

**Julia Santucci Pereira**

**EFEITO DA 2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO-P-DIOXINA  
(TCDD) NA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL DA GLÂNDULA  
MAMÁRIA DE RATAS DURANTE O SEU DESENVOLVIMENTO**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista  
de Medicina, para obtenção do título de  
Doutor em Ciências pelo programa de  
pós-graduação em Ginecologia

São Paulo  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Julia Santucci Pereira

EFEITO DA 2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO-P-DIOXINA  
(TCDD) NA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL DA GLÂNDULA  
MAMÁRIA DE RATAS DURANTE O SEU DESENVOLVIMENTO

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista  
de Medicina, para obtenção do título de  
Doutor em Ciências pelo programa de  
pós-graduação em Ginecologia

**Orientador:** Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

**Co-orientador:** Prof. Dr. Jose Russo

São Paulo  
2009

Pereira, Julia Santucci

**Efeito da 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) na  
Expressão Gênica Global da Glândula Mamária de Ratas Durante o  
Desenvolvimento** / Julia Santucci Pereira -- São Paulo, 2009.

xxii, 65f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação do Departamento de Ginecologia.

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) Effect on the Global Gene Expression of the Rat Mammary Gland During the Development

1-Tetraclorodibenzodioxina. 2-Expressão Gênica. 3-Glândulas mamárias animais. 4-Crescimento e Desenvolvimento

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO  
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA  
LABORATÓRIO DE GINECOLOGIA MOLECULAR

**Chefe de Departamento**

Prof. Dr. Afonso Celso Pinto Nazário

**Coordenador do Curso de Pós-Graduação**

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva

**Orientador:**

Prof. Dr. Ismael Dale Cotrim Guerreiro Da Silva

**Co-orientador**

Prof. Dr. Jose Russo



**Julia Santucci Pereira**

EFEITO DA 2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO-P-DIOXINA  
(TCDD) NA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL DA GLÂNDULA  
MAMÁRIA DE RATAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO

Presidente da banca:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Banca Examinadora:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_



## Dedicatória

*À minha mãe, **Cristina**, que me ensinou as melhores e mais importantes lições da vida,  
com amor e com o intuito de me fazer feliz.*

*Ao meu pai, **Eduardo**, pelo encorajamento e incentivo que me impulsionaram a sempre  
dar o melhor de mim.*

*À minha família, por sempre ter acreditado em mim, e por me dar apoio e carinho.*

*A todas incríveis mulheres que conheci que tiveram que batalhar contra o câncer de  
mama e me incitam a continuar meus estudos.*

**A todos o meu amor e obrigada.**



O presente trabalho foi realizado nos laboratórios:

***Breast Cancer Research Laboratory, Fox Chase Cancer Center, Filadélfia, Pensilvânia, 19111, Estados Unidos.***

***Department of Pharmacology and Toxicology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, 35294, Estados Unidos.***

### **Agradecimentos às Instituições Financiadoras:**

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES/ MEC** pela bolsa de auxílio financeiro concedida à aluna Julia Santucci Pereira através do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE), processo BEX 2829/05-3.

Aos **National Cancer Institute (NCI)** e **National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS)** pelo auxílio financeiro concedido ao Breast Cancer and the Environment Research Centers, processo U01 ES/CA 12771.



## Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Ismael D.C. Guerreiro da Silva** por tudo que tem me ensinado, pelas grandes oportunidades que tem me propiciado, e especialmente, por nunca ter deixado de ser um verdadeiro orientador.

À **Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM)**, por ter me dado toda a base do conhecimento biomédico.

Ao **Departamento de Ginecologia, à Pós-graduação de Ginecologia** e aos **seus funcionários**, pela oportunidade de fazer parte da pós-graduação e por todo o suporte dado.

Ao funcionário da pró-reitoria de pós-graduação, **Marcelo Vasconcellos**, por ser o intermédio entre mim e a CAPES.

Aos meus colegas do Laboratório de Ginecologia Molecular pela ajuda, ensinamentos e incentivo durante todos esses anos: **Regina Affonso, Cristina Carvalho, Tatiana dos Santos, Marcio Custódio, Elenir Pereira, Ana Maria Taborda, Audrey Otsuka, Fabíola Villanova, Naiara de Souza, Paulo D'Amora, Michele Junqueira, Helena Costa, Daniela Leite, Silvana Corrêa, Cíntia Kosugi, Beatriz Schnabel e Giannina Ricci**.

Aos meus grandes amigos **Eduardo Goto, Thiago Veiga, Luciana Semião e Pedro Isoldi**, que mesmo longe estiveram perto de mim todo o tempo e não me deixaram sentir sozinha longe de casa.

Aos **Dr. Jose Russo** e **Dr<sup>a</sup>. Irma Russo** por me darem a oportunidade de trabalhar no *Breast Cancer Research Laboratory*, pela confiança depositada em mim e pelas incontáveis lições. (*To Dr. Jose Russo and Dr. Irma Russo for the opportunity to work in the Breast Cancer Research Laboratory, for trusting me and for the uncountable lessons*)

Ao **Dr. Coral Lamartiniere** e sua equipe do *Department of Pharmacology and Toxicology, University of Alabama at Birmingham* pelo tratamento dos animais e colaboração neste estudo. (*To Dr. Coral Lamartiniere and your group at Department of Pharmacology and Toxicology, University of Alabama at Birmingham for the animal treatments and the collaborative work*)

À excepcional amiga, **Johana Vanegas**, que me recebeu de braços abertos, me deu apoio em todos os momentos difíceis dessa fase, e juntamente com **Enrique, Cecilia e Natalia**, permitiu que eu fizesse parte de sua família. (*To the exceptional friend, Johana Vanegas, who received me and gave me support during the hard times and together with Enrique, Cecilia and Natalia, allowed me to make part of their family*).

À amiga **Raquel Moral** que compartilhou seus conhecimentos e me orientou nos meus primeiros meses nos Estados Unidos. *(To my friend **Raquel Moral** who shared her knowledge and mentored me in my first months in the United States).*

Aos colegas **Michael Slifker** e **Suraj Peri**, que com muita paciência, responderam todas as minhas perguntas de Bioinformática e me auxiliaram na análise de vários experimentos. *(To the co-workers **Michael Slifker** and **Suraj Peri** that with a lot of patience answered all my Bioinformatics questions and helped me in the analysis of several experiments).*

Às técnicas **Patricia Russo** e **Kara Snider**, não só por todo auxílio com os experimentos no dia-a-dia, mas também por todas dicas e ajuda com o Inglês. *(To the technicians **Patricia Russo** and **Kara Snider**, not only for all help with every day experiments, but also for all tips and help with the English).*

Aos amigos, **Mehmet Kocdor**, **Hilal Kocdor** e **Ziddon Nasser**, que passaram pelo *Breast Cancer Research Laboratory* e compartilharam suas experiências tão valiosas. *(To the friends **Mehmet Kocdor**, **Hilal Kocdor** and **Ziddon Nasser** that passed through the *Breast Cancer Research Laboratory* and shared their valuable experiences).*

Aos colegas e ex-colegas do *Breast Cancer Reseach Laboratory* que tanto me ajudaram no desenvolvimento deste e outros trabalhos: **Ricardo Lopez**, **Fathima Sheriff**, **Sandra Fernandez**, **Richard Wang**, **Luis Garcia**, **Luz Vargas** e **Jennifer McDonald**. *(To co-workers and former co-workers of the *Breast Cancer Research Laboratory* that helped me in the development of this and other works: **Ricardo Lopez**, **Fathima Sheriff**, **Sandra Fernandez**, **Richard Wang**, **Luis Garcia**, **Luz Vargas** and **Jennifer McDonald**).*

Aos amigos **Sibele Meireles** e **Mamoun Al Dulaimy** pela imensurável ajuda que me deram e pelos momentos especiais que passamos juntos. *(To my friends **Sibele Meireles** and **Mamoun Al Dulaimy** for the immeasurable help e for the special moments we spent together).*

***“O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior.”***

***Albert Einstein***



## Sumário

DEDICATÓRIA.....	vii
AGRADECIMENTOS ÀS INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS .....	ix
AGRADECIMENTOS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xvii
LISTA DE TABELAS .....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xx
RESUMO.....	xxi
<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1- A 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) .....	1
1.2- Exposição à TCDD.....	2
1.3- Efeitos da Exposição à TCDD .....	5
1.3.1- TCDD é um Agente Carcinogênico .....	5
1.3.2- TCDD e o Câncer de Mama.....	7
1.4- Exposições em Diferentes Estágios da Vida .....	9
1.5- Mecanismo de Ação da TCDD .....	11
1.6- TCDD e <i>Microarrays</i> .....	13
1.7- Objetivos .....	15
<b>2- MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
2.1- Casuística .....	19
2.2- Tratamento dos animais .....	19
2.3- Coleta das Glândulas Mamárias .....	21
2.4- Análise Morfológica .....	23
2.4.1- Índice de Proliferação Celular .....	23
2.4.2- Cálculo do Índice de Proliferação Celular.....	25
2.5- Análise da Expressão Gênica .....	27
2.5.1- Extração de RNA .....	27
2.5.2- Preparação dos <i>Microarrays</i> .....	28
2.5.3- Análise das Imagens dos <i>Microarrays</i> .....	31
2.5.4- Análise Bioestatística e Bioinformática dos <i>Microarrays</i> .....	32
2.5.5- Validação com RT-PCR em Tempo Real .....	35
<b>3- RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
3.1- Efeito de TCDD na Massa Corpórea dos Animais .....	41
3.2- Efeito de TCDD no Índice de Proliferação Celular .....	43
3.3- Efeito de TCDD na Expressão Gênica .....	47
3.3.1- Extração de RNA .....	47
3.3.2- Controle de Qualidade dos <i>Microarrays</i> .....	47
3.3.3- Genes Diferencialmente Expressos.....	50
3.3.4- Categorização dos Genes por Função Biológica .....	53
3.3.5- Vias canônicas metabólicas e de sinalização dos genes .....	63
3.3.6- Validação por RT-PCR em tempo real .....	65
<b>4- DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>5- CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>

<b>6- ANEXOS .....</b>	<b>83</b>
<b>Anexo 1 .....</b>	<b>85</b>
<b>Anexo 2 .....</b>	<b>86</b>
<b>Anexo 3 .....</b>	<b>92</b>
<b>Anexo 4 .....</b>	<b>94</b>
<b>7- REFERÊNCIAS.....</b>	<b>97</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>103</b>
<b>BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....</b>	<b>105</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1-</b> Fórmula molecular da 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD).....	1
<b>Figura 2-</b> Via de sinalização do receptor de aril-hidrocarbono.....	12
<b>Figura 3-</b> Tipos de tratamentos das ratas.....	20
<b>Figura 4-</b> Esquema demonstrando os tratamentos realizados com TCDD.....	21
<b>Figura 5-</b> Localização das glândulas mamárias da rata exteriormente e interiormente..	22
<b>Figura 6-</b> Extração das glândulas mamárias.....	23
<b>Figura 7-</b> Estruturas moleculares da timidina e da 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU).....	24
<b>Figura 8-</b> Fotos demonstrando as estruturas que tiveram a proliferação celular avaliadas.....	26
<b>Figura 9-</b> Representação do agrupamento das amostras e distribuição para a hibridização.....	29
<b>Figura 10-</b> Passos necessários para a análise de expressão gênica através de <i>microarrays</i> .....	30
<b>Figura 11-</b> Resumo dos métodos utilizados neste estudo.....	37
<b>Figura 12-</b> Peso em gramas dos animais controle e tratados com TCDD no período pré-natal.....	41
<b>Figura 13-</b> Peso em gramas dos animais controle e tratados com TCDD no período pré-pubertal.....	42
<b>Figura 14-</b> Proliferação celular (%) das estruturas da glândula mamária das ratas controle e tratadas com TCDD no período pré-natal. ....	43
<b>Figura 15-</b> Proliferação celular (%) das estruturas da glândula mamária das ratas controle e tratadas com TCDD no período pré-pubertal.....	45
<b>Figura 16-</b> Eletroferogramas representando RNAs de boa qualidade.....	47
<b>Figura 17-</b> Imagem digitalizada da lâmina de <i>microarray</i> em duas diferentes magnitudes.....	48
<b>Figura 18-</b> Gráfico box-plot representando a intensidade das sondas em cada uma das 40 lâminas de <i>microarrays</i> preparadas.....	48
<b>Figura 19-</b> Gráfico representando os parâmetros de qualidade de cada lâmina preparada. ....	49
<b>Figura 20-</b> Gráfico de correlação entre as réplicas biológicas.....	50
<b>Figura 21-</b> Gráficos com o número de genes modificados pelo tratamento pré-natal e pré-pubertal em ratas com 21, 35, 50 e 100 dias.....	52
<b>Figura 22-</b> Histogramas demonstrando o número de genes em diferentes categorias que foram desregulados pela ação da TCDD nas diferentes condições estudadas.....	56
<b>Figura 23-</b> Histogramas demonstrando o número de genes classificados como proto-oncogenes ou genes supressores de tumor que foram modulados pela ação da TCDD nas diferentes condições estudadas.....	57
<b>Figura 24-</b> Via canônica de sinalização da proteína p53, super-expressa entre os genes supressores de tumor.....	58

<b>Figura 25-</b> Rede formada pelos genes supressores de tumor que tiveram aumento de expressão.....	59
<b>Figura 26-</b> Rede formada pelos proto-oncogenes com menor expressão.....	60
<b>Figura 27-</b> Número de genes relacionados com o metabolismo de lipídeos que sofreram aumento ou diminuição na expressão em cada uma das condições.....	61
<b>Figura 28-</b> Via canônica do metabolismo de ácidos graxos.....	62
<b>Figura 29-</b> Parte da via canônica de sinalização do receptor de aril-hidrocarbono.....	64
<b>Figura 30-</b> Expressões relativas dos genes ( $\log_2$ ) medidas através de RT-PCR em tempo real e <i>microarrays</i> .....	66
<b>Figura 31-</b> Esquema do metabolismo do estradiol.....	75

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1-</b> Comparação dos níveis de dioxinas e furanos em diferentes centros urbanos.....	3
<b>Tabela 2-</b> Média de consumo de TCDD por adultos nos Estados Unidos.....	4
<b>Tabela 3-</b> Lista de genes validados por RT-PCR em tempo real.....	35
<b>Tabela 4-</b> Média dos pesos (g) dos animais que receberam o tratamento pré-natal.....	41
<b>Tabela 5-</b> Média dos pesos (g) dos animais que receberam o tratamento pré-pubertal....	42
<b>Tabela 6-</b> Índice de proliferação celular nas estruturas da glândula mamária das ratas em diferentes idades depois de receberem TCDD durante a gestação.....	44
<b>Tabela 7-</b> Índice de proliferação nas estruturas da glândula mamária das ratas em diferentes idades depois de receberem TCDD durante a lactação.....	46
<b>Tabela 8-</b> Número de genes diferencialmente expressos (FDR<5%) pelos diferentes tratamentos com TCDD.....	51
<b>Tabela 9-</b> Número de genes que tiveram aumento ou decréscimo na expressão devido à ação da TCDD (p<0,01).....	51
<b>Tabela 10-</b> Número de processos biológicos super-representados dentre os genes diferencialmente expressos em cada condição.....	54
<b>Tabela 11-</b> Número de vias canônicas consideradas mais representadas dentre os genes encontrados diferencialmente expressos em cada condição.....	63
<b>Tabela 12-</b> Expressão relativa dos genes envolvidos no metabolismo do estradiol.....	65

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

µg	Microgramas
µL	Microlitros
AHR ou AhR	Receptor de aril-hidrocarbono
BrdU	5-Bromo-2'-deoxiuridina
DMBA	Dimetilbenzoantraceno
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FDR	<i>False Discovery Rate</i> (Taxa de falso positivo)
GO	<i>Gene Ontology</i>
kg	Quilogramas
ng	Nanogramas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pg	Picogramas
pmols	Picomols
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TEQ	Toxicidade equivalente

## Resumo

**OBJETIVO:** Este estudo teve como objetivo verificar as modificações causadas na proliferação celular e na expressão gênica da glândula mamária de ratas com 21, 35, 50 e 100 dias que foram expostas à 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) durante a gestação (tratamento pré-natal) ou durante a lactação (tratamento pré-pubertal).

**MÉTODOS:** Para o tratamento pré-natal, ratas Sprague-Dawley prenhas receberam no 15º dia após a concepção dose única de 3,0µg de TCDD/kg através de gavagem. Para o tratamento pré-pubertal, ratas lactantes receberam no 14º e 17º dias pós-parto 6,67ng ou 20,0ng de TCDD/g. Animais controles receberam volume equivalente de óleo de gergelim. Ao atingiram 21, 35, 50 e 100 dias de idade, as filhotes fêmeas das ratas que receberam TCDD foram sacrificadas e tiveram as glândulas mamárias extraídas para estudo do índice de proliferação celular e expressão gênica. Para o cálculo de índice de proliferação celular, dez ratas por grupo receberam uma injeção intraperitoneal de 200 mg/kg de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) e através de imunohistoquímica foram identificadas as células que estavam proliferando em cada estrutura da glândula mamária. Outras dez ratas por grupo tiveram o RNA da glândula mamária extraído, e este foi utilizado para o estudo de expressão gênica através de *microarrays*. Para determinar os genes diferencialmente expressos utilizou-se o teste-t bayesiano empírico moderado. Genes diferencialmente expressos ( $p < 0,01$ ) foram então categorizados de acordo com a função biológica ou via canônica de ação. Ainda, genes que se destacaram foram validados através de RT-PCR em tempo real.

**RESULTADOS:** O tratamento pré-pubertal alterou a proliferação celular nas glândulas mamárias das ratas com 35, 50 e 100 dias, principalmente nos botões terminais (TEBs). A análise da expressão gênica demonstrou que o número máximo de genes diferencialmente expressos foi observado nos animais com 100 dias que receberam TCDD durante a gestação. No tratamento pré-pubertal, observou-se que a alta dose causou mais alterações do que a dose baixa. Cyp1b1 foi o gene que mais sofreu aumento de expressão em diferentes idades. A categorização dos genes desregulados de acordo com a função biológica mostrou que TCDD tem uma ampla ação, principalmente após o tratamento pré-pubertal com maior dose. As classes de genes mais afetadas foram proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados com o metabolismo de lipídeos. A via de sinalização mais atingida foi a via de sinalização do receptor de aril-hidrocarbono (AhR). Também se observou alterações na expressão de genes participantes da via de metabolização do estradiol, aumentando a produção de metabólitos prejudiciais ao DNA. **CONCLUSÕES:** O tratamento com TCDD resultou em mudanças na proliferação celular e na expressão gênica da glândula mamária das ratas. As mudanças gênicas observadas indicam que a célula mamária é submetida a estímulos genotóxicos ao mesmo tempo em que genes de reparo de DNA e supressores do crescimento tumoral ficam ativados no intuito de manter a estabilidade genômica.

**PALAVRAS-CHAVES:** Tetraclorodibenzodioxina. Expressão Gênica. Glândulas mamárias animais. Crescimento e Desenvolvimento.



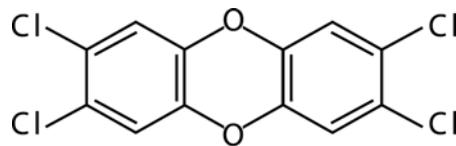
# *1-INTRODUÇÃO*



## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1- A 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)

Dioxinas, pertencentes ao grupo dos organoclorados, descrevem um grupo de químicos que são comuns no meio ambiente e são considerados uns dos poluentes ambientais mais tóxicos. A 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), a mais tóxica das dioxinas, é composta por dois anéis de benzeno ligados por dois oxigênios e quatro cloros ligados aos anéis benzênicos (figura 1). A TCDD tem o peso molecular de 322, pertence à classe dos hidrocarbonetos aromáticos e é frequentemente encontrada no ambiente .



**Figura 1-** Fórmula molecular da 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)

Até 1976 as dioxinas não eram muito conhecidas. Na década de 40, um acidente industrial nos Estados Unidos fez com que 50 empregados de uma empresa de triclorofenol tivessem irritação cutânea, e a substância responsável pela reação foi chamada, na época, de Substância X. Na Alemanha, outros acidentes na década de 50 tiveram o mesmo efeito, e a reação na pele foi denominada cloroacne. Por um longo tempo resíduos de partículas industriais que foram lançados para o ar por incineradores fez com que começassem a aparecer casos de teratogenia. Durante a guerra do Vietnã, o uso do herbicida Agente Laranja, contendo a substância X, provocou novamente forte irritação na pele das pessoas tendo sido observado um grande número de casos de teratogenia. Na mesma época, em Missouri nos Estados Unidos, uma arena de cavalos foi contaminada com óleo contendo TCDD resultando na morte de vários cavalos e outros animais na região. Mas foi só a partir do acidente que ocorreu em 1976, em Seveso, Itália, que as dioxinas passaram a ser estudadas e

identificadas. Apesar de outros acidentes anteriores, este foi o primeiro acidente que atingiu a população em geral. Uma nuvem de vapor contendo de 300 a 2000g TCDD foi liberada de um reator usado na produção de triclorofenol, cobrindo uma área de aproximadamente 2,8km<sup>2</sup>, e contaminando toda a comunidade .

## 1.2- Exposição à TCDD

O principal modo de produção de dioxinas é através da combustão de materiais orgânicos na presença de cloro. A combustão pode ser tanto pela queima de combustíveis, queimas de florestas, erupções de vulcões e incineração de lixo, entre outras. A fundição e refinamento de metais como o ferro, aço, alumínio, zinco, cobre, também produzem dioxinas, assim como a produção de químicos como derivados de cloro, herbicidas e outras substâncias orgânicas, ou mesmo o processo de branqueamento do papel. Evidências da formação de dioxinas também são encontradas em certas condições ambientais, como por exemplo nos esgotos, na qual este químico é derivado da biotransformação microbial de compostos fenólicos clorinados. As dioxinas resultantes desses processos são lançadas diretamente para a atmosfera podendo constituir-se em grande fonte contaminante do meio ambiente (Committee on the Implications of Dioxin in the Food Supply 2003).

As partículas de dioxinas podem ser transportadas pelo ar de duas formas, pela combinação com partículas presentes na atmosfera ou em forma gasosa, devido a sua volatilidade. Uma vez no ar, devido à baixa solubilidade em água, esses compostos tendem a se separar do ar, e se depositar nas superfícies de plantas, água e solo. No solo, solventes podem facilitar a difusão dessas. Dessa forma, as dioxinas também entram na cadeia alimentar, onde se acumulam facilmente devido a sua propriedade lipofílica (Committee on the Implications of Dioxin in the Food Supply 2003).

Assunção et al estudou as concentrações de poluentes em três diferentes localidades da cidade de São Paulo, SP, Brasil (local 1- próximo do centro da cidade com intenso tráfego de veículos; local 2 -área residencial com incinerador de serviços de saúde; e local 3- área industrial e com trânsito veicular constante). A maior quantidade de poluentes foi encontrada no local 3. As concentrações de dioxinas e furanos encontradas foram entre  $1,14\text{pgm}^{-3}$  e  $13,8\text{pgm}^{-3}$ , sendo que TCDD foi o segundo componente a colaborar mais com a toxicidade total (7–16%) (de Assunção, Pesquero et al. 2005). No mesmo trabalho, Assunção apresenta diversos trabalhos demonstrando as concentrações desses poluentes em diversos centros urbanos (tabela 1).

Tabela 1- Comparação dos níveis de dioxinas e furanos em diferentes centros urbanos

Local	Ano	Quantidades (pg I-TEQm <sup>-3</sup> )	Referência
São Paulo-locais 1e 2 (Brasil)	2000–2001	0,047 <sup>a</sup> –0,223 <sup>c</sup>	de Assunção et al.,2005
São Paulo-local 3 (Brasil)	2000–2001	0,047 <sup>a,b</sup> –0,751 <sup>a,b</sup>	de Assunção et al.,2005
São Paulo (Brasil)	1995	0,086–0,169 <sup>c</sup>	CETESB,1996
Cubatão (Brasil)	1995	0,038–0,048	CETESB,1996
Araraquara (Brasil)	1995	0,046–0,267 <sup>d</sup>	CETESB,1996
Atenas (Grécia)	2000	0,042–0,073	Mandalakis et al.,2001
Hong-Kong (China)	2000	0,018–0,429	Sin et al.,2002
Taipei (Taiwan)	1999–2000	0,056 <sup>c</sup> –0,348 <sup>c</sup>	Chang et al.,2003
Catalonia (Espanha)	1994–2000	0,013 <sup>b</sup> –0,954 <sup>c</sup>	Abad et al.,2002
Thessaloniki (Grécia)	1999	0,004–0,119	Kouimtzis et al.,2002
Oporto (Portugal)	1998–1999	0,0244–0,547	Coutinho et al.,2001
Manchester (Reino Unido)	1998	0,026 <sup>a,b</sup> –0,220 <sup>a,b</sup>	Lohmann et al.,2000
Lancaster (Reino Unido)	1997	0,0071–0,0176	Lohmann et al.,1999
London (Reino Unido)	1991–1995	0,067–0,204	Coleman et al.,1997
Manchester (Reino Unido)	1991–1995	0,086–0,467	Coleman et al.,1997
4 locais urbanos (Reino Unido)	1991–1993	Nd–1,80	Duarte-Davidson et al.,1994
Krakov (Polónia)	1995	0,950–11,95 <sup>a</sup>	Grochowalski et al.,1995
Phoenix (EUA)	1994	0,092 <sup>a</sup> –0,448 <sup>a</sup>	Hunt et al.,1997
Flanders (Bélgica)	1992	0,0175–0,379	Wevers et al.,1993
Urban (Japão)	1992	0,300–0,940	Kurokawa et al.,1996
Roma (Itália)	1990–1991	0,048–0,277	Turrio-Baldassarri et al.,1994
Roterdã (Holanda)	1991	0,005 <sup>c</sup> –0,140 <sup>c</sup>	Bolt and de Jong,1993
Hessen (Alemanha)	1990	0,078 <sup>a</sup> –0,146 <sup>b</sup>	König et al.,1993
Berlim (Alemanha)	1986–1987	0,020–0,400	Christman et al.,1989
Estocolmo (Suécia)	1989	0,0026–0,024	Broman et al.,1991
San Bernardino (EUA)	1987–1989	0,192–2,228	Hunt and Maisel,1992

**Tabela 1-** Quantidades de dioxinas e furanos medidos em diversos centros urbanos por diferentes estudos. Tabela modificada de Assunção et al.,2005 (de Assunção, Pesquero et al. 2005). **a**= Urbano/tráfego veicular, **b**= Urbano/industrial, **c**= Urbano/próximo a incinerador, **d**= Urbano/episódios de queima de cana, **Nd**= Não detectado.

A exposição às dioxinas pode ser através da inalação e contato com a pele, porém a ingestão é a principal via de contaminação dos humanos, especialmente através dos lipídeos presentes nos animais. Estudos mostram que 34% da dieta calórica dos norte-americanos adultos diária são de gorduras (Committee on the Implications of Dioxin in the Food Supply 2003), enquanto dos brasileiros, a média é de 27,61% (IBGE 2004). Carnes, peixes e laticínios são os alimentos com maior quantidade de contaminantes (tabela 2).

Tabela 2- Média de consumo de TCDD por adultos nos Estados Unidos

Alimento	Quantidade de TCDD ingerida (pg/dia)
Carne	23
Leite	13
Vegetais, legumes e frutas	5
Peixe	5 (em regiões de pesca, como a região dos Grandes Lagos, EUA, o consumo pode ser de 390 a 8400)

**Tabela 2-** Quantidades de TCDD (pg) ingeridas em média por dia por um adulto nos Estados Unidos

Durante o desenvolvimento, o feto está exposto às dioxinas que atravessam a placenta, assim como os infantes durante a amamentação. As concentrações desses compostos no leite materno ou no cordão umbilical é dependente das concentrações destes no organismo da mãe (U.S. Department of Health and Human Services 2005). Estudos demonstraram que dietas feitas no período da gravidez com menos dioxinas não contribuíram significativamente para a diminuição desses compostos no leite e no cordão (Patandin, Dagnelie et al. 1999). Nos Estados Unidos, calcula-se que a exposição à TCDD através do leite materno no primeiro ano de vida é de 35 a 53 pg/kg de massa corpórea por dia (U.S. Department of Health and Human Services 2005). Patandin et al. observou que a amamentação materna por seis meses é responsável por 12-14% da acumulação de dioxinas e bisfenis policlorinados no organismo das crianças até a idade reprodutiva. Após o desmame as maiores fontes são derivados do leite, comidas processadas e carne (Patandin, Dagnelie et al. 1999).

### **1.3- Efeitos da Exposição à TCDD**

A TCDD tem efeitos anti-estrogênicos e é classificada como um disruptor endócrino ambiental, ou seja, um agente exógeno que interfere na produção, metabolismo, ação ou eliminação dos hormônios endógenos responsáveis pela manutenção, regulação e desenvolvimento do organismo.

TCDD é conhecida por causar tanto simples alterações bioquímicas como respostas extremamente tóxicas em animais, incluindo morte. Alguns dos efeitos resultantes da exposição à TCDD são supressão da resposta imune, atrofia gonadal, cloroacne, hepatocixidade, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, alteração em fatores endócrinos e em fatores de crescimento, teratogenia e carcinogênese. Os efeitos são adversos e dependem da espécie estudada, dose, sexo e da idade de exposição (Birnbbaum and Tuomisto 2000).

#### **1.3.1- TCDD é um Agente Carcinogênico**

Em 1997, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) classificou a TCDD um carcinogênico do grupo 1 baseando-se em algumas evidências encontradas em estudos com humanos, evidência suficiente nos estudos com animais e grande informação do mecanismo de ação de TCDD através do receptor de aril-hidrocarbono (AhR) (Steenland, Bertazzi et al. 2004).

Quando administrada cronicamente em roedores, por diferentes vias, em diferentes doses, TCDD pode induzir o desenvolvimento de tumores de fígado, pulmão, pele, cavidade oral e em outras localizações. Quando utilizado como promotor de tumores induzidos por outros carcinogênicos conhecidos, a incidência de tumores é maior e a latência dos tumores diminui (Knerr and Schrenk 2006).

Dados sobre a carcinogênese em humanos foram levantados principalmente baseando-se nos acidentes industriais, em exposição ocupacional ou exposição a herbicidas contaminados com TCDD (IARC 1997).

Fingerhut et al. 1991 conduziu um estudo de cohort retrospectivo para estudar a mortalidade de 5172 trabalhadores em 12 indústrias produtoras de químicos contaminados com TCDD nos Estados Unidos. A exposição foi medida através da descrição do trabalho realizado e níveis de TCDD no soro de 253 trabalhadores. A mortalidade causada por diversos cânceres anteriormente associados à TCDD não teve aumento neste estudo. Porém um subgrupo desses trabalhadores os quais foram expostos durante um ano e tiveram latência de 20 anos apresentaram aumento significativo de sarcoma de tecido mole, cânceres do sistema respiratório e aumento da mortalidade causado por câncer de diferentes tipos (Fingerhut, Halperin et al. 1991).

