

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Efeitos da associação entre vitamina A e ácido butírico em células de
adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7**

Fábia de Oliveira Andrade

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Thomas Prates Ong

São Paulo
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Fábia de Oliveira Andrade

Efeitos da associação entre e vitamina A e ácido butírico em células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Thomas Prates Ong
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Ao meu pai Oliveiros e minha mãe Neusa, com carinho e gratidão por sempre acreditarem em mim e me apoiarem incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu forças para continuar mesmo diante de tantos obstáculos;

À minha família por ser meu porto seguro;

Ao Prof. Thomas Prates Ong por acreditar em mim e me aceitar como aluna de mestrado, por dois anos de paciência e orientação e ainda, por aceitar me orientar por mais três anos de doutorado;

Ao Prof. Fernando Salvador Moreno que muito contribuiu para meu crescimento científico;

À Profa. Maria Lúcia Zaidan Dagli, da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, por ceder gentilmente seu laboratório de cultura celular para realização dos meus experimentos;

Ao Prof. João Ernesto de Carvalho, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas e Biológicas da UNICAMP, pela doação das células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7;

Ao Prof. Alceu Afonso Jordão Junior e Prof. Helio Vannucchi, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP, pelas análises da concentração celular de retinóides por cromatografia líquida de alta eficiência;

À Letícia que me deu apoio desde o início do mestrado e por se tornar uma amiga;

À Márcia Nagamine por me ensinar a trabalhar com cultura celular, por sempre estar disposta a ajudar e pela amizade;

À Aline por me ensinar biologia molecular, por sempre ser tão atenciosa e prestativa e ainda por ser uma pessoa muito alegre e otimista, qualidades que transmite a todos que convivem com ela;

À Alessandra por ser uma pessoa carinhosa, atenciosa e meiga que me inspira a ser uma pessoa melhor;

À Clarissa por sempre esclarecer dúvidas sobre cultura celular e também pelas brincadeiras e momentos divertidos no laboratório;

À Maria Aderuza por ser sempre prestativa, por ter me ensinado a técnica de “Western blot” e também pelas caronas até a Faculdade de Medicina Veterinária;

À Mônica por ser uma pessoa que transmite segurança, por ser atenciosa e prestativa, pelas infinitas caronas e ainda pela sua amizade;

À Bruna pelas análises estatísticas e pelas iniciativas de reunir todo o laboratório em confraternizações, que apesar de eu ter ido a poucas, foram momentos muito divertidos e alegres;

Ao Renato Heidor por sua paciência, companheirismo e ajuda em momentos críticos;

Ao Lucas por pacientemente me ensinar e me ajudar na realização da técnica de PCR em tempo real;

À Marguite por ter sido sempre muito atenciosa e solícita;

Ao Carlos por me auxiliar na realização da técnica de “dot blot”;

Ao Rodrigo pela convivência;

Aos estagiários Juliana, Eduardo e Camile por serem sempre prestativos e atenciosos e acima de tudo pela amizade;

À Suzana, Luciana, Roberta e Juliana pela amizade e companheirismo;

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental pela dedicação a todos os alunos;

Ao Joás pelo carinho e por ser meu companheiro em todos os momentos;

À todos os meus outros amigos que mesmo distantes fizeram parte dessa vitória;

À FAPESP pela bolsa de mestrado (Processo 2008/51742-9) e auxílio à pesquisa (Processo 2008/58697-9).

*“Mire na lua. Ainda que erre,
você estará entre as estrelas”*

Les Brown

RESUMO

ANDRADE, F.O. **Efeitos da associação entre vitamina A e ácido butírico em células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7.** 2010. 84f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O câncer de mama é a principal causa de morte por neoplasias em mulheres no mundo. Nutrientes, como vitamina A (VA) e ácido butírico (AB) podem modular a carcinogênese por meio de mecanismos epigenéticos, como acetilação de histonas e metilação do DNA. A associação de agentes desmetilantes do DNA e inibidores de desacetilases de histonas representa estratégia promissora para controle do câncer, inclusive de mama. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da administração de vitamina A e ácido butírico, isolados ou em associação, em células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7. Para tanto, em células MCF-7, tratadas com VA (10 μ M) e/ou AB (1mM) durante diferentes períodos, foram avaliados: crescimento celular, padrão de acetilação de histonas e de metilação global do DNA; expressão dos genes RAR β e CRBP-I, padrão de metilação da região promotora do gene RAR β e concentração celular de retinóides. Em comparação ao controle, representado por células MCF-7 não tratadas com as substâncias, o tratamento com VA e AB associados, mas não isolados, resultou em inibição significativa do crescimento de células MCF-7 ($p > 0,05$) após período de 120hs. Nesse caso, observaram-se inibições do crescimento de 10%, 34% e 46% para os tratamentos com VA, AB e VA+AB, respectivamente. Em comparação ao controle, AB e associação de VA+AB, mas não VA isolada, aumentaram ($p < 0,05$) o nível de acetilação de H3K9, mas não de H4K16, após 96hs de tratamento, não se verificando diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos com AB e VA+AB. VA e AB, isolados ou em associação, não alteraram ($p > 0,05$) o padrão de metilação global do DNA e nem a expressão do gene CRBP-I, em comparação ao controle. AB e associação de VA+AB, mas não VA isolada, aumentaram ($p < 0,05$) a expressão do gene RAR β após 120hs de tratamento, em comparação ao controle, não se verificando diferenças ($p > 0,05$) entre os tratamentos com AB e VA+AB. Células MCF-7 tratadas ou não com VA e AB, isolados ou em associação, apresentaram promotor do gene RAR β predominantemente metilado e níveis não detectáveis de palmitato de retinila. Em comparação ao controle, apenas o tratamento com VA isolada aumentou ($p < 0,05$) da concentração de retinol após 120hs. Com base nos resultados, a associação de VA e AB resultou em efeito inibitório aditivo do crescimento de células MCF-7. Acetilação de histonas H3K9, mas não de H4K16 e metilação do DNA, parece representar alvo epigenético do AB. Aumento da expressão do gene supressor de tumor RAR β parece estar envolvido na inibição do crescimento de células MCF-7 pelo AB. O gene CRBP-I não parece estar envolvido na inibição do crescimento de células MCF-7 pela VA e AB, isolados ou em associação. Ausência de esterificação do retinol em células MCF-7 tratadas ou não com VA e AB, isolados ou em associação, parece se relacionar à expressão reduzida do gene CRBP-1.

Palavras-chave: Câncer de mama. MCF-7. Ácido butírico. Vitamina A. Alvos epigenéticos.

ABSTRACT

ANDRADE, F.O. **Effects of the association between vitamin A and butyric acid on MCF-7 human breast adenocarcinoma cell line.** 2010. 84f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Breast cancer is the leading cause of deaths among women diagnosed with neoplasia worldwide. Nutrients such as vitamin A (VA) and butyric acid (BA) may modulate carcinogenesis through epigenetic mechanisms, such as histone acetylation and DNA methylation. The combination of DNA demethylating agents and histone deacetylase inhibitors represent a promising strategy for cancer control, including breast cancer. This study aimed to evaluate the effects of administration of vitamin A and butyric acid, isolated or combined, on MCF-7 human breast adenocarcinoma cell line. For this, the following parameters were evaluated in MCF-7 cells treated for different periods with VA (10 μ M) and/or BA (1 mM): cell growth, histone acetylation status, global DNA methylation pattern, RAR β and CRBP-I gene expression, RAR β promoter methylation status, and cellular concentration of retinoids. Compared to controls, represented by untreated MCF-7 cells, treatment with VA and BA combined, but not isolated, significantly ($p < 0.05$) inhibited the growth of MCF-7 cells after 120hs. In this case, 10%, 34% and 46% growth inhibitions were observed after treatment with VA, BA and VA+BA, respectively. Compared to controls, BA and its association with VA, but not VA isolated, increased ($p < 0.05$) acetylation level of H3K9, but not of H4K16, after 96hs; no differences were observed between treatments with BA and VA+BA. VA and BA, isolated or combined, did not alter ($p > 0.05$) global DNA methylation pattern and CRBP-I gene expression, compared to controls. BA and its association with VA, but not VA isolated, increased RAR β gene expression after 120hs, compared to controls; no differences were observed between treatments with BA and VA+BA. MCF-7 cells, treated or not with VA and BA, isolated or combined, presented RAR β promoter predominantly methylated and undetectable levels of retinyl palmitate. Compared to controls, only treatment with VA isolated increased ($p < 0.05$) cellular retinol concentration after 120hs. Based on these data, association between VA and BA resulted in additive inhibitory effect on MCF-7 cell growth. Acetylation of H3K9, but not of H4K16, seems to represent a BA epigenetic target. Increased expression of tumor suppressor gene RAR β seems to be involved in BA inhibitory action on MCF-7 cell growth. Neither CRBP-I gene nor global DNA methylation seem to be involved in VA and/or BA inhibitory actions on MCF-7 cell growth. Lack of retinol esterification in MCF-7 cells treated or not with VA and BA, isolated or combined, could be related to reduced CRBP-I gene expression.

Keywords: Breast cancer. MCF-7. Vitamin A. Butyric Acid. Epigenetic targets.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo hipotético do desenvolvimento de tumor de mama	22
Figura 2	Metabolismo do retinol em células de mamíferos	26
Figura 3	Curva de crescimento de células MCF-7 tratadas com VA	44
Figura 4	Curva de crescimento de células MCF-7 tratadas com AB	46
Figura 5	Curva de crescimento de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB	48
Figura 6	Acetilação de H3K9 de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 96hs.	50
Figura 7	Acetilação de H3K9 de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB no período de 120hs	51
Figura 8	Acetilação de H4K16 de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 96hs	52
Figura 9	Metilação global do DNA de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 96hs	54
Figura 10	Metilação global do DNA de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 120hs	55
Figura 11	Expressão do gene RAR β em células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 96hs	56
Figura 12	Expressão do gene RAR β de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 120hs	57
Figura 13	Expressão do gene CRBP-I de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 96hs	58
Figura 14	Expressão do gene CRBP-I de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 120hs	58
Figura 15	Metilação da região promotora do gene RAR β de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 96hs.	59
Figura 16	Concentração de retinol em células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, nos períodos de 96 e 120hs.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	“Primers” e sondas utilizados nas PCR em Tempo Real	39
Tabela 2	Percentual de inibição do crescimento das células MCF-7 por diversas concentrações de VA, nos períodos de 96 e 120hs.	45
Tabela 3	Percentual de inibição do crescimento das células MCF-7 por diversas concentrações de AB, nos períodos de 48, 72, 96 e 120hs.	47
Tabela 4	Percentual de inibição do crescimento das células MCF-7 por VA e/ou AB, nos períodos de 24, 48, 72, 96 e 120hs.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Ácido Butírico
AR	Ácido retinóico
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CRPB	Proteína de ligação ao retinol celular
DMBA	7,12-dimetilbenz[a]antraceno
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ER	Receptor de Estrógeno
GAPDH	Gliceraldeído desidrogenase-3 fosfatase
HAT	Acetil transferase de histonas
HDAC	Desacetilase de histonas
HDACis	Inibidores de desacetilases de histonas
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulphonic acid
HER	Receptor do fator de crescimento epidermal do tipo 2
IMC	Índice de massa corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LRAT	Lecitina:retinol acil-transferase
MAPK	Proteína kinase ativada por mitógeno
MNU	Metil-nitrosouréia
mRNA	RNA mensageiro
MS-PCR	Reação em cadeia pela polimerase específica para metilação
NFκB	Fator nuclear kappa B
Nrf2	Fator 2 relacionado ao NF-E2
PBS	Tampão fosfato- salino

PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinase
PMSF	phenylmethanesulphonylfluoride
RALDH	Retinaldeído desidrogenase
RAR	Receptor de ácido retinóico
RARE	Elemento de resposta ao ácido retinóico
RBP	Proteína de ligação ao retinol
RDH	Retinol desidrogenase
RED	Retinaldeído redutase
RNA	Ácido ribonucléico
RXR	Receptor de retinóide X
SAHA	Ácido hidroxâmico
SAM	S-adenosilmetionina
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TB	Tributirina
TSA	Tricostatina A
VA	Vitamina A
VPA	Ácido valpróico
WHO	Organização Mundial da Saúde
Δ Ct	Delta Ct
$\Delta\Delta$ Ct	Delta delta Ct

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Nutrição e Câncer	16
2.2	Câncer de mama	21
2.2.1	Aspectos gerais	21
2.2.2	Vitamina A	24
2.2.3	Ácido Butírico	28
2.2.4	Associação de ácido butírico com vitamina A	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	Geral.....	32
3.2	Específicos.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	Cultura celular	33
4.2	Curva de crescimento de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB	33
4.3	Avaliação da acetilação no resíduo de lisina 9 da histona 3 (H3K9) e no resíduo de lisina 16 da histona 4 (H4K16).....	34
4.3.1	Extração ácida de histonas de células MCF-7.....	34
4.3.2	“Western blotting” de H3K9 e H4K16 acetiladas	35
4.4	Avaliação do padrão de metilação global do DNA	36
4.4.1	Extração de DNA de células MCF-7	36
4.4.2	Técnica de “Dot blot”	37
4.5	Análise da expressão dos genes RAR β e CRBP-I por PCR em tempo real.....	38
4.5.1	Extração de RNA de células MCF-7	38
4.5.2	Conversão de RNA para cDNA pela enzima transcriptase reversa.....	38
4.5.3	Amplificação dos genes RAR β e CRBP-I	39
4.6	Análise do padrão de metilação do promotor do gene que codifica para RAR β , pela técnica de PCR metilação-específica (MS-PCR).....	40
4.6.1	Modificação do DNA com Bissulfito de Sódio.....	40
4.6.2	Análise do padrão de metilação da região promotora do gene RAR β	41
4.7	Determinação das concentrações celulares de retinol e palmitato de retinila, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	42
4.8	Análises estatísticas	43
5	RESULTADOS.....	44
5.1	Curva de crescimento de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB	44
5.2	Acetilação de H3K9 de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB	49
5.3	Acetilação de H4K16 de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB.....	52
5.4	Padrão de metilação global do DNA de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB	53
5.5	Expressão dos genes para RAR β e CRBP-I de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB.....	56
5.6	Padrão de metilação do promotor do gene que codifica para RAR β de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB.....	59
5.7	Concentrações de retinol e palmitato de retinila de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB.....	60
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÕES	68
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um importante problema de saúde pública que se encontra entre as dez principais causas de morte no mundo (WHO, 2008; INCA, 2009). A alimentação influencia diretamente o risco de desenvolvimento de câncer e o comportamento do tumor (DAVIS; MILNER, 2007). Nos EUA e na Europa, alimentação inadequada está associada a 35% das mortes por câncer (HUANG, 2002; MARTIN-MORENO; SOERJOMATARAM; MAGNUSSON, 2008). Por outro lado, vários nutrientes e compostos bioativos dos alimentos têm sido destacados como agente anticarcinogênicos promissores (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 2007).

Nesse contexto, a elucidação de mecanismos de interação gene-nutriente é de grande importância para se entender como a dieta modula o risco de desenvolvimento de doenças como o câncer (DAVIS; MILNER, 2007; DELAGE; DASHWOOD, 2008). Eventos epigenéticos são susceptíveis a mudanças por fatores ambientais, como a dieta, tornando-se alvos importantes para componentes dos alimentos (ROSS, 2003). Em comparação com células normais, células de câncer humano apresentam uma mudança drástica no status de metilação do DNA, exibindo geralmente uma hipometilação global do DNA, acompanhada de hipermetilação em regiões específicas (DELAGE; DASHWOOD, 2008; KOK; VAN BREDA; MANSON, 2008). Além disso, o desequilíbrio entre a acetilação e desacetilação de histonas está também relacionado à patogênese do câncer (MARKS *et al.*, 2001; MINUCCI; PELICCI, 2006).

Retinóides têm sido considerados importantes classes de substâncias com efeito protetor contra o câncer de mama (SIMEONI; TARI, 2004; ZANARDI *et al.*, 2006). Nesse sentido, aventa-se que múltiplas vias de transdução do sinal estejam envolvidas, com modulação da expressão gênica de forma direta e indireta (WIDSCHWENDTER *et al.*, 2001; ZANARDI *et al.*, 2006). As ações do ácido retinóico (AR), metabólito da vitamina A (VA), são mediadas por seus receptores nucleares, RARs α , β e λ e RXRs α , β e λ , pertencentes à superfamília de fatores transcricionais dependentes de ligante (YANG *et al.*, 1999; FARIAS *et al.*, 2005; BOGOS *et al.*, 2009). Sinalização aberrante de retinol no câncer está relacionada à progressiva perda da expressão de RAR β 2 em vários tipos de câncer, inclusive o de mama (XU *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1999; LOTAN *et al.*, 2005; TANABE *et al.*, 2008), sendo que essa perda parece ser um evento precoce durante a carcinogênese (WIDSCHWENDTER *et*

al., 2001). A metilação da região promotora do gene RAR β 2 tem sido indicada como causa da supressão desse gene (LOTAN 2005; BOGOS *et al.*, 2009). Além do status de metilação do gene RAR β 2, alguns estudos têm considerado também a hipótese que a acetilação de histonas poderia ter um papel importante na inibição da expressão de RAR β 2 em câncer de mama (WIDSCHWENDTER *et al.*, 2001). A perda da produção de AR encontrado no câncer de mama parece estar relacionada à expressão reduzida da proteína ligadora de retinol celular I (CRBP-I), proteína importante para o direcionamento da VA intracelular (ARAPSHIAN *et al.*, 2004; WILLIAMS; CYETKIVIC; HAMILTON, 2009; TAIBI *et al.*, 2009).

Diversos estudos indicam que o ácido butírico (AB), produzido no lúmen intestinal por fermentação bacteriana de carboidratos dietéticos não digeríveis (DAVIE, 2003; HAMER *et al.*, 2008) e encontrado em frutas, hortaliças, mel e, principalmente, na gordura do leite, apresenta ações protetoras contra o câncer de mama (DAVIS *et al.*, 2000; CHOPIN *et al.*, 2002; LOUIS *et al.*, 2004; GONCALVES *et al.*, 2005) e que os principais mecanismos envolvidos incluem modulação da proliferação, morte e diferenciação celular (CHOPIN *et al.*, 2002, 2004; WONG *et al.*, 2006; NOHARA; YOKOYAMA; KANO, 2007). Esses efeitos estão relacionados com atividade de inibição de desacetilases de histonas (HDACi) do AB, resultando em hiperacetilação de histonas (H3 e H4), com consequente favorecimento do acesso de fatores de transcrição ao DNA (WONG *et al.*, 2006; HAMER *et al.*, 2008).

Combinações de HDACi, como o AB, com AR, representam alternativas promissoras para o tratamento e prevenção de leucemias, bem como de tumores sólidos, dentre eles o câncer de mama (WIDSCHWENDTER *et al.*, 2001; SIRCHIA *et al.*, 2002; KALEBIC, 2003; WHANG *et al.*, 2005; MASSART; DENAIS; GIBASSIER, 2006). Propõe-se que butirato e outros agentes dietéticos que modulam epigeneticamente o DNA apresentem maior impacto na redução do risco de câncer quando em associação com retinóides (SPURLING *et al.*, 2008). Uma hipótese nesse sentido seria que ao favorecer a abertura da cromatina, o AB permitiria a ativação transcricional de genes importantes no metabolismo da VA, como CRBP-I e RAR β , facilitando seus efeitos anticarcinogênicos como indução de diferenciação, apoptose e inibição da proliferação celular (WHANG *et al.*, 2005). Avaliaram-se no presente trabalho os efeitos da administração de AB e VA, isolados ou em associação, em células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7. Para tanto, em células MCF-7, tratadas com VA e/ou AB durante diferentes períodos, foram avaliados: crescimento celular, padrão de acetilação de histonas e de metilação global do DNA, expressão dos genes RAR β e CRBP-I, padrão de metilação da região promotora do gene RAR β e concentração celular de retinóides.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nutrição e Câncer

A alimentação influencia diretamente o risco de desenvolvimento de câncer e o comportamento do tumor (DAVIS; MILNER, 2007). Nos EUA e na Europa, alimentação inadequada está associada a 35% das mortes por câncer (HUANG, 2002; MARTIN-MORENO; SOERJOMATARAM; MAGNUSSON, 2008). Desde 1930 estudos epidemiológicos têm demonstrado a relação entre dieta e risco de câncer, dentre eles o de mama (HILL, 1997). Está bem estabelecido que o controle do peso corporal, redução do consumo de gordura animal e alta ingestão de frutas, hortaliças e grãos integrais protegem contra o câncer (HILL, 1997; BÉLIVEAU; GINGRAS, 2007). Estudos recentes confirmam a associação entre o consumo de nutrientes e compostos bioativos presentes em frutas e hortaliças e redução do risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer (BESSAOUD; DAURÈS; GERBER, 2008; MIGNONE *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; LEWIS *et al.*, 2009).

Após análise de evidências sobre alimentação e risco de câncer, o Fundo Mundial de Pesquisa do Câncer (World Cancer Research Fund) estabeleceu metas e recomendações populacionais com objetivo de prevenção do câncer: manter peso corporal adequado (IMC entre 18,5 e 24,9); praticar atividade física diariamente; evitar o consumo de alimentos e bebidas densamente energéticos; consumir no mínimo 5 porções (400g) de vegetais e frutas diariamente; consumir cereais integrais e leguminosas; reduzir o consumo de carne vermelha (menos que 500g por semana); reduzir o consumo de bebidas alcoólicas (2 drinques para homens e 1 drinque para mulheres); reduzir o consumo de sal (6g/dia); utilizar suplementos dietéticos apenas em casos específicos (WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 2007).

Vários nutrientes e compostos bioativos dos alimentos como os ácidos graxos ômega 3, folato, vitamina C, carotenóides, zinco, selênio, flavonóides, isoflavonas, vitamina D, VA e AB têm sido destacados como agente anticarcinogênicos promissores (WORLD RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH, 2007; KOK; VAN BREDA; MANSON, 2008; FERGUSON, 2009).

Processos diretamente relacionados ao desenvolvimento do câncer como proliferação celular, apoptose, angiogênese, metabolismo de carcinógenos, diferenciação celular, regulação hormonal, reparo do DNA e inflamação podem ser influenciados por componentes bioativos dos alimentos, por meio da regulação da expressão gênica (ROSS, 2007; DAVIS; MILNER, 2007; KOK; VAN BREDA; MANSON, 2008).

O ômega 3, por exemplo, atua como um fator antiinflamatório e ativando vias de transdução de sinal intracelular por alterar a composição das membranas celulares (FERGUSON, 2009). Efeitos antioxidantes também são mecanismos pelo quais compostos bioativos dos alimentos atuam na proteção contra o câncer. Dentre eles podem-se citar os polifenóis do chá verde, curcumina, genisteína, resveratrol e licopeno que apresentam efeito quimiopreventivo contra diversos tipos de câncer, inclusive o de mama. Esses antioxidantes modulam vias de transdução de sinais inibindo proteínas importantes para a progressão do ciclo celular como NFκB, MAPKs, PI3K, cateninas e Nrf2. Também promovem o reparo de dano ao DNA, inibem marcadores de proliferação celular, metástase e angiogênese, além de induzir proteínas pró-apoptóticas (KHAN; AFAQ; MUKHTAR, 2008) e promover diferenciação celular e aumento da expressão de genes supressores de tumor (KWON *et al.*, 2007).

Nesse contexto, a elucidação dos mecanismos de interação gene-nutriente é de grande importância para se entender como a dieta modula o risco de desenvolvimento de doenças como o câncer (DAVIS; MILNER, 2007; DELAGE; DASHWOOD, 2008). Disciplina pós-genômica denominada nutrigenômica tem como foco de estudo a influência dos diferentes tipos de nutrientes e compostos bioativos na expressão gênica e, conseqüentemente, no fenótipo (GILLIES, 2003; MARIMAN, 2006; KAPUT *et al.*, 2007; LOVEGROVE; GITAU, 2008; SUBBIAH, 2008; FERGUSON, 2009).

Alterações genéticas que causam ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor representam mecanismos bem estabelecidos responsáveis pelo desencadeamento gradual do câncer em humanos. Contudo, somente eventos genéticos não podem explicar todo o processo de carcinogênese (KANAI; HIROHASHI, 2007), devendo-se também considerar os epigenéticos (BAYLIN; HERMAM, 2000; SPORN; SUH, 2002; KALEBIC, 2003; BAYLIN; OHM, 2006).

Por meio de mecanismos epigenéticos a expressão gênica é seletivamente ativada ou inativada sem alterar a sequência do DNA (ROSS, 2003). Epigenética é, dessa forma, definida como mudança na expressão gênica que é reversível e hereditária, sem qualquer alteração na

seqüência do DNA (ROSS, 2003; SANTOS-ROSA; CALDAS, 2005; BAYLIN; OHM, 2006; HINSHELWOOD; CLARK, 2008).

Há dois tipos mais comuns de modificações epigenéticas: aquela que ocorre em nível de DNA (metilação do DNA) e a que ocorre em nível de cromatina (remodelamento da cromatina) (HINSHELWOOD; CLARK, 2008). A metilação do DNA é uma mudança química enzimática que ocorre normalmente em dinucleotídeos CpGs em mamíferos. O remodelamento da cromatina, por sua vez, ocorre via modificação enzimática de resíduos de histonas, afetando sua interação com o DNA (DUNN; VERMA; UMAR, 2003; SANTOS-ROSA; CALDAS 2005; HINSHELWOOD; CLARK, 2008). As unidades estruturais da cromatina, os nucleossomos, são compostas por histonas e DNA que são essenciais ao empacotamento do genoma eucarioto (MARKS *et al.*, 2001; MINUCCI; PELICCI, 2006). Os nucleossomos estão envolvidos diretamente na regulação da expressão gênica e contêm 146 pares de bases de DNA envoltos no núcleo de octâmero de histonas, o qual é composto por duas cópias de histonas H2A, H2B, H3 e H4 (MARKS *et al.*, 2001).

Outro mecanismo de regulação epigenética da expressão gênica, que apresenta importante papel no desenvolvimento do câncer, são RNAs como os microRNAs (ESTELLER, 2007). MicroRNA é uma classe de RNA não codificante, que regula a transcrição de mRNA por inibir a função ribossômica, alterar a estabilidade e degradar mRNA alvo (GALASSO; SANA; VOLINIA, 2010; DAVIDSON-MONCADA; PAPAVALIIOU; TAM, 2010).

Metilação do DNA refere-se à adição covalente de grupo metil na posição 5 da citosina adjacente a uma guanina. É um processo epigenético fundamental não somente para modulação da expressão gênica, mas também para a estabilidade cromossomal (ROSS, 2003). A hipermetilação do DNA normalmente promove uma estrutura de cromatina altamente condensada através do recrutamento de proteínas organizadoras do DNA, com consequente redução da expressão gênica. A hipometilação do DNA causa, por outro lado, descompactamento da cromatina promovendo rearranjos cromossomais que podem resultar em instabilidade, mudanças estruturais nos cromossomos e aumento na expressão gênica (BAYLIN; OHM, 2006; KANAI; HIROHASHI, 2007).

Em comparação com células normais, células de câncer humano apresentam uma mudança drástica no status de metilação do DNA, geralmente exibindo uma hipometilação global do DNA, acompanhada de hipermetilação em regiões específicas (KALEBIC, 2003; KANAI; HIROHASHI, 2007; DELAGE; DASHWOOD, 2008; KOK; VAN BREDA; MANSON, 2008). A hipermetilação de ilhas CpGs próximo a regiões regulatórias de genes

silencia genes importantes para o processo da carcinogênese, como os supressores de tumor (HERMAN, 1999; GOODMAN; WATSON, 2002; KALEBIC, 2003; KANAI; HIROHASHI, 2007). Alterações no padrão de metilação do DNA já ocorrem em estágios iniciais da carcinogênese (DUNN; VERMA; UMAR, 2003; KANAI; HIROHASHI, 2007). Além disso, metilação aberrante do DNA é associada à falta de diferenciação do tumor, agressividade e mau prognóstico (KANAI; HIROHASHI, 2007).

Além da metilação do DNA, a acetilação de histonas está envolvida na remodelação da cromatina, reparo e replicação do DNA, segregação cromossômica e expressão gênica (DELAGE; DASHWOOD, 2008; LIU; LI; TOLLEFSBOL; 2008). Dois grupos de enzimas, acetil transferases de histonas (HAT) e desacetilases de histonas (HDAC) apresentam papel crítico na regulação da acetilação de histonas e na manutenção da estrutura da cromatina (KALEBIC, 2003). Acetilação (particularmente nas caudas de histonas H3 e H4) tem sido relacionada ao estado da cromatina que permite a transcrição ou que corresponde a regiões genômicas transcricionalmente ativas (MINUCCI; PELICCI, 2006; SEKHAVAT; SUN; DAVIE, 2007), enquanto que a desacetilação de histonas promove a inativação gênica por favorecer o estado condensado da cromatina (SEKHAVAT; SUN; DAVIE, 2007). Assim, HAT e HDAC estão envolvidas na ativação e repressão de genes, respectivamente (MINUCCI; PELICCI, 2006).

O desequilíbrio entre a acetilação e desacetilação de histonas está relacionado à patogênese do câncer (MARKS *et al.*, 2001; MINUCCI; PELICCI, 2006). Nesse sentido, há evidências de que a atividade da enzima HDAC encontra-se aumentada em tumores sólidos e hematológicos, bem como em linhagens de células de câncer (KALEBIC, 2003), promovendo o silenciamento de genes envolvidos no controle da progressão do ciclo celular, diferenciação e/ou apoptose (MARKS *et al.*, 2001).

Eventos epigenéticos são susceptíveis a mudanças por fatores ambientais, como a dieta, tornando-se alvos importantes para a redução do risco de câncer e inibição do desenvolvimento do tumor (ROSS, 2003). A re-expressão de genes silenciados epigeneticamente pode resultar na supressão do crescimento do tumor bem como aumentar a sensibilidade a fármacos anti-neoplásicos (KALEBIC, 2003). O aprofundamento do conhecimento a respeito do impacto de modulações epigenéticas no câncer torna-se fundamental para a descoberta de novos alvos terapêuticos e, conseqüentemente, de novas substâncias anti-neoplásicas, além de permitir o desenvolvimento de biomarcadores para monitorar a eficácia de intervenções terapêuticas (KALEBIC, 2003; BAYLIN; OHM, 2006).

Alguns nutrientes como folato, metionina, colina, genisteína, ácido retinóico e AB podem modular mecanismo epigenéticos como o status de metilação do DNA, interferindo diretamente no risco de desenvolvimento de câncer (ROSS, 2003; DI CROCE *et al.*, 2002; SPURLING *et al.*, 2008). Em indivíduos com câncer de cólon e que apresentavam uma ingestão elevada de VA, observou-se frequências reduzidas de hipermetilação das regiões promotoras dos genes envolvidos no metabolismo dessa vitamina (ESTELLER *et al.*, 2002).

Componentes que inibem ou ativam HDAC e HAT, respectivamente, são potenciais agentes quimiopreventivos ou terapêuticos para doenças como câncer (KIM; KIM; KWON, 2003; MINUCCI; PELICCI, 2006; WALKINSHAW; YANG, 2008), pois produzem diversos efeitos celulares como bloqueio do crescimento, diferenciação e apoptose *in vitro* e *in vivo* (MINUCCI; PELICCI, 2006).

Uma grande variedade de compostos bioativos encontrados na dieta podem modular HDAC e, conseqüentemente, o status de acetilação de histonas (DELAGE; DASHWOOD, 2008). Estudos têm apresentado efeitos anticarcinogênicos de alguns HDACis (inibidores de desacetilases de histonas) encontrados nos alimentos, como AB (DEMARY; WONG; SPANJAARD, 2001; KUEFER *et al.*, 2004; SANTOS; MARTINEZ-IGLESIAS; ARANDA, 2007) e tributirina (TB), um pró-fármaco do ácido butírico (CHEN; BREITMAN, 1994; MAIER *et al.*, 2000; CLARKE; FEINMAN; HARRISON, 2001; KUEFER *et al.*, 2004; SCHRODER; MAURER, 2002).

O AB e seu pró-fármaco TB têm apresentado efeito protetor contra diversos tipos de cânceres, como de mama, próstata, melanoma, fígado, cólon e neuroblastoma, tanto quando administrado isoladamente ou em associação com outras substâncias (WATKINS *et al.*, 1999; DAVIS *et al.*, 2000; MAIER *et al.*, 2000; GASCHOTT *et al.*, 2001; DEMARY; WONG; SPANJAARD, 2001; KUEFER *et al.*, 2004; SANTOS; ZAMBRANO; ARANDA, 2007; KUROIWA-TRZMIELINA *et al.*, 2009).

2.2 Câncer de mama

2.2.1 Aspectos gerais

O câncer está entre as dez principais causas de morte no mundo. Estima-se que 7,4 milhões de pessoas morreram de câncer em 2004 e que até 2015 morrerão mais de 83,2 milhões de pessoas. Entre as mulheres o câncer de mama é a causa mais comum de mortalidade, correspondendo a 16% das mortes por câncer em mulheres adultas (WHO, 2008). A cada ano, cerca de 1 milhão de mulheres no mundo são diagnosticadas com a doença (HANF;GONDER, 2005). Também no Brasil o câncer de mama é o que mais causa morte em mulheres, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA). A estimativa de casos novos para o Brasil em 2010 é de 49.240, com risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2009).

Os fatores de risco de câncer de mama incluem: menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação e menopausa tardias, uso de anticoncepcionais orais, uso de terapia de reposição hormonal, idade mais avançada, história familiar e etnia (BALLARD-BARBASH *et al.*, 2009; INCA, 2009).

Além desses fatores de risco, outros relacionados ao estilo de vida, como ingestão de álcool, hábito alimentar, inatividade física e peso corporal têm sido relacionados ao desenvolvimento de câncer de mama (PATEL;SHARMA;JORDAN,2007; BESSAOUD;DAURÈS;GERBER, 2008; MARTIN-MORENO;SOERJOMATARAM; MAGNUSSON, 2008). Busca-se estabelecer quais estilos de vida poderiam reduzir o risco de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres com risco médio e direcionar a quimioprevenção para mulheres com alto risco. A necessidade de estratégias de redução do risco da doença deve ser enfatizada, visto que este tipo de câncer, além de ser o mais comum entre as mulheres, tem apresentado aumento significativo da sua incidência, especialmente nos países em desenvolvimento (CUZICK, 2008).

A história natural do câncer de mama envolve progressão através de estágios patológicos e clínicos definidos, iniciando-se com hiperproliferação ductal, com evolução para carcinoma *in situ* e invasivo e, finalmente, para doença metastática (Figura 1). Ductos normais de mama são compostos de membrana basal e uma camada de células mioepiteliais e epiteliais. As células que compõem o estroma incluem vários leucócitos, fibroblastos,

miofibroblastos e células endoteliais. Em carcinoma *in situ* as células mioepiteliais são epigeneticamente e fenotipicamente alteradas e encontram-se em número reduzido, potencialmente devido à degradação da membrana basal. Concomitantemente, o número de fibroblastos estromais e miofibroblastos, linfócitos e células endoteliais aumentam. Perda de células mioepiteliais e membrana basal resultam em carcinoma invasivo, no qual células neoplásicas podem invadir tecidos ao redor e migrar para órgãos distantes, eventualmente levando à metástase. O câncer de mama é iniciado com transformação (genética e epigenética) em uma única célula, seguida por progressão do tumor. Esta etapa é direcionada pelo o acúmulo de alterações genéticas adicionais combinadas com expansão clonal e seleção (POLYAK, 2007).

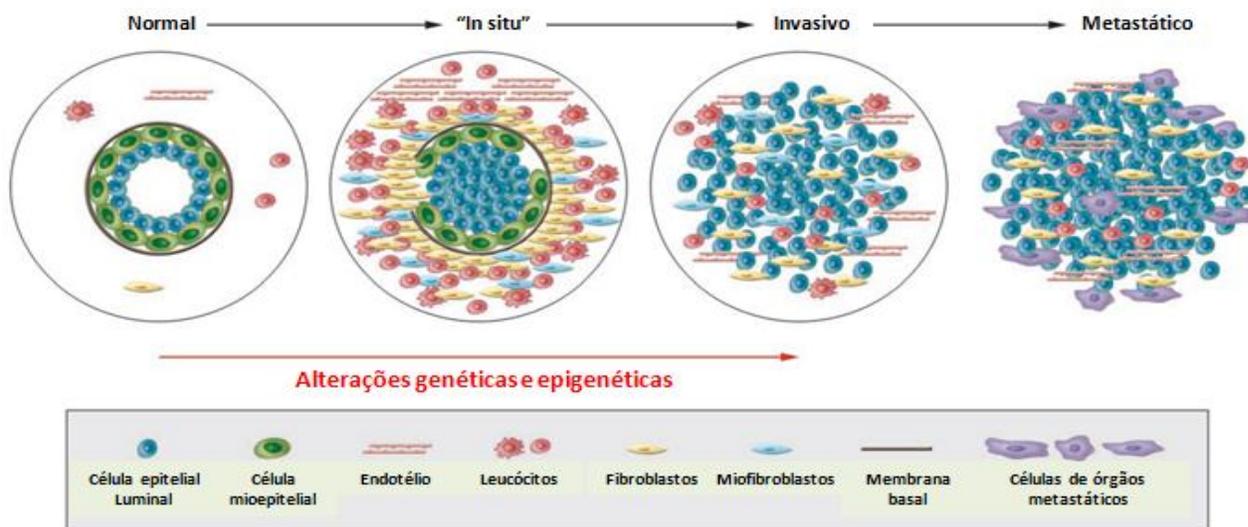


Figura 1: Modelo hipotético do desenvolvimento de tumor de mama. A figura representa a mudança da mama normal para carcinoma *in situ*, invasivo e metastático. (Fonte: Polyak, 2007).

Os tumores de mama são bastante heterogêneos em sua história natural e na resposta aos tratamentos (HUGH *et al.*, 2009; RAKHA *et al.*, 2009). A variação do programa transcricional representa grande parte da diversidade biológica dos tumores e células neoplásicas. Assim, os tumores de mama podem ser classificados em nível clínico e molecular (PEROU *et al.*, 2000). Perfis de expressão gênica de grandes grupos de tumores revelam quatro subtipos moleculares de câncer de mama: “basal-like”, luminal, HER2+/ER-, e “normal breast-like” (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; POLYAK, 2007; HUGH *et al.*, 2009).

O grupo de tumores luminiais pode ser subdividido em outros subgrupos (luminal A, B e C) que são tumores que expressam o gene para o receptor de estrógeno, ou seja, são

considerados ER+, além de expressar genes característicos de célula epitelial luminal. Já os tumores “basal-like” são ER- e expressam genes característicos de célula epitelial basal. Há também tumores que superexpressam a proteína HER2 e possuem baixa expressão de ER (HER2+/ER-) (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; LOI, 2008; HUGH *et al.*, 2009). Os tumores “normal breast like” são assim definidos por expressar genes característicos de célula epitelial basal e célula adiposa, além de apresentar baixa expressão de genes característicos de célula epitelial luminal (PEROU *et al.*, 2000). Os tumores ER+ representam 50 a 60% de todos os tumores de mama (VAN DIJK *et al.*, 1997). As diferenças moleculares resultam em padrões clínicos diferentes e respostas distintas aos tratamentos. Em geral, tumores luminal A apresenta o melhor prognóstico, enquanto “basal-like” e HER2+/ER- apresentam o pior prognóstico (SORLIE *et al.*, 2001; POLYAK, 2007; RAKHA *et al.*, 2009).

A linhagem de células MCF-7 é uma linhagem de célula epitelial luminal ER+ (PEROU *et al.*, 2000) e vem sendo utilizada, desde a década de 1980, como modelo de estudo para tumores de mama que expressam o receptor de estrógeno (BRANDES; HERMONAT, 1983).

Estudos do controle do câncer *in vitro* são de grande importância para determinar biomarcadores intermediários de transformação, avaliar a eficácia de um agente candidato a quimioprevenção antes de ser aplicado em um modelo *in vivo*, bem como para selecionar agentes apropriados para serem testados em estudos clínicos de prevenção de câncer. Além disso, permitem identificar importantes vias responsáveis por efeitos protetores de substâncias naturais ou sintéticas e descobrir novos alvos terapêuticos (DRAGNEV; RIGAS; DMITROVSKY, 2000; DAMIA; D'INCALCI, 2009). Dentre os vários modelos experimentais disponíveis para o estudo do câncer, linhagens de células de cânceres humanos têm sido amplamente utilizadas. As linhagens de células são homogêneas, de fácil propagação, geneticamente manipuláveis e fornecem resultados reproduzíveis. Uma importante desvantagem do uso de modelos *in vitro* refere-se à ausência de influência do microambiente do tumor, incluindo a organização tecidual, fatores de crescimento e hormônios fisiológicos e comunicação com outras células como fibroblastos, células endoteliais e do sistema imune (van STAVEREN *et al.*, 2009).

2.2.2 Vitamina A

Retinóides têm sido considerados importantes classes de substâncias com efeito protetor contra o câncer de mama e por isso estão sendo amplamente avaliados em estudos clínicos de prevenção de câncer (SIMEONI; TARI, 2004; ZANARDI *et al.*, 2006; RECCHIA *et al.*, 2009). Apesar de os mecanismos moleculares de ação da VA no contexto do câncer de mama não terem sido ainda completamente elucidados, acredita-se que múltiplas vias de transdução do sinal estejam envolvidas, com modulação da expressão gênica de forma direta e indireta (WIDSCHWENDTER *et al.*, 2001; ZANARDI *et al.*, 2006).

A relação entre retinóides e indução de diferenciação celular e, conseqüentemente, inibição do desenvolvimento de câncer é conhecida desde a década de 1920. Porém, foi apenas na década de 1970 que se iniciaram os estudos de prevenção do câncer com uso farmacológico de retinóides, com base no conhecimento de que essas substâncias promovem o bloqueio ou reversão de processos patológicos, por estimular processos fisiológicos como diferenciação (SPORN, 1977). Dados epidemiológicos, clínicos e experimentais fornecem evidências consistentes a cerca dos efeitos benéficos do uso de retinóides na terapia e prevenção do câncer (DRAGNEV; RIGAS; DMITROVSKY, 2000).

A VA exerce suas funções dentro das células quando convertida a ácido retinóico (AR), seu metabólito ativo (MIRA-Y-LOPEZ *et al.*, 2000; FARIAS *et al.*, 2005). Esse derivado da VA regula processos biológicos importantes incluindo proliferação, diferenciação e morte celular, apresentando assim papel importante no desenvolvimento da embriogênese, crescimento e manutenção de tecidos adultos (DONATO; NOY, 2005).

VA é obtida pela alimentação na forma de éster de retinila, em produtos de origem animal, e na sua forma precursora (β -caroteno), em vegetais alaranjados e verdes escuros (SILVEIRA; MORENO, 1998; MONGAN; GUDAS, 2007). Ésteres de retinila são hidrolizados no lúmen intestinal e re-esterificados no enterócito. Juntamente com o β -caroteno, são incorporados em quilomícrons para distribuição tecidual, principalmente para o fígado (SILVEIRA; MORENO, 1998). O retinol é secretado pelos hepatócitos complexado à proteína de ligação ao retinol (RBP4) para suprir os requerimentos de VA do organismo (SILVEIRA; MORENO, 1998; MONGAN; GUDAS, 2007). Dentro das células o retinol pode seguir diferentes vias: ser estocado na forma de éster de retinila, metabolizado a AR ou mesmo retornar para a circulação sistêmica (SILVEIRA; MORENO, 1998) (Figura 2).

Uma proteína importante para direcionamento do retinol intracelular é a proteína de ligação ao retinol celular (CRBP-I). CRBP-I liga-se ao retinol com alta afinidade e regula tanto a esterificação e estoque de retinol, como a oxidação de retinol a AR (ONG, 1994; DRAGNEV; RIGAS; DMITROVSKY, 2000; SPINELLA; DMITROVSKY, 2000; KUPPUMBATTI *et al.*, 2001). O retinol é convertido primeiramente a retinaldeído e posteriormente a AR, por meio da ação de enzimas como a álcool desidrogenase e retinol desidrogenase. A proteína CRBP-I favorece o reconhecimento do substrato retinol por parte da enzima retinol desidrogenase, aumentando sua afinidade (NAPOLI, 1996; SILVEIRA; MORENO, 1998; TAIBI *et al.*, 2009).

Além disso, CRBP-I facilita a esterificação e estoque de retinol porque a enzima lecitina: retinol acil-transferase (LRAT), responsável pela esterificação do retinol (NAPOLI, 1996; LOTAN 2005; MONGAN; GUDAS, 2007), é muito mais ativa quando o substrato retinol é apresentado complexado com CRBP-I (LOTAN, 2005).

As ações do AR são mediadas por seus receptores nucleares RARs α , β e λ e RXRs α , β e λ , pertencentes à superfamília de fatores transcricionais dependentes de ligante (YANG *et al.*, 1999; FARIAS *et al.*, 2005; BOGOS *et al.*, 2008). A ligação do AR aos RARs desencadeia mudanças conformacionais no DNA, promovendo a dissociação de correpressores e o recrutamento de coativadores. Estes por sua vez, promovem a abertura da estrutura da cromatina, permitindo o acesso do maquinário transcricional à região promotora. Isso ativa a transcrição de múltiplos genes alvos, incluindo genes envolvidos na diferenciação, controle do ciclo celular, apoptose e inibição da proliferação celular (DRAGNEV; RIGAS; DMITROVSKY, 2000; SCHUG *et al.*, 2008).

RARs funcionam como heterodímeros (RXR-RAR), os quais se ligam a sequências específicas de DNA (elementos de resposta ao ácido retinóico, RARE) localizadas em regiões regulatórias de seus genes alvos (YANG *et al.*, 1999; DONATO; NOY, 2005; BOGOS *et al.*, 2008).

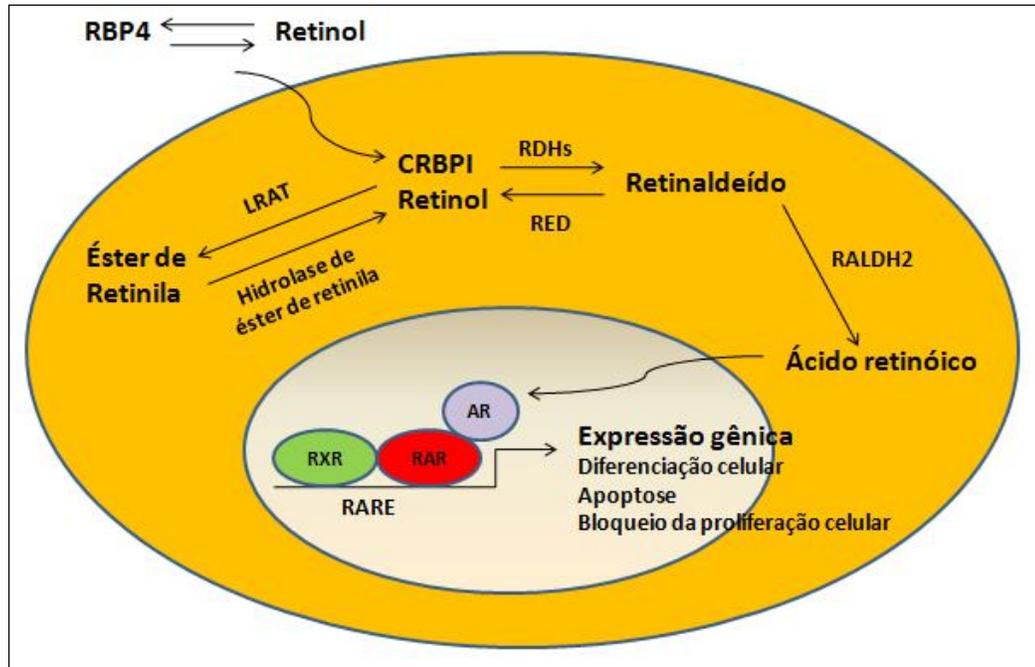


Figura 2: Metabolismo do retinol em células de mamíferos. O retinol complexado com CRBP-I pode ser convertido a éster de retinila, através da ação da enzima LRAT, ou ser convertido a retinaldeído e posteriormente a ácido retinóico, através da ação das enzimas RDH e RALDH2. O ácido retinóico pode assim exercer suas funções ligando ao seu receptor nuclear e ativar a transcrição gênica. RBP4, proteína de ligação ao retinol plasmático; LRAT, lecitina:retinol acil-transferase; RDHs, retinol desidrogenase; RED, retinaldeído redutase; RALDH2, retinaldeído desidrogenase; CRBP-I, proteína de ligação ao retinol celular; RXR, receptor de retinóide X; RAR, receptor de ácido retinóico (Adaptado: MONGAN; GUDAS, 2007).

O metabolismo da VA encontra-se alterado no câncer de mama. Diferentemente de células epiteliais de mama normal, células neoplásicas mamárias apresentam níveis reduzidos ou não detectáveis de AR, decorrente de produção deficiente desse metabólito (MIRA-Y-LOPEZ *et al.*, 2000). Sinalização aberrante de retinol em vários tipos de câncer, incluindo o de mama, está relacionado à perda progressiva da expressão de RAR β 2, (XU *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1999; LOTAN *et al.*, 2005; TANABE *et al.*, 2008), que parece ser evento precoce durante a carcinogênese (WIDSCHWENDTER *et al.*, 2001).

A indução da expressão de RAR β 2 por AR em células de câncer de mama ER+ (ZR-75 e T-47D) parece ser responsável pela inibição do crescimento promovido por esse retinóide. Em células ER- (MDA-MB 231 e MDA-MB 468), que são resistentes ao tratamento com AR, a re-expressão de RAR β 2 por transfecção restaura a sensibilidade dessas células ao AR, com consequente inibição do crescimento celular (LIU *et al.*, 1996).

O padrão de metilação da região promotora do gene RAR β 2 têm sido indicado como a causa da supressão desse gene (LOTAN 2005; BOGOS *et al.*, 2008). Em linhagens de células de câncer de mama, bem como em tumores de mama, o promotor do gene RAR β 2 apresenta-

se hipermetilado independente do status do receptor de estrógeno (SIRCHIA *et al.*, 2000). Em células de leucemia promioclótica aguda, o tratamento com AR promoveu a desmetilação e reexpressão do gene RAR β , com consequente diferenciação celular (DI CROCE *et al.*, 2002). Porém, algumas células neoplásicas, como as de cólon, são frequentemente resistentes ao tratamento com AR, em parte devido ao silenciamento do gene RAR β 2 por meio da hipermetilação do seu promotor (SPURLING *et al.*, 2008).

Além do status de metilação do gene RAR β 2, tem-se considerado também a hipótese no câncer de mama de que a desacetilação de histonas poderia ter papel importante na inibição da expressão de RAR β 2, que tem sido detectada mesmo na ausência de metilação do DNA (WIDSCHWENDTER *et al.*, 2001).

Sirchia *et al.*(2002) sugerem que a reativação do gene RAR β 2 por doses farmacológicas de AR só é possível quando há um nível adequado de acetilação de histonas. Ressalta-se que o tratamento com AR isolado pode aumentar a acetilação de histonas e, conseqüentemente, a reativação gênica, somente em células que apresentam RAR β 2 hipoacetilado (T-47D), mas não em células que apresentem o promotor desacetilado (MCF-7). De acordo ainda com esses autores, a reacetilação de histonas H3 e H4 com HDACis favorece a reativação do gene RAR β 2 em células MCF-7 (ER+) e MDA-MB231 (ER-) quando tratadas com AR.

Em adição à perda da expressão de receptores de AR, o câncer de mama está associado a defeitos no processamento de retinol e perda da habilidade em esterificar e estocar esse nutriente (CHEN *et al.*, 1997), com consequente diminuição dos níveis de éster de retinila e AR (MIRA-Y-LOPEZ *et al.*, 2000).

Anormalidades no metabolismo da VA parecem estar ligadas a alterações que ocorrem na via de sinalização do retinóide antes da etapa de ativação dos receptores nucleares, ou até mesmo antes da sua conversão a AR. Nesse sentido, esses defeitos alterariam a esterificação e armazenamento de retinol, gerando a deficiência local de retinóides como ésteres de retinila e AR. Sugere-se que a diminuição dos níveis de RAR β é causada, em parte, pela deficiência local de VA (LOTAN 2005), visto que a ativação fisiológica de RAR é dependente dos níveis de AR, que são dependentes, por sua vez, da disponibilidade dos estoques de retinol (FARIAS *et al.*, 2005).

A perda da produção de AR em células neoplásicas parece estar relacionada à expressão reduzida da proteína CRBP-I, que tem sido associada ao processo de carcinogênese (ARAPSHIAN *et al.*, 2004; WILLIAMS; CYETKIVIC; HAMILTON, 2009; TAIBI *et al.*, 2009). Por outro lado, a indução da expressão de CRBP-I em células de câncer de mama

resultou em aumento da esterificação e armazenamento de retinol, bem como em redução da capacidade dessas células de se proliferarem (KUPPUMBATTI *et al.*, 2001).

A expressão de CRBP-I encontra-se diminuída em células de câncer de mama, como MCF-7 e MDA-MB 231 (KUPPUMBATTI *et al.*, 2000, 2001; ARAPSHIAN *et al.*, 2004; TAIBI *et al.*, 2009) e quando essa expressão é restaurada, observam-se efeitos supressivos de tumor (KUPPUMBATTI *et al.*, 2000, 2001). Outros tipos de cânceres também apresentam perda da expressão dessa proteína como o de nasofaringe, esôfago, estômago, cólon, fígado, próstata, rins, bem como células leucêmicas. Esse evento é observado mesmo em estágios precoces da carcinogênese, como em lesões displásicas de ovários humanos (WILLIAMS; CYETKIVIC; HAMILTON, 2009). Essa perda ou reduzida expressão de CRBP-I parece estar relacionada também à hipermetilação de ilhas CpGs na região promotora do gene (ARAPSHIAN *et al.*, 2004; LOTAN, 2005; WILLIAMS; CYETKIVIC; HAMILTON, 2009).

Esteller *et al.* (2002) ao estudarem diversas linhagens de células neoplásicas como a MCF-7 e tumores primários de humanos, inclusive de mama, observaram hipermetilação conjunta dos promotores dos genes para CRBP-I e RAR β . Dessa forma, assim como o RAR β (SUN; LOTAN, 2002), o gene para CRBP-I vem sendo também considerado supressor de tumor (ESTELLER, 2003).

2.2.3 Ácido Butírico

AB é um ácido graxo de cadeia curta produzido no lúmen intestinal por fermentação bacteriana de carboidratos dietéticos não digeríveis (DAVIE, 2003; HAMER *et al.*, 2008). Também é encontrado em frutas, hortaliças, mel e, principalmente, na gordura do leite (CHOPIN *et al.*, 2002, 2004). É uma importante fonte de energia para as células epiteliais, além de favorecer a saúde colônica por apresentar diferentes ações, como antiinflamatória, melhora da barreira intestinal e diminuição do stresse oxidativo (HAMER *et al.*, 2008). As concentrações plasmáticas de AB normalmente alcançam em média de 0,5 a 3,9 μ M (WONG *et al.*, 2006; HAMER *et al.*, 2008).

Diversos estudos *in vitro* demonstram que o AB apresenta ações protetoras contra o câncer de mama (DAVIS *et al.*, 2000; CHOPIN *et al.*, 2002; LOUIS *et al.*, 2004; GONCALVES *et al.*, 2005) e que os principais mecanismos envolvidos incluem modulação da proliferação, morte e diferenciação celular (CHOPIN *et al.*, 2002, 2004; WONG *et al.*,

2006; NOHARA; YOKOYAMA; KANO, 2007). Efeitos do AB na indução da diferenciação e inibição da proliferação de células de câncer de mama, como a MCF-7, têm sido demonstrados desde a década de 1980 (ABE; KUFU, 1984a; ABE; KUFU, 1984b).

Em estudo conduzido em ratas Sprague-Dawley submetidas a modelo de carcinogênese de mama induzido pelo agente carcinogênico 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA), o AB, administrado a 6% na ração, resultou em redução da incidência de carcinomas mamários (YANAGI; YAMASHITA; IMAI, 1993). De forma semelhante, o AB, na forma de TB (um triacilglicerol contendo 3 moléculas de ácido butírico), inibiu o desenvolvimento de adenocarcinomas mamários quando administrado a 3% na ração, antes e após a iniciação com o carcinógeno metil-nitrosouréia (MNU) (BELOBRAJDIC; MCINTOSH, 2000).

O mecanismo de ação anticarcinogênica do AB não é completamente entendido. Descreve-se que sua influência na função celular ocorre por meio da regulação da expressão gênica, por meio da modulação de processos epigenéticos, como hiperacetilação de histonas (BOFFA; MARIANI; PARKER, 1994; PARODI, 1997; DEMARY; WONG; SPANJAARD, 2001; CHOPIN *et al.*, 2004; KUEFER *et al.*, 2004; SANTOS; ZAMBRANO; ARANDA, 2007). Esse efeito relaciona-se com a atividade de inibição de HDAC (HDACi) do AB, resultando em hiperacetilação de histonas (H3 e H4), com conseqüente favorecimento do acesso de fatores de transcrição ao DNA (WONG *et al.*, 2006; HAMER *et al.*, 2008). Interessantemente, células de câncer parecem ser mais sensíveis a ação de inibidores de desacetilases de histonas em comparação a células não transformadas, embora a base mecanística para essa aparente seleção seja pouco entendida (HAMER *et al.*, 2008).

Em linhagens de células de câncer de mama (MCF-7 e Hs578T) butirato inibiu a síntese de DNA em até 90%, induziu apoptose e aumentou a expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, em decorrência do aumento na acetilação de histonas (TSUBAKI *et al.*, 2001). De forma similar, outros estudos mostraram que AB aumentou a acetilação de histona H3 em células MCF-7 e MDA-MB231, com conseqüente indução de morte celular. Além disso, induziu a expressão de p21^{waf1/cip1}, bloqueou a fosforilação da proteína retinoblastoma e inibiu a expressão de ciclina D1, mesmo na presença de estrógeno (DAVIS *et al.*, 2000; SANTOS; MARTINEZ-IGLESIAS; ARANDA, 2007). O AB também realçou a sensibilidade de células de câncer de mama (MCF-7) e coloretal (RKO) à radiação, isoladamente ou em associação com o agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxicitidina, por promover o relaxamento da cromatina (CHO *et al.*, 2009).

O AB foi um dos primeiros compostos dos alimentos descobertos com atividade de HDACi (SPURLING *et al.*, 2008). Vale destacar que essa ação do AB é altamente seletiva resultando na ativação de determinados genes, como os supressores de tumor, incluindo o p21^{waf1/cip1}, e na repressão de outros, como oncogenes, sendo que nesse último caso também seria relevante a sua hipermetilação (PARODI, 1997; CHOPIN *et al.*, 2004).

2.2.4 Associação de ácido butírico com vitamina A

Componentes dietéticos que modulam múltiplos alvos moleculares podem exercer efeitos aditivos ou sinérgicos no controle do câncer (DAVIS; MILNER, 2007). Assim, tem-se alcançado sucesso com estratégias de combinação de agentes quimiopreventivos ou terapêuticos para controle de diferentes tipos de câncer (HAHN *et al.*, 2008). Terapia com combinações envolvendo retinóides e outros agentes destacam-se como estratégia farmacológica promissora (DRAGNEV; RIGAS; DMITROVSKY, 2000). Nesse sentido, por exemplo, a combinação de AR com tamoxifeno, um agente terapêutico e quimiopreventivo do câncer de mama, pode promover maior eficácia na prevenção do câncer de mama ou mesmo em terapias adjuvantes (ANZANO *et al.*, 1994; SEAROVIC *et al.*, 2009; CZECZUGA-SEMENIUK; LEMANCEWICZ; WOLCZYNSKI, 2009).

Combinações de HDACi, como o AB, com AR, também representam alternativas promissoras para o tratamento e prevenção de leucemias, bem como de tumores sólidos, dentre eles o câncer de mama (WIDSCHWENDTER *et al.*, 2001; SIRCHIA *et al.*, 2002; KALEBIC, 2003; WHANG *et al.*, 2005; MASSART; DENAIS; GIBASSIER, 2006).

Na ausência de ligante, receptores de AR recrutam complexo corregulador com atividade HDAC, reprimindo a transcrição gênica. Quando AR liga-se aos RARs, promove liberação de proteínas HDACs e recruta coativadores transcricionais associados à HAT (HAHN *et al.*, 2008). Entretanto, algumas células de câncer, inclusive de mama, são resistentes ao AR. Nesse sentido, o tratamento dessas células com AR e HDACis como AB, fenilbutirato (análogo do butirato), tricostatina A (TSA) e ácido valpróico (VPA), é capaz de restaurar a sensibilidade ao AR por reverter a repressão gênica, favorecendo a atividade quimiopreventiva de retinóides (SIRCHIA *et al.*, 2000; DELAGE; DASHWOOD, 2008; HAHN *et al.*, 2008).

O tratamento com associação de AR e HDACis (VPA e TSA) promove aumento da acetilação de histonas H3 do promotor do gene RAR β , restaurando sua expressão e inibindo o crescimento de células de câncer de mama, inclusive daquelas que são resistentes ao AR (MDA-MB-231), bem como de tumores mamários *in vivo* (SIRCHIA *et al.*, 2000; SIRCHIA *et al.*, 2002; MONGAN; GUDAS, 2005). Este efeito também foi observado após o tratamento de células de melanoma A375 com AB em associação com AR (DEMARY; WONG; SPANJAARD, 2001) e de células de hepatocarcinoma (HepG2) com retinoide e VPA (TATEBE *et al.*, 2009).

Da mesma forma, o tratamento com outro HDACi (MS-275) reverteu a resistência de células de tumor renal humano ao tratamento com AR, por alterar o padrão de acetilação de histonas do promotor do gene RAR β 2. Além disso, o tratamento combinado de MS-275 com AR resultou em atividade antineoplásica mais pronunciada quando comparado a essas substâncias isoladas (WANG *et al.*, 2005). Também em células de neuroblastoma a associação de AR com HDACis como VPA, SAHA e LAQ 824 resultou em ações sinérgicas na indução da diferenciação celular, bem como na indução da apoptose e redução da viabilidade celular (HAHN *et al.*, 2008).

Pró-fármacos sintéticos, que associam AR com TB, foram desenvolvidos e apresentaram efeito antiproliferativo em linhagens de células de câncer de mama (MDA-MB 231) e de câncer de cólon (PC-3) (GEDIYA *et al.*, 2008).

Além de aumentar a acetilação de histonas, o AB parece diminuir os níveis de metilação de promotores gênicos devido, em parte, à inibição de HDAC. Em células de câncer de colon HT29 e HCT116, AB, juntamente com AR, aumentou a expressão de RAR β 2, por reverter a metilação aberrante do promotor desse gene. Nesse trabalho os autores concluíram que a influência do butirato na metilação do DNA parece ser limitada a sítios específicos e não a uma ação global (SPURLING *et al.*, 2008).

Propõe-se que butirato e outros agentes dietéticos que modulam epigeneticamente o DNA apresentem maior impacto na redução do risco de câncer quando em associação com retinóides (SPURLING *et al.*, 2008). Uma hipótese nesse sentido seria que ao favorecer a abertura da cromatina, o AB permitiria a ativação transcricional de genes importantes no metabolismo da VA, como CRBP-I e RAR β , facilitando seu efeito anticarcinogênico como indução de diferenciação, apoptose e inibição da proliferação celular (WHANG *et al.*, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar os efeitos da administração de vitamina A (VA) e ácido butírico (AB), isolados ou em associação, em células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7.

3.2 Específicos

- Avaliar a ocorrência ou não de ações sinérgicas entre VA e AB contra o crescimento de células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7.
- Avaliar em células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7 tratadas com VA e AB, isoladamente ou em associação:
 - Padrão de acetilação de histonas H3 e H4;
 - Padrão de metilação global do DNA;
 - Expressão dos genes para $RAR\beta$ e CRBP-I;
 - Padrão de metilação da região promotora do gene para $RAR\beta$;
- Determinar as concentrações de retinol e palmitato de retinila em células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7 tratadas com VA e AB, isoladamente ou em associação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura celular

As células da linhagem de adenocarcinoma mamário humano MCF-7 foram gentilmente cedidas pelo Prof. João Ernesto de Carvalho do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas e Biológicas da Universidade Estadual de Campinas. Estas foram mantidas em frascos de cultura e acondicionadas em meio de cultura DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco), suplementado com 10% de soro fetal bovino e tampão HEPES (3g/L) com pH final de 7,2, em estufa com 5% de CO₂ à 37°C. O inóculo inicial foi subcultivado a cada 3 ou 5 dias e mantido em fase log de crescimento celular, de acordo com Holandino *et al.* (2001) ou congelado em tubos de criocongelamento a uma concentração de 2x10⁶ células/mL com 10% de DMSO para uso futuro.

4.2 Curva de crescimento de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB

Para avaliar o efeito de VA e/ou AB no crescimento de células MCF-7, utilizou-se VA na forma de palmitato de retinila (87% pureza; BASF, Alemanha) e AB na forma de butirato de sódio (99% pureza; Sigma, EUA). Etanol absoluto (Merck, Alemanha) foi utilizado como veículo da VA. Assim a VA foi dissolvida em etanol na concentração inicial de 0,03M (solução mãe), seguida de diluições seriadas em meio de cultura. Já o AB foi dissolvido diretamente em meio de cultura na concentração inicial de 0,5M (solução mãe), seguido de diluições seriadas em meio de cultura. A solução de VA foi preparada por ocasião de cada experimento e a solução mãe de AB foi congelada em alíquotas, em freezer -20°C, com descongelamento imediatamente antes do uso.

As células MCF-7 foram plaqueadas a uma concentração de 1x10⁴ células/mL em placas de 96 poços e incubadas por 24hs. Após este período, as células foram inicialmente tratadas com 1, 5, 10, 15 e 20µM de VA ou etanol a 0,07% (controle de VA, correspondente à quantidade de etanol residual no meio de cultura com 20µM de VA); ou 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5mM

de AB ou meio de cultura (controle de AB) por períodos de 24hs até 120hs. Para avaliar o efeito da associação entre VA e AB, utilizou-se 10 μ M de VA e 1mM de AB, isoladamente ou em associação. Para controle deste experimento, um grupo de células foi tratado com etanol 0,035%, correspondente à concentração de etanol residual no meio de cultura após o tratamento com 10 μ M VA. A fim de eliminar qualquer interferência do etanol, esse também foi adicionado na concentração de 0,035% ao meio de cultura com 1mM de AB. No tratamento com associação de VA e AB não foi necessário a adição de etanol, pois a concentração de 0,035% foi alcançada após a adição de 10 μ M VA ao meio.

Após o período de incubação com os diferentes tratamentos, as células foram coradas com cristal violeta a 0,5% (10 μ L para 100 μ L de meio/poço), incubadas por 10min, lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Foram, então, adicionados em cada poço 100 μ L de metanol e a leitura da densidade óptica feita a 570nm em leitor de Elisa (Universal Microplate Reader EL800). Cada concentração foi analisada em sextuplicata e o experimento repetido três vezes.

Para se avaliar a possível ocorrência de efeito aditivo ou sinérgico na inibição do crescimento de células MCF-7 após o tratamento com VA+AB, utilizou-se a seguinte fórmula: (controle-tratamento com VA+AB)/(controle-tratamento com VA)+(controle-tratamento com AB), o que significa % de inibição observado/% de inibição esperado. De acordo com a fórmula, valor maior que 1 indica efeito sinérgico, valor igual a 1 indica efeito aditivo e valor menor que 1 indica efeito antagônico (SHIAU *et al.*, 2010).

4.3 Avaliação da acetilação no resíduo de lisina 9 da histona 3 (H3K9) e no resíduo de lisina 16 da histona 4 (H4K16)

4.3.1 Extração ácida de histonas de células MCF-7

Para extração de histonas, cerca de 2x10⁵ células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm, incubadas por 24hs e então tratadas com 10 μ M de VA, 1mM de AB, 10 μ M de VA+1mM de AB ou etanol a 0,035%, correspondente a concentração de etanol residual no tratamento com VA. Para controle de eventual interferência do etanol, foi adicionado ao meio de cultura contendo 1mM de AB quantidade de etanol correspondente a

0,035%. Após 96 e 120hs dos tratamentos, as células foram coletadas das placas de petri com auxílio de raspador e então transferidas para microtubos. As células foram, então, homogeneizadas em 600 μ L de tampão de lise gelado (Tris 10mM; Bissulfito de sódio 50mM; Triton X 100 1%; MgCl₂ 10mM; sacarose 8,6%, PMSF; pH=6,5) por 1-2 min e centrifugadas por 15 min a 700g e 4°C. O precipitado foi então lavado com 50 μ L de tampão Tris-EDTA (Tris 10mM; EDTA 13mM; PMSF; pH=8,0). O precipitado foi ressuspensão em 150 μ L de água ultra-pura e 100 μ L de H₂SO₄ 0,8N e incubado por uma noite a 4°C.

Após este período, realizou-se centrifugação por 15 min a 10.000g e 4°C e o sobrenadante foi incubado com 1mL de acetona a -20°C por uma noite para precipitação das histonas. Posteriormente, acrescentou-se 10 μ L de NaOH 3N para neutralização e submeteu-se a centrifugação por 5 min a 12.000g e 4°C. O precipitado foi ressuspensão em 20 μ L de tampão de carregamento (uréia 5,8M; ácido acético glacial 0,9M; glicerol 16%; 2-mercaptoetanol 4,8% e verde de metila 0,2%). As histonas foram quantificadas por método espectrofotométrico (UV), utilizando-se aparelho GeneQuant Pro (Amersham Pharmacia Biotec, EUA) ajustado para leitura a 280nm. A concentração de proteínas foi determinada a partir de curva padrão de albumina (concentração de 0 a 4.000 μ g/mL) e estas foram armazenadas a -80°C.

