

**MONISE VIANA ABRANCHES**

**VITAMINAS ANTIOXIDANTES, CITOCINAS E CÂNCER DE MAMA: UM  
ESTUDO CASO-CONTROLE**

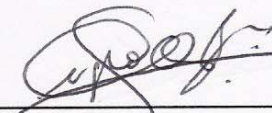
Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência da Nutrição, para  
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

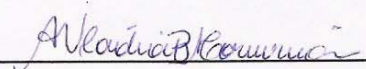
VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

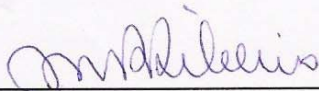
VITAMINAS ANTIOXIDANTES, CITOCINAS E CÂNCER DE MAMA: UM  
ESTUDO CASO-CONTROLE

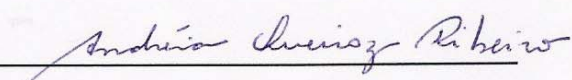
Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência da Nutrição, para  
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

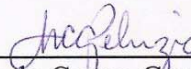
Aprovada: 29 de junho de 2009

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Sérgio Oliveira de Paula  
(Coorientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Ana Vlândia Bandeira Moreira

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Sônia Machado Rocha Ribeiro  
(Coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Andréia Queiroz Ribeiro

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Maria do Carmo Gouveia Peluzio  
(Orientadora)

*Dedico esta dissertação  
Aos meus pais **Edson e Eloísa**, à minha irmã **Milene**.  
E às voluntárias que em meio a dores físicas e emocionais aceitaram em participar  
deste trabalho de pesquisa.*

*“Olhar para trás, após uma longa caminhada, pode fazer perder a noção de distância que percorremos. Mas, se nos detivermos em nossa imagem, quando a iniciamos e ao término, certamente nos lembraremos de quanto nos custou chegar até o ponto atual.”*

*(Guimarães Rosa)*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pela força concedida durante esta jornada.

Aos meus pais Edson e Eloísa pelo apoio incondicional, pelo amor, incentivo, