no 16º dia gestacional quando espaços intercelulares se desenvolvem dentro do broto. Estes

espaços aumentam em tamanho e em número até que uma luz distinta se torna aparente no 18º dia gestacional (Hogg, 1983).

Nesta fase, as células epiteliais também se diferenciam em pele especializada do mamilo (Balinsky, 1950; Sakakura, 1987). Nos seres humanos, ao invés de um único broto, há a formação de vários brotos mamários (árvore mamária) que se unem ao mamilo (Macias; Hinck, 2012). A geração de mamilo ocorre por modificações da pele que recobre o mesênquima e envolve espessamento da epiderme, assim como supressão de folículos capilares e formação da bainha de queratinócitos no mamilo no local onde os ductos primários ligam-se à superfície da pele (**Figura 2**) (Hens et al., 2007). O dimorfismo sexual da glândula mamária é também alcançado durante esta fase do desenvolvimento embrionário em camundongos, porém mais tarde em humanos (Macias; Hinck, 2012). Estes processos requerem sinalização mediada pela proteína relacionada com o hormônio paratiróide (PTHLH). Os efeitos de PTHLH parecem exigir sinalização da proteína morfogênica óssea (BMP4), o qual tem sua expressão aumentada por meio da alta expressão do receptor BMPR1A no mesênquima (Hens et al., 2007). Além disso, o aumento da expressão do fator de transcrição Msx2 no mesênquima, é um evento regulatório, necessário para a ação de PTHLH na inibição da formação de folículos piloso sobre o mamilo (Hens et al., 2007) por volta do 15,5º dia gestacional como demonstrado na **Figura 2**.

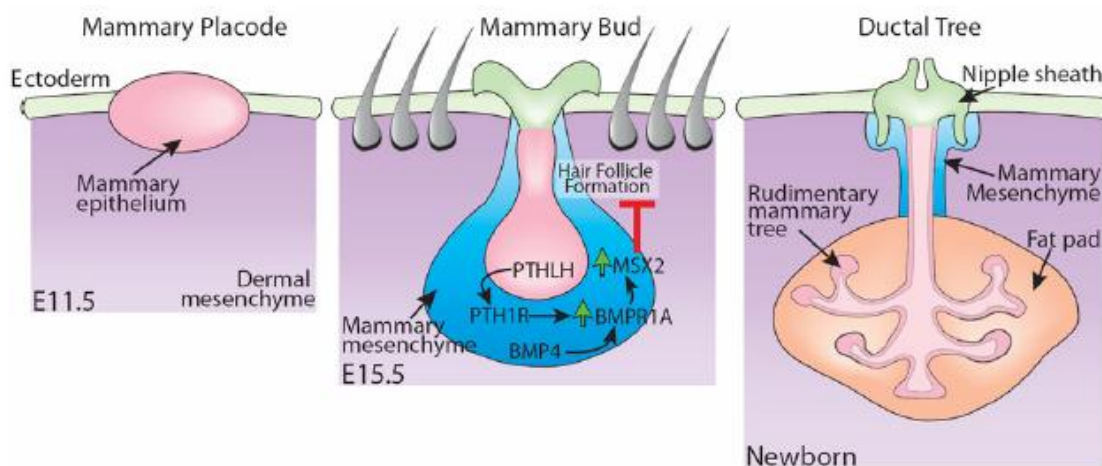


Figura 2. Representação esquemática ilustrando o desenvolvimento embrionário da glândula mamária. O placócio mamário cresce e invagina-se no mesênquima subjacente, em seguida, há emissão de sinais da proteína relacionada com o hormônio paratireoide (PTHLH) do epitélio para o mesênquima, possibilitando aumento da expressão do receptor-1A da proteína morfogênica óssea (BMPR1A). A emissão de sinais da proteína morfogênica óssea 4 (BMP4) do BMPR1A para MSX2 no mesênquima inibe a formação de folículo piloso na bainha do mamilo em

desenvolvimento. O epitélio mamário cresce em uma estrutura de árvore pequena, simples contendo um lúmen aberto, o qual permanece desta forma até o nascimento. Fonte: Adaptado de Cowin; Wysolmerski (2010).

A ramificação dos ductos pode começar no ambiente do tecido adiposo e o mesênquima embrionário pode se transformar em mesênquima específico mamário, que mais tarde se desenvolve em tecido conjuntivo com cordas fibrosas, formando vasos sanguíneos e linfáticos (Hovey et al., 1999). Uma das diferenças mais evidentes entre as glândulas mamárias humanas e de roedores é a presença de estroma interlobular denso e intralobular frouxo na mama de humanos em comparação com um estroma rico em tecido adiposo em roedores (Russo; Russo, 1978).

No nascimento, a estrutura mamária é apenas um sistema ductal rudimentar (**Figura 2**), e como as influências endócrinas maternas diminuem, a glândula passa por um período de crescimento alométrico, que caracteriza uma fase de quiescência morfogênica até a puberdade, quando ocorre a proliferação celular intensiva, preenchendo a camada de gordura sob a influência de hormônios e fatores de crescimento (Macias; Hinck, 2012; Sternlicht, 2005; Gjorevski; Nelson, 2011). Nesta fase, ocorre elevada proliferação de estruturas bulbosas, nas extremidades distais dos ductos denominada brotos terminais (TEBs) (Sreekumar et al., 2015). Estas estruturas são consideradas como condutores do crescimento e arborização dos ductos em toda a camada de gordura, como consequência de vários ciclos de divisão celular (Hinck; Silberstein, 2005). Desta forma, a puberdade é o estágio mais marcante da morfogênese mamária, uma vez que, o aumento nos níveis dos hormônios ovarianos, incluindo o estrogênio, promove a proliferação e alongamento dos ductos existentes e a ramificação destes em ductos secundários e terciários, cujos brotos terminais formam as unidades lobulares. Estas últimas, contendo estruturas alveolares rudimentares, também são chamadas de brotos alveolares (Anderson et al., 2007; Gjorevski; Nelson, 2011).

A morfogênese da ramificação mamária não se restringe ao compartimento epitelial, pois concomitante a este processo ocorre a expansão do estroma mamário, através de atividades de remodelamento de matriz extracelular (Russo; Russo, 2004; Anderson et al., 2007). Portanto, ciclos sucessivos de alongamento, bifurcação e ramificação lateral resultam na formação de uma “árvore” epitélio-ductal, com estruturas lobulares, características do tecido mamário maduro funcional, alcançado apenas durante o período de gestação/lactação. (Hartmann, 2007; Gjorevski; Nelson, 2011).

2. Fatores de risco e evidências epidemiológicas para o câncer de mama

O câncer continua sendo um grande problema de saúde pública, pois é responsável por 16% de mortes no mundo (WHO, 2011) e a segunda doença de maior mortalidade, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares (Siegel et al., 2015). O câncer de mama é o mais frequentemente diagnosticado e a principal causa de morte por câncer entre as mulheres no Brasil e no mundo (Ferlay et al., 2013; INCA, 2014; Siegel et al., 2015). Estima-se 231,840 mil novos casos para câncer de mama em 2015 (Siegel et al., 2015), apresentando altas taxas de incidência e prevalência em países desenvolvidos e em desenvolvimento (Siegel et al., 2015). É importante relatar que a frequência de novos casos tem aumentado em mulheres mais jovens (Jemal et al., 2010; Cuzik, 2010; INCA, 2014).

No Brasil, as estimativas de incidência de câncer para 2014/2015 são de aproximadamente 576 mil casos novos, dos quais são esperados 57.120 casos novos de câncer de mama (Figura 3), ou seja, um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014). As várias regiões brasileiras apresentam diferentes taxas de incidência, sendo sudeste e sul as regiões mais incidentes (Figura 4), (INCA, 2014).

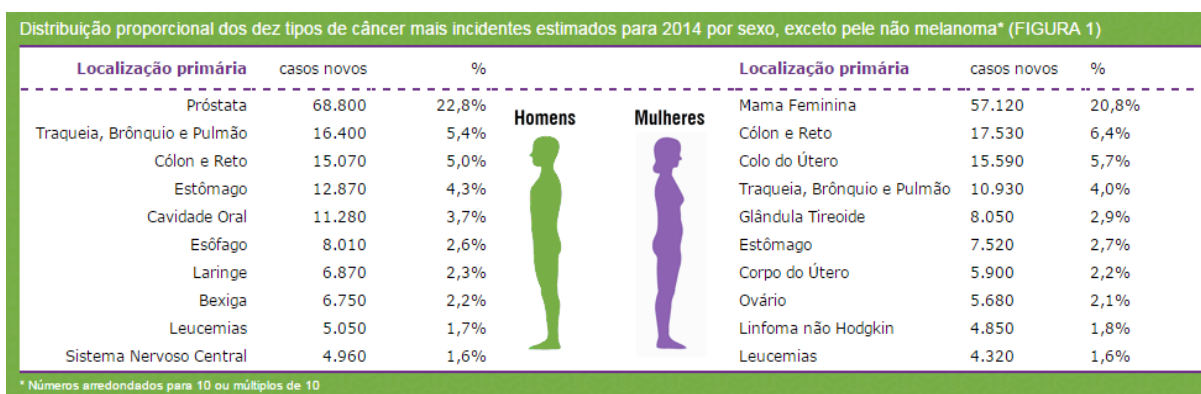


Figura 3. Tipos de câncer com maior incidência na população brasileira feminina e masculina para o ano de 2014. Fonte: INCA, 2014.

juntamente com biomarcadores já estabelecidos, como receptor de estrogênio (ER), de progesterona (PR) e o receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2). (Riesop et al., 2015). A otimização da gestão do câncer de mama encontra-se na detecção precoce, prognóstico e terapia eficaz individualizada, os quais exigem uma abrangente compreensão das interações moleculares complexas que estão na base do desenvolvimento e progressão do câncer da mama. O advento de tecnologias que possibilita a obtenção do perfil de expressão gênica tem sido uma maneira eficaz para desvendar a heterogeneidade deste tipo de neoplasia (Van't Veer et al., 2003; Sorlie et al., 2006; Lowery et al., 2010).

O câncer de mama representa uma doença crônica, relacionada com fatores sócio-demográficos, ambientais e endógenos, os quais interagem com susceptibilidade genética individual (AlQallaf et al., 2007). Assim, a etiologia do câncer de mama é multifatorial, incluindo fatores genéticos, como alterações nos genes *Brca1* e *Brca2*, vários fatores de risco associados a hábitos alimentares, estilo de vida (obesidade, alcoolismo, sedentarismo), e estilo de vida reprodutiva (idade avançada, gravidez tardia, ausência de gravidez), além dos desequilíbrios hormonais, (uso de hormônios exógenos, contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal na menopausa) (Bouchardy et al., 2007; Cuzik, 2010; Riesop et al., 2015). Estudos sugerem que alimentação rica em gordura pode estar relacionada aos diferentes índices de incidência e mortalidade por câncer de mama (Parkin et al., 2005).

A fisiologia da mama compreende características peculiares que a torna sensível a vários compostos que contribuem para o desenvolvimento do câncer (Mulware, 2013). As glândulas apócrinas que compõem o parênquima da mama proliferam continuamente a partir da menarca com o aumento da população de células durante cada ciclo de ovulação, o que resulta no desenvolvimento da estrutura de brotamento até aproximadamente a idade de 35 anos (Lambreche; Goldberg, 1997). Uma mutação que ocorre durante a transcrição do DNA e outros erros que podem ocorrer durante cada ciclo de replicação celular, expõe os tecidos mamários a risco carcinogênico (Mulware, 2013). Embora a doença clínica, muitas vezes não seja evidente até meia-idade, o câncer de mama pode ser desencadeado no início da vida reprodutiva da mulher (Masso-Welch et al., 2000).

As investigações sobre o câncer de mama são prioritárias para a gestão da saúde pública, o que estimulam os pesquisadores a tentarem entender melhor a evolução dessa doença, descobrir suas causas e/ou relacioná-la com fatores de risco, e a buscarem novas estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento (Cui et al., 2007).

3. Carcinogênese química

Modelos experimentais de indução de tumores, pela administração de agentes químicos carcinogênicos ou inoculação de células tumorais em roedores, são utilizados para mimetizar a carcinogênese humana e para condução de estudos de prevenção e tratamento do câncer. (Thompson; Singh, 2000; Hui et al., 2010). Neste sentido, a utilização de cancerígenos químicos em roedores tem sido uma ferramenta útil para o estudo das múltiplas etapas da carcinogênese mamária (Boone et al., 1992; Thompson; Singh, 2000; Mehta, 2000).

Os cancerígenos químicos podem atuar nas diferentes etapas da carcinogênese. Os agentes iniciadores podem ser enquadrados em duas grandes categorias: 1) compostos de ação direta, que não exigem biotransformação para exercer sua carcinogenicidade e 2) compostos de ação indireta, ou pré-cancerígenos, que exigem conversão metabólica para produzir cancerígenos finais com caráter nucleofílico, como por exemplo, agentes alquilantes que induzem mutações no DNA ou a produção de radicais de oxigênio e nitrogênio, que são capazes de levar a lesões oxidativas e iniciar o processo de carcinogênese em células-alvo específicas (Preston; Williams, 2005). As células iniciadas, com alterações permanentes em seu DNA, passam a se proliferar em ritmo diferente das outras células normais, adquirem novas mutações e respondem de maneira mais efetiva aos compostos promotores, ou não genotóxicos (Preston; Williams, 2005).

O processo de carcinogênese química ocorre através de múltiplas etapas denominadas de iniciação, promoção e progressão (Dragan et al, 1991; Pitot, 1993; Pitot, 2001, 2007). 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 (Dragan et al, 1991; Pitot, 1993; Pitot, 2001, Pitot 2007). A promoção ocorre quando tal alteração é expressa, ocorrendo o aparecimento de lesões focais de células alteradas ou lesões pré-neoplásicas (Dragan et al, 1991; Pitot, 1993; Pitot, 2001, Pitot 2007). Essas lesões apresentam importantes modificações em níveis moleculares e morfológicos, incluindo genes que controlam a proliferação celular, diferenciação e apoptose (Cordon-Cardo, 1998; Ray et al., 2007). Quando as lesões adquirem características de malignidade tem-se a fase de progressão (Pitot, 1993; Pitot, 2001, Pitot 2007), na qual são observadas alterações no genoma, relacionadas à proliferação celular/apoptose, invasão de tecidos adjacentes, capacidade de produzir

metástases e outras alterações bioquímicas, fornecendo o substrato biológico para a manifestação clínica do câncer (Venning et al., 2015).

As neoplasias mamárias quimicamente induzidas são, em geral, carcinomas hormônio-dependentes. A incidência, multiplicidade e tipos de tumores mamários são influenciados pela idade, tempo de exposição ao cancerígeno, história reprodutiva, desregulação endócrina, dieta e outros fatores que alteram o desenvolvimento e o grau de diferenciação da glândula mamária (Russo; Russo, 1994). As substâncias químicas mais utilizadas nos modelos experimentais de indução da carcinogênese mamária em fêmeas de ratos e camundongos são a 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) e a N-metil-N-nitrosourea (MNU). A exposição de ratas jovens a esses cancerígenos antes da primeira prenhez aumenta a susceptibilidade das glândulas mamárias à iniciação do câncer (Russo et al., 1992).

A DMBA é um cancerígeno sintético órgão-específico utilizado na elaboração de modelos experimentais de carcinogênese de mama (Macejová; Brtko, 2001), atuando nos dois estágios da carcinogênese química "modelo de iniciação-promoção" (Slaga, 1984; Dipple et al., 1984). Esse composto químico é agrupado na classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (**Figura 5**). A metabolização da DMBA pelas células animais resulta em um metabólito reativo carcinogênico com sítio reativo diidrodiol epóxido (Macejová; Brtko, 2001). De fato, os diidrodióis epóxidos têm potencial químico para formar íons carboxi-benzílicos, intermediários eletrofílicos que se ligam avidamente a sítios nucleofílicos celulares (Macejová; Brtko, 2001).

Administração de DMBA leva à expressão aumentada do receptor do hidrocarboneto citosólico aril (AhR), o qual se transloca para o núcleo e se associa com o translocador nuclear do receptor de hidrocarboneto aril (ARNT). Assim, o complexo AhR/ARNT se liga a genes específicos AhR e induz transcrição de genes CYP1. AhR é dependente da expressão do citocromo P450 (CYP450) que metaboliza a DMBA em epóxido e forma adutos de DNA, um evento importante na iniciação da carcinogênese (Nebert et al., 1990; Trombino et al., 2000).

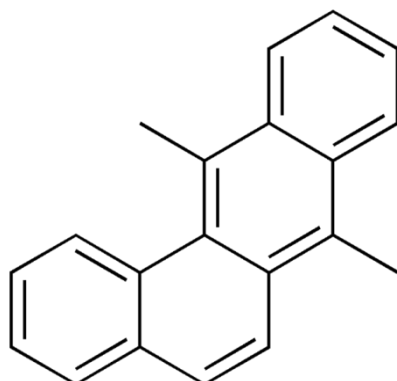


Figura 5—Estrutura química do hidrocarboneto policíclico aromático 7,12-dimetilbenz(o)antraceno (DMBA), de fórmula molecular $C_{20}H_{16}$.

Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>

As células epiteliais mamárias de roedores presentes nos brotos terminais (TEBs) metabolizam a DMBA, resultando em metabólitos reativos, o que causa danos irreparáveis no DNA dessas células e dando origem ao desenvolvimento de tumores mamários (Russo; Russo, 1987; Russo et al., 1990). Esse efeito carcinogênico é seletivo para as células do TEB em comparação às demais células epiteliais mamárias, pois essas células são incapazes de remover completamente os adutos de DNA formados (Macejová; Brtko, 2001). Estruturas semelhantes em células mamárias humanas, conhecida como unidade lobular ductal terminal 1 (TDLU1), parecem ser os sítios de iniciação do câncer de mama na maioria das mulheres (Russo et al., 2000). A razão pela qual os tumores surgem de TEB/TDLU1 não é totalmente compreendida, mas pode estar relacionada com a proliferação celular aumentada nestas estruturas (Russo; Russo, 1980), associado com o aumento dos níveis de formação de adutos e a redução da capacidade para reparar danos no DNA (Telang et al., 1992).

Durante o desenvolvimento da glândula mamária, os brotos terminais (TEB) crescem ativamente como estruturas terminais ductais localizadas na franja crescente desta glândula que se diferenciam em brotos e lóbulos alveolares (ABL) (Grubbs et al., 1983; Russo; Russo, 1983, 1978, 1996). Alguns TEBs também regridem para ductos terminais (TD) que permanecem até a diferenciação final durante a gravidez e lactação (Russo e Russo, 1978). Enquanto TEBs são considerados os sítios primários de atividade cancerígena deste órgão, um dos mais importantes fatores que determinam a sensibilidade da glândula aos estímulos neoplásicos é o estágio de diferenciação no momento da exposição ao agente cancerígeno (Nagasawa et al, 1974; Russo; Russo, 1978, 1987).

Observações obtidas de estudos com modelos animais indicam que as exposições no início da vida a compostos alimentares podem estar associados com alterações na

vulnerabilidade a carcinogênese mamária, bem como alterações no número de TEBs. Assim, a ligação entre o aumento do número de TEBs e maior risco de câncer têm sido fortemente considerado (Hilakivi-Clarke et al., 1997; de Assis et al., 2006).

4. Impactos da deficiência e suplementação de zinco no câncer de mama

O zinco é um oligoelemento, essencial para todos os organismos vivos e necessários para o funcionamento de aproximadamente 3.000 proteínas, o que confere 10% das proteínas codificadas pelo genoma humano (Ho; Ames, 2002; Maret, 2009; Rink 2011; Prasad 2011; McCormick et al., 2014). Essas proteínas abrangem todas as classes de enzimas que são indispensáveis para várias funções celulares, como resposta ao estresse oxidativo, proliferação celular, síntese de RNA e DNA, bem como sinalização, diferenciação celular, reparo de dano do DNA, progressão do ciclo celular e apoptose (Bostanciet al., 2014; Kloubert; Rink, 2015). Assim, este elemento é crítico para o crescimento celular (Grattan; Freake, 2012) e estudos epidemiológicos tem correlacionado a deficiência deste elemento com o aumento do risco de doenças crônicas, incluindo o câncer (Wu 2004; Leone et al., 2006).

Embora muitos estudos se concentrem na etiologia do câncer de mama, vários aspectos da doença permanecem desconhecidos. No entanto, é provável que os oligoelementos, como o zinco, desempenhem papéis importantes em processos biológicos relevantes para o câncer de mama, especialmente por ser um componente essencial para ação antioxidante (Willett, 2001; Gaur et al., 2013). Além disso, o seu papel na manutenção da estabilidade genômica têm sido amplamente relatado (Eide, 2011). Alguns estudos estabeleceram ligação entre a deficiência de zinco na alimentação e o risco maior de desenvolver neoplasias (Leone et al., 2006). Desta forma, este elemento tem sido o objeto de investigações sobre a sua importância em processos bioquímicos gerais (McCall et al., 2000; Bargellini et al., 2003).

A compreensão das vias bioquímicas, em que o metabolismo de zinco esta envolvido no câncer de mama, assim como em outros tipos de neoplasias, é um dos principais desafios para melhor entendimento da patogenia desta doença. Em geral, a relação de zinco e tumores pode ser considerada a partir da perspectiva da desregulação dos níveis de zinco intracelular, bem como no soro sanguíneo e, a partir da perspectiva de que o nível deste micronutriente abundante ou deficiente na alimentação resulta em alterações de funções bioquímicas no organismo (Gumulec et al., 2011). O zinco é encontrado em uma grande

variedade de alimentos tais como: carnes bovinas e suínas, peixes, aves, leite e derivados, cereais e feijão (Taco, 2004).

A deficiência de zinco é um problema de saúde pública global, o que representa aproximadamente dois bilhões de pessoas em risco de sua deficiência (Brown, 2004). Entre os metais de transição e nutricionais essenciais, os íons de zinco apresentam funções importantes no desenvolvimento, crescimento e reprodução dos organismos vivos (Maret 2010). Além disso, outras complicações de deficiência de zinco compreendem doenças como, dermatite, alopecia, disfunção do sistema imunológico, hipogonadismo, retardo mental e de crescimento, e outras (Prasad et al., 1963; Hambidge, 2000). A quantidade total de zinco no organismo humano compreende de 1,4-2,3 g em todos os tecidos do corpo e secreções (Chasapis et al., 2011), enfatizando a sua classificação como um elemento traço (Rink; Gabriel, 2000).

A ingestão de zinco recomendada pelo conselho de alimentação e nutrição dos Estados Unidos (EUA) é de cerca de 8 mg/dia para mulheres e 11 mg/dia para homens (Russell et al., 2001). A deficiência de zinco afeta predominantemente mulheres em idade reprodutiva (Caulfield et al., 1998), assim como indivíduos em fase de crescimento como bebês, crianças e adolescentes (Roohani et al., 2013). Além disso, os vegetarianos, idosos e pessoas que vivem em países em desenvolvimento são particularmente propensos à deficiência de zinco (Roohani et al., 2013). Os vegetarianos podem sofrer deficiência de zinco, devido à baixa ingestão deste elemento, combinada com a ingestão de grandes quantidades de fitato, que é responsável por uma redução da biodisponibilidade do zinco (Kloubert; Rink L, 2015).

As estimativas de baixa ingestão de zinco, combinados com um aumento das necessidades deste micronutriente durante a reprodução (King, 2000), sugerem que, 80% das mulheres grávidas e lactantes estão em risco de deficiência marginal de zinco (Caulfield et al., 1998; Scheplyagina, 2005). Essa taxa pode se aproximar de 100% nos países em desenvolvimento (Caulfield et al., 1998). Os desequilíbrios nutricionais de zinco nessas fases da vida são críticos para o desenvolvimento fetal e pós-natal (Sandstead, 1995; Sandstrom, 1997; Vallee; Auld, 1993). Portanto, é de suma importância pesquisas que permitam o desenvolvimento de novas estratégias de suplementação de zinco em mulheres lactantes para melhorar a saúde e desenvolvimento infantil (Dempsey et al., 2012).

É importante considerar que durante a transição de um órgão quiescente para um órgão com capacidade de secreção, ocorrem várias mudanças na glândula mamária que dependem de zinco, como bioenergia, sinalização dependente do ciclo celular, apoptose/autofagia e sinalização dependente de hormônios e citocinas, para manter o epitélio secretor (Hennigar; Kelleher, 2012). Ao mesmo tempo, a glândula mamária deve acumular e secretar (McCormick et al., 2010) uma quantidade extraordinária deste elemento (aproximadamente 1 - 3 mg/dia) no leite, em resposta ao estímulo lactogênico. Assim, o zinco é requerido pela célula, redistribuído no interior de compartimentos subcelulares, e acumulado em vesículas secretoras para transferência ao leite (Hennigar; Kelleher, 2012). Contudo, essas alterações envolvem o papel de vários transportadores de zinco específicos na função deste órgão durante a lactação (Kelleher et al., 2012) (**Figura 6**). De certa forma, compreender o papel da regulação do metabolismo do zinco no tecido mamário normal é fundamental para compreender a relevância da desregulação deste metal no câncer de mama, visto que ocorre grande acúmulo de zinco no tecido tumoral mamário se correlaciona com a progressão da doença (Cui et al., 2007; Hennigar; Kelleher, 2012).

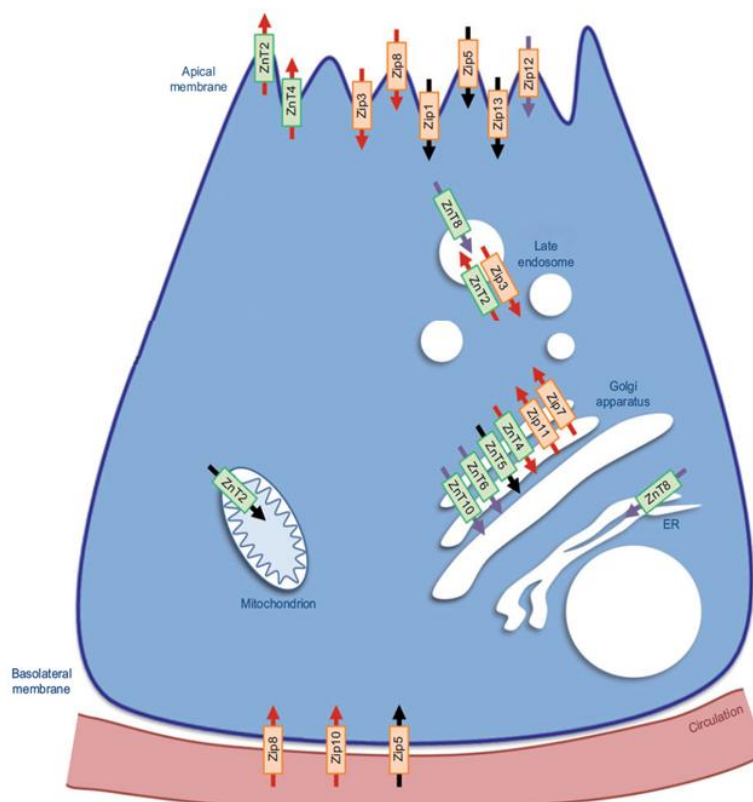


Figura 6. Rede de transporte de zinco na glândula mamária em resposta a lactação. Setas vermelhas indicam aumento de zinco, setas pretas nenhuma alteração, e setas roxas indicam diminuições na expressão de transportadores de zinco em resposta a lactação. ER, retículo endoplasmático. Fonte: adaptado de Kelleher et al. (2012).

Estudos *in vivo* e *in vitro* revelaram que a deficiência de zinco celular leva ao aumento do estresse oxidativo e provoca danos no DNA (Fenech; Ferguson, 2001; Ho et al., 2003; Milner, 2004; Finley, 2005; Yan et al., 2008), o que resultaria no desenvolvimento do câncer. Enquanto que a suplementação de zinco tem mostrado potencial para inibição do desenvolvimento do câncer (Fujii, 1954; Paski; Xu, 2001; Franklin; Costello, 2007; Hashemiet al., 2007).

Neste sentido, a nutrição inadequada deste micronutriente prejudica a função de várias proteínas dependentes de zinco (Yan et al., 2008). Subconjuntos destas proteínas inclui a metalotioneína (Theocharis et al., 2004), e superóxido dismutase (SOD) Cu/Zn, (Oteiza et al., 2001), envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo, as proteínas que controlam as respostas de reparo aos danos do DNA (Prasad, 1998; 2003; Song, 2009), as enzimas de sinalização intracelular (Vallee; Auld, 1993; Prasad, 1995), cerca de 3.000 fatores de transcrição (Andreini et al., 2006; Maret 2009; Rink 2011), proteínas dedo de zinco que requerem zinco para a sua estabilidade estrutural e se ligam ao DNA (Brown et al., 2002; Prasad, 2009), p53, que regula várias funções relacionadas com a reparo do DNA, ponto de verificação do ciclo celular e indução de apoptose (Harris, 1996; Gasco et al., 2002), bem como as metaloproteinases de matriz (MMPs), uma família de endopeptidases dependente de zinco e cálcio que regulam a remodelação da matriz extracelular nos tecidos (Lin et al., 2011) e desempenham função importante na invasão e metástases de tumores quando suas funções estão desreguladas (Alam; Kelleher, 2012). Contudo, os mecanismos antioxidantes e anticarcinogênicos associados com a homeostase de zinco parecem desempenhar papel inibitório sobre o crescimento de células neoplásicas (Alam; Kelleher, 2012).

As perturbações na homeostase do zinco podem induzir alterações bioquímicas características de neoplasias (Bhuloka et al., 2004). Este mineral, que participa na expressão gênica, proliferação celular e regulação da apoptose, pode ter influência direta sobre o desenvolvimento de diferentes formas de câncer. No entanto, o mecanismo exato de como o zinco afeta o crescimento de células neoplásicas não é ainda bem esclarecido (John et al., 2010).

A complexidade da homeostase de zinco requer a compartimentalização de zinco em organelas intracelulares, que é rigidamente regulada através da integração de mecanismos de transporte deste metal (Kelleher et al., 2011). **A Figura 7** mostra a atual compreensão das consequências resultantes da desregulação do zinco nos tecidos da mama e do desenvolvimento de câncer (Alam; Kelleher, 2012).

O zinco é um cátion bivalente e, portanto não é capaz de atravessar as membranas celulares por difusão passiva. No entanto, tem sido identificado duas famílias de transportadores de zinco, essenciais para controlar a homeostase de zinco, bem como evitar o elevado acúmulo deste íon acompanhado de efeitos tóxicos no interior da célula (Palmiter et al., 2003; Eide, 2006). Membros da família do gene *Slc39a* (*Zip1-14*) são responsáveis pelo influxo de zinco para o citoplasma (Jeong; Eide, 2013; Huang; Tapaamorndech, 2013). Em contrapartida, membros da família do gene *Slc30a* (*ZnT1-10*) promovem o efluxo do excesso de zinco a partir do citoplasma para vesículas intracelulares (Kambe et al., 2002; Lopez et al., 2011). Alguns membros de transportadores de zinco que estão envolvidos na carcinogênese mamária estão mostrados na **Figura 7**.

Como a glândula mamária é um tecido secretor que requer zinco para os processos biológicos específicos e críticos para a sua função, este tecido acumula zinco abundante em vesículas secretoras e regula rigidamente a secreção de zinco para tais processos (Kelleher et al., 2011). Entretanto, o metabolismo desregulado de zinco no tecido mamário está implicado em desordens, e desenvolvimento de doenças como o câncer (Kelleher et al., 2011). Funções alteradas de transportadores de zinco ganharam muita atenção em termos de sua expressão e atividades na modulação dos níveis intracelulares de zinco e sua correlação com o câncer de mama (Alam; Kelleher, 2012).

O transportador de zinco *ZnT2* desempenha papel chave no sequestro deste metal em vesículas (Kelleher; Lonnerdal, 2003; Lopez; Kelleher, 2009; Guo et al., 2010) e é regulado positivamente por níveis de zinco celular de um modo similar a MT (Guo et al., 2010). Tem sido estabelecido a importância do *ZnT2* previamente no metabolismo de zinco na glândula mamária normal, ao acumulá-lo em vesículas destinadas a secreção para o leite durante a lactação (Lopez; Kelleher, 2009; Lopez et al., 2011). Portanto, isto pode sugerir que o *ZnT2* desempenha função crítica no acúmulo deste oligoelemento em vesículas intracelulares para proteger as células tumorais mamárias do seu acúmulo elevado (Palmiter et al., 1996; Lopez et al., 2011). Além disso, os transportadores *ZnT2* e *MT* têm sido encontrados com expressão elevada em células tumorais de mama (Lopez et al., 2011; Alam; Kelleher, 2012), como mecanismo de proteção da toxicidade e morte das células tumorais pelo excesso de zinco intracelular (Bay et al., 2006; Lopez et al., 2011; Alam; Kelleher, 2012; Larner et al., 2015). O zinco em excesso aumenta a geração de superóxido (Donadelli et al., 2009) e acidose intracelular, e ativa tanto a apoptose dependente de caspase (Rudolf; Cervinka, 2004; Jayaraman; Jayaraman, 2011) como a independente de caspase (Donadelli et al., 2009). A alta expressão de MT em carcinomas mamários, também pode estar associada

com a inibição de p53 e, consequentemente com resistência à apoptose (Puca et al., 2009; Yap et al., 2009).

Tem sido encontrada em biópsias de câncer da mama, bem como em células tumorais cultivadas, a expressão elevada de algumas proteínas que desempenham função na homeostase deste elemento, incluindo ZIP6 (Taylor, 2000), ZIP7 (Taylor et al., 2008), ZIP10 (Kagara et al., 2007), e ZNT2 (Lopez et al., 2011), que participam da rede de transportadores de zinco e promovem o desenvolvimento de câncer de mama (**Figura 7**). A expressão gênica elevada de *Zip6*, *Zip7* e *Zip10* em tumores de mama, que promovem o fluxo de zinco para as células, parece inibir os transportadores transmembranares deste metal para as células normais, sugerindo que as células tumorais seletivamente aumentam a absorção de zinco na doença (Grattan; Freake, 2012). Além disso, as proteínas ZIP6 e ZIP10 estão associadas com alto grau do câncer de mama e metástase do linfonodo (Kasper et al., 2005; Taylor et al., 2007; Grattan; Freake, 2012).

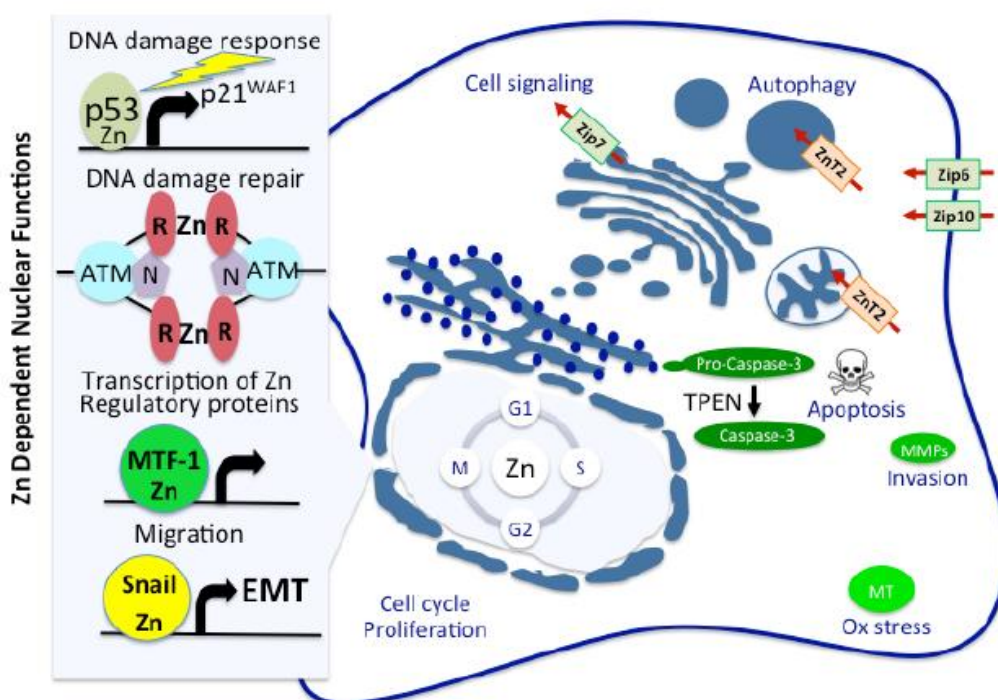


Figura 7. Papel da homeostase de zinco nas funções celulares que potencialmente apontam para iniciação e progressão do câncer de mama. Ação de p53; ATM/MRN, proteínas de resposta ao dano e reparo do DNA, proteína dedo de zinco MTF1, o qual controla a transcrição de proteínas reguladoras de níveis de zinco celular como a metalotioneína (MT) e metaloproteinases de matriz (MMPs), que regulam a remodelação de tecidos. Controle de níveis de zinco no citosol por regulação coordenada dos transportadores de zinco ZNTs e ZIPs e importância do zinco para a proliferação celular, regulação do ciclo celular, diferenciação, sinalização, autofagia e apoptose.

Snail, um fator de transcrição dependente de zinco que desempenha papel central no desenvolvimento da transição mesenquimal epitelial (EMT). Fonte: (Alam; Kelleher, 2012).

Um recente estudo mostrou que a deficiência marginal de zinco (15 mg Zn/kg dieta) fornecida na dieta de camundongos fêmeas, resultou em elevado acúmulo de zinco no tecido mamário, acompanhado do aumento da expressão dos transportadores de zinco *Zip 6* e *Zip 10*, o que estabeleceu um microambiente tóxico na glândula (Bostanci et al., 2015). Os efeitos incluíram estresse oxidativo, inflamação ductal e estromal, fibrose e expansão da glândula mamária, além do aumento da expressão de receptores de estrógeno (ER), os quais possuem potenciais riscos para conduzir ao aparecimento do câncer de mama (Bostanci et al., 2015), o que indica que o estresse oxidativo pode também ser associado a deficiência, além do acúmulo de zinco intracelular.

Evidências crescentes têm implicado diretamente na desregulação do metabolismo do zinco celular em câncer de mama (Taylor et al., 2007; Kelleher et al., 2009; Lopez; Kelleher, 2010). Desta forma, o elevado acúmulo deste metal no tecido mamário está associado com sua malignidade (Santoliquido et al., 1976; Margalioth et al., 1983). Autores têm mostrado correlação entre os níveis elevados de zinco na glândula mamária e o início da carcinogênese (Cui et al., 2007). Esta observação é ainda apoiada pela demonstração de níveis de zinco significativamente mais elevados em biópsias de mama retiradas de mastectomias em comparação com o tecido mamário normal (Geraki et al., 2002; 2004). Alguns estudos também mostraram relação entre os baixos níveis deste micronutriente no plasma e o risco para o desenvolvimento de câncer de mama (Kuo et al., 2002; Adzersen et al., 2003; Taylor et al., 2011), o que levou à sugestão de que os níveis de zinco plasmáticos podem ser utilizados como um prognóstico, bem como marcadores terapêuticos para o câncer da mama (Kopanski et al., 2001; Oyama et al., 2003).

Os efeitos do zinco são, contudo, ambíguos (cancerígenos ou protetores), visto que, parecem ser muito complexos e se manifestam de forma dependente do tipo de neoplasia (Gumulec et al., 2011). A ubiquidade das funções do zinco em processos biológicos concentra-se na ideia de que este elemento está envolvido em numerosos processos celulares (Andreini et al., 2006; Maret; Li, 2009) e a sua regulação é importante não só no desenvolvimento e proliferação de tecidos, mas também na transformação neoplásica (Krishna et al., 2003; Yan et al., 2007). Determinados níveis de zinco celular afetam profundamente a saúde celular e apresentam inúmeros papéis na iniciação e progressão do câncer e, potencialmente, a prevenção. A interação entre os níveis de zinco, expressão de

transportadores de zinco, e função imunológica está entrelaçada com vias de sinalização celular fornecendo vários mecanismos para o papel do zinco no câncer (Grattan; Freaque, 2012).

5. Programação Fetal e efeitos da deficiência de zinco sobre a vida fetal e pós-natal

O conceito de programação fetal sugere que o feto pode ser programado durante o desenvolvimento intra-uterino para desenvolver doenças na vida adulta (Langley-Evans, 2004; Barker; 2004, 2006). Portanto, a programação pode se estender até a infância, onde diferentes órgãos e sistemas continuam se adaptando a vários estímulos (Calkins; Devaskar, 2011). Algumas décadas mais tarde, os efeitos da programação podem ser refletidos por adaptações irreversíveis, que resultam em mau funcionamento dos órgãos e sistemas, e também a diminuição na longevidade (Lucas, 1991). Este fenômeno é mostrado na **Figura 8**.

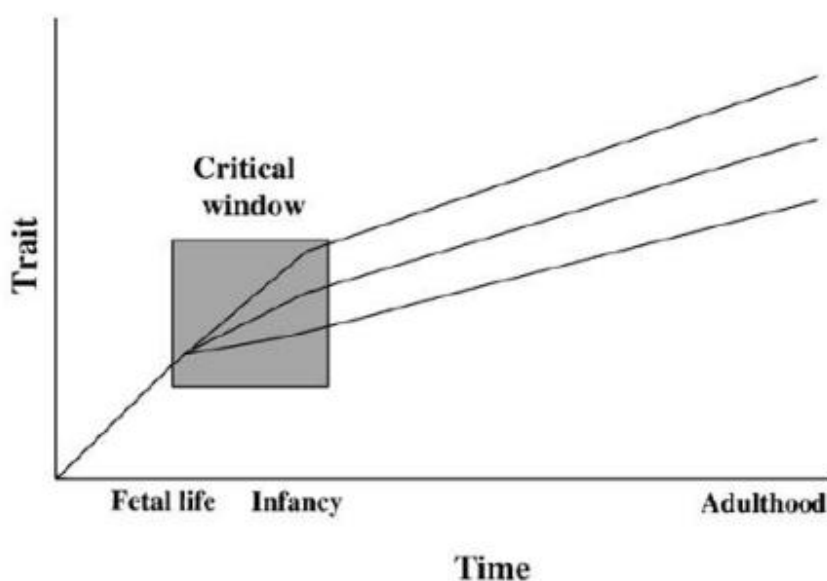


Figura 8. Diagrama da programação fetal. Fonte: (Wells, 2003).

De fato, a programação pode determinar de forma profunda o perfil da saúde e as doenças que irão acometer um indivíduo ao longo de sua vida (Wells, 2003). Quando o feto é colocado sob a influência de determinados estímulos durante o desenvolvimento embrionário, as respostas adaptativas que ocorrem nesse período podem ser memorizadas e fixadas permanentemente (Lucas, 1991; Ozanne et al 1996; Simmons et al 2001).

A gestação e início da vida pós-natal são períodos de desenvolvimento os quais apresentam sensibilidade e suscetibilidade a fatores ambientais (Godfrey; Barker, 2000; Cottrell; Ozanne, 2008). Durante estes períodos, o fornecimento de alimentos, tanto em termos de quantidade e qualidade é completamente depende de hábitos alimentares e nutricionais da mãe (Beck et al., 2012).

Estudos epidemiológicos e experimentais têm proposto que um ambiente pré-natal adverso, como perturbações nutricionais e metabólicas podem programar modificações em longo prazo, resultante de alterações adaptativas na expressão de genes e/ou seleção clonal de células adaptadas, preferencialmente em tecidos programados (Lucas, 1998; Alexander, 2006; Padmavathi et al., 2009).

Além da influência nutricional, a programação fetal também sugere que a susceptibilidade a doenças (incluindo disfunções reprodutivas) pode ser resultado do estresse durante o período fetal e neonatal e da exposição ambiental a agentes tóxicos (Heindel, 2007). Estas incluem doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, diabetes do tipo II, doenças renais, doenças pulmonares crônicas obstrutivas, osteoporose, esquizofrenia, depressão, câncer de mama e síndrome dos ovários policísticos (Ozane et al., 2004; Hilakivi-clarke, 2007; Langley-Evans; McMullen, 2010).

Trichopoulos (1990) sugere que alguns cânceres de mama originariam já no ambiente intra-uterino frente a exposições elevadas ao estrógeno materno. Nesse sentido, exposições hormonais no período pré-natal têm sido relacionadas à predisposição para o desenvolvimento do câncer de mama (Assis et al., 2006; Hilakivi-Clarke, 2007). Dieta, exposições ambientais e alterações endócrinas maternas podem aumentar o risco de câncer de mama por induzir no feto mudanças epigenéticas, ou seja, mudanças na expressão gênica, reversíveis e hereditárias, sem qualquer modificação na sequência do DNA (Hinshel et al., 2008) capazes de alterar a susceptibilidade a fatores de iniciação do câncer de mama (Lillicrop et al., 2005; Hilakivi-Clarke; Assis, 2006; Hilakivi-Clarke, 2007; Burdge et al., 2009).

A alimentação influencia diretamente o risco de desenvolvimento de câncer e o comportamento do tumor (Davis; Milner, 2007). Desde 1930 estudos epidemiológicos têm demonstrado a relação entre dieta e risco de câncer, dentre eles o de mama (Hill, 1997). Estima-se que a alimentação contribua para a etiologia de 30 a 50% de todos os cânceres de mama (Willet, 2001; Hilakivi-Clarke, 2007), o consumo de gordura animal, principalmente de carne vermelha e produtos lácteos durante o período pré-menopausal parece estar associado ao aumento do risco desse tipo câncer (Cho et al., 2003).

A deficiência de zinco, observada em mulheres gestantes e em recém-nascidos nos países em desenvolvimento e desenvolvidos é principalmente devido a um desequilíbrio entre a ingestão e o aumento da necessidade deste micronutriente nessas fases da vida, assim sua deficiência poderia ser um insulto nutricional para o desenvolvimento fetal e pós-natal (Vallee, 1993; Sandstead, 1995; Tomat et al., 2008; Tomat et al., 2010). Além disso, a deficiência de zinco também afeta indivíduos em fase de crescimento como crianças e adolescentes (Roohani et al., 2013). Os resultados de estudos experimentais realizados em animais e estudos observacionais em populações humanas mostram que a deficiência materna de zinco durante a gestação pode causar efeitos adversos na prole como morte embrionária ou fetal e disfunção imune precoce (Hess; King, 2009), além de complicações neurológicas, diabetes induzida por alterações do metabolismo do zinco materno e aumento do risco de complicações cardiovasculares, como hipertensão e disfunção renal, que persistem na vida adulta (Tomat et al., 2010).

Varios autores têm mostrado que a deficiência materna de zinco em animais reduz a secreção de leite, que pode ter implicações importantes para a transferência de nutrientes e para a saúde e desenvolvimento do lactente, sugerindo uma relação entre a deficiência materna de zinco e hipogalactia (Chowanadisai et al., 2004; Scheplyagina, 2005; Dempsey et al., 2012). Além disso, o zinco poderia programar doenças do adulto por mecanismos epigenéticos, uma vez que controla reações de metilação e modificações epigenéticas do DNA e histonas (metilação e acetilação de histonas) (Keen et al., 2003; Maret; Sandstead, 2008).

Embora os efeitos da ingestão de macronutrientes durante a gestação em doenças crônicas na prole adulta têm sido o tema de muitos estudos, os efeitos de micronutrientes, especialmente oligoelementos, são mal compreendidos (Padmavathi et al., 2009).

O interesse na relação programação uterina e doenças humanas na vida adulta tem sido crescente nos últimos anos. A utilização de modelos experimentais com animais favoreceu o entendimento das relações entre modificações do ambiente materno e a saúde da prole ao longo da vida. A natureza dos estudos em animais concentra-se tipicamente na alteração de aspectos específicos da nutrição materna (redução do conteúdo proteico, restrição alimentar global ou menor consumo de calorias) durante períodos críticos do desenvolvimento (início do desenvolvimento, períodos de organogênese, crescimento fetal) e os resultados destas alterações na saúde e no desenvolvimento da prole (Watkins; Fleming, 2009).

Diante da alta prevalência de câncer de mama e das evidências de sua possível origem fetal, alguns estudos epidemiológicos e experimentais têm buscado elucidar a associação da nutrição materna durante a gestação e risco de desenvolvimento de câncer nos

descendentes. (Hilakivi-Clarke; Assis, 2006; Khan et al.,2007; Burdge et al., 2009). Desta forma, nosso interesse se voltou na avaliação dos efeitos da deficiência e suplementação de zinco nas fases iniciais da vida e período juvenil, e a susceptibilidade ao desenvolvimento de neoplasias mamárias induzidas pela DMBA.

6. Referências

Adzersen KH, Jess P, Freivogel KW, Gerhard I, Bastert G. Raw and cooked vegetables, fruits, selected micronutrients, and breast cancer risk: A case-control study in Germany. *Nutr Cancer*, 2003;46: 131-7.

Ahn Y. Signaling in tooth, hair, and mammary placodes. *Curr Top Dev Biol*. 2015;111:421-59.

Alam S, Kelleher SL. Cellular Mechanisms of Zinc Dysregulation: A Perspective on Zinc Homeostasis as an Etiological Factor in the Development and Progression of Breast Cancer. *Nutrients*. 2012;4:875-903.

Alexander BT. Fetal programming of hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290:1-10.

AlQallaf B, Sorkhou I, Sarkhou N. Breast cancer among ever married kuwaiti women reproductive, menstrual and menopausal factors. *Bull Alex Fac Med*. 2007;43:1-10.

Andersson T, Johansson M, Bolmsjo G, James P. Automating MALDI sample plate loading. *J Proteome Res*. 2007;6:894-6.

Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res*. 2006;5:196-201.

Assis S, Wang M, Goel S, Forxworth A, Helferich W, Hilakivi-Clarke L. Excessive Weight Gain during Pregnancy Increases carcinogen-Induced Mammary Tumorigenesis in Sprague-Dawley and Lean and Obese Zucker Rats. *J Nutr*. 2006;136:998-1004.

Balinsky BI. On the pre-natal growth of the mammary gland rudiment in the mouse. *J Anat* 1950;84:227-35.

Bargellini A, Piccinini L, De Palma M, Giacobazzi P, Scaltriti S, Mariano M, et al. Trace elements, anxiety and immune parameters in patients affected by cancer. *J Trace Elem Med Biol*. 2003;17:3–9.

Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol*. 2006;49:270-283.

Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr*. 2004;23:588-595.

Bay BH, Jin R, Huang J, Tan PH. Metallothionein as a prognostic biomarker in breast cancer, *Exp Biol Med*. 2006;231:1516-21.

Beck B, Richy S, Archer ZA, Mercer JG. Ingestion of carbohydrate-rich supplements during gestation programs insulin and leptin resistance but not body weight gain in adult rat offspring. *Front Physiol*. 2012;3:224.

Bhuloka Reddy S, Charles MJ, Naga Raju GJ, Seetharam I Reddy B, Seshi Reddy T, et al. Trace Elemental Analysis of Cancer - afflicted Intestine by PIXE Technique. *Biol Trace Elem Res*. 2004;102:265-81.

Blindauer CA, Schmid R. Cytosolic metal handling in plants: determinants for zinc specificity in metal transporters and metallothioneins. *Metallomics*. 2010;2:510.

Boone CW, Steele VE, Kelloff GJ. Screening for chemopreventive (anticarcinogenic) compounds in rodents. *Mutat Res*. 1992;267:251-5.

Bostanci Z, Mack RP, Lee S, Soybel DI, Kelleher SL. Paradoxical zinc toxicity and oxidative stress in the mammary gland during marginal dietary zinc deficiency. *Reprod Toxicol*. 2014;54:84-92.

Bouchardy C, Fioretta G, Verkooijen HM, Vlastos G, Schaefer P, Delaloye JF, et al. Recent increase of breast cancer incidence among women under the age of forty. *Br J Cancer*. 2007;96:1743-6.

Brown KH, Pearson JM, Rivera J, Allen LH. Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of prepubertal children: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 2002;75:1062-71.

Brown KH, Rivera JA, Bhutta Z, Gibson RS, King JC, Lonnerdal B, et al. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document 1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutr Bull*. 2004;25:99-203.

Burdge GC, Lillycrop KA, Jacson AA. Nutrition in early life, and risk of cancer and metabolic disease: alternative endings in an epigenetic tale? *Br J Nutr.* 2009;101:619-30.

Calkins K, Devaskar U. Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2011;41:158-76.

Cancer Genome Atlas Network, Comprehensive molecular portraits of human breast tumours, *Nature.* 2012;490:61-70.

Caulfield LE, Zavaleta N, Shankar A, Merialdi M. Potential contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival. *Am J Clin Nutr.* 1998;68:499-508.

Chasapis CT, Loutsidou AC, Spiliopoulou CA, Stefanidou ME. Zinc and human health: An update. *Arch Toxicol.* 2011;86:521-34.

Cho E, Spiegelman D, Hunter DJ, Chen WY, Stampfer MJ, Colditz GA, et al. Premenopausal fat intake and Risk of Breast cancer. *J Nat Cancer Inst.* 2003;85:1079-85.

Chowanadisai W, Kelleher SL, Lonnerdal B. Maternal zinc deficiency raises plasma prolactin levels in lactating rats. *J Nutr.* 2004;134:1314-9.

Cichon MA, Degnim AC, Visscher DW, Radisky DC. Microenvironmental Influences that Drive Progression from Benign Breast Disease to Invasive Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010;15:389-97.

Cordon-Cardo C. Molecular alterations in bladder cancer. *Cancer Surv.* 1998;32:115-31.

Cowin P, Wysolmerski J. Molecular mechanisms guiding embryonic mammary gland development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2:3251.

Cui Y, Vogt S, Olson N, Glass AG, Rohan TE. Levels of zinc, selenium, calcium, and iron in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2007;16:1682-5.

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

Davis CD, Milner JA. Biomarkers for diet and cancer prevention research: potentials and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2007;28:1262-73.

de Assis S, Galam K, Hilakivi-Clarke, L. High birth weight increases mammary tumorigenesis in rats. *Int J Cancer*. 2006;119:1537-46.

Dempsey C, McCormick NH, Croxford TP, Seo YA, Grider A, Kelleher SL. Marginal Maternal Zinc Deficiency in Lactating Mice Reduces Secretory Capacity and Alters Milk Composition. *J Nutr*. 2012;142:655-60.

Desantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61:409-18.

Dipple A, Mosche RC, Bigger, CAH. Polynuclear aromatic carcinogens. In: Searle CE *Chemical Carcinogenesis*, Washington, DC: ACS Monograph Series, No 182. 1984;1:41-163.

Donadelli M, Dalla Pozza E, Scupoli MT, Costanzo C, Scarpa A, Palmieri M. Intracellular zinc increase inhibits p53(-/-) pancreatic adenocarcinoma cell growth by ROS/AIF-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793:273-80.

Dragan YP, Rizvi T, Xu YH, Hully JR, Bawa N, Campbell HA, et al. An initiation-promotion assay in rat liver as a potential complement to the 2-year carcinogenesis bioassay. *Fundam Appl Toxicol*. 1991;16:525-47.

Eide D J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1763:711-22.

Eide DJ. The oxidative stress of zinc deficiency. *Metallomics* 2011;3:1124-29.

Ercan C, van Diest PJ, Vooijs M. Mammary Development and Breast Cancer: The Role of Stem Cells. *Curr Mol Med*. 2011;11:270-85.

Fenech M, Ferguson LR. Vitamins/minerals and genomic stability in humans. *Mut Res*. 2001; 475:1-6.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN (2012) v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No 11. 2013 [Internet]. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

Finley JW. Proposed criteria for assessing the efficacy of cancer reduction by plant foods enriched in carotenoids, glucosinolates, polyphenols and selenocompounds. *Ann Bot*. 2005;95:1075-96.

Franklin RB, Costello LC. Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers. *Biochem Bioph.* 2007;463:211-17.

Fujii T. Presence of zinc in nucleoli and its possible role in mitosis. *Nature.* 1954;174:1108-9.

Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2002;4:70-6.

Gaur A, Collins H, Wulaningsih W, Holmberg L, Garmo H, Hammar N, et al. Iron metabolism and risk of cancer in the Swedish AMORIS study. *Cancer Causes Control.* 2013;24:1393-402.

Geraki K, Farquharson MJ, Bradley DA. Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study. *Phys Med Biol.* 2002;47:2327-39.

Geraki K, Farquharson MJ, Bradley DA. X-ray fluorescence and energy dispersive X-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue. *Phys Med Biol.* 2004;49:99-110.

Gjorevski N, Nelson CM. Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12:581-93.

Godfrey KM, Barker DJP. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1344-52.

Grattan BJ, Freake HC. Zinc and cancer: implications for LIV-1 in breast cancer. *Nutrients* 2012;4:648-75.

Grubbs CL, Hill DL, McDonough KC, Peckman JC. N-nitroso-N-methylurea-induced mammary carcinogenesis: effect of pregnancy on preneoplastic cells. *J Natl Cancer Inst.* 1983;71:625-28.

Gumulec J, Masarik M, Krizkova S, Adam V, Hubalek J, Hrabeta J, et al. Insight to Physiology and Pathology of Zinc (II) Ions and Their Actions in Breast and Prostate Carcinoma. *Curr Med Chem.* 2011;18:5041-51.

Gunasinghe NP, Wells A, Thompson EW. Mesenchymal epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metast Rev.* 2012; 31:469-78.

Guo L, Lichten LA, Ryu MS, Liuzzi JP, Wang F, Cousins RJ. STAT5- glucocorticoid receptor interaction and MTF-1 regulate the expression of ZnT2 (Slc30a2) in pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2010;107:2818-23.

Hambidge M. Human zinc deficiency. *J Nutr*. 2000;130:1344-9.

Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: Clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88:1442-55.

Halttunen T, Good C, Makela S, Hilakivi-Clarke L. Maternal flaxseed diet during pregnancy or lactation increases female rat offspring's susceptibility to carcinogen-induced mammary tumorigenesis. *Reprod Toxicol*. 2007;23:397-406.

Hartmann PE. The lactating breast: An overview from down under. *Breastfeed Med*. 2007;2:3-9.

Hashemi M, Ghavami S, Eshraghi M, Booy EP, Los M. Cytotoxic effect of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells. *Eur J Pharmacol*. 2007;557:9-192.

Hassiotou F, Geddes D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat*. 2012;26:29-48.

Heindel JJ. Role of exposure to environmental chemicals in the developmental basis of disease and dysfunction. *Reprod Toxicol*. 2007;23:257-9.

Hennigar SR, Kelleher SL. Zinc networks: the cell-specific compartmentalization of zinc for specialized functions. *Biol Chem*. 2012;393:565-78.

Hens JR, Dann P, Zhang JP, Harris S, Robinson GW, Wysolmerski J. BMP4 and PTHrP interact to stimulate ductal outgrowth during embryonic mammary development and to inhibit hair follicle induction. *Development*. 2007;134:1221-30.

Hess SY, King JC. Effects of maternal supplementation on pregnancy and lactation outcomes. *Food Nutr Bull*. 2009;30:60-76.

Hilakivi-Clarke L, Assis S. Fetal origins of breast cancer. *Trends in endocrinology and Metabolism*. 2006;1:340-8.

Hilakivi-Clarke L, Clarke R, Onojafe I, Raygada M, Cho E, Lippman ME. A maternal diet high in n-6 polyunsaturated fats alters mammary gland development, puberty onset, and breast cancer risk among female rat offspring. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94:9372-7.

Hilaviki-Clarke L. Nutritional Modulation of Terminal End Buds: Its Relevance to Breast Cancer. *Prevention. Current Cancer Drug Targets*. 2007;7:465-74.

Hill MJ. Nutrition and human Cancer. *Annals New York Academy of Sciences*. 1997;833:68-78.

Hinck L, Silberstein GB. Key stages in mammary gland development: the mammary end bud as a motile organ. *Breast Cancer Res*. 2005;7:245-51.

Hinshel Wood RA, Clark SJ. Breast cancer epigenetic: normal human mammary epithelial cells as a model system. *J Mol Med*. 2008;86:1315-28.

Ho E, Ames BN. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkB, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *PNAS*. 2002;26:16770-5.

Ho E, Courtemanche C, Ames BN. Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases p53 expression in human lung fibroblasts. *J Nutr*. 2003;133:2543-8.

Hogg NA, Harrison CJ, Tickle C. Lumen formation in the developing mouse mammary gland. *J Embryol Exp Morphol*. 1983;73:39-57.

Hondermarck H. Breast cancer – when proteomics challenges biological complexity. *Mol Cell Proteomics*. 2003;2:281-91.

Hovey RC, McFadden TB, Akers RM. Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1999;4:53-68.

Hui C, Bin YU, Xiaoping YU, Long YI, Chunye C, Mantian MI, et al. Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo. *Nutr Cancer*. 2010;68:1128-36.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil [internet] Rio de Janeiro: INCA; 2014 [acesso outubro 2015]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>.

Jayaraman AK, Jayaraman S. Increased level of exogenous zinc induces cytotoxicity and up-regulates the expression of the ZnT-1 zinc transporter gene in pancreatic cancer cells. *J Nutr Biochem.* 2011;79-88.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Câncer statistics, 2010. *CA Câncer J Clin.* 2010;60:277-300.

Jeong J, Eide DJ. The SLC39 family of zinc transporters. *Mol Aspects Med.* 2013;4:612-9.

John E, Laskow TC, Buchser WJ, Bruce RP, Basse PH, Butterfield LH, et al. Zinc in innate and adaptive tumor immunity. *J Transl Med.* 2010;8:118.

Kagara N, Tanaka N, Noguchi S, Hirano T. Zinc and its transporter ZIP10 are involved in invasive behavior of breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2007;98:692-7.

Kambe T, Narita H, Yamaguchi-Iwai Y, Hirose J, Amano T, Sugiura N, et al. Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *J Biol Chem.* 2002;277:19049-55.

Kasper G, Weiser AA, Rump A, Sparbier K, Dahl E, et al. Expression levels of the putative zinc transporter LIV-1 are associated with a better outcome of breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2005;117:961-73.

Keen CL, Hanna LA, Lanoue L, Uriu-Adams JY, Rucker RB, Clegg MS. Developmental consequences of trace mineral deficiencies in rodents: acute and long-term effects. *J Nutr.* 2003;133:1477-80.

Kelleher SL, Lonnerdal B. Zn transporter levels and localization change throughout lactation in rat mammary gland and are regulated by Zn in mammary cells. *J Nutr.* 133;2003: 3378-85.

Kelleher SL, Seo YA, Lopez V. Mammary gland zinc metabolism: regulation and dysregulation. *Genes Nutr.* 2009;4:83-94.

Kelleher SL, Velasquez V, Croxford TP, McCormick NH, Lopez V, Macdavid J. Mapping the zinc-transportingsystem in mammary cells: molecular analysis reveals a phenotype-dependent zinc-transporting network during lactation. *J Cell Physiol.* 2012;227:1761-70.

Kelleher SL, McCormick NH, Velasquez V, Lopez V. Zinc in Specialized Secretory Tissues: Roles in thePancreas, Prostate, and Mammary Gland. *Adv Nutr.* 2011;2:101-11.

King JC. Determinants of maternal zinc status during pregnancy. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1334-43.

Kloubert V, Rink L. Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells. *Food Funct.* 2015;6:3195-204.

Kopanski Z, Piekoszewski W, Habiniak J, Wojewoda T, Wojewoda A, Schlegel-Zawadzka M, et al. The clinical value of the determinations in the serum of zinc concentration in women with breast cancer. *Folia Histochem Cytobiol.* 2001;39:84-86.

Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV. Structural classification of zinc fingers. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:532-50.

Kuo HW, Chen SF, Wu CC, Chen DR, Lee JH. Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. *Biol Trace Elem Res.* 2002;89:1-11.

Lambreche FP, Goldberg MS. Exposure to organic solvents and breast cancer in women: a hypothesis. *Am J Ind Med.* 1997;32:1-14.

Langley-Evans SC, McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Medical principles and practice, Switzerland.* 2010;19:87-98.

Langley-Evans SC. Fetal nutrition and adult disease: Programming of chronic disease through fetal exposure to undernutrition. UK: CABI Publishing, 2004.

Larner F, Woodley LN, Shousha S, Moyes A, Humphreys-Williams E, Strekopytov S. Zinc isotopic compositions of breast cancer tissue. *Metallomics.* 2015;7:112-7.

Leone N, Courbon D, Ducimetiere P, Zureik M. Zinc, copper, and magnesium and risks for all-cause, cancer, and cardiovascular mortality. *Epidemiology.* 2006;17:308-14.

Lillicrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr.* 2005;135:1382-6.

Lin CY, Tsai PH, Kandaswami CC, Lee PP, Huang CJ, Hwang JJ, et al. Matrix metalloproteinase-9 cooperates with transcription factor Snail to induce epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Sci.* 2011;102:815-27.

- Líška J, Brtko J, Dubovický M. Relationship between histology, development and tumorigenesis of mammary gland in female rat. *Exp Anim*. 2015.
- Lopez V, Foolad F, Kelleher SL. ZnT2-overexpression represses the cytotoxic effects of zinc hyper-accumulation in malignant metallothionein-null T47D breast tumor cells, *Cancer Lett*. 2011;304:41-51.
- Lopez V, Kelleher SL. Zinc transporter-2 (ZnT2) variants are localized to distinct subcellular compartments and functionally transport zinc. *Biochem J*. 2009;422:43-52.
- Lopez V, Kelleher SL. Zip6-attenuation promotes epithelial-to-mesenchymal transition in ductal breast tumor (T47D) cells. *Exp Cell Res*. 2010;316:366-75.
- Lowery AJ, Miller N, Dwyer RM, Kerin MJ. Dysregulated miR-183 inhibits migration in breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2010;21:10-502.
- Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp*. 1991;156:38-50.
- Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr* 1998;128:401-6.
- Macejová D, Brtko J. Chemically induced carcinogenesis: a comparison of 1-methyl-1-nitrosurea, 7,12-dimethylbenzanthracene, diethylnitroso-amine and azoxymethan models (mini-review). *Endocrine Reg*. 2001;35:53-9.
- Macias H, Hinck L. Mammary Gland Development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2012; 1:533-57.
- Maret W, Li Y. Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem Rev*. 2009;109:4682-707.
- Maret W, Sandstead HH. Possible roles of zinc nutrition in the fetal origins of disease. *Exp Gerontol*. 2008;43:378-81.
- Maret W. Metalloproteomics, metalloproteomes, and the annotation of metalloproteins. *Metallomics*. 2010; 2:117.
- Maret W. Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals. *Biometals*. 2009;22:149-57.
- Margalioth EJ, Schenker JG, Chevion M. Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer*. 1983;52:868-72.

- Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC, Margot M IP. A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2000;5:165-85.
- McCall KA, Huang C, Fierke CA. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr* 2000;130:1437-46.
- McCormick N, Velasquez V, Finney L, Vogt S, Kelleher SL. X-ray fluorescence microscopy reveals accumulation and secretion of discrete intracellular zinc pools in the lactating mouse mammary gland. *PLoS One*. 2010;5:e11078.
- McCormick NH, Hennigar SR, Kiselyov K, Kelleher SL. The biology of zinc transport in mammary epithelial cells: implications for mammary gland development, lactation, and involution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2014;19:59-71.
- Milner JA. Molecular targets for bioactive food components. *J Nutr*. 2004;134:2492-8.
- Mittra I. Breast cancer screening in developing countries. *Prev Med*. 2011;53:121-2.
- Mulware SJ. The Mammary Gland Carcinogens: The Role of Metal Compounds and Organic Solvents. *Int J Breast Cancer*. 2013:640851.
- Nagasawa H, Yanai R, Shonoda M, Nakamura T, Tanabe Y. Effects of neonatally administered estrogen and prolactin on normal and neoplastic mammary growth and serum estradiol-17 level in rats. *Cancer Res*. 1974;34:2643-46.
- Nebert DW, Petersen DD, Fornace AJ. Cellular responses to oxidative stress: the [Ah] gene battery as a paradigm, *Environ. Health Persp*. 1990;88:13-25.
- Nguyen B, Keane MM, Johnston PG. The biology of growth regulation in normal and malignant breast epithelium: from bench to clinic. 1995;20:223-36.
- Oftedal OT. The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2002;7:225-52.
- Oteiza PI, Clegg MS, Keen CL. Short-term zinc deficiency affects nuclear factor-kappaB nuclear binding activity in rat testes. *J Nutr*. 2001;131:21-6.
- Oyama T, Kawamoto T, Matsuno K, Osaki T, Matsumoto A, Isse T, et al. A case-case study comparing the usefulness of serum trace elements (Cu, Zn and Se) and tumor markers (CEA, SCC and SLX) in non-small cell lung cancer patients. *Anticancer Res*. 2003;23: 605-12.

Ozane SE, Fernandez-Twinn D, Hales CN. Fetal growth and adult diseases. *Semin Perinatol*. 2004;28:81-7.

Ozanne SE, Wang CL, Coleman N, Smith GD. Altered muscle insulin sensitivity in the male offspring of protein-malnourished rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1996;271: 1128-34.

Padmavathi JN, Kishore YD, Venu L, Ganeshan M, Harishankar N, Giridharan NV, et al. Prenatal and perinatal zinc restriction: effects on body composition, glucose tolerance and insulin response in rat offspring. *Exp Physiol*. 2009;94:761-9.

Palmiter RD, Cole TB, Findley SD. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration, *EMBO J*. 1996;15:1784-91.

Palmiter RD, Huang L. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. In: Hediger MA, editor. *The ABC of solute carriers*. New York: Springer-Verlag. 2003.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55:74-108.

Paski SC, Xu Z. Labile intracellular zinc is associated with 3T3 cell growth. *J Nutr Biochem*. 2001;12:655-61.

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406:747-52.

Pitot HC. Adventures in hepatocarcinogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2007;2:1-29.

Pitot HC. Animal models of neoplastic development. *Dev Biol (Basel)*. 2001;106:53-57; discussion 7-9, 143-60.

Pitot HC. Multistage carcinogenesis genetic and epigenetic mechanisms in relation to cancer prevention. *Cancer Detect Prev*. 1993;17:567-73.

Polyak K, Kalluri R. The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2:3244.

Prasad A. Discovery of zinc deficiency in humans and its impact fifty years later. In: Rink L (ed) *Zinc in Human Health*. IOS Press Aachen. 2011;7-28.

Prasad AS, Beck FW, Snell DC, Kucuk O. Zinc in cancer prevention. *Nutr Cancer*. 2009;61:879-87.

Prasad AS. Zinc deficiency. *BMJ* 2003;326:409-10.

Prasad AS. Zinc: An overview. *Nutrition*.1995;11:93-99.

Prasad AS, Miale A Jr, Farid Z, Sandstead HH, Schulert AR. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism, and hypogonadism. *J Lab Clin Med*. 1963.

Prasad AS. Zinc deficiency in humans: A neglected problem. *J Am Coll Nutr*. 1998;17:542-43.

Preston RJ, Williams GM. DNA-reactive carcinogens: mode of action and human cancer hazard. *Crit Rev Toxicol*. 2005;35:673-83.

Propper AY, Howard BA, Veltmaat JM. Prenatal morphogenesis of mammary glands in mouse and rabbit. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2013;18:93-104.

Propper AY. Wandering epithelial cells in the rabbit embryo milk line. A preliminary scanning electron microscope study. *Dev Biol*. 1978;67:225-31.

Puca R, Nardinocchi L, Bossi G, Sacchi A, Rechavi G, Givol D, et al. Restoring wt p53 activity in HIPK2 depleted MCF7 cells by modulating metallothionein and zinc. *Exp Cell Res*. 2009;315:67-75.

Ray RS, Ghosh B, Rana A, Chatterjee M. Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: chemopreventive activity of vanadium in vivo and in vitro. *Int J Cancer*. 2007;120:13-23.

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.

Rink L, Gabriel P. Zinc and the immune system. *Proc Nutr Soc*. 2000;59:541-52.

Rink L. Zinc in Human Health. (ed) IOS Press Aachen. 2011.

Robinson GW. Cooperation of signalling pathways in embryonic mammary gland development. *Nat Rev Genet*. 2007;12:963-72.

Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci.* 2013;18:144-57.

Rudolf E, Cervinka M. Depletion of endogenous zinc stores induces oxidative stress and cell death in human melanoma cells. *Acta Med.* 2004;47:91-6.

Russell R, Beard JL, Cousins RJ. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. The National Academic Press. Washington DC. 2001.

Russo IH, Russo J. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect.* 1996;104:938-67.

Russo IH, Russo J. Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz a.anthracene. *J Natl Cancer.*1978;61:1439-49.

Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten MJ. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest.* 1990;62:244-78.

Russo J, Hu YF, Yang X, Russo IH. Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2000;17-37.

Russo J, Rivera R, Russo IH. Influence of age and parity on the development of the human breast. *Breast Cancer Res Treat.* 1992;23:211-8.

Russo J, Russo IH. Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. *Lab Invest.* 1987;57:112-37.

Russo J, Russo IH. Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. III. The cell of origin of rat mammary carcinoma. *Am J Pathol.* 1983;113:50-66.

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

Russo J, Russo IR. Development of the human breast. *Maturitas.*2004;49:2-15.

Russo J, Russo I. H. Influence of differentiation and cell kinetics on the susceptibility of the rat mammary gland to carcinogenesis. *Cancer Res.* 1980;40:2677-87.

Sakakura T. Mammary embryogenesis. In: Neville MC, Daniel CW, editors. The mammary gland, development, regulation and function. New York and London: Plenum. 1987:37-66.

Sandstead HH. Is zinc deficiency a public problem? *Nutrition* 11, Suppl. 1995;1:87-92.

Sandstrom B. Bioavailability of zinc. *Eur J Clin Nutr* 51, Suppl.1997;1:17-19.

Santoliquido PM, Southwick HW, Olwin JH. Trace metal levels in cancer of the breast. *Surg Gynecol Obstet*. 1976;142:65-70.

Scheplyagina LA. Impact of the mother's zinc deficiency on the woman's and newborn's health status. *J Trace Elem Med Biol*. 2005;19:29-35.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015;65:5-29.

Simmons RA, Templeton LJ, Gertz SJ. Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* 2001;50:2279-86.

Slaga TJ. Mechanisms involved in two-stage carcinogenesis in mouse skin. In: Slaga TJ. Mechanisms of Tumor Promotion: Tumor Promotion and Skin Carcinogenesis. CRC Press Inc. 1984;2:1-16.

Solomayer EF, Diel IJ, Meyberg GC, 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.

Song Y, Chung CS, Bruno RS, Traber MG, Brown KH, King JC, et al. Dietary zinc restriction and repletion affects DNA integrity in healthy men. *Am J Clin Nutr*. 2009;90: 321-8.

Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics*. 2006;7:127.

Sreekumar A, Roarty K, Rosen JM . The mammary stem cell hierarchy: a looking glass into heterogeneous breast cancer landscapes. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22:161-76.

Sternlicht MD, Sunnarborg SW, Kouros-Mehr H, YU Y, Lee DC, WERB Z. Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Development*. 2005;132:3923-33.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação (NEPA). Universidade de Campinas, UNICAMP. 2004. Disponível em URL: [http:// www.unicamp.br/nepa/taco](http://www.unicamp.br/nepa/taco).

Taylor K, Gee J, Kille P. Zinc and Cancer. In: Rink L (ed) Zinc in Human Health. IOS Press Aachen Germany. 2011.

Taylor KM, Morgan HE, Smart K, Zahari NM, Pumford S, Ellis IO, et al. The emerging role of the LIV-1 subfamily of zinc transporters in breast cancer. *Mol Med*. 2007;13:396-406.

Taylor KM, Vichova P, Jordan N, Hiscox S, Hendley R, Nicholson RI. ZIP7-mediated intracellular zinc transport contributes to aberrant growth factor signaling in antihormone-resistant breast cancer cells. *Endocrinology*. 2008;149:4912-20.

Taylor KM. LIV-1 breast cancer protein belongs to new family of histidine-rich membrane proteins with potential to control intracellular Zn²⁺ homeostasis. *IUBMB Life* 2000;49: 249-53.

Telang NT, Suto A, Wong GY, Osborne MP, Bradlow HL. Induction by estrogen metabolite 16 alpha-hydroxyestrone of genotoxic damage and aberrant proliferation in mouse mammary epithelial cells. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84:634-8.

Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, Kouraklis GP. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology*. 2004;45:103-18.

Thompson HJ, Singh M. Rat models of premalignant breast disease. *J Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2000;5:409-20.

Tomat A, Elesgaray R, Zago V, Fasoli H, Fellet A, Balaszczuk AM, et al. Exposure to zinc deficiency in fetal and postnatal life determines nitricoxide system activity and arterial blood pressure levels in adult rats. *Br J Nutr*. 2010;104:382-9.

Tomat AL, Inserra F, Veiras L, Vallone MC, Balaszczuk AM, Costa MA, et al. Moderate zinc restriction during fetal and postnatal growth of rats: effects on adult arterial blood pressure and kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:543-9.

Trichopoulos D. Hypothesis: does breast cancer originate in utero? *Lancet*. 1990;335:939-40.

- Trombino AF, Near RI, Matulka RA, Yang S, Hafer LJ, Toselli PA, et al. Expression of the aryl hydrocarbon receptor/transcription factor (AhR) and AhR-regulated CYP1 gene transcripts in a rat model of mammary tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat.* 2000; 63:117-31.
- Vallee BL, Auld DS. Cocatalytic zinc motifs in enzyme catalysis. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1993;90:2715-8.
- Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev.* 1993;73:79-118.
- Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Bernards R, et al. Expression profiling predicts outcome in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2003;5:57-8.
- Venning FA, Wullkopf L, Erler JT. Targeting ECM Disrupts Cancer Progression. *Front Oncol.* 2015;20:5-224.
- Watkins AJ, Fleming TP. Blastocyst environment and its influence on offspring cardiovascular health: the heart of the matter. *J Anatomy.* 2009;215:52-9.
- Watson CJ, Khaled WT. Mammary development in the embryo and adult: A journey of morphogenesis and commitment. *Development.* 2008;135:995-1003.
- Weigelt B, Peterse JL, Van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:591-602.
- Wells A, Yates C, Shepard CR. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clin Exp Metastasis.* 2008;25:621-8.
- Wells JCK. The thrifty phenotype hypothesis: thrifty offspring or thrifty mother? *J Theor Biol.* 2003;221:143-61.
- Willet WC. Diet and Breast cancer. *J Int Med.* 2001;249:395-411.
- World Health Organization (WHO) F.S. 2011, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>.
- Wu T. Serum iron, copper and zinc concentrations and risk of cancer mortality in US adults. *Ann Epidemiol.* 2004;14:195-201.

Yan M, Song Y, Wong CP, Hardin K, Ho E. Zinc Deficiency Alters DNA Damage Response Genes in Normal Human Prostate Epithelial Cells. J Nutr. 2008;138:667-73.

Yan W, Imanishi M, Futaki S, Sugiura Y. alpha-helical linker of an artificial 6-zinc finger peptide contributes to selective DNA binding to a discontinuous recognition sequence. Biochemistry. 2007;46:8517-24.

Yap X, Tan HY, Huang J, Lai Y, Yip GW, Tan PH, et al. Overexpression of metallothionein predicts chemoresistance in breast cancer. J Pathol. 2009;217:563-70.

* Referências padronizadas de acordo com as normas **Vancouver**

Objetivos

Tendo em vista a escassez de estudos que relacionam os possíveis efeitos da ingestão de dieta com deficiência ou suplementação de zinco durante as fases de gestação e lactação e suas repercussões na prole sobre a susceptibilidade ao câncer de mama na vida adulta, o presente estudo teve como objetivo investigar se a ingestão de dietas com deficiência ou suplementação de zinco durante a gestação, lactação e fase juvenil interfere na susceptibilidade ao desenvolvimento de carcinogênese mamária induzida por 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) em ratas da linhagem Sprague-Dawley (SD).

Capítulo II

Artigo

De acordo com as normas da revista **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**

Early-in-life dietary zinc supplementation or deficiency related to susceptibility to mammary carcinogenesis in female Sprague-Dawley rat

Flávia R. Moraes da Silva · Lucas T. Bidinotto · Robson F. Carvalho · Luis F. Barbisan

F.R.M. da Silva

Department of Pathology, Botucatu Medical School, UNESP - Univ Estadual Paulista,
Botucatu, SP, 18610-307, Brazil

e-mail: flavisbio@gmail.com

L.T. Bidinotto

Molecular Oncology Research Center, Barretos School of Health Sciences, Dr. Paulo Prata -
FACISB, Barretos, SP, 14785-002, Brazil

e-mail: lucasbidinotto@gmail.com

R.F. Carvalho

Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP - Univ Estadual Paulista,
Botucatu, SP, 18618-689, Brazil

e-mail: rcarvalho@ibb.unesp.br

L.F. Barbisan

Department of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP - Univ Estadual Paulista,
Botucatu, SP, 18618-689, Brazil

e-mail: barbisan@ibb.unesp.br

Abstract

The present study was designed to evaluate whether dietary intake with zinc deficiency or supplementation during the pregnancy, lactation and juvenile stages interfere the development of mammary glands and susceptibility to the mammary carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) in female rats Sprague-Dawley (SD) rats. Two generations, dams and female offspring received dietary with zinc levels adequate (35 mg/kg diet), deficiency (3 mg/kg diet) or supplementation (180 mg/kg diet) during pregnancy and lactation. After weaning, the females offspring received the same diets as their dams until post natal day (PND) 51 or 53. On PND 51, females SD were euthanized for removal of the mammary glands (right and left) or received a single dose of DMBA (50mg/kg, ig) for initiation of mammary carcinogenesis and euthanized on PND 53 or PND 180. On PND 53, mammary glands were processed for histological and immunohistochemical analyses, as well as evaluation of the expression of genes related to DNA damage and repair, apoptosis, cell cycle and signaling related to estrogen receptor and p53 by RT-qPCR with Taqman Low density array system (TLDA). Tumors collected throughout experiment or on PND 180 were processed for histological evaluation. The females fed with dietary zinc deficiency presented a significant reduction in body weight on PND 0, 10, 21 e 51. The mean number of the terminal buds (TEBs), terminal ducts (TEDs) and alveolar lobe (ABLs) in mammary gland did not differ among offspring of the three groups. On PND 53 the indexes of proliferation in the mammary glands epithelial cells were significantly higher in the zinc supplementation group in relation to the control group, while the indexes of apoptosis epithelial cell and positive ER- α did not differ among the groups. Also, dietary zinc supplementation significantly reduced the expression of the *Api5* and *Ercc1* genes related to apoptosis inhibitor and DNA repair, respectively. On PND 180 both dietary zinc deficiency as supplementation did not change the, latency, incidence, multiplicity or volume of DMBA-induced mammary tumors in relation to the control group. However, dietary zinc supplementation increased the total number of tumors in 72% compared to others groups. Therefore zinc supplementation during the early life and juvenile period marginally increased the susceptibility to the mammary tumors development.

Key Words: Mammary carcinogenesis, rat, zinc deficiency and zinc supplementation.

1. Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar se a ingestão de dietas com deficiência ou suplementação de zinco, durante as fases de gestação, lactação e juvenil, interfere no desenvolvimento das glândulas mamárias e na susceptibilidade ao desenvolvimento de carcinogênese mamária induzida pela 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) em ratas da linhagem Sprague-Dawley (SD). Duas gerações, mães e prole de fêmeas receberam dietas com níveis adequados (35mg/Kg dieta), deficientes (3mg/Kg dieta) ou com suplementação (180mg/Kg dieta) de zinco durante a gestação e lactação. Após o desmame, as proles de fêmeas receberam as mesmas dietas das mães até o dia pós-natal (DPN) 51 ou 53. No DPN 51 fêmeas SD foram eutanasiadas para remoção das glândulas mamárias abdominais (D e E) ou receberam dose única de DMBA (50mg/kg; i.g.) para iniciação da carcinogênese e eutanasiadas no DPN 53 ou DPN 180. No dia DPN 53 as glândulas foram processadas para análises histológicas e imunoistoquímicas, e avaliação da expressão de genes relacionados a dano e reparo de DNA, apoptose, ciclo celular e sinalização de genes relacionados ao receptor de estrógeno e p53, por RT-qPCR com sistema Taqman Low density array (TLDA). Os tumores coletados ao longo do experimento e no DPN 180 foram processados para avaliação histológica. As fêmeas alimentadas com dieta deficiente de zinco apresentaram redução significativa no peso corpóreo nos DPNs 0, 10, 21 e 51. O número médio de brotos terminais (TEBs), ductos terminais (TEDs) e lóbulos alveolares (ABLs) mamários não diferiram entre as proles dos três grupos experimentais. No DPN 53, os índices de proliferação nas células epiteliais mamárias foram significativamente maiores no grupo que recebeu suplementação de zinco em relação ao grupo controle, enquanto os índices de células epiteliais em apoptose e RE- α positivas não diferiram entre os grupos. Além disso, a suplementação de zinco reduziu significativamente a expressão dos genes *Api5* e *Ercc1*, que atuam como inibidor de apoptose e reparo de DNA, respectivamente. No DPN 180, tanto a deficiência quanto a suplementação de zinco na dieta não alteraram a latência, incidência, multiplicidade ou volume dos tumores mamários induzidos pela DMBA em relação ao grupo controle. No entanto, a suplementação de zinco aumentou o número total de tumores em 72% quando comparado aos demais grupos. Portanto a suplementação de zinco durante as fases iniciais da vida e período juvenil aumentou marginalmente a suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores mamários.

Palavras-chave: Carcinogênese mamária, rato, deficiência de zinco e suplementação de zinco.

2. Introdução

O zinco é um mineral essencial para o crescimento e desenvolvimento de todos os organismos (Kloubert and Rink, 2015), e necessário para o funcionamento de aproximadamente 10% das proteínas codificadas pelo genoma humano, que utilizam zinco para fins estruturais ou catalíticos (Ho and Ames, 2002; Andreini et al., 2006, 2009; Rink 2011; Prasad 2011). Essas proteínas participam de várias funções celulares, como respostas ao estresse oxidativo, manutenção da integridade do DNA e RNA, proliferação celular e apoptose, assim como regulação de pontos de verificação do ciclo celular através da proteína p53 (Harris, 1996; Gasco et al., 2002; Yan et al., 2008). O zinco é encontrado em uma grande variedade de alimentos tais como carnes bovinas e suínas, peixes, aves, leite e derivados, cereais e feijão (Taco, 2004), e a sua ingestão recomendada pelo conselho de alimentação e nutrição dos Estados Unidos (EUA) é de cerca de 8 mg/dia para mulheres e 11 mg/dia para homens (Russell et al., 2001).

Os resultados de deficiência de zinco afeta predominantemente mulheres em idade reprodutiva (Caulfield et al., 1998), assim como indivíduos em fase de crescimento como bebês, crianças e adolescentes (Roohani et al., 2013). Os desequilíbrios nutricionais de zinco nessas fases da vida são críticos para o desenvolvimento fetal e pós-natal (Sandstead, 1995; Sandstrom, 1997). Portanto, é de suma importância pesquisas que permitam o desenvolvimento de novas estratégias de suplementação de zinco em mulheres lactantes para melhorar a saúde e desenvolvimento infantil (Dempsey et al., 2012). O interesse na relação entre programação uterina e doenças humanas na vida adulta tem sido crescente nos últimos anos. A utilização de modelos experimentais com animais favoreceu o entendimento das relações entre modificações do ambiente materno e a saúde da prole ao longo da vida (Watkins and Fleming, 2009).

É provável que o zinco tenha importância na proteção contra o desenvolvimento de neoplasias, e na inibição do crescimento e proliferação de diversos tipos de células tumorais, incluindo células neoplásicas mamárias (Fraker et al., 2000; Silva, 2007; Franklin; Costello; 2009), especialmente por ser um componente essencial para ação antioxidante (Willett, 2001; Gaur et al., 2013). Além disso, o seu papel na manutenção da estabilidade genômica têm sido relatado (Eide, 2011).

Alguns estudos estabeleceram uma ligação intrínseca entre a deficiência de zinco na alimentação e um risco maior de desenvolver neoplasias (Leone et al., 2006). Desta forma, este elemento tem sido o objeto de investigações sobre a sua importância em processos

bioquímicos (McCall et al., 2000; Bargellini et al., 2003). A compreensão das vias bioquímicas, em que o metabolismo de zinco está envolvido no câncer mama, assim como em outros tipos de cânceres, é um dos principais desafios para um melhor entendimento da doença (Gumulec et al., 2011).

Evidências crescentes têm implicado diretamente na desregulação do metabolismo do zinco celular no câncer de mama (Taylor et al., 2007; Kelleher et al., 2009; Lopez and Kelleher, 2010). Desta forma, o elevado acúmulo deste metal no tecido mamário está associado com o desenvolvimento do tumor (Santoliquido et al., 1976; Margalioth et al., 1983). Estudos *in vivo* e *in vitro* revelaram que a deficiência de zinco celular leva ao aumento do estresse oxidativo e provoca danos no DNA (Fenech and Ferguson, 2001; Ho et al., 2003; Milner, 2004; Finley, 2005; Yan et al., 2008), o que resulta no desenvolvimento de neoplasias, como as de mama. Por outro lado, a suplementação de zinco tem mostrado papel importante na inibição do desenvolvimento desta neoplasia (Paski and Xu, 2001; Federico et al., 2001; Franklin and Costello, 2007; Hashemi et al., 2007). No entanto, estes dados permanecem conflituosos, pois alguns autores tem mostrado uma correlação entre os níveis elevados de zinco na glândula mamária e o início da carcinogênese (Cui et al., 2007).

Observações obtidas de estudos com modelos animais indicam que determinadas exposições no início da vida pode estar associados com alterações na vulnerabilidade a carcinogênese mamária, bem como alterações no número de brotos mamários que crescem como estruturas terminais (TEBs) e se diferenciam em brotos e lóbulos alveolares (ABL) (Grubbs et al., 1983; Russo and Russo, 1983, 1978, 1996). As células dos TEBs são consideradas o sítio primário de atividade cancerígena na glândula mamaria, pois essas células são incapazes de remover completamente os adutos de DNA (Macejová and Brtko, 2001). Assim, a ligação entre o aumento do número de TEBS e maior risco de câncer tem sido fortemente considerado (Hilakivi-Clarke et al., 1997; Hilakivi-Clarke et al., 2004; de Assis et al., 2006).

Diante da alta prevalência de câncer de mama, das evidências de sua possível origem fetal e dos mecanismos celulares em que o zinco está envolvido, alguns estudos epidemiológicos e experimentais têm buscado elucidar a associação entre zinco e câncer de mama (Kelleher et al., 2009; Lopez and Kelleher, 2010; Gumulec et al., 2011).

3. Objetivos

3.1. Objetivos Específicos

1. Investigar se a ingestão precoce de dietas deficientes ou suplementadas com zinco durante a gestação, lactação e fase juvenil interfere no desenvolvimento e diferenciação das estruturas mamárias normais em ratas da linhagem Sprague-Dawley (SD).
2. Identificar e correlacionar as alterações do desenvolvimento mamário normal, causadas pelas intervenções supracitadas, com o aumento na susceptibilidade ao desenvolvimento de carcinogênese mamária induzida por 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) em ratas da linhagem Sprague-Dawley (SD).
3. Verificar as alterações da expressão de genes relacionados ao dano, reparo, morte celular e proliferação celular e sinalização do receptor de estrógeno induzidas pela DMBA e os efeitos modificadores do zinco e das dietas supracitadas nos tecidos mamários coletados dois dias após a administração do cancerígeno.

4. Material e Métodos

4.1. Animais e ambiente de experimentação

Ratos machos (n= 20) e fêmeas (n= 60) da linhagem Sprague-Dawley (SD) foram adquiridos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Campinas – SP). Os machos e fêmeas foram instalados separadamente no Biotério do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP até atingirem a idade reprodutiva (12 semanas).

Durante a fase de crescimento foram mantidos cinco animais por gaiola de polipropileno de 41 x 34 x 16 cm, com tampa de aço inox na forma de grade e forradas com maravalha branca de pinho autoclavada. As gaiolas juntamente com a maravalha foram trocadas três vezes por semana seguindo protocolo pré-estabelecido pela Faculdade de Medicina. As condições ambientais do biotério de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$), fotoperíodo (ciclos 12 horas claro/12 horas escuro) e exaustão contínua do ar foram rigorosamente controladas durante toda a fase de crescimento e experimentação. Todos os animais receberam ração comercial (NUVILAB CR1 – NUVITAL, PR) e água filtrada em bebedouros de vidro com tampa de borracha e bico metálico (500 ml). A água e a ração foram fornecidas ad libitum.

4.2. Delineamento Experimental

Os procedimentos experimentais utilizados neste estudo foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética na experimentação animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de Botucatu, protocolo nº (917) (**Anexo 1**).

Após atingir a idade reprodutiva, duas fêmeas virgens foram colocadas com um macho por gaiola por 12h (período escuro). Todas as fêmeas foram então submetidas ao exame citopatológico para esfoliação vaginal que consistiu na introdução de haste flexível com algodão umedecido em solução de NaCl 0,9% na abertura vaginal em sentido horário, seguido do esfregaço do material contido na haste flexível em sentido anti-horário em lâminas histológicas. A presença de espermatozoides na esfoliação vaginal e identificação da fase de estro do ciclo em microscópio convencional (**Figura 1**), foi considerada como Dia Gestacional 0 (DG0). Esses procedimentos foram realizados todos os dias para obtenção de número de fêmeas prenhes proposto para cada grupo experimental. As fêmeas consideradas prenhes foram mantidas em gaiolas individuais, e receberam dieta padrão (AIN 93G) com níveis normais (35 mg/Kg dieta), deficiência (3 mg/Kg dieta) ou suplementação (180 mg/Kg dieta) de zinco e água ad libitum do dia gestacional 10 (DG10) ao 21º dia pós natal (DPN 21).



Figura 1. Fotomicrografia de esfregaço vaginal após 12 horas de acasalamento, considerado positivo. Presença de espermatozoides (seta preta) e células queratinizadas da fase estro do ciclo estral (seta vermelha).

Durante a fase gestacional foi avaliado peso corpóreo, consumo de água e de ração nos DG 0, 6, 9, 12, 15, 18 e 20, e semanalmente durante o período de lactação. O peso corpóreo da prole de filhotes foi documentado ao nascimento e no decorrer do experimento, e os consumos de água e de ração avaliados semanalmente.

Após o nascimento dos filhotes, foi realizada a sexagem por comparação da distância anogenital (esta distância no macho é duas vezes maior do que na fêmea), observação da papila genital (saliente no macho) e identificação dos mamilos nas fêmeas, que se tornam visíveis por volta de uma semana de vida. A sexagem e redução do número de filhotes por mãe foi realizada no DPN 0. Foram mantidos oito filhotes por mãe (cinco a seis fêmeas + dois ou três machos) de modo a garantir disponibilidade de leite materno igualitária entre todos os filhotes da ninhada. Os filhotes foram mantidos em gaiolas individuais com as mães até a idade do desmame (DPN 21). Após este período, as mães foram encaminhadas para eutanásia e a prole de fêmeas foi separada para experimentação, e distribuída da seguinte forma de acordo com a **Figura 2**:

Grupo 1: Prole de fêmeas SD de mães alimentadas com dieta deficiente em zinco (3 mg/Kg) durante a gestação e lactação e fêmeas das ninhadas até a fase juvenil (DPN 21 até o DPN 53).

Grupo 2: Prole de fêmeas SD de mães alimentadas com dieta com níveis normais de zinco (35 mg/Kg) durante a gestação e lactação e fêmeas das ninhadas até a fase juvenil (DPN 21 até o DPN 53) (Grupo controle).

Grupo 3: Prole de fêmeas SD de mães alimentadas com dieta suplementada com zinco (180 mg/Kg) durante a gestação e lactação e fêmeas das ninhadas até a fase juvenil (DPN 21 até o DPN 53).

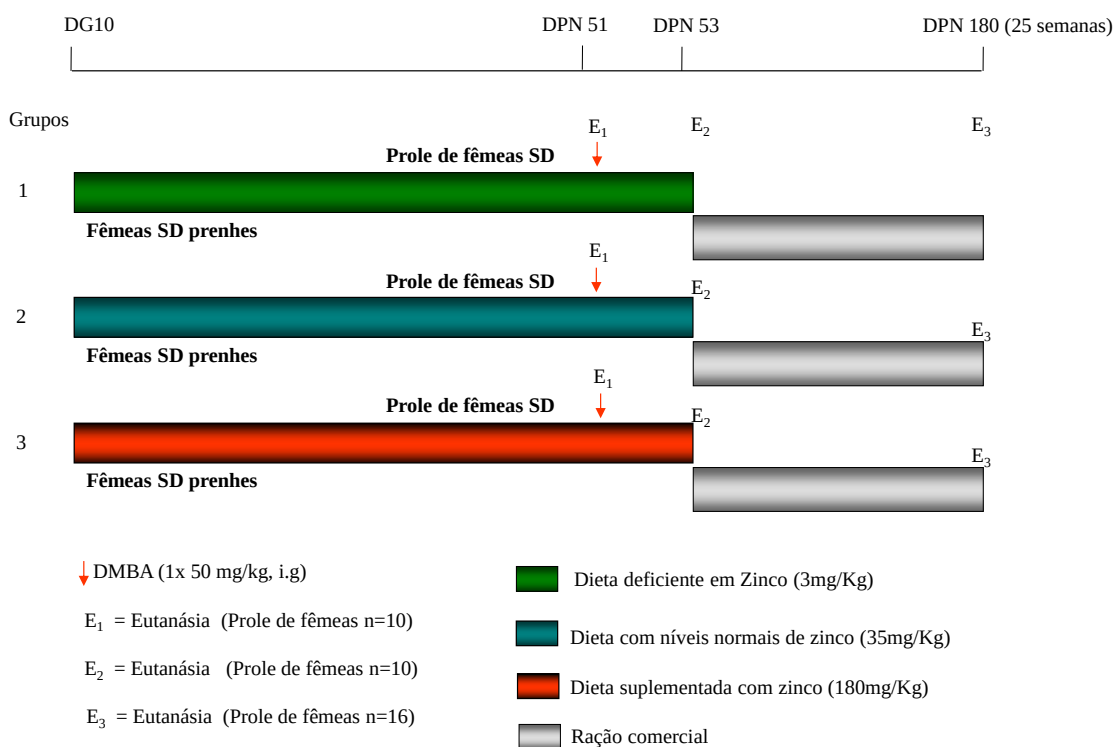


Figura 2. Protocolo experimental para avaliar o efeito de dietas com diferentes níveis de zinco durante as fases de gestação e lactação e fase juvenil na suscetibilidade a carcinogênese mamária em fêmeas da linhagem Sprague-Dawley.

4.3. Preparo da ração com adição de zinco

A dieta padrão (AIN 93G com modificações na fonte de gordura (óleo de milho ao invés de óleo de soja) e adição de níveis normais de zinco (35 mg/Kg) ou dieta deficiente (3 mg/Kg) ou suplementada (180 mg/Kg) de zinco foram adquiridas da HN & C – Consultoria em Nutrição Experimental na forma de pó (**Tabela 1**). A dieta foi umidificada na unidade de pesquisa experimental UNIPLEX/UNESP em misturador industrial (CAF-modelo M60), em seguida foi peletizada em máquina peletizadora de ração (Chavantes- PR), seca por ventilação e acondicionada em sacos plásticos previamente identificados e mantidos sobre refrigeração (-5°C) até o momento do uso.

Tabela 1. Composição das rações semi-purificadas

Ingredientes	Dieta Padrão AIN-93G ¹	Dieta Deficiente em zinco (teste)	Dieta Suplementada com zinco (teste)
Gordura (mg) (óleo de milho %)	7	7	7
Proteína (mg) (%)	20	20	20
Carboidrato (mg) (%)	64	64	64
Cálcio (mg/g) ²	0,5	0,5	0,5
Vitaminas D ₃ (IU/g) ²	1	1	1
Fósforo (PO ₄) (mg/g) ²	0,3	0,3	0,3
Zinco (Zn) (mg/g) ²	0,035	0,003	0,18
Fibra (celulose) (%)	5	5	5
Ácido Fólico (mg/g) ²	2,3	2,3	2,3
L-cistina (%)	0,3	0,3	0,3
L-cisteína (%)	-	-	-
Colina (%)	0,2	0,2	0,2

¹AIN-93G Diet for Gestating and Growing Rodents

²mg/g ou IU/g da Mistura de Vitaminas ou Minerais

4.4. Período gestacional, lactacional e juvenil até o DPN 51 e 53

Exemplares das proles de fêmeas SD (n=10 por grupo sendo 1 fêmea/ninhada) foram eutanasiadas no DPN51. A eutanásia procedeu-se por injeção intraperitoneal de quetamina/xilazina. Após a narcose foram coletados 1,5 ml de sangue de cada animal por punção cardíaca para análise de níveis séricos de estradiol e progesterona. As amostras de sangue foram mantidas por aproximadamente 15 minutos em tubos de polipropileno de 5 ml, devidamente identificados e sem anti-coagulante. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas para separação do soro, coletado cerca de 500 µl e mantidas a -20° C. Todas as amostras de soro foram encaminhadas para determinação dos hormônios estradiol e progesterona (quimioluminescência), em laboratório privado. Após a eutanásia as glândulas mamárias abdominais direitas foram removidas e seguidas para processamento da montagem total, conforme o protocolo descrito por de Assis et al (2010). As glândulas mamárias abdominais esquerdas também foram coletadas, estendidas em papel filtro e, posteriormente, fixadas para obtenção de cortes histológicos para análises de hematoxilina-eosina (HE) e imunoistoquímica.

Exemplares das proles de fêmeas SD (n=10 por grupo sendo 1 fêmea/ninhada) foram eutanasiadas no DPN53 após a administração de dose oral única de 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA, 50 mg/kg, Sigma-Aldrich, EUA) no DPN 51. A eutanásia procedeu-se após a injeção intraperitoneal de quetamina/xilazina. Após a eutanásia, as glândulas mamárias abdominais direita foram coletadas em criotubos de 2 ml e armazenadas a -80° C. Essas amostras foram encaminhadas para processamento de análise da expressão de genes relacionados a dano e reparo de DNA, proliferação e morte celular, sinalização de receptor de estrógeno e p53 por RT-PCR em tempo real com sistema TLDA. As glândulas mamárias abdominais esquerdas também foram coletadas para obtenção de cortes histológicos para análises de HE e imunoistoquímica.

4.5. Período adulto DPN 51 ao 180

Exemplares das proles de fêmeas SD (n=16 por grupo sendo 1 fêmeas/ninhada) foram iniciadas para carcinogênese mamária com dose única oral de DMBA (50 mg/kg, Sigma-Aldrich, EUA) no DPN 51. Esses grupos de fêmeas foram alimentados com ração contendo os mesmos níveis de zinco do DPN 53 ao 180. Cada fêmea foi avaliada clinicamente por apalpação a cada dois dias, durante todo o período experimental, com o intuito de detectar e registrar o desenvolvimento dos tumores mamários, sendo registrado o dia de aparecimento e sua localização anatômica. Após a eutanásia por injeção intraperitoneal de quetamina/xilazina foram coletadas amostras de tumores mamários. Essas amostras foram fixadas em formalina tamponada 10%, processadas e embebidas em parafina, cortadas a 5 μ m de espessura em micrótomo rotativo e coradas pela HE.

Durante a necropsia dos animais foi calculado volume de cada tumor pelo método de determinação do volume de elipses (*largura x altura x profundidade x 0,75 x 3,141592*) (Dias et al., 2013). Os tumores mamários induzidos pela DMBA foram agrupados em três categorias levando-se em consideração seu volume médio em cada um dos grupos experimentais: pequeno (0,01 a 4,23 cm³), médio (4,24 a 8,46 cm³) ou grande (8,47 a 12,7 cm³). Para isso, os tumores foram ordenados em três intervalos representados por um terço dos volumes tumorais.

O diagnóstico e características histopatológicas das neoplasias mamárias foram analisados em cortes histológicos corados por HE, com base em critérios histopatológicos pré-estabelecidos (Costa et. al., 2002; Russo and Russo, 2000). A incidência, multiplicidade e latência tumoral foram calculadas para os diferentes grupos experimentais (Grassi et al., 2011).

4.6. Montagem Total da Mama

A solução para coloração de Carmine Alum Stain constituiu de 1g de Carmine (Sigma-Aldrich Co., EUA, LLC – CAS 1390-65-4) e 2,5g de alumínio potássio sulfato dodecahidratado (Sigma-Aldrich Co. LLC - CAS 7784-24-9) dissolvidos em 500 ml de água destilada e fervidos por 20 minutos. Posteriormente, o volume final foi ajustado para 500 ml de água, filtrado e refrigerado até o momento de uso.

Após a eutanásia dos animais no DPN 51, as glândulas mamárias abdominais direitas foram removidas, esticadas em lâminas, fixadas em formalina tamponada 10% por 48 h e seguidas para processamento da técnica de montagem total. As lâminas contendo as glândulas mamárias foram colocadas em recipiente com a solução de coloração Carmine Alum e mantidas imersas por 2 dias em agitação. Depois de coradas as lâminas foram removidas do corante e lavadas em álcool 70%, 95% e 100% permanecendo 1 hora em cada solução. Após essa etapa, as lâminas foram colocadas em xilol e permaneceram até o tecido adiposo da glândula mamária apresentar transparência (dois dias ou mais), e posteriormente seguidas para montagem com lamínula e Permount.

A análise morfométrica da mama foi realizada pela medida (em milímetros) da distância entre o final da borda do linfonodo e as margens mais externas da glândula mamária (10 animais por grupo) (**Figura 3**), em lupa com objetiva de 1x (Leica MZ12 – Japan - DF C 420). (Leica MZ12 – Japan - DF C 420) acoplada a um sistema de captura e análise de imagens. Foi realizada a contagem de estruturas terminais (TEB: estrutura ductal terminal > 100 µm de diâmetro e que apresentam de 3 a 6 camadas de células epiteliais na periferia do broto mamário; TED: com diâmetro menor que 100 µm e com uma ou 3 camadas de células epiteliais entre o lúmen ductal e borda externa da estrutura e ABL de 5 a 10 brotos alveolares (**Figura 4**).

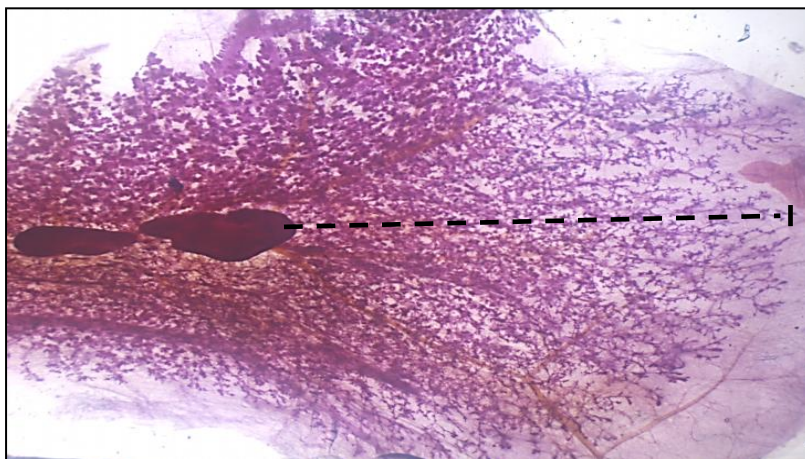


Figura 3. Montagem total mostrando a extensão da árvore epitelial (linha preta pontilhada) em relação a superfície do linfonodo (seta preta) em lupa com objetiva de 1x, de glândula mamária de ratas SpragueDawley do DPN 51.

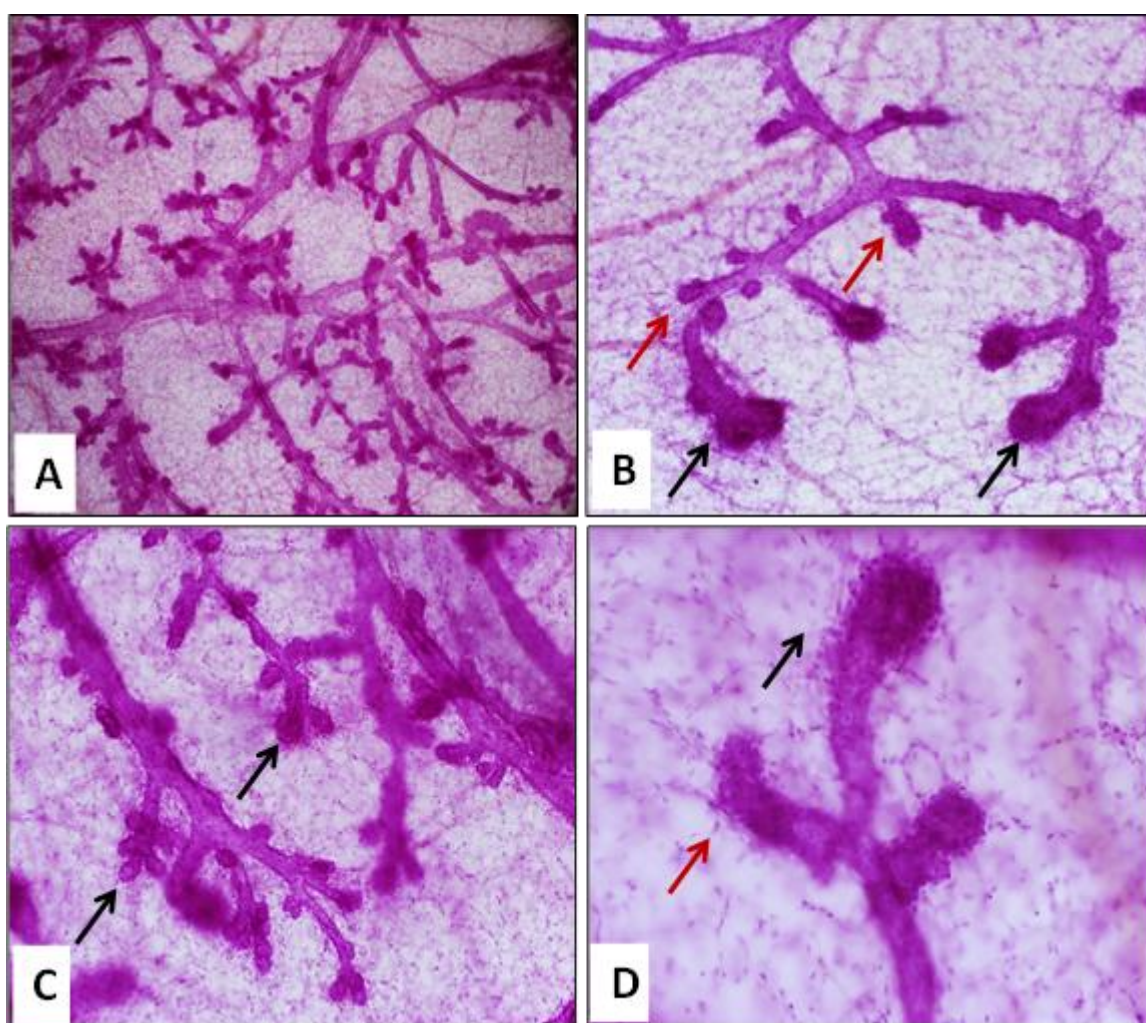


Figura 4. Fotomicrografia de mama de ratas SpragueDawley com 51 dias de idade preparadas pela técnica de montagem total. (A) visão microscópica das estruturas (4x); (B) TEBs (setas pretas) e TDs (setas vermelhas) (20x); (C) ABLs (setas) (20x); (D) Detalhe doTEB (seta preta) e TED (seta vermelha) (40x).

4.7. Análises histológica e imunoistoquímica

Os critérios utilizados para definição e classificação histológica de neoplasias de mama foram classificados segundo critérios publicados na literatura (Thompson and Singh, 2000). O índice de apoptose foi analisado pelo método de HE, a expressão de Ki-67, do receptor de estrógeno alfa (RE- α) foi detectada pela técnica imunoistoquímica do complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (ABC) (Hsu and Raine, 1981). As células epiteliais mamárias Ki-67 ou RE- α -positivas foram analisadas nas mamas abdominais esquerdas (ductos e alvéolos mamários) coletadas no DPN 53, dois dias após a aplicação do DMBA. Células epiteliais mamárias ductais e alveolares em apoptose foram identificadas por critérios morfológicos (Russo and Russo 1987).

Os valores dos índices de marcação de Ki-67 (IM%) ou RE- α (IM%) e de células apoptóticas (IA%) foram determinados dividindo-se o número de núcleos positivos ou de células epiteliais mamárias em apoptose pelo número de células analisadas de cada animal, e multiplicando-se por 100.

Os anticorpos e reagentes utilizados na reação imunoistoquímica foram: anticorpo policlonal IgG de camundongo anti-Ki-67 (ABCAM, EUA), anticorpo monoclonal IgG de camundongo anti-ER-alfa (Biocare Medical, EUA), e sistema de polímero Dako LSAB + System – HRP (Dako, Dinamarca).

4.8. Dosagens bioquímicas de progesterona e estradiol

As dosagens séricas de progesterona e estradiol da prole de fêmeas (10 animais/grupo) foram realizadas pelo método de quimiluminescência no laboratório Vitae cromatografia líquida em análises clínicas Ltda, São Paulo SP.

4.9. Extração, quantificação e análise da qualidade de RNA das glândulas mamárias.

A extração de RNA total das amostras de glândulas mamárias abdominais direitas de cada grupo experimental no DPN 53 foi realizada com o kit RNeasy Mini Kit® (QIAGEN, Valencia CA, USA) seguindo o protocolo do fabricante.

A extração de RNA foi iniciada com fragmentos de aproximadamente 100mg de tecido congelado que foram imediatamente colocados em 1 ml de qiazol para início da lise do tecido mamário. As amostras foram trituradas e lisadas por 25 segundos utilizando-se homogenizador Polytron PT 1.300 D (Kinematica, Inc., Bohemia NY, USA). Após a homogeneização, foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio na amostra e, então centrifugado

para separação dos restos teciduais. Ao sobrenadante foi adicionado o mesmo volume de etanol 70%, e a solução foi transferida para a coluna do kit da Qiagen, onde o RNA foi tratado com DNase I (Qiagen) na coluna e ficou retido por afinidade até a sua eluição com 40µL em água livre de RNases, presente no kit.

A quantificação e pureza do RNA total extraído foi avaliada pelo espectrofotômetro Nanovue (GE, EUA) (40), a partir da relação de absorbância 260/280nm e 260/230nm. As amostras utilizadas tiveram razões próximas de 2.0. A qualidade do RNA foi avaliada por meio do perfil, baseado na conservação das bandas 28S e 18S do RNA ribossômico, e do valor de integridade (RIN: ‘‘RNA Integrity Number’’) obtidos após eletroforese por capilaridade no equipamento Agilent 2100 Bionalyzer (Agilent Technologies, Inc, Wilmington DE, USA), com utilização do Kit RNA Nano6000 (Agilent Technologies, EUA). As amostras foram consideradas adequadas na presença de RIN maior ou igual a 7,0. As amostras que não atingiram os critérios necessários de boa qualidade foram excluídas do experimento.

4.10. Síntese de cDNA

O DNA complementar (cDNA) de cada amostra foi sintetizado a partir de alíquotas contendo 0,5992 µg de RNA, quantidade padronizada para todas as amostras. A síntese de cDNA foi realizada com o Kit da invitrogen (SuperScript Vilo TM cDNA Synthesis) seguindo o protocolo do fabricante. A cada amostra de RNA foram adicionados 6µl de uma mistura composta de 4µl de tampão (5X viloTM Reaction Mix) contendo oligonucleotídeos iniciadores random primers, dNTPs e MgCl₂ otimizados para a reação, e 2µl de tampão de transcriptase reversa (10X superscript Enzyme Mix) contendo inibidor de ribonuclease recombinante RNase OUT e uma proteína auxiliar. Posteriormente, a mistura foi incubada a 25 °C por 10 minutos, seguida por incubações a 42 °C por 60 minutos e 85 °C por 5 minutos.

4.11. Expressão gênica por reação de RT-qPCR com o sistema Taqman Low density array (TLDA)

O perfil de expressão gênica foi determinado em cada amostra, através da reação de RT-qPCR em tempo real com o sistema TaqMan® Array Low Density Array (TLDA) (Applied Biosystems-Life Technologies, EUA). Esse sistema é constituído de cartões microfluidos TaqMan® Array (Applied Biosystems-Life Technologies, EUA). Cada cartão apresenta 384 poços com primers e sondas de hidrólise específicos, customizados, que

permite a quantificação de 96 genes para 4 amostras diferentes, sendo 92 genes específicos (relacionados com proliferação celular, apoptose, dano e reparo de DNA, sinalização do receptor de estrógeno e do gene p53 (Tabela suplementar em Anexo 3), e quatro genes de referência, analisados no aparelho. O uso de cartões microfluidos permite a distribuição da amostra nos 384 poços por centrifugação minimizando erros. A técnica foi realizada de acordo com o sugerido pelo fabricante (Applied Biosystems, EUA), sendo testados quatro genes de referência (TRFC, ACTB, RPL13A, e PUM1) (Majidzadeh-A et al., 2011; Shah and Faridi, 2011; Kiliç Y et al., 2014). Foram utilizadas cinco amostras de cDNA por grupo, totalizando 15 amostras. Para cada amostra foi preparado um mix, contendo 16 µl de cDNA (0,5992 µg), 100 µl de Master Mix Taqman Fast Advanced (Applied Biosystems, CA, USA), e o valor final foi ajustado para 200 µl com água livre de nuclease. Cada cartão possui 8 canaletas de entrada e permite a quantificação dos genes para 4 amostras diferentes. Então foram aplicados 200 µl do mix (cDNA+Master Mix+água) por amostra, sendo 100 µl em cada canaleta. Os cartões foram centrifugados em duas etapas sequenciais por 1 minuto a 120 rpm e selados para evitar o refluxo das amostras, e então as canaletas foram descartadas.

A quantificação do cDNA foi realizada no equipamento QuantStudio™ 12 K Flex Real-Time PCR System (Life Technologies, EUA). A reação de amplificação foi realizada com o seguinte ciclo: 2 min a 50 °C para incubação da uracila-DNA-glicosilase (UNG), 10 min a 95 °C para ativação da polimerase, 40 ciclos de 3 segundos de desnaturação a 95 °C e 60 segundos de anelamento e extensão a 60 °C.

Após a realização da qRT-PCR, a baseline foi definida automaticamente para cada cartão e o valor do threshold (CT), ciclo em que a curva de amplificação ultrapassou o limiar de detecção da fluorescência, foi determinado e utilizado para a quantificação da expressão gênica. Os dados com os valores de thresholds foram exportados para serem posteriormente analisados pelo software ExpressionSuite v 1.0.3 (Life Technologies, EUA) em relação ao controle endógeno PUM1, que apresentou maior estabilidade.

A quantificação da expressão de cada gene foi calculada pelo ΔCT , representado pela diferença de expressão entre o gene alvo e o controle endógeno de uma determinada amostra. Para fazer a comparação dos níveis de expressão gênica dos grupos foi utilizado o cálculo do fold change $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde o $\Delta\Delta CT$ corresponde a diferença entre o ΔCT (expressão normalizada) das amostras estudadas (tratadas e não tratadas). Para esses resultados foram considerados como diferencialmente expressos os genes com fold change (expressão relativa) $\geq |1,5|$ e $p \leq 0,05$.

4.12. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Sigma Stat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Os dados de peso corpóreo e ganho de peso, consumo de ração e água, índice de proliferação, apoptose e RE- α positivas, assim como contagem das estruturas e distância (linfonodo/extremidade) das glândulas mamárias abdominais, dosagens hormonais, multiplicidade e tamanho de tumores foram analisados pelos testes ANOVA, e quando não foi observada distribuição normal aplicou-se o teste Kruskal-Wallis. A incidência de tipos, padrões e características histológicas das neoplasias mamárias foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fischer. Para análise de animais livres de tumor utilizou-se o teste de Kaplan-Meier, seguido de Long Rank Test. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Fase gestacional, lactacional e juvenil

As fêmeas prenhes dos três grupos experimentais ($n=15/\text{grupo}$) não apresentaram sinais clínicos evidentes de toxicidade ao longo do período gestacional com a ingestão de dietas com diferentes níveis de zinco durante o período DG 10-21 (**Tabela 2**). O nascimento das ninhadas ocorreu predominantemente durante o período diurno e não houve diferença estatística em relação à duração da gestação, tamanho e razão sexual das ninhadas ao nascimento nos diferentes grupos experimentais (**Tabela 2**). Entretanto, alguns filhotes natimortos foram observados, sendo a maioria do grupo de mães alimentadas com dieta deficiente em zinco ($G1= 3 \text{ mg/Kg}$). Além disso, alguns filhotes do grupo com deficiência de zinco evoluíram para óbito no dia seguinte ou se mostraram debilitados ao nascimento. Desta forma, no grupo de fêmeas prenhes alimentadas com dieta deficiente em zinco ocorreu a morte de vinte filhotes ao nascimento, enquanto nos grupos de mães que receberam dieta com níveis normais ($G2= 35 \text{ mg/Kg}$) ou com suplementação de zinco ($G3= 180 \text{ mg/Kg}$) foram observados quatro filhotes natimortos ($p=0,001$).

As fêmeas prenhes do grupo alimentado com dieta deficiente em zinco ($G1= 3 \text{ mg/Kg}$) geraram 143 filhotes, sendo 62 fêmeas e 81 machos, enquanto as mães prenhes dos grupos alimentados com dieta com níveis normais de zinco ($G2= 35 \text{ mg/Kg}$) ou suplementação de zinco ($G3= 180 \text{ mg/Kg}$) produziram 140 filhotes, sendo 72 fêmeas e 68 machos e de 177 filhotes, sendo 91 fêmeas e 86 machos, respectivamente. Após a sexagem, retirada dos natimortos e da redução das ninhadas (8 filhotes/ninhada) foram obtidas 41, 68 e 73 fêmeas viáveis para inclusão nos grupos com dieta deficiente em zinco ($G1= 3 \text{ mg/Kg}$),

níveis adequados (G2= 35 mg/Kg) ou com suplementação de zinco (G3= 180 mg/Kg), respectivamente (**Tabela 2**). Para esse estudo foram utilizadas 36 fêmeas da geração F1 de cada grupo experimental, de acordo com o número total de fêmeas obtidas no G1= 3mg/Kg de zinco, o qual apresentou menor número de fêmeas, devido ao maior número de filhotes mortos ao nascimento.

As ninhadas (machos e fêmeas) das fêmeas prenhes alimentadas com dieta deficiente em zinco (G1= 3 mg/kg) apresentaram menor ($p= 0,018$) peso corpóreo ao nascimento (DPN 0), quando comparado com os grupos alimentados com dieta adequada (G2= 35 mg/Kg) ou com suplementação (G3= 180 mg/Kg) de zinco na dieta (**Tabela 2**).

A **Tabela 2** indica os valores do consumo estimado de ração (g/rato/dia), peso corpóreo final e ganho de peso das fêmeas prenhes alimentadas com dieta deficiente (3 mg/Kg), com níveis normais (35 mg/Kg) ou com suplementação (180 mg/Kg) de zinco, a partir do DG 10. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais quanto ao consumo médio de ração na gestação. No DG 21, o peso corpóreo das fêmeas prenhes do grupo alimentado com deficiência de zinco (G1= 3 mg/Kg) foi menor ($p < 0,023$) quando comparado ao grupo de fêmeas prenhes alimentadas com dieta com suplementação de zinco (G3= 180 mg/Kg), mas semelhante quando comparado ao grupo de mães alimentadas com níveis adequados de zinco (G2= 35 mg/Kg). O ganho de peso corpóreo do grupo de mães alimentadas com dieta deficiente de zinco (G1= 3 mg/Kg,) foi menor ($p < 0,002$) quando comparado aos demais grupos experimentais (G2 e G3).

Os valores do consumo estimado de ração (g/rato/dia) e peso corpóreo das mães lactantes alimentadas com dieta deficiente, com níveis normais ou com suplementação de zinco estão apresentados na **Tabela 2**. O consumo médio de ração foi menor ($p= 0,001$) nos grupos de lactantes alimentadas com ração deficiente (G1= 3 mg/Kg,) e com suplementação de zinco (G3= 180 mg/Kg,) quando comparado ao grupo de mães alimentadas com níveis adequados de zinco (G2= 35 mg/Kg).

Embora alguns filhotes do grupo de mães alimentadas com dieta deficiente de zinco (G1= 3 mg/Kg) mostraram-se debilitados ao nascimento, estes sobreviveram e mostraram-se ativos durante o período de lactação. Entretanto, no DPN 10 e 21, a prole de fêmeas de mães alimentadas com dieta deficiente de zinco apresentou menor peso corpóreo médio ($p= 0,001$) em relação às proles dos demais grupos experimentais (**Tabela 2**).

A **Tabela 2** indica os valores de média e desvio-padrão do consumo estimado de ração (g/rato/dia) pela prole e peso corpóreo dos diferentes grupos experimentais do DPN 21 ao DPN 51 (final da fase juvenil). O consumo médio de ração foi menor ($p= 0,001$) no grupo

da prole de fêmeas que recebeu ração deficiente ($G1 = 3 \text{ mg/Kg}$) quando comparado aos grupos da prole de fêmeas alimentadas com níveis adequados ($G2 = 35 \text{ mg/Kg}$) e com suplementação de zinco ($G3 = 180 \text{ mg/Kg}$), nas fases de gestação, lactação e juvenil. No DPN 51, as proles de fêmeas alimentadas com dieta deficiente de zinco apresentaram menor peso corpóreo médio ($p = 0,001$) em relação às proles dos demais grupos experimentais.

Tabela 2. Dados reprodutivos das mães e prole expostas às dietas com diferentes concentrações de zinco¹.

Parâmetros	Grupo/tratamento ²		
	(G1)	(G2)	(G3)
	Zn (3mg/Kg)	Zn (35mg/Kg)	Zn (180mg/Kg)
Mães	15 ⁷	15	15
<i>Gestação</i>	22,66 ± 0,48	22,66 ± 0,72	22,80 ± 0,86
Duração da gestação (dias)			
Tamanho da ninhada	9,87 ± 2,83	10,43 ± 2,93	11,93 ± 2,63
Razão sexual (M:F) ³	1,25 ± 0,69	1,28 ± 1,15	1,32 ± 1,39
Consumo de ração (g/rato/dia) ⁴	20,24 ± 3,51	19,81 ± 1,24	20,82 ± 1,58
Peso corpóreo (g) DG 21	375,24 ± 30,08 [#]	380,56 ± 22,76	400,00 ± 21,90
Ganho de peso corpóreo (g) ⁵	67,17 ± 27,05 ^{+,#}	87,43 ± 14,35	91,58 ± 31,72
<i>Lactação</i>			
Consumo de ração (g/rato/dia) ⁶	26,44 ± 5,78 ^{+,#}	41,97 ± 6,83 [#]	34,77 ± 4,26
Perda de peso (g) ⁷	- 58,00 ± 27,30	- 49,00 ± 21,52	- 49,64 ± 19,88
Prole de Fêmeas	41 ⁸	68	73
Filhotes mortos ao nascer	20 ^{8+,#}	4	4
Peso corpóreo (g)			
DPN 0	6,07 ± 0,98 ^{+,#}	6,63 ± 0,94	6,74 ± 0,78
DPN 10	19,41 ± 3,13 ^{+,#}	24,22 ± 2,95 [#]	22,58 ± 2,94
DPN 21	42,28 ± 6,11 ^{+,#}	59,66 ± 8,17	55,00 ± 7,83
DPN 21-51	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
Consumo de ração (g/rato/dia)	7,33 ± 2,06 ^{+,#}	12,00 ± 2,23	11,39 ± 2,30
Peso corpóreo final	141,38 ± 29,43 ^{+,#}	195,77 ± 18,52	187,83 ± 7,02

¹ Valores representados por média ± SD. ²Exposição as dietas com deficiência de zinco (3mg/Kg), zinco normal (35mg/Kg) e suplementação de zinco (180mg/Kg) durante as fases iniciais da vida. ³Número da prole de machos dividido pelo número da prole de fêmeas. ⁴Valor estimado mensurado no DG 10 ao DG 21. ⁵ Baseado na Diferença entre DG 21 e DG 10. ⁶Valor estimado mensurado no DL 3 ao DL 21. ⁷Baseado na Diferença entre DL 3 e DL 21. ⁸ Numero de animais. ^{+,#} Diferenças significativas do grupo G1 em relação ao grupo G2 e G3, respectivamente, numa faixa de valor de p= 0,001 - 0,01 de acordo com os testes anova ou Kruskal-wallis.

5.2. Análise morfométrica e estrutural da mama (Montagem Total)

A **Tabela 3** mostra os valores de média e desvio-padrão da distância (mm) entre o linfonodo e as margens exteriores da glândula mamária das proles de fêmeas dos diferentes grupos experimentais no DPN 51. As glândulas mamárias abdominais das proles de fêmeas alimentadas com dieta deficiente em zinco (G1= 3 mg/Kg) apresentaram menor distância linfonodo-margem externa ($p= 0,001$) quando comparado as glândulas mamárias dos grupos que receberam dieta com níveis normais (G2= 35 mg/Kg) e com suplementação de zinco (G3= 180 mg/Kg), como mostrado na **Figura 5**.

Os valores médios da contagem das estruturas mamárias das proles de fêmeas dos diferentes grupos experimentais estão apresentados na **Tabela 3**. Os valores do número médio de TEBs, TEDs e ABLs por campo microscópico foram similares entre os grupos experimentais.

Tabela 3. Efeitos da exposição às dietas com diferentes concentrações de zinco na glândula mamária, desde as fases iniciais da vida até o DPN 51¹.

Parâmetros	Grupo/tratamento		
	(G1)	(G2)	(G3)
	Zn (3mg/Kg)	Zn (35mg/Kg)	Zn (180mg/Kg)
Número de animais	10	10	10
Distância (mm) Linfonodo/mama	9,67 ± 2,42*	14,91 ± 1,21	15,27 ± 1,58
TEBs ²	66,00 ± 22,77	57,70 ± 10,01	50,20 ± 11,59
TEDs ²	123,20 ± 34,47	98,50 ± 29,20	119,90 ± 35,28
ABLS ²	39,60 ± 17,57	35,00 ± 9,70	31,50 ± 17,28

¹ Valores representados por média ± SD; ² Estruturas mamárias: TEBs (Broto Terminais), TED (Ductos Terminais) e ABLs (Lóbulo Alveolares). * Diferenças significativas em relação ao grupo G2 e G3, ($p= 0,001$ e $p=0,010$) de acordo com o teste Anova.

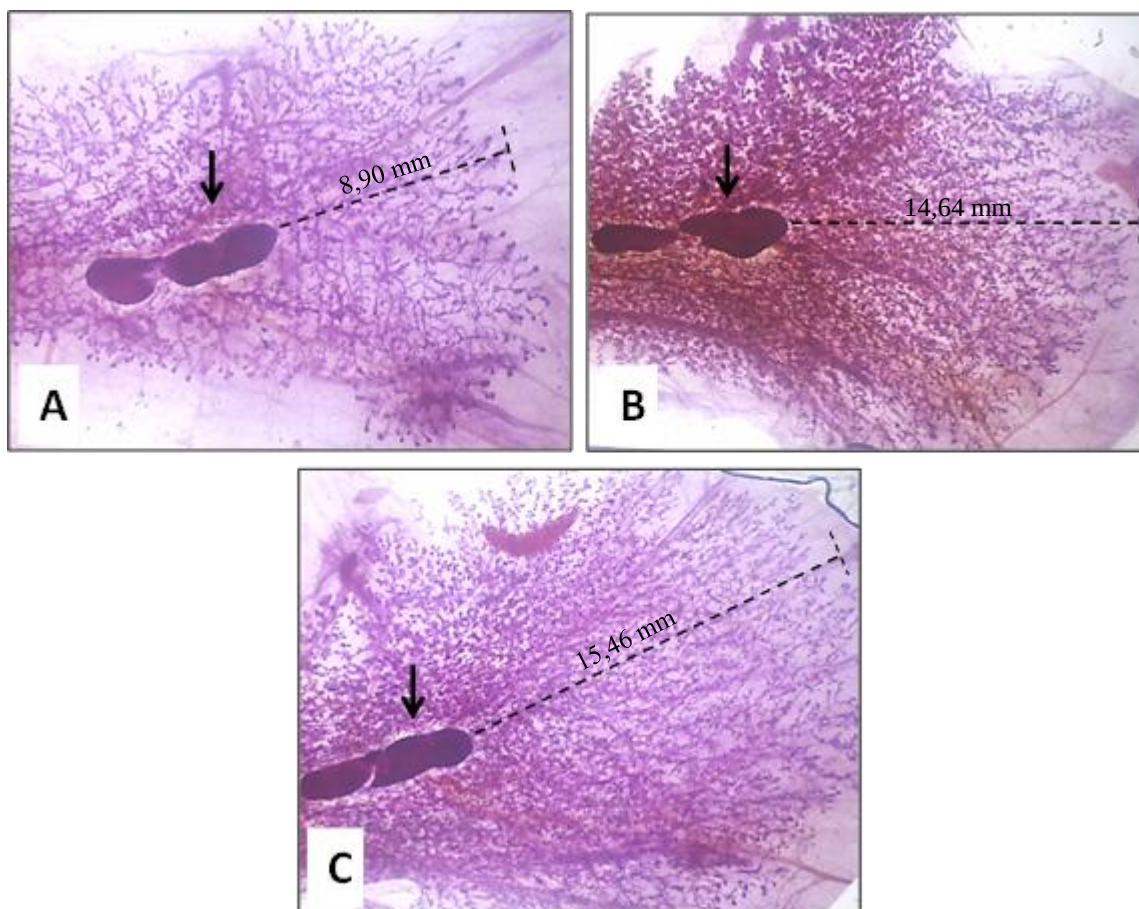


Figura 5. Extensão da árvore epitelial (linha preta pontilhada) em relação à superfície do linfonodo (seta preta) em lupa com objetiva de 1x, de glândula mamária de ratas Sprague Dawley do DPN 51. (A) Grupo com dieta deficiente de zinco (3 mg/Kg, G1); (B) Grupo com dieta com níveis normais de zinco (35 mg/Kg, G2); (C) Grupo com suplementação de zinco (180 mg/Kg, G3).

5.3. Índices de proliferação celular e apoptose e análise de RE- α

A expressão e os índices de proliferação celular (%) pelo Ki-67 nas células epiteliais mamárias dos diferentes grupos experimentais estão apresentados na **Figura 6**. As glândulas mamárias abdominais das proles de fêmeas que receberam dieta com suplementação de zinco (G3= 180 mg/Kg) apresentaram maiores ($p=0,027$) níveis de proliferação celular, quando comparado aos grupos que receberam dietas deficientes (G1= 3 mg/Kg) ou com níveis adequados de zinco (G2= 35 mg/Kg) no DPN 53 (dois dias após a aplicação da DMBA).

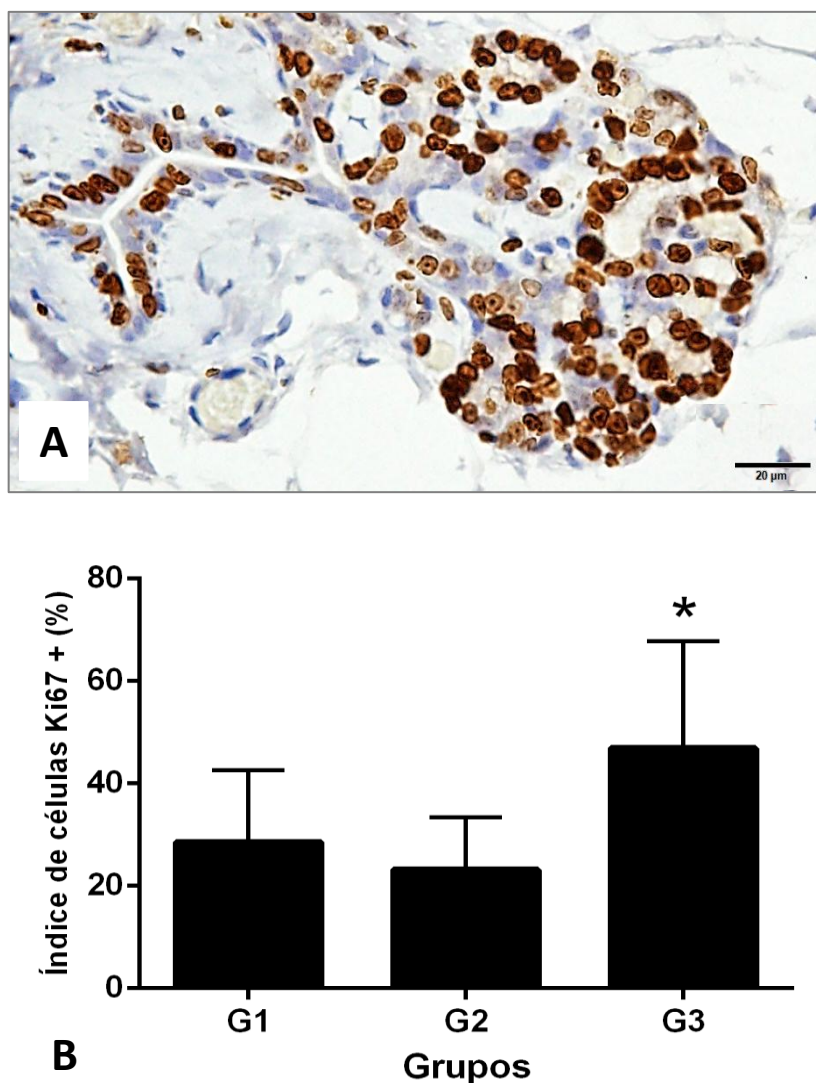


Figura 6. (A): Marcação imunoistoquímica em glândulas mamárias para Ki-67 (G3). (B): Índice de proliferação celular nas células epiteliais das glândulas mamárias da prole de fêmeas dos diferentes grupos experimentais. G1= (3 mg/kg Zn), G2= (35 mg/Kg Zn) e G3 (180 mg/Kg Zn). * Diferença significativa em relação aos grupos G1 e G2 de acordo com o Kruskal-wallis seguido do teste de Tukey.

A **Figura 7** apresenta um corte histológico da glândula mamária em HE (**Figura 7A**) evidenciando uma célula em apoptose (seta), assim como os índices de apoptose (%) nas células epiteliais mamárias dos diferentes grupos experimentais (**Figura 7B**). Os resultados indicam que os níveis de apoptose foram semelhantes nas glândulas mamárias entre os grupos experimentais no DPN 53 (dois dias após a aplicação da DMBA).

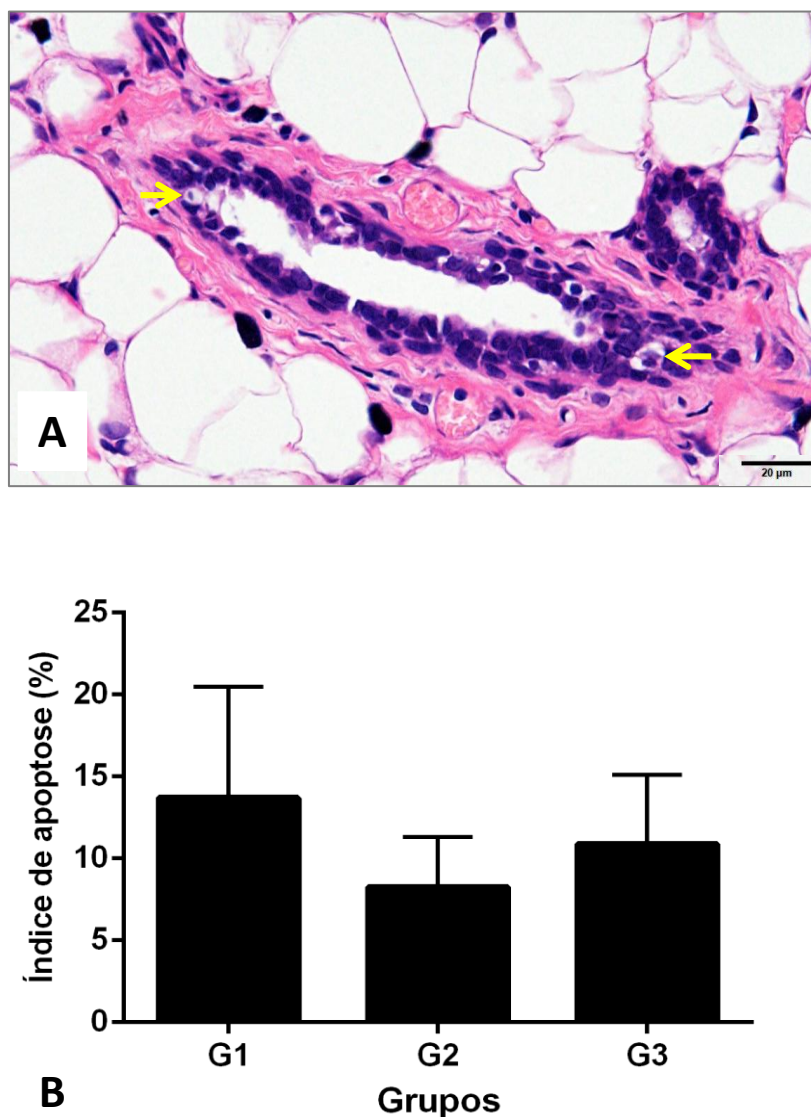


Figura 7. (A): Corte histológico de glândula mamária corado em HE mostrando células epiteliais mamárias em apoptose (setas) (G1). (B): Índice de apoptose (%) nas células epiteliais nas glândulas mamárias da prole de fêmeas dos diferentes grupos experimentais. G1= (3mg/kg Zn), G2= (35mg/Kg Zn) e G3 (180mg/Kg Zn). Teste estatístico Anova.

A expressão de células positivas para RE- α e seus índices (%) nas células epiteliais mamárias dos diferentes grupos experimentais estão apresentados na **Figura 8**. Os resultados indicam que a positividade para o RE- α positivas foi semelhante nos diferentes grupos experimentais. Os níveis de estrógeno e progesterona também não foram alterados no DPN 53 (**Tabela 4**).

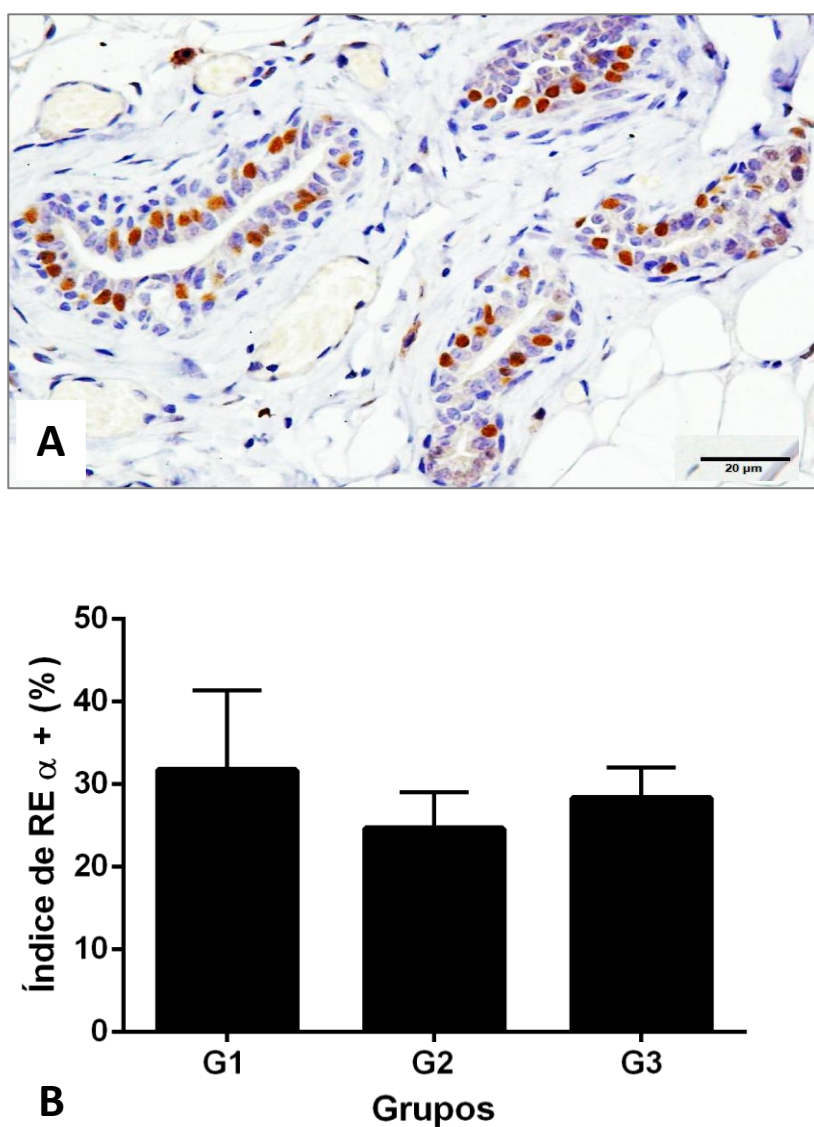


Figura 8. (A): Marcação imunoistoquímica em glândulas mamárias para o RE- α (G1). (B): Índice de células epiteliais RE- α positivas (%) nas glândulas mamárias da prole de fêmeas dos diferentes grupos experimentais. G1= (3mg/kg Zn), G2= (35mg/Kg Zn) e G3 (180mg/Kg Zn). Teste estatístico Kruskal-wallis.

Tabela 4. Dosagens bioquímicas de progesterona e estradiol nos diferentes grupos experimentais¹.

Parâmetros	Grupo/tratamento ²		
	(G1) Zn (3mg/Kg)	(G2) Zn (35mg/Kg)	(G3) Zn (180mg/kg)
Número de animais	10	10	10
Progesterona (ng/ml)	24,47 ± 11,01	26,34 ± 9,11	23,46 ± 8,84
Estradiol (pg/ml)	22,50 ± 6,91	22,30 ± 4,66	20,10 ± 0,31

¹ Valores representados por média ± SD; ² Exposição as dietas com deficiência de zinco (3mg/Kg), zinco normal (35mg/Kg) e suplementação de zinco (180mg/Kg) durante as fases iniciais da vida até a fase juvenil (DPN 51). Teste estatístico Anova.

5.4. Avaliação da expressão gênica por Taqman Low Density Array (TLDA)

5.4.1. Extração de RNA

A concentração de RNA total extraído das glândulas mamárias abdominais esta apresentada na **Tabela 1 (anexo 2)**. As amostras escolhidas tiveram razão entre as absorbâncias com os comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm próxima de 2,0, o valor de Rin igual ou maior que 7,0 e dois picos bem definidos, correspondentes às bandas 28S e 18S do RNA ribossômico no eletroferograma (**Figura 1 em anexo 2**), o que indica RNA de boa qualidade.

5.4.2. Análise quantitativa da expressão gênica

Os genes selecionados para análise de expressão foram considerados diferencialmente expressos com base no fold change $\geq |1,5|$ e $p \leq 0,05$. Dos 92 genes avaliados no tecido mamário da prole de fêmeas dos diferentes grupos experimentais (**Tabela suplementar em anexo 3**), apenas os genes *Api5* e *Ercc1* foram considerados diferencialmente expressos no tecido mamário no DPN 53. Esses genes apresentaram baixa expressão com fold change de 0,497 ($p=0,019$) e 0,508 ($p=0,036$), respectivamente, no grupo que recebeu a dieta com suplementação de zinco (G3= 180 mg/Kg) em relação ao grupo controle que recebeu dieta com níveis adequados de zinco (G2= 35 mg/Kg) (**Figuras 9 e 10**). Quando comparamos o perfil da expressão gênica do grupo exposto a dieta com deficiência de zinco (G1= 3 mg/Kg) com os grupos G2 e G3, não foi encontrada diferença significativa na expressão gênica. A **Figura11** ilustra a rede em que esses dois genes estão envolvidos.

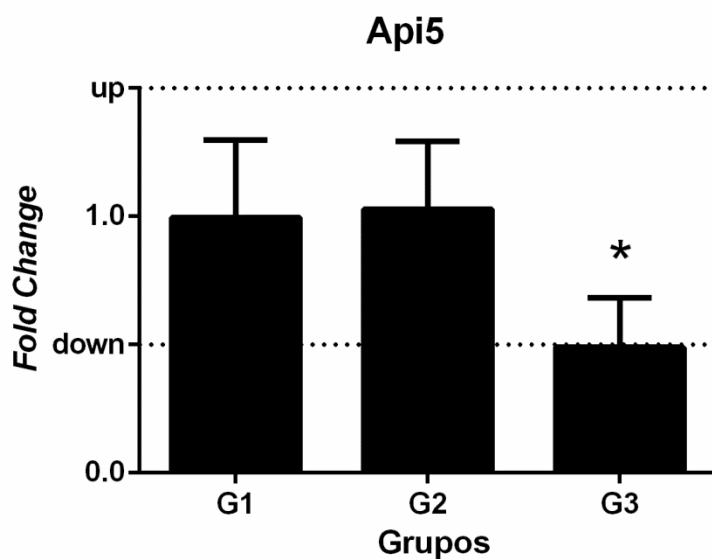


Figura 9. Expressão do gene *Api5* nas glândulas mamárias do DPN 53 (48 horas após a administração da DMBA) nos diferentes grupos experimentais. G1= (3mg/kg Zn), G2= (35mg/Kg Zn) e G3 (180mg/Kg Zn). * Diferença significativa em relação ao grupo G2 de acordo com Anova seguido do teste Holm-Sidak.

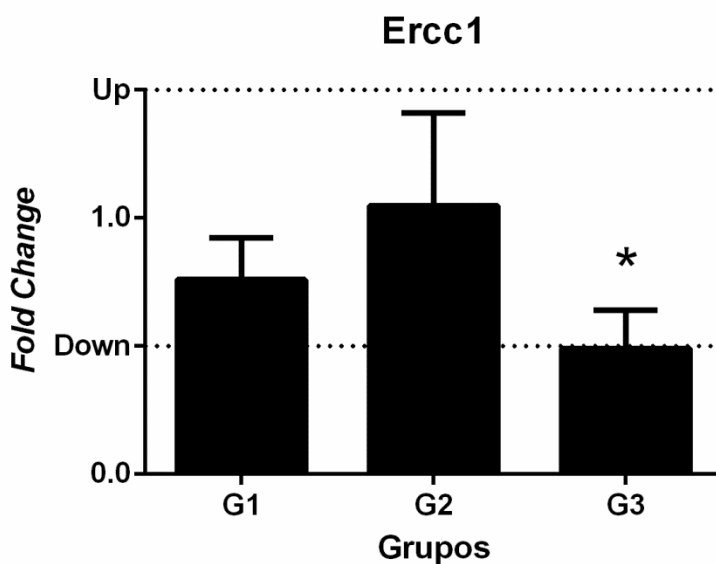


Figura 10. Expressão do gene *Ercc1* nas glândulas mamárias do DPN 53 (48 horas após a administração da DMBA) nos diferentes grupos experimentais. G1= (3mg/kg Zn), G2= (35mg/Kg Zn) e G3 (180mg/Kg Zn). * Diferença significativa em relação ao grupo G2 de acordo Anova seguido do teste Holm-Sidak.

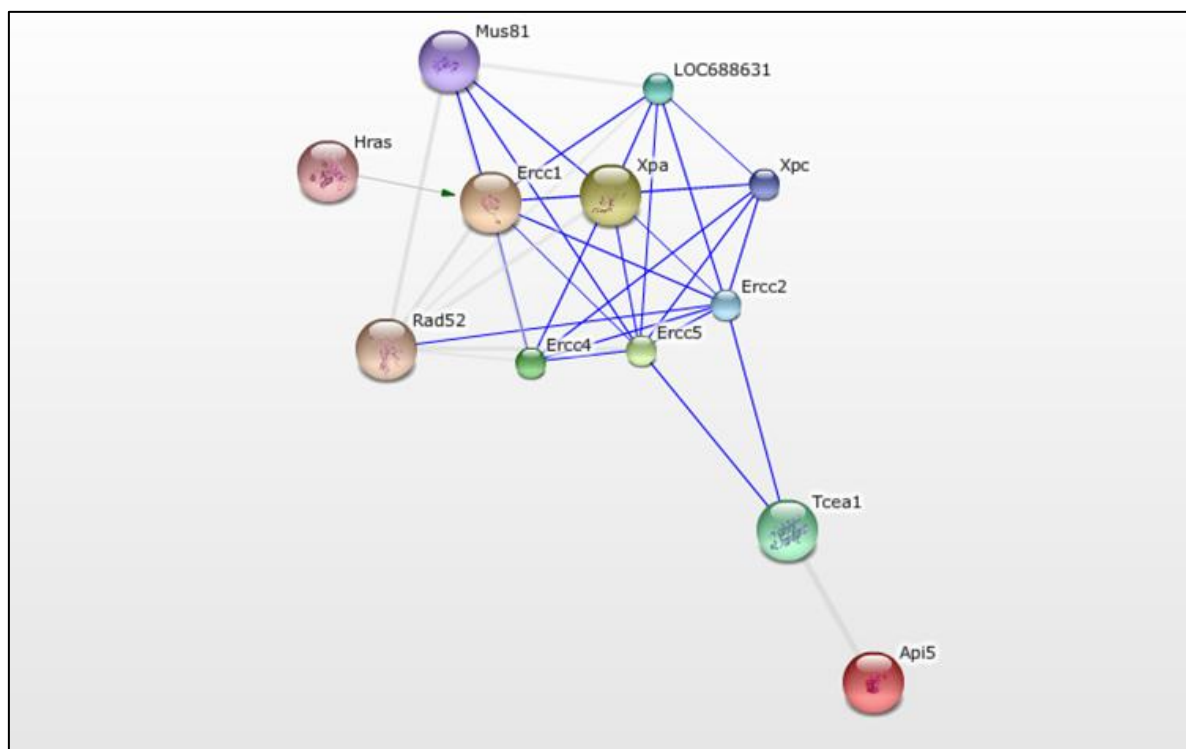


Figura 11. Rede Formada pelos genes Api5 e Ercc1 que tiveram diminuição de sua expressão.

Fonte: http://stringdb.org/newstring.cgi/show_input_page.pl?

5.5. Fase Adulta

5.5.1- Dados obtidos durante o período em biotério

A **Tabela 5** indica os valores de média e desvio-padrão do consumo estimado de ração (g/rato/dia), água (ml/rato/dia) e peso corpóreo da prole de fêmeas dos diferentes grupos experimentais durante o DPN 53-180. Em geral, o consumo médio de ração e água e ganho de peso foi semelhante entre os diferentes grupos experimentais. Entretanto, menor peso corpóreo final ($p= 0,001$) foi observado no grupo da prole de fêmeas que foram expostas à dieta com deficiência de zinco ($G1= 3 \text{ mg/Kg}$), quando comparado aos grupos que receberam dietas com níveis adequados ($G2= 35 \text{ mg/Kg}$) e suplementadas com zinco ($G3= 180 \text{ mg/Kg}$), durante as fases gestacional, lactacional e juvenil (**Tabela 5**).

Todos os grupos experimentais apresentaram aumento de peso corpóreo a partir da 2ª semana após aplicação da DMBA, e ganho de peso progressivo durante o período experimental (**Figura 12**).

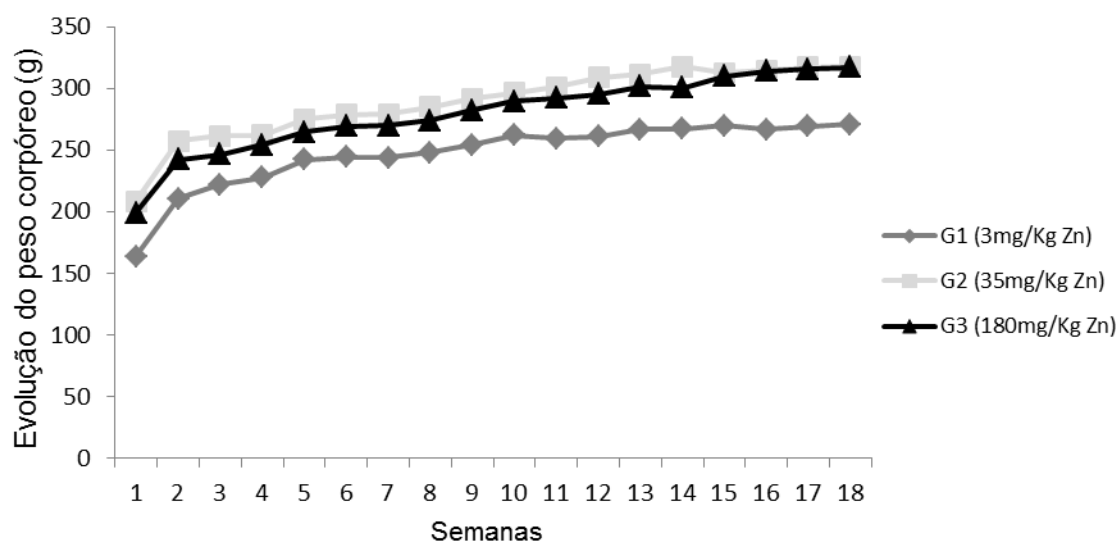


Figura 12. Evolução do peso corpóreo médio dos diferentes grupos experimentais ao longo das 18 semanas do estudo. Teste estatístico Anova.

Tabela 5. Consumo médio estimado de ração e água, peso corpóreo final e ganho de peso da prole de fêmeas iniciadas com a DMBA durante o período do DPN 53-180¹.

Group/Treatment ²	Número de animais	Consumo de ração (g/rato/dia)	Consumo de água (ml/rato/dia)	Peso corpóreo Final (g)	Ganho de peso (g) ³
(G1) Zn (3mg/Kg)	16	17,24 ± 2,62	35,24 ± 7,30	267,15 ± 28,57*	101,00 ± 32,16
(G2) Zn (35mg/Kg)	16	18,31 ± 2,37	32,63 ± 4,74	317,84 ± 36,02	106,55 ± 35,38
(G3) Zn (180mg/Kg)	16	17,52 ± 2,43	31,87 ± 4,41	314,00 ± 20,85	101,44 ± 33,58

¹ Valores em média ± SD; ² Ingestão de dietas com deficiência (3mg/Kg), níveis normais (35mg/Kg) e com suplementação (180mg/Kg) de zinco durante as fases iniciais da vida até a fase juvenil (DPN 53). * Diferença significativa em relação ao grupo G2 e G3 (p= 0,001) Teste estatístico Anova.

5.5.2. Desenvolvimento de tumores mamários e análise histopatológica

A **Figura 13** apresenta o número cumulativo de tumores palpáveis detectados ao longo das 25^a semanas de experimento, somados aos tumores pequenos detectados durante necropsia. Os tumores mamários começaram surgir em torno da 3^a semana de experimento após a aplicação do DMBA. Os primeiros tumores apareceram no grupo com suplementação de zinco (G3= 180 mg/Kg) em vinte dias, no grupo com níveis normais de zinco (G2= 35 mg/Kg) em quarenta e cinco dias e no grupo com deficiência de zinco (G1= 3 mg/Kg) em trinta e seis dias após a aplicação da DMBA (**Tabela 6**). O número e a incidência de tumores aumentaram a partir da sétima semana após a aplicação da DMBA nos três grupos

experimentais, e progressivamente, durante o experimento. O grupo com suplementação de zinco (G3= 180 mg/Kg) apresentou maior número e incidência de tumores mamários tanto no decorrer (**Figura 13 e 14**) como ao final do experimento (DPN 180), quando comparado aos demais grupos, embora sem significância estatística (**Tabela 6**).

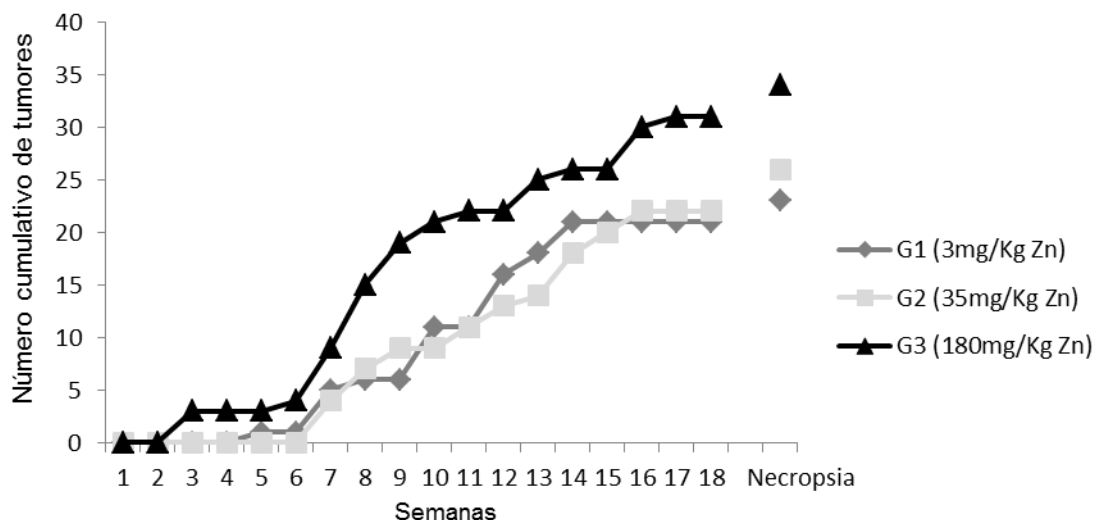


Figura 13. Número cumulativo e a semana de detecção de tumores mamários palpáveis nos diferentes grupos experimentais ao longo do estudo somados aos tumores identificados na necropsia.

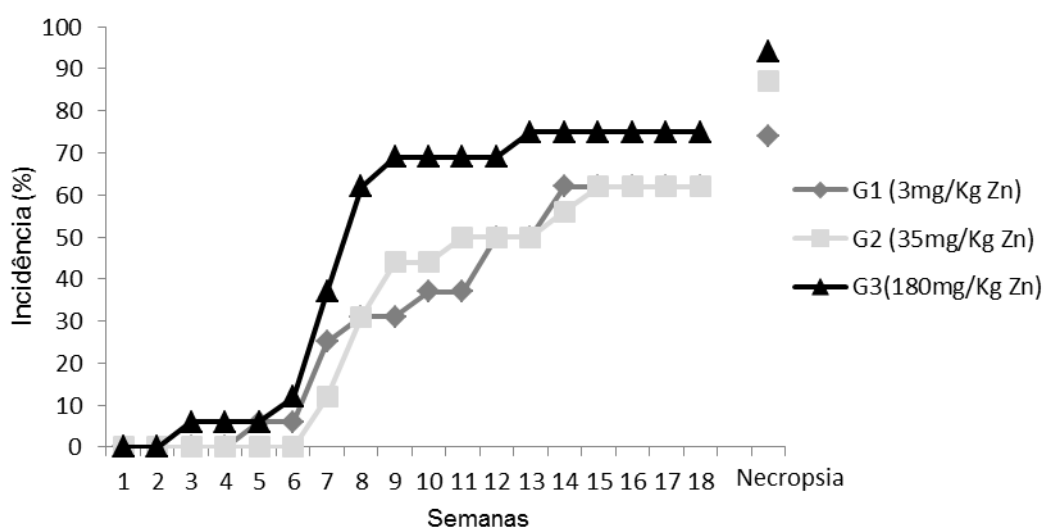


Figura 14. Incidência de tumores nos diferentes grupos experimentais ao longo das 18 semanas de estudo, somados aos tumores identificados na necropsia. Teste estatístico Qui-quadrado.

A **Figura 15** indica que o grupo com suplementação de zinco (G3= 180 mg/Kg) apresentou menor porcentagem de animais livres de tumor quando comparado aos demais grupos, porém sem diferença significativa. Além disso, a ingestão de dietas com diferentes níveis de zinco nas fases iniciais da vida não alterou de forma significativa a latência, incidência ou multiplicidade de tumores mamários detectados no período experimental estabelecido (**Tabela 6**).

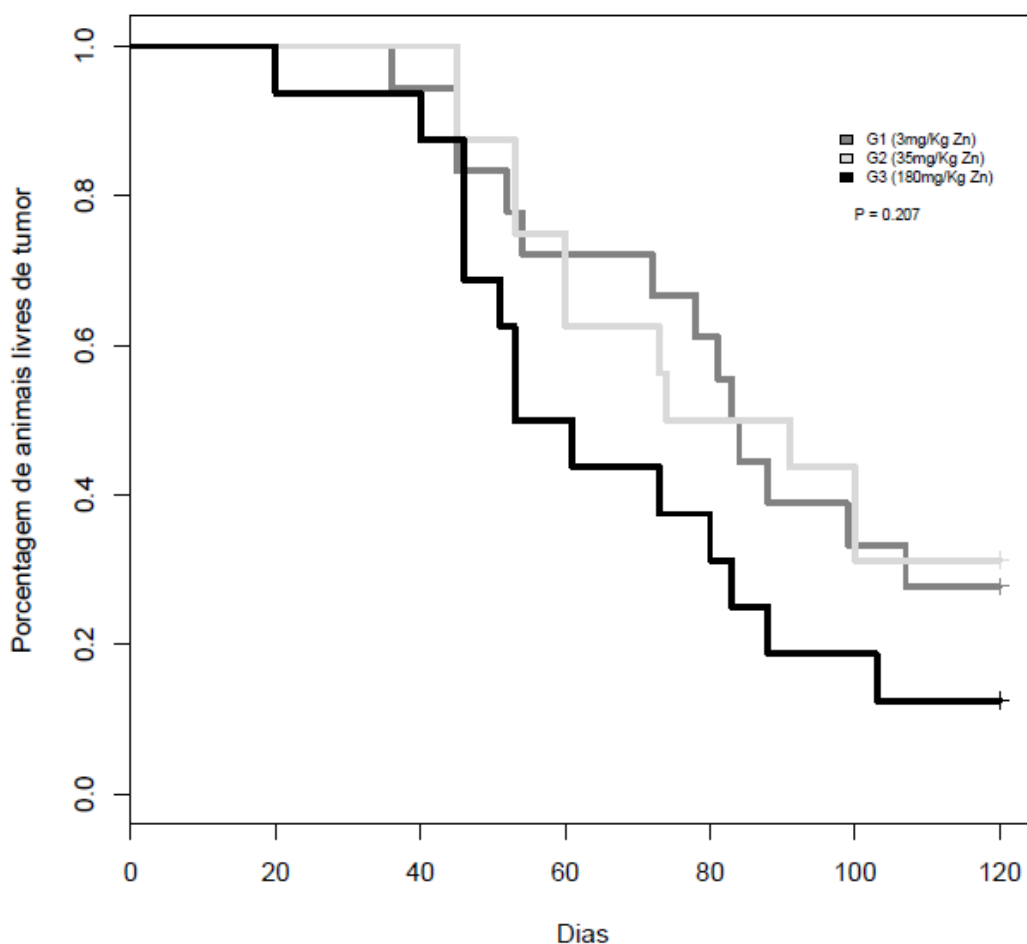


Figura 15. Proporção de animais livres de tumores nos diferentes grupos experimentais ao longo das 18 semanas de estudo, somados aos tumores identificados na necropsia. Não houve diferença significativa (Kaplan-Meier e Log Rank Test, $p > 0,05$).

A maioria dos tumores mamários induzidos pelo DMBA foi diagnosticada como adenocarcinomas com padrão histológico papilífero (**Figura 16**). A frequência desse padrão histológico tumoral nos diferentes grupos experimentais foi de 76%, 77% e 55% para os grupos G1, G2 e G3, respectivamente. O volume médio (cm³) dos tumores mamários nas três

faixas de tamanho analisadas (pequeno, médio e grande) não diferiu entre os três grupos experimentais (**Figura 17**).

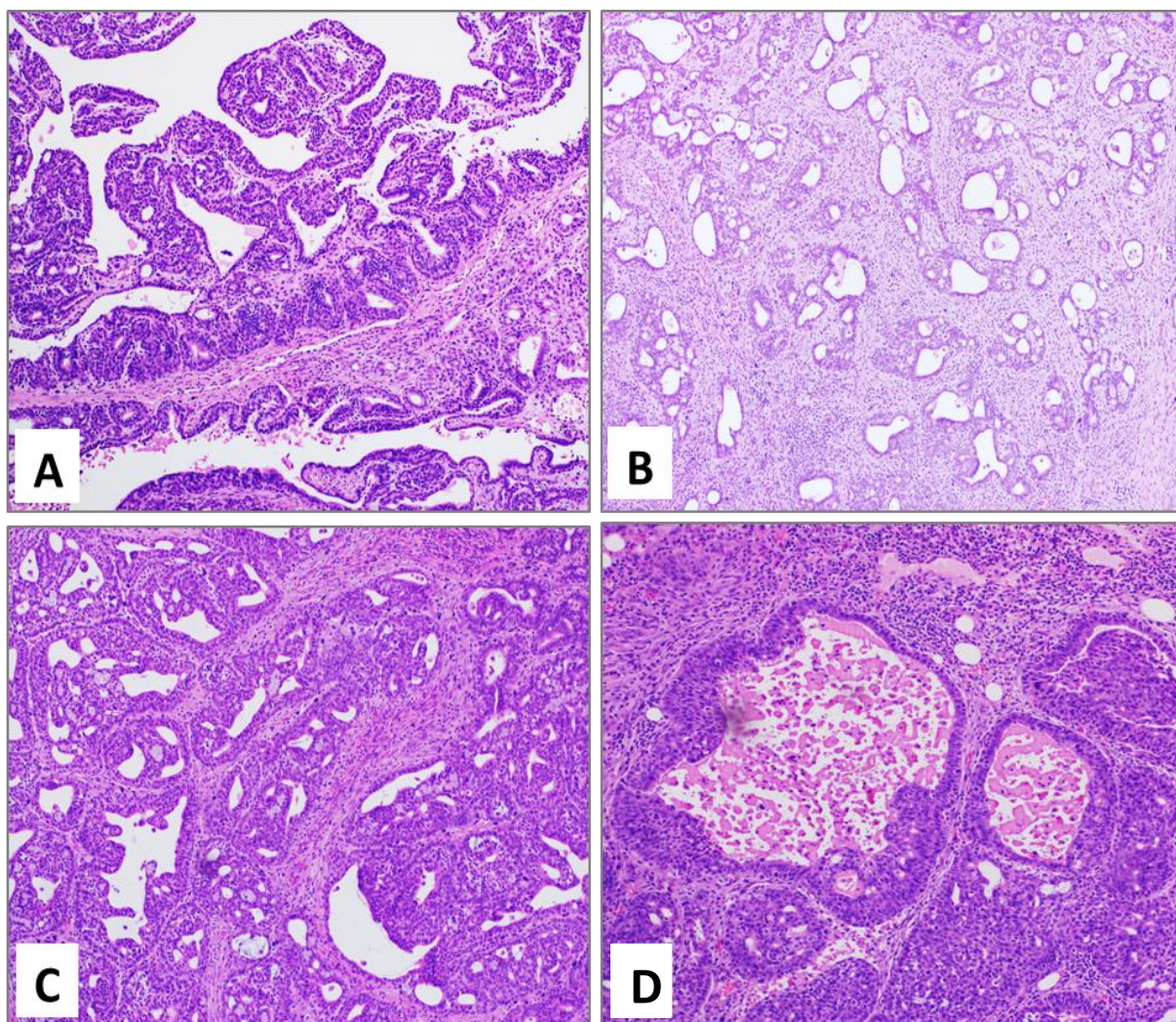


Figura 16. Padrão histológico dos tumores mamários induzidos pela DMBA mostrando: (A) Adenocarcinoma de padrão papilífero; (B) Adenocarcinomas de padrão tubular; (C) Adenocarcinoma de padrão cribriforme; (D) Adenocarcinoma de padrão cribriforme/comedo. Coloração histológica de HE, objetiva de 10x.

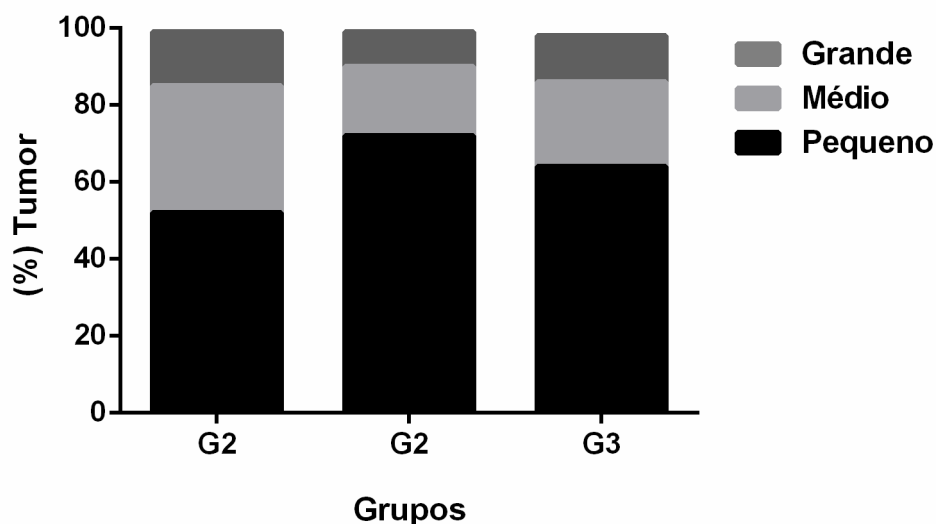


Figura 17. Número de tumores mamários de diferentes volumes nos três grupos experimentais ao final da 18ª semana do estudo. Os tumores foram classificados como pequeno (0,01-4,23 cm³), médio (4,24-8,46 cm³) ou grande (8,47-12,71 cm³). Teste estatístico Anova.

Tabela 6. Dados de latência, incidência, multiplicidade e tipos histológicos das neoplasias mamárias induzidas pela DMBA nos diferentes grupos experimentais.

Parâmetros	Grupo/tratamento ²		
	(G1)	(G2)	(G3)
	Zn (3mg/Kg)	Zn (35mg/Kg)	Zn (180mg/Kg)
Numero de animais	16	16	16
Latência Tumoral (dias) ¹	70,89 ± 19,08	78,38 ± 22,18	72,90 ± 24,66
Primeiro Tumor (dia)	36°	45°	20°
Incidência Tumoral (%)	11/16 (69)	11/16 (69)	14/16 (87)
Multiplicidade ^{1,3}	1,91 ± 1,38	2,00 ± 1,10	2,85 ± 1,99
Número de Tumores	21	22	38 (72%)
Tipo histológico (%)			
Adenocarcinoma Papilar	16 (76)	17 (77)	21 (55)
Adenocarcinoma Tubular	4 (19)	3 (13)	11 (29)
Adenocarcinoma Tubular/papilar	0 (0)	2 (9)	3 (8)
Adenocarcinoma Cribiforme	1 (5)	0 (0)	3 (8)

¹ Valores representados por média ± SD; ²Exposição as dietas com deficiência de zinco (3mg/Kg), zinco normal (35mg/Kg) e suplementação de zinco (180mg/Kg) durante as fases iniciais da vida até a fase juvenil (DPN 53); ³Número de tumores por animal. Para Latência e multiplicidade tumoral, teste Kruskal-wallis, Incidência e tipo histológico de tumores, teste exato de Fischer.

6. Discussão

No presente estudo, dietas com deficiência e suplementação de zinco foram introduzidas durante os períodos de gestação, lactação e fase juvenil, para explorar os efeitos sobre o desenvolvimento da glândula mamária e susceptibilidade a carcinogênese na geração F1 de fêmeas SD. Nossos resultados demonstraram que a deficiência de zinco interferiu no crescimento do animal e, conseqüentemente, no tamanho da glândula mamária no DPN 51, mas não alterou de forma significativa a susceptibilidade a carcinogênese mamária ao longo do estudo. Entretanto, a suplementação de zinco (~ 5 vezes mais que no grupo controle) parece sinalizar para um aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores mamários induzidos pela DMBA.

A ingestão de dieta com deficiência de zinco (3mg/kg, G1) nas fases iniciais da vida interferiu na evolução do peso corpóreo da prole de fêmeas, sendo que esta redução de peso corpóreo não foi recuperada na vida adulta, mesmo com a ingestão de dieta com níveis adequados de zinco durante o período DPN 53-180 (**Tabela 5 e Figura 12**). Desta forma, a deficiência de zinco durante períodos críticos iniciais da vida determinou o crescimento corpóreo da prole durante a vida adulta, mesmo com a correção desta deficiência mineral (Yu et al, 2013). O zinco está presente em diversas atividades biológicas, e sua deficiência está relacionada a vários distúrbios e alterações no metabolismo de células normais, que inclui anorexia, perda de peso, menor eficiência da ação de alimentos e redução do crescimento, (Kaji, 2001; Sun et al., 2005; Sun et al., 2007a).

O zinco é necessário para vários processos intra e extracelulares, incluindo o crescimento e proliferação celular, cuja desregulação pode estar associada à carcinogênese (Lee et al., 2004; Andreini et al., 2006). Alguns autores sugerem que níveis elevados de zinco na alimentação podem estar associados ao aumento do risco de câncer de mama (Cui et al., 2007).

Nós avaliamos a morfologia da glândula mamária através da montagem total e, embora não encontramos alterações no número das estruturas mamárias, TEBs, TEDs e ABLs em nenhum dos grupos experimentais, foi observado menor distância (mm) entre o linfonodo e as margens exteriores da glândula mamária na prole de fêmeas alimentadas com dieta deficiente em zinco (gestação, lactação e juvenil). Esse resultado reflete os efeitos negativos da deficiência de zinco sobre o crescimento da glândula mamária em relação ao linfonodo e, portanto na área ocupada pela árvore epitelial (Mandrup et al., 2012). De fato, a glândula mamária é um tecido que requer zinco para seu desenvolvimento e função (Kelleher et al., 2009; MacDonald, 2000). Além disso, o crescimento menor da glândula pode estar

diretamente relacionada com o menor consumo alimentar e menor peso corpóreo encontrado nesta prole desde o seu nascimento, como observado por Yu et al. (2013). Todavia, esta redução de crescimento mamário não influenciou no número de TEBs, estruturas indiferenciadas localizadas no final dos ductos mamários, responsáveis pelo crescimento ductal e pela origem dos novos ductos e alvéolos (Russo et al., 1979). Estas estruturas apresentam níveis maiores de proliferação celular e, portanto são susceptíveis à carcinógenos e propensos ao desenvolvimento do câncer mamário (Russo et al., 1979; Russo and Russo, 1996b; Fenton, 2006). Portanto, o aumento ou redução do número de TEBs pode alterar o risco de câncer de mama após alterações nutricionais ou exposição a um carcinógeno químico no início da vida (Hilakivi-Clarke et al., 1997; Fenton, 2006; Rudel et al., 2011).

Relatos da literatura indicam que a deficiência de zinco pode contribuir para danos e modificações oxidativas no DNA, o que pode aumentar o risco de desenvolvimento de neoplasias incluindo as de mama (Huang, 1999; Fernandes and Mafra, 2005; Leone et al., 2006; Grattan and Freake, 2012). Outros estudos mostraram que a suplementação com zinco reduziu o estresse oxidativo e melhorou a eficiência do sistema imunológico, sugerindo a participação deste mineral em mecanismos importantes envolvidos na prevenção do câncer (Federico et al., 2001; Prasad, 2002). Neste estudo, a deficiência em zinco (3mg/Kg, G1) não aumentou de forma significativa o risco para o desenvolvimento de tumor mamário em nenhum dos parâmetros avaliados, assim como a suplementação de zinco (180mg/kg, G3) não exerceu nenhum papel na inibição do desenvolvimento da carcinogênese mamária na prole de fêmeas. Ao contrário, a suplementação de zinco levou ao aumento significativo de proliferação das células epiteliais mamárias e redução da expressão dos genes *Ercc1* e *Api5* no tecido mamário. Portanto, esses resultados sinalizam um discreto potencial para modificação da susceptibilidade a carcinogênese mamária da prole de fêmeas alimentadas com dieta suplementada com zinco nas fases iniciais da vida. As concentrações de 3 e 180 mg/Kg de zinco na ração basal foram escolhidas com bases em estudos anteriores de deficiência e suplementação de zinco (Woo and Xu, 2002; Sun et al., 2007b).

Sabe-se que o aumento da proliferação celular durante a carcinogênese gera necessidade de fornecimento contínuo e suficiente de zinco para sustentar o crescimento tumoral (McQuitty et al., 1970; Paski and Xu, 2002; Lee et al., 2004). Estudos in vivo têm mostrado que o crescimento de carcinomas mamários pode ser suprimido após a depleção de zinco, tanto em seres humanos como em camundongos (Dewys and Pories, 1970; Pories et al., 1977; Mills et al., 1984). Além disso, Woo et al. (2002) demonstraram que doses elevadas de zinco durante a fase de promoção podem favorecer o desenvolvimento de tumores mamários

induzidos pela N-metil-N-nitrosuréia (MNU) em ratas Sprague-Dawley. No entanto, os efeitos de zinco na tumorigênese não estão ainda bem definitivos, e são dependentes do tipo do modelo experimental (Lee et al., 2004).

Leitzmann et al. (2003) sugeriram que pode haver um efeito ambivalente da suplementação de zinco no câncer de próstata em seres humanos. Neste contexto, a dose recomendada de 15mg/dia de zinco pode apresentar efeito protetor (Tapiero and Tew, 2003), enquanto doses diárias superiores a 150 mg (dez vezes maior que a recomendada) poderia promover a tumorigênese (Gumulec et al., 2011). Assim, o envolvimento do zinco no desenvolvimento do câncer parece ser complexo, e requer estudos mais aprofundados do metabolismo do zinco e suas vias bioquímicas (Gumulec et al., 2011).

Neste estudo, dois dias após a aplicação da DMBA, observamos redução da expressão do gene *Ercc1* no tecido mamário do grupo suplementado com zinco (180mg/Kg, G3) em relação ao grupo controle (35mg/Kg, G2). O gene *Ercc1* participa do mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), uma via importante pela qual são removidos diferentes tipos de danos no DNA, tais como, adutos, ligações cruzadas, lesões oxidativas, danos por alquilação e formação dímeros de timidina (Zhu et al., 2014), que distorcem a dupla hélice e interferem na transcrição e replicação do DNA (Lehmann, 2003). Sabe-se que alterações em genes de reparo do DNA podem alterar a capacidade da célula em remover danos no DNA e aumentar o risco de câncer (Zhu et al., 2014), através do acúmulo de mutações deletérias, levando a instabilidade genética e evolução para o câncer de mama (Helzlsouer et al., 1995; Helzlsouer et al., 1996; Mojgan et al., 2012).

Conforme mostrado na **Figura 11**, o gene *Ercc1* interage com o gene *Ercc4* (*Excision repair cross-complementation group 4*), também conhecido como Xpf, para formar um heterodímero, o qual cliva a terminação 5' do DNA no sítio danificado, durante o processo de excisão da lesão do DNA (Tripsianes et al., 2005; Tsodikov et al., 2005; Wang et al., 2011; Zhu et al., 2014). Antes deste processo é necessária a identificação do dano no seguimento do DNA a ser excisado. Para tanto, as endonucleases XPA e XPC codificadas pelos genes *Xpa* e *Xpc*, respectivamente, são recrutadas para o local como sensores de danos (Houstmuller et al., 1999; Sugasawa, et al., 2005; Min and Pavletich, 2007). Em seguida, o gene *Ercc2* (*Excision repair cross-complementation group 2*) interage com a via NER e codifica a proteína ERCC2 (ou endonuclease XPD) para abrir a dupla fita de DNA em torno do local do dano (Benhamou and Sarasin, 2005). Posteriormente, a proteína ERCC5 (ou endonuclease XPG) codificada pelo gene *Ercc5* (*Excision repair cross-complementation*

group 5), procede a excisão na terminação 3' do DNA no segmento da lesão (Houstmuller et al., 1999).

Existem poucos estudos sobre a expressão de *Ercc1* em câncer de mama (Fu et al., 2012; Gerhard et al., 2013). Alguns mostram que a menor expressão do gene *Ercc1* poderia estar relacionada ao aumento do índice de proliferação no tecido mamário (Zhu et al., 2014), e consequentemente ao aumento de número de tumores mamários da prole de fêmeas (Mojgan et al., 2012).

Na **Figura 11** também é possível observar que a função do gene *Ercc1* é ativada pelo gene *H-ras* (*Harvey rat sarcoma viral oncogene*) (Youn et al., 2004), molécula de sinalização central que regula a oncogênese e as propriedades invasivas e migratórias de células epiteliais mamárias (Yong et al., 2011). Essas moléculas ativam redes críticas de sinalização celular, incluindo as de sobrevivência e proliferação celulares e de motilidade e organização do citoesqueleto (Boguski and McCormick, 1993). A expressão de *Ras* tem sido sugerida como um marcador para a agressividade do tumor no câncer de mama (Clair et al., 1987; Clark and Der, 1995; Watson et al., 1991; Moon et al., 2000). No entanto, neste estudo a expressão do gene *Hras* não foi avaliada.

A suplementação de zinco também levou a redução na expressão do gene *Api5* (*Apoptosis inhibitor 5*) no tecido mamário da prole de fêmeas suplementadas com zinco (180mg/Kg, G3) apenas em relação ao grupo controle. O gene *Api5*, também conhecido como *Aac11* (*Anti-apoptosis clone 11*) ou *FIF* (*fibroblast growth factor-2-interacting factor*), codifica a proteína nuclear API5 com função anti-apoptótica (Cho et al., 2014), cuja expressão elevada tem sido relacionada com a supressão de apoptose após a privação de fatores de crescimento (Tewari et al., 1997; Kim et al., 2000).

A apoptose é um processo regulado geneticamente e fornece um mecanismo de proteção celular vital contra o desenvolvimento de neoplasias, pois remove as células com danos no DNA (Kerr et al., 1994; Meterissian, 1997). Assim, a inibição da apoptose confere vantagem de sobrevivência em células portadoras de alterações genéticas, e pode promover a aquisição de mutações adicionais e o acúmulo de células, resultando na progressão neoplásica (Kerr et al., 1994; Meterissian, 1997). Portanto a expressão aumentada do *Api5* tem sido correlacionada com o aumento de risco de desenvolvimento neoplásico (Krejci et al., 2007; Cho et al., 2014; Guha et al., 2010).

Apesar de evidências do envolvimento do gene *Api5* na tumorigênese, as informações sobre a expressão da sua proteína em tumores humanos ainda é escassa (Tewari et al., 1997; Cho et al., 2014; Song et al., 2014). Em células de câncer de mama, a expressão

de *Api5* foi relatada em apenas um estudo de quimioprevenção do composto tocotrienol, o qual levou a uma baixa expressão do gene *Api5* detectada através de microarray e validada por qRT-PCR em células MCF-7 de tumor mamário, mostrando seu papel na manutenção dos índices normais de apoptose (Ramdas e tal., 2011).

No presente estudo, embora a dieta suplementada com zinco (180 mg/Kg, G3) tenha levado a uma baixa expressão do gene *Api5* no tecido mamário da prole de fêmeas, não encontramos diferença no índice de apoptose (%) e nem na incidência de tumores. Adicionalmente, observou-se maior índice de proliferação celular por de ki67 (%) no tecido mamário e, embora não tenha sido observada diferença significativa na incidência de tumores, foi observado maior número de tumores neste grupo. Até o momento, não há estudos na literatura relacionados com suplementação de zinco e alterações na expressão do gene *Api5* no tecido mamário.

Embora tenhamos encontrado baixa expressão de dois genes (*Ercc1* e *Api5*) no tecido mamário do grupo suplementado com zinco (180 mg/Kg, G3), o envolvimento deles ocorre em vias diferentes e relativamente distantes. De acordo com a **Figura 11** esses genes não apresentam interações diretas. Os genes *Ercc2* e *Ercc1* que participam do reparo de dano ao DNA pela via NER, interage com o gene *Tcea1* (*Transcription elongation factor A (SII)*, 1), cuja função é estimular a elongação da transcrição, e promover sua leitura através de sítios de parada da transcrição pela RNA polimerase II (SivaRaman et al., 1990; Wind and Reines, 2000; Shimoaraiso et al., 2000; Kettenberger et al., 2003). Este, por sua vez, interage com o gene *Api5* (**Figura 11**). De acordo com os resultados de proliferação celular e números de tumores no grupo que recebeu a suplementação de zinco (180 mg/Kg, G3), podemos sugerir que a baixa expressão do gene *Ercc1* pode ter apresentado maior impacto no desenvolvimento de tumores mamários na vida adulta do que a baixa expressão do *Api5*.

Os estudos que correlacionam os níveis de zinco na alimentação e o câncer de mama permanecem conflitantes. Enquanto alguns estudos sugerem que níveis elevados podem estar associados ao aumento do risco de câncer de mama (Cui et al., 2007) e outros sugerem que a baixa ingestão de zinco inibe o crescimento de adenocarcinomas mamários implantados em ratos machos (Mills et al., 1984), outros estudos relatam a associação da suplementação de zinco com mecanismos envolvidos na prevenção do câncer de mama (Federico et al., 2001; Prasad and Kucuk 2002). Estes últimos relatam que além deste mineral atuar como componente da estrutura da cromatina, ele atua como co-fator de mais de 3.000 fatores de transcrição, incluindo as proteínas dedos de zinco que se ligam ao DNA e regulam o processo de transcrição e replicação e de enzimas antioxidantes como a superóxido

dismutase (CuZnSOD) e várias proteínas envolvidas no reparo do DNA (Falchuk, 1998; Prasad, 1998; Prasad, 2003). Estudos sugerem que a altos níveis o zinco pode apresentar propriedades anti-apoptóticas (Plum et al., 2010), provavelmente, por limitar a extensão de dano oxidativo induzido pela deficiência de zinco (Cui et al., 2000; Oteiza et al., 2000). O zinco também é capaz de estabilizar lipídeos e proteínas e, desta forma, proteger as membranas celulares e macromoléculas de danos oxidativos. Por outro lado, é importante relatar que a disponibilidade elevada de zinco pode também induzir o estresse oxidativo, e o seu impacto na homeostase de zinco pode ser tanto de proteção (Tapiero and Tew, 2003) como de promoção da tumorigenese (Gumulec et al., 2011) em função da sua disponibilidade (Maret, 2006). Além disso, estudos relatam a interação do zinco com várias moléculas reguladoras da apoptose, promovendo a inibição de caspases (Perry et al., 1997; Stennicke and Salvesen, 1997).

Neste estudo, a ingestão de dietas com diferentes níveis de zinco não alterou a morfologia dos tumores mamários induzidos pela DMBA na vida adulta. Essa análise, adaptada da classificação histopatológica de tumores humanos, é uma ferramenta útil para o diagnóstico e graduação da agressividade dos tumores mamários induzidos quimicamente (Costa et al., 2002). A maioria das neoplasias induzidas pela DMBA foi diagnosticada como de crescimento expansivo e com áreas de invasão local, mas sem metástases diagnosticadas. Outros trabalhos na literatura têm demonstrado resultados semelhantes em modelos experimentais com roedores com o uso da DMBA e com incidência superior a 90% de animais com adenocarcinomas mamários (Russo and Russo, 1996b; Costa et al., 2002). O volume médio (cm³) dos tumores mamários nas três faixas de tamanho analisadas (pequeno, médio e grande) não diferiu entre os três grupos experimentais (**Figura 17**). Assim, os resultados indicam que a ingestão de zinco nas fases iniciais da vida não interferiu de forma significativa em alterações na suscetibilidade a carcinogênese mamária induzida pela DMBA.

7. Conclusões

A suplementação de zinco durante as fases de gestação, lactação e juvenil aumentou de forma marginal a suscetibilidade ao desenvolvimento de tumores mamários. Esta suscetibilidade foi evidenciada pelo aumento da proliferação das células epiteliais mamárias e pela redução da expressão do gene *Ercc1*, envolvido com reparo de dano do DNA no tecido mamário, assim como pelo aumento do número de tumores. A suplementação de zinco também reduziu a expressão do gene *Api5* com função anti-apoptótica, porém esta redução apresentou menor impacto no desenvolvimento de tumores do que o gene *Ercc1*. No entanto, a deficiência de zinco durante os períodos iniciais da vida não alterou a susceptibilidade a carcinogênese mamária, porém reduziu o crescimento da prole de fêmeas e, consequentemente diminuiu o desenvolvimento da glândula mamária.

8. Referências

- Andreini C, Banci L, Bertini I, Rosato A (2006) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res* 5(1): 196-201. doi: 10.1021/pr050361j
- Andreini C, Bertini I, Rosato A (2009) Metalloproteomes: a bioinformatic approach. *Acc Chem Res* 42(10):1471-1479. doi: 10.1021/ar900015x.
- Asano M, Nevins JR, Wharton RP (1996) Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev* 10(11):1422-1432. doi: 10.1101/gad.10.11.1422
- Asano M, Nevins JR, Wharton RP (1996) Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev* 10(11):1422-1432. doi: 10.1101/gad.10.11.1422
- Bargellini A, Piccinini L, De Palma M, Giacobazzi P, Scaltriti S, Mariano M, Roncaglia R, Borella P (2003) Trace elements, anxiety and immune parameters in patients affected by cancer. *J Trace Elem Med Biol* ; 17(1):3-9.
- Benhamou S, Sarasin A (2005) ERCC2 /XPD gene polymorphisms and lung cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 161(1):1-14. doi: 10.1093/aje/kwi018
- Boguski MS, McCormick F (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366(6456):643-654. doi:10.1038/366643a0
- Boone CW, Steele VE, Kelloff GJ (1992) Screening for chemopreventive (anticarcinogenic) compounds in rodents. *Mutat. Res* 267(2):251-255. doi:10.1016/0027-5107(92)90069-E
- Bowles M, Lally J, Fadden AJ, Mouilleron S, Hammonds T, McDonald NQ (2012) Fluorescence-based incision assay for human XPF–ERCC1 activity identifies important elements of DNA junction recognition. *Nucleic Acids Res* 40(13):e101. doi: 10.1093/nar/gks284
- Burdge GC, Lillycrop KA, Jacson AA (2009) Nutrition in early life, and risk of cancer and metabolic disease: alternative endings in an epigenetic tale? *Br J Nutr* 101(5):619-30. doi: 10.1017/S0007114508145883
- Caulfield LE, Zavaleta N, Shankar A, Merialdi M (1998) Potential contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival. *Am J Clin Nutr* 68(2):499-508.
- Cho H, Chung JY, Song KH, Noh KH, Kim BW, Chung EJ, Ylaya K, Kim JH, Kim TW, Hewitt SM1, Kim JH (2014) Apoptosis inhibitor-5 overexpression is associated with tumor progression and poor prognosis in patients with cervical cancer. *BMC Cancer* 14:545. doi: 10.1186/1471-2407-14-545

- Ciccia A, McDonald N, West SC (2008) Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. *Annu Rev Biochem* 77:259-287. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.070306.102408.
- Clair T, Miller WR, Cho-Chung YS (1987) Prognostic significance of the expression of a ras protein with a molecular weight of 21,000 by human breast cancer. *Cancer Res* 47(20): 5290-5293.
- Clark GJ and Der CJ (1995) Aberrant function of the Ras signal transduction pathway in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 35(1):133-144.
- Costa I, Solanas M, Escrich E (2002) Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12dimethylbenz(alpha)anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors. *Arch Pathol Lab Med* 126(8):915-927.
- Cui L, Takagi Y, Sando K, Wasa, M, Okada A (2000) Nitric oxide synthase inhibitor attenuates inflammatory lesions in the skin of zinc-deficient rats. *Nutrition* 16(1):34-41. doi:10.1016/S0899-9007(99)00185-9
- Cui Y, Vogt S, Olson N, Glass AG, Rohan TE (2007) Levels of zinc, selenium, calcium, and iron in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 16(8):1682-1685. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0187
- de Assis S, Galam K, Hilakivi-Clarke L (2006) High birth weight increases mammary tumorigenesis in rats. *Int J Cancer* 119(7):1537-1546. doi: 10.1002/ijc.21936
- de Assis S, Warri A, Cruz MI, Hilakivi-Clarke L (2010) Changes in Mammary Gland Morphology and Breast Cancer Risk in Rats. *J Vis Exp* 16(44):2260. doi: 10.3791/2260
- Dempsey C, McCormick NH, Croxford TP, Seo YA, Grider A, Kelleher SL (2012) Marginal Maternal Zinc Deficiency in Lactating Mice Reduces Secretory Capacity and Alters Milk Composition. *J Nutr* 142(4):655-60. doi: 10.3945/jn.111.150623
- DeWys W, Pories WJ, Richter MC, Strain WH (1970) Inhibition of Walker 256 carcinosarcoma growth of dietary zinc deficiency. *Proc Soc Exp Biol Med* 135(1):17-22.
- Dias MC, Furtado KS, Rodrigues MA, Barbisan LF (2013) Effects of Ginkgo biloba on chemically-induced mammary tumors in rats receiving tamoxifen. *BMC Complement Altern Med* 13:93.
- Eide DJ. The oxidative stress of zinc deficiency (2011) *Metallomics* 3(11):1124–1129. doi: 10.1039/c1mt00064k
- Falchuk KH (1998) The molecular basis for the role of zinc in developmental biology. *Mol Cell Biochem* 188(1-2):41-48.
- Federico A, Iodice P, Federico P, Del Rio A, Mellone MC, Catalano G, Federico P (2001) Effects of selenium and zinc supplementation on nutritional status in patients with cancer of digestive tract. *Eur J Clin Nutr* 55(4):293-297.

- Fenech M, Ferguson LR (2001) Vitamins/minerals and genomic stability in humans. *Mut Res* 475(1-2):1-6. doi:10.1016/S0027-5107(01)00069-0
- Feng P, Li T, Guan Z, Franklin RB, Costello LC (2008) The involvement of Bax in zinc-induced mitochondrial apoptogenesis in malignant prostate cells. *Mol Cancer* 10(7):25. doi: 10.1186/1476-4598-7-25
- Fenton SE (2006) Endocrine-disrupting compounds and mammary gland development: early exposure and later life consequences. *Endocrinology* 147(6):18-24. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2005-1131>
- Fernandes AG, Mafra D (2005) Zinco e Câncer: uma revisão. *Rev Saúde Com* 1:144-156.
- Finley JW (2005) Proposed criteria for assessing the efficacy of cancer reduction by plant foods enriched in carotenoids, glucosinolates, polyphenols and selenocompounds. *Ann Bot* 95(7):1075-1096. doi: 10.1093/aob/mci123
- Fraker PJ, King LE, Laakko T, Vollmer TL (2000) The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. *J. Nutr* 130(5):1399-1406.
- Franklin RB, Costello LC (2007) Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers. *Biochem Bioph* 463(2):211-217. Zinc as an anti-tumor agent in prostate cancer and in other cancers. *Biochem Bioph* 463(2):211-217.
- Franklin RB, Costello LC (2009) The important role of the apoptotic effects of zinc in the development of cancers. *Cell Biochem* 106(5):750-7. doi: 10.1002/jcb.22049.
- Fu JM, Zhou J, Shi J, Xie JS, Huang L, Yip AY, Loo WT, Chow LW, Ng EL (2012) Emodin affects ERCC1 expression in breast cancer cells. *J Transl Med* 19(1):1S7. doi: 10.1186/1479-5876-10-S1-S7
- Garcia-Jove Navarro M, Basset C, Arcondeguy T, Touriol C, Perez G, Prats H, Lacazette E (2013) Api5 contributes to E2F1 control of the G1/S cell cycle phase transition. *PLoS One* 8(8): e71443. doi: 10.1371/journal.pone.0071443
- Gasco M, Shami S, Crook T (2002) The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* 4(2):70-76. doi: 10.1186/bcr426
- Gaur A, Collins H, Wulaningsih W, Holmberg L, Garmo H, Hammar N, Walldius G, Jungner I, Van Hemelrijck M (2013) Iron metabolism and risk of cancer in the Swedish AMORIS study. *Cancer Causes Control* 24(7):1393-1402. doi: 10.1007/s10552-013-0219-8
- Gerhard R, Carvalho A, Carneiro V, Bento RS, Uemura G, Gomes M, Albergaria A, Schmitt F (2013) Clinicopathological significance of ERCC1 expression in breast cancer. *Pathol Res Pract* 209(6):331-336. doi: 10.1016/j.prp.2013.02.009
- Goode EL, Ulrich CM, Potter JD (2002) Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11(12):1513-1530.

- Grattan BJ, Freake HC (2012) Zinc and Cancer: implications for LIV-1 in breast cancer. *Nutrients* 4(7):648-675. doi: 10.3390/nu4070648
- Grubbs CL, Hill DL, McDonough KC, Peckman JC (1983) N-nitroso-N-methylurea-induced mammary carcinogenesis: effect of pregnancy on preneoplastic cells. *J Natl Cancer Inst* 71(3):625-628.
- Guha M, Xia F, Raskett CM and Altieri DC (2010) Caspase 2-mediated tumor suppression involves survivin gene silencing caspase 2 regulation of tumor growth. *Oncogene* 29(9):1280-1292. doi: 10.1038/onc.2009.428
- Gumulec J, Masarik M, Krizkova S, Adam V, Hubalek J, Hrabeta J (2011) Insight to Physiology and Pathology of Zinc (II) Ions and Their Actions in Breast and Prostate Carcinoma. *Curr Med Chem* 18(33):5041-51. doi: 10.2174/092986711797636126
- Harris CC (1996) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: Clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 88(20):1442-1455. doi: 10.1093/jnci/88.20.1442
- Hashemi M, Ghavami S, Eshraghi M, Booy EP, Los M (2007) Cytotoxic effect of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells *Eur J Pharmacol* 557(1):9-192. doi:10.1016/j.ejphar.2006.11.010
- Helzlsouer KJ, Harris EL, Parshad R, Fogel S, Bigbee WL, Sanford KK (1995) Familial clustering of breast cancer: possible interaction between DNA repair proficiency and radiation exposure in the development of breast cancer. *Int J Cancer* 64(1):14-17.
- Helzlsouer KJ, Harris EL, Parshad R, Perry HR, Price FM, Sanford KK (1996) DNA repair proficiency: potential susceptibility factor for breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 88(11):754-745. doi: 10.1093/jnci/88.11.754
- Hilakivi-Clarke L, de Assis S (2006) Fetal origins of breast cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 17(9):340-348.
- Hilakivi-Clarke L, Cabanes A, de AS, Wang M, Khan G, Shoemaker WJ, Stevens RG (2004) In utero alcohol exposure increases mammary tumorigenesis in rats. *Br J Cancer* 90(11): 2225-2231. doi:10.1016/j.tem.2006.09.002
- Hilakivi-Clarke L, Cho E, Raygada M & Kenney N (1997) Alterations in mammary gland development following neonatal exposure to estradiol, transforming growth factor alpha, and estrogen receptor antagonist ICI 182,780. *J Cell Physiol* 170(3):279-289. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652
- Ho E, Ames BN (2002) Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFkB, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci* 99(26):16770-16775. doi: 10.1073/pnas.222679399

- Ho E, Courtemanche C, Ames BN (2003) Zinc deficiency induces oxidative DNA damage and increases p53 expression in human lung fibroblasts. *J Nutr* 133(8):2543-2548.
- Ho E (2004) Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *J Nutr Biochem* 15(10):572-578. doi:10.1016/j.jnutbio.2004.07.005
- Hoffrer M, Wirbelauer C, Humar B, Krek W (1999). Increased levels of E2F-1-dependent DNA binding activity after UV- or gamma-irradiation. *Nucleic Acids Res* 27(2):491-495.
- Houstmuller AB, Rademarkers S, Nigg AL, HoogstratenD, Hoeijmakers JH, Vermeulen W (1999) Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science* 284:958-961.
- Hsu SM, Raine L (1981) Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 29(11):1349-1353. doi: 10.1177/29.11.6172466
- Huang YL, Sheu JY, Lin TH (1999) Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clin Biochemistry* 32(2):131-136. doi:10.1016/S0009-9120(98)00096-4
- Kaji M (2001) Zinc in endocrinology. *IntPediatr* 16:1-7.
- Kelleher SL, Seo YA, Lopez V (2009) Mammary gland zinc metabolism: regulation and dysregulation. *Genes Nutr* 4(2):83-94. doi: 10.1007/s12263-009-0119-4
- Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV (1994) Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73(8):2013-2016. doi: 10.1002/1097-0142
- Kettenberger H, Armache KJ, Cramer P (2003) Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell* 114(3):347-357. doi:10.1016/S0092-8674(03)00598-1
- Khan G, Penttinen P, Cabanes A, Foxworth A, Chezek A, Mastropole K, Yu B, Smeds A, Halttunen T, Good C, Makela S, Hilakivi-Clarke L (2007) Maternal flaxseed diet during pregnancy or lactation increases female rat offspring's susceptibility to carcinogen-induced mammary tumorigenesis. *Rep Toxicol* 23(3):397-406. doi:10.1016/j.reprotox.2007.02.002
- Kim D, Jung W, Koo JS (2011) The expression of ERCC1, RRM1, and BRCA1 in breastcancer according to the immunohistochemical phenotypes. *J Korean Med Sci* 26(3):352-359. doi: 10.3346/jkms.2011.26.3.352
- Kim JW, Cho HS, Kim JH, Hur SY, Kim TE, Lee JM, Kim IK, Namkoong SE (2000) AAC-11 overexpression induces invasion and protects cervical cancer cells from apoptosis. *Lab Invest* 80(4):587-594.
- Kloubert V, Rink L (2015) Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells. *Food Funct* 6(10):3195-3204. doi: 10.1039/c5fo00630a

- Kontorovich T, Levy A, Korostishevsky M, Nir U, Friedman E (2010) Single nucleotide polymorphisms in miRNA binding sites and miRNA genes as breast/ovarian cancer risk modifiers in Jewish high-risk women. *Int J Cancer* 127(3):589-597. doi: 10.1002/ijc.25065.
- Krejci P, Pejchalova K, Rosenbloom BE, Rosenfelt FP, Tran EL (2007) The antiapoptotic protein Api5 and its partner, high molecular weight FGF2, are up-regulated in B cell chronic lymphoid leukemia. *J Leukoc Biol* 82(6):1363-1364. doi:10.1189/jlb.0607425
- Lee KM, Choi JY, Kang C, Kang CP, Park SK, Cho H, Cho DY, Yoo KY, Noh DY, Ahn SH, Park CG, Wei Q, Kang D (2005) Genetic polymorphisms of selected DNA repair genes, estrogen and progesterone receptor status, and breast cancer risk. *Clin Cancer Res* 11(12):4620-4626. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2534
- Lee S, Simpson M, Nimmo M, Xu Z (2004) Low zinc intake suppressed N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 25(10):1879-1885. doi: 10.1093/carcin/bgh214
- Lehmann AR (2003) DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* 85(11):1101-1111. doi:10.1016/j.biochi.2003.09.010
- Leitzmann MF, Stampfer MJ, Wu KN, Colditz GA, Willett WC, Giovannucci EL (2003) Zinc supplement use and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 95(13):1004-1007. doi: 10.1093/jnci/95.13.1004
- Leone N, Courbon D, Ducimetiere P, Zureik M (2006) Zinc, copper, and magnesium and risks for all-cause, cancer, and cardiovascular mortality. *Epidemiology* 17(3):308-314. doi: 10.1097/01.ede.0000209454.41466.b7
- Liu J, Meng X, Shen Z (2002) Association of human RAD52 protein with transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 297(5):1191-6. doi:10.1016/S0006-291X(02)02353-7
- Lopez V, Kelleher SL (2010) Zip6-attenuation promotes epithelial-to-mesenchymal transition in ductal breast tumor (T47D) cells. *Exp Cell Res* 316(3):366-375. doi: 10.1016/j.yexcr.2009.10.011
- Macaisne N, Novatchkova M, Peirera L, Vezon D, Jolivet S, Froger N, Chelysheva L, Grelon M and Mercier R (2008) SHOC1, an XPF endonuclease-related protein, is essential for the formation of class I meiotic crossovers. *Curr Biol* 18(18):1432-1437. doi: 10.1016/j.cub.2008.08.041
- MacDonald RS (2000) The role of zinc in growth and cell proliferation. *J Nutr* 130(5):1500-1508.

- Macejová D, Brtko J (2001) Chemically induced carcinogenesis: a comparison of 1-methyl-1-nitrosurea, 7,12-dimethylbenzanthracene, diethylnitroso-amine and azoxymethan models (mini-review). *Endocr Regul* 35(1):53-9.
- Mandrup KR, Hass U, Christiansen S, Boberg J (2012) Perinatal ethinyloestradiol alters mammary gland development in male and female Wistar rats. *Int J Androl* 35(3):385-396. doi: 10.1111/j.1365-2605.2012.01258.x
- Margalioth EJ, Schenker JG, Chevion M (1983) Copper and zinc levels in normal and malignant tissues. *Cancer* 52(5):868-872. doi: 10.1002/1097-0142
- McCall KA, Huang C, Fierke CA (2000) Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr* 130(5):1437-1446.
- McQuitty JT, DeWys WD, Monaco L, Strain WH, Rob CG, Apgar J, Pories WJ (1970) Inhibition of tumor growth by dietary zinc deficiency. *Cancer Res* 30(5):1387-1390.
- Mehta RG (2000) Experimental basis for the prevention of breast cancer. *Eur J Cancer* 36(10):1275-1282. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-8049\(00\)00100-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-8049(00)00100-3)
- Meterissian SH (1997) Apoptosis: its role in the progression of and chemotherapy for carcinoma. *J Am Coll Surg* 184(6):658-666.
- Mills BJ, Broghamer WL, Higgins PJ, Lindeman RD (1984) Inhibition of tumor growth by zinc depletion of rats. *J Nutr* 114(4):746-752.
- Milner JA (2004) Molecular targets for bioactive food components. *J Nutr* 134(9):2492-2498.
- Min JH, Pavletich NP (2007) Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. *Nature* 449(7162):570-575. doi:10.1038/nature06155
- Mojgan H, Massoud H and Ahmad E (2012) ERCC1 intron 1 was associated with breast cancer risk. *Arch Med Sci* 8(4):655-658. doi:10.5114/aoms.2012.30289
- Moon A, Kim MS, Kim TG, Kim SH, Kim HE, Chen YQ, Kim HR (2000) H-ras, but not N-ras, induces an invasive phenotype in human breast epithelial cells: a role for MMP-2 in the H-ras-induced invasive phenotype. *Int J Cancer* 85(2):176-181. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000115)85:2<176::AID-IJC5>3.0.CO;2-E
- Moon NS, Frolov MV, Kwon EJ, Di Stefano L, Dimova DK (2005) Drosophila E2F1 has context-specific pro- and antiapoptotic properties during development. *Dev Cell* 9(4):463-475. doi:10.1016/j.devcel.2005.08.015
- Morris EJ, Michaud WA, Ji JY, Moon NS, Rocco JW (2006) Functional identification of Api5 as a suppressor of E2F-dependent apoptosis in vivo. *PLoS Genet* 12(11):e196. Doi: 10.1371/journal.pgen.0020196
- Muris DF, Bezzubova O, Buerstedde JM, Vreeken K, Balajee AS, Osgood CJ, Troelstra C, Hoeijmakers JH, Ostermann K, Schmidt H (1994) Cloning of human and mouse genes

- homologous to RAD52, a yeast gene involved in DNA repair and recombination. *Mutat Res* 315(3):295-305. doi:10.1016/0921-8777(94)90040-X
- Newman M, Murray-Rust J, Lally J, Rudolf J, Fadden A, Knowles PP, White MF, McDonald NQ (2005) Structure of an XPF endonuclease with and without DNA suggests a model for substrate recognition. *EMBO J* 24(5):895-905. doi: 10.1038/sj.emboj.7600581
- Nishino T, Komori K, Ishino Y, Morikawa K (2005) Structural and functional analyses of an archaeal XPF/Rad1/ Mus81 nuclease: asymmetric DNA binding and cleavage mechanisms. *Structure* 13(8):1183-1192. doi:10.1016/j.str.2005.04.024
- Oteiza PI, Clegg MS, Zago MP, Keen CL (2000) Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells. *Free Radical Biol Med* 28(7):1091-1099. doi:10.1016/S0891-5849(00)00200-8
- Park MS, Ludwig DL, Stigger E, Lee SH (1996) Physical interaction between human RAD52 and RPA is required for homologous recombination in mammalian cells. *J Biol Chem* 271(31):18996-19000. doi:10.1074/jbc.271.31.18996
- Paski SC, Xu Z (2002) Growth factor stimulated cell proliferation is accompanied by an elevated labile intracellular pool of zinc in 3T3 cells. *Can J Physiol Pharmacol* 80(8):790-795.
- Paski SC, Xu Z (2001) Labile intracellular zinc is associated with 3T3 cell growth. *J Nutr Biochem* 12(11):655-661. doi:10.1016/S0955-2863(01)00188-7
- Perry DK, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG, Hannun YA (1997) Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. A novel target for zinc in the inhibition of apoptosis. *J Biol Chem* 272(30):18530-18533. doi:10.1074/jbc.272.30.18530
- Plum LM, Rink L, Haase H (2010) The Essential Toxin: Impact of Zinc on Human Health. *Int J Environ Res Public Health* 7(4):1342-1365. doi: 10.3390/ijerph7041342
- Pories WJ, DeWys WD, Flynn A, Mansour EG, Strain, WH (1977) Implications of the inhibition of animal tumors by dietary zinc deficiency. *Adv Exp Med Biol* 91:243-257.
- Prasad A (2011) Discovery of zinc deficiency in humans and its impact fifty years later. In: Rink L (ed) *Zinc in Human Health*. IOS Press Aachen 7-28.
- Prasad AS (1998) Zinc deficiency in humans: a neglected problem. *J Am Coll Nutr* 17(6):542-543.
- Prasad AS (2003) Zinc deficiency. *BMJ* 326(7386):409-410. doi: 10.1136/bmj.326.7386.409
- Prasad AS, Kucuk O (2002) Zinc in cancer prevention. *Cancer Metastasis Rev* 21(3-4):291-295.

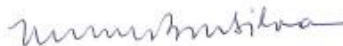
- Ramdas P, Rajihuzzaman M, Veerasenan SD, Selvaduray KR, NesaretnamK, Radhakrishnan AK (2011) Tocotrienol-treated MCF-7 Human Breast Cancer Cells ShowDown-regulation of API5 and Up-regulation of MIG6 Genes.Cancer Genomics Proteomics 8(1):19-31.
- Rink L (2011) (ed). Zinc in Human Health. IOS Press Aachen.
- Romanowicz-Makowska H, Smolarz B, Zadrozny M, Westfal B, Baszczynski J, Polac I, Sporny S (2011) Single nucleotide polymorphisms in the homologous recombination repair genes and breast cancer risk in Polish women. Tohoku J Exp Med 224(3):201-208. doi: 1620/tjem.224.201
- Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R (2013) Zinc and its importance for human health: An integrative review. J Res Med Sci 18(2):144-57.
- Rudel RA, Fenton SE, Ackerman JM, Euling SY & Makris SL (2011) Environmental exposures and mammary gland development: state of the science, public health implications, and research recommendations. Environ Health Perspect 119(8):1053-1061. doi: 10.1289/ehp.1002864
- Russell R, Beard JL, Cousins RJ (2001) Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, The National Academic Press Washington DC.
- Russo IH, Russo J (1996a) Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. Environ Health Perspect 104(9):938-967.
- Russo J, Russo IH (1996b) Experimentally induced mammary tumors in rats. Breast Cancer Res Treat 39(1):7-20.
- Russo J, Russo IH (2000) Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland.J. Mammary Gland BiolNeoplasia 5(2):187-200.
- Russo J, Russo IH (1987) Biological and molecular bases of mammary carcinogenesis. Lab Invest 57(2):112-37.
- Russo J, Russo IH (1978) Development stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethybenz(a)anthracene. J Natl Cancer Inst 61(6):1439-1449. doi: 10.1093/jnci/61.6.1439
- Russo J, Russo IH (1983) Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. III. The cell of origin of rat mammary carcinoma. Am J Pathol 113(1):50-66. doi:10.1186/bcr3607
- Russo J, Wilgus G, Russo IH (1979) Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis1.Differentiation of the mammary gland asdeterminant of tumor incidence and type of lesion. Am J Pathol 96(3):721-736.
- Sandstead HH (1995) Is zinc deficiency a public problem? Nutrition 11(1)87-92. doi: 10.1001/archpedi.1991.02160080029016

- Sandstrom B (1997) Bioavailability of zinc. *Eur J Clin Nutr* 51(1):17-19.
- Santoliquido PM, Southwick HW, Olwin JH (1976) Trace metal levels in cancer of the breast. *Surg Gynecol Obstet* 142(1):65-70. doi:10.1007/s00432-015-1932-3
- Shields PG, Harris CC (1991) Molecular epidemiology and the genetics of environmental cancer. *JAMA* 266(5):681-687. doi:10.1001/jama.1991.03470050081027
- Shimoaraiso M, Nakanishi T, Kubo T, Natori S (2000) Transcription elongation factor S-II confers yeast resistance to 6-azauracil by enhancing expression of the SSM1 gene. *J Biol Chem* 275(38):29623-29627. doi: 10.1074/jbc.M910371199
- Sidoni A, Cartaginense F, Colozza M, Gori S, Crinó L (2008) ERCC1 expression in triple negative breast carcinoma: the paradox revisited, *Breast Cancer Res. Treat.*; 111(3):569-570.
- Silva MP (2007) Estudo da fluorescência de elementos traços para identificar a presença de neoplasias mamárias [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo.
- SivaRaman L, Reines D, Kane CM (1990) Purified elongation factor SII is sufficient to promote read-through by purified RNA polymerase II at specific termination sites in the human histone H3.3 gene. *J Biol Chem* 265(24):14554-14560.
- Song KH, Kim SH, Noh KH, Bae HC, Kim JH, Lee HJ, Song J, Kang TH, Kim DW, Oh SJ, Jeon JH, Kim TW (2015) Apoptosis Inhibitor 5 Increases Metastasis via Erk-mediated MMP expression. *BMB Rep* 48(6):330–335. doi:10.5483/BMBRep.2015.48.6.139
- Stennicke HR, Salvesen GS (1997) Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem* 272(41):25719-25723. doi:10.1074/jbc.272.41.25719
- Sterpone S, Mastellone V, Padua L, Novelli F, Patrono C, Cornetta T, Giammarino D, Donato V, Testa A, Cozzi R (2010) Singlenucleotide polymorphisms in BER and HRR genes, XRCC1 haplotypes and breast cancer risk in Caucasian women. *J Cancer Res Clin Oncol* 136(4):631-636. doi: 10.1007/s00432-010-0791-1
- Sugasawa K, Okuda Y, Saijo M, Nishi R, Matsuda N, Chu G, Mori T, Iwai S, Tanaka K, Tanaka K, Hanaoka F (2005) UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 121(3):387-400. doi:10.1016/j.cell.2005.02.035
- Sun D, Zhang L, Wang Y, Wang X, Hu X, Cui FA, Kong F (2007b) Regulation of zinc transporters by dietary zinc supplement in breast cancer. *Mol Biol Rep* 34(4):241-247.
- Sun JY, Jing MY, Weng XY, Fu LJ, Xu ZR, Zi NT, Wang JF (2005) Effects of dietary zinc levels on the activities of enzymes, weights of organs and the concentrations of zinc and copper in growing rats. *Biol Trace Element Res* 107(2):153-165.
- Sun JY, Wang JF, Zi NT, Jing MY, Weng XY (2007a) Gene expression profiles analysis of the growing rat liver in response to different zinc status by cDNA microarray analysis. *Biol Trace Element Res* 115(2):157-185. doi:10.1007/BF02686028

- Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (2004) Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação (NEPA). Universidade de Campinas UNICAMP. Disponível em URL: [http:// www.unicamp.br/nepa/taco](http://www.unicamp.br/nepa/taco).
- Tapiero H, Tew KD (2003) Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother* 57(9):399-411. doi:10.1016/S0753-3322(03)00081-7
- Taylor KM, Morgan HE, Smart K, Zahari NM, Pumford S, Ellis IO, Robertson JF, Nicholson RI (2007) The emerging role of the LIV-1 subfamily of zinc transporters in breast cancer. *Mol Med* 13(7-8):396-406. doi:10.2119/2007-00040
- Tewari M, Yu M, Ross B, Dean C, Giordano A, Rubin R (1997) AAC-11, a novel cDNA that inhibits apoptosis after growth factor withdrawal. *Cancer research* 57(18):4063-4069. doi:10.1371/journal.pone.0076029
- Thompson HJ, Singh M (2000) Rat models of premalignant breast disease. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(4):409-420.
- Tomat AL, Insera F, Veiras L, Vallone MC, Balaszczuk AM, Costa MA, Arranz C (2008) Moderate zinc restriction during fetal and postnatal growth of rats: effects on adult arterial blood pressure and kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:543-549. doi:10.1016/j.nut.2012.09.008
- Tripsianes K, Folkers G, Ab E, Das D, Odijk H, Jaspers NG, Hoeijmakers JH, Kaptein R, Boelens R (2005) The structure of the human ERCC1/XPF interaction domains reveals a complementary role for the two proteins in nucleotide excision repair. *Structure* 13(12):1849-1858. doi:10.1016/j.str.2005.08.014
- Tsodikov OV, Enzlin JH, Scharer OD and Ellenberger T (2005) Crystal structure and DNA binding functions of ERCC1, a subunit of the DNA structure-specific endonuclease XPF-ERCC1. *Proc Natl Acad Sci* 102(32):11236-11241. doi: 10.1073/pnas.0504341102
- Wang Z, Liu H, Liu B, Ma W, Xue X, Chen J, Zhou Q (2010) Gene expression levels of CSNK1A1 and AAC-11, but not NME1, in tumor tissues as prognostic factors in NSCLC patients. *Med Sci Monit* 16(8):357-364.
- Watkins AJ, Fleming TP (2009) Blastocyst environment and its influence on offspring cardiovascular health: the heart of the matter. *J Anatomy* 215(1):52-9. doi: 10.1111/j.1469-7580.2008.01033.x
- Watson DM, Elton RA, Jack WJ, Dixon JM, Chetty U, Miller WR (1991) The H-ras oncogene product p21 and prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 17(3):161-169. Doi:10.1186/bcr2725
- White MF (2003) Archaeal DNA repair: paradigms and puzzles. *Biochem Soc Trans* 31(3): 690-693. doi: 10.1042/bst0310690

- Willet WC (2001) Diet and Breast cancer. *J Int Med* 249(5):395-411. doi: 10.1046/j.1365-2796.2001.00822.x
- Wind M, Reines D (2000) Transcription elongation factor SII. *Bioessays* 22(4):327-336. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(200004)22:4<327::AID-BIES3>3.0.CO;2-4
- Woo W, Xu Z (2002) Body zinc distribution profile during N-methyl-N-nitrosurea induced mammary tumorigenesis in rats at various levels of dietary zinc intake. *Biol Trace Elem Res* 87(1-3):157-169.
- Yan M, Song Y, Wong CP, Hardin K, Ho E (2008) Zinc Deficiency Alters DNA Damage Response Genes in Normal Human Prostate Epithelial Cells. *J Nutr* 138(4):667-73. Doi: 10.3945/jn.109.106369
- Yong HY, Hwang JS, Son H, Park HI, Oh ES, Kim HH, Kim do K, Choi WS, Lee BJ, Kim HR, Moon A (2011) Identification of H-Ras-Specific Motif for the Activation of Invasive Signaling Program in Human Breast Epithelial Cells. *Neoplasia* 13(2):98-107. doi: 10.1593/neo.101088
- Youn CK, Kim MH, Cho HJ, Kim HB, Chang IY, Chung MH, You HJ (2004) Oncogenic H-Ras Up-Regulates Expression of ERCC1 to Protect Cells from Platinum-Based Anticancer Agents. *Cancer Res* 64(14):4849-4857. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0348
- Yu X, Jin L, Zhang X, Yu X (2013) Effects of maternal mild zinc deficiency and zinc supplementation in offspring on spatial memory and hippocampal neuronal ultrastructural changes. *Nutrition* 29(2):457-461. doi: 10.1016/j.nut.2012.09.002
- Zalewski PD, Forbes IJ, Betts WH (1993) Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II). *Biochem J* 296(2):403-408. doi:10.1042/bj2960403
- Zhu J, Hua RX, Jiang J, Zhao LQ, Sun X, Luan J, Lang Y, Sun Y, Shang K, Peng S, Ma J (2014) Association Studies of ERCC1 Polymorphisms with Lung Cancer Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 9(5):e97616. doi: 10.1371/journal.pone.0097616

ANEXO 1

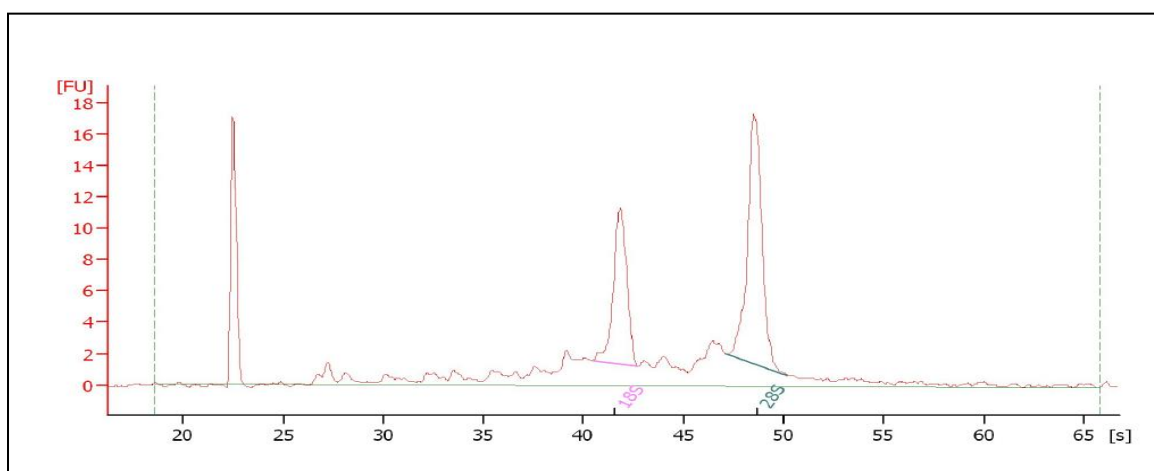
	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA		 Comissão de Ética em Experimentação Animal  Criada através da Portaria DFM nº 30 de 28/04/99
Certificado			
Certificamos que (Protocolo CEEA 917-2011) "Efeitos da exposição gestacional, lactacional e juvenil às dietas com deficiência e suplementação de zinco e suscetibilidade a carcinogênese da mama em fêmeas Sprague-Dawley", a ser conduzido por Flávia Regina Moraes da Silva, orientada pelo Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan, co-orientada por Lucas Tadeu Bidinotto, com a colaboração de Gisele Aparecida Dionísio Lopes e Maria Aparecida Marchesan Rodrigues Kobayasi, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.			
Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 24/11/2011.			
 Prof ^a Dr ^a Maria Rosa Bet Moraes Silva Presidente da CEEA	 Alberto Santos Capelluppi Secretário da CEEA		
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br			

ANEXO 2

Tabela 1. Dados da extração de RNA das glândulas mamárias da prole de fêmeas do DPN 53.

Amostras	Concentração (ng/ul)	260/280nm ¹	RIN ²
(G1) Zn (3mg/Kg)			
1	121,6	1,9	7,00
2	67,2	1,9	7,30
3	44,4	1,8	8,5
4	1.030,0	1,9	8,2
5	173,6	1,8	7,7
(G2) Zn (35mg/Kg)			
1	54,8	2,0	7,1
2	106,8	2,0	7,0
3	533,2	1,8	7,9
4	444,0	1,9	7,1
5	84,4	1,9	8,3
(G3) Zn (180mg/Kg)			
1	43,6	1,9	7,5
2	42,8	1,9	7,2
3	88,0	1,9	7,4
4	193,2	2,0	7,0
5	72,4	2,0	8,0

¹Razão de absorvância relacionada a pureza (livre de contaminantes proteicos) do RNA; ² Número de integridade do RNA (RIN).

**Figura 1.** Eletroferogramas representando RNAs de boa qualidade. Os picos representam as bandas de 28S e 18S (direita e esquerda) do RNA ribossômico.

ANEXO 3

Tabela Suplementar – Genes avaliados, presentes no cartão microfluído TaqMan® Array, e os processos com os quais eles estão relacionados.

Unigene	GeneBank	Símbolo	Descrição	Gene ame	Processo*
Rn.3105	NM_001100850	Abl1	C-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase	Abl	1
Rn.64522	NM_023979	Apaf1	Apoptotic peptidase activating factor 1	-	2, 5
Rn.5949	NM_024148	Apex1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	APE, Apex, REF-1	3, 4, 5
Rn.103083	NM_001127379	Api5	Apoptosis inhibitor 5	MGC187857	2
Rn.42932	NM_021702	Atxn3	Ataxin 3	Rsca3	4
Rn.145049	NM_001107757	Aven	Apoptosis, caspase activation inhibitor	-	2
Rn.36696	NM_022698	Bad	BCL2-associated agonist of cell death	MGC72439	2, 6
Rn.16320	NM_001106647	Bag1	BCL2-associated athanogene	-	2, 5, 6
Rn.10668	NM_017059	Bax	Bcl2-associated X protein	-	2, 5
Rn.9996	NM_016993	Bcl2	B-cell CLL/lymphoma 2	Bcl-2	1, 2, 5, 6
Rn.31142	NM_022684	Bid	BH3 interacting domain death agonist	-	2, 5
Rn.48840	NM_012514	Brca1	Breast cancer 1	-	1, 3, 4, 5
Rn.103225	NM_031542	Brca2	Breast cancer 2	-	1, 3, 4, 5
Rn.107499	NM_012920	Camk2a	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	PK2CDD, PKCCD	1
Rn.10562	NM_012922	Casp3	Caspase 3	Lice, MGC93645	1, 2
Rn.16195	NM_053736	Casp4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	Casp11, MGC124949	2
Rn.88160	NM_031775	Casp6	Caspase 6	MGC93335, Mch2	2
Rn.53995	NM_022260	Casp7	Caspase 7	-	2
Rn.54474	NM_022277	Casp8	Caspase 8	-	2
Rn.32199	NM_031632	Casp9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	Apaf3, Casp-9-CTD, Casp9_v1, Ice-Lap6, Mch6	2, 5
Rn.13094	NM_053702	Ccna2	Cyclin A2	MGC156527	1, 6
Rn.6743	NM_001009470	Ccnb2	Cyclin B2	MGC108931	1, 5
Rn.22279	NM_171992	Ccnd1	Cyclin D1	-	1, 6
Rn.15455	NM_001100821	Ccne1	Cyclin E1	CYCLE, Ccne	1, 6
Rn.98992	NM_001108656	Ccne2	Cyclin E2	-	5, 6
Rn.25180	NM_134360	Cd40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	Tnfrsf5	2
Rn.1120	NM_012924	Cd44	Cd44 molecule	CD44A, META, MGC124941, RHAMM	6
Rn.11390	NM_133571	Cdc25a	Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	-	1, 5
Rn.6934	NM_019296	Cdk1	Cyclin-dependent kinase 1	Cdc2, Cdc2a	5
Rn.6115	NM_053593	Cdk4	Cyclin-dependent kinase 4	-	1, 5
Rn.10089	NM_080782	Cdkn1a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	Cip1, Waf1	1, 5, 6
Rn.48717	NM_031550	Cdkn2a	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	Arf, INK4A, MTS1, p16, p16Cdkn2a, p19ARF	1, 5, 6
Rn.8171	NM_001170467	Cidea	Cell death-inducing DFFA-like effector a	-	2
Rn.204016	NM_001108869	Cideb	Cell death-inducing DFFA-like effector b	-	2
Rn.32259	NM_031702	Cldn7	Claudin 7	MGC124679	6
Rn.7262	NM_138910	Dad1	Defender against cell death 1	-	2

Rn.41244	NM_001106201	Dclre1a	DNA cross-link repair 1A, PSO2 homolog (S. cerevisiae)	-	3, 4
Rn.8402	NM_171995	Ddb1	Damage-specific DNA binding protein 1	-	4
Rn.154614	XM_242065	Ddb2	Damage specific DNA binding protein 2	-	4
Rn.6955	NM_053354	Dnmt1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	-	5
Rn.72471	NM_001100778	E2f1	E2F transcription factor 1	-	1, 5
Rn.73967	XM_214476	E2f3	E2F transcription factor 3	RGD1561600	1, 5
Rn.154586	XM_226441	E2f4	E2F transcription factor 4	-	1
Rn.37227	NM_031507	Egfr	Epidermal growth factor receptor	ERBB1, ErbB-1, Errp	6
Rn.9096	NM_012551	Egr1	Early growth response 1	Krox-24, NGFI-A, Ngf1, Ngfi, zif-268	5
Rn.12447	XM_576312	Ep300	E1A binding protein p300	-	5
Rn.93966	NM_017003	ErbB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	-	6
Rn.7320	NM_001106228	Ercc1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1	-	3, 4, 5
Rn.74906	NM_001172809	Ercc2	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2	-	3, 4
Rn.10595	NM_012689	Esr1	Estrogen receptor 1	ER-alpha, Esr, RNESTROR	5, 6
Rn.37460	NM_012754	Esr2	Estrogen receptor 2 (ER beta)	ER-beta, ERbeta, Erb2	6
Rn.52638	NM_001107198	Exo1	Exonuclease 1	-	3, 4
Rn.16664	NM_053430	Fen1	Flap structure-specific endonuclease 1	FEN-1, MGC94425	3, 4
Rn.24593	NM_001106395	Foxo3	Forkhead box O3	Fkhrl1, Foxo3a	5
Rn.10250	NM_024127	Gadd45a	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	Ddit1, Gadd45	1, 2, 3, 5
Rn.6813	NM_013122	Igfbp2	Insulin-like growth factor binding protein 2	IGFBP-2, ILGFBPA	6
Rn.93714	NM_021835	Jun	Jun oncogene	-	5, 6
Rn.11303	NM_130741	Lcn2	Lipocalin 2	-	6
Rn.162081	NM_001025425	Map2k7	Mitogen activated protein kinase kinase 7	2, JNKK	6
Rn.44266	NM_053777	Mapk8ip1	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1	JIP1, Jip-1, Mapk8ip	2
Rn.179073	XM_001059437	Mbd4	Methyl-CpG binding domain protein 4	-	3
Rn.9836	NM_012861	Mgmt	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	-	3, 4
Rn.73551	XM_225460	Mki67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	-	1, 6
Rn.11325	NM_053968	Mt3	Metallothionein 3	GIF, Mt-3	6
Rn.12072	NM_012603	Myc	Myelocytomatosis oncogene	MGC105490, RNCMYC, c-myc, mMyc	5
Rn.92423	XM_226742	Naip2	NLR family, apoptosis inhibitory protein 2	Birc1, Birc1a, Birc1b, Naip	2
Rn.10686	NM_012609	Nf1	Neurofibromin 1	-	5
Rn.2411	XM_342346	Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	NF-kB	2, 5
Rn.65930	NM_024358	Notch2	Notch homolog 2 (Drosophila)	-	1
Rn.11327	NM_013063	Parp1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1	Adprt, MGC93658, Parp-1	3, 4
Rn.9346	NM_017141	Polb	Polymerase (DNA directed), beta	-	2, 4
Rn.88690	NM_021662	Pold1	Polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit	-	3
Rn.40977	NM_001107152	Pole	Polymerase (DNA directed), epsilon	-	3
Rn.92419	NM_138516	Polk	Polymerase (DNA directed) kappa	Dinb1	3
Rn.105454	NM_001014168	Poll	Polymerase (DNA directed), lambda	-	4
Rn.138438	NM_001107529	Prc1	Protein regulator of cytokinesis 1	-	5

Rn.24110	NM_001108327	Prkdc	Protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide	MGC189093	3, 4
Rn.55115	NM_017045	Rb1	Retinoblastoma 1	-	5
Rn.19480	NM_199267	Rela	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	NFkB	5
Rn.25752	NM_057108	Serpinb5	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	Maspin, PI-5, Pi5	5, 6
Rn.154278	NM_001106416	Skp2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	RGD1562456	1
Rn.41053	NM_001012066	Sphk2	Sphingosine kinase 2	-	2
Rn.185771	NM_001013062	Thbs1	Thrombospondin 1	TSP-1, Tsp1	6
Rn.165619	NM_001169138	Thbs2	Thrombospondin 2	TSP-2	6
Rn.54443	NM_030989	Tp53	Tumor protein p53	MGC112612, Trp53, p53	1, 2, 3, 5, 6
Rn.42907	NM_019221	Tp63	Tumor protein p63	Ket, P73l, Tp73l, Trp63	1, 2, 5
Rn.103860	NM_001108696	Tp73	Tumor protein p73	P73, Trp73	2
Rn.1923	NM_031836	Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	VEGF164, Vegf	6
Rn.2710	NM_031140	Vim	Vimentin	-	6
Rn.92531	NM_031534	Wt1	Wilms tumor 1	-	5
Rn.2925	NM_022548	Zmat3	Zinc finger, matrin type 3	PAG608, Wig1	5
Rn.6059	NM_017050.1	Sod1	Sod1 superoxide dismutase 1, soluble	Sod1	4

*1- Ciclo celular; 2- Apoptose; 3- Dano de DNA; 4- Reparo de DNA; 5- Cascata do gene p53; 6- Cascata do receptor de estrógeno