4.3.2 “Western blotting” de H3K9 e H4K16 acetiladas

Os extratos de proteína das células MCF-7 tratadas com etanol, VA e/ou AB foram submetidos à eletroforese em géis de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) a 15% e tampão Tris-glicina 1X, utilizando-se uma cuba de eletroforese vertical (Mini PROTEAN[®]System, Bio Rad, EUA). Posteriormente, as proteínas foram transferidas dos géis para membranas de nitrocelulose Hybond-ECLTM (Amersham Biosciences, EUA), com poro de diâmetro de 0,20 μ m, no decorrer de 35 min.

Para se verificar a eficácia da transferência, as membranas foram coradas com Ponceau-S (USB, EUA) e, em seguida, lavadas com PBS (NaCl 137mM; Na₂HPO₄ 10mM; KCl 2,68 mM; KH₂PO₄ 1,76 mM e água ultra-pura, pH=7,4) e água.

O bloqueio das membranas foi realizado com reagente próprio presente no sistema de quimioluminescência ECL (Enhanced Chemiluminescence, GE Healthcare, Reino Unido), diluído em PBS (1mL de PBS para cada 20mg de ECL) e incubada por 1h à temperatura

ambiente, sob agitação. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-acetil H3K9 ou anti-acetil H4K16 (Upstate, EUA) (1:5000) diluídos em reagente ECL, por uma noite a 4°C. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase HRP anti-imunoglobulina de coelho (GE Healthacare, Reino Unido) na diluição 1:10.000 em reagente ECL por 1 hora.

As membranas foram então incubadas com anticorpo primário anti-H1 (Upstate, EUA), o qual serve para controle da técnica, na diluição de 1:5000 em reagente ECL por 1 h a 37°C e sob agitação. Em seguida, foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase HRP anti-imunoglobulina de rato (GE Healthacare, Reino Unido) na diluição 1:10000 em ECL por 1h, a 37°C e sob agitação.

A imunodeteção foi feita utilizando-se o sistema de quimioluminescência ECL. O sinal foi captado utilizando-se o sistema de aquisição de imagens ImageQuant 400 (GE Healthcare, Reino Unido).

4.4 Avaliação do padrão de metilação global do DNA

4.4.1 Extração de DNA de células MCF-7

O DNA genômico foi extraído pelo método clássico utilizando fenol-clorofórmio e álcool isoamílico. Para isso, cerca de 2×10^5 células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm, incubadas por 24hs e então tratadas com 10 μ M de VA, 1mM de AB, 10 μ M de VA+1mM de AB ou etanol na concentração de 0,035%, correspondente à concentração de etanol residual no tratamento com VA. Para controle de eventual interferência do etanol, foi adicionado à solução de 1mM de AB quantidade de etanol correspondente a 0,035%. Após 96 e 120hs do tratamento, as células foram coletadas das placas de petri com auxílio de raspador e então transferidas para microtubos e incubadas com 500 μ L de solução de lise TES (Tris HCL 10mM pH=8.0, EDTA 50mM, SDS 0,5%), 2,5 μ L de RNase (10mg/mL) e 2,5 μ L de proteinase K (20mg/mL) sob agitação, por aproximadamente 17hs a 55°C. Após esta etapa, adicionaram-se 500 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, sendo a mistura levada à agitação por 15 min. O homogenato foi centrifugado a 3.000rpm por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e foi realizada outra extração com 500 μ L de

clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após nova centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionando-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3M e 2,5X do volume de etanol absoluto gelado. Essa solução foi então mantida a -20°C por 2 dias para precipitação do DNA. Após este período, realizou-se centrifugação por 30 min a 12.000rpm e o precipitado foi lavado com etanol 70%. Por fim o DNA foi ressuspense em 50µL de TE (Tris 100mM, EDTA 10mM, pH=8,0) e quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop1000, ThermoScientific). O DNA foi considerado de boa qualidade e íntegro quando a razão das absorvâncias nos comprimentos de onda de 260 e 280nm foi maior que 1,8 e menor que 2,2 e quando não apresentou fragmentação em gel de agarose a 2%, respectivamente.

4.4.2 Técnica de “Dot blot”

A análise do padrão de metilação global do DNA foi realizada pela técnica de “dot blot” (ALYAQOUB *et al.*, 2006) em amostras de células de adenocarcinoma mamário humano da linhagem MCF-7 tratadas com etanol a 0,035%, VA, AB e VA+AB. Amostras de DNA (2µg), foram desnaturadas em solução 0,1M de NaOH e tampão SSC (3M NaCl, 0,3M citrato de sódio, pH=7,0) a 95°C durante 5 min e aplicadas em membrana de nitrocelulose (Amersham Bioscience, EUA) (ALYAQOUB *et al.*, 2006). Posteriormente, as amostras foram fixadas sob vácuo a 80 °C por 2hs. As membranas foram bloqueadas com solução 5% de leite por 2hs e, então, incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-5-metilcitosina (Serotec, Reino Unido) por cerca de 2hs. Em seguida, a membrana foi tratada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase HRP anti-imunoglobulina de rato (GE Healthcare, Reino Unido) por 2hs. A imunodeteção foi feita utilizando-se o sistema de quimioluminescência ECL (GE Healthcare, Reino Unido). Em seguida, um filme de raio-x (Kodak X-Omat, EUA) foi exposto a essa membrana para revelação do sinal. A intensidade do sinal foi quantificada pelo software Quantity One 4.6.8 (Bio Rad, EUA). Para controle da aplicação das amostras de DNA, a membrana foi corada com azul de metileno e os dados normalizados utilizando-se o sinal correspondente deste corante para corrigir as variações no carregamento do DNA (ALYAQOUB *et al.*, 2006; ONG *et al.*, 2006).

4.5 Análise da expressão dos genes RAR β e CRBP-I por PCR em tempo real

4.5.1 Extração de RNA de células MCF-7

A extração de RNA total a partir de células MCF-7 foi realizada de acordo com instruções do kit illustra RNAspin Mini RNA isolation (GE Healthcare, Alemanha). Para tanto, cerca de 2×10^5 células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm, incubadas por 24hs e então tratadas com 10 μ M de VA, 1mM de AB, 10 μ M de VA+1mM de AB e etanol na concentração de 0,035%, correspondente a concentração de etanol residual no tratamento de VA. Para controle de alguma interferência do etanol, foi adicionado à solução de 1mM de AB quantidade de etanol correspondente a 0,035%. Após 96 e 120hs dos tratamentos, as células foram tripsinizadas e transferidas para microtubos, onde foram incubadas com tampão de lise para rompimento das membranas celulares e inativação de RNAses. Além disso, esse tampão proporcionou condições adequadas para que ocorresse a adsorção do RNA a uma membrana de sílica. Após subseqüentes etapas de lavagem, os metabólitos celulares foram retirados e o RNA, então, eluído da membrana de sílica, sob condições de baixa concentração iônica. O RNA foi considerado íntegro e de boa qualidade quando a razão das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 e 280nm foi maior que 1,8 e menor que 2,2 e quando as bandas 18s e 28s puderam ser visualizadas em gel de agarose 1%, respectivamente.

4.5.2 Conversão de RNA para cDNA pela enzima transcriptase reversa

A transcrição reversa foi realizada a partir de 1500ng de RNA total obtidos de células MCF-7 tratadas com etanol, VA, AB ou VA+AB de acordo com instruções do kit SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen-EUA).

4.5.3 Amplificação dos genes RAR β e CRBP-I

A quantificação de mRNA dos genes RAR β , CRBP-I e gliceraldeído desidrogenase-3 fosfatase (GAPDH; gene controle), por meio de seus respectivos cDNAs, foi realizada por PCR em tempo real, utilizando-se o sistema de amplificação TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Foram selecionados “primers” e sondas marcadas com fluoróforo *FAM* para todos os genes de acordo com os *assays* disponibilizados pela Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com.br) (Tabela 1).

Tabela 1: “Primers” e sondas utilizados nas PCRs em Tempo Real

Gene	Assay ID
RAR β	Hs00233407-m1
CRBP-I	Hs01011514-m1
GAPDH	Hs99999905-m1

A reação de PCR foi realizada em termociclador ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), iniciada a 50°C por 2 min, seguida de 95°C por 10 min e a amplificação conduzida por 50 ciclos de 15s a 95°C (desnaturação) e 1 min a 60°C (hibridização e extensão).

O sinal de fluorescência captado pelo programa 7000 System SDS Software (Applied Biosystems, Foster City, CA EUA) gerou o parâmetro ciclo, denominado ciclo treshold (Ct), momento em que a amplificação acontece de forma exponencial. Para cada amostra de cDNA, o Ct de cada gene foi registrado e comparado com o do gene GAPDH, que foi utilizado como controle endógeno.

A quantidade de cDNA utilizada nos ensaios foi determinada a partir de curva-padrão que permite avaliar a linearidade da amplificação bem como a eficiência da mesma. Para essa finalidade, foram utilizadas seis diferentes concentrações de cDNA (23ng/ μ L, 11,5 ng/ μ L, 5,75 ng/ μ L, 2,9ng/ μ L, 1,4ng/ μ L, 0,7 ng/ μ L) de amostras de células de mama normal provenientes de mamoplastia (HB4a) usadas apenas para teste nos ensaios de PCR em tempo real. Com os dados gerados pela curva padrão, pôde-se calcular a eficiência da reação através da inclinação da curva. Consideraram-se ensaios de PCR em tempo real com alta eficiência

(90% a 110%), quando a inclinação (*slope*) da curva-padrão foi próxima a -3,3 (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os valores de Ct obtidos nos ensaios foram utilizados para determinar a expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do GAPDH (controle endógeno), através da relação Delta Ct (ΔCt): $\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno}})$. Para se verificar se houve variação de expressão dos genes RAR β e CRBP-I em células tratadas com VA, AB e VA+AB em relação às células controle, os dados foram normalizados de acordo com o parâmetro Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$): $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{tratamento}} - \Delta Ct_{\text{controle(etanol)}})$. E por último, os resultados foram transformados em escala logarítmica ($2^{\Delta\Delta Ct}$).

4.6 Análise do padrão de metilação do promotor do gene que codifica para RAR β , pela técnica de PCR metilação-específica (MS-PCR)

A técnica MS-PCR baseia-se no princípio de que o tratamento do DNA com bissulfito converte os resíduos de citosinas não metiladas em uracilas, enquanto que os resíduos de citosinas metiladas permanecem inalterados. Assim, após a conversão com bissulfito, seqüências do DNA metiladas e não metiladas podem ser distinguidas por “primers” específicos (HERMAN *et al.*, 1996.; COTTRELL; LAIRD, 2003).

4.6.1 Modificação do DNA com Bissulfito de Sódio

Cerca de 2 μg do DNA genômico extraídos de células MCF-7, após 96hs e 120hs de tratamento com etanol a 0,035%, 10 μM VA, 1mM de AB ou 10 μM VA+1mM de AB, juntamente com DNA de esperma de salmão (Ci-10mg/ml) (Eppendorf, Alemanha) em volume final de 17 μL , foram desnaturados com NaOH (concentração final de 0,2M) por 20 min a 50°C. Concomitantemente, foi preparada uma solução de bissulfito de sódio 2,5M/hidroquinona 1M, pH=5 que foi adicionada à amostra e incubada a 70°C por 3hs, no escuro. O DNA modificado foi purificado com o sistema Wizard DNA-Clean-up System (Promega, EUA), tratado com NaOH 0,3M por 10 min e então precipitado com acetato de amônio 5M, etanol gelado e 1 μL de glicogênio (20 mg/ml) durante uma noite à -20°C. Após

esse período, realizou-se centrifugação por 15 min a 20.817 g e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi lavado com 500µL de etanol a 70%. O DNA precipitado seco foi ressuspensionado em 50µL de TE e, em seguida, armazenado a -80°C até o momento de seu uso.

4.6.2 Análise do padrão de metilação da região promotora do gene RARβ

Para análise do padrão de metilação da região promotora do gene RARβ foram utilizados os seguintes “primers” de acordo com Esteller *et al.* (2002):

Seqüência não-metilada

5' TTGGGATGTTGAGAATGTGAGTGATTT 3' (sentido)

5' CTTACTCAACCAATCCAACCAAAACAA 3' (antisentido)

Seqüência metilada

5' TGTCGAGAACGCGAGCGATTC 3' (sentido)

5' CGACCA ATCCAACCGAAACGA 3' (antisentido)

Cada reação de PCR foi composta por tampão de PCR 1X (16,6mM sulfato de amônio/ 67mM Tris, pH 8,8/ 6,7mM MgCl₂/ 10mM 2-mercaptoetanol), dNTPs (10mM cada), “primers” (300ng cada), 1,25 unidade de Taq polimerase e DNA modificado com bissulfito (50ng) em um volume final de 25µL.

A reação de PCR foi realizada em termociclador Eppendorf epMastercycler (Eppendorf, Alemanha). As reações foram iniciadas a 94°C por 10 min e a amplificação foi conduzida por 35 ciclos: 30s à 94°C, 30s à temperatura de associação (“annealing”; 57°C para o molde desmetilado e 58°C para o metilado), 30s à 72°C e, finalmente, 10 min de extensão final a 72°C.

O resultado da PCR (10µL) foi diretamente aplicado em gel de agarose a 2% corado com BlueGreen (LGC Biotecnologia).

4.7 Determinação das concentrações celulares de retinol e palmitato de retinila, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para extração dos retinóides, cerca de 2×10^5 células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm, incubadas por 24hs e então tratadas com $10 \mu\text{M}$ de VA, 1mM de AB, $10 \mu\text{M}$ de VA+ 1mM de AB ou etanol a 0,035%, correspondente a concentração de etanol residual no tratamento de VA. Para controle de eventual interferência do etanol, foi adicionado à solução de 1mM de AB quantidade de etanol correspondente a 0,035%. Após 96 e 120hs dos tratamentos, as células foram coletadas das placas de petri com auxílio de raspador e então transferidas para microtubos. A lise celular foi promovida por sequências de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento por 3 vezes e o processo foi completado com seringa (22G). Todo o procedimento foi realizado no escuro. Uma alíquota foi retirada para determinação do extrato protéico e a alíquota destinada à determinação de retinol e palmitato de retinila foi armazenado a -80°C até o momento das análises.

De acordo com metodologia descrita por STAHL *et al.* (1993) as amostras foram homogeneizadas em agitador mecânico, com 2mL de etanol por 2 min, sendo então agitadas em agitador de tubos após acréscimo de 2mL de n-hexano, também por 2 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (centrífuga Sorvall, modelo RC5C, rotor SS-34) a 10.000rpm, por 10 min. O sobrenadante foi seco em atmosfera de nitrogênio e ressuspenso na fase móvel [acetonitrila – diclorometano – metanol (20:20:10)].

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo (modelo LC9A, Shimadzu, Japão) com sistema de bomba de multissolventes, auto injetor (modelo SIL – 6B) e detector de fotiodo UV-VIS (modelo SPD-M6A, ajustado a 325nm para a detecção dos retinóides), com coluna C18 de fase reversa (CLC-ODS; $5 \mu\text{m}$, 6 mm x 15 cm). Alíquotas de $20 \mu\text{L}$ foram injetadas no cromatógrafo e os retinóides (retinol e palmitato de retinila) foram eluídos ($1,5 \text{mL}/\text{minuto}$) em fase móvel [acetonitrila – diclorometano – metanol (20:20:10)]. Os retinóides foram identificados pela comparação de seus tempos de retenção com os de padrões autênticos, e quantificados pelas áreas dos picos.

4.8 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram testados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade das variâncias (teste de Levene e Brown-Forsythe). Quando atendidos esses requisitos, as comparações foram realizadas com o teste paramétrico de Análise de Variância Unidimensional (One-Way-ANOVA) seguida do teste de Tuckey. Quando não foi observada distribuição normal e, principalmente, a homogeneidade das variâncias, adotou-se teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão de três ou quatro experimentos independentes e o nível de significância utilizado de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa STATISTICA 8.0 (StatSoft).

5 RESULTADOS

5.1 Curva de crescimento de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB

A Figura 3 apresenta os resultados referentes ao crescimento celular em resposta aos tratamentos das células MCF-7 com VA. Nos períodos de 24, 48, 72 e 96hs após os tratamentos, nenhuma concentração de VA inibiu o crescimento celular ($p>0,05$) em comparação ao controle. Após 120hs de tratamento, somente a concentração de 20 μ M de VA inibiu ($p<0,05$) o crescimento celular em comparação ao controle. Na tabela 2 pode-se observar o percentual de inibição do crescimento celular após 96 e 120hs de tratamentos com VA.

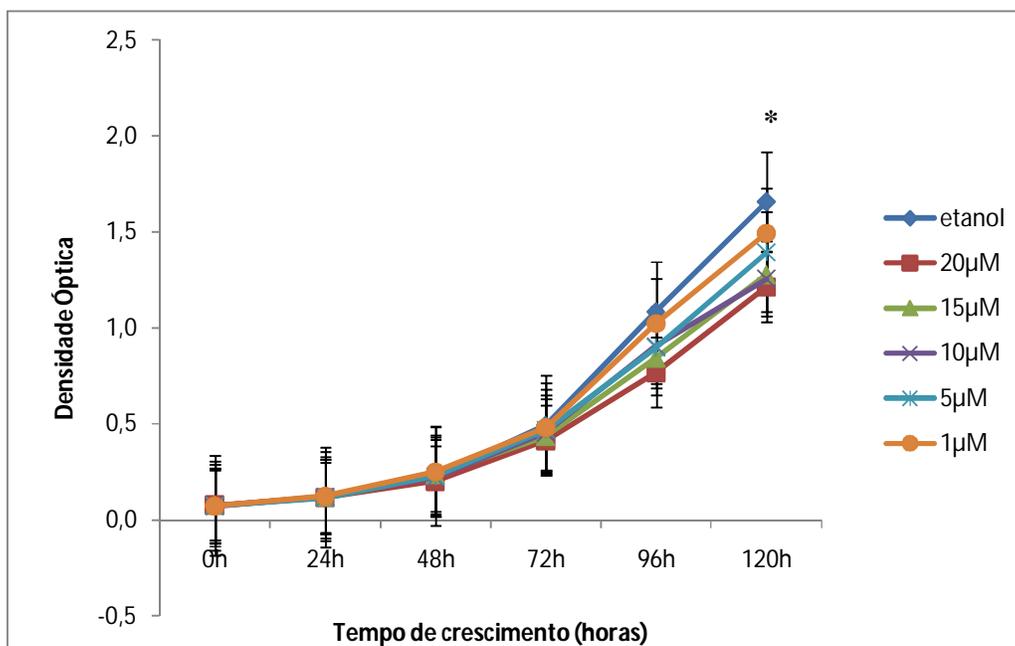


Figura 3: Curva de crescimento de células MCF-7 tratadas com VA. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão de três experimentos realizados em sextuplicata para cada concentração de VA. *Diferença estatisticamente significativa ($p=0,02$) entre o tratamento com 20 μ M de VA e o controle (etanol 0,07%) de acordo com o teste ANOVA seguido pelo de Tuckey. As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24hs. Após este período foram tratadas com etanol a 0,07% (controle), 1 μ M; 5 μ M; 10 μ M; 15 μ M e 20 μ M de VA e incubadas por períodos de 24, 48, 72, 96 e 120hs. Após cada período de incubação, o crescimento celular foi avaliado pelo método cristal violeta.

Tabela 2: Percentual de inibição do crescimento das células MCF-7 por diversas concentrações de VA, nos períodos de 96 e 120hs.

Concentração de VA	96hs	120hs
	% inibição	% inibição
1 μ M	7	10
5 μ M	17	16
10 μ M	17	24
15 μ M	22	23
20 μ M	29	27

A Figura 4 apresenta os resultados referentes ao crescimento celular em resposta aos tratamentos das células MCF-7 com AB. Após 24 e 72hs de tratamento, nenhuma concentração de AB inibiu o crescimento celular ($p > 0,05$) em comparação ao controle. Após 48 e 96hs de tratamento, somente a concentração de 5mM de AB inibiu ($p < 0,05$) o crescimento celular em comparação ao controle. Após 120hs de tratamento, todas as concentrações de AB inibiram ($p < 0,01$) o crescimento celular em relação ao controle. Na tabela 3 pode-se observar o percentual de inibição do crescimento celular após 96 e 120hs de tratamentos com AB.

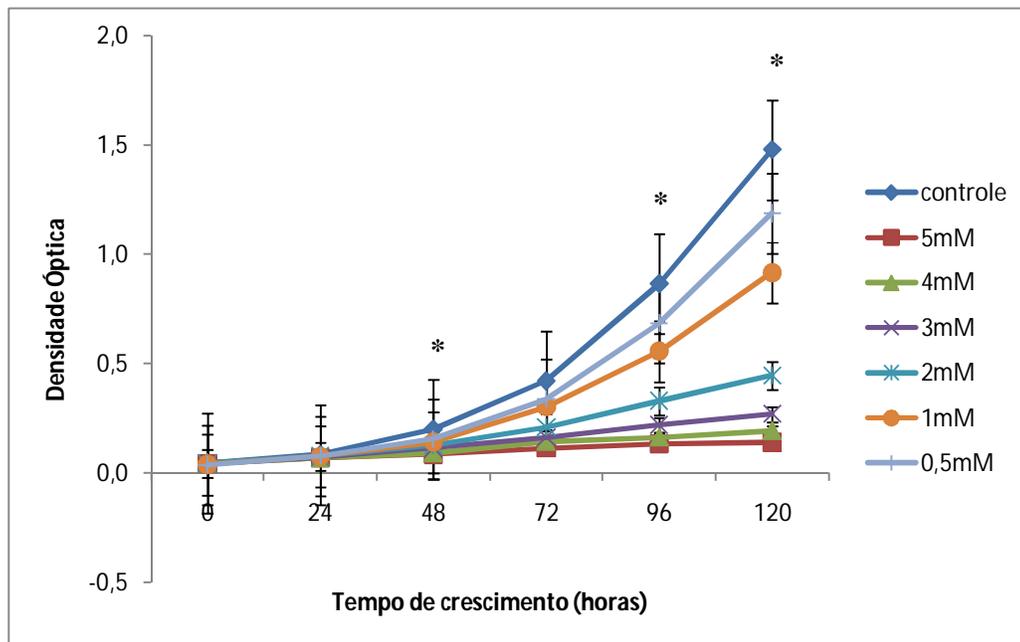


Figura 4: Curva de crescimento de células MCF-7 tratadas com AB. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão de três experimentos realizados em sextuplicata para cada concentração de AB. *Diferença estatisticamente significante no tratamento com 5mM de AB em 48 e 96hs e em todos os tratamentos em 120hs, quando comparado ao controle (células não tratadas) ($p < 0,05$) de acordo com o teste ANOVA seguido pelo de Tuckey. As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24hs. Após este período foram tratadas com meio de cultura com soro bovino fetal 10% (controle), 0,5mM, 1mM, 2mM, 3mM, 4mM e 5mM de AB e incubadas por períodos de 24, 48, 72, 96 e 120hs. Após cada período de incubação, o crescimento celular foi avaliado pelo método cristal violeta.

Tabela 3: Percentual de inibição do crescimento das células MCF-7 por diversas concentrações de AB, nos períodos de 48, 72, 96 e 120hs.