Quando trabalhadores de uma fábrica de herbicidas e inseticidas alemã foram avaliados de acordo com um índice de exposição às dioxinas, a mortalidade e a mortalidade por câncer foram elevadas se comparadas à população geral da Alemanha (Flesch-Janys, Steindorf et al. 1998).

Em um estudo considerando 278.108 habitantes da região de Seveso, Itália, foi encontrada elevada mortalidade causada por câncer linfático e hematopoiético nas regiões onde a exposição à dioxina foi classificada como alta ou muito alta. Também houve a sugestão de aumento de outros cânceres como reto e pulmão, e outras doenças circulatórias, pulmonares e diabetes mellitus (Consonni, Pesatori et al. 2008). Bertazzi et al 1997 estudou a mortalidade causada por câncer de 1976 a 1991 entre os moradores de Seveso, e na zona com maiores exposições encontrou aumento da mortalidade causado por câncer do sistema digestivo e neoplasmas hematológicos. Os maiores riscos observados foram para leucemia em homens, mieloma em mulheres e doença de Hodgkins nos dois sexos. Sarcoma de tecido mole foi elevado nas zonas de menor exposição em homens. Entretanto, controvérsias ainda existem, de fato, Bertazzi não encontrou nessa mesma população aumento de mortalidade por câncer em geral (Bertazzi, Zocchetti et al. 1997).

Entre os veteranos que serviram na guerra do Vietnã, observou-se aumento de algumas doenças como diabetes, hipertensão, doenças do coração e respiratórias, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo. Enquanto que essas mesmas doenças foram significativamente elevadas entre os veteranos que trabalharam diretamente com os herbicidas (Kang, Dalager et al. 2006). Indivíduos que foram expostos ao Agente Laranja tiveram maior incidência de câncer de próstata, com variantes mais agressivas da doença e com idades mais precoces (Chamie, DeVere White et al. 2008).

### **1.3.2- TCDD e o Câncer de Mama**

Diversos mecanismos estão envolvidos no controle do crescimento da glândula mamária, e os hormônios têm forte influência neste processo, que começa desde o período fetal com influências dos hormônios maternos (Russo, Medado et al. 1989). Deste modo, acredita-se que a TCDD, por ser um disruptor endócrino pode ter influências nos processos que determinam o surgimento do câncer de mama. Apesar da associação entre diversos cânceres e a exposição à TCDD, dados epidemiológicos estabelecendo a relação causal entre a exposição a esta dioxina e o câncer de mama ainda são conflitantes.

Estudo realizado com 981 mulheres de Seveso, que em 1976 eram crianças ou tinham até 40 anos de idade, moravam na área de maior exposição e tiveram seu soro coletado pouco depois após o acidente, demonstrou o aumento do risco de câncer de mama associado com o aumento dos níveis de TCDD no soro (Warner, Eskenazi et al. 2002). Porém, outros trabalhos não encontraram aumento de mortalidade devido ao câncer de mama (Bertazzi, Zocchetti et al. 1997), ou com outros cânceres ginecológicos (Consonni, Pesatori et al. 2008). Outro estudo entre as zonas mais contaminadas encontrou menos casos de câncer de mama do que o esperado e

nas zonas com menos ou baixa exposição encontrou-se menor número de câncer de endométrio (Bertazzi, Pesatori et al. 1993).

Um estudo realizado na cidade de Besançon, França, não demonstrou a associação entre dioxinas emitidas pelo incinerador de lixo municipal e o risco de câncer de mama em mulheres mais jovens. E em mulheres acima de 60 anos, vivendo em zonas de maior exposição encontrou-se menor risco de desenvolver câncer invasivo comparando-se com as áreas de baixa emissão (Viel, Clement et al. 2008). Em um cohort internacional somando 701 trabalhadoras expostas à dioxina e outros químicos não foi encontrado o aumento de câncer de mama (Kogevinas, Saracci et al. 1993).

Por outro lado, estudo realizado na cidade de Chapaevsk, na Rússia, região contaminada por dioxinas demonstrou que as mulheres desta região têm maior risco para câncer de mama e de colo do útero. (Revich, Aksel et al. 2001). Em um cohort de 399 mulheres que trabalhavam na Alemanha com a produção de herbicidas, não foi observado o aumento da mortalidade por cânceres em mulheres, com exceção do câncer de mama (Manz, Berger et al. 1991).

Em um estudo caso-controle, foram medidas as concentrações de diferentes contaminantes na gordura da glândula mamária. As concentrações médias de TCDD de pacientes com câncer de mama (3,6 pg/g de lipídeos) e do grupo controle (3,3 pg/g de lipídeos) não tiveram diferenças (Hardell, Lindstrom et al. 1996), o que foi confirmado com outro estudo caso-controle medindo-se a concentração de dioxinas no tecido adiposo em um hospital (Reynolds, Hurley et al. 2005).

Em um trabalho de pesquisa epidemiológica de diferentes poluentes e a relação destes com câncer de mama chegou-se a conclusão que as evidências epidemiológicas apresentadas para fazer uma associação entre o câncer de mama e as dioxinas ainda são escassas e metodologicamente limitadas (Brody, Moysich et al. 2007).

#### 1.4- Exposições em Diferentes Estágios da Vida

O estágio da vida em que ocorre a exposição a certos agentes é importante para as futuras respostas destes no organismo e essas respostas podem ser imediatas ou aparecerem somente mais tarde na vida. Como exemplo, mulheres que foram expostas à radiação durante a adolescência tiveram maior incidência de câncer de mama em relação àquelas que foram expostas durante a idade adulta (Boice, Land et al. 1979). Outro exemplo é o dietilestilbestrol (DES), droga usada para evitar abortos entre 1940 e 1970, aumentou a incidência de adenocarcinoma vaginal e no colo uterino durante a adolescência das filhas das mulheres que usaram este medicamento (Gunning 1976). Ratas que receberam DES durante o período pré-natal, tiveram aumento da suscetibilidade ao câncer de mama induzido quimicamente, enquanto as ratas que foram expostas neonatalmente tiveram a diminuição do desenvolvimento de câncer quimicamente induzido (Lamartiniere 2002).

Trabalhos em roedores mostram que a época de exposição a TCDD é importante para os diferentes efeitos deste químico (Lamartiniere 2002). Quando ratas Sprague-Dawley receberam 1 µg de TCDD /kg de peso corpóreo no 15º dia de gestação e, após o nascimento, a prole com 50 dias foi desafiada com o agente carcinogênico dimetilbenzoantraceno (DMBA), as ratas expostas pré-natalmente à dioxina desenvolveram duas vezes mais tumores em comparação às ratas que receberam o veículo (Brown, Manzollillo et al. 1998). Estudos na morfologia da glândula mamária demonstraram que este composto altera a diferenciação desta glândula, aumentando o número de estruturas menos desenvolvidas neste tecido e conseqüentemente aumentando a suscetibilidade à carcinogênese (Brown and Lamartiniere 1995; Brown, Manzollillo et al. 1998). O tratamento neste mesmo estágio de vida, demonstrou que este composto altera o proteoma dos animais adultos de maneira que pode contribuir com a carcinogênese (Jenkins, Rowell et al. 2007). Com a mesma dose, TCDD induz malformações na genitália externa e problemas de fertilidade na prole fêmea (Gray and Ostby 1995; Gray, Wolf et al. 1997). Ainda, com o tratamento realizado com 3 µg de TCDD/kg *in utero*, observou-se alterações na

morfologia, crescimento, proliferação celular e apoptose no útero das ratas Sprague-Dawley aos 50 dias de idade (Whitsett Jr., Kalia et al. 2008).

Fenton et al., 2002 avaliou as alterações causadas pela exposição à TCDD durante o período gestacional (15º ou 20º dias) e durante o período lactacional em diferentes momentos e averiguou que para que ocorram mudanças permanentes na morfologia o período crítico de exposição é 15º dia durante a gestação, período esse que coincide com a época em que os brotos do epitélio mamário se formam (Fenton, Hamm et al. 2002).

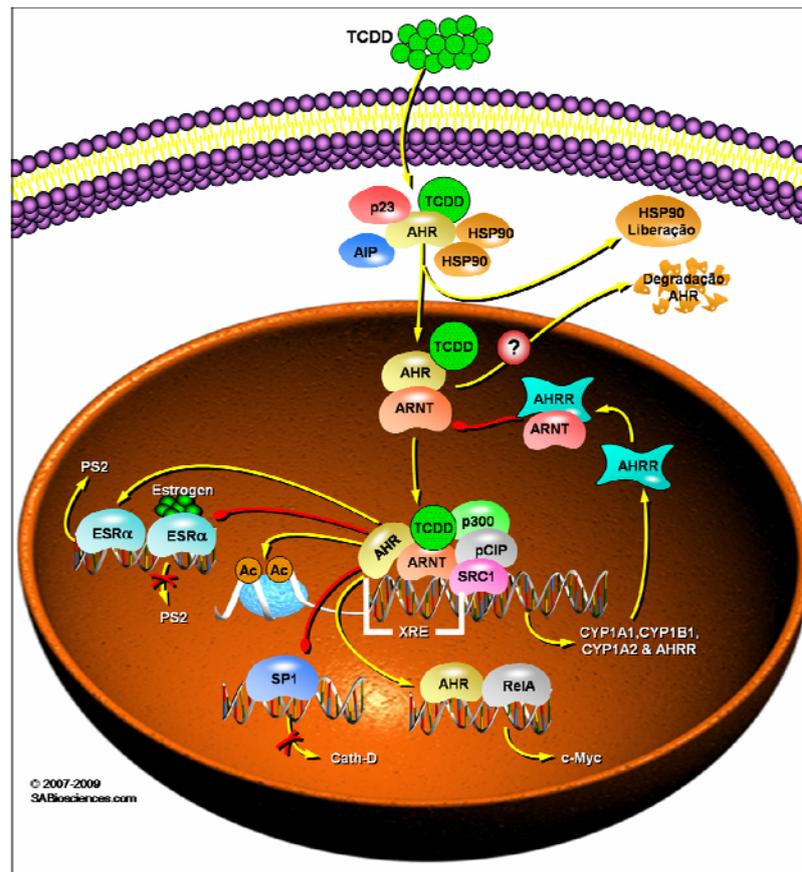
Por outro lado, quando TCDD é dado a ratas fêmeas três dias antes da administração de DMBA, o tempo de latência dos tumores aumenta. Acredita-se que isso ocorre devido ao aumento do metabolismo de xenobióticos causado pela aumento das enzimas induzidas pela TCDD (Lamartiniere 2002). Adicionalmente, quando TCDD é administrada em animais adultos contendo tumores de mama induzidos por DMBA, estes têm o crescimento inibido ou têm a diminuição do volume do tumor, acredita-se que essa inibição seja resultante do efeito anti-estrogênico da TCDD (Holcomb and Safe 1994). Quando ratas Sprague-Dawley foram tratadas aos 18 dias após o nascimento com 2,5 µg de TCDD/kg por gavagem e posteriormente foram desafiadas com o agente carcinogênico metilnitrosouréia (MNU) tiveram aumento significativo na média de lesões malignas na glândula mamária (Desaulniers, Leingartner et al. 2001).

Chen, et al. 2001 realizou experimentos em ratas Long Evans com o objetivo de avaliar a quantidade de compostos que atingem a prole após a exposição gestacional e lactacional a uma mistura contendo diversas dioxinas e furanos, incluindo TCDD. O tratamento no 15º dia gestacional mostrou que o sequestro hepático materno de TCDD é proporcional a dose e a porcentagem da dose que é transferida para a prole é reduzida com o aumento dessa (Chen, Hamm et al. 2001). Um dia após a administração da droga à mãe, 0,015-0,020% da dose de TCDD/g atinge a prole (Chen, Hamm et al. 2001), e ocorre um equilíbrio entre os níveis de TCDD entre o feto e a placenta baseando-se nas concentrações de lipídeos (Chen, Hamm et al. 2002). Adicionalmente, seis dias após a exposição, observa-se de 0,02- 0,06% dose/ g nos filhotes e com a lactação, os filhotes têm maior exposição à droga (0,12-0,32% dose/g) (Chen, Hamm et al. 2001).

## 1.5- Mecanismo de Ação da TCDD

Estudos em camundongos *knockout* têm demonstrado que a toxicidade da TCDD se dá quase totalmente devido ao fato de se ligar ao receptor de aril-hidrocarbono (AHR) (Mitchell and Elferink 2008), dessa forma, alterando a expressão de grande número de genes. TCDD tem um vasto efeito em diferentes sistemas como sistema endócrino, vias de fatores de crescimento, citocinas e transdução de sinal. O amplo efeito de TCDD em diferentes localidades é consistente com o fato que TCDD promove o câncer em diferentes órgãos.

A TCDD tem grande afinidade com o AHR, um fator de transcrição da família do bHLH/PAS, o receptor permanece no citoplasma associado com proteínas chaperonas hsp90, hsp23, entre outras proteínas. Quando o ligante conecta-se ao receptor, esse complexo protéico transloca-se para o núcleo celular, dissocia-se dessas proteínas e dimeriza-se com o translocador nuclear aril-hidrocarbono (ARNT), que também é um membro da família PAS. Esse complexo, ligante-ARH-ARNT, liga-se com outros elementos reguladores, conhecidos como elementos responsáveis a xenobióticos (XRE) e funcionam como um fator de transcrição que recruta outros co-ativadores, modulam a conformação de histonas e possibilita a interação com o maquinário de transcrição (figura 2) (Boutros, Moffat et al. 2004; Bock and Kohle 2005). O AHR também pode interagir diretamente com outras proteínas que influenciam o ciclo celular (Boutros, Moffat et al. 2004). O AHR é responsável pela indução de genes que codificam as enzimas para metabolização de xenobióticos de Fase I (CYPs da subfamília do citocromo P450) e enzimas de Fase II. Estudos têm demonstrado que este receptor também é importante nos processos de desenvolvimento e homeostase fisiológica. E o fato de que há grandes similaridades entre o comportamento responsivo de CYP1 e CYP2 ao AHR em camundongos e humanos, mostra que este é um mecanismo altamente conservado, importante não só para a resposta de xenobióticos mas também para a homeostase fisiológica (Mitchell and Elferink 2008).



**Figura 2-** Via de sinalização do receptor de aril-hidrocarbono. Imagem modificada de SABiosciences.com.

Evidências têm demonstrado que TCDD não é um agente genotóxico direto, pois não tem a capacidade de se ligar covalentemente ao DNA. Resultados de testes de curto prazo para genotoxicidade são negativos e TCDD é um potente promotor mas um fraco iniciador de carcinogênese quimicamente induzida, porém pode alterar a genotoxicidade de compostos endógenos (Huff, Lucier et al. 1994).

Mesmo que não ocorra a ligação de TCDD com o DNA, há evidências que TCDD induz a quebra de fita simples de DNA em ratos Sprague-Dawley como consequência da peroxidação de lipídeos. Essa evidência é consistente com a habilidade de TCDD induzir as enzimas de metabolização, as quais podem colaborar com o aumento da formação de metabólitos que reagem com o DNA (Huff, Lucier et al. 1994).

A TCDD tem uma meia-vida que pode variar de 5,8 a 11,3 anos nos humanos (U.S. Department of Health and Human Services 2005). A meia-vida deste químico é dose-dependente, é estendida com o aumento do índice de massa corpórea, e em crianças e adolescentes a meia-vida é menor (Kerger, Leung et al. 2006). Em ratos a meia-vida varia de 12 a 40 dias de acordo com o sexo do animal, espécie e a dose administrada. Em geral, trabalhos com menores doses demonstraram uma meia-vida mais longa e a eliminação terminal de TCDD é prevista a aumentar de acordo com a dose (Emond, Birnbaum et al. 2006). Ainda a acumulação de TCDD nos tecidos humanos ocorre em uma taxa maior quando comparada com animais experimentais, o que sugere que respostas à TCDD em humanos podem ser desencadeadas com doses menores do que aquelas necessárias para desencadear reações nesses animais (U.S. Department of Health and Human Services 2005). O fato da eliminação das dioxinas ser dependente da dose pode influenciar nos estudos epidemiológicos que tentam relacionar os efeitos adversos na saúde de indivíduos expostos à essas substâncias (Emond, Birnbaum et al. 2006).

A interação entre a TCDD e os estrógenos é evidente e pode explicar a diferença de incidência de certos tumores em animais de diferentes sexos. Foi demonstrado que a incidência de tumor de fígado em ratas fêmeas é maior do que em machos o que pode ser resultante do aumento da conversão de estrogênios nas suas formas hidroxiladas no fígado, os quais tem mais capacidade para a produção de radicais livres (Huff, Lucier et al. 1994). Também foi demonstrado que quanto maior a concentração de TCDD no soro de mulheres grávidas, menor era a concentração do metabólito hidroxilado de estrogênio (4-OH-E2) (Wang, Chang et al. 2006).

### **1.6- TCDD e *Microarrays***

Até o momento, não há muitas publicações nas quais os efeitos da exposição à TCDD na expressão gênica foram avaliadas de forma ampla, utilizando-se *microarrays*. Esta técnica possibilita o estudo da expressão de milhares de genes de concomitantemente, avaliando-se diferentes condições.

Entre estudos realizados com *microarrays*, a maioria foi feita em outras espécies, principalmente em camundongos. Estudos envolvendo ratos, foram realizados em um número limitado de órgãos como fígado (Vezina, Walker et al. 2004; Fletcher, Wahlstrom et al. 2005; Boverhof, Burgoon et al. 2006), sistema reprodutivo (Miyamoto 2004) e placenta (Mizutani, Yoshino et al. 2004). Porém os efeitos deste contaminante ambiental na expressão gênica da glândula mamária não foram avaliados.

Este estudo, único a estudar até o momento as alterações gênicas causadas pela TCDD na glândula mamária, avalia essas alterações em diferentes momentos da vida da rata (21, 35, 50 e 100 dias) após a exposição a este composto em diferentes períodos (pré-natal e pré-pubertal) importantes na formação e desenvolvimento do animal.

## **1.7- Objetivos**

Avaliar os efeitos da exposição pré-natal e durante a lactação (pré-pubertal) à 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) na proliferação celular e na expressão gênica global da glândula mamária de ratas Sprague-Dawley durante o seu desenvolvimento.



## *2- MÉTODOS*



## 2- MÉTODOS

### 2.1- Casuística

Neste estudo, 50 ratas fêmeas, Sprague-Dawley (Charles River Breeding Co., Raleigh NC, USA), possuindo oito semanas de idade passaram por diferentes condições de tratamento utilizando-se TCDD. Os efeitos deste composto foram analisados na prole dessas ratas ao atingirem 21, 35, 50 ou 100 dias de idade. Para a análise morfológica foram utilizadas 120 fêmeas com 21, 35, 50 ou 100 dias de idade e para a análise de expressão gênica foram utilizadas outras 120 filhotes fêmeas, também com 21, 35, 50 ou 100 dias de idade.

### 2.2- Tratamento dos animais

Todo o tratamento dos animais foi realizado pelo grupo do Dr. Coral Lamartiniere na University of Alabama at Birmingham, em Birmingham, Alabama, Estados Unidos, de acordo com as normas da universidade para uso e cuidados com os animais (anexo 1).

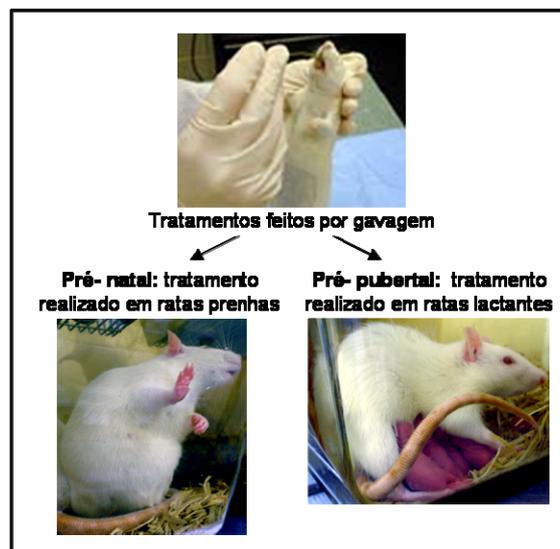
As ratas tiveram uma dieta *ad libitum*, com água e ração livre de fitoestrógenos (AIN-93G diet- Harlan Teklad, Madison WS, USA) e passaram por um período de adaptação de dez dias no biotério antes do início do experimento.

Após o período de adaptação, as ratas foram acasaladas de modo randômico, na proporção de duas ratas para cada macho. A prenhez foi diagnosticada pela análise microscópica do esfregaço vaginal, onde a presença de espermatozóide

na luz vaginal caracterizou o dia zero de prenhez e os machos foram retirados das gaiolas. Ao ser confirmada a prenhez, as ratas foram divididas em dois grupos: Pré-natal (PN) e Pré-pubertal (PP).

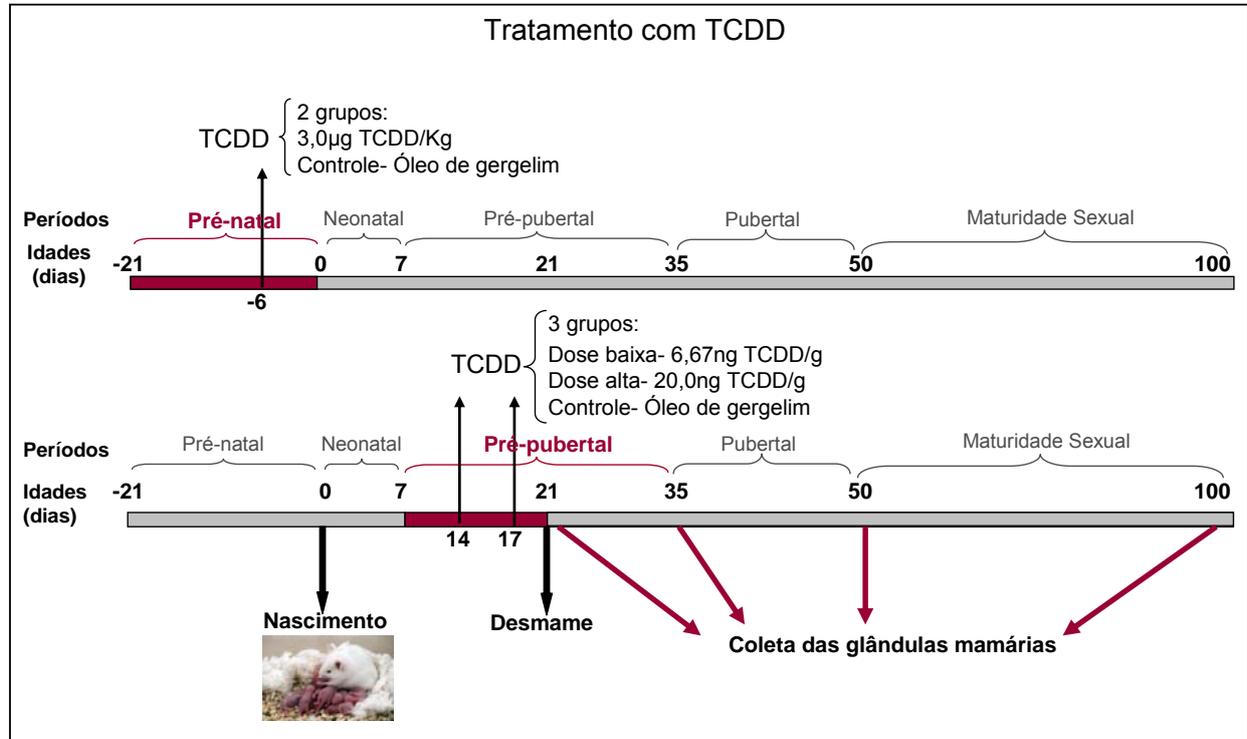
No tratamento pré-natal (PN), as ratas prenhas, receberam no 15º dia após a concepção, dose única de 3,0µg de TCDD/kg de massa corpórea através de gavagem (figura 3). Após o nascimento, a ninhada foi separada da mãe e transferida para uma fêmea nutriz para o aleitamento, desta maneira, foi garantida que a exposição à TCDD fosse exclusivamente intra-uterina. O grupo controle foi manipulado da mesma forma e recebeu o mesmo volume de óleo de gergelim (*Sesamum indicum*), veículo utilizado para a TCDD.

Para o tratamento pré-pubertal (PP), as ratas lactantes foram divididas em três grupos: grupo dose baixa (L), grupo dose alta (H) e grupo controle. Os diferentes tratamentos foram realizados nos dias 14 e 17 pós-parto através de gavagem. O grupo dose baixa recebeu 6,67ng de TCDD/g de massa corpórea, o grupo dose alta recebeu 20,0ng de TCDD/g de massa corpórea e o grupo controle recebeu volume equivalente de óleo de gergelim. Neste caso, a prole recebeu o composto através do aleitamento (figura 3).



**Figura 3-** Tipos de tratamentos das ratas. No grupo pré-natal (PN) o tratamento foi feito em ratas prenhas e no tratamento pré-pubertal (PP) o tratamento foi realizado em ratas lactantes, através de gavagem.

Neste estudo, foram utilizadas somente as filhotes fêmeas. Nos dois tipos de tratamentos, a prole sofreu o desmame ao completar 21 dias de idade e foram mantidas em duas ou três por gaiola, até a eutanásia realizada em 4 diferentes idades, 21, 35, 50 e 100 dias (figura 4).



**Figura 4-** Esquema demonstrando os tratamentos realizados com TCDD. As barras representam a linha da vida das ratas. No topo está representado o tratamento pré-natal e a segunda barra representa o tratamento pré-pubertal. Aos 21, 35, 50 e 100 dias de idade os animais foram sacrificados para a coleta das glândulas mamárias.

### 2.3- Coleta das Glândulas Mamárias

Os efeitos da TCDD recebida através da placenta ou através do aleitamento foram estudados nas ratas quando estas atingiram quatro importantes idades do desenvolvimento:

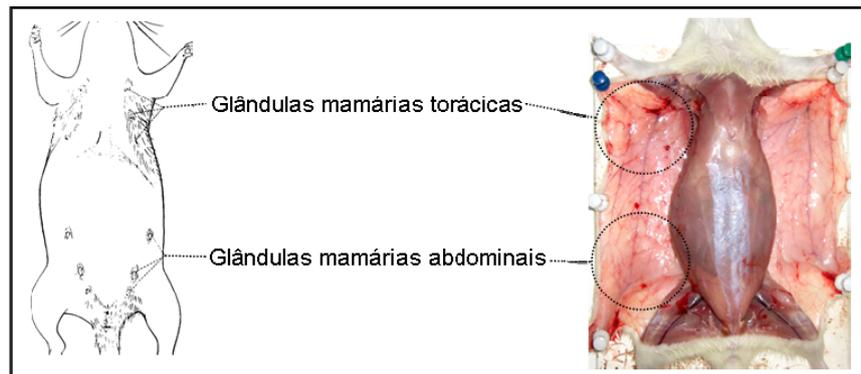
**21 dias-** idade em que as ratas sofrem o desmame.

**35 dias-** idade com que a rata inicia a puberdade, ocorre a abertura vaginal e o ciclo estral começa.

**50 dias-** idade com que as ratas são mais suscetíveis a desenvolver câncer de mama quimicamente induzido.

**100 dias-** As ratas já atingiram a idade adulta.

Em cada uma das idades, 21, 35 ± 1, 50 ± 1 e 100 ± 2 dias foram utilizados vinte animais por grupo, dez para o estudo morfológico e dez para estudo molecular. Para as últimas três idades, todas as fêmeas foram sacrificadas durante a fase de estro do ciclo estral. Os animais foram anestesiados utilizando injeção intraperitoneal (100mg/kg) de Xilazina (AnaSed<sup>®</sup> Injectable- LLOYD Laboratories, Shenandoah IA, USA) e Cetamina HCl (Hospira Inc., Lake Forest IL, USA) na proporção de 1:10, seguido de transsecção da aorta após a extração das glândulas mamárias abdominais (figura 5).

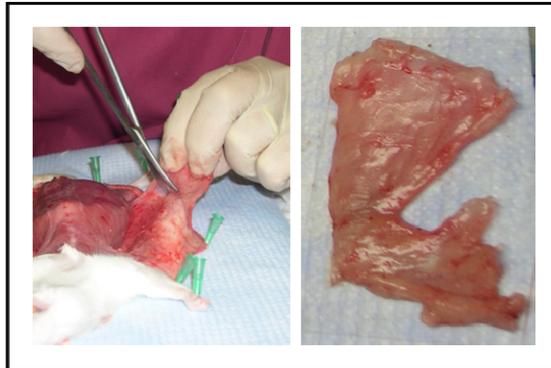


**Figura 5-** Localização das glândulas mamárias da rata exteriormente e interiormente. Neste estudo foram utilizadas somente as glândulas abdominais.

Os animais utilizados para o estudo morfológico, duas horas antes de serem sacrificados, receberam uma injeção intraperitoneal de 200 mg/kg de 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (Sigma, St Louis MO, USA) suspensa em solução salina estéril para a realização do estudo da proliferação celular.

As glândulas extraídas foram colocadas em cassetes histológicos e fixadas em álcool 70%, para o estudo de índice de proliferação. Outros dez animais por grupo, utilizados para o estudo molecular, tiveram as glândulas mamárias abdominais

extraídas e imediatamente imergidas em nitrogênio líquido até o total congelamento. Estas amostras foram conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para a extração de RNA.



**Figura 6-** Extração das glândulas mamárias. À direita, foto da glândula mamária totalmente extraída.

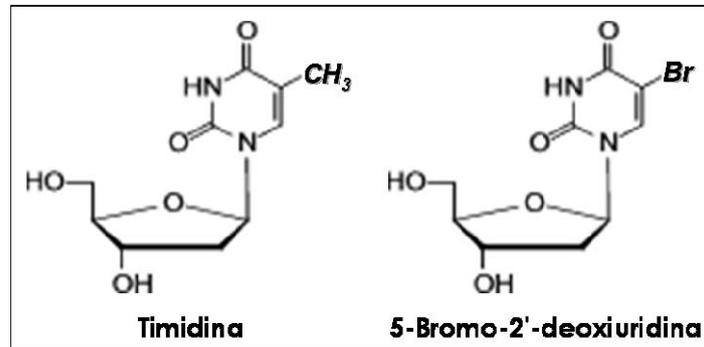
## 2.4- Análise Morfológica

As glândulas mamárias que foram mantidas em cassetes com etanol 70% foram processadas para o estudo de proliferação celular através de imuno-histoquímica.

### 2.4.1- Índice de Proliferação Celular

Para se determinar o índice de proliferação das células da glândula mamária foi realizada imuno-histoquímica, onde as células que estavam proliferando foram marcadas com 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU). A BrdU é um análogo sintético da timidina em que o grupo metil é substituído por um brometo (figura 7). Este se incorpora ao DNA durante a sua replicação, conseqüentemente, a marcação celular é

proporcional a síntese de DNA durante a fase S da divisão celular. Através de imunohistoquímica, usando o anticorpo específico para este composto, é possível determinar quais são as células que estavam proliferando antes da eutanásia dos animais.



**Figura 7-** Estruturas moleculares da timidina e da 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), observe que na BrdU o grupo metil é substituído por um brometo.

As glândulas mamárias, depois de extraídas, foram mantidas em etanol 70% para a fixação por pelo menos 24 horas, para posteriormente serem embebidas em parafina.

Os cassetes foram colocados em um Modular Vacuum Processor (Instrumentation Laboratory). Nesta máquina o tecido passou pelo processo de fixação em álcool 70%, desidratação com concentrações crescente de etanol, diafanização com xilol e posteriormente recebem parafina para a sustentação do tecido. Este processo leva aproximadamente 12 horas.

Após a retirada dos tecidos do Modular Vacuum Processor, os cassetes foram embebidos em parafina utilizando-se o histoembebedor EG 1160 Tissue Histoembedder (Leica Microsystems, Bannockburn IL, USA). Os blocos de parafina foram utilizados para fazer cortes de 5µm de espessura e colocados em lâminas positivas (+) Superforst® Plus Microscope Slides (Fisher Scientific, Pittsburgh PA, USA). As lâminas foram processadas para a realização da imunohistoquímica.

Primeiramente os cortes foram desparafinados utilizando-se xilol. Posteriormente, foram hidratados através de diferentes concentrações de etanol e em seguida, o tecido foi bloqueado com solução de 30% peróxido de hidrogênio em

metanol por 30 minutos. A recuperação antigênica foi realizada utilizando-se tampão de citrato 5% e aquecendo em microondas.

Após o esfriamento das lâminas, elas foram colocadas no Optimax Plus- Automatic Consolidated Cell Stainer (Biogenex, San Ramon, CA), onde os cortes receberam a solução de bloqueio, depois foram encubados com o anticorpo primário anti-BrdU (Biogenex Cat: MU247-UC) por 30 minutos e, posteriormente, com o anticorpo secundário anti-camundongo por 20 minutos. A revelação foi realizada usando-se o kit de detecção Supersensitive™ Link-label IHC Detection System (Biogenex, San Ramon, CA).

#### 2.4.2- Cálculo do Índice de Proliferação Celular

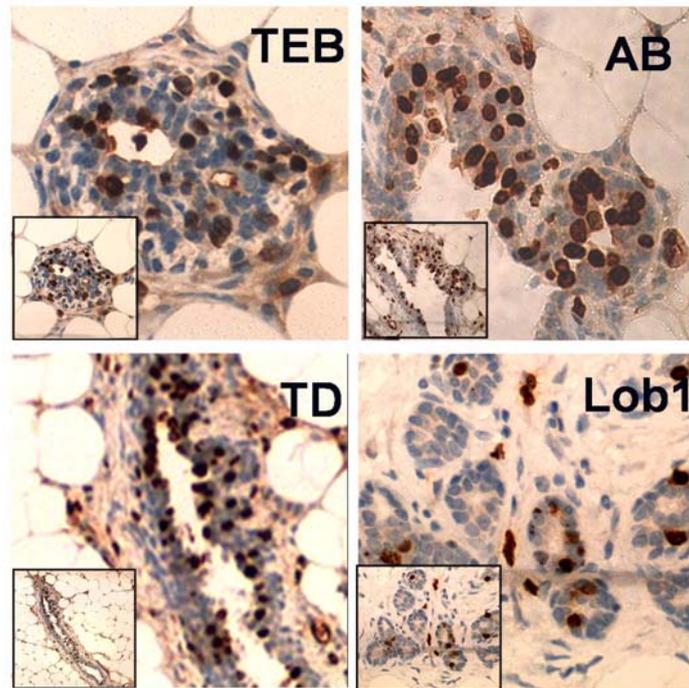
A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de luz Olympus BX40, com ocular de 10X e objetiva de 40X, resultando no aumento final de 400X, imagens foram digitalizadas através da câmera digital SPOT-Real Time (Diagnostic Instruments, Sterling Heights MI, USA) acoplada ao microscópio. As células que apresentaram grânulos amarronzados no núcleo foram consideradas positivas e o índice de proliferação celular foi calculado separadamente para as diferentes estruturas da glândula mamária (Russo and Russo 2004) (figura 8).

**Ducto terminal (*terminal duct*- TD):** Final dos ductos excretores.

**Botão terminal (*terminal end bud*- TEB):** Se formam nas extremidades dos ductos e possuem a forma de bulbo. Estruturas menos desenvolvidas da glândula.

**Broto alveolar (*alveolar bud*- AB):** Cada TEB pode se dividir formando essas menores estruturas, morfológicamente mais desenvolvidas. Os ABs podem continuar crescendo formando novos ramos ou formando ductos menores, resultando em pequenas estruturas aglomeradas ao redor do ducto terminal.

**Lóbulo do tipo 1 (*lobule type 1*- Lob1):** É a unidade estrutural composta pelo ducto terminal e por 4 a 11 pequenos ductos derivados deste.



**Figura 8-** Fotos demonstrando as estruturas que tiveram a proliferação celular avaliadas. Células com coloração marrom são positivas para proliferação. **TEB-** Botão terminal; **AB-** Broto alveolar; **TD-** Ducto terminal; **Lob1-** Lóbulo do tipo 1 (Fotos de Richard Wang).

Dois observadores independentes analisaram de oito a dez lâminas por grupo. Todas as células presentes (positivas e negativas) foram contadas para cada uma das estruturas encontradas. O índice de proliferação celular foi calculado através da razão entre o número de células positivas e o número de total de células contadas em uma determinada estrutura.

$$\text{Índice de proliferação} = \frac{\text{Número de células positivas para BrdU}}{\text{Número de total de células na estrutura}}$$

Os índices de proliferação de cada estrutura foram comparados entre os animais tratados nas diferentes condições contra os seus respectivos controles. Foram considerados diferentes os índices de proliferação celular que apresentaram  $p < 0,05$  como resultado do teste-t não pareado.

## 2.5- Análise da Expressão Gênica

A análise de expressão gênica das glândulas mamárias foi realizada através da técnica de *microarray* e posteriormente, foi realizada a validação de alguns genes escolhidos através de RT-PCR em tempo real.

### 2.5.1- Extração de RNA

Os tecidos conservados em  $-80^{\circ}\text{C}$  tiveram o RNA extraído com o kit RNeasy Mini Kit<sup>®</sup> (QIAGEN, Valencia CA, USA) seguindo o protocolo do fabricante.

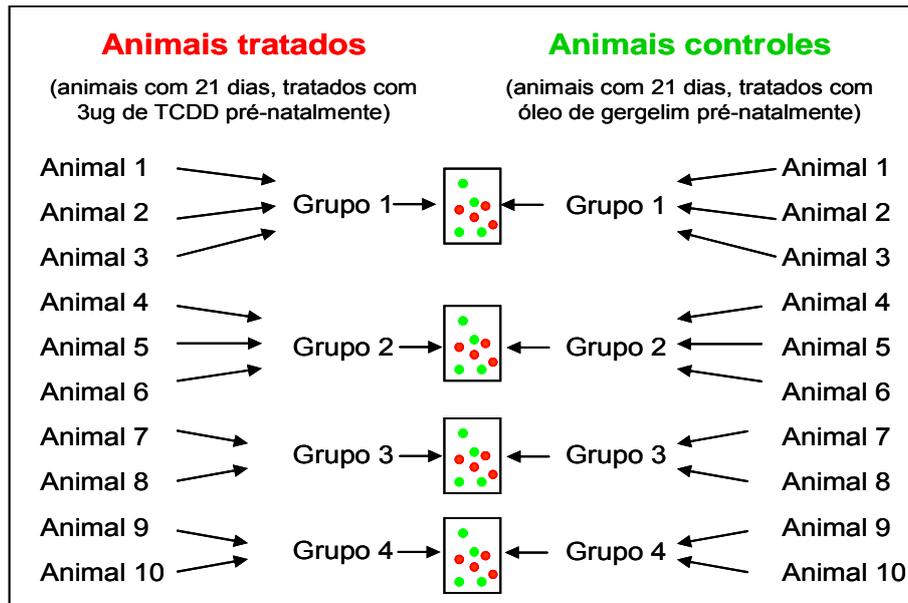
A extração de RNA foi iniciada com fragmentos de aproximadamente 30mg de tecido congelado que foram imediatamente colocados em 700 $\mu\text{L}$  de Buffer RLT contendo 1% de  $\beta$ -Mercaptoetanol para a iniciação da lise do tecido. As amostras foram trituradas e lisadas por 30 segundos utilizando-se homogenizador Polytron PT 3000 (Kinematica, Inc., Bohemia NY, USA). Após a homogeneização, o lisado foi centrifugado a máxima velocidade, para a separação dos restos teciduais. Ao sobrenadante foi adicionado o mesmo volume de etanol 70%, e a solução foi transferida para a coluna presente no kit da QIAGEN. A solução contendo o RNA passa pela coluna, a qual retém o RNA por afinidade. A coluna passou por lavagens para a purificação do RNA e posteriormente, elui-se o RNA com 60 $\mu\text{L}$  em água livre de RNAses, presente no kit.

A concentração do RNA obtido foi medida através do NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 v.3.3 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). O Nanodrop é um espectrofotômetro que calcula a concentração das amostras de RNA utilizando-se o comprimento de onda de 260nm, assim como a pureza das amostras através da razão da absorbância obtida pelos comprimentos de ondas de 260 e 280 nm.

Para a realização de *microarrays*, a boa qualidade do RNA utilizado é essencial. Para averiguar a qualidade dos RNAs utilizou-se eletroforese por capilaridade com Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc, Wilmington DE, USA). Neste aparelho, averiguamos a qualidade do RNA total baseando-se na conservação das bandas 28S e 18S do RNA ribossômico. Para o experimento, foram utilizadas as amostras com menor degradação dos segmentos 28s e 18s. As amostras que não apresentaram qualidade satisfatória tiveram sua extração repetida e não atingindo os critérios necessários foram excluídas do experimento.

### **2.5.2- Preparação dos *Microarrays***

As dez amostras de RNA extraídas de cada condição foram agrupadas em trios ou pares resultando em um total de três ou quatro grupos de RNAs por tratamento e idade (figura 9). Ao final, o tratamento pré-natal era composto de 4 agrupamentos de RNA para cada uma das idades (21, 35, 50 e 100 dias), e foram realizadas 4 lâminas de *microarray* por idade, totalizando 16 lâminas. No tratamento pré-pubertal, resultamos com 3 agrupamentos de RNA dos animais que receberam a dose baixa para cada idade, portanto 12 *microarrays* e, 3 agrupamentos de RNA dos animais que receberam a dose alta por idade, outros 12 *microarrays*. No total foram realizadas 40 lâminas.



**Figura 9-** Representação do agrupamento das amostras e distribuição para a hibridização de uma das idades (21 dias do grupo pré-natal). Este esquema foi utilizado para todas as diferentes condições. As amostras das ratas tratadas foram marcadas com Cyanina-5 e os controles foram marcados com Cyanina-3.

Iniciando-se com 250 ng de RNA total, utilizou-se o Low RNA Input Linear Amplification Kit (Agilent Technologies, Inc, Wilmington DE, USA) para a amplificação e marcação do cRNA para a hibridização.

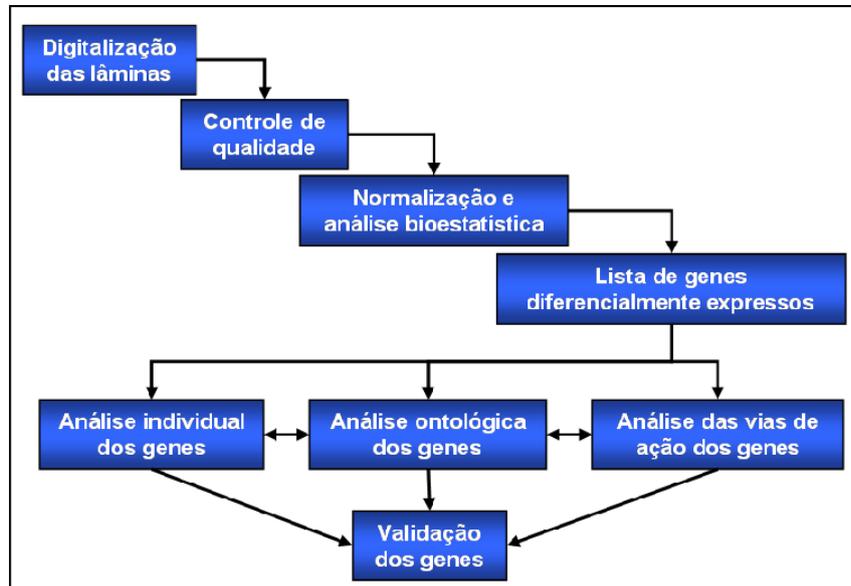
Durante o processo de amplificação, o RNA mensageiro passa por uma transcrição reversa *in vitro* resultando em DNA complementar (cDNA). O cDNA serve como molde para a produção de cRNA que incorpora os nucleotídeos de citosina marcados com Cyanina-3 (Cy3-dCTP) ou Cyanina-5 (Cy5-dCTP) (Perkin Elmer Life Sciences, Boston MA, USA) durante a amplificação.

Após a marcação com os fluorocromos, medimos a concentração de cRNA obtida com a amplificação e a concentração de picomols de marcadores por RNA, e com esses valores calculamos a eficiência da amplificação e marcação. Para que a hibridação seja realizada, precisamos que a eficiência da marcação seja de no mínimo 8 picomols por cada micrograma de RNA presente na amostra.

Com a comprovação da marcação, as amostras passam pelo processo de fragmentação controlada, e posteriormente, inicia-se a hibridação. Cada

lâmina foi hibridizada com quantidades de RNA equivalentes a 8 picomols de Cy3 da amostra controle e 8 picomols de Cy5 do grupo tratado. As lâminas hibridizadas por 17 horas a 60°C com agitação de 4 rpm. Rat Oligo Microarray Kit com SurePrint Technology- G4130A (Agilent Technologies, Inc, Wilmington DE, USA) foram as lâminas utilizadas para os *microarrays*. Estas contêm 22mil sondas, incluindo controles positivos e negativos, com o comprimento de 60 oligonucleotídeos impressos pelo processo de SurePrint.

Ao final, as lâminas de *microarrays* passaram por três tampões de lavagens. O último tampão, Stabilization and Drying Solution (Agilent Technologies, Inc, Wilmington DE, USA) é utilizado para diminuir a degradação que o Cy5-dCTP sofre pela ação do ozônio e dessa forma não cause artefatos técnicos nas lâminas. Imediatamente após as lavagens, as lâminas foram digitalizadas utilizando-se o Agilent Technologies Scanner modelo G2505B. Para garantir a qualidade das imagens, as lâminas foram lavadas uma segunda vez e novamente foram digitalizadas. Após a digitalização das lâminas, as imagens passam pelo processo de qualificação e normalização para as subseqüentes análises (figura 10).



**Figura 10-** Passos necessários para a análise de expressão gênica através de *microarrays*. Após a digitalização das imagens, estas passam pelo controle de qualidade. Posteriormente, são realizadas as normalizações e as análises estatísticas resultando em lista de genes considerados diferencialmente expressos. Essas listas são analisadas por diferentes metodologias e os genes de interesse passam por validação.

### 2.5.3- Análise das Imagens dos *Microarrays*

As imagens obtidas foram submetidas ao software Feature Extraction v9.5.1.1 (Agilent Technologies, Inc, Wilmington DE, USA) utilizando-se o protocolo GE2-v4\_95\_feb07, recomendado para o tipo de lâminas que usamos, não alterando nenhum dos padrões.

Neste programa uma grade é sobreposta às imagens capturadas. Esta grade, além de determinar a localização de cada oligonucleotídeo na lâmina, é utilizada para se verificar a qualidade dos *spots*. O protocolo escolhido contém as informações de como serão calculados e avaliados diversos parâmetros, como a luminescência emitida pela lâmina (*background*), formato dos *spots*, distribuição dos *spots* normais e os considerados não-uniformes, saturados ou extremos (*outliers*), distribuição das cores equivalentes aos canais de Cy3 ou Cy5, controles positivos e negativos.

Neste protocolo, nenhuma correção do *background* foi aplicada e foram avaliados 12 parâmetros para medição da qualidade. Esses parâmetros são utilizados para a escolha da melhor imagem obtida, dando sempre preferência para a primeira imagem digitalizada para evitar perda de luminescência pela primeira exposição aos *lasers* ou à segunda lavagem. As lâminas que não apresentaram a qualidade necessária foram excluídas do estudo.

Feature Extraction também realiza a normalização e calcula o valor de luminescência de cada oligonucleotídeo para cada canal. A normalização para cada lâmina é realizada para que as diferenças sistemáticas resultantes do uso de Cy3 e Cy5 sejam removidas. Neste caso foi feita a normalização Linear Lowess, que consiste em duas fases. Na fase linear, o sinal emitido por cada gene tem o *background* subtraído e posteriormente multiplicado por uma constante, calculada para cada canal separadamente, usando média geométrica dos parâmetros escolhidos para normalização. Adicionalmente, as diferenças de Cy3 e Cy5 são dependentes da intensidade do sinal emitido. Desta forma, é preciso aplicar uma metodologia não-linear

nos dados já normalizados linearmente. Na Lowess, o sinal com o *background* subtraído é multiplicado por uma função determinada a partir da intensidade do *spot*.

As intensidades de luminescência são transformadas nos valores de expressão para cada oligonucleotídeo presente na lâmina, que posteriormente foram utilizados para a análise Bioestatística e Bioinformática. As diferenças de expressão (DE) são calculadas pelo logaritmo com base 2 da razão entre as intensidades de Cy5 (tratado) e Cy3 (controle) para cada oligo:

$$DE = \log_2 \left( \frac{Cy5}{Cy3} \right)$$

#### 2.5.4- Análise Bioestatística e Bioinformática dos *Microarrays*

Na etapa de elaboração e aplicação dos modelos estatísticos apropriados o projeto teve a colaboração de Michael Slifker, MS e Suraj Peri, PhD, pertencentes ao departamento de Bioestatística e Bioinformática do Fox Chase Cancer Center, Filadélfia, PA, EUA.

Depois de diferentes programas e modelos utilizados, devido à complexidade do modelo experimental optamos por fazer a comparação de expressão gênica em cada condição separadamente, comparando-se a amostra tratada com TCDD (canal vermelho) com a amostra não tratada (canal verde) hibridizada na mesma lâmina. Desta forma, foram realizados 12 testes, um para cada estágio de exposição (pré-natal ou pré-pubertal), para cada dose (alta ou baixa) no caso dos animais expostos pré-pubertalmente, em cada idade (21, 35, 50 e 100 dias), resultando em 12 listas de genes diferencialmente expressos.

Antes da análise ser realizada, os oligonucleotídeos foram filtrados e qualquer oligo que não possuísse identificação no banco de genes (Entrez Gene), associação com alguma função biológica ou fossem oligos controle foram retirados,

assim como, os oligos que tiveram expressão abaixo do *background* em mais de 50% das amostras. O teste estatístico utilizado para cada amostra foi teste-t bayesiano empírico moderado (Smyth 2004), utilizando-se o pacote computacional LIMMA (*Linear Models for Microarray Data*) oferecido no ambiente de desenvolvimento Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) em linguagem R. O teste-t moderado é interpretado da mesma maneira que o teste comum, porém, os erros padrão foram moderados entre todos os oligos usando um modelo bayesiano, fazendo com que informação de toda a lâmina seja utilizada para cada oligo, resultando em valores mais confiáveis de erro padrão. Essa técnica faz com que a análise seja mais estável para experimentos com pequeno número de réplicas e diminui o número de falso positivos.

A análise realizada foi ponderada de acordo com a qualidade das lâminas de modo que os oligonucleotídeos que apresentaram menor qualidade, tiveram menor peso. Deste modo, mesmo se lâminas com menor qualidade foram mantidas na análise, estas têm menor peso nos resultados.

Na análise de *microarrays*, testes-t são realizados para cada oligonucleotídeo que passaram pelo controle de qualidade, gerando um grande número de falso positivos, uma vez que este aumenta proporcionalmente ao número de testes realizados. Para controlar o número de falso positivos, aplicamos o teste de correção de multiplicidade descrito por Benjamini e Hochberg, *False Discovery Rate* (FDR) (Benjamini and Hochberg 1995). Porém, as listas de genes geradas usando FDR como critério foram muito pequenas em algumas condições, então usamos como critério os oligos com valores de p menores que 0,01 para considerá-los diferencialmente expressos nas amostras tratadas em comparação às amostras que receberam apenas o solvente da TCDD. No total foram geradas 12 listas de genes diferencialmente expressos por TCDD referentes a cada condição testada e estas listas foram utilizadas para a análise exploratória de funções e vias de ação relacionadas com os tratamentos.

Os genes considerados diferencialmente expressos foram classificados de acordo com a suas funções biológicas, utilizando-se a nomenclatura desenvolvida pelo projeto Gene Ontology (GO). Através do teste hipergeométrico condicional, oferecido pelo pacote computacional GOstats no ambiente Bioconductor, as funções encontradas foram testadas para se avaliar se elas estavam mais

representadas do que seria o esperado nas listas de genes. As funções foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,01.

Devido às subcategorias disponíveis na classificação do projeto Gene Ontology, genes pertencentes a processos biológicos similares são classificados em termos GO diferentes, por isso, posteriormente, os termos GOs considerados estatisticamente significantes juntamente com os seus genes foram manualmente agrupados em diferentes classes baseando-se na similaridade de suas funções. Mapas com as expressões dos genes encontrados em cada classe foram construídos para facilitar a visualização do comportamento de TCDD nas diferentes condições. Os mapas foram construídos através de agrupamentos (clusterings) hierárquicos usando-se a média aritmética das distâncias como método de *linkage* (*average linkage*) e para o cálculo das distâncias foi usado *pearson uncentered*, no programa computacional MeV- MultiExperiment Viewer do TIGR MeV Team (Saeed, Sharov et al. 2003).

Adicionalmente, as 12 listas de genes diferencialmente expressos foram classificadas de acordo com as vias de ação canônicas, utilizando-se o programa Ingenuity Pathways Analysis (IPA) v6 (Ingenuity Systems®, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)). A significância de associação entre as listas de genes e vias de ação canônicas foram medidas de duas formas. Primeiro, através da razão entre o número de genes de interesse que pertencem à determinada via e o número total de moléculas da via. Segundo, através do teste exato de Fisher, o qual calcula valores de p para determinar a probabilidade de que a associação entre as listas de genes submetidas e as vias de ação ocorreu ao acaso. Utilizamos apenas as vias com valor de p menor do que 0,01.

Utilizando o mesmo programa, IPA, grupos de genes foram submetidos a avaliação da relação entre si e outros os genes através da formação de redes, e a relação destas com outras vias de ação, funções biológicas ou doenças. Nesta análise, os genes de interesse são sobrepostos a uma rede molecular global, que foi desenvolvida baseada no banco de dados da Ingenuity Systems® e as redes contendo os genes de interesse são geradas algoritmicamente baseando-se na conectividade. Com o teste exato de Fisher se mede a probabilidade dessa rede ter sido formada randomicamente.

### 2.5.5- Validação com RT-PCR em Tempo Real

Aqueles genes que se destacaram, seja por apresentarem grandes diferenças de expressão, por estarem modificados independentes da condição, por fazerem parte de importantes funções biológicas ou por atuarem em importantes vias foram submetidos à validação.

A validação dos resultados foi feita através de Reação de Polimerase em Cadeia em tempo real com Transcrição Reversa (RT-PCR em tempo real) para a quantificação relativa da expressão gênica nas amostras. Como metodologia fluorescente usou-se TaqMan<sup>®</sup>, através do kit TaqMan<sup>®</sup> One Step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA). O termociclador, ABI 7000 Sequence Detection System, e as sondas utilizadas (tabela 3) para a investigação de cada gene também eram do mesmo fabricante.

Tabela 3- Lista de genes validados por RT-PCR em tempo real

Código das sondas	Símbolo	Nome do gene	GenBank
Rn00667869_m1	Act b	<i>actin, beta</i>	NM_031144.2
Rn00487218_m1	Cyp1a1	<i>cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1</i>	NM_012540.2
Rn00564055_m1	Cyp1b1	<i>cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1</i>	NM_012940.2
Rn00592815_m1	Elov6	<i>ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast)</i>	NM_134383.2
Rn00565750_m1	AhR	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>	NM_013149.2

**Tabela 3-** Sondas que foram usadas para a validação dos genes através de RT-PCR em tempo real. **Código das sondas**= número do produto comercializado por Applied Biosystems.

Para cada reação foram utilizados 100ng de RNA total, 1,5µL da sonda, 1,25µL de 40X MultiScribe and RNase Inhibitor e 25 µL de 2X Master Mix without UNG completando um volume de 50µL. A reação foi realizada no termociclador com 30 minutos a 48°C para a transcrição reversa, 10 minutos a 95°C para a ativação da polimerase, e 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95°C e 60 segundos de anelamento e extensão a 60°C.

Resultante da reação, adquirimos os valores de CT, os quais são definidos como o número de ciclos que foram necessários para que a reação produzisse quantidade de fluorescência acima do limite mínimo delimitado. Cada gene foi normalizado entre as amostras utilizando-se beta-actina como controle endógeno. Essa normalização foi feita subtraindo-se do CT de cada um dos genes o CT da beta-actina de uma determinada amostra ( $\Delta CT$ ):

$$\Delta CT = CT_{\text{gene}} - CT_{\beta\text{-actina}}$$

A expressão relativa do gene de interesse é calculada através da diferença entre a expressão normalizada nas amostras tratadas e não tratadas  $\Delta\Delta CT$ .

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{tratado}} - \Delta CT_{\text{controle}}$$

O  $\Delta\Delta CT$  representa o logaritmo com base 2 da razão entre a expressão na amostra tratada e controle, para transformar esses dados em expressão linear, calculamos o antilogaritmo ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Dessa forma, obtivemos o valor relativo de expressão de um determinado gene em relação a este mesmo gene na amostra controle.

Para a análise de significância, foi utilizado teste-t não pareado, e as comparações que tiveram  $p < 0.05$  foram consideradas estatisticamente diferentes.

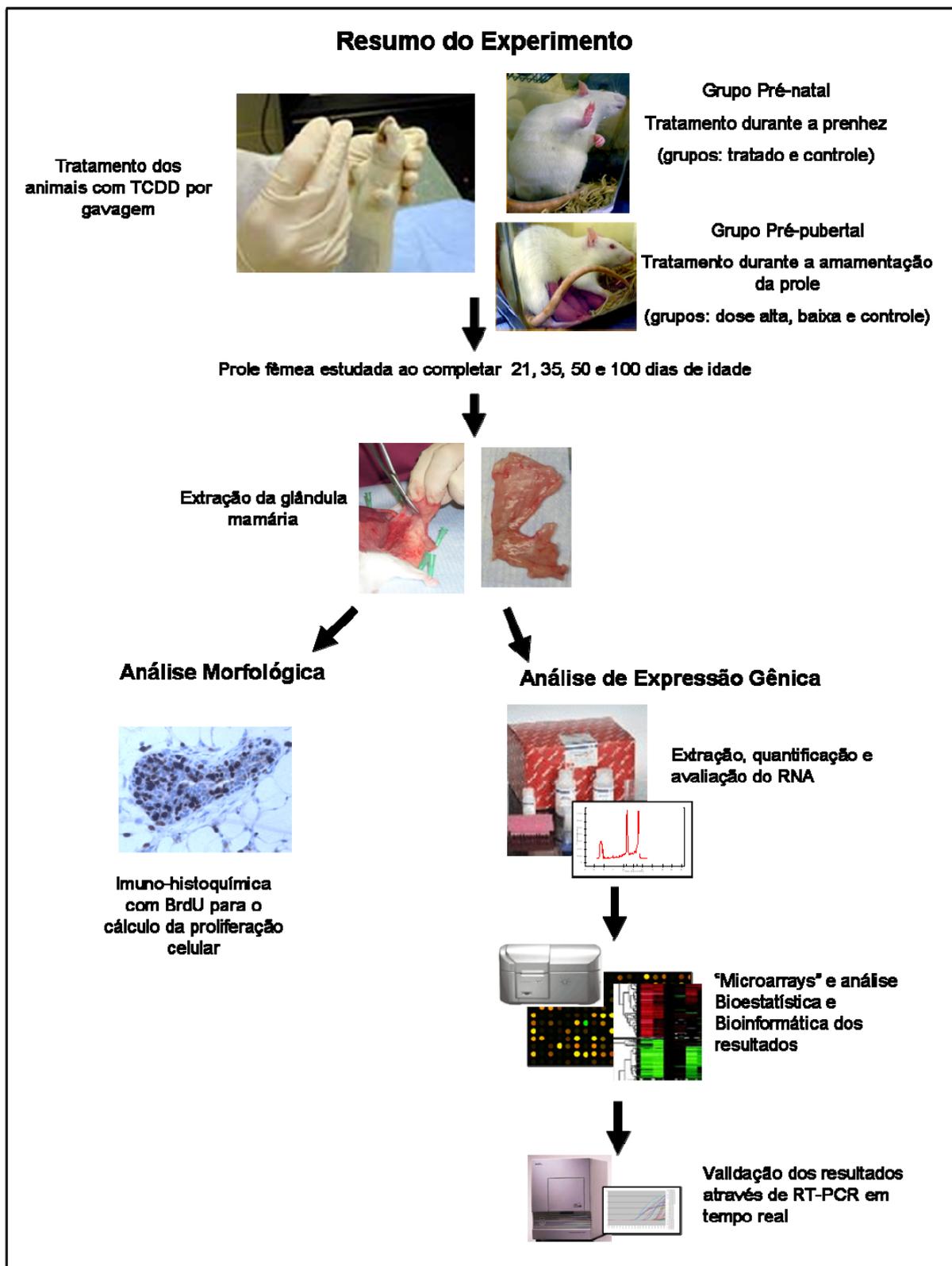


Figura 11- Resumo dos métodos utilizados neste estudo.



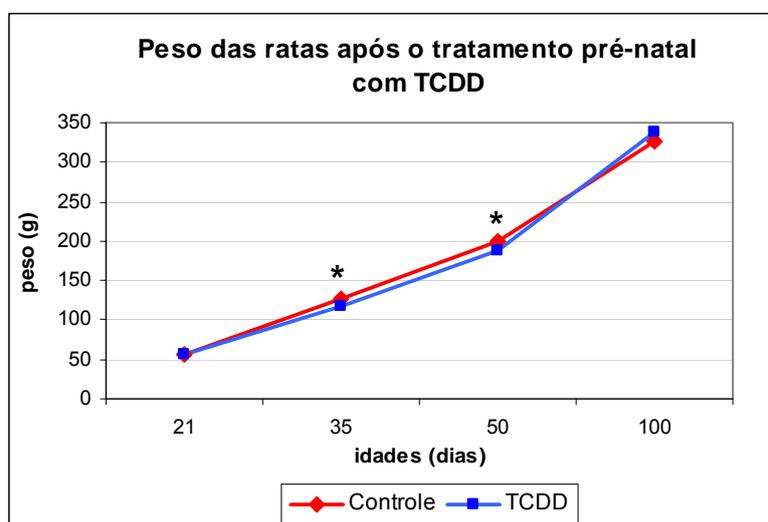
## *3- RESULTADOS*



## 3- RESULTADOS

## 3.1- Efeito de TCDD na Massa Corpórea dos Animais

Todas as ratas que foram sacrificadas, tanto para o estudo morfológico como para o estudo gênico foram pesadas e tiveram sua massa corpórea comparada com o seu grupo controle. Dentre os animais que receberam o tratamento antes do nascimento, observamos decréscimo no peso dos animais com 35 e 50 dias (tabela 4 e figura 12).



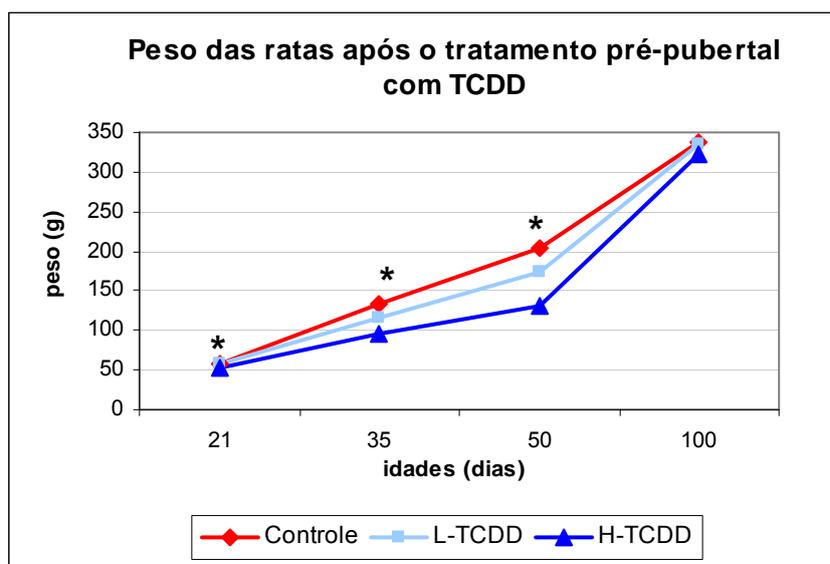
**Figura 12-** Peso em gramas dos animais controle e tratados com TCDD no período pré-natal. Asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) entre o peso dos animais tratados e não-tratados aos 35 e 50 dias de idade.

Tabela 4- Média dos pesos (g) dos animais que receberam o tratamento pré-natal

Idade	Controle	TCDD	valor de p
21 dias	55,8 ± 4,9	55,8 ± 3,8	0,971
35 dias	126,5 ± 9,2	117,9 ± 8,9	0,005
50 dias	199,7 ± 13,6	188,2 ± 16,1	0,021
100 dias	326,9 ± 33,7	337,9 ± 41,7	0,364

**Tabela 4-** Média dos pesos (g) dos animais que receberam o tratamento pré-natal. Animais com 35 e 50 dias de idade apresentaram menor peso quando comparados com seus respectivos controle ( $p < 0,05$ ).

Semelhantemente, o tratamento após o nascimento das ratas causou diminuição do peso dos animais com 35 e 50 dias usando-se baixa dose. Com maior dose os animais tiveram um decréscimo ainda maior do peso, sendo estatisticamente significante menor comparando-se com os animais controle ou com os animais que receberam 6,67 ng de TCDD/g, e este efeito foi observado a partir dos 21 dias (tabela 5 e figura 13).



**Figura 13-** Peso em gramas dos animais controle e tratados com TCDD no período pré-pubertal. Asteriscos (\*) representam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) entre o peso dos animais nas idades específicas.

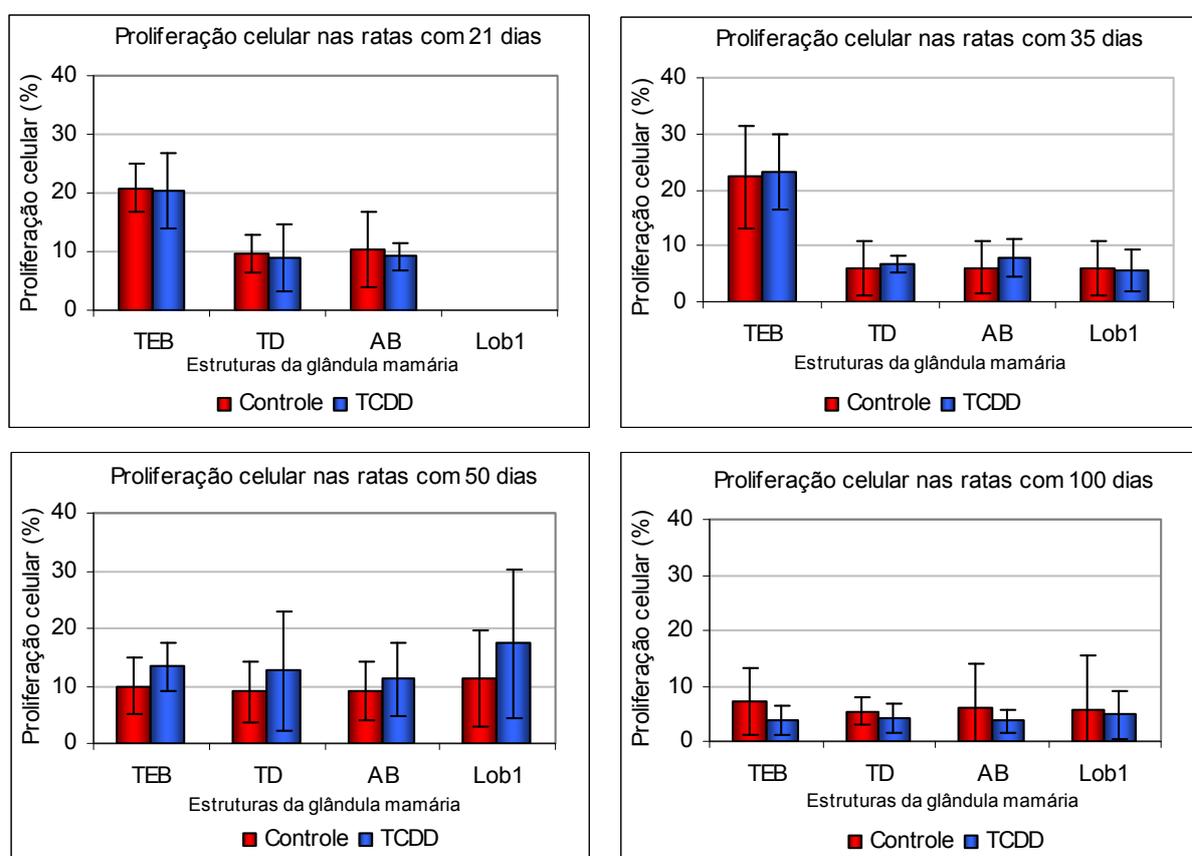
**Tabela 5-** Média dos pesos (g) dos animais que receberam o tratamento pré-pubertal

Idade	Controle	L-TCDD	valor de p (C x L)	H-TCDD	valor de p (C x H)	valor de p (L x H)
21 dias	58,2± 8,6	56,7± 4,5	0,510	52,7± 3,2	0,011	0,002
35 dias	134,6± 14,2	116,6± 9,4	<0,001	95,1± 13,9	<0,001	<0,001
50 dias	204,7± 19,5	173,5± 16,6	<0,001	130,3± 40,3	<0,001	<0,001
100 dias	338,1± 30,7	334,7± 43,3	0,776	322± 46,1	0,203	0,377

**Tabela 5-** Média dos pesos (g) dos animais que receberam o tratamento pré-pubertal. Animais com 35 e 50 dias de idade apresentaram menor peso independente da dose que receberam ( $p < 0,001$ ). A dose maior diminuiu também o peso dos animais com 21 dias de idade ( $p < 0,05$ ).

### 3.2- Efeito de TCDD no Índice de Proliferação Celular

Foram comparados os índices de proliferação de cada estrutura das glândulas mamárias das ratas que foram tratadas com TCDD pré-natalmente contra aquelas que receberam o tratamento com óleo de gergelim no mesmo estágio de vida. Não observamos diferenças estatisticamente significantes nas taxas de proliferação celular em nenhuma das idades e em nenhuma das estruturas estudadas após o tratamento pré-natal (figura 14 e tabela 6).



**Figura 14-** Proliferação celular (%) das estruturas da glândula mamária das ratas controle e tratadas com TCDD no período pré-natal. Nenhuma das estruturas apresentou diferença significativa na proliferação celular após o tratamento. **TEB-** Botão terminal; **TD-** Ducto terminal; **AB-** Broto alveolar; **Lob1-** Lóbulo do tipo 1.

Tabela 6- Índice de proliferação celular nas estruturas da glândula mamária das ratas em diferentes idades depois de receberem TCDD durante a gestação

<b>Botão terminal (TEB)</b>			
<b>Idade</b>	<b>IP controle (%)</b>	<b>IP TCDD (%)</b>	<b>Valor de p</b>
21 dias	20,88 ± 4,14	20,22 ± 6,41	0,79
35 dias	22,28 ± 9,05	23,09 ± 6,78	0,83
50 dias	9,92 ± 4,91	13,35 ± 4,21	0,13
100 dias	7,03 ± 6,02	3,79 ± 2,6	0,26

<b>Ducto e ducto terminal (TD)</b>			
<b>Idade</b>	<b>IP controle (%)</b>	<b>IP TCDD (%)</b>	<b>Valor de p</b>
21 dias	9,64 ± 3,15	8,91 ± 5,81	0,75
35 dias	5,87 ± 4,93	6,79 ± 1,49	0,62
50 dias	9,03 ± 5,25	12,68 ± 10,35	0,35
100 dias	5,47 ± 2,43	4,19 ± 2,63	0,29

<b>Broto alveolar (AB)</b>			
<b>Idade</b>	<b>IP controle (%)</b>	<b>IP TCDD (%)</b>	<b>Valor de p</b>
21 dias	10,41 ± 6,31	9,18 ± 2,33	0,61
35 dias	6,14 ± 4,77	7,9 ± 3,29	0,39
50 dias	9,08 ± 5,08	11,14 ± 6,36	0,49
100 dias	5,91 ± 8,19	3,7 ± 2,13	0,42

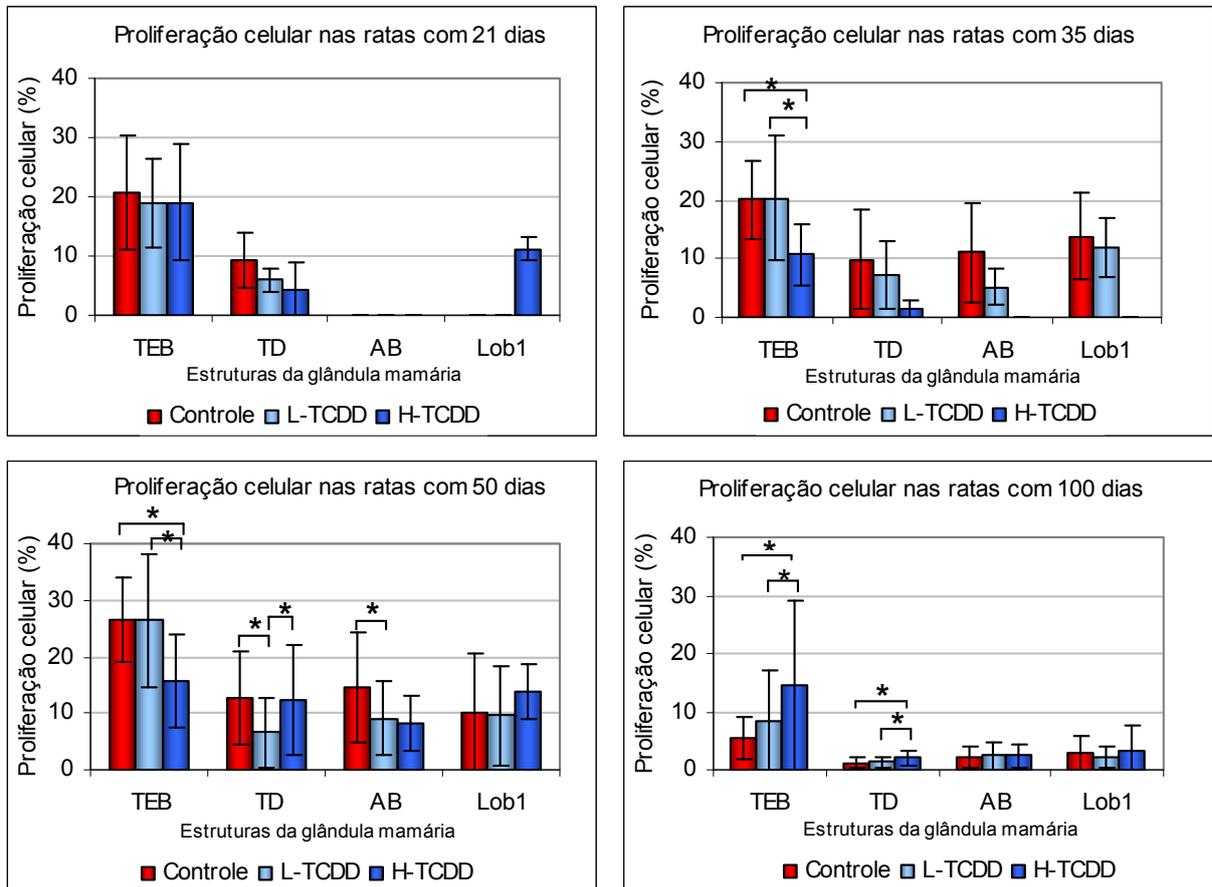
  

<b>Lóbulo do tipo 1 (Lob1)</b>			
<b>Idade</b>	<b>IP controle (%)</b>	<b>IP TCDD (%)</b>	<b>Valor de p</b>
21 dias	-	-	-
35 dias	6,12 ± 4,84	5,46 ± 3,76	0,76
50 dias	11,23 ± 8,48	17,33 ± 12,92	0,29
100 dias	5,5 ± 10,05	4,77 ± 4,23	0,84

**Tabela 6-** Índice de proliferação celular (%) calculada em cada estrutura da glândula mamária das ratas controle e tratadas com TCDD no período pré-natal. A proliferação celular não foi estatisticamente modificada em nenhuma das idades.

Quando o tratamento estudado foi o pré-pubertal, observamos que a TCDD afetou a taxa de proliferação celular em algumas estruturas em idades específicas. A dose baixa de TCDD teve uma tendência a aumentar a proliferação celular nos TEBs dos animais com 100 dias. A dose alta diminuiu significativamente a proliferação nos animais com 35 e 50 dias, e aumentou a proliferação nos animais com 100 dias. Ao estudarmos os TDs, observamos que a dose baixa diminuiu a proliferação nos animais com 50 dias e a dose alta aumentou a proliferação nos animais com 100

dias. A análise dos ABs mostrou que a baixa dose de TCDD diminuiu a proliferação nos animais com 35 e 50 dias e a alta dose diminuiu a divisão celular aos 50 dias de idade. Porém nenhuma mudança significativa foi observada nos lóbulos do tipo 1 (figura 15 e tabela 7).



**Figura 15-** Proliferação celular (%) das estruturas da glândula mamária das ratas controle e tratadas com TCDD no período pré-pubertal. Asteriscos (\*) representam diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ). **TEB-** Botão terminal; **AB-** Broto alveolar; **TD-** Ducto terminal; **Lob1-** Lóbulo do tipo 1.

Tabela 7- Índice de proliferação nas estruturas da glândula mamária das ratas em diferentes idades depois de receberem TCDD durante a lactação

Idade	Controle IP (%)	L-TCDD IP (%)	Botão terminal (TEB)			
			Valor de p (C x L-TCDD)	H-TCDD IP (%)	Valor de p (C x H-TCDD)	Valor de p (L x H)
21dias	20,6 ± 9,7	19,1 ± 7,5	0,491	19,1 ± 9,9	0,487	0,997
35 dias	20,1 ± 6,7	20,3 ± 10,6	0,925	10,7 ± 5,3	p<0,001	p<0,001
50 dias	26,6 ± 7,4	26,4 ± 11,7	0,900	15,7 ± 8,2	p<0,001	p<0,001
100 dias	5,4 ± 3,6	8,3 ± 8,8	0,114	14,6 ± 14,6	0,002	0,047

Idade	Controle IP (%)	L-TCDD IP (%)	Ducto e ducto terminal (TD)			
			Valor de p (C x L-TCDD)	H-TCDD IP (%)	Valor de p (C x H-TCDD)	Valor de p (L x H)
21dias	9,3 ± 4,7	5,9 ± 1,8	0,384	4,4 ± 4,7	0,079	0,677
35 dias	9,9 ± 8,3	7,3 ± 5,7	0,248	1,3 ± 1,7	0,165	0,166
50 dias	12,8 ± 8,3	6,6 ± 6,1	p<0,001	12,3 ± 9,6	0,850	0,007
100 dias	1,2 ± 0,9	1,4 ± 0,9	0,479	2,1 ± 1,3	0,002	0,028

Idade	Controle IP (%)	L-TCDD IP (%)	Broto alveolar (AB)			
			Valor de p (C x L-TCDD)	H-TCDD IP (%)	Valor de p (C x H-TCDD)	Valor de p (L x H)
21dias	-	-	-	-	-	-
35 dias	11 ± 8,6	5,2 ± 3,2	0,064	-	-	-
50 dias	14,5 ± 9,7	9,1 ± 6,5	0,049	8,3 ± 4,9	0,055	0,731
100 dias	2,1 ± 1,8	2,4 ± 2,3	0,682	2,4 ± 1,9	0,641	0,993

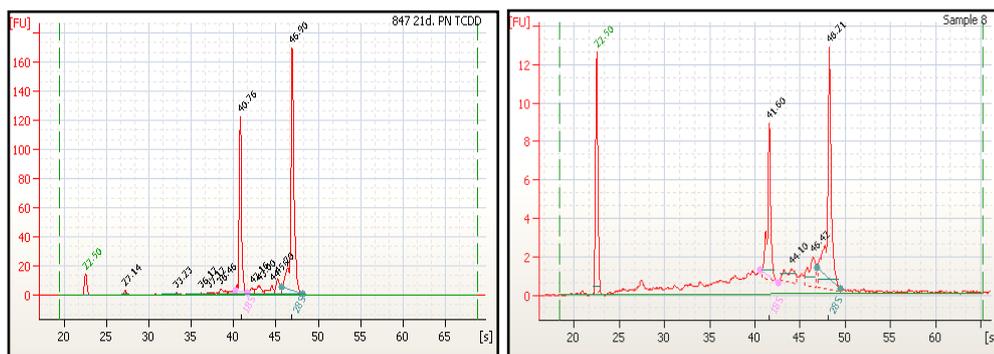
Idade	Controle IP (%)	L-TCDD IP (%)	Lóbulo do tipo 1 (Lob1)			
			Valor de p (C x L-TCDD)	H-TCDD IP (%)	Valor de p (C x H-TCDD)	Valor de p (L x H)
21dias	-	-	-	11,2 ± 1,9	-	-
35 dias	13,8 ± 7,3	11,8 ± 5	0,671	-	-	-
50 dias	10 ± 10,6	9,6 ± 8,8	0,850	13,8 ± 4,9	0,187	0,081
100 dias	2,8 ± 2,9	2,3 ± 1,8	0,583	3,2 ± 4,6	0,729	0,442

**Tabela 7-** Índice de proliferação celular (%) calculada em cada estrutura da glândula mamária das ratas controle e tratadas com TCDD no período pré-pubertal. A proliferação celular foi principalmente afetada nos animais com 50 dias de idade. Entretanto, após 100 dias os TEBs dos animais tratados com TCDD (alta dose) apresentavam proliferação significativamente maior do que os controles. As estruturas mais afetadas nas diferentes idades foram os TEBs.

### 3.3- Efeito de TCDD na Expressão Gênica

#### 3.3.1- Extração de RNA

O RNA extraído das amostras de glândula mamária foram avaliados de acordo com a qualidade e concentração. O total de RNA coletado para cada amostra teve grande variação. Utilizamos apenas as amostras que tiveram a razão entre as absorbâncias com os comprimentos de onda de 260nm e 280nm próxima de 2,0, e que apresentaram dois picos bem definidos, correspondentes às bandas 28S e 18S do RNA ribossômico no eletroferograma (figura 16).

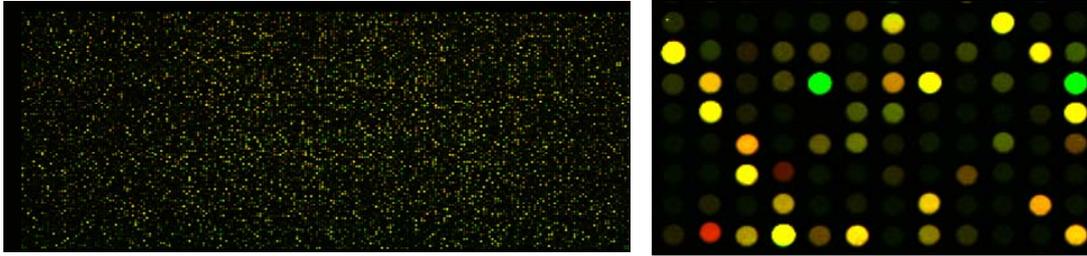


**Figura 16-** Eletroferogramas representando RNAs de boa qualidade. O picos representam as bandas de 28S e 18S (direita e esquerda) do RNA ribossômico.

#### 3.3.2- Controle de Qualidade dos *Microarrays*

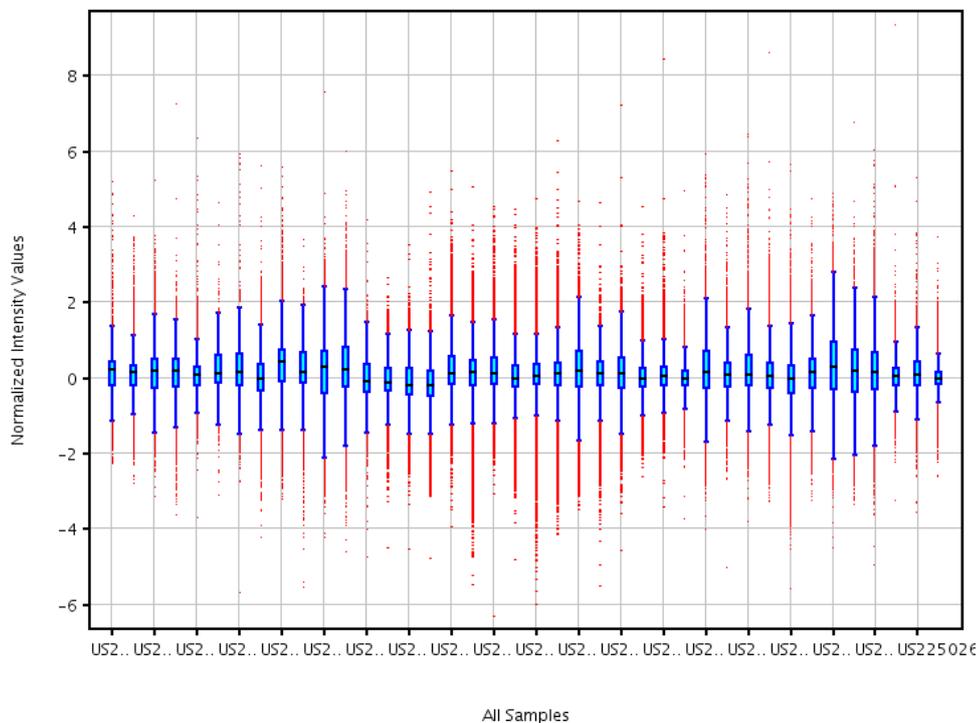
Quando o RNA extraído foi considerado de boa qualidade, utilizamos este para a amplificação e marcação com os fluorocromos. Após amplificação e marcação, as amostras foram quantificadas. RNAs que tiveram amplificação menor que 10 vezes e índice de marcação do ácido nucléico menor que 8pmols/ $\mu$ g de RNA não foram utilizadas para a hibridação das lâminas.

Após a digitalização das lâminas, todas as imagens foram avaliadas para a procura de problemas de qualidade como áreas escuras, ou áreas com resíduos. Usando maior magnitude, avaliamos os *spots* que devem estar nítidos e com coloração uniforme (figura 17).



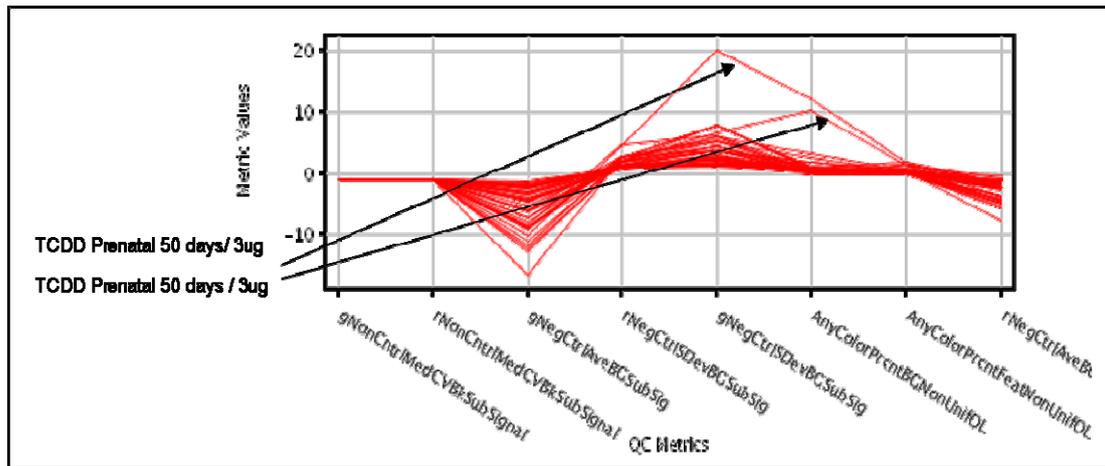
**Figura 17-** Imagem digitalizada da lâmina de *microarray* em duas diferentes magnitudes.

Em seguida, as imagens submetidas ao programa Feature Extraction v9.5.1.1 os quais foram qualificadas e quantificadas. Com os relatórios emitidos neste programa e através do programa GeneSpring v9.0 (Agilent Technologies, Inc, Wilmington DE, USA) avaliamos a qualidade de cada uma das imagens adquiridas. Observamos a distribuição das intensidades dos *spots* após a normalização das lâminas no gráfico box-plot (figure 18).



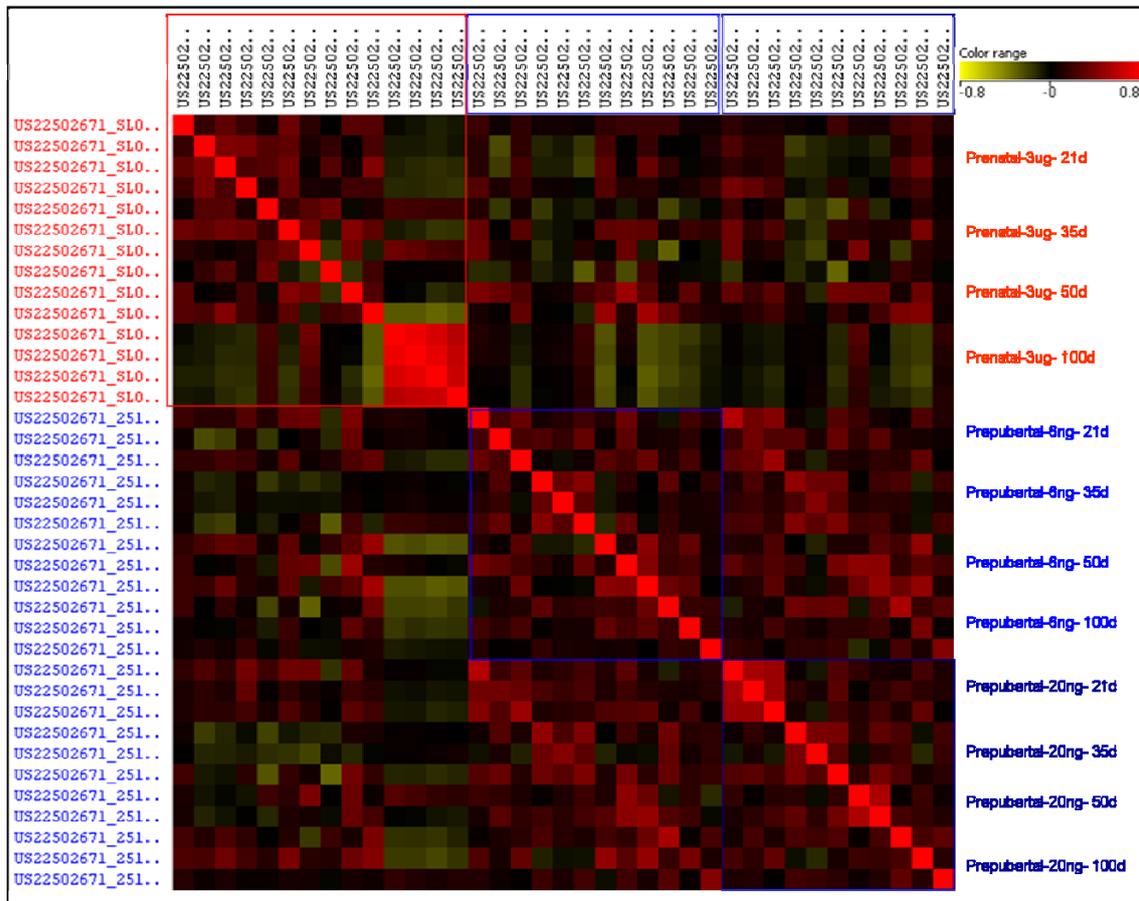
**Figura 18-** Gráfico box-plot representando a intensidade das sondas em cada uma das 40 lâminas de *microarrays* preparadas.

Todas as lâminas utilizadas no experimento foram aprovadas nos 12 parâmetros de controle de qualidade utilizados pela Agilent Technologies. Duas lâminas, que não estavam dentro do padrão esperado foram excluídas das análises (figura 19).



**Figura 19-** Gráfico representando os parâmetros de qualidade de cada lâmina preparada. As setas apontam as linhas correspondentes às duas lâminas excluídas das análises devido a problemas de qualidade.

Outro parâmetro para a qualidade do experimento é a correlação entre as réplicas biológicas (animais que receberam o mesmo tratamento e foram sacrificados ao atingirem a mesma idade), avaliada no gráfico de correlação (figura 20). Observamos maior intensidade de vermelho, ou seja, maior correlação entre as réplicas biológicas. Os animais que foram sacrificados com 100 dias de idade após o tratamento pré-natal foram os que apresentaram maior correlação entre eles. Através desse gráfico é também possível observar, maior correlação entre as amostras que foram tratadas durante o período pré-natal e maior correlação entre as amostras tratadas pré-pubertalmente, com diferentes doses, mas sacrificados com a mesma idade.



**Figura 20-** Gráfico de correlação entre as réplicas biológicas. À esquerda e no topo estão representadas o número das lâminas. À direita está indicado a qual grupo as réplicas pertencem. Quanto maior a intensidade da cor vermelha, maior é a correlação entre as amostras.

### 3.3.3- Genes Diferencialmente Expressos

Quando utilizamos FDR (false discovery rate) de 5% não encontramos muitos genes diferencialmente expressos (tabela 8) nas diferentes condições estudadas. Para podermos comparar as diferentes idades após os diferentes tratamentos optamos utilizar o valor de  $p < 0,01$  como critério para definir os genes diferencialmente expressos por TCDD (tabela 9 e figura 21).

Tabela 8- Número de genes diferencialmente expressos (FDR<5%) pelos diferentes tratamentos com TCDD

Tratamento e idade	FDR<5%
Pré-natal 21d	2
Pré-natal 100d	8479
Pré-pubertal- H- 21d	254
Pré-pubertal- H- 35d	1
Pré-pubertal- H- 50d	939

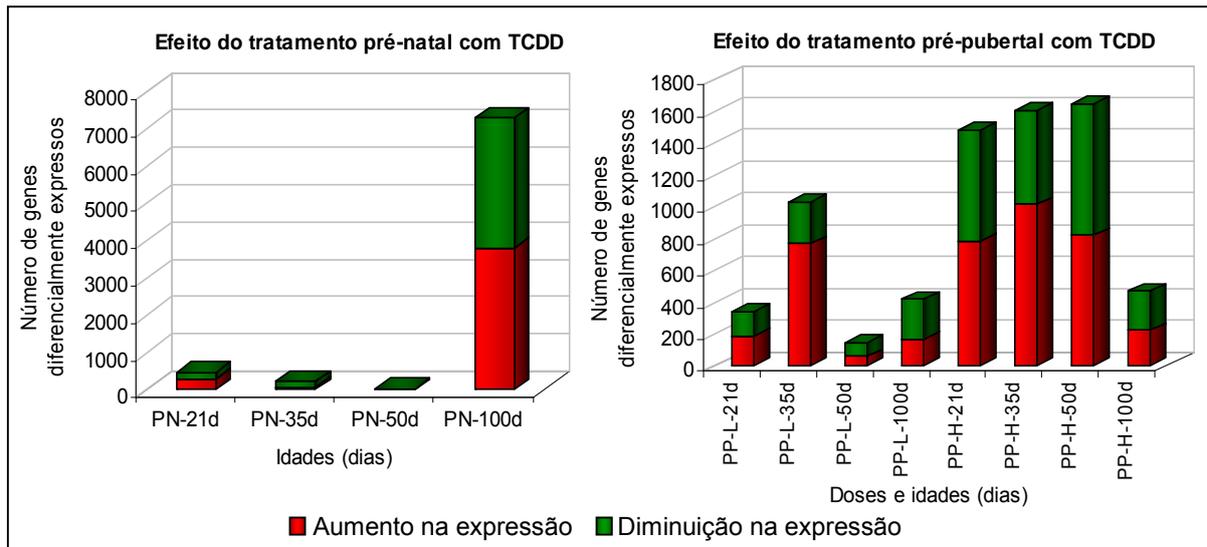
**Tabela 8-** Número de genes diferencialmente expressos utilizando FDR<5% como critério para se determinar a significância estatística. Os demais grupos não apresentaram nenhum gene diferencialmente expresso.

A análise estatística ( $p<0,01$ ) demonstrou que o número máximo de genes diferencialmente expressos foi observado nos animais com 100 dias de idade que receberam TCDD durante a gestação (tabela 9 e figura 21). Quando o tratamento foi realizado pré-pubertalmente observamos que a alta dose de TCDD resultou em maiores números de genes diferencialmente expressos nas diferentes idades.

Tabela 9- Número de genes que tiveram aumento ou decréscimo na expressão devido à ação da TCDD ( $p<0,01$ )

Tratamento e idade	Aumento	Decréscimo	Total
Pré-natal 21d	293	183	476
Pré-natal 35d	83	147	230
Pré-natal 50d	12	15	27
Pré-natal 100d	3807	3483	7290
Pré-pubertal- L- 21d	189	151	340
Pré-pubertal- L- 35d	766	263	1029
Pré-pubertal- L- 50d	57	91	148
Pré-pubertal- L- 100d	166	251	417
Pré-pubertal- H- 21d	783	700	1483
Pré-pubertal- H- 35d	1013	588	1601
Pré-pubertal- H- 50d	817	825	1642
Pré-pubertal- H- 100d	222	246	468

**Tabela 9-** Número de genes com aumento ou decréscimo de expressão devido à ação de TCDD em diferentes tratamentos e idades ( $p<0,01$ ). Maior efeito é observado com tratamento durante a gestação nos animais que completaram 100 dias, mas o tratamento pré-pubertal com alta dose tem maior efeito em diferentes idades.



**Figura 21-** Gráficos com o número de genes modificados pelo tratamento pré-natal (esquerda) e pré-pubertal (direita) em ratas com 21, 35, 50 e 100 dias. O maior número de genes afetados por TCDD foi com o tratamento pré-natal nos animais com 100 dias, no entanto, o tratamento pré-pubertal com maior dose mostrou atingir vários genes nas diferentes idades estudadas. **PN-** tratamento pré-natal, **PP-** tratamento pré-pubertal, **L-** baixa dose, **H-** alta dose e **21d, 35d, 50d** ou **100d-** idade em dias.

Alguns genes tiveram sua expressão modificada em quase todos os grupos. De fato, *Cyp1b1* (*cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1*) foi o gene mais modulado em diferentes idades, tendo aumento da expressão de duas a oito vezes em todas as idades que receberam TCDD durante a lactação.

Nenhum gene que foi modulado no tratamento pré-natal apresentou o efeito nas 4 idades estudadas, porém *Gad1* (*glutamic acid decarboxylase 1*) diminuiu seis vezes a expressão nos animais com 35 dias e manteve baixa expressão nas idades seguintes.

O tratamento pré-pubertal mostrou-se atingir de forma mais constante a expressão dos genes durante a vida das ratas, esse tratamento aumentou a expressão de *Cyp1b1* com ambas as doses, e adicionalmente afetou outros genes nas diferentes idades, principalmente naquelas ratas que foram tratadas com 20,0ng de TCDD/g. Com baixa dose, o gene *Creb3l1* (*cAMP responsive element binding protein 3-like 1*) teve a expressão diminuída pela metade ou mais nas diferentes idades.

Enquanto outros sete genes foram modulados em três das idades. O tratamento com maior dose provocou o aumento de expressão de quatro genes, Cyp1b1, Rarres1, Cdc73 e CK842253 em todas as idades, e outros 142 genes mostraram efeitos da TCDD em três idades estudadas, sendo que 44 genes tiveram aumento da expressão gênica e 12, diminuição. Isso demonstra que o efeito da dose de 20,0ng de TCDD/g é maior e uma vez atingidos, maior número de genes continuam modulados por TCDD durante o crescimento do animal.

### **3.3.4- Categorização dos Genes por Função Biológica**

Os genes considerados diferencialmente expressos em cada comparação ( $p < 0,01$ ) foram classificados de acordo com a função biológica, seguindo a categorização proposta pelo projeto Gene Ontology (GO). No total 244 termos GO foram considerados mais representados do que seria o esperado dentre os genes diferencialmente expressos ( $p < 0,01$ ). Apesar das ratas com 100 dias que receberam o tratamento pré-natal terem o maior número de genes afetados pela TCDD, este grupo não foi o que afetou o maior número de processos biológicos. O tratamento pré-pubertal com maior dose mostrou ser o grupo com mudanças mais significativas em diversos processos biológicos os quais foram consecutivamente afetados nas diferentes idades durante o desenvolvimento da glândula mamária. Isso demonstra que a TCDD tem uma ampla ação na glândula mamária sendo esta dependente do período em que o animal foi exposto, da dose administrada e da idade atual do animal.

Tabela 10- Número de processos biológicos super-representados dentre os genes diferencialmente expressos em cada condição

Tratamento e idade	Nº de processos biológicos
Pré-natal 21d	14
Pré-natal 35d	9
Pré-natal 50d	17
Pré-natal 100d	21
Pré-pubertal- L- 21d	33
Pré-pubertal- L- 35d	42
Pré-pubertal- L- 50d	24
Pré-pubertal- L- 100d	1
Pré-pubertal- H- 21d	75
Pré-pubertal- H- 35d	41
Pré-pubertal- H- 50d	48
Pré-pubertal- H- 100d	6

**Tabela 10-** Número de termos GO representando processos biológicos super-representados dentre os genes diferencialmente expressos em cada condição. Observa-se que o tratamento com alta dose durante o período pré-pubertal apresentou os maiores números de GO atingidos.

Os termos que apareceram mais representados dentre os genes diferencialmente expressos em cada condição foram: *aromatic compound metabolic process* (GO:0006725), *oxidoreduction coenzyme metabolic process* (GO:0006733), *acetyl-CoA metabolic process* (GO:0006084), *fatty acid metabolic process* (GO:0006631), *water-soluble vitamin metabolic process* (GO:0006767), *nicotinamide metabolic process* (GO:0006769), *monocarboxylic acid metabolic process* (GO:0032787) e *cofactor metabolic process* (GO:0051186).

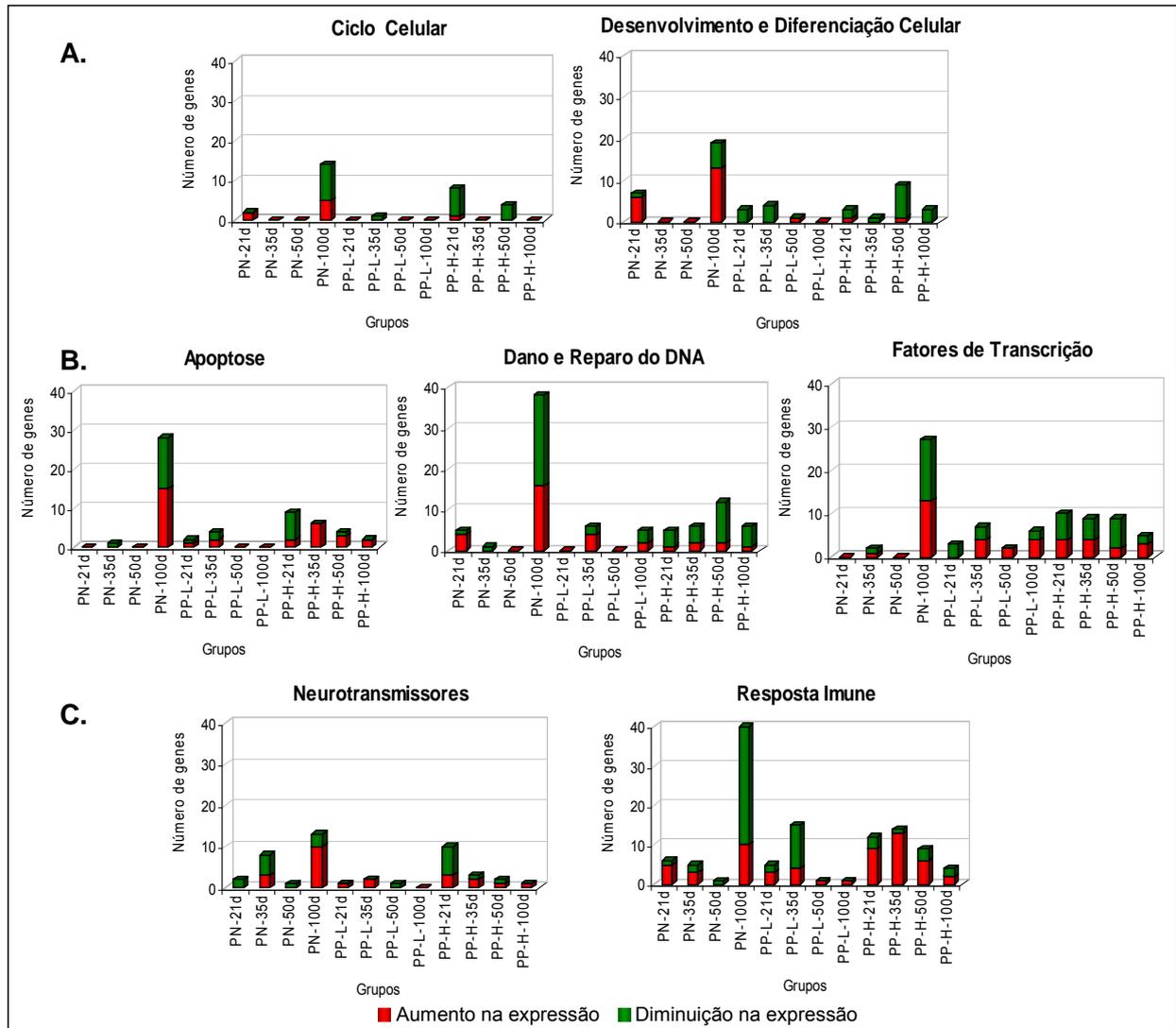
Devido às subcategorias disponíveis na classificação do projeto Gene Ontology, genes pertencentes a processos biológicos similares são classificados em termos GO diferentes, conseqüentemente, quando comparamos apenas o número de identificação dos termos, essas funções similares são consideradas diferentes. Para evitarmos essa subdivisão, agrupamos os termos em diferentes classes, mais amplas, para uma análise mais detalhada das funções e avaliação de como estas estão se comportando em cada condição. Os genes diferencialmente expressos foram divididos em:

- Apoptose,
- Ciclo celular,

- Dano e reparo do DNA,
- Desenvolvimento e diferenciação celular,
- Fatores de transcrição,
- Genes supressores de tumor,
- Metabolismo de lipídeos,
- Neurotransmissores,
- Proto-oncogenes,
- Resposta imune.

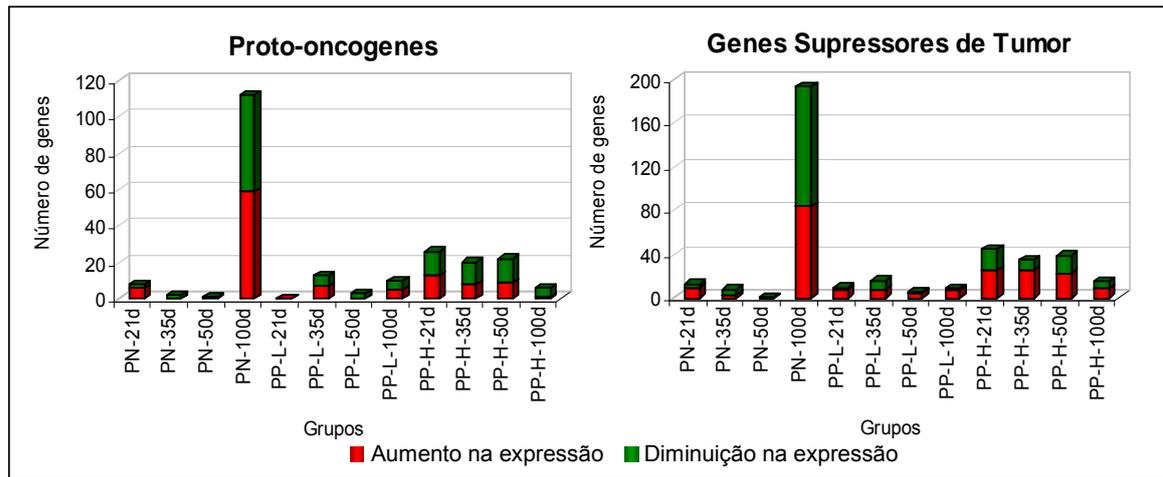
Em nove dos dez grupos de genes estudados, observamos que o maior número de genes afetados foi nos animais com 100 dias que receberam o tratamento durante o período gestacional (figura 22).

Não foi grande o número de genes relacionados com ciclo celular, desenvolvimento e diferenciação celular que foram modulados por TCDD, porém dentre os genes afetados, encontramos principalmente a diminuição da expressão. Alguns desses genes foram *Cdk10* (*cyclin-dependent kinase 10*), essencial na progressão do ciclo celular, *Mdm2* (*Mdm2 p53 binding protein homolog*), o qual inibe a atividade da p53 e *Wnt4* (*wingless-type MMTV integration site family, member 4*) (figura 22A). Genes relacionados com apoptose, dano e reparo do DNA, e fatores de transcrição mostraram ser mais afetados com o tratamento pré-pubertal, principalmente quando a dose mais alta foi administrada (figura 22B). Analisando os genes relacionados com neurotransmissão ou resposta imune observamos que TCDD teve uma ação que não se restringiu a alguns grupos específicos, ou seja, tanto o tratamento pré-natal como o pré-pubertal afetaram genes pertencentes a esses grupos, não obstante os efeitos foram observados em vários pontos durante o desenvolvimento da rata (figura 22C).



**Figura 22-** Histogramas demonstrando o número de genes em diferentes categorias que foram desregulados pela ação da TCDD nas diferentes condições estudadas. Barras em verde indicam o número de genes que sofreram inibição da expressão e barras em vermelho indicam aumento na expressão comparando-se aos respectivos controles. **PN-** tratamento pré-natal, **PP-** tratamento pré-pubertal, **L-** baixa dose, **H-** alta dose e **21d, 35d, 50d** ou **100d-** idade em dias.

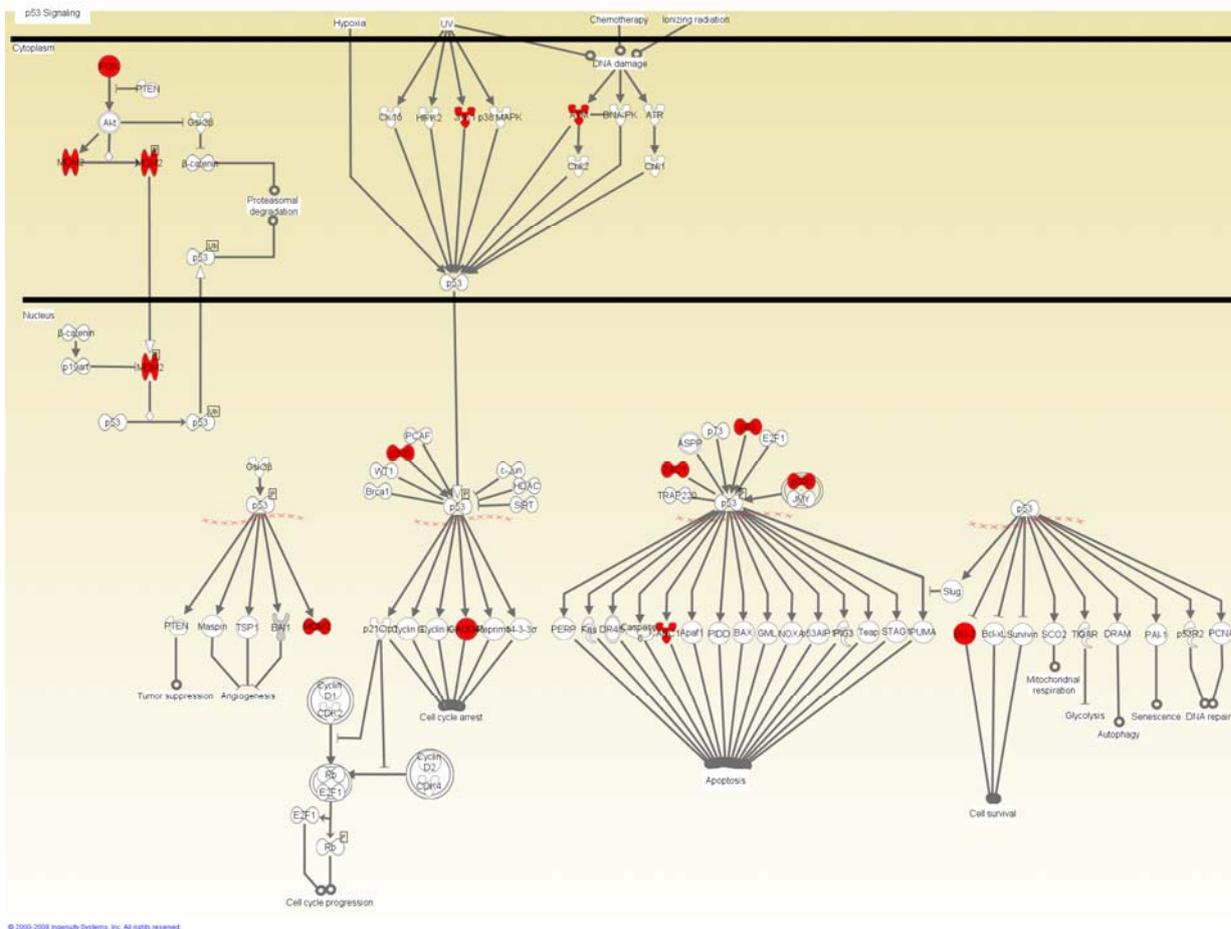
Dentre os genes diferencialmente expressos encontramos vários deles relacionados com câncer. Esses genes foram classificados como proto-oncogenes e genes supressores de tumor (figura 23).



**Figura 23-** Histogramas demonstrando o número de genes classificados como proto-oncogenes (esquerda) ou genes supressores de tumor (direita) que foram modulados pela ação da TCDD nas diferentes condições estudadas. Barras em verde indicam o número de genes que sofreram diminuição da expressão e barras em vermelho indicam aumento na expressão comparando-se aos respectivos controles. **PN-** tratamento pré-natal, **PP-** tratamento pré-pubertal, **L-** baixa dose, **H-** alta dose e **21d, 35d, 50d** ou **100d-** idade em dias.

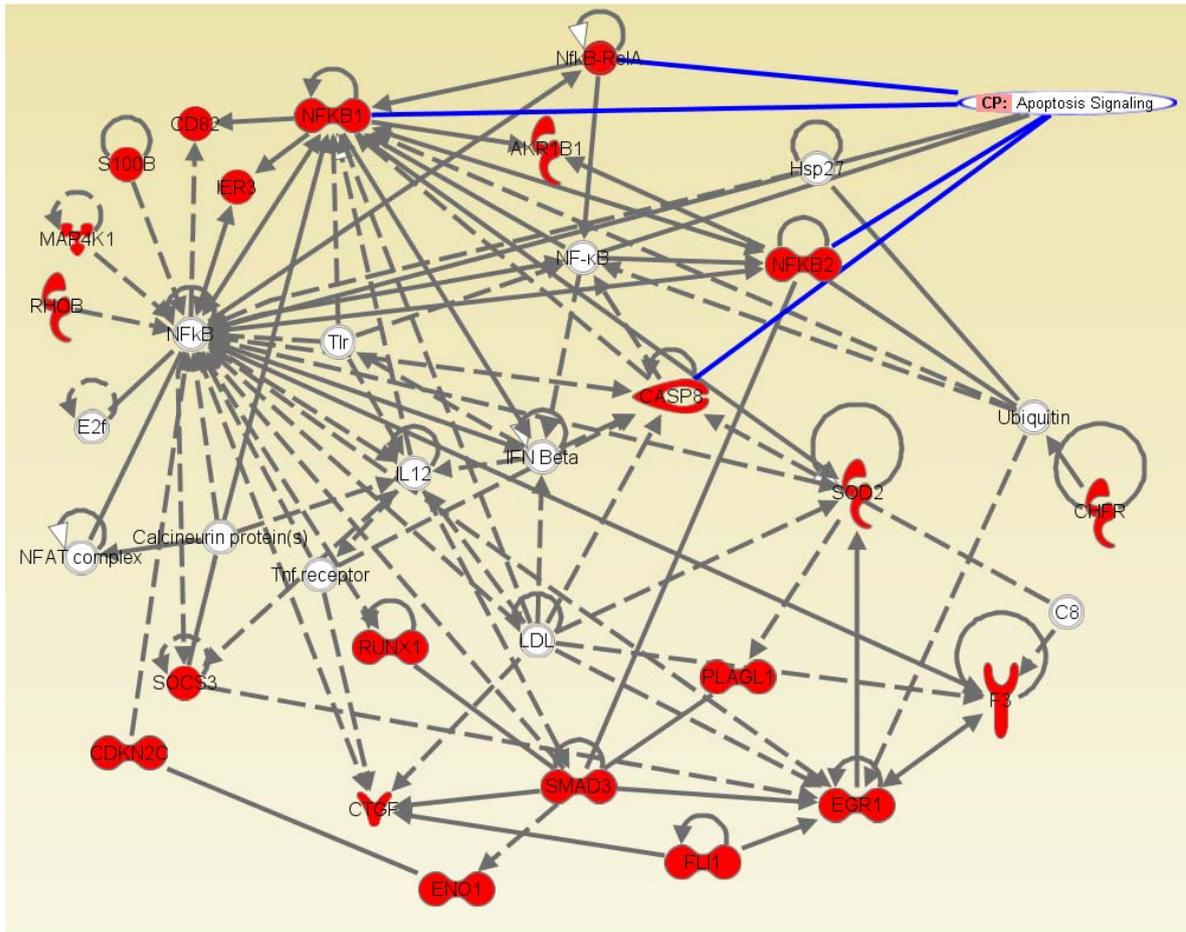
O principal efeito da TCDD nos genes conhecidos como supressores de tumor foi o aumento da expressão, especialmente no tratamento com maior dose realizado durante a lactação. Em média, os animais mais jovens tiveram a ativação de 25 genes. Ainda com este mesmo tratamento, os animais com 21 dias também tiveram a inibição de 20 genes. 193 genes foram desregulados (84 aumento e 109 diminuição) nos animais com 100 dias que receberam o tratamento pré-natal (anexo 2).

Devido ao grande número de genes que tiveram aumento de transcrição, estes foram analisados de acordo com as vias de sinalização que pertencem. A via de sinalização da p53 teve maior correlação ( $p < 0,001$ ) entre os genes analisados e as vias canônicas sendo que a expressão de 11 genes de 87 do total pertencente a esta via foi aumentada (figura 24).



**Figura 24-** Via canônica de sinalização da proteína p53, super-expressa entre os genes supressores de tumor. Genes supressores de tumor que tiveram expressão aumentada de acordo com a análise dos *microarrays* estão representados em vermelho (imagem gerada através da ferramenta Path Designer do programa Ingenuity Pathways Analysis).

Adicionalmente, os genes analisados formaram oito redes, mostrando a relação entre eles. A rede com menor valor de p ( $p=1 \times 10^{-39}$ ) está relacionada principalmente com câncer, morte celular, crescimento e proliferação. Na figura 25, podemos observar alguns dos genes que tiveram a expressão aumentada e fazem parte da via de sinalização da apoptose.

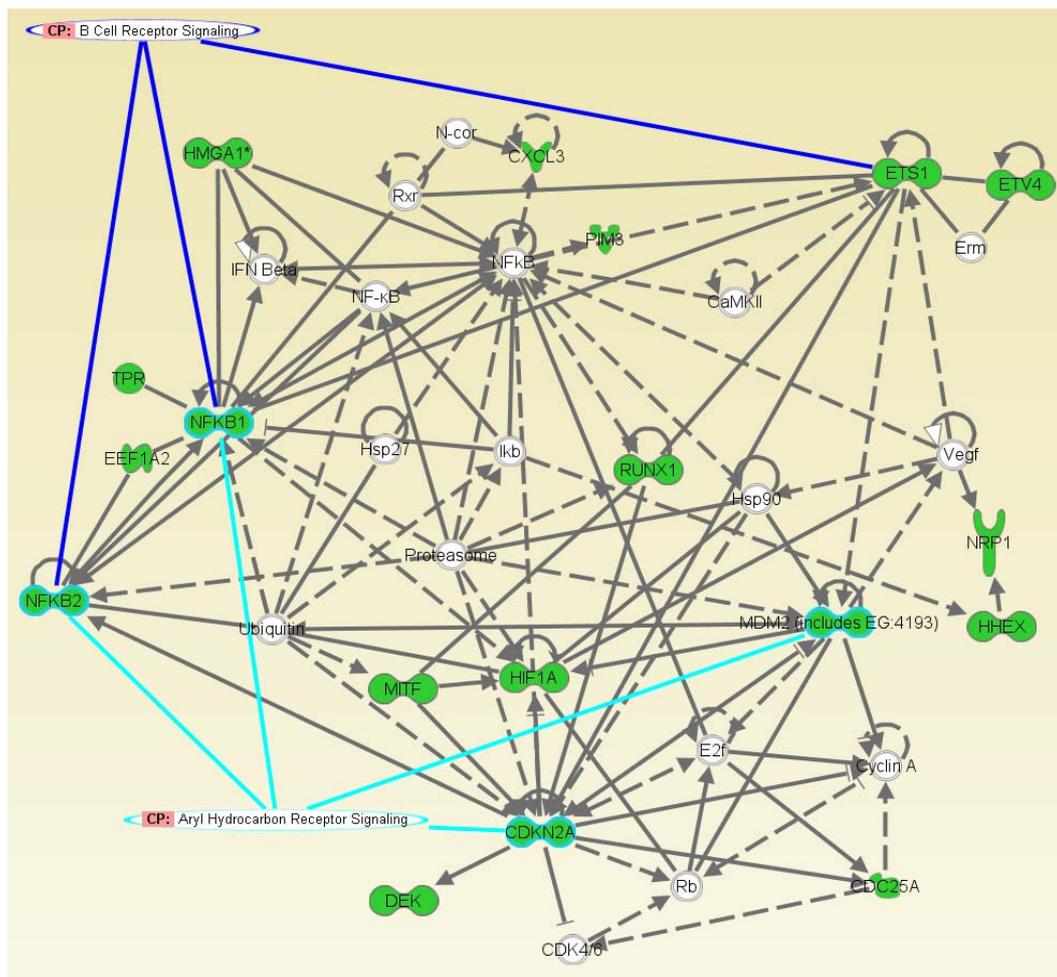


© 2000-2008 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

**Figura 25-** Rede formada pelos genes supressores de tumor que tiveram aumento de expressão. As moléculas em vermelho pertencem ao grupo de genes que tiveram a expressão aumentada e foram analisadas. As moléculas em branco complementam a rede dos genes analisados. As linhas em azul apontam as moléculas que fazem parte da via de sinalização da apoptose e foram moduladas (imagem gerada através da ferramenta Path Designer do programa Ingenuity Pathways Analysis).

Uma grande quantidade de proto-oncogenes foram modulados pela dioxina. O maior número de oncogenes regulados foi observado nos animais com 100 dias de idade que receberam o tratamento intra-uterinamente, na qual 59 genes tiveram aumento e 53 tiveram diminuição de expressão. O tratamento durante a lactação atingiu diferentes genes com diferentes doses e diversas idades, com maior efeito após o tratamento a dose de 20ng de TCDD/g. Nesta condição, os animais mais novos tiveram em média 23 genes desregulados (figura 23).

Ao analisarmos as vias de sinalização as quais os genes que tiveram menor expressão pertencem, concluímos que estes genes estão atuando principalmente nas vias de sinalização de interleucina 8 e do receptor da célula B ( $p < 0,001$ ). Ao estudarmos a relação entre esses genes, encontramos que uma rede de 35 moléculas (18 que tiveram expressão diminuída) foi formada, e esta é relacionada principalmente com câncer e morfologia da célula. Observamos nesta rede alguns genes pertencentes às vias de sinalização do receptor de aril-hidrocarbono e receptor da célula B (figura 26).

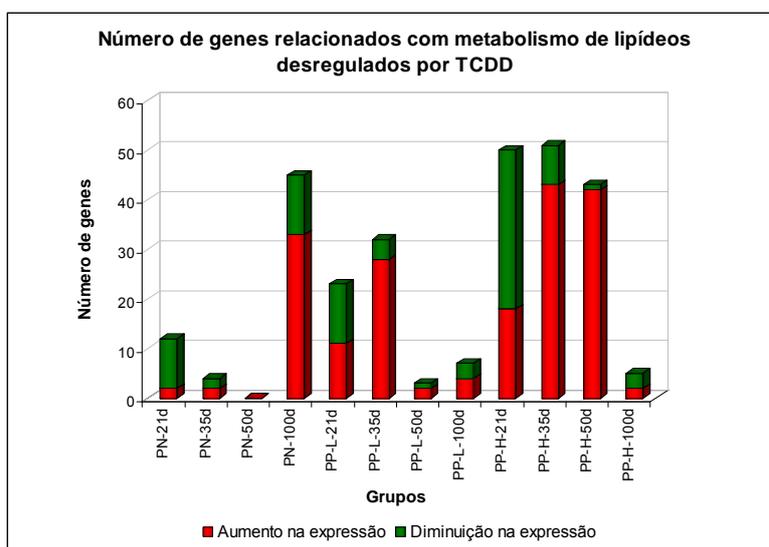


© 2000-2008 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

**Figura 26-** Rede formada pelos proto-oncogenes com menor expressão. As moléculas em verde pertencem ao grupo de genes que tiveram declínio da expressão e foram analisadas. As moléculas em branco complementam a rede dos genes analisados. As linhas em azul claro indicam as moléculas que fazem parte da via de sinalização do receptor de aril hidrocarbono e foram moduladas e as linhas em azul escuro indicam os genes modulados que fazem parte da via de sinalização do receptor da célula B (imagem gerada através da ferramenta Path Designer do programa Ingenuity Pathways Analysis).

O grupo que mais extensivamente foi afetado por TCDD foram os genes relacionados com metabolismo de lipídeos (figura 27 e anexo 3). Quando o químico foi dado aos animais durante a vida intra-uterina, houve o decréscimo de transcrição de alguns genes aos 21 dias de idade. Animais com 35 e 50 dias foram pouco ou não afetados por TCDD, porém, animais com 100 dias tiveram 45 genes afetados. O tratamento durante a lactação, teve maior impacto neste grupo de genes. Aos 21 dias de idade, o tratamento pré-pubertal com ambas as doses teve efeito similar, regulando vários genes em comum, porém, a maior dose teve efeito no dobro de genes. Comportamento similar observamos nos animais com 35 dias, no qual baixa e alta dose regularam os mesmos genes. Com a dose baixa, não detectamos muitas mudanças nas idades subsequentes, enquanto a dose alta de TCDD manteve a alta expressão de alguns dos genes atingidos aos 35 dias e causou aumento da transcrição de outros, totalizando 42 genes nos animais com 50 dias (figura 27).

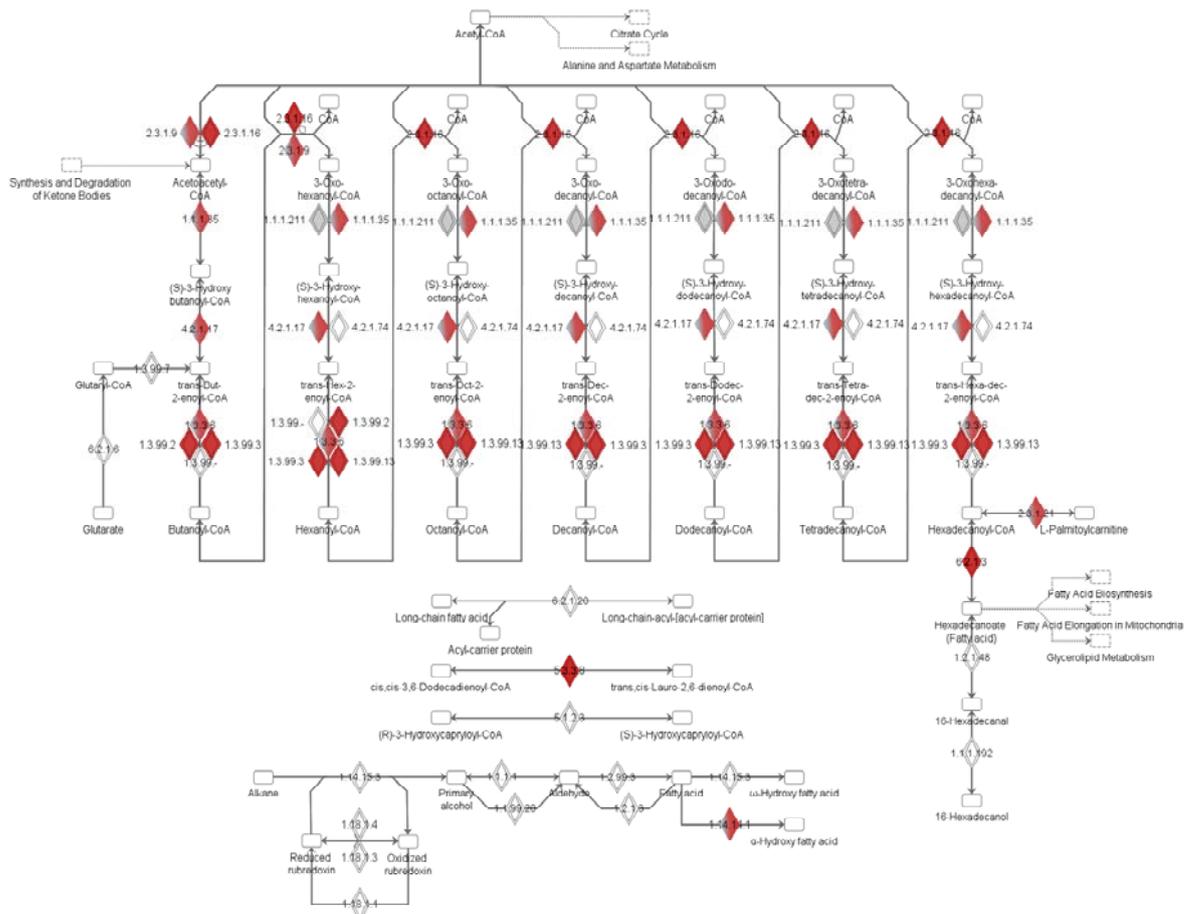
Alguns dos genes pertencentes a este grupo foram Cyp1b1 e Elovl6, os genes encontrados mais constantemente modulados pelos tratamentos. E outros como Fasn (*fatty acid synthase*), Insig 1 (*insulin induced gene1*) que foi demonstrado ter papel na homeostase do colesterol intracelular e Pparg (*peroxime proliferator activated receptor gamma*) envolvido na diferenciação de adipócitos.



**Figura 27-** Número de genes relacionados com o metabolismo de lipídeos que sofreram aumento ou diminuição na expressão em cada uma das condições. Verde indica inibição da expressão e vermelhos indica aumento na expressão comparando-se aos respectivos controles. **PN-** tratamento pré-natal; **PP-** tratamento pré-pubertal; **L-** baixa dose; **H-** alta dose e **21d, 35d, 50d** ou **100d-** idade em dias.

Ao analisarmos esses genes de acordo com as vias canônicas as quais pertencem, esses genes foram correlacionados com vias metabólicas como via de metabolismo de ácidos graxos (figura 28), metabolismo de betanoato, degradação de valina, leucina e isoleucina e biossíntese de esteróides entre outros.

Fatty Acid Metabolism



© 2009 Pathway Solutions Inc. Distribution of Curated Data under license from Pathway Solutions Inc. All rights reserved.

**Figura 28-** Via canônica do metabolismo de ácidos graxos. Formas em vermelho representam genes que tiveram aumento da expressão devido ao tratamento pré-pubertal com alta dose de TCDD nos animais com 35 dias. Formas em cinza representam genes que foram regulados por TCDD em outras condições e genes em branco não sofrem ação da TCDD (imagem gerada através do programa Ingenuity Pathways Analysis).

### 3.3.5- Vias canônicas metabólicas e de sinalização dos genes

Ao estudarmos as vias canônicas metabólicas e de sinalização, encontramos que o maior número de vias atingidas foi aos 100 dias de idade, após o tratamento pré-natal. Porém o tratamento com alta dose durante a amamentação atingiu mais vias em diferentes idades (tabela 11).

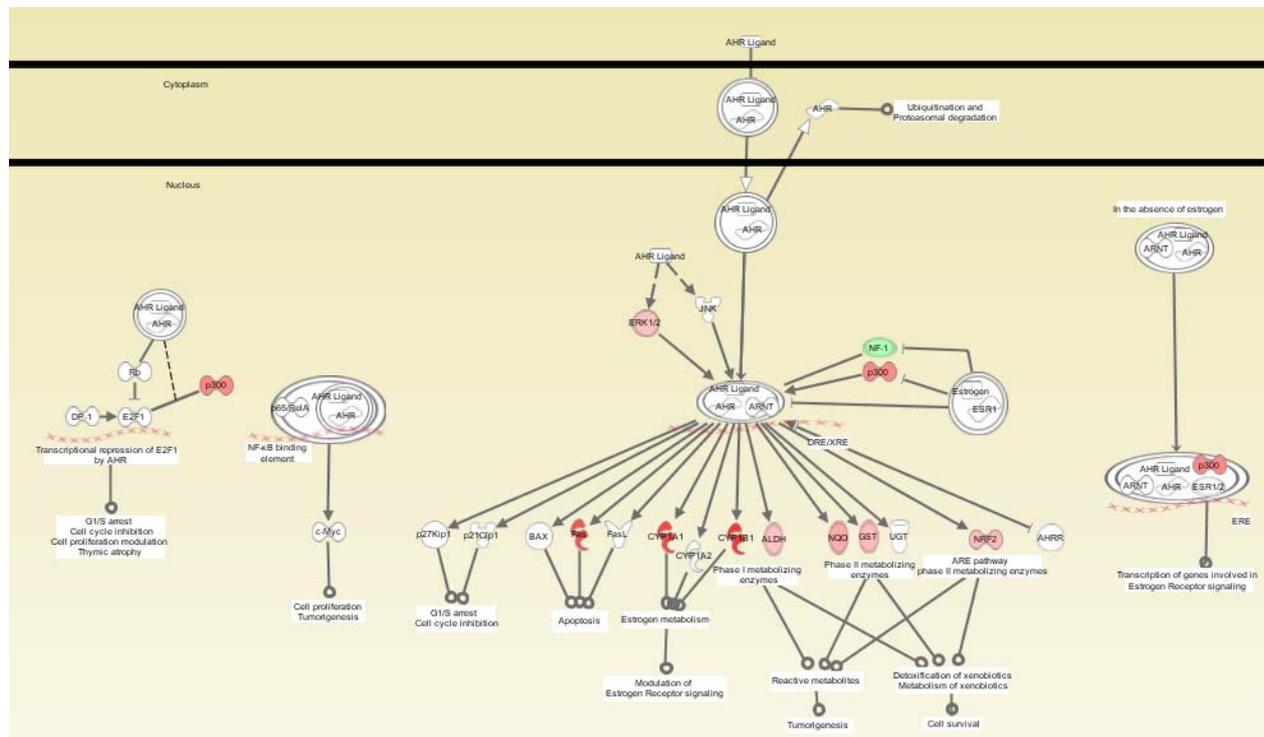
Tabela 11- Número de vias canônicas consideradas mais representadas dentre os genes encontrados diferencialmente expressos em cada condição

Tratamento e idade	Nº de vias canônicas
Pré-natal 21d	5
Pré-natal 35d	1
Pré-natal 50d	3
Pré-natal 100d	59
Pré-pubertal- L- 21d	13
Pré-pubertal- L- 35d	10
Pré-pubertal- L- 50d	0
Pré-pubertal- L- 100d	0
Pré-pubertal- H- 21d	41
Pré-pubertal- H- 35d	18
Pré-pubertal- H- 50d	29
Pré-pubertal- H- 100d	1

**Tabela 11-** Número de vias canônicas super-representadas dentre os genes diferencialmente expressos em cada condição. O maior número de vias correlacionado com a lista de genes diferencialmente expressos foi encontrado com o tratamento pré-natal nos animais com 100 dias.

A via que foi encontrada mais constantemente afetada pela TCDD foi a via de sinalização do receptor de aril-hidrocarbono (AhR), modulada com o tratamento pré-pubertal com baixa dose nos animais com 21 e 35 dias e com alta dose nos animais de 21, 35 e 50 dias de idade, sendo que o efeito nesta idade foi o mais acentuado (figura 29). Outras vias que foram significativamente correlacionadas ( $p < 0,01$ ) com as listas de genes diferencialmente expressos nas diferentes condições foram resposta a estresse oxidativo mediado por NRF2 (anexo 4), vias de metabolismo de ácidos graxos, propanoato, piruvato, glicerofosfolipídeos, xenobióticos, entre outros,

porém, a maioria das vias canônicas encontradas foram específicas para cada condição.



**Figura 29-** Parte da via canônica de sinalização do receptor de aril-hidrocarbono. Nesta figura está representada a regulação gênica sofrida pelos animais com 50 dias de idade que receberam 20ng de TCDD/g no período pré-pubertal. Genes em verde representam menor expressão do que no grupo controle e vermelho, maior expressão (imagem gerada através da ferramenta Path Designer do programa Ingenuity Pathways Analysis).

Uma vez que a expressão de dois importantes participantes da biossíntese e metabolização do estradiol (Cyp1a1 and Cyp 1b1) apresentaram expressão aumentada após o tratamento lactacional, analisamos também o comportamento dos demais genes participantes desta via (tabela 12) .

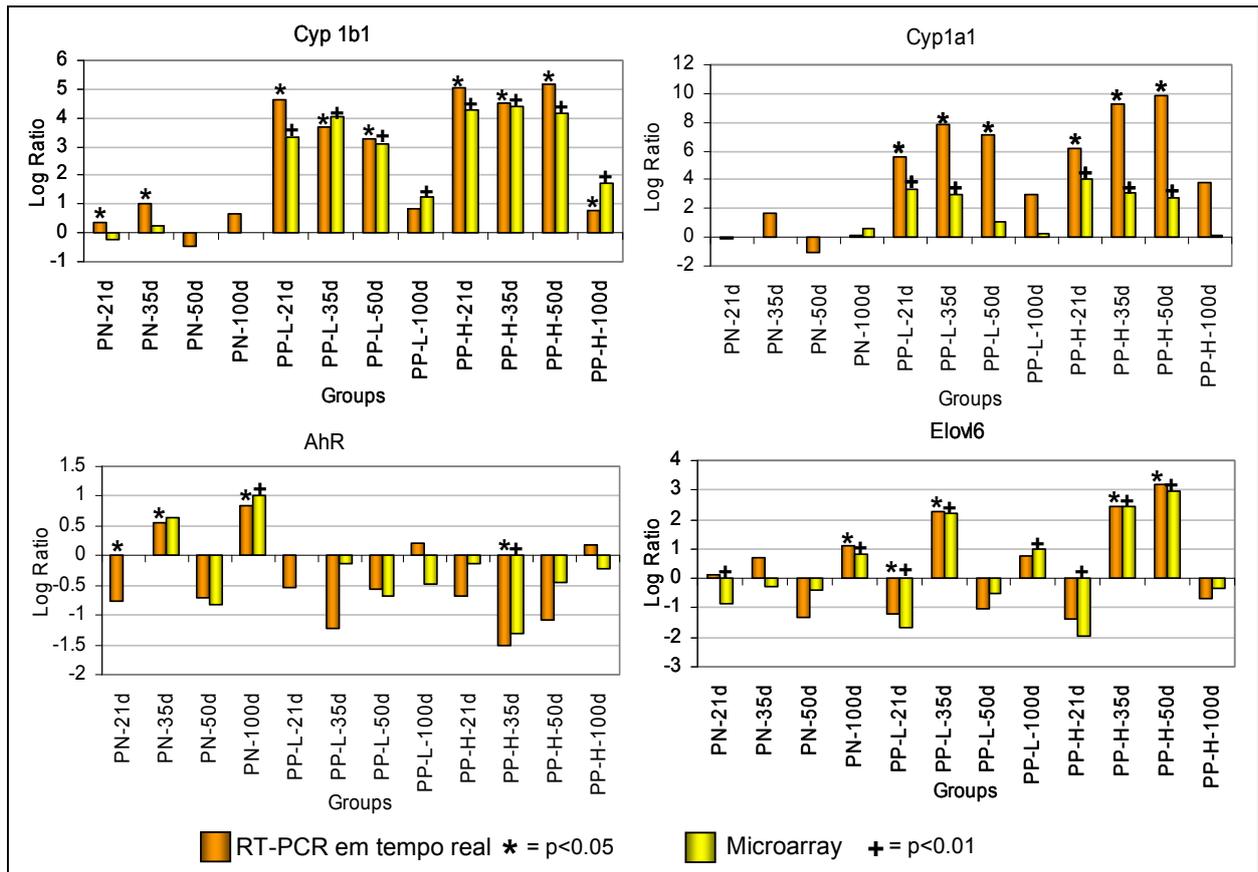
Tabela 12- Expressão relativa dos genes envolvidos no metabolismo do estradiol

GeneSymbol	PN-35d	PN-100d	PP-L-21d	PP-L-35d	PP-L-50d	PP-L-100d	PP-H-21d	PP-H-35d	PP-H-50d	PP-H-100d
Cyp11a1	1,0	<b>1,4</b>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Cyp17a1	1,0	<b>2,1</b>	1,0	1,0	1,0	1,0	<b>3,7</b>	1,0	1,0	1,0
Hsd17b12	<b>0,6</b>	1,0	1,0	<b>2,9</b>	1,0	1,0	1,0	<b>3,7</b>	<b>7,7</b>	1,0
Hsd17b3	1,0	<b>1,5</b>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Hsd17b4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	<b>1,6</b>	1,0	1,0
Hsd17b7	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	<b>0,5</b>	1,0	<b>2,2</b>	1,0
Hsd17b7	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	<b>3,5</b>	1,0
Hsd17b8	1,0	<b>0,7</b>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Cyp1a1	1,0	1,0	<b>10,2</b>	<b>8,0</b>	1,0	1,0	<b>15,9</b>	<b>8,5</b>	<b>6,9</b>	1,0
Cyp1b1	1,0	1,0	<b>10,2</b>	<b>16,6</b>	<b>8,4</b>	<b>2,4</b>	<b>19,6</b>	<b>21,1</b>	<b>18,1</b>	<b>3,3</b>
Comtd1_predicted	1,0	<b>1,1</b>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Gstm1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	<b>2,0</b>	1,0
Gstp1	1,0	<b>0,5</b>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Gstt1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	<b>1,7</b>	1,0	1,0
Sod1	1,0	<b>0,8</b>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	<b>1,8</b>	<b>1,8</b>	1,0
Sod2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	<b>1,9</b>	1,0	1,0
Sod3	1,0	1,0	1,0	<b>1,7</b>	1,0	1,0	1,0	<b>1,8</b>	<b>2,8</b>	1,0

**Tabela 12-** Genes envolvidos no metabolismo do estradiol e suas expressões relativas nos diferentes grupos comparadas com os respectivos controles.

### 3.3.6- Validação por RT-PCR em tempo real

Quatro genes identificados nos *microarrays* como diferencialmente expressos em diferentes grupos foram utilizados para RT-PCR em tempo real para a validação dos resultados (figura 30). Observamos que os genes Cyp1b1 e Cyp1a1 sofreram aumento da expressão com o tratamento durante o período lactacional. Elov16 também confirmou os resultados encontrados nos *microarrays* e apresentou menor expressão nos animais com 21 dias, após o tratamento pré-pubertal e aumento da expressão nos animais com 35 com baixa e alta dose, e 50 dias alta dose. Apesar de TCDD agir no AhR, não observamos muitas alterações estatisticamente significantes na expressão gênica deste receptor nos *microarrays* ou nos RT-PCRs em tempo real.



**Figura 30-** Expressões relativas dos genes ( $\log_2$ ) medidas através de RT-PCR em tempo real e *microarrays*. Barras em laranja apresentam os resultados obtidos através do RT-PCR em tempo real, (\*) indicam diferença estatisticamente significativa entre a amostra experimental e controle através do RT-PCR em tempo real ( $p < 0.05$ ), enquanto as barras em amarelo representam os resultados dos *microarrays* e (+) indicam diferença estatisticamente significativa entre a amostra experimental e controle nos *microarrays* ( $p < 0.01$ ).

## *4- DISCUSSÃO*



## 4- DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos os efeitos das exposições, intra-útero e durante a lactação, a um contaminante altamente distribuído no meio ambiente, a 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), e seus efeitos sobre o desenvolvimento da glândula mamária de ratas. Trata-se do primeiro estudo na literatura que analisou os efeitos da TCDD, na glândula mamária, utilizando-se de ensaio de expressão gênica global. Nossos resultados revelam uma importante ação da TCDD nesse órgão, em especial, no que tange à indução tônica da expressão de genes envolvidos na metabolização de esteróides sexuais e consequente acúmulo de radicais livres, bem como no estímulo à expressão de genes envolvidos em supressão do crescimento tumoral e reparo de DNA. Quando analisados em conjunto, esses resultados nos sugerem, fortemente, que a exposição, muito precoce, a TCDD constitui-se em fator genotóxico importante e os resultados obtidos aqui representam a resposta da glândula mamária no sentido de manter seu genoma estável. De fato, este composto é a mais tóxica dioxina e é conhecida por causar prejuízos a saúde de diferentes espécies, além de interferir no desenvolvimento de animais quando administrada em momentos específicos da vida. Estudos anteriores têm demonstrado que a exposição de ratas, intra-uterinamente, à TCDD pode causar alterações morfológicas e funcionais no aparelho reprodutor (Gray and Ostby 1995; Gray, Wolf et al. 1997), além alterar o desenvolvimento da glândula mamária (Brown and Lamartiniere 1995; Brown, Manziolillo et al. 1998).

No presente trabalho, observou-se que TCDD causa alterações na proliferação celular e expressão gênica da glândula mamária das ratas Sprague-Dawley após a administração desse agente químico durante a formação do feto (período pré-natal) ou mesmo durante o desenvolvimento desse órgão (período pré-pubertal). Os nossos resultados sugerem também que a administração durante o período pré-pubertal mostrou ser a mais crítica e aquela que mais alterações causa dos pontos-de-vista molecular e de proliferação.

No que tange à exposição diária, sabe-se que o maior contato com esta dioxina, dá-se quando da ingestão de alimentos contaminados em especial naqueles ricos em gordura, como o leite, devido ao fato da TCDD ser altamente lipossolúvel; todavia, a exposição pode ocorrer também por intermédio da inalação ou contato com a pele. Estimativas de exposição a esse poluente são um desafio. De Vito encontrou concentração média básica de 13ng TEQ/kg de massa corpórea em adultos nos Estados Unidos enquanto que populações mais expostas podem alcançar cifras de 96 a 7000 ng TEQ/kg (DeVito, Birnbaum et al. 1995).

Neste estudo não medimos as concentrações de TCDD que chegaram aos filhotes após a exposição durante os diferentes períodos da vida, entretanto, baseando-se em estudos realizados por Hurst (Hurst, DeVito et al. 2000) and Chen (Chen, Hamm et al. 2001) os quais analisaram quanto de TCDD atinge o feto após o tratamento desses animais no 15º dia de gestação, estimamos as doses que chegaram aos filhotes neste trabalho.

O trabalho de Hurst (Hurst, DeVito et al. 2000) demonstra que aproximadamente 0,013% da dose/g chegam ao feto no 21º de gestação quando 1µg de TCDD/kg é administrada à rata prenha. Em nosso trabalho, com a dose de 3µg de TCDD/kg, as ratas grávidas receberam em torno de 750ng de TCDD, considerando-se que 0,013% da dose/g seria a porcentagem da dose na prole no dia do nascimento, estima-se que a prole, em nosso estudo, recebeu em torno de 0,10ng/g. Para calcular a exposição pré-pubertal não foi possível encontrar nenhum trabalho na literatura com um modelo similar ao apresentado neste estudo, então nos baseamos no trabalho de Chen (Chen, Hamm et al. 2001), que com o tratamento intra-uterino, calculou que 0,12% da dose/g atingia os filhotes no quarto dia após o nascimento através do aleitamento. Deste modo, estima-se que 3,2 ng/g e 9,6 ng/g são quantidades aproximadas das recebidas pelos animais através da lactação. Cabe aqui ressaltar, entretanto, que a exposição sofrida pela prole em nosso trabalho foi exclusivamente através da lactação, fator esse que pode influenciar a porcentagem da dose encontrada na prole.

Estudos têm demonstrado que em animais a indução de câncer pode ocorrer em concentração corporal de 944-137.000 ng TCDD/kg e outros efeitos

podem ser observados com 10-12500 ng TCDD/kg. Adicionalmente, informações em humanos demonstram que alguns efeitos da TCDD podem ser observados com concentrações corporal de 2 a 3 vezes a encontrada na população geral (DeVito, Birnbaum et al. 1995).

No presente trabalho, o primeiro efeito observado foi a diminuição do peso dos animais expostos intra-útero. A queda do peso foi mais acentuada nas ratas com 35 e 50 dias de idade. O tratamento pré-pubertal mostrou-se afetar mais o peso das ratas, principalmente com maior dose. Aos 100 dias, os animais que receberam quaisquer tratamentos voltaram a obter o peso similar aos grupos que receberam óleo de gergelim. Essa perda de peso, é comumente observada em animais que receberam tratamento com TCDD (Whitsett Jr., Kalia et al. 2008), e também é observado em recém-nascidos de mães com aumento dos níveis de dioxinas (Hurst, DeVito et al. 2000). Acredita-se que a diminuição do apetite é o responsável pela perda de peso através do efeito direto de TCDD em áreas do encéfalo que controlam o apetite (Stahl and Rozman 1990).

No estudo de proliferação celular não foi encontrado nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os animais tratados com TCDD ou com óleo de gergelim durante o período intra-uterino. Isso também se refletiu no aspecto genético uma vez que não se observou aumento da atividade de genes envolvidos no ciclo celular neste grupo de estudo. Esses resultados estão de acordo com Brown, que também não observou diferenças estatisticamente significantes na proliferação celular após o tratamento pré-natal (Brown, Manzollillo et al. 1998).

Ao contrário do tratamento pré-natal, o tratamento realizado durante a lactação do animal causou alterações da proliferação celular nas glândulas mamárias das ratas ao atingirem 35, 50 e 100 dias. A proliferação nos TEBs, estruturas menos desenvolvidas da glândula mamária e com maior proliferação, diminuíram com o tratamento em maior dose nos animais com 35 e 50 dias, porém, com 100 dias, idade na qual a proliferação dessas estruturas deveria diminuir, a proliferação manteve-se nos mesmos índices observados nos animais mais jovens. Ou seja, com a exposição à TCDD, disparou-se um gatilho proliferativo tônico na glândula mamária. Resultados semelhantes também foram observados por Brown em animais com 32 dias, após o

tratamento com TCDD após o desmame (Brown and Lamartiniere 1995). É importante observar o comportamento dos TEBs nas glândulas mamárias uma vez que por serem as estruturas menos desenvolvidas, são as mais suscetíveis a neoplasias (Russo, Tait et al. 1983).

No estudo de expressão gênica, consideramos diferencialmente expressos os genes que tiveram o valor de  $p$  menor que 0,01. Ao utilizarmos a correção para múltiplos testes com o objetivo de controlar o número de falso positivos, o número de genes considerados diferencialmente expressos em várias listas foi igual a zero. Durante a análise de *microarrays*, um teste  $t$  é realizado para cada gene, aumentando o número de falso positivos. O valor de  $p$  igual a 0,01 significa que há 1% de chances que um gene seja considerado diferencialmente expresso por acaso, neste experimento, as lâminas possuem aproximadamente 20.000 oligos, ou seja, com o  $p=0,01$ , 200 genes podem ter sido considerados diferencialmente expressos ao acaso. Com o teste de Benjamini and Hochberg (Benjamini and Hochberg 1995), utilizado para o cálculo do FDR, este valor de  $p$  é ajustado, e é possível controlar o número de falso positivos, entretanto, com a diminuição de falsos positivos também se aumenta o número de falsos negativos. Por este experimento ter um caráter exploratório, a utilização do valor de  $p<0,01$  é aceitável como limite para se determinar se um gene foi diferencialmente expresso devido à TCDD.

Não foram observadas muitas alterações na expressão gênica nos animais com 21, 35 e 50 dias de idade que receberam o tratamento durante a gestação, entretanto, nesses mesmos animais, o número máximo de genes alterados deu-se aos 100 dias de idade. Isso nos sugere que os efeitos da TCDD podem ser tardios mostrando-se importantes apenas após um longo período de vida. De modo semelhante, um outro disruptor endócrino, o Bisfenol A (BPA), utilizado na fabricação de plásticos, induziu um maior número de genes diferencialmente expressos apenas em animais com 100 dias de idade (Moral, Wang et al. 2008).

O tratamento que mostrou modificar, mais amplamente, a expressão gênica da glândula mamária durante o desenvolvimento dos animais, foi o tratamento realizado com 20ng de TCDD/kg durante a lactação. Este tratamento, não só atingiu um grande número de genes, mas também determinou que esses genes

permanecessem constantemente modulados em diferentes idades. O maior efeito com o tratamento pré-pubertal pode ser explicado pelo fato de que a transferência de TCDD à prole é maior através do leite materno (Chen, Hamm et al. 2001), período no qual há um decréscimo acentuado das quantidades de TCDD no corpo da mãe (Hurst, DeVito et al. 2000).

O grande número de processos biológicos encontrados correlacionados com as diferentes listas de genes diferencialmente expressos nas diferentes condições é um indicativo de que TCDD tem uma ação ampla na expressão gênica da glândula mamária, e o fato desses processos biológicos serem classificados de formas diferentes, demonstram que não só TCDD tem uma ação ampla, mas também esta ação é dependente da época de exposição, da dose e da idade em que este efeito é estudado.

A ação de TCDD se dá através da via de sinalização do AHR e isso explica a grande dimensão de efeitos observados por esta dioxina. A via de sinalização do AHR está envolvida em diversas ações no organismo. Sua presença em diferentes tecidos e até mesmo em diferentes espécies mostra que esta via de sinalização não é importante apenas na resposta a xenobióticos e dioxinas, mas também determina modificações importantes em funções fisiológicas, como controle do ciclo celular, diferenciação e ciclo circadiano. Sua presença em embriões e teratogenicidade da TCDD indicam o papel deste receptor na organogênese e desenvolvimento, sinalização de moléculas como os hormônios esteróides, tiroxinas e neurotransmissores (Bock and Kohle 2006).

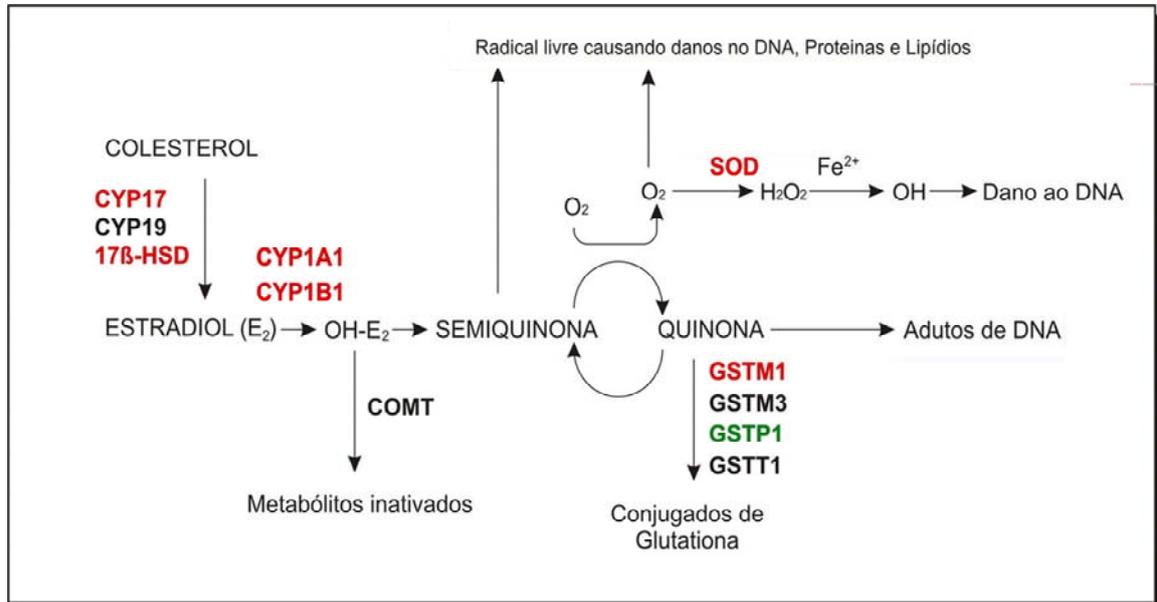
Nossos resultados comprovaram a modulação da via de sinalização do AHR causado por TCDD, sendo que esta foi a via de sinalização mais constantemente atingida pela dioxina. A ativação desta é principalmente dependente da ligação do agonista no seu receptor, apesar de algumas poucas evidências do contrário (Mitchell and Elferink 2008). Observamos que esta via está principalmente sendo modulada nos animais que receberam o tratamento pré-pubertal o que pode ser uma indicação que o composto ainda esteja presente no organismo das ratas. Ainda, os resultados demonstraram que apesar de não estatisticamente significativa, houve diminuição na expressão do AHR nas mesmas idades nas quais a via de ação

encontrou-se mais ativada. Isso está de acordo com estudos que demonstram que a ativação prolongada desta via aumenta a degradação deste receptor, ao contrário do que acontece em curtos períodos de exposição. Esse mecanismo de tentativa de bloquear ativações prolongadas deste receptor pode ser uma indicação que a permanente ativação dessa via pode ser prejudicial para o organismo (Mitchell and Elferink 2008).

Em resposta à ação sobre a via de sinalização do AHR, encontramos o aumento da expressão, de modo tônico ao longo de todos os grupos de estudo, dos genes *Cyp1b1* e *Cyp1a1*. As enzimas codificadas por estes genes são responsáveis não só pela metabolização de xenobióticos, mas também metabolização de hormônios esteróides como o estradiol. Nossos resultados demonstraram que a via de biossíntese e metabolização do estradiol não só está sendo modificada através do aumento da expressão gênica dessas enzimas, mas também com alteração na expressão de outros importantes genes.

De fato, genes como *Cyp17*, *Cyp11a* e 17  $\beta$ -desidrogenase que codificam enzimas que facilitam a transformação do colesterol em esteróides tiveram expressão aumentada em nosso estudo. *Cyp1b1* e *Cyp1a1*, genes encontrados super expressos em várias idades depois do tratamento durante a lactação, produzem enzimas responsáveis pela hidroxilação do estradiol, produzindo 2 ou 4-hidroxiestradiol. Estes metabólitos, fortes indutores da produção de radicais livres, podem e devem ser inativados pela metilação determinada, logo em seguida nessa mesma via, pela enzima Catecol-o-Metiltransferase (COMT). Todavia, ao analisarmos a expressão do gene que codifica a COMT observamos que não houve um esperado aumento na sua expressão. Em consequência disso, o 2 e 4-hidroxiestradiol, produzidos em quantidades aumentada, não são inativados eficientemente levando a formação de semiquinonas e quinonas, os quais se ligam estavelmente ao DNA produzindo adutos de DNA. Adicionalmente, a transição entre semiquinonas e quinonas é acompanhada de grande produção de radicais livres os quais, sabidamente, podem provocar danos ao DNA, proteínas e lipídeos. Outro mecanismo de defesa contra as quinonas diz respeito ao fato delas se tornarem inativas por intermédio de sua conjugação à glutatona, graças à ação das Glutationas S-Transferases (GSTs). Nosso estudo mostrou que, da mesma forma que a COMT, não

se observou aumento significativo das GSTs nos animais expostos. Na tentativa de reforçar a nossa hipótese de que a TCDD é genotóxica, por induzir adutos de DNA e produção aumentada de radicais livres, interessou-nos avaliar também outras vias que respondem ao aumento desses últimos. Ou seja, se a TCDD aumenta a produção de radicais livres, alguns genes, obrigatoriamente, deveriam estar super expressos em resposta a isso. Dessa forma, analisamos a expressão das Superóxido Desmutases, enzimas chave no bloqueio e inativação dos radicais livres e, de fato, confirmando nossa hipótese encontramos as superóxidos desmutases (SOD) aumentadas, significativamente, nos grupos expostos à TCDD. As SODs são responsáveis por catalisar a conversão do superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) para proteger a célula contra a formação de radicais livres (Mitrunen and Hirvonen 2003). Devido ao aumento da expressão gênica de enzimas chaves desse mecanismo e da diminuição ou não alteração da expressão de outros genes responsáveis pela desativação de alguns metabólitos genotóxicos podemos concluir que a TCDD, ao que parece, está favorecendo danos ao DNA na glândula mamária desses animais (figura 31).



**Figura 31-** Esquema da biossíntese e metabolismo do estradiol (Mitrunen and Hirvonen 2003)-modificado). Enzimas em vermelho tiveram aumento da expressão gênica, em preto não sofreram modificações estatisticamente significantes e em verde, teve diminuição significativa da expressão. Através do esquema, observamos o favorecimento da produção de compostos que aumentam as chances de danos ao DNA devido à ação da TCDD.

Alinhados com o aumento da ação da via do AHR e consequente aumento das condições que favorecem um ambiente prejudicial ao DNA, observamos aumento da expressão de genes relacionados à apoptose e supressão tumoral e outros mecanismos de resposta a danos e reparo do DNA sendo modulados, principalmente, após o tratamento pré-pubertal. Isso nos leva à conclusão de que a glândula mamária dos animais expostos está, acima de tudo, sendo desafiada por agentes genotóxicos e que os mecanismos de defesa contra o estabelecimento de mutações está altamente ativado.

Através das redes e vias de ação formadas com os genes aqui estudados foi possível identificar, de modo estatisticamente significativo, a ativação da via da proteína p53 como o mecanismo de eleição adotado pelos animais no sentido de manter a estabilidade genômica na glândula mamária exposta. Outra medida de defesa adotada em resposta à TCDD, e que vem reforçar ainda mais a nossa hipótese, diz respeito ao fato de encontrarmos, super-expressa, a via canônica de resposta a estresse oxidativo mediado por NRF2 nos animais que receberam o tratamento pré-pubertal.

Ainda, decorrente da exposição à TCDD, encontramos genes relacionados com a resposta imune diferencialmente expressos tanto pelo tratamento durante a gestação como pelo tratamento durante a lactação. A diversa resposta do sistema imune devido à ação da TCDD tem sido descrita em diversos artigos. Constantemente é descrito imunossupressão após a exposição à TCDD em animais, porém os dados em humanos ainda continuam contraditórios (Vos, De Heer et al. 1997). Adicionalmente tem sido demonstrado que TCDD age diretamente em várias células do sistema imune como linfócitos, macrófagos, células dendríticas, granulócitos e células natural killers através do AHR. Algumas supressões causadas por TCDD são inefetivas se o animal testado não possui um AHR funcional. E como nas demais ações ativadas por este receptor, a regulação do sistema imune também é dependente do contexto, ou seja, é dependente da dose e espécie estudada (Kerkvliet 2009).

Outro efeito na expressão gênica das glândulas mamárias expostas à TCDD foi a alteração de grande número de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos. Um dos efeitos descritos causados por TCDD é a perda de peso e alterações no metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e carboidratos como redução da

gliconeogênese (Weber, Lebofsky et al. 1991) e alterações dos níveis de insulina no soro (Ebner, Brewster et al. 1988).

Um dos genes mais diferenciados por TCDD com posterior confirmação pelo PCR em tempo real foi o *Elovl6* (*ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids*). Trata-se de enzima que catalisa a elongação de ácidos graxos saturados e monoinsaturados com 12, 14 e 16 carbonos na síntese de ácidos graxos endógenos. Essa enzima é expressa em tecido adiposo e pode modular resistência a insulina (Matsuzaka and Shimano 2009). Outros genes que tiveram aumento da expressão como *Fasn* (*fatty acid synthase*), *Insig 1* (*insulin induced gene1*), *Slc25a10* (*solute carrier family 25, mitochondrial carrier, dicarboxylate transporter, member 10*) também estão envolvidos na sensibilidade à insulina, enquanto *Pparg* (*peroxime proliferator activated receptor gamma*), *Gcgr* (*glucagon receptor*) e *Gpam* (*glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial*) são relacionados com tolerância à glicose.

Correlação entre exposição à TCDD e elevação na incidência de diabetes tem sido demonstrada em veteranos expostos ao Agente Laranja. De fato, estudo realizado por Kern demonstrou que altos níveis de TCDD no sangue pode promover um estado de resistência a insulina (Kern, Said et al. 2004). Interessantemente, estudos recentes têm demonstrado a relação entre câncer de mama e resistência à insulina (Garmendia, Pereira et al. 2007; Goodwin, Ennis et al. 2009).

Em resumo, nossos resultados demonstram que a TCDD é capaz de determinar modificações na glândula mamária de animais expostos a ela. Essas modificações, em especial do ponto-de-vista molecular, sugerem que o referido composto é genotóxico podendo determinar alterações na fisiologia desse órgão caracterizadas pelo estímulo à formação de adutos de DNA e produção de radicais livres seguidos da supressão dos mecanismos normais de combate a estes últimos com paralelo aumento da proliferação de estruturas-chave na formação da junção ducto-alveolar. Observamos ainda, que parte considerável dessas alterações ocorreu num período distante daquele da exposição inicial a esse disruptor endócrino (100 dias), o que sugere ser este, um mecanismo de instalação lenta mas progressiva que quando deflagrado, permanecerá ativo durante boa parte da vida do animal.



## *5- CONCLUSÕES*



## 5- CONCLUSÕES

1. Animais que foram expostos à TCDD, tanto pré-natalmente como pré-pubertalmente, tiveram um significativo decréscimo do peso.
2. TCDD alterou a proliferação celular das glândulas mamárias das ratas que foram expostas a este disruptor durante a lactação.
3. TCDD modificou a expressão de vários genes, sendo que o tratamento pré-natal resultou no maior número de genes modificados quando os animais atingiram 100 dias de idade.
4. O tratamento pré-pubertal mostrou alterar uma gama maior de genes com diferentes funções biológicas.
5. TCDD teve ação na via de sinalização do receptor aril-hidrocarbono com consequente ativação das vias metabolizadoras de estrogênios a qual não foi seguida da esperada resposta protetora de enzimas da fase II.
6. A exposição à TCDD ativou vários mecanismos de defesa da célula, como genes de reparo do DNA, apoptose e genes supressores de tumor provavelmente no intuito de manter o seu genoma estável.
7. A exposição a esta dioxina, afetou a expressão de genes do sistema imune e ainda, principalmente, genes pertencentes ao metabolismo de lipídeos.



## 6- ANEXOS



**Anexo 1-** Aprovação do Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da *University of Alabama at Birmingham* para o desenvolvimento desse estudo.



THE UNIVERSITY OF ALABAMA AT BIRMINGHAM

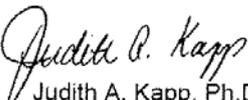
*Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)*

---

**MEMORANDUM**

**DATE:** October 24, 2007

**TO:** Coral A. Lamartiniere, Ph.D.  
VH-124 0019  
FAX: 934-8240

**FROM:**   
Judith A. Kapp, Ph.D., Chair  
Institutional Animal Care and Use Committee

**SUBJECT:** **NOTICE OF APPROVAL - Please forward this notice to the appropriate granting agency.**

---

The following application was reviewed and approved by the University of Alabama at Birmingham Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) on October 31, 2007.

Title of Application: CENTER: Breast Cancer and the Environment Research Centers (Dr. Russo); Center for the Study of Environment and Mammary Gland Development

Fund Source: NIH

This institution has an Animal Welfare Assurance on file with the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW) (Assurance Number A3255-01) and is registered as a Research Facility with the United States Department of Agriculture. The animal care and use program is accredited by the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC International)

**Institutional Animal Care and Use Committee**  
B10 Volker Hall  
1670 University Boulevard  
205.934.7692  
FAX 205.934.1188

Mailing Address:  
VH B10  
1530 3RD AVE S  
BIRMINGHAM AL 35294-0019

## Anexo 2- Genes supressores de tumor desregulados pela TCDD

Símbolo	Nome do Gene	Pré-natal	Pré-pubertal 6,67ng			Pré-pubertal 20,0ng		
		100d	21d	35d	50d	21d	35d	50d
AA899635	AA899635 UI-R-E0-dg-g-01-0-UI.s1 UI-R-E0 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-E0-dg-g-01-0-UI 3' similar to gi [AA899635]	-0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Acaca	acetyl-coenzyme A carboxylase alpha	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Akr1b4	aldo-keto reductase family 1, member B4 (aldose reductase)	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Alox15	arachidonate 15-lipoxygenase	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.2	0.0	1.0
Alpl	alkaline phosphatase, tissue-nonspecific	0.0	0.0	0.0	-1.2	0.0	0.0	-1.1
Anp32a	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.1	0.0	0.0
Anp32b	acidic nuclear phosphoprotein 32 family, member B	-0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Anxa1	annexin A1	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ar	androgen receptor	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0
Arl11	ADP-ribosylation factor-like 11	0.4	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Arb2	arrestin, beta 2	-0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Aurkb	aurora kinase B	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
AW914895	AW914895 EST346199 Normalized rat ovary, Bento Soares Rattus sp. cDNA clone RGIBM02 5' end, mRNA sequence [AW914895]	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0
Axin1	axin 1	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Bai1_predicted	brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (predicted)	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Bak1	BCL2-antagonist/killer 1	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Becn1	beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2-interacting protein)	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
BF555543	BF555543 UI-R-A1-dq-a-05-0-UI.r1 UI-R-A1 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-A1-dq-a-05-0-UI 5', mRNA sequence [BF555543]	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Bin1	bridging integrator 1	-1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Bicap	bladder cancer associated protein homolog (human)	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Bmpr1a	bone morphogenetic protein receptor, type 1A	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Bnip3	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3	0.5	0.0	0.9	0.8	0.8	1.4	2.4
Brca2	breast cancer 2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.0
Brf1_predicted	BRF1 homolog, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor IIIB (S. cerevisiae) (predicted)	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Btbd14b	BTB (POZ) domain containing 14B	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Btg2	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cabc1	chaperone, ABC1 activity of bc1 complex like (S. pombe)	0.5	0.0	0.0	0.0	-0.7	0.0	1.4
Casp8	caspase 8	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cav2	caveolin 2	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
CB546386	CB546386 AMGNNUC:NRHY4-00134-D10-A W Rat hypothalamus (10464) Rattus norvegicus cDNA clone nrhy4-00134-d10 5', mRNA sequence [CB546386]	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
CB547274	CB547274 AMGNNUC:URRG1-00067-G12-A urrg1 (14046) Rattus norvegicus cDNA clone urrg1-00067-g12 5', mRNA sequence [CB547274]	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
CB547958	CB547958 AMGNNUC:NRDG1-00016-F4-A nrdg1 (10855) Rattus norvegicus cDNA clone nrdg1-00016-f4 5', mRNA sequence [CB547958]	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
CB547962	CB547962 AMGNNUC:NRHY3-00187-B5-A W Rat hypothalamus (10735) Rattus norvegicus cDNA clone nrhy3-00187-b5 5', mRNA sequence [CB547962]	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.4
CB605964	CB605964 AMGNNUC:NRHY4-00159-E2-A W Rat hypothalamus (10464) Rattus norvegicus cDNA clone nrhy4-00159-e2 5', mRNA sequence [CB605964]	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
CB606288	CB606288 AMGNNUC:SRPB2-00170-H8-A srpb2 (10220) Rattus norvegicus cDNA clone srpb2-00170-h8 5', mRNA sequence [CB606288]	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ccnc	cyclin C	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ccndbp1	cyclin D-type binding-protein 1	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Continua...

...continuação

Símbolo	Nome do Gene	Pré-natal	Pré-pubertal 6,67ng			Pré-pubertal 20,0ng		
		100d	21d	35d	50d	21d	35d	50d
Ccng1	cyclin G1	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cd59	CD59 antigen	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.9
Cd82	CD82 antigen	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cdc14a_predicted	CDC14 cell division cycle 14 homolog A (S. cerevisiae) (predicted)	-0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cdc2a	cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.4
Cdc73	cell division cycle 73, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (S. cerevisiae)	0.5	0.0	0.0	0.0	1.7	0.6	1.8
Cdh1	cadherin 1	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cdh11	cadherin 11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0
Cdkn1b	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	-0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0
Cdkn2a	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.8	0.0
Cdkn2b	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.6	0.0
Cdkn2c	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.1	1.0	2.1
Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.8	0.0	0.0
CF110335	Shultzomica03586 Rat lung airway and parenchyma cDNA libraries Rattus norvegicus cDNA clone Contig3172 5', mRNA sequence [CF110335]	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Chfr	checkpoint with forkhead and ring finger domains	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Crebbp	CREB binding protein	-1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Crebl2	cAMP responsive element binding protein-like 2	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cst6	cystatin E/M	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.8
Ctdspl_predicted	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like (predicted)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.6
Ctgf	connective tissue growth factor	-0.3	1.2	0.0	0.0	1.2	0.7	0.0
Cul2_predicted	cullin 2 (predicted)	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cut1	cut-like 1 (Drosophila)	-0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.4
Cyba	cytochrome b-245, alpha polypeptide	-1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Datf1_predicted	death associated transcription factor 1 (predicted)	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.0	0.0
Ddx26	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 26	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ddx3x	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Dnmt3b	DNA methyltransferase 3B	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Dusp6	dual specificity phosphatase 6	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
E2f5	E2F transcription factor 5	-0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-2.3
Eef1e1_predicted	eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon 1 (predicted)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
Egln1	EGL nine homolog 1 (C. elegans)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9
Egr1	early growth response 1	0.6	0.0	-0.7	0.0	0.0	0.0	-1.2
Eif2s1	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Enc1	ectodermal-neural cortex 1	0.6	0.9	0.0	0.0	1.3	0.8	0.0
Eno1	enolase 1, alpha	0.4	0.0	0.0	0.0	-1.3	0.0	0.0
ENSRNOT00000017291	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to Retinoblastoma-binding protein 8 (RBBP-8) (CtBP interacting protein) (CtIP) (Retinoblastoma-interacting protein and myosin-like) (RIM) (predicted) (RGD1308872_predicted), mRNA [XM_214620]	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ENSRNOT00000035929	Q8YTY7_ANASP (Q8YTY7) Air2576 protein, partial (5%) [TC590018]	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0
ENSRNOT00000038703	PREDICTED: Rattus norvegicus similar to FAT tumor suppressor homolog 4 (predicted) (RGD1564291_predicted), mRNA [XM_227060]	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ENSRNOT00000043292	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G [Source:RefSeq_peptide;Acc:NP_599183] [ENSRNOT00000043292]	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ep300	E1A binding protein p300	0.0	-0.6	0.0	1.6	2.5	0.0	1.7
Errfi1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0

Continua...

...continuação

Símbolo	Nome do Gene	Pré-natal	Pré-pubertal 6,67ng			Pré-pubertal 20,0ng		
		100d	21d	35d	50d	21d	35d	50d
F3	coagulation factor III	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.8
Fabp3	fatty acid binding protein 3	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Fath	fat tumor suppressor homolog (Drosophila)	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Fh1	fumarate hydratase 1	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Fli1	Friend leukemia integration 1	-0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Foxa2	forkhead box A2	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0
Foxo1a	forkhead box O1A	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
G3bp	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein	0.0	0.0	-0.5	0.0	-1.2	0.0	0.0
Gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0
Gak	cyclin G associated kinase	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Gjb2	gap junction membrane channel protein beta 2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-2.2
Glpr1	GLI pathogenesis-related 1 (glioma)	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.9	0.0
Gltsr2	glioma tumor suppressor candidate region gene 2	-0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Gpc3	glypican 3	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0
Gprc5a	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.9	0.0
Gpx3	glutathione peroxidase 3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	1.4
Gtf2e1	general transcription factor II E, polypeptide 1 (alpha subunit)	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hdac1_predicted	histone deacetylase 1 (predicted)	-1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hif1a	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hod	homeobox only domain	-0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Hoxa5	homeo box A5	-0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ier3	immediate early response 3	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0
Igf2r	insulin-like growth factor 2 receptor	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Igfbp1	insulin-like growth factor binding protein 1	0.4	0.0	0.0	0.0	1.3	1.6	0.0
Igfbp3	insulin-like growth factor binding protein 3	-1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Il1b	interleukin 1 beta	0.0	0.0	-0.8	0.0	0.0	0.0	0.0
Ing1	inhibitor of growth family, member 1	-0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ing4	inhibitor of growth family, member 4	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Irf1	interferon regulatory factor 1	-0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Irf3	interferon regulatory factor 3	-0.7	0.0	-0.9	0.0	0.0	0.0	0.0
Jup	junction plakoglobin	0.3	0.0	0.0	0.0	-0.8	0.0	0.0
Klf4	Kruppel-like factor 4 (gut)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0
Kpna2	karyopherin (importin) alpha 2	-0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Lama5	laminin, alpha 5	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Lats2_predicted	large tumor suppressor 2 (predicted)	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Lcn2	lipocalin 2	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
LOC362414	similar to Tada3l protein	-0.5	0.0	0.0	0.0	-1.5	0.0	0.0
LOC365592	similar to CG10585-PA	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
LOC501052	similar to Fus1 protein	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Lrp12_predicted	low density lipoprotein-related protein 12 (predicted)	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Lyk5	protein kinase LYK5	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Lzts1	leucine zipper, putative tumor suppressor 1	0.7	0.0	0.0	0.0	-0.6	0.0	0.0
Lzts2	leucine zipper, putative tumor suppressor 2	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Map2k4	mitogen activated protein kinase kinase 4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.2	1.1
Map4k1_predicted	mitogen activated protein kinase kinase kinase 1 (predicted)	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mapk1	mitogen activated protein kinase 1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9
Mapk14	mitogen activated protein kinase 14	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mapk3	mitogen activated protein kinase 3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Mapk8	mitogen-activated protein kinase 8	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Continua...

...continuação

Símbolo	Nome do Gene	Pré-natal	Pré-pubertal 6,67ng				Pré-pubertal 20,0ng		
		100d	21d	35d	50d	21d	35d	50d	
Mapk9	mitogen-activated protein kinase 9	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Mdm2_predicted	transformed mouse 3T3 cell double minute 2 homolog (mouse) (predicted)	0.5	0.0	0.0	0.0	-0.9	0.0	0.0	
Mlh1	mutL homolog 1 (E. coli)	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Mll	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia	-1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.9	-1.8	
Msbm	beta-microseminoprotein	1.2	0.0	0.0	0.0	1.3	0.0	0.0	
Mtus1	mitochondrial tumor suppressor 1	-0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Myc	myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Nbn	nibrin	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Nbr1	neighbor of Brca1 gene 1	-0.2	0.0	0.0	0.0	-1.0	0.0	0.0	
Ndr1	N-myc downstream regulated gene 1	0.0	0.0	-1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Ndr2	N-myc downstream regulated gene 2	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Nfkb1	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Nos2	nitric oxide synthase 2, inducible	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Notch1	Notch gene homolog 1 (Drosophila)	-0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Nox4	NADPH oxidase 4	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Nr4a1	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	
Nudt2	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 2	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Onecut1	one cut domain, family member 1	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Park2	parkin	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Pax6	paired box gene 6	0.4	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	
Pcbp4_predicted	poly(rC) binding protein 4 (predicted)	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Pdcd4	programmed cell death 4	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Pfn1	profilin 1	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Phf17_predicted	PHD finger protein 17 (predicted)	0.0	0.0	1.2	0.0	0.9	0.9	0.0	
Phlda2_predicted	pleckstrin homology-like domain, family A, member 2 (predicted)	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Pik3c3	phosphoinositide-3-kinase, class 3	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Plagl1	pleiomorphic adenoma gene-like 1	0.0	0.8	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0	
Plk1	polo-like kinase 1 (Drosophila)	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.6	
Pou2f3	POU domain, class 2, transcription factor 3	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Ppara	peroxisome proliferator activated receptor alpha	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.6	0.0	
Ppm1d_predicted	protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform (predicted)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	
Ppp2r1b	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), beta isoform	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Prickle1	prickle-like 1 (Drosophila)	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	
Prkcd	protein kinase C, delta	-0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Prkr	Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent	-0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Psmc3	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Ptch1	patched homolog 1 (Drosophila)	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Pten	phosphatase and tensin homolog	-0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Ptpro	protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	-1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Ralgds	ral guanine nucleotide dissociation stimulator	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.6	0.0	0.0	
Ras10b_predicted	RAS-like, family 10, member B (predicted)	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Rassf5	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 5	-1.0	0.0	-1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	
Rbbp6	retinoblastoma binding protein 6	-1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.6	
Rbbp7	retinoblastoma binding protein 7	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Rbl2	retinoblastoma-like 2	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Rbm4_predicted	RNA binding motif protein 4 (predicted)	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Rbm5	RNA binding motif protein 5	-0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

Continua...

...continuação

Símbolo	Nome do Gene	Pré-natal	Pré-pubertal 6,67ng				Pré-pubertal 20,0ng		
		100d	21d	35d	50d	21d	35d	50d	
RGD1564146_predicted	similar to solute carrier family 5 (iodide transporter), member 8 (predicted)	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
RGD1564762_predicted	similar to erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) isoform 1 (predicted)	-0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
RGD1565055_predicted	similar to PDZ-domain protein scribble (predicted)	-0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
RGD1566025_predicted	similar to Pin2-interacting protein X1 (predicted)	0.0	-0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Rhob	ras homolog gene family, member B	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Rora_predicted	RAR-related orphan receptor alpha (predicted)	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.8	0.0	0.0	
Rps29	ribosomal protein S29	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Rtn4	reticulon 4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	
Runx1	runt related transcription factor 1	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	
Runx3	runt-related transcription factor 3	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
S100a4	S100 calcium-binding protein A4	-0.6	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	
S100b	S100 protein, beta polypeptide	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	1.9	
Sdc2	syndecan 2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	
Sdhd	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	-0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	
Sec14l2	SEC14-like 2 (S. cerevisiae)	0.0	1.6	0.0	0.0	3.1	0.0	0.0	
Sel1h	Sel1 (suppressor of lin-12) 1 homolog (C. elegans)	-0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Sema3b_predicted	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B (predicted)	0.0	0.0	0.0	1.0	1.3	0.0	2.3	
Siah1a	seven in absentia 1A	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Slc9a3r1	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), isoform 3 regulator 1	-0.3	0.0	-1.2	0.0	-1.1	0.0	0.0	
Smad2	MAD homolog 2 (Drosophila)	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Smad3	MAD homolog 3 (Drosophila)	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Smarca2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Smo	smoothened homolog (Drosophila)	0.0	0.0	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Socs3	suppressor of cytokine signaling 3	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	
Spn	sialoporphin	0.0	0.0	0.0	0.0	2.4	0.0	0.0	
St13	suppression of tumorigenicity 13	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	
Stat3	signal transducer and activator of transcription 3	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Stat5a	signal transducer and activator of transcription 5A	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.9	
Stk3	serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast)	-0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Sufu	suppressor of fused	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Tagln	transgelin	-0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.7	-2.2	
TC588820	BC030894 Trp53bp2 protein {Mus musculus} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (61%) [TC588820]	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	
Tceb2	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2	-0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Tcfe2a	transcription factor E2a	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Tlr2	toll-like receptor 2	-0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.0	
Tmeff1	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	0.0	
Tmeff2_predicted	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2 (predicted)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	
Tnk2	tyrosine kinase, non-receptor, 2	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.8	0.0	
Tpm1	tropomyosin 1, alpha	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.0	
Trp63	transformation related protein 63	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.5	
Trrap_predicted	transformation/transcription domain-associated protein (predicted)	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.9	0.0	0.0	
Tube1_predicted	tubulin, epsilon 1 (predicted)	0.6	0.0	-0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	
Tusc4	tumor suppressor candidate 4	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Ube2i	ubiquitin-conjugating enzyme E2I	-0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Ube4b_predicted	ubiquitination factor E4B, UFD2 homolog (S. cerevisiae) (predicted)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	

Continua...