Tempo de incubação após tratamento	Concentração de AB	% inibição	Valor p
48hs	0,5mM	22	>0,05
	1mM	30	>0,05
	2mM	37	>0,05
	3mM	43	>0,05
	4mM	55	>0,05
	5mM	58	0,04
72hs	0,5mM	20	>0,05
	1mM	28	>0,05
	2mM	50	>0,05
	3mM	61	>0,05
	4mM	66	>0,05
	5mM	73	0,05
96hs	0,5mM	21	>0,05
	1mM	36	>0,05
	2mM	62	>0,05
	3mM	75	>0,05
	4mM	81	>0,05
	5mM	85	0,02
120hs	0,5mM	20	<0,01
	1mM	38	<0,01
	2mM	70	<0,01
	3mM	82	<0,01
	4mM	87	<0,01
	5mM	91	<0,01

Para se avaliar se associação de VA e AB apresentariam eventual efeito sinérgico ou aditivo na inibição do crescimento das células MCF-7, selecionaram-se concentrações de VA e AB em que seus efeitos inibitórios, quando isolados, tivessem sido moderados. Figura 5 apresenta os resultados referentes ao crescimento celular em resposta aos tratamentos das células MCF-7 com 10 μ M de VA e/ou 1mM de AB. Observa-se que 24hs após os tratamentos, nenhuma diferença ($p>0,05$) foi observada entre os grupos de células. Após 48, 72, 96 e 120hs de tratamento, o grupo de células tratadas com a associação de VA e AB apresentou menor crescimento celular ($p<0,05$) em relação ao controle. AB isolada apresentou menor crescimento celular ($p<0,05$) em relação ao controle somente após 72hs de tratamento, enquanto que VA não ($p>0,05$) alterou o crescimento celular em qualquer período de tratamento. Na Tabela 4 observam-se os percentuais de inibições do crescimento das

células MCF-7, em relação ao controle, em todos os períodos de incubação após os diferentes tratamentos.

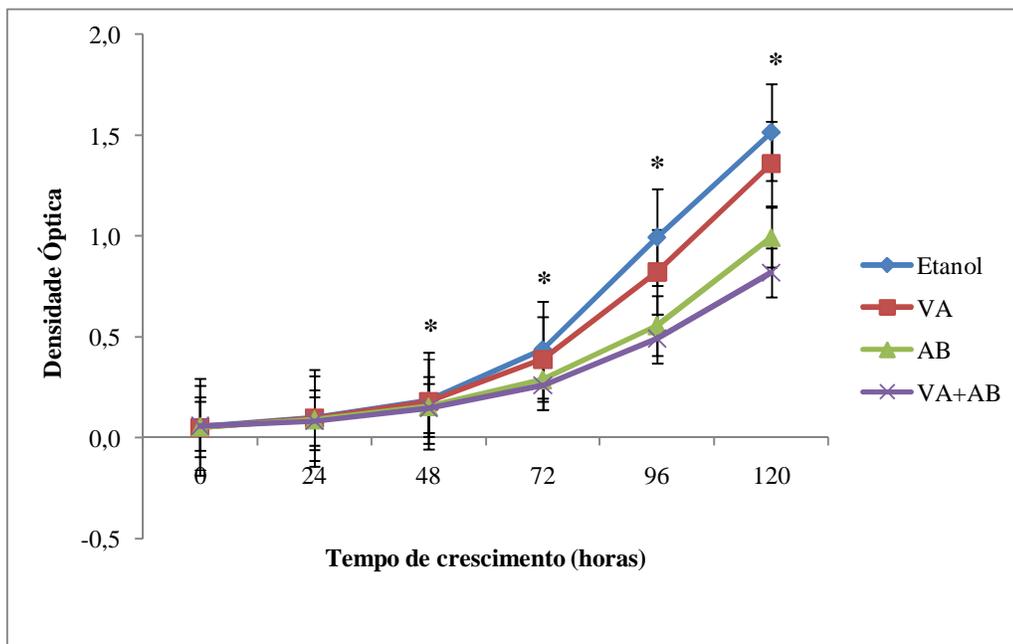


Figura 5: Curva de crescimento de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão de três experimentos realizados com sextuplicata para cada tratamento. * Diferença estatisticamente significativa do tratamento com VA+AB em 48, 72, 96 e 120hs e do tratamento com AB em 72hs, quando comparado ao controle (etanol) de acordo com o teste ANOVA seguido pelo de Tuckey. As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 hs. Após este período foram tratadas com etanol 0,035%, 10 μ M de VA, 1mM de AB e 10 μ M de VA + 1mM de AB e incubadas por períodos de 24, 48, 72, 96 e 120hs. Após cada período de incubação, o crescimento celular foi avaliado pelo método cristal violeta.

Tabela 4: Percentual de inibição do crescimento das células MCF-7 por VA e/ou AB, nos períodos de 24, 48, 72, 96 e 120hs.

Tempo de incubação após tratamento	Tratamento	% inibição	Valor p
24hs	VA	1	>0,05
	AB	9	>0,05
	VA+AB	16	>0,05
48hs	VA	2	>0,05
	AB	16	>0,05
	VA+AB	20	0,04
72hs	VA	11	>0,05
	AB	34	<0,01
	VA+AB	40	<0,01
96hs	VA	17	>0,05
	AB	44	>0,05
	VA+AB	51	0,01
120hs	VA	10	>0,05
	AB	34	>0,05
	VA+AB	46	0,04

5.2 Acetilação de H3K9 de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB

As Figuras 6 e 7 apresentam os resultados referentes à análise da acetilação de H3K9 de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, após período de 96 e 120hs, respectivamente. Após 96hs, o tratamento de células MCF-7 com AB isolado ou em associação com VA, mas não com VA isolada, aumentou a acetilação de H3K9 ($p < 0,05$) em comparação ao controle. Nesse mesmo período, o tratamento com AB também aumentou a acetilação de H3K9 ($p < 0,05$) em comparação ao tratamento com VA. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos com AB e VA+AB quanto a acetilação de H3K9. Após 120hs, os tratamentos com VA e/ou AB não alteraram a acetilação de H3K9 ($p > 0,05$) em comparação ao controle.

A)



B)

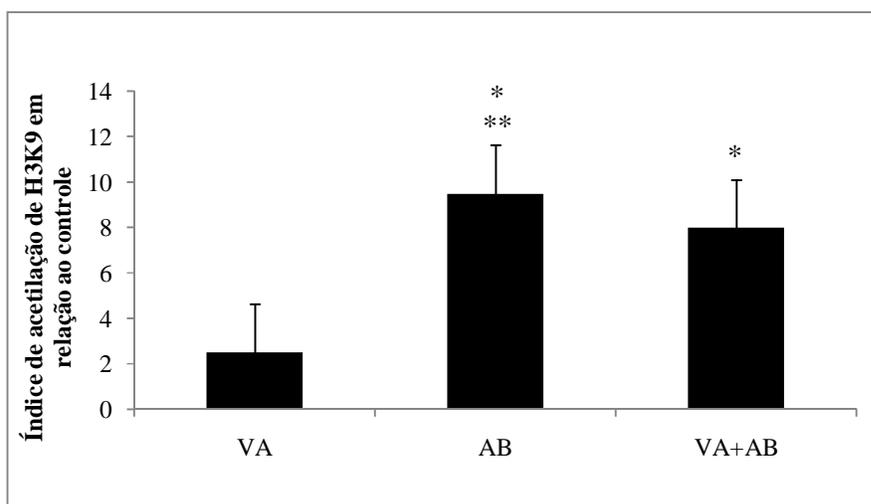
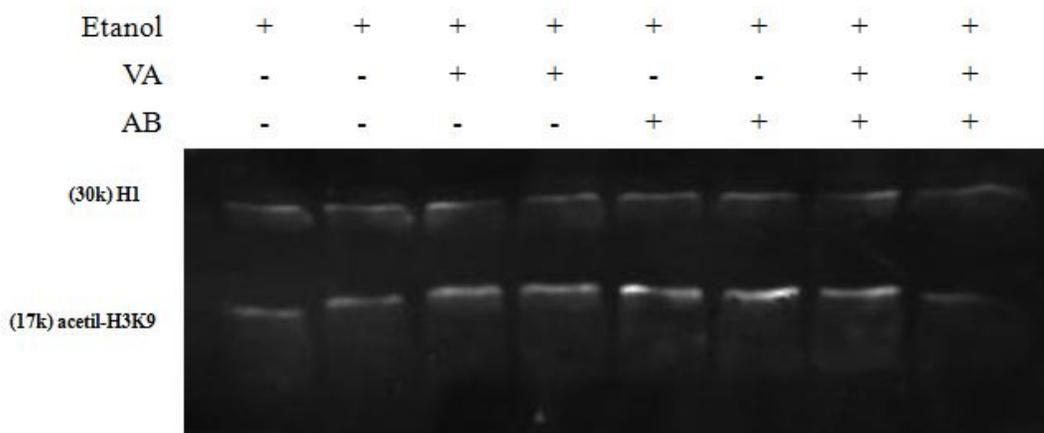


Figura 6: Acetilação de H3K9 de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 96hs. A) Imunoblot com marcação para H1 (controle do carregamento) e H3K9; B) Índice de acetilação de H3K9 em relação ao controle. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes e estão expressos em média \pm erro padrão. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; ** diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com VA de acordo com o teste ANOVA seguido pelo de Tuckey ($p < 0,05$). As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm e incubadas por 24hs. Após este período foram tratadas com etanol a 0,035% (controle), 10 μ M de VA, 1mM de AB ou 10 μ M de VA + 1mM de AB. Após 96hs de incubação, as histonas foram extraídas e o padrão de acetilação da H3K9 avaliado por “Western Blot”.

A)



B)

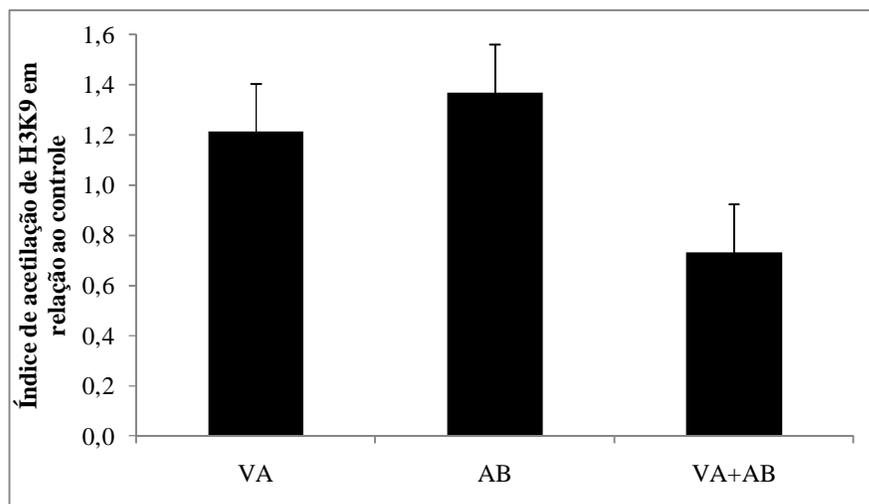
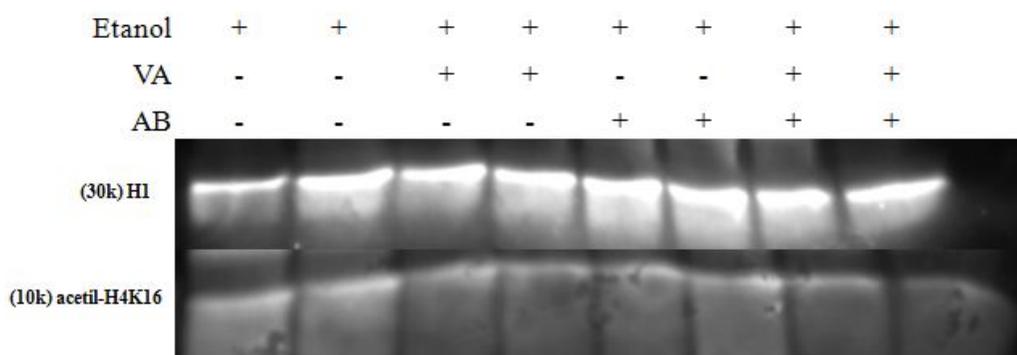


Figura 7: Acetilação de H3K9 de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB no período de 120hs. A) Imunoblot com marcação para H1 (controle do carregamento) e H3K9; B) Índice de acetilação de H3K9 em relação ao controle. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes e estão expressos em média \pm erro padrão. Sem diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste ANOVA ($p > 0,05$). As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm e incubadas por 24hs. Após este período foram tratadas com etanol a 0,035% (controle), 10 μ M de VA, 1mM de AB e 10 μ M de VA + 1mM de AB. Após 120hs de incubação, as histonas foram extraídas e o padrão de acetilação da H3K9 avaliado por “Western Blot”.

5.3 Acetilação de H4K16 de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB

A Figura 8 apresenta os resultados referentes à análise da acetilação de H4K16 de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, após período de 96hs. Observa-se que os tratamentos com VA e/ou AB não alteraram a acetilação de H4K16 ($p>0,05$) em comparação ao controle.

A)



B)

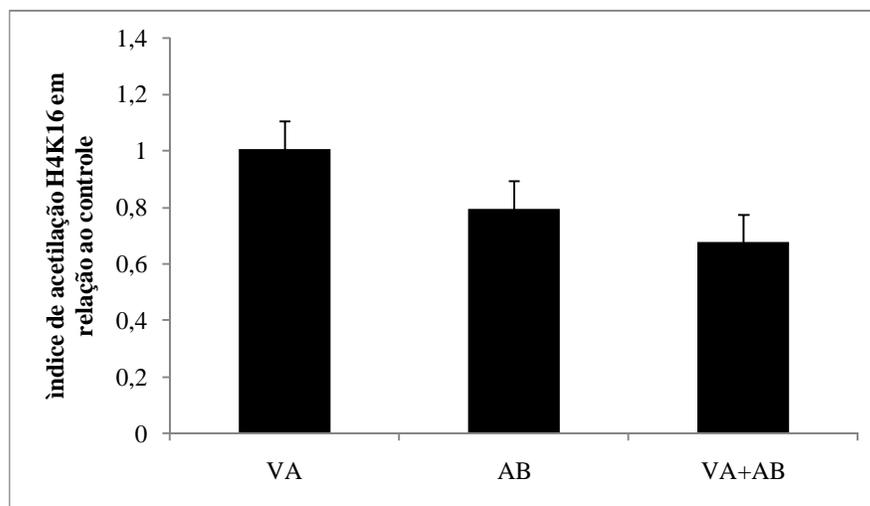


Figura 8: Acetilação de H4K16 de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 96hs. A) Imunoblot com marcação para HI (controle do carregamento) e H4K16; B) Índice de acetilação de H4K16 em relação ao controle. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes e estão expressos em média \pm erro padrão. Sem diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste ANOVA ($p>0,05$). As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm e incubadas por 24hs. Após este período foram tratadas com etanol a 0,035% (controle), 10 μ M de VA, 1mM de AB e 10 μ M de VA + 1mM de AB. Após 96hs de incubação, as histonas foram extraídas e o padrão de acetilação da H4K16 avaliado por “Western Blot”.

5.4 Padrão de metilação global do DNA de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB

As Figuras 9 e 10 apresentam os resultados referentes à análise do padrão de metilação global de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, após período de 96 e 120hs, respectivamente. Os tratamentos com VA e/ou AB não alteraram o padrão de metilação global do DNA ($p>0,05$) em comparação ao grupo controle, tanto no período de 96hs quanto no período de 120hs após os tratamentos.

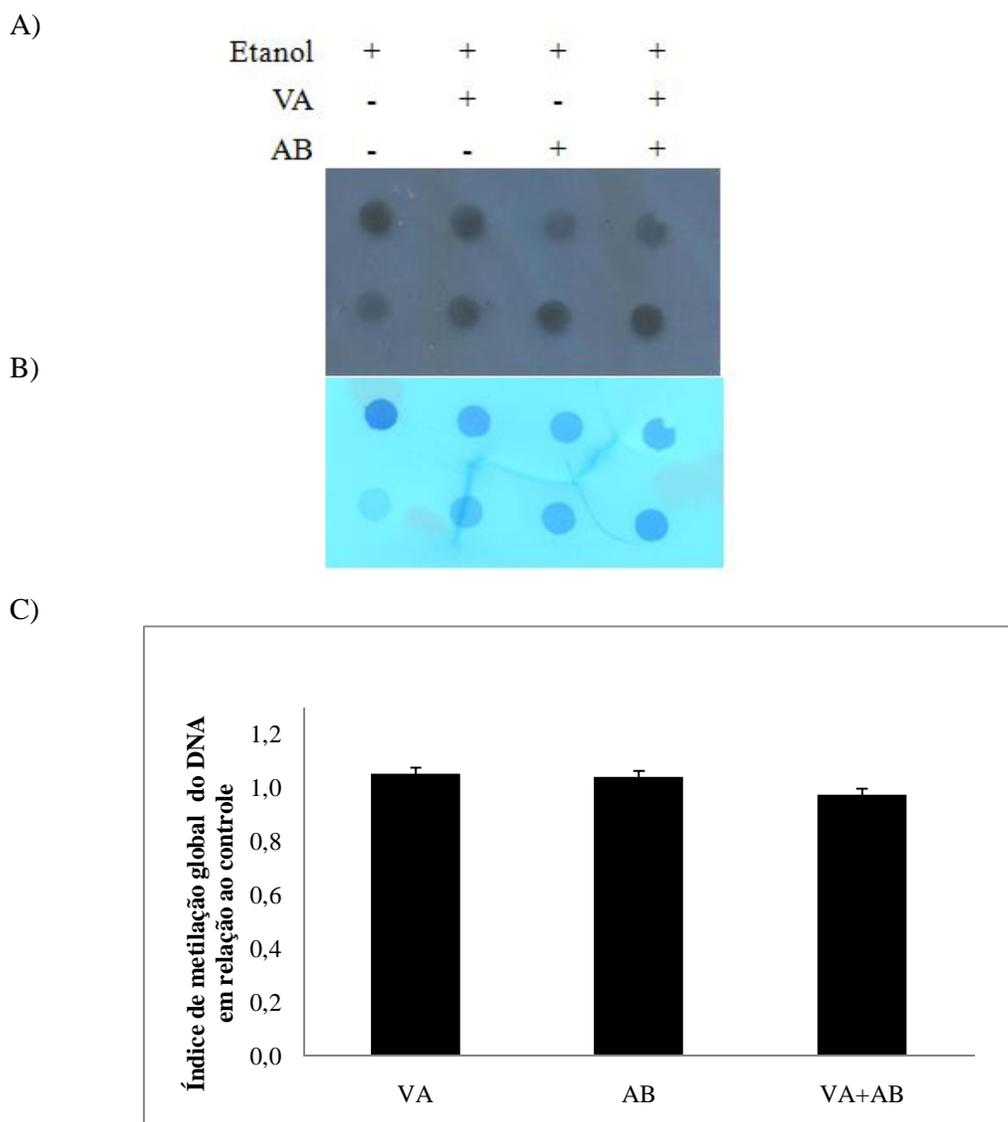


Figura 9: Metilação global do DNA de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 96hs. A) Imunoblot com marcação para 5-metilcitosina de uma duplicata por tratamento; B) Membrana de nitrocelulose com coloração com azul de metileno do DNA de uma duplicata por tratamento; C) Índice de metilação global do DNA em relação ao controle. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes conduzidos em duplicata e estão expressos em média \pm erro padrão. Sem diferenças estatisticamente significantes de acordo com o teste de Kruskal Wallis ($p > 0,05$). As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm e incubadas por 24hs. Após este período foram tratadas com etanol a 0,035% (controle), 10 μ M de VA, 1mM de AB e 10 μ M de VA + 1mM de AB. Após 96hs de incubação, o DNA foi extraído e o padrão de metilação global do DNA avaliado por “Dot Blot”.

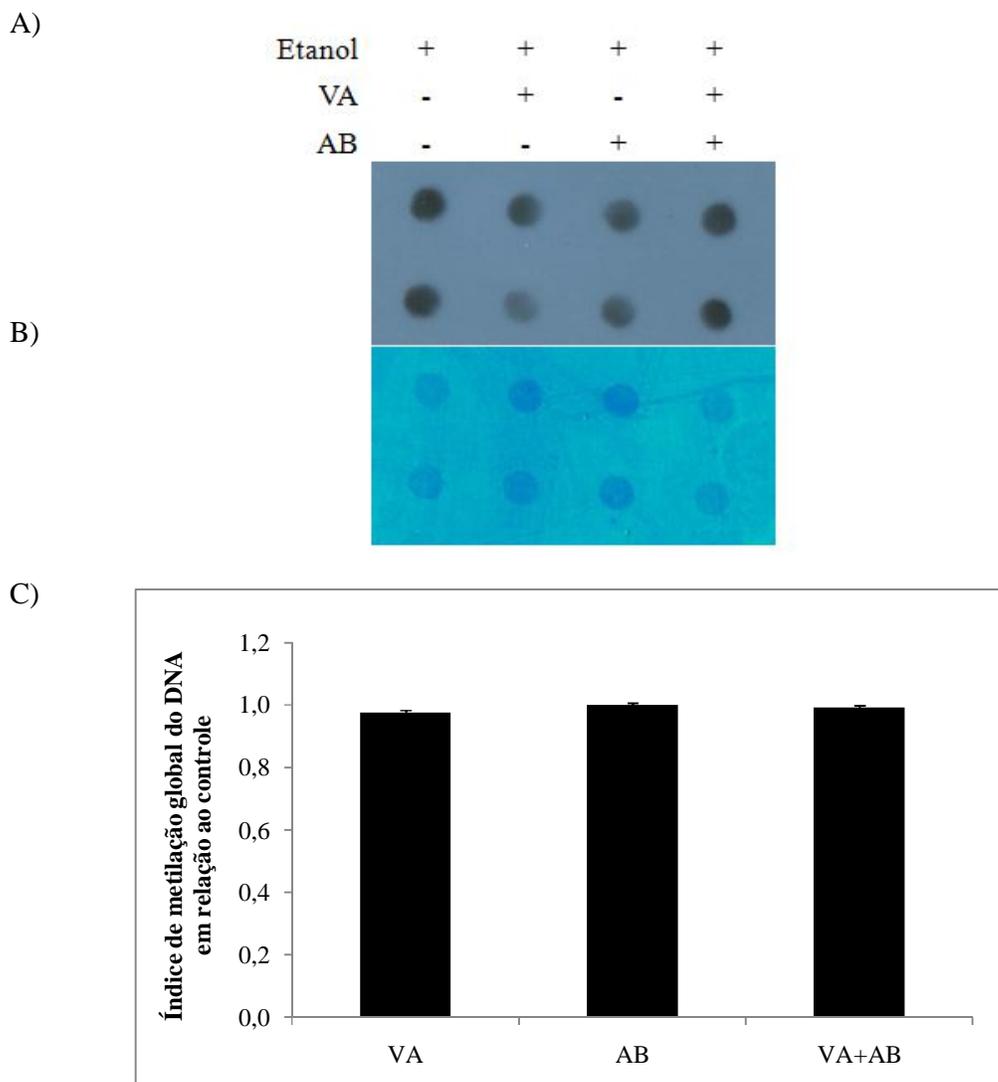


Figura 10: Metilação global do DNA de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 120hs. A) Imunoblot com marcação para 5-metilcitosina de uma duplicata por tratamento; B) Membrana de nitrocelulose com coloração com azul de metileno do DNA de uma duplicata por tratamento; C) Índice de metilação global do DNA em relação ao controle. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes conduzidos em duplicata e estão expressos em média \pm erro padrão. Sem diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste de Kruskal Wallis ($p > 0,05$). As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm e incubadas por 24hs. Após este período foram tratadas com etanol a 0,035% (controle), 10 μ M de VA, 1mM de AB e 10 μ M de VA + 1mM de AB. Após 120hs de incubação, o DNA foi extraído e o padrão de metilação global do DNA avaliado por “Dot Blot”.

5.5 Expressão dos genes para RAR β e CRBP-I de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB

As Figuras 11 e 12 apresentam nível de expressão do gene para RAR β de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, após período de 96 e 120hs, respectivamente. Observa-se que após 96hs de tratamento, apenas AB aumentou a expressão do gene RAR β ($p < 0,05$) quando comparado ao tratamento com VA. Em comparação ao controle, não houve diferença ($p > 0,05$) nos tratamentos com VA e/ou AB quanto à expressão do gene. Após 120hs, os tratamentos com AB isolado ou em associação com VA, mas não com VA isolada, aumentaram a expressão do gene RAR β ($p < 0,05$) em relação ao controle. Após 120hs, o tratamento com AB aumentou a expressão do gene RAR β ($p < 0,05$) em relação ao grupo VA. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos com AB e VA+AB quanto a expressão do gene.

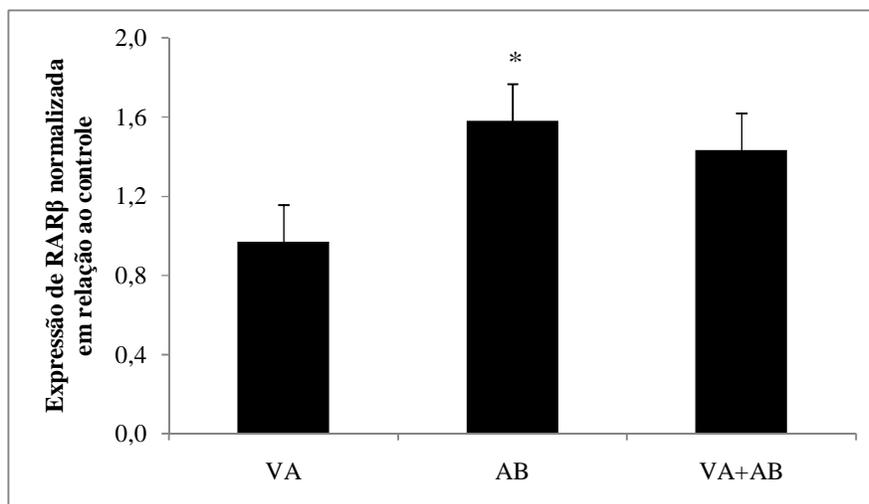


Figura 11: Expressão do gene RAR β em células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 96hs. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes conduzidos em duplicata e estão expressos em média \pm erro padrão. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com VA de acordo com o teste ANOVA seguido pelo de Tuckey ($p < 0,05$). As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm e incubadas por 24hs. Após este período foram tratadas etanol 0,035% (controle), 10 μ M de VA, 1mM de AB e 10 μ M de VA + 1mM de AB. Após 96hs de incubação, o RNA foi extraído e a expressão do gene RAR β avaliada por PCR em tempo real. A expressão de RAR β em células normais de mama HB4a, não apresentada, foi 1,22 vez maior do que a expressão em células MCF-7 tratadas com etanol.

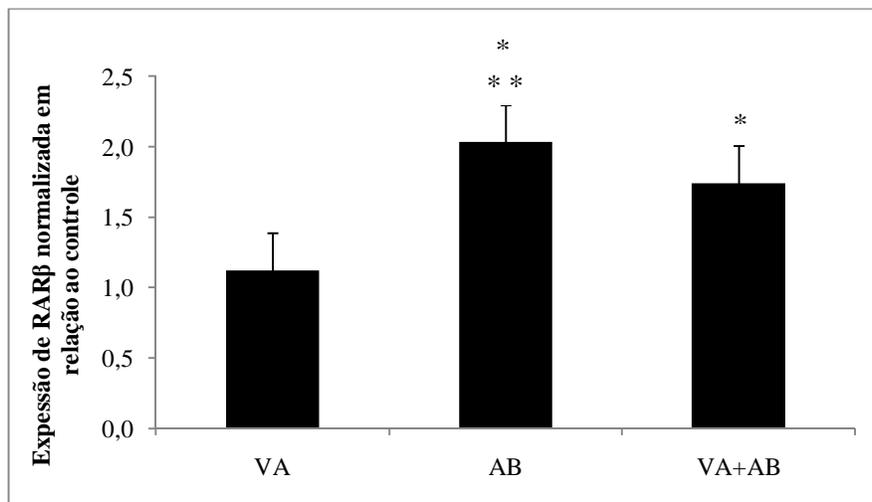


Figura 12: Expressão do gene RAR β de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 120hs. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes conduzidos em duplicata e estão expressos em média \pm erro padrão. * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle; ** Diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento com VA de acordo com o teste ANOVA seguido pelo de Tuckey ($p < 0,05$). As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm e incubadas por 24hs. Após este período foram tratadas etanol 0,035%(controle), 10 μ M de VA, 1mM de AB e 10 μ M de VA + 1mM de AB. Após 120hs de incubação, o RNA foi extraído e a expressão do gene RAR β avaliada por PCR em tempo real. A expressão de RAR β em células normais de mama HB4a, não apresentada, foi 1,07 vez maior do que a expressão em células MCF-7 tratadas com etanol.

As Figuras 13 e 14 apresentam o nível de expressão do gene para CRBP-I de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, após período de 96 e 120hs, respectivamente. Após 96 e 120hs, nenhum dos tratamentos alterou a expressão do gene para CRBP-I ($p > 0,05$) em relação ao controle.

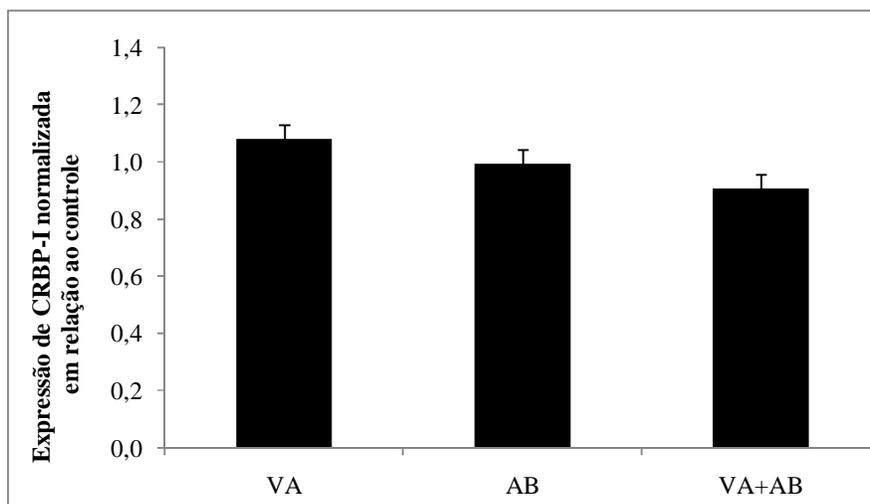


Figura 13: Expressão do gene CRBP-I de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 96hs. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes conduzidos em duplicata e estão expressos em média \pm erro padrão. Sem diferenças estatísticas de acordo com o teste ANOVA ($p > 0,05$). As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm e incubadas por 24hs. Após este período foram tratadas com etanol a 0,035%(controle), 10 μ M de VA, 1mM de AB e 10 μ M de VA + 1mM de AB. Após 96hs de incubação, o RNA foi extraído e a expressão do gene CRBP-I avaliada por PCR em tempo real. A expressão de CRBP-I de células normais de mama HB4a, não apresentada, foi 200 vezes maior do que a expressão em células MCF-7 tratadas com etanol.

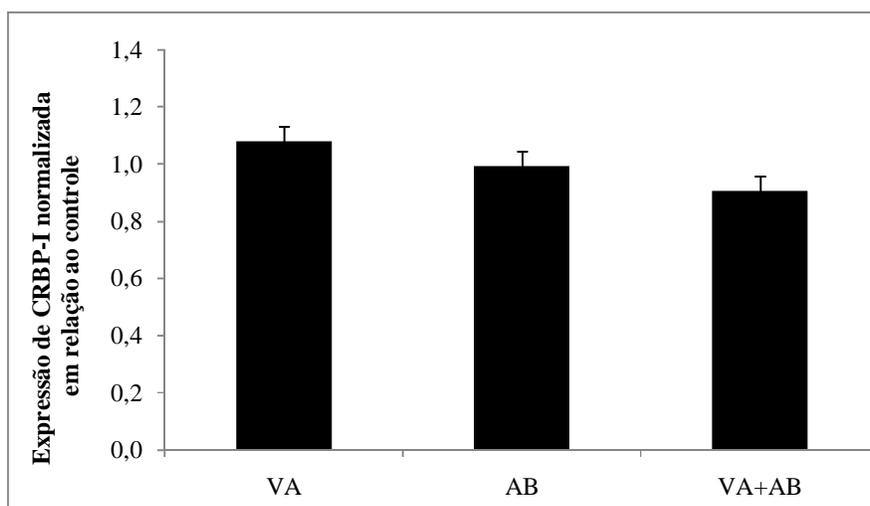


Figura 14: Expressão do gene CRBP-I de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 120hs. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes conduzidos em duplicata e estão expressos em média \pm erro padrão. Sem diferenças estatísticas de acordo com o teste ANOVA ($p > 0,05$). As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm e incubadas por 24hs. Após este período foram tratadas com etanol a 0,035%(controle), 10 μ M de VA, 1mM de AB e 10 μ M de VA + 1mM de AB. Após 120hs de incubação, o RNA foi extraído e a expressão do gene CRBP-I avaliada por PCR em tempo real. A expressão de CRBP-I de células normais de mama HB4a, não apresentada, foi 229 vezes maior do que a expressão em células MCF-7 tratadas com etanol.

5.6 Padrão de metilação do promotor do gene que codifica para RAR β de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB

A Figura 15 apresenta o padrão de metilação do promotor do gene que codifica para RAR β de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, após período de 96hs. Observa-se que a região promotora do gene RAR β apresenta-se predominantemente metilada nas células MCF-7 tratadas ou não com VA, AB, isolados ou em associação.

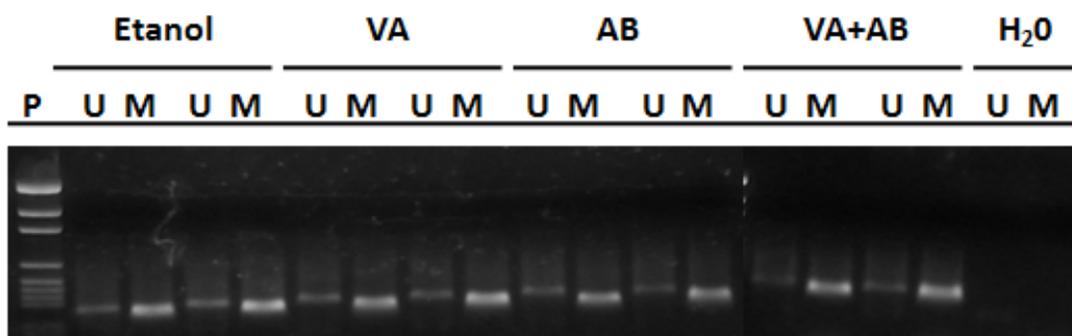


Figura 15: Metilação da região promotora do gene RAR β de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, no período de 96hs. As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm e incubadas por 24hs. Após este período foram tratadas com etanol a 0,035% (controle), 10 μ M de VA, 1mM de AB ou 10 μ M de VA + 1mM de AB. Após 96hs de incubação, o DNA foi extraído e o padrão de metilação da região promotora do gene RAR β avaliado pela técnica de MS-PCR. (U) amplificação com “primers” específicos para seqüência não metilada, (M) amplificação com “primers” específicos para seqüência metilada, (P) padrão de peso molecular, (H₂O) controle negativo.

5.7 Concentrações de retinol e palmitato de retinila de células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB

A Figura 16 apresenta os resultados referentes às concentrações de retinol em células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB. Após 96hs, não houve diferença ($p>0,05$) entre os tratamentos quanto à concentração celular desse retinóide. Após 120hs, apenas as células tratadas com VA isolada apresentaram maior concentração de retinol ($p<0,05$) em comparação ao controle. Palmitato de retinila não foi detectado em células MCF-7 tratadas com etanol, VA e/ou AB.

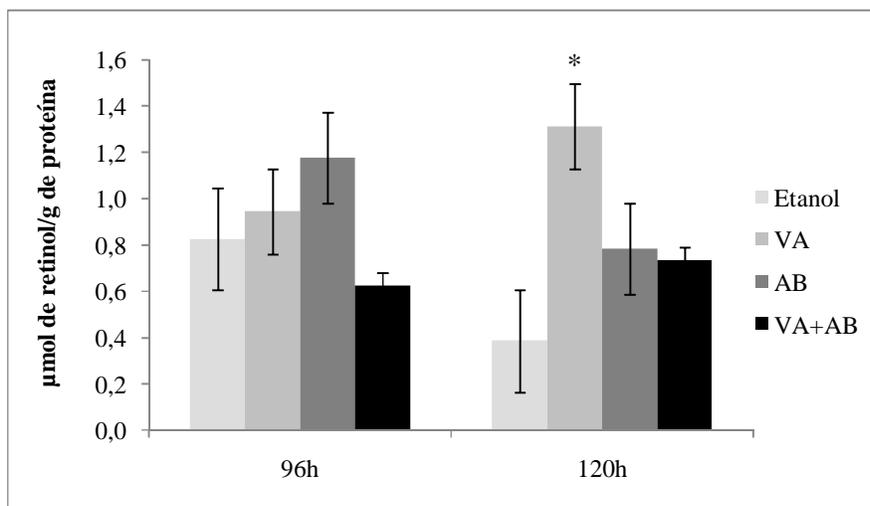


Figura 16: Concentração de retinol em células MCF-7 tratadas com VA e/ou AB, nos períodos de 96 e 120hs. Os dados são representativos de 4 experimentos independentes e estão expressos em média \pm erro padrão. * Diferença estatisticamente significante em relação ao controle de acordo com o teste ANOVA seguido pelo de Tuckey ($p<0,05$). As células MCF-7 foram plaqueadas em placas de petri de 100mm e incubadas por 24hs. Após este período foram tratadas com etanol a 0,035%(controle), 10 μ M de VA, 1mM de AB ou 10 μ M de VA + 1mM de AB. Após 96 e 120hs de incubação, os retinóides foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência.

6 DISCUSSÃO

Retinóides são importante classe de substâncias para a prevenção e tratamento de diversos tipos de câncer, especialmente o de mama (PASTORINO *et al.*, 1993; DRAGNEV; RIGAS; DMITROVSKY, 2000; MENARD *et al.*, 2001; McDANIEL *et al.*, 2007; FORMELLI *et al.*, 2009; BONANNI; LAZZERONI, 2009).

Diversos estudos relataram efeitos inibitórios do crescimento de células de câncer de mama ER+ como MCF-7 e T47D por parte de retinóides (RUBIN *et al.*, 1994; STEPHEN; DARBRE, 2000; CZECZUGA-SEMENIUK; LEMANCEWICZ; WOLCZYŃSKI, 2009; SEAROVIC *et al.*, 2009). Estudo recente investigou os efeitos do AR, nas concentrações de 10nM, 100nM ou 1µM, em células com graus progressivos de malignidade e que representavam os diferentes estágios da carcinogênese de mama. Observou-se, nesse caso, que quanto maior a agressividade das células, menor a resposta ao tratamento com o retinóide. (AHN; CHANG; TALMAGE, 2009).

Alguns trabalhos avaliaram em linhagens de câncer de mama o efeito de retinóides na forma de VA. Prakash *et al.*(2001) observaram que tratamento com 100nM ou 1µM de retinol inibiu significativamente o crescimento de células MCF-7 após período de 216hs. Já em células MDA-MB 231, houve estímulo de seu crescimento pelo retinóide, não se observando efeito em células Hs578T. Tratamento com concentração fisiológica de retinol (2,5µM) reduziu o crescimento de células MCF-7 em 22% e 32%, após período de 120hs e 144hs de tratamento, respectivamente (HAYDEN; SATRE, 2002). Por outro lado, de acordo com Miray-Lopes *et al.*(2000) concentrações de 0,5 a 2,0µM de retinol não inibiram o crescimento de células MCF-7, refletindo o metabolismo alterado da VA em células de câncer de mama. No presente estudo, observou-se inibição significativa do crescimento de células MCF-7 somente com tratamento com 20µM de VA, concentração quase 10 vezes maior que a fisiológica, após período de 120hs.

O AB tem sido considerado agente promissor para tratamento e prevenção do câncer, inclusive o de mama (MANDAL; KUMAR, 1996; BELOBRAJDIC; McINTOSH, 2000; TSUBAKI *et al.* 2001; PELLIZARO *et al.*, 2001; CHOPIN *et al.*, 2002; KUEFER *et al.*, 2004; CHOPIN *et al.*, 2004; NOHARA; YOKOYAMA; KANO, 2007; SANTOS; MARTINEZ-IGLESIAS; ARANDA, 2007; KUROIWA-TRZMIELINA *et al.* 2009). Em células de câncer de mama como a MCF-7, há relatos de inibição de até 75% de seu crescimento após tratamento com AB na concentração de 1 a 3mM, com aumento de células na fase G1 do ciclo

celular (MANDAL; KUMAR, 1996; CHOPIN *et al.*, 2002). Além disso, o tratamento com 1mM de AB resultou em aumento do número de células na fase G2/M e G1, após período de 24 e 48hs, respectivamente, indicando inibição da proliferação celular. AB também induziu apoptose no período de 48hs a partir da concentração de 1mM, observando-se maior efeito com 2,5mM (CHOPIN *et al.*, 2004). Tsubaki *et al.*(2001) observaram inibição da síntese de DNA pelo AB em padrão concentração dependente. Nesse caso, a concentração de 5mM inibiu a síntese de DNA em 90-100% em células MCF-7 e Hs578T. DAVIS *et al.* (2000) relataram que o AB promove inibição do crescimento de células MCF-7 em padrão concentração-dependente. Interessantemente, células de câncer de mama são mais sensíveis a ação do AB em comparação células de mama normal. No presente estudo, também se verificou que os tratamentos com 0,5 a 5mM de AB inibiram o crescimento de células MCF-7 de forma concentração-dependente. Isso poderia estar relacionado, eventualmente, à modulação da proliferação celular e/ou apoptose.

A associação de AR com HDACi resulta em efeitos aditivos na inibição do crescimento de células tumorais, bem como do desenvolvimento de tumores *in vivo*. Isso foi verificado em células de câncer renal resistentes ao tratamento com AR (SK-RC-39 e SK-RC-45), bem como em neoplasias renais de ratos, após tratamento com associação de AR e TSA (MASSART; DENAIS; GIBASSIER, 2006). Em células de carcinoma de cabeça e pescoço (SqCC/Y1), AR isolado não influenciou o crescimento celular. Porém, a sua associação com TSA inibiu sinergicamente o crescimento dessas células (WHANG *et al.*, 2005). Em células de leucemia mielóide (HL60) a associação de AB com AR agiu sinergicamente na indução de diferenciação (CHEN; BREITMAN, 1994).

Em células de câncer de mama MCF-7, associação de VPA com AR resultou em efeitos aditivos na inibição do crescimento celular (MONGAN; GUDAS, 2005). No presente estudo, o tratamento com VA, AB e VA+AB resultou em inibições do crescimento de células MCF-7, no período de 120hs, de 10%, 34% e 46%, respectivamente. Com base na fórmula proposta por Shiau *et al.* (2010) (% de inibição observado/% de inibição esperado) para se determinar a ocorrência de interações entre substâncias, verificou-se que o índice obtido foi igual 1, indicando que a associação de VA com AB resultou em efeito aditivo na inibição do crescimento de células de câncer de mama (MCF-7). Por outro lado, em células de neuroblastoma (SH-SY5Y), não se obteve efeito sinérgico ou aditivo na inibição do crescimento celular após tratamento com ácido retinóico e diversos inibidores de desacetilases de histonas (iHDACs), entre eles o AB (SANTOS; ZAMBRANO; ARANDA, 2007).

HDACs podem induzir diversas respostas biológicas em células tumorais, incluindo indução da apoptose e supressão da proliferação celular nos “checkpoints” G1/S ou G2/M (FREW; JOHNSTONE; BOLDEN, 2009), e são considerados grupo promissor de agentes anticâncer (MARKS & XU, 2009).

Em 1970, descreveu-se que AB bloqueia a proliferação celular, altera a morfologia das células e modula a expressão gênica. A partir de estudos subseqüentes, verificou-se que as ações do AB são mediadas por meio da inibição da atividade HDAC, com conseqüente aumento da acetilação de histonas (DAVIE, 2003). Em células de neuroblastoma, por exemplo, concentrações de 1mM e 2mM de AB aumentaram de forma sustentada a acetilação de histonas H3K9/14, diferentemente de TSA, que apresentou efeito transitório nesse sentido (SANTOS; ZAMBRANO; ARANDA, 2007). Em alguns estudos *in vivo*, como o conduzido por KUROIWA-TRZMIELINA *et al* (2009) em ratos submetidos a hepatocarcinogênese, observou-se que a atividade quimiopreventiva do AB, fornecido na forma de seu pró-fármaco TB, foi associada a sua atividade de HDCAi com aumento da acetilação de histonas H3K9.

Mais especificamente no contexto do câncer de mama, AB, ao apresentar ação de HDACi, parece promover ações anti-estrogênicos por hiperacetilar histonas H3 e inibir a expressão de genes dependentes de ER (SANTOS; MARTINEZ-IGLESIAS; ARANDA, 2007). Além disso, a supressão da síntese de DNA por AB em células de câncer de mama (MCF-7 e Hs578T) pode estar associada com hiperacetilação de histonas (TSUBAKI *et al.*,2001). No presente estudo, tratamento com 1mM de AB, isolado ou em associação com VA, aumentou quase 10 vezes a acetilação de histonas H3K9 em células MCF-7, após período de 96hs, o que pode estar associado à inibição do crescimento celular por esse HDACi. AB também aumentou a acetilação de histonas H4 em células de melanoma, restaurando ou potencializando a resposta ao AR (DEMARY; WONG; SPANJAARD, 2001). Entretanto, diferentemente desses dados e de outros descritos na literatura (DAVIE, 2003), de acordo com resultados do presente estudo, AB parece não modular o padrão de acetilação de histonas H4K16 em células MCF-7.

No câncer há um desequilíbrio no padrão de metilação do DNA, geralmente associado com hipometilação global e hipermetilação da região promotora de determinados genes (KALEBIC, 2003; KANAI; HIROHASHI, 2007; DELAGE; DASHWOOD, 2008; KOK; VAN BREDA; MANSON, 2008). A hipometilação do DNA promove instabilidade cromossômica e aumento da expressão de genes, tais como oncogenes (BAYLIN; OHM, 2006; KANAI; HIROHASHI, 2007).

A hipometilação do DNA está presente em estágios iniciais da carcinogênese e o processo de perda de metilação pode aumentar progressivamente durante o desenvolvimento do tumor (SMET; LORIOT, 2010). Discute-se ainda que a localização do sítio de hipometilação no genoma é importante para o padrão de expressão gênica. Genes com sequências hipometiladas localizadas a 2kb antes ou após o sítio de início da transcrição são amplamente expressos, enquanto que genes com extensa hipometilação em regiões 3'-UTR (regiões não transcritas) e intragênicas são silenciados (SHANN *et al.*, 2008). Células de câncer de mama MCF-7, bem como tumores de mama, apresentam hipometilação global quando comparada a células de mama normal (MCF-10-2A) ou tecido de mama normal (TRYNDYAK *et al.*, 2006; SHANN *et al.*, 2008).