...conclusão

Símbolo	Nome do Gene	Pré-natal	Pré-pubertal 6,67ng			Pré-pubertal 20,0ng		
		100d	21d	35d	50d	21d	35d	50d
Wfdc1	WAP four-disulfide core domain 1	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Wif1	Wnt inhibitory factor 1	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	1.2	0.0
XM_341192	Rattus norvegicus similar to Platelet factor 4 precursor (PF-4) (CXCL4) (LOC360918), mRNA [XM_341192]	-0.6	1.2	1.0	0.0	1.3	1.1	0.0
Xrcc1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1	-0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ywhab	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9
Ywhag	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide	0.4	0.0	0.6	0.0	-0.9	0.0	1.2
Zfp403	zinc finger protein 403	-0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Zmynd10	zinc finger, MYND domain-containing 10	-0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.8	0.0

**Anexo 2-** Genes supressores de tumor desregulados pela TCDD administrada pré-natalmente nos animais com 100 dias de idade, ou pré-pubertalmente com baixa e alta doses nos animais com 21, 35 e 50 dias, e as suas respectivas expressões relativas ( $\log_2$ ).

### Anexo 3- Genes relacionados com o metabolismo de lipídeos desregulados pelo tratamento pré-pubertal

Símbolo	Nome do Gene	Pré-pubertal 6,67ng				Pré-pubertal 20,0ng			
		21d	35d	50d	100d	21d	35d	50d	100d
Aacs	acetoacetyl-CoA synthetase	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	1.1	2.2	0.0
Abcd2	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.6	0.0
Acadl	acetyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0
Acadvl	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.1	0.0
Acox1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0
Acox3	acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl	0.0	0.6	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0
Acs11	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	0.0	1.3	0.0	0.0	-0.7	1.6	2.6	0.0
Adipoq	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0
Adm	adrenomedullin	0.7	0.0	0.0	0.0	0.8	0.8	0.0	0.0
Agt	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0
Alox12e_predicted	arachidonate lipoxygenase, epidermal (predicted)	0.0	-0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Alox5	arachidonate 5-lipoxygenase	0.8	0.9	0.0	0.0	1.0	1.2	0.0	0.0
B4galt6	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 6	0.8	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0
Bucs1_predicted	butyryl Coenzyme A synthetase 1 (predicted)	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.8	0.0	0.0	0.0
CB547241	CB547241 AMGNNUC:URRG1-00066-H10-A urrg1 (14046) Rattus norvegicus cDNA clone urrg1-00066-h10 5', mRNA sequence [CB547241]	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0
CB548021	CB548021 AMGNNUC:SRPB2-00261-C4-A srpb2 (10220) Rattus norvegicus cDNA clone srpb2-00261-c4 5', mRNA sequence [CB548021]	-1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cd36	cd36 antigen	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0
Cln3	ceroid lipofuscinosis, neuronal 3, juvenile (Batten, Spielmeier-Vogt disease)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.0	0.0	0.0
Cpt1b	carnitine palmitoyltransferase 1b, muscle	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.6	0.0	1.6	0.0
Cpt2	carnitine palmitoyltransferase 2	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	1.1	1.2	0.0
Cte1	cytosolic acyl-CoA thioesterase 1	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7
Cyp17a1	cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	0.0	0.0
Cyp1b1	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1	3.4	4.1	3.1	1.2	4.3	4.4	4.2	0.0
Cyp51	cytochrome P450, subfamily 51	-0.8	0.0	0.0	0.0	-1.1	0.0	1.5	0.0
Cyp7b1	cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	0.0
Dbi	diazepam binding inhibitor	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	1.0	1.5	0.0
Dgat2	diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (mouse)	0.0	0.9	0.0	0.0	-0.9	1.1	1.9	0.0
Dhrs8	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0
Echs1	enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.3	0.0
Ehhadh	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	0.0	0.0
Elovl5	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (yeast)	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.7	0.0	1.3	0.0
Elovl6	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast)	-1.7	2.2	0.0	1.0	-2.0	2.5	3.0	0.6
Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	2.5	0.0
Fasn	fatty acid synthase	-1.5	1.6	0.0	0.0	-1.8	2.1	2.6	0.0
Fcer1a	Fc receptor, IgE, high affinity I, alpha polypeptide	2.2	1.5	0.0	0.0	1.6	0.9	0.0	0.0
Fdft1	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.8	0.0	0.0	0.0
Fdps	farnesyl diphosphate synthase	-1.0	0.0	0.0	0.0	-1.4	0.0	1.5	0.0
Fgf2	fibroblast growth factor 2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.8	0.0	0.0
Gal	galanin	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
Ggta1	gamma-glutamyltransferase-like activity 1	0.0	0.0	0.0	-0.8	0.0	-1.0	0.0	0.0
Gpam	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	0.0	2.7	0.0	0.0	-1.6	2.8	3.8	-0.6
Gpsn2	glycoprotein, synaptic 2	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.6	0.0	0.0	0.0
Hadha	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.0	0.0	0.0	0.0

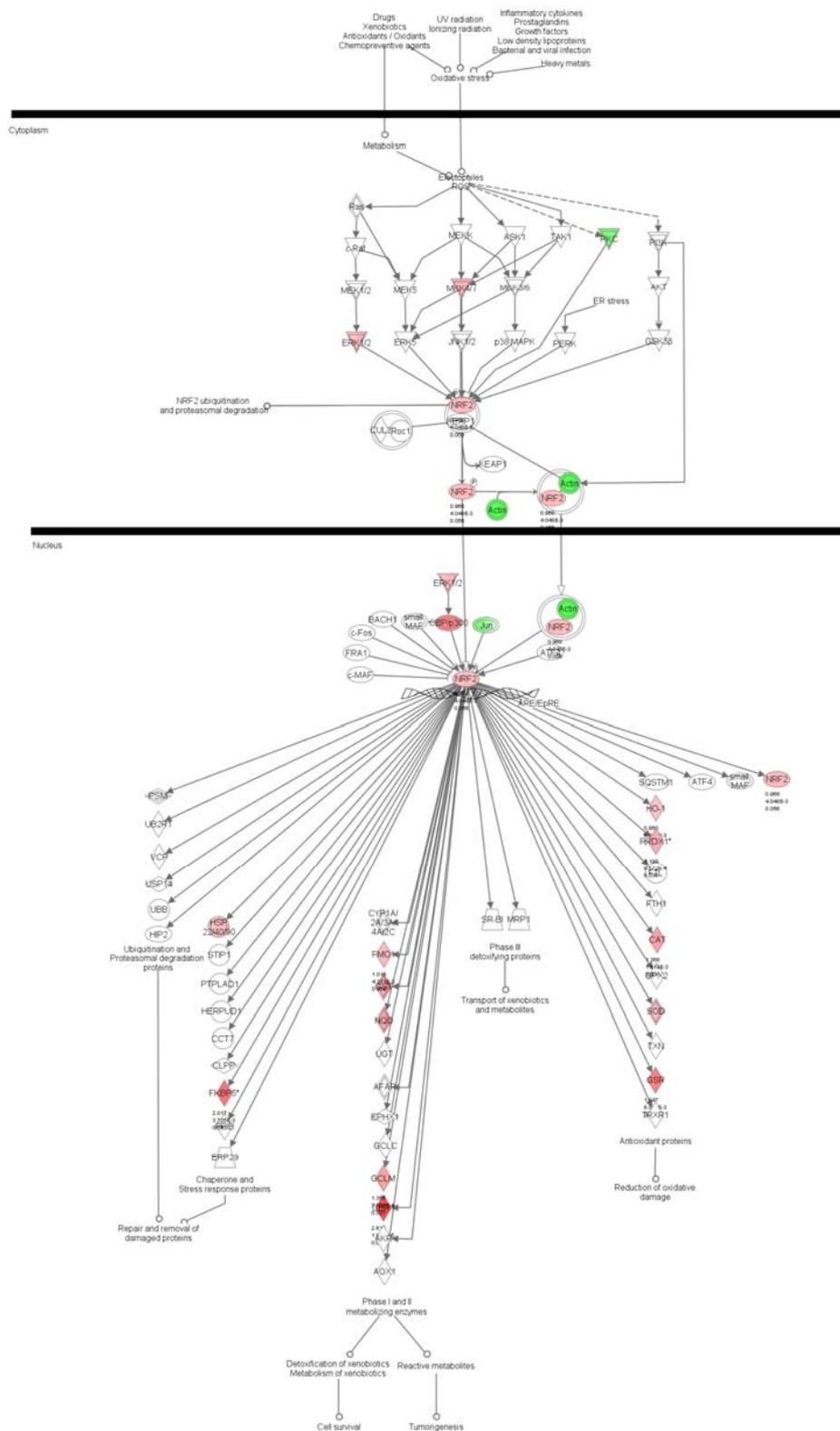
Continua...

...conclusão

Símbolo	Nome do Gene	Pré-pubertal 6,67ng				Pré-pubertal 20,0ng			
		21d	35d	50d	100d	21d	35d	50d	100d
Hadhb	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.7	0.9	1.5	0.0
Hadhsc	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	1.3	0.0
Hmgcl	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.5	0.0	0.0	-1.3
Hmgcs1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.9	0.0	1.2	0.0
Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	0.0	0.0	0.0	-0.7	1.6	0.0	-1.2	-0.5
Hnf4a	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	0.0	0.0	-2.0	0.0	0.0	-1.7	0.0	0.0
Hsd17b4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0
Hsd17b7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.0	0.0	1.1	0.0
Idi1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	-1.0	0.0	0.0	0.0	-0.9	0.0	0.0	0.0
Insig1	insulin induced gene 1	0.0	2.8	0.0	0.7	-0.9	1.5	3.1	0.0
Insig2	insulin induced gene 2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.6	0.0	0.0
Lipe	lipase, hormone sensitive	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.2	0.8	1.7	0.0
Lpl	lipoprotein lipase	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0
Lss	lanosterol synthase	-0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.8	0.0
Ltb4dh	leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	1.0	1.3	0.0
Lypla2	lysophospholipase 2	0.0	-0.6	0.0	0.0	-0.5	0.0	0.0	0.0
Mecr	mitochondrial trans-2-enoyl-CoA reductase	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.8	0.0	1.3	0.0
Mvd	mevalonate (diphospho) decarboxylase	-0.9	0.0	0.0	0.0	-1.0	0.0	1.3	0.0
Nsdhl	NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.1	0.0	2.9	0.0
Osbp2_predicted	oxysterol binding protein 2 (predicted)	-1.2	-0.8	0.0	0.0	-0.8	-0.9	0.0	0.0
Pc	Pyruvate carboxylase	-0.7	1.1	0.0	0.0	-1.2	1.7	2.3	0.0
Pck1	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	0.0	0.7	1.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0
Pex7	peroxisome biogenesis factor 7	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	1.2	1.1	0.0
Pigm	phosphatidylinositol glycan, class M	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Pik3c3	phosphoinositide-3-kinase, class 3	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Pip5k1a_predicted	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1, alpha (predicted)	-0.5	-0.5	0.0	0.0	0.0	-0.5	0.0	0.0
Pmvk	phosphomevalonate kinase	0.0	0.0	0.0	0.0	-1.1	0.0	0.0	0.0
Ppara	peroxisome proliferator activated receptor alpha	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.6	0.0	0.0
Pparg	peroxisome proliferator activated receptor gamma	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	1.3	2.4	0.0
Prkar2b	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type II beta	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.9	1.7	0.0
Ptgds2	prostaglandin D2 synthase 2	0.9	1.0	0.0	0.0	1.1	1.4	1.8	0.0
Rbp1	retinol binding protein 1, cellular	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0
Sacm1l	SAC1 (suppressor of actin mutations 1, homolog)-like (S. cerevisiae)	0.8	0.0	0.0	0.0	0.9	1.7	0.0	0.0
Sc5d	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	1.7	0.0
Sec14l2	SEC14-like 2 (S. cerevisiae)	1.6	0.0	0.0	0.0	3.1	0.0	0.0	0.0
Slc27a1	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.6	1.2	1.9	0.0
Smpd2	sphingomyelin phosphodiesterase 2, neutral	0.0	0.0	0.0	-0.8	0.0	0.0	0.0	0.0
Star	steroidogenic acute regulatory protein	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	3.7	2.7	0.0
Tbxas1	thromboxane A synthase 1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0
Thedc1	thioesterase domain containing 1	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0

**Anexo 3-** Genes relacionados com o metabolismo de lipídeos desregulados pelo tratamento pré-pubertal e as suas respectivas expressões relativas (log<sub>2</sub>).

**Anexo 4-** Via de sinalização de resposta a estresse oxidativo mediado por NRF2



**Anexo 4-** Via de sinalização de resposta a estresse oxidativo mediado por NRF2. Genes em vermelho representam aumento na expressão e em verde representam diminuição da expressão nos animais com 50 dias que foram tratados durante a lactação. Imagem gerada pelo programa Ingenuity Pathways Analysis.

## *7- REFERÊNCIAS*



**7- REFERÊNCIAS**

- Benjamini, Y. and Y. Hochberg (1995). "Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." *Journal of the Royal Statistical Society* **57**(1): 289-300.
- Bertazzi, A., A. C. Pesatori, et al. (1993). "Cancer incidence in a population accidentally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin." *Epidemiology* **4**(5): 398-406.
- Bertazzi, P. A., C. Zocchetti, et al. (1997). "Dioxin exposure and cancer risk: a 15-year mortality study after the "Seveso accident"." *Epidemiology* **8**(6): 646-52.
- Birnbaum, L. S. and J. Tuomisto (2000). "Non-carcinogenic effects of TCDD in animals." *Food Addit Contam* **17**(4): 275-88.
- Bock, K. W. and C. Kohle (2005). "Ah receptor- and TCDD-mediated liver tumor promotion: clonal selection and expansion of cells evading growth arrest and apoptosis." *Biochem Pharmacol* **69**(10): 1403-8.
- Bock, K. W. and C. Kohle (2006). "Ah receptor: dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions." *Biochem Pharmacol* **72**(4): 393-404.
- Boice, J. D., Jr., C. E. Land, et al. (1979). "Risk of breast cancer following low-dose radiation exposure." *Radiology* **131**(3): 589-97.
- Boutros, P. C., I. D. Moffat, et al. (2004). "Dioxin-responsive AHRE-II gene battery: identification by phylogenetic footprinting." *Biochem Biophys Res Commun* **321**(3): 707-15.
- Boverhof, D. R., L. D. Burgoon, et al. (2006). "Comparative toxicogenomic analysis of the hepatotoxic effects of TCDD in Sprague Dawley rats and C57BL/6 mice." *Toxicol Sci* **94**(2): 398-416.
- Brody, J. G., K. B. Moysich, et al. (2007). "Environmental pollutants and breast cancer: epidemiologic studies." *Cancer* **109**(12 Suppl): 2667-711.
- Brown, N. M. and C. A. Lamartiniere (1995). "Xenoestrogens alter mammary gland differentiation and cell proliferation in the rat." *Environ Health Perspect* **103**(7-8): 708-13.
- Brown, N. M., P. A. Manzillo, et al. (1998). "Prenatal TCDD and predisposition to mammary cancer in the rat." *Carcinogenesis* **19**(9): 1623-9.

- Chamie, K., R. W. De Vere White, et al. (2008). "Agent Orange exposure, Vietnam War veterans, and the risk of prostate cancer." Cancer **113**(9): 2464-70.
- Chen, C. Y., J. T. Hamm, et al. (2002). "A mixture of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and non-ortho polychlorinated biphenyls (PCBs) changed the lipid content of pregnant Long Evans rats." Chemosphere **46**(9-10): 1501-4.
- Chen, C. Y., J. T. Hamm, et al. (2001). "Disposition of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and non-ortho polychlorinated biphenyls in pregnant long evans rats and the transfer to offspring." Toxicol Appl Pharmacol **173**(2): 65-88.
- Committee on the Implications of Dioxin in the Food Supply, N. R. C. (2003). Dioxins and Dioxin-like Compounds in the Food Supply: Strategies to Decrease Exposure. Washington, DC.
- Consonni, D., A. C. Pesatori, et al. (2008). "Mortality in a population exposed to dioxin after the Seveso, Italy, accident in 1976: 25 years of follow-up." Am J Epidemiol **167**(7): 847-58.
- de Assunção, J. V., C. R. Pesquero, et al. (2005). "Dioxins and furans in the atmosphere of Sao Paulo City, Brazil." Chemosphere **58**(10): 1391-8.
- Desaulniers, D., K. Leingartner, et al. (2001). "Modulatory effects of neonatal exposure to TCDD, or a mixture of PCBs, p,p'-DDT, and p,p'-DDE, on methylnitrosourea-induced mammary tumor development in the rat." Environ Health Perspect **109**(7): 739-47.
- DeVito, M. J., L. S. Birnbaum, et al. (1995). "Comparisons of estimated human body burdens of dioxinlike chemicals and TCDD body burdens in experimentally exposed animals." Environ Health Perspect **103**(9): 820-31.
- Ebner, K., D. W. Brewster, et al. (1988). "Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on serum insulin and glucose levels in the rabbit." J Environ Sci Health B **23**(5): 427-38.
- Emond, C., L. S. Birnbaum, et al. (2006). "Use of a physiologically based pharmacokinetic model for rats to study the influence of body fat mass and induction of CYP1A2 on the pharmacokinetics of TCDD." Environ Health Perspect **114**(9): 1394-400.
- Fenton, S. E., J. T. Hamm, et al. (2002). "Persistent abnormalities in the rat mammary gland following gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)." Toxicol Sci **67**(1): 63-74.
- Fingerhut, M. A., W. E. Halperin, et al. (1991). "Cancer mortality in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." N Engl J Med **324**(4): 212-8.

Flesch-Janys, D., K. Steindorf, et al. (1998). "Estimation of the cumulated exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins/furans and standardized mortality ratio analysis of cancer mortality by dose in an occupationally exposed cohort." Environ Health Perspect **106 Suppl 2**: 655-62.

Fletcher, N., D. Wahlstrom, et al. (2005). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the mRNA expression of critical genes associated with cholesterol metabolism, bile acid biosynthesis, and bile transport in rat liver: a microarray study." Toxicol Appl Pharmacol **207**(1): 1-24.

Garmendia, M. L., A. Pereira, et al. (2007). "Relation between insulin resistance and breast cancer among Chilean women." Ann Epidemiol **17**(6): 403-9.

Goodwin, P. J., M. Ennis, et al. (2009). "High insulin levels in newly diagnosed breast cancer patients reflect underlying insulin resistance and are associated with components of the insulin resistance syndrome." Breast Cancer Res Treat **114**(3): 517-25.

Gray, L. E., Jr. and J. S. Ostby (1995). "In utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring." Toxicol Appl Pharmacol **133**(2): 285-94.

Gray, L. E., C. Wolf, et al. (1997). "In utero exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters reproductive development of female Long Evans hooded rat offspring." Toxicol Appl Pharmacol **146**(2): 237-44.

Gunning, J. E. (1976). "The DES story." Obstet Gynecol Surv **31**(11): 827-33.

Hardell, L., G. Lindstrom, et al. (1996). "Increased concentrations of octachlorodibenzo-p-dioxin in cases with breast cancer--results from a case-control study." Eur J Cancer Prev **5**(5): 351-7.

Holcomb, M. and S. Safe (1994). "Inhibition of 7,12-dimethylbenzanthracene-induced rat mammary tumor growth by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." Cancer Lett **82**(1): 43-7.

Huff, J., G. Lucier, et al. (1994). "Carcinogenicity of TCDD: experimental, mechanistic, and epidemiologic evidence." Annu Rev Pharmacol Toxicol **34**: 343-72.

Hurst, C. H., M. J. DeVito, et al. (2000). "Tissue disposition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in maternal and developing long-evans rats following subchronic exposure." Toxicol Sci **57**(2): 275-83.

Hurst, C. H., M. J. DeVito, et al. (2000). "Acute administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in pregnant Long Evans rats: association of measured tissue concentrations with developmental effects." Toxicol Sci **53**(2): 411-20.

- IARC (1997). Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. W. H. Organization. Lyon, France, International Agency for Research on Cancer. **69**: 1-666.
- IBGE (2004). Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2002-2003. I. B. d. G. e. Estatística, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- Jenkins, S., C. Rowell, et al. (2007). "Prenatal TCDD exposure predisposes for mammary cancer in rats." Reprod Toxicol **23**(3): 391-6.
- Kang, H. K., N. A. Dalager, et al. (2006). "Health status of Army Chemical Corps Vietnam veterans who sprayed defoliant in Vietnam." Am J Ind Med **49**(11): 875-84.
- Kerger, B. D., H. W. Leung, et al. (2006). "Age- and concentration-dependent elimination half-life of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Seveso children." Environ Health Perspect **114**(10): 1596-602.
- Kerkvliet, N. I. (2009). "AHR-mediated immunomodulation: the role of altered gene transcription." Biochem Pharmacol **77**(4): 746-60.
- Kern, P. A., S. Said, et al. (2004). "Insulin sensitivity following agent orange exposure in Vietnam veterans with high blood levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin." J Clin Endocrinol Metab **89**(9): 4665-72.
- Knerr, S. and D. Schrenk (2006). "Carcinogenicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in experimental models." Mol Nutr Food Res **50**(10): 897-907.
- Kogevinas, M., R. Saracci, et al. (1993). "Cancer incidence and mortality in women occupationally exposed to chlorophenoxy herbicides, chlorophenols, and dioxins." Cancer Causes Control **4**(6): 547-53.
- Lamartiniere, C. A. (2002). "Timing of exposure and mammary cancer risk." J Mammary Gland Biol Neoplasia **7**(1): 67-76.
- Manz, A., J. Berger, et al. (1991). "Cancer mortality among workers in chemical plant contaminated with dioxin." Lancet **338**(8773): 959-64.
- Matsuzaka, T. and H. Shimano (2009). "Elovl6: a new player in fatty acid metabolism and insulin sensitivity." J Mol Med **87**(4): 379-84.
- Mitchell, K. A. and C. J. Elferink (2008). "Timing is everything: Consequences of transient and sustained AhR activity." Biochem Pharmacol.
- Mitrunen, K. and A. Hirvonen (2003). "Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism." Mutat Res **544**(1): 9-41.

Miyamoto, K. (2004). "Effects of dioxin on gene expression in female reproductive system in the rat." Environ Sci **11**(1): 47-55.

Mizutani, T., M. Yoshino, et al. (2004). "Identification of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-inducible and -suppressive genes in the rat placenta: induction of interferon-regulated genes with possible inhibitory roles for angiogenesis in the placenta." Endocr J **51**(6): 569-77.

Moral, R., R. Wang, et al. (2008). "Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature." J Endocrinol **196**(1): 101-12.

Patandin, S., P. C. Dagnelie, et al. (1999). "Dietary exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins from infancy until adulthood: A comparison between breast-feeding, toddler, and long-term exposure." Environ Health Perspect **107**(1): 45-51.

Revich, B., E. Aksel, et al. (2001). "Dioxin exposure and public health in Chapaevsk, Russia." Chemosphere **43**(4-7): 951-66.

Reynolds, P., S. E. Hurley, et al. (2005). "Adipose levels of dioxins and risk of breast cancer." Cancer Causes Control **16**(5): 525-35.

Russo, I. H., J. Medado, et al. (1989). Endocrine Influences on Mammary Gland Structure and Development. Integument and Mammary Gland of Laboratory Animals (Jones, T.C., Mohr, U., and Hunt, R.D., Eds.) Berlin, Springer Verlag: 252-266.

Russo, J. and I. H. Russo (2004). Molecular basis of breast cancer: prevention and treatment. Berlin, Springer.

Russo, J., L. Tait, et al. (1983). "Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. III. The cell of origin of rat mammary carcinoma." Am J Pathol **113**(1): 50-66.

Saeed, A. I., V. Sharov, et al. (2003). "TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis." Biotechniques **34**(2): 374-8.

Smyth, G. K. (2004). "Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." Stat Appl Genet Mol Biol **3**: Article3.

Stahl, B. U. and K. Rozman (1990). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced appetite suppression in the Sprague-Dawley rat is not a direct effect on feed intake regulation in the brain." Toxicol Appl Pharmacol **106**(1): 158-62.

Steenland, K., P. Bertazzi, et al. (2004). "Dioxin revisited: developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen." Environ Health Perspect **112**(13): 1265-8.

- U.S. Department of Health and Human Services (2005). Report on Carcinogens, Eleventh Edition, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program.
- Vezina, C. M., N. J. Walker, et al. (2004). "Subchronic exposure to TCDD, PeCDF, PCB126, and PCB153: effect on hepatic gene expression." Environ Health Perspect **112**(16): 1636-44.
- Viel, J. F., M. C. Clement, et al. (2008). "Dioxin emissions from a municipal solid waste incinerator and risk of invasive breast cancer: a population-based case-control study with GIS-derived exposure." Int J Health Geogr **7**: 4.
- Vos, J. G., C. De Heer, et al. (1997). "Immunotoxic effects of TCDD and toxic equivalency factors." Teratog Carcinog Mutagen **17**(4-5): 275-84.
- Wang, S. L., Y. C. Chang, et al. (2006). "Body burdens of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls and their relations to estrogen metabolism in pregnant women." Environ Health Perspect **114**(5): 740-5.
- Warner, M., B. Eskenazi, et al. (2002). "Serum dioxin concentrations and breast cancer risk in the Seveso Women's Health Study." Environ Health Perspect **110**(7): 625-8.
- Weber, L. W., M. Lebofsky, et al. (1991). "Reduced activities of key enzymes of gluconeogenesis as possible cause of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in rats." Toxicology **66**(2): 133-44.
- Whitsett Jr., T. G., V. Kalia, et al. (2008). "Prenatal TCDD Exposure Delays Differentiation and Alters Cell Proliferation and Apoptosis in the Uterus of the Sprague-Dawley Rat." The Open Toxicology Journal **2**: 13-21.

## ABSTRACT

**PURPOSE:** This work studied the modifications in cell proliferation and gene expression in the rat mammary gland of animals 21, 35, 50 and 100 days old that were exposed to 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) during pregnancy (prenatal treatment) or during lactation (prepubertal treatment). **METHODS:** For the prenatal treatment, pregnant Sprague-Dawley rats received on the 15<sup>th</sup> day post-conception, single dose of 3.0µg TCDD/kg through gavage. For the prepubertal treatment, lactate dams received on the 14<sup>th</sup> and 17<sup>th</sup> days post-delivery either 6.67ng or 20.0ng TCDD/g. Control group received equivalent volume of sesame oil. When the female offspring reached 21, 35, 50 and 100 days of age, they were sacrificed and their mammary gland extracted for cell proliferation and gene expression analyses. To calculate the cell proliferation index, ten rats per group received an intraperitoneal injection of 200 mg/kg of 5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and through immunohistochemistry the cells in proliferation were identified in each mammary gland structure. Other ten rats per group had the RNA extracted from the mammary gland and used for gene expression analysis through microarrays. To determine the differentially expressed genes empirical Bayes moderated one sample t-test was performed. Differentially expressed genes ( $p < 0.01$ ) were categorized accordingly with biological function and canonical pathways. In addition, important genes were validated through real time RT-PCR. **RESULTS:** The prepubertal treatment modified the cell proliferation of 35, 50 and 100 days-old rat mammary gland, mainly in the terminal end buds (TEBs). The gene expression analysis showed that the maximum number of differentially expressed genes was reached in 100 days-old rats that received TCDD during pregnancy. The prepubertal treatment induced more changes with higher dose of TCDD. Cyp1b1 was the gene the most up-regulated genes at different ages. The categorization of the dysregulated genes according with their biological function showed that TCDD has a wide action, especially after the prepubertal treatment with high dose. The groups of genes more affected by TCDD were the proto-oncogenes, tumor suppressor genes and genes related to the metabolism of lipids. The most affected canonical pathway was the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. In addition, genes related to estradiol metabolism were modulated increasing the production of metabolites that damage the DNA. **CONCLUSIONS:** The TCDD treatment induced changes in the cell proliferation and gene expression of the rat mammary gland. The genomic changes observed indicate that the mammary cell is submitted to genotoxic stimuli and DNA repair genes as tumor suppressor genes are activated to keep the genomic stability.

**Key-words:** Tetrachlorodibenzodioxin. Gene Expression. Mammary Glands, Animals. Growth and Development.



## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Agilent Technologies. "Agilent SurePrint Technology: Content centered microarray design enabling speed and flexibility". USA: ©Agilent Technologies, Inc; 2003.

Agilent Technologies. "Microarray Data Analysis: Level I- Workshop" [apostilado]. USA: ©Agilent Technologies, Inc; 2006.

Agilent Technologies. "Microarray Data Analysis: Level II- Workshop" [apostilado]. USA: ©Agilent Technologies, Inc; 2006.

Agilent Technologies. "Microarray Data Analysis: Level III- Workshop" [apostilado]. USA: ©Agilent Technologies, Inc; 2006.

Agilent Technologies . "Reference Guide: Agilent Feature Extraction Software (v9.5)". 4<sup>th</sup> ed. USA: ©Agilent Technologies, Inc; 2007.

"Dicionário Priberam da Língua Portuguesa" [dicionário na Internet]; 2009, <http://www.priberam.pt/dlpo/> [consultado em 2008-2009].

Instituto Antônio Houaiss e de Azeredo JC. "Escrevendo Pela Nova Ortografia: Como Usar as Regras do Novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa". São Paulo: Publifolha; 2008.

Lee NH, Saeed A. "Microarray: An Overview". In: Methods in Molecular Biology: Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes. 2<sup>nd</sup> ed. Totowa (NJ): Humana Press Inc.; 2007. p.265-300.

"Michaelis Pequeno Dicionário: Inglês-Português/ Português-Inglês". 62<sup>a</sup> ed. São Paulo: Melhoramentos; 2000.

"Wikipedia: The Free Encyclopedia" [enciclopédia na internet], Wikimedia Foundation Inc; 2001 [consultado em 2008-2009]. Disponível em: [http://en.wikipedia.org/wiki/Main\\_Page](http://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page).

Rother, ET, Braga MER. "Como elaborar sua tese: estrutura e referências". 2<sup>a</sup> ed. Rev. E ampliada. São Paulo; 2005.

Russo, J, Russo IH. "Molecular basis of breast cancer: prevention and treatment". Berlin: Springer; 2004.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)