Retinóides como VA, ácido retinóico *todo-trans* e ácido retinóico *9-cis* promoveram em ratos hipometilação do DNA, por meio do aumento da expressão e atividade da glicina N-metiltransferase (GNMT), enzima chave na regulação da taxa de S-adenosilmetionina (SAM)/S-adenosilhomocisteína (SAH), importante para reações de transmetilação do DNA (ROWLING; MCMULLEN; SCHALINSKE, 2002). Já o AB parece não interferir no padrão de metilação global (SPURLING *et al.*, 2008). No presente estudo, tratamentos de células MCF-7 com VA e AB, isolados ou em associação, não alteraram o padrão de metilação global.

Apesar de o mecanismo de ação exato da VA não estar totalmente esclarecido, descreve-se que o retinóide induz múltiplas vias de sinalização envolvidas com indução da apoptose, bloqueio do crescimento e diferenciação de células neoplásicas. Nesse contexto, considera-se que RAR β represente alvo molecular importante para as ações anti-carcinogênicas do AR (MONGAN; GUDAS, 2005).

Entretanto, no presente estudo apesar do tratamento com 10 μ M de VA ter resultado em inibição de cerca de 10 a 17% no crescimento de células MCF-7, não se observou aumento da expressão do gene para RAR β . Em células de câncer de cólon, o retinol inibiu o crescimento de células sensíveis e resistentes ao AR em um padrão independente de RAR (PARK *et al.*, 2005). CHEN *et al.* (1997) observaram efeito inibitório por parte do retinol em células de câncer de mama MCF-7, mesmo na ausência da produção de AR, sugerindo que outros metabólitos como o 4-oxoretinol poderiam ter ações inibitórias do crescimento dessas células.

O tratamento de células MCF-7 com 1mM de AB, por sua vez, aumentou em 1,6 e 2 vezes a expressão de RAR β nos períodos de 96hs e 120hs, respectivamente. Isso poderia estar eventualmente relacionado à atividade de HDACi por parte do AB, considerando-se que no

período de 96hs esse aumentou em quase 10 vezes a acetilação de histonas H3K9. O tratamento de células de câncer de cólon com AB e AR associados, mas não isolados, aumentou a expressão de RAR β (SPURLING *et al.*, 2008). Os autores desse estudo concluíram que os efeitos de AB na ativação de RAR β estão relacionados com sua atividade de HDACi e também, por promover demetilação da região promotora desse gene.

Outros estudos também mostram que associação de retinóides com HDACi favorece a reativação do gene RAR β , por aumentar a acetilação de histonas H3, em células de câncer de mama, inclusive as que são resistentes ao tratamento com AR, em células de melanoma, hepatocarcinoma e câncer renal, bem como em tumores *in vivo* (SIRCHIA *et al.*, 2000; DEMARY; WONG; SPANJAARD, 2001; SIRCHIA *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2005; DELAGE; DASHWOOD, 2008; HAHN *et al.*, 2008; TATEBE *et al.*, 2009). Por outro lado, observou-se que a associação de VPA com AR não resultou em indução da expressão de RAR β em células MCF-7, apesar de ter inibido o crescimento celular. A indução da expressão de RAR β nesse caso só foi possível na presença de 5-aza-2'-deoxicitidina (MONGAN;GUDAS, 2005). Vale destacar que em nosso estudo, apesar de se ter constatado ações aditivas na inibição do crescimento de células MCF-7 com a associação de VA e AB, não se observaram diferenças quanto à indução da expressão de RAR β entre os tratamentos com AB isolado ou em associação com VA. Isso sugere que tais efeitos sejam atribuídos especificamente ao AB.

No presente estudo, nenhum dos tratamentos com VA, AB ou VA+AB foi capaz de alterar o padrão de hipermetilação do promotor do gene RAR β em células MCF-7. Entretanto, a desmetilação do promotor do gene RAR β parece não ser o único mecanismo necessário para sua transcrição, visto que a sua expressão pode ser induzida mesmo na presença de hipermetilação (SIRCHIA *et al.*, 2000), como descrito para o AB no presente estudo, ou considerando-se, ainda, que supressão desse gene pode ocorrer mesmo na ausência desse tipo de alteração epigenética (WIDSCHWENDTER *et al.*, 2001).

Em células MCF-7, a reativação do gene RAR β só é possível quando se promove um nível adequado de acetilação de histonas com um HDACi, visto que nessas células o promotor desse gene apresenta-se desacetilado. No caso de células de câncer de mama T-47D, doses farmacológicas de AR são capazes de reativar RAR β , uma vez que esse se apresenta hipoacetilado (SIRCHIA *et al.*, 2002).

O gene CRBP-I apresenta importante papel no metabolismo da VA, tanto para a biossíntese de AR a partir de retinol, como para o armazenamento de VA na forma de éster

de retinila (CHEN *et al.*, 1997; TAIBI *et al.*, 2009). O gene CRBP-I também apresenta-se inativo em células de carcinoma mamário como MCF-7 e MDA-MB-231 (KUPPUMBATTI *et al.*, 2000, 2001; ARAPSHIAN *et al.*, 2004; TAIBI *et al.*, 2009), levando ao comprometimento do metabolismo de AR pela redução do transporte e armazenamento do retinol (ONG *et al.*, 1994; BAVIK; WARD; ONG, 1997). A perda da expressão do gene CRBP-I está relacionada à hipermetilação da sua região promotora (ARAPSHIAN *et al.*, 2004; LOTAN, 2005; WILLIAMS; CYETKIVIC; HAMILTON, 2009). No presente estudo, observou-se que em células MCF-7, o gene CRBP-I apresenta reduzida expressão (cerca de 200 vezes menor em comparação a células de mama normal). Além disso, nenhum dos tratamentos com VA, AB ou VA+AB foi capaz de aumentar a expressão do gene CRBP-I em células MCF-7.

Não se detectou a presença de palmitato de retinila nas células MCF-7 mesmo após os diversos tratamentos. Isso confirma achados na literatura de que diferentemente de células mamárias normais MCF-10A e AD074, células MCF-7 não apresentam a capacidade de esterificar retinol, em parte devido à perda de expressão do gene CRBP-I (CHEN *et al.*, 1997, KUPPUMBATTI *et al.*, 2000, 2001; ARAPSHIAN *et al.*, 2004; TAIBI *et al.*, 2009).

Além disso, somente as células tratadas com VA apresentaram no período de 120hs maior concentração de retinol em comparação às células controle. Hyden & Satre (2002) ao estudarem o metabolismo do retinol em célula normal de mama (HMEC) e linhagens tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231), observaram que apesar de todas as células captarem o retinol do meio, somente as células HMEC foram capazes de produzir eficientemente AR e armazenar retinol na forma de palmitato de retinila. Em células HMEC, as concentrações de retinol reduziram-se drasticamente após 6hs de tratamento, enquanto que as de palmitato de retinila e AR aumentaram. Já nas linhagens neoplásicas, as concentrações de retinol permaneceram elevadas até 72hs de tratamento, enquanto que as de AR permaneceram reduzidas e as de palmitato de retinila praticamente não detectadas, indicando metabolismo de VA alterada nessas células. Também *in vivo*, mais especificamente em tumores de mama induzida por N-metil-N-nitrosouréia em ratas, não se detectou a presença de retinol e palmitato de retinila (BHAT; LACROIX, 1989).

Com base nos resultados, a associação de VA e AB resultou em efeito inibitório aditivo do crescimento de células MCF-7. Acetilação de histonas H3K9, mas não de H4K16 e metilação do DNA, parece representar alvo epigenético do AB. Aumento da expressão do gene supressor de tumor RAR β parece estar envolvido na inibição do crescimento de células MCF-7 pelo AB. Ausência de esterificação do retinol em células MCF-7 tratadas ou não com

VA e AB, isolados ou em associação, parece se relacionar à expressão reduzida do gene CRBP-I.

7 CONCLUSÕES

- A associação de 10 μ M de VA com 1mM de AB resultou em efeito inibitório aditivo do crescimento de células MCF-7.
- Acetilação de histonas H3K9 parece ser alvo epigenético do AB, mas não da VA.
- Metilação do DNA e acetilação de histonas H4K16 não parecem ser alvos epigenéticos da VA e AB, isolados ou em associação.
- Aumento da expressão do gene supressor de tumor RAR β parece estar envolvido na inibição do crescimento de células MCF-7 pelo AB, mas não por VA.
- O gene CRBP-I não parece estar envolvido na inibição do crescimento de células MCF-7 pela VA e AB, isolados ou em associação.
- Células MCF-7 não esterificam retinol devido, em parte, à redução da expressão do gene CRBP-I.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M.; KUFEL, D.W. Effect of sodium butyrate on human breast carcinoma (MCF-7) cellular proliferation, morphology and CEA production. **Breast Cancer Research Treatment**, Netherlands, v.4, n.4, p. 269-274, 1984b.

ABE, M.; KUFEL, D.W. Sodium butyrate induction of milk-related antigens in human MCF-7 breast carcinoma cells. **Cancer Research**, United States, v.44, n.10,p.4574-4577, 1984a.

AHN, E.H.; CHANG,C.C.; TALMAGE, D.A. Loss of anti-proliferative effect of all-trans retinoic acid in advanced stage of breast carcinogenesis. **Anticancer Research**, United States v.20, p.2899-2904, 2009.

ALYAQOUB, F.S.; TAO, L.; KRAMER, P.M.; STEELE, V.E.; LUBET, R.A.; GUNNING, W.T.; PEREIRA, M.A. Prevention of mouse lung tumors and modulation of DNA methylation by combined treatment with budesonide and R115777 (ZarnestraMT). **Carcinogenesis**, England, v.28, n. 1, p.124-129, 2006.

ANZANO, M.A.; BYERS, S.W.; SMITH, J.M.; PEER, C.W.; MULLEN, L.T.; BROWN, C.C.; ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B. Prevention of breast cancer in rat with 9-cis-retinoic acid as a single agent and in combination with tamoxifen. **Cancer Research**, United States, v.54, n.17, p.4614-4617, 1994.

ARAPSHIAN, A.; BERTRAN, S.; KUPPUMBATTI, Y.S.; NAKAJO, S.; MIRA-Y-LOPES, R. Epigenetic CRBP downregulation appears to be an evolutionarily conserved (human and mouse) and oncogene-specific phenomenon in breast cancer. **Molecular Cancer**, England, v.3, n.13, p.1-12, 2004.

BALLARD-BARBASH, R.; HUNSBERGER, S.; ALCIATI, M.H.; BLAIR, S.N.; GOODWIN, A.M.T.; WING. R.; SCHATZKIN A. Physical Activity, Weight Control, and Breast Cancer Risk and Survival: Clinical Trial Rationale and Design Considerations. **Journal of the National Cancer Institute**, United States, v.101, n.9, p.630-643, 2009.

BAVIK,C.; WARD, S.J.; ONG, D.E. Identification of mechanism to localize generation of retinoic acid in rat embryos. **Mechanisms of development**, Ireland, v.69, p.155-167, 1997.

BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G. DNA Hypermethylation in tumorigenesis-epigenetics joins genetics. **Trends in genetics**, England, v.16, n.4, p.168-174, 2000.

BAYLIN, S.B.; OHM, J.E. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nature reviews. Cancer**, England, v.6, n.2, p.107-116, 2006.
BÉLIVEAU; R.; GINGRAS, D. Os alimentos contra o câncer: A prevenção e o tratamento do câncer pela alimentação. 1 Edição. Petrópolis, RJ: Vozes, 2007. 214p.

BELOBRAJDIC, D.P.; MCINTOSH, G.H. Dietary butyrate inhibits NMU-induced mammary cancer in rats. **Nutrition and cancer**, United States, v.36,n.2, p.217-223, 2000.

BESSAOUD, F.; DAURÈS, J.P.; GERBER, M. Dietary Factors and Breast Cancer Risk: A Case Control Study Among a Population in Southern France. **Nutrition and cancer**, England, v.60, n2, p.177-187, 2008.

BHAT, P.V.; LACROIX, A. Metabolism of retinol and retinoic acid in N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinomas in rats. **Cancer Research**, United States, v.49, p.139-144, 1989.

BOFFA, L.C.; MARIANI, M.R.; PARKER, M.I. Selective hypermethylation of transcribed nucleosomal DNA by sodium butyrate. **Experimental cell research**, United States, v.211, n.2, p.420-423, 1994.

BOGOS, K.; RENYI-VAMOS, F.; KOVACS, G.; TOCARI, J.; DOME, B. Role of retinoic receptors in lung carcinogenesis. **Journal of experimental & clinical cancer research**, England, v. 27, n.18, p.1-7, 2008.

BONANNI, B.; LAZZERONI, M. Retinoids and breast cancer prevention. **Recent Results in Cancer Research**, Germany, v.181, p.77-82, 2009.

BRANDES, L.J.; HERMONAT, M.W. Receptor Status and Subsequent Sensitivity of Suclones of MCF-7 Human Breast Cancer Cells Surviving Exposure to Diethylstilbestrol 1. **Cancer Research**, United States, v.43, n.6, p.2831-2835, 1983.

CHEN, A.; GUO, X.; DERGUINI, F.; GUDAS, L. Human breast cancer cells and normal mammary epithelial cells: retinol metabolism and growth inhibition by the retinol metabolite 4-oxoretinol. **Cancer Research**, United States, v.57, n.20, p.4642-4651, 1997.

CHEN, Z.X.; BREITMAN, T.R. Tributyrin: a prodrug of butyric acid for potential clinical application in differentiation therapy. **Cancer Research**, United States, v.54, n.13, p.3494-3499, 1994.

CHO, H.J.; KIM, S.Y.; KIM, K.H.; KANG, W.K.; KIM, J.I.; OH, S.T.; KIM, J.S.; AN, C.H. The combination effect of sodium butyrate and 5-Aza-2'-deoxycytidine on radiosensitivity in RKO colorectal cancer and MCF-7 breast cancer cell lines. **World journal of surgical oncology**, England, v.7, p.1-7, 2009.

CHOPIN V, TOILLON RA, JOUY N, LE BOURHIS X. P21(WAF1/CIP1) is dispensable for G1 arrest, but indispensable for apoptosis induced by sodium butyrate in MCF-7 breast cancer cells. **Oncogene**, England, 23:21-9, 2004.

CHOPIN, V.; TOILLON, R.A.; JOUY, N.; BOURHIS, X.L. Sodium butyrate induces P53-independent, Fas-mediated apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. **British Journal of Pharmacology**, England, v.135, n.1, p.79-86, 2002.

CLARKE, K.O.; FEINMAN, R.; HARRISON, L.E. Tributyrin, an oral butyrate analogue, induces apoptosis through the activation of caspase-3. **Cancer Letters**, Ireland, v.171, n. 1, p.57-65, 2001.

COTTRELL, S.E.; LAIRD, P.W. Sensitive detection of DNA methylation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, United States, v.983, p.120-30, 2003.

CUZICK, J. Chemoprevention of breast cancer. **Breast Cancer**, New Zealand v.15, n.1, p.10-16, 2008.

CZECZUGA-SEMENIUK, E.; LEMANCEWICZ, D.; WOLCZYNSKI, S. Estradiol and tamoxifen affects the inhibitory effects of vitamin A and their metabolites on the proliferation and expression of $\alpha\beta 1$ integrins in MCF-7 breast cancer cells. **Advances in Medical Sciences**, Poland, v.54, n.1, p.91-98, 2009.

DAMIA, G.; D'INCALCI, M. Contemporary pre-clinical development of anticancer agents – What are the optimal preclinical models? **European Journal of Cancer**, England, v.45, p.2768-2781, 2009.

DAVIDSON-MONCADA, J.; PAPAVALIIOU, F.N.; TAM, W. MicroRNAs of the immune system Roles in inflammation and cancer. **Annals Of The New York Academy of Sciences**, United States, v.1183, p.183, 194, 2010.

DAVIE, J.R. Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate. **The Journal of nutrition**, United States, v.133, p.2485S-2493S, 2003. Supplement 7.

DAVIS, C.D.; MILNER, J.A. Biomarkers for diet and cancer prevention research: potentials and challenges. **Acta Pharmacologica Sinica**, United States, v.28, n.9, 1262-73, 2007.

DAVIS, T.; KENNEDY, C.; CHIEW, Y.E.; CLARKE, C.L.; DEFAZIO A. Histone deacetylase inhibitors decrease proliferation and modulate cell cycle gene expression in normal mammary epithelial cells. **Clinical cancer research**, United States, v.6, n.11, p.4334-4342, 2000.

DELAGE, B.; DASHWOOD, R.H. Dietary manipulation of histone structure and function. **Annual Review of Nutrition**, United States, v.28, p.347-366, 2008.

DEMARY, K.; WONG, L.; SPANJAARD, R.A. Effects of retinoic acid and sodium butyrate on gene expression, histone acetylation and inhibition of proliferation of melanoma cells. **Cancer Letters**, Ireland, v.163, p.103-107, 2001.

DI CROCE, L.; RAKER, V.A.; CORSARO, M.; FAZI, F.; FANELLI, M.; FARETTA, M., FUKS F, LO COCO F, KOUZARIDES T, NERVI C, MINUCCI S, PELICCI PG. Methyltransferase Recruitment and DNA Hypermethylation of Target Promoters by Oncogenic Transcription Factor. **Science**, United States, 295: 1079-1082, 2002.

DONATO, L.J.; NOY, N. Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. **Cancer Research**, United States, v.65, p.8193-8199, 2005.

DRAGNEV, K.H.; RIGAS, J.R.; DMITROVSKY, E. The Retinoids and Cancer Prevention Mechanisms. **The Oncologist**, United States, v.5, n.5, p.361-368, 2000.

DUNN, B.K.; VERMA, M.; UMAR, A. Epigenetics in cancer prevention: early detection and risk assessment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, United States, v.983, p.1-4, 2003.

ESTELLER, M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylation. **Human Molecular Genetics**, England, v.16, p.50-59, 2007.

ESTELLER, M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. **The Lancet Oncology**, England, v.4, n.6, p.351-58, 2003.

ESTELLER, M.; GUO, M.; MORENO, V.; REINADO, M.; CAPELLA, G.; GALM, O.; BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G. Hypermethylation-associated inactivation of the cellular

retinol-binding-protein 1 gene in human cancer. **Cancer Research**, United States, v.62, p. 5902-5, 2002.

FARIAS, E.F.; ONG, D.E.; GHYSELEICK, N.B.; NAKAJO, S.; KUPPUMBATTI, Y.S.; MIRA-Y-LOPEZ, R. Cellular retinol-binding protein I, a regulator of breast epithelial retinoic acid receptor activity, cell differentiation, and tumorigenicity. **Journal of the National Cancer Institute**, United States, v.97, n.1, 21-29, 2005.

FERGUSON, L.R. Nutrigenomics approaches to functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, United States, v.109, p.452-458, 2009.

FORMELLI, F.; MENEGHINI, E.; CAVADINI, E.; CAMERINI, T.; DI MAURO, M.G.; DE PALO, G.; VERONESI, U.; BERRINO, F.; MICHELI, A. Plasma Retinol and Prognosis of Postmenopausal Breast Cancer Patients. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, United States, v.18, n.1, p.42-48, 2009.

FREW, A.J.; JOHNSTONE, R.W.; BOLDEN, J.E. Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. **Cancer Letters**, Ireland, v.280, p.125-133, 2009.

GALASSO, M.; SANA, M.E.; VOLINIA, S. Non-coding RNAs: a key to future personalized molecular therapy? **Genome Medicine**, England, v.2, n.2, p.1-10, 2010.

GASCHOTT, T.; STEINHILBER, D.; MILOVIC, V.; STEIN, J. Tributyrin, a stable and rapidly absorbed prodrug of butyric acid, enhances antiproliferative effects of dihydroxycholecalciferol in human colon cancer cells. **Journal of Nutrition**, United States, v.131, p.1839-1843, 2001.

GEDIYA, L.K.; KHANDEL, W.A.L.A.; PATEL, J.; BELOSAY, A.; SABNIS, G.; MEHTA, J.; PURUSHOTTAMACHAR, P.; NJAR, V.C.O. Design, synthesis, and evaluation of novel mutual prodrugs (hybrid drugs) of *all-trans-retinoic acid* and histone deacetylase inhibitors with enhanced anticancer activities in breast and prostate cancer cells in vitro. **Journal of Medicinal Chemistry**, United States, v.51, p.3895-3904, 2008.

GILLIES, P.J. Nutrigenomics: The rubicon of molecular nutrition. **Journal of the American Dietetic Association**, United States, v.103, n. 12, p. 50-55, 2003. Supplement 3.

GONCALVES, J.; MALTA-VACAS, J.; LOUIS, M.; BRAULT, L.; BAGREL, D.; MONTEIRO, C.; BRITO, M. Modulation of translation factor's gene expression by histone deacetylase inhibitors in breast cancer cells. **Clinical chemistry and laboratory medicine**, Germany, v.43, p.151-156, 2005.

GOODMAN, J.I.; WATSON, R.E. Altered DNA methylation: A secondary mechanism involved in carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, United States, v.42, p.501-525, 2002.

HAHN, C.K.; ROSS, K.N.; WARRINGTON, I.M.; MAZITSCHKEK, R.; KANEGAI, C.M.; WRIGHT, R.D.; KUNG, A.L, Golub TR, Stegmaier K. Expression-based screening identifies the combination of histone deacetylase inhibitors and retinoids for neuroblastoma differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v.105, n. 28, p.9751-9756, 2008.

HAMER, H.M.; JONKERS, D.; VENEMA, K.; VANHOUTVIN, S.; TROOST, F.J.; BRUMMER, R.J. Review article: the role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, England, v.27, n.2, p.104-119, 2008.

HANF, V.; GONDER, U. Nutrition and primary prevention of breast cancer: foods, nutrients and breast cancer risk. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, Ireland, v.123, n.2, p.139-49, 2005.

HAYDEN, L.J.; SATRE, M.A. Alterations in cellular retinol metabolism contribute to differential retinoid responsiveness in normal human mammary epithelial cells versus breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, Netherlands, v.72, p.95-105, 2002.

HERMAN, J.G. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, England, v.9, n.5, p.359-367, 1999.

HERMAN, J.G.; GRAFF, J.R.; MYÖHÄNEN, S.; NELKIN, B.D.; BAYLIN, S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States, v.93, n.18, p.9821-9826, 1996.

HILL, M.J.; Nutrition and Human Cancer. **Annals New York Academy of Sciences**, United States, v.833, p.68-78, 1997.

HINSHELWOOD, R.A.; CLARK, S.J. Breast cancer epigenetics: normal human mammary epithelial cells as a model system. **Journal of Molecular Medicine**, Netherlands, v.86, n.12, p.1315-1328, 2008.

HOLANDINO, C.; VEIGA, V.F.; RODRIGUES, M.L.; MORALES, M.M.; CAPELLA, M.A.M.; ALVIANO, C.S. Direct current decreases cell viability but not P glycoprotein expression and function in human multidrug resistant leukaemic cell. **Bioelectromagnetics**, United States, v. 22, n.7, p.470-478, 2001.

HUANG, S. Histone methyltransferases, diet nutrients and tumour suppressors. **Nature**, England, v.2, p.469:476, 2002.

HUGH, J.; HANSON, J.; CHEANG, M.C.U.; NIELSEN, T.O.; PEROU, C.M.; DUMONTET, C.; REED, J.; KRAJEWSKA, M.; TREILLEUX, I.; RUPIN, M.; MAGHERINI, E.; MACKEY, J.; MARTIN, M.; VOGEL, C. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: Use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. **Journal of Clinical Oncology**, United States, v.27, p.1-9, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Incidência de câncer no Brasil-Estimativa 2010**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>>. Acesso em 06 de Dez. 2009.

KALEBIC, T. Epigenetic Changes: Potential Therapeutic Targets. **Annals of the New York Academy of Sciences**, United States, v.983, p.278-285, 2003.

KANAI, Y.; HIROHASHI, S. Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state. **Carcinogenesis**, England, v.28, n.12, p.2434-2442, 2007.

KAPUT, J.; PERLINA, A.; HATTIPOGLU, B.; BARTHOLOMEU, A.; NIKOLSKY, Y. Nutrigenomics: concepts and applications to pharmacogenomics and clinical medicine. **Pharmacogenomics**, England, v.8, n.4, p.xxx-xxx, 2007.

KHAN, N.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Cancer chemoprevention through dietary antioxidants: progress and promise. **Antioxidants & redox signaling**, United States, v.10, p. 475-510, 2008.

KIM, D.H.; KIM, M.; KWON, J. Histone deacetylase in carcinogenesis and its inhibitors as anti-cancer agents. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Korea (South), v.36, n.1, p.110-119, 2003.

KOK, T.M.; VAN BREDA, S.G.; MANSON, M.M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary Compounds. **European Journal of Nutrition**, Germany, v.47, p.51-59, 2008. Supplement 2.

KUEFER, R.; HOFER, M.D.; ALTUG, V.; ZOM, C.; GENEZE, F.; KUNIZI-RAPP, K.; HAUTMANN, R.E.; GSCHWEND, J.E. Sodium butyrate and tributyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis in human prostate cancer. **British Journal of Cancer**, England, v.90, n.2, p. 535-541, 2004.

KUPPUMBATTI, Y.S.; BLEIWEISS, I.J.; MANDELI, J.P.; WAXMAN, S.; MIRA-Y-LOPES, R. Cellular retinol-binding protein expression and breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, United States, v.92, n.6, p.475-480, 2000.

KUPPUMBATTI, Y.S.; REXER, B.; NAKAJO, S.; NAKAYA, K.; MIRA-Y-LOPEZ, R. CRBP suppresses breast cancer cell survival and anchorage-independent growth. **Oncogene**, England, v.20, n.50, p.7413-7419, 2001.

KUROIWA-TRZMIELINA, J.; DE CONTI, A.; SCOLASTICI, C.; PEREIRA, D.; HORST, M.A.; PURGATTO, E.; ONG, T.P.; MORENO, F.S. Chemoprevention of rat hepatocarcinogenesis with histone deacetylase inhibitors: efficacy of tributyrin, a butyric acid prodrug. **International Journal of Cancer**, United States, v.124, n.11, p.2520-2527, 2009.

KWON, K.H.; BARVA, Y.U. S.; HUANG, M.T.; KONG, A.T. Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models. **Acta Pharmacologica Sinica**, United States, v.28, p.1409-1421, 2007.

LEWIS, J.E.; SOLER-VILÁ, H.; CLARK, P.E.; KRESTY, L.A.; ALLEN, G.O.; HU, J.J. Intake of Plant Foods and Associated Nutrients in Prostate Cancer Risk. **Nutrition and Cancer**, England, v.61, n.2, p.216-224, 2009.

LIU, L.; LI, Y.; TOLLEFSBOL, T.C. Gene-Environment Interactions and Epigenetic Basis of Human Diseases. **Current Issues in Molecular Biology**, England, v.10, p.25-36, 2008.

LIU, Y.; LEE, M.O.; WANG, H.G.; LI, Y.; HASHIMOTO, Y.; KLAUS, M.; REED, J.C.; ZHANG, X.K. Retinoic acid receptor mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. **Molecular and Cellular Biology**, United States, v.16, n.3, p.1138-1149, 1996.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, United States, v.25, p. 402-408, 2001.

LOI, S. Molecular Analysis of hormone receptor positive (luminal) breast cancers – What have we learnt? **European Journal of Cancer**, England, v.44, n.18, p.2813-2818, 2008.

LOTAN, R. A Crucial Role for Cellular Retinol-Binding Protein I in Retinoid Signaling. **Journal of the National Cancer Institute**, United States, v.97, n.1, p.3-5, 2005.

LOUIS, M.; ROSATO, R.R.; BRAULT, L.; OSBILD, S.; BATTAGLIA, E.; YANG, X.H.; GRANT, S.; BAGREL, D. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate induces breast cancer cell apoptosis through diverse cytotoxic actions including glutathione depletion and oxidative stress. **International Journal of Oncology**, Greece, v.25, n.6, p.1701-11, 2004.

LOVEGROVE, J.A.; GITAU, R. Personalized nutrition for the prevention of cardiovascular disease: a future perspective. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, England, v. 21, p.306-316, 2008.

MAIER, S.; REICH, E.; MARTIN, R.; BACHEM, M.; ALTUG, V.; HAUTMANN, R.E.; GSCHWEND, J.E. Tributyrin induces differentiation, growth arrest and apoptosis in androgen-sensitive and androgen-resistant human prostate cancer cell lines. **International Journal of Cancer**, United States, v.88, p.245-251, 2000.

MANDAL, M.; KUMAR, R. Bcl-2 expression regulates sodium butyrate-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. **Cell Growth & Differentiation**, United States, v.7, p.311-318, 1996.

MARIMAN, E.C.M. Nutrigenomics and nutrigenetics: the “omics” revolution in nutritional science. **Applied biochemistry and biotechnology**, United States, v. 44, p.119-128, 2006.

MARKS, P.A.; RIFKIND, R.A.; RICHON, V.M.; BRESLOW, R.; MILLER, T.; KELLY, W.K. Histone Deacetylases and Cancer: Causes and Therapies. **Nature Reviews. Cancer**, England, v.1, p.194-202, 2001.

MARKS, P.A.; XU, W.S. Histone deacetylase inhibitors: potential in cancer therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, United States, v.107, p. 600-608, 2009.

MARTIN-MORENO, J.M.; SOERJOMATARAM, I.; MAGNUSSON, G. Cancer causes and prevention: A condensed appraisal in Europe in 2008. **European Journal of Cancer**, England, v.44, n.10, p.1390-1403, 2008.

MASSART, C.; DENAIS, A.; GIBASSIER, J. Effect of all-trans retinoic acid and sodium butyrate in vitro and in vivo on thyroid carcinoma xenografts. **Anti-cancer Drugs**, England, v.17, n.5, p.559-63, 2006.

McDANIEL, S.M.; O'NEILL, C.; METZ, R.P.; TARBUTTON, E.; STACEWICZ-SAPUNTZAKIS, M.; HEIMENDINGER, J.; WOLFE, P.; THOMPSON, H.; SCHEDUN, P. Whole-Food Sources of Vitamin A More Effectively Inhibit Female Rat Sexual Maturation, Mammary Gland Development, and Mammary Carcinogenesis than Retinyl Palmitate. **The Journal of Nutrition**, United States, v.137, p.1415-1422, 2007.

MENARD, S.; CAMERINI, T.; MARIANI, L.; TOMASIC, G.; PILOTTI, S.; COSTA, A.; DE PALO, G.; VERONESI, U. Re: Randomized Trial of Fenretinide to Prevent Second Breast Malignancy in Women With Early Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, United States, v.93, n.3, p.240-241, 2001.

MIGNONE, L.I.; GIOVANNUCCI, E.; NEWCOMB, P.A.; ERNSTOFF, L.T.; DIETZ, A.T.; HAMPTON, J.M.; WILLWTT, W.C.; EGAN, K.M. Dietary carotenoids and the risk of invasive breast cancer. **International Journal of Cancer**, United States, v.124, n.12, p.2929–2937, 2009.

MINUCCI, S.; PELICCI, P.G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. **Nature Reviews. Cancer**, England, v.6, n.1, p.38-51, 2006.

MIRA-Y-LOPEZ, R.; ZHENG, W.L.; KUPPUMBATHI, Y.S.; REXER, B.; JING, Y.; ONG, D.E. Retinol conversion to retinoic acid is impaired in breast cancer cell lines relative to normal cells. **Journal of Cellular Physiology**, United States, v.185, n.2, p.302-309, 2000.

MONGAN, N.P.; GUDAS, L.J. Valproic acid, in combination with all-trans retinoic acid and 5-aza-2'-deoxycytidine, restores expression of silenced RAR β in breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, United States, v.4, n.3, p.477-486, 2005.

MONGAN, N.P.; GUDAS, L.J. Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. **Differentiation**, England, v.75, n.9, p.853-870, 2007.

NAPOLI, J.L. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, United States, v.10, p.993-1001, 1996.

NOHARA, K.; YOKOYAMA, Y.; KANO, K. The important role of caspase-10 in sodium butyrate-induced apoptosis. **The Kobe Journal of Medical Sciences**, Japan, v.53, n.5, p.265-273, 2007.

ONG, D.E. Cellular transport and metabolism of vitamin A: Roles of the cellular retinoid-binding proteins. **Nature Reviews. Cancer**, England, v.52: S24-S31, 1994.

ONG, T.P.; HEIDOR, R.; DE CONTI, A.; DAGLI, M.L.; MORENO, F.S. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. **Carcinogenesis**, England, v.27, v.6, p. 1194-203, 2006.

PARODI, P.W. Cow's Milk fat components as potential anticarcinogenic agents. **The Journal of Nutrition**, United States, v.127, n.6, p.1055-1060, 1997.

PARK, E.Y.; DILLARD, A.; WILLIAMS, E.A.; WILDER, E.T.; PEPPER, M.R.; LANE, M.A. Retinol inhibits the growth of all-trans-retinoic acid-sensitive and all-trans-retinoic acid-resistant colon cancer cells through a retinoic acid receptor-independent mechanism. **Cancer Research**, United States, v.65, n.21, p.9923-9933, 2005.

PASTORINO, U.; INFANTE, M.; MAIOLI, M.; CHIESA, G.; BUYSE, M.; FIRKET, P.; ROSMENTZ, N.; CLERICI, M.; SORESI, E.; VALENTE, M.; BELLONI, P.A.; RAVASI, G. Adjuvant Treatment of Stage I Lung Cancer With High-Dose Vitamin A. **Journal of Clinical Oncology**, United States, v.11, p.1216-1222, 1993.

PATEL, R.R.; SHARMA, C.G.N.; JORDAN, V.C. Optimizing the antihormonal treatment and prevention of breast cancer. **Breast Cancer**, New Zealand, v.14, n.2, p.13-122, 2007.

PELIZZARO, C.; CORADINI, D.; DANIOTTI, A.; ABOLAFIO, G.; DAIDONE, D. Modulation of cell cycle-related protein expression by sodium butyrate in human non-small cell lung cancer cell lines. **International Journal of Cancer**, United States v.91, p.654-657, 2001.

PEROU, C.M.; SURLIE, T.; EISEN, M.B.; RIJNS, M.V.; JEFFREYK, S.S.; REES, C.A.; POLLACK, J.R.; ROSS, D.T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L.A.; FLUGEL, E.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S.X.; LUNNING, P.E.; BURRESEN-DALE, A.L.; BROWN, P.O.; BOSTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, England, v.406, p.747-752, 2000.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, United States, v.117, n.11, p.3155-3163, 2007.

PRAKASH, P.; RUSSEL, R.M.; KRINSKY, N.I. In vitro inhibition of proliferation of estrogen-dependent and estrogen-independent human breast cancer cells treated with carotenoids or retinoids. **The Journal of Nutrition**, United States, v.131, p.1574-1580, 2001.

RAKHA, E.A.; EL-SAYED, M.E.; REIS-FILHO, J.; ELLIS, I.O. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, Netherlands, v.113, n.3, p.411-422, 2009.

RECCHIA, F.; SICA, G.; CANDELORO, G.; NECOZIONE, S.; BISEGNA, R.; BRATTA, M.; REA, S. Beta-interferon, retinoids and tamoxifen in metastatic breast cancer: long-term follow-up of a phase II study. **Oncology reports**, Greece, v.21, n.4, p.1011-1016, 2009.

ROSS, S.A. Diet and DNA Methylation Interactions in Cancer Prevention. **Annals of the New York Academy of Sciences**, United States, v.983, p.197-207, 2003.

ROSS, S.A. Nutritional genomic approaches to cancer prevention research. **Experimental Oncology**, Ukraine, v.29, p.250-256, 2007.

ROWLING, M.J.; McMULLEN, M.H.; SCHALINSKE, K.L. Vitamin A and Its Derivatives Induce Hepatic Glycine *N*-Methyltransferase and Hypomethylation of DNA in Rats. **The Journal of Nutrition**, United States, v.132, p.365-369, 2002.

RUBIN, M.; FENIG, E.; ROSENAUER, A.; BOTET, C.M.; ACHKAR, C.; BENTEL, J.M.; YAHALOM, J.; MENDELSON, J.; JR MILLER, W.H. 9.cis Retinoic Acid Inhibits Growth of Breast Cancer Cells and Down-Regulates Estrogen Receptor RNA and Protein. **Cancer Research**, United States, v.54, p.6549-6556, 1994.

SANTOS, M.; MARTINEZ-IGLESIAS, O.; ARANDA, A. Anti-estrogenic actions of histone deacetylase inhibitors in MCF-7 breast cancer cells. **Endocrine-related Cancer**, England, v.14, n.4, p.1021-1028, 2007.

SANTOS, M.; ZAMBRANO, A.; ARANDA, A. Combined effects of retinoic acid and histone deacetylase inhibitors on human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, United States, v.6, n.4, p.1425-1431, 2007.

SANTOS-ROSA, H.; CALDAS, C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. **European Journal of Cancer**, England, v.41, n.16, p.2381-2402, 2005..

SHIAU, R.-J.; CHEN, K.-Y.; WEN, Y.-D.; CHUANG, C.-H.; YEH, S.-L. Genistein and *b*-carotene enhance the growth-inhibitory effect of trichostatin A in A549 cells. **European Journal of Nutrition**, Germany, v.49, n.1, p.19-25, 2010.

SCHRÖDER, C.P.; MAURER, H.R. Tributyrin-induced differentiation promotes apoptosis of LS174T colon cancer cells *in vitro*. **International Journal of Oncology**, Greece, v.20, n.1, p.95-200, 2002.

SCHUG, T.T.; BERRY, D.C.; TOSHKOV, I.A.; CHENG, L.; NIKITIN, A.Y.; NOY, N. Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from

PPAR β/δ to RAR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v.105, n.21, p.7546-7551, 2008.

SEAROVIC, P.; ALONSO, M.; OSES, C.; PEREIRA-FLORES, K.; VELARDE, V.; SAE, C.G. Effect of tamoxifen and retinoic acid on bradykinin induced proliferation in MCF-7 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, United States, v.106, n.3, p.473-481, 2009.

SEKHAVAT, A.; SUN, J.M.; DAVIE, J.R. Competitive inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A and butyrate. **Biochemistry and cell biology**, Canada, v. 85, n.6, p.751-752, 2007.

SHANN, Y-J.; CHENG, C.; CHIAO, C-H.; CHEN, D-T.; LI, P-H.; HSU, M-T. Genome-wide mapping and characterization of hypomethylated sites in human tissues and breast cancer cell lines. **Genome Research**, United States, v.18, p.791-801, 2008.

SILVEIRA, E.R.; MORENO, F.S. Natural retinoids and β -caroteno: From food to their actions on gene expression. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, United States, v.9, p.446-456, 1998.

SIMEONE, A.M.; TARI, A.M. How retinoids regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Switzerland, v.61, n.12, p.1475-84, 2004.

SIRCHIA, S.M.; FERGUSON, A.T.; SIRONI, E.; SUBRAMANYAN, S.; ORLANDI, R.; SUKUMAR, S.; SACCHI, N. Evidence of epigenetic changes affecting the chromatin state of the retinoic acid receptor β 2 promotor in breast cancer cells. **Oncogene**, England, v.19, n.12, p.1556-1563, 2000.

SIRCHIA, S.M.; REN, M.; PILI, R.; SIRONI, E.; SOMENZI, G.; GHIDONI, R.; TOMA, S.; NICOLO, G.; SACCHI, N. Endogenous reactivation of the RAR β 2 tumor suppressor gene epigenetically silenced in breast cancer. **Cancer Research**, United States, v.62, n.9, p.2455-2461, 2002.

SMET, C.; LORIOT, A. DNA hypomethylation in cancer: Epigenetic scars of a neoplastic journey. **Epigenetics**, United States, v.5, n.3, 2010.

SORLIE, T.; PEROU, C.M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M.B.; RIJN, M.V.; JEFFREY, S.S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J.C.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D.; LONNING, P.E.; DALE, A.L.B. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v.98, n.19, p.10869-10874, 2001.

SPINELLA, M.J.; DMITROVSKY, E. Aberrant retinoid signaling and breast cancer: the view from outside the nucleus. **Journal of the National Cancer Institute**, United States, v.92, n.6, p.438-440, 2000.

SPORN, M.B. Retinoids and carcinogenesis. **Nutrition Reviews**, United States, v.35, n.4, p.65-69, 1977.

SPORN, M.B.; SUH, N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. **Nature reviews. Cancer**, England, v.2, p.537-543, 2002.

SPURLING, C.C.; SUHL, J.A.; BOUCHER, N.; NELSON, C.E.; ROSENBERG, D.W.; GIARDINA, C. The Short Chain Fatty Acid Butyrate Induces Promoter Demethylation and Reactivation of RAR2 in Colon Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, England, v.60, n.5, p.692-702, 2008.

STEPHEN, R.; DARBRE, P.D. Loss of growth inhibitory effects of retinoic acid in human breast cancer cells following long-term exposure to retinoic acid. **British Journal of Cancer**, England, v.83, n.9, p.1183-1191, 2000.

SUBBIAH, M.T.R. Understanding the nutrigenomic definitions and concepts at the food-genome junction. **OMICS: a journal of integrative biology**, United States, v. 12, n.4, p. 229-235, 2008.

SUN, S.Y.; LOTAN, R. Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Netherlands, v.41, n1, p. 41-55, 2002.

TAIBI, G.; CARRUBA, G.; COCCIADIFERRO, L.; GRANATA, O.M.; NICOTRA, C.M.A. Low levels both Xanthine Dehydrogenase and Cellular Retinol Binding Protein Are Responsible for Retinoic Acid Deficiency in Malignant Human Mammary Epithelial Cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, United States, v.1155, p.268-272, 2009.

TANABE, K.; UTSUNOMIYA, H.; TAMURA, M.; NIIKURA, H.; TAKANO, T.; YOSHINAGA, K.; NAGASE, S.; SUZUKI, T.; ITO, K.; MATSUMOTO, M.; HAYASHI, S.; WAEGASHI, N. Expression of retinoic acid receptors in human endometrial carcinoma. **Cancer Science**, England, v.99, n.2, p.267-271, 2008.

TATEBE, H.; SHIMIZU, M.; SHIRAKAMI, Y.; SAKAI, H.; YASUDA, Y.; TSURUMI, H.; MORIWAKI, H. Acyclic retinoid synergises with valproic acid to inhibit growth in human hepatocellular carcinoma cells. **Cancer Letters**, Ireland, v.285, n.20, p.210-217, 2009.

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

TSUBAKI, J.; CHOI, W.K.; INGERMANN, A.R.; TWIGG, S.M.; KIM, H.S.; ROSENFELD, R.G.; OH, Y. Effects of sodium butyrate on expression of members of the IGF-binding protein superfamily in human mammary epithelial cells. **J Endocrinology**, United States, v.169, n.1, p.97-110, 2001.

VAN DIJK, M.A.J.; FLOORE, A.N.; KLOPPENBORG, K.I.M.; VAN'T VEER, L.J. A Functional Assay in Yeast for the Human Estrogen Receptor Displays Wild-Type and Variant Estrogen Receptor Messenger RNAs Present in Breast Carcinoma. **Cancer Research**, United States, v.57, n.16, p.3478-3485, 1997.

van STAVEREN, W.C.G.; SOLIS, W.; DETOURS, H.V.; DUMINT, J.E.; MAENHAUT, C. Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? **Biochimica et Biophysica Acta**, Netherlands, v.1795, n.2, p. 92–103, 2009.

WALKINSHAW, D.R.; YANG, X.J. Histone deacetylase inhibitors as novel anticancer therapeutics. **Current Oncology**, Canada, v.15, n.5, p.237-243, 2008.

WANG, X.; QIAN, D.Z.; REN, M.; KATO, Y.; WEI, Y.; ZHANG, L.; FANSLER, Z.; CLARK, D.; NAKANISHI, O.; PILI, R. Epigenetic modulation of retinoic acid receptor β 2 by histone deacetylase inhibitor MS-275 in human renal cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, United States, v.11, n.9, p.3535-3542, 2005.

WATKINS, S.M.; CARTER, L.C.; MAK, J.; TSAU, J.; YAMAMOTO, S.; GERMAN, J.B. Butyric acid and tributyrin induce apoptosis in human hepatic tumour cells. **The Journal of Dairy Research**, England, v.66, p.559-567, 1999.

WHANG, Y.M.; CHOI, E.J.; SEO, J.H.; KIM, J.S.; YOO, Y.D.; KIM, Y.H. Hyperacetylation enhances the growth-inhibitory effect of all-trans retinoic acid by the restoration of retinoic acid receptor beta expression in head and neck squamous carcinoma (HNSCC) cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, Germany, v.56, n.5, p.543-55, 2005.

WIDSCHWENDTER, M.; BERGER, J.; MULLER, H.M.; ZEIMET, A.G.; MARTH, C. Epigenetic downregulation of the retinoic acid receptor- β 2 gene in breast cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, United States, v.6, n.2, p.193-200, 2001.

WILLIAMS, S.J.; CYETKIVIC, D.; HAMILTON, T.C. Vitamin A metabolism is impaired in human ovarian cancer. **Gynecologic Oncology**, United States, v.112, n.3, p.637–645, 2009.

WONG, J.M.W.; SOUZA, R.; KENDALL, C.W.C.; EMAM, A.; JENKINS, D.J.A. Colonic Health: Fermentation and Short Chain Fatty Acids. **Journal of Clinical Gastroenterology**, United States, v.40, n.3, p.235-242, 2006.

WORLD CANCER RESEARCH FUND/AMERICAN INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH. **Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective**. Washington DC: AICR, 2007.517 p.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Statistics**. Geneva, 2008.112 p.

XU, X.C.; SNEIGE, N.; LIU, X.; NANDAGIRI, R.; LEE, J.J.; LUKMANJI, F.; HORTOBAGYI, G.; LIPPMAN, S.M.; DHINGRA, K.; LOTAN, R. Progressive decrease in nuclear retinoic acid receptor β messenger RNA level during breast carcinogenesis. **Cancer Research**, United States, v.57, p.4992-4996, 1997.

YANAGI, S.; YAMASHITA, M.; IMAI, S. Sodium butyrate inhibits the enhancing effect of high fat diet on mammary tumorigenesis. **Oncology**, Switzerland, v.50, n.4, p.201–4, 1993.

YANG, L.; TIN-U, C.; WU, K.; BROWN, P. Role of retinoid receptors in the prevention and treatment of breast cancer. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, United States, v.4, n.4, p.377-388, 1999.

ZANARDI, S.; SERRANO, D.; ARGUSTI, A.; BARILE, M.; PUNTONI, M.; DECENSI, A. Clinical trials with retinoids for breast cancer chemoprevention. **Endocrine-Related Cancer**, England, v.13, n.1, p.51-68, 2006.

ZHANG, C.X.; HO, S.C.; CHEN, Y.M.; FU, J.H.; CHENG, S.Z.; LIN, F.Y. Greater vegetable and fruit intake is associated with a lower risk of breast cancer among Chinese women. **International Journal of Cancer**, United States, v.125, n.1, p.181–188, 2009.

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](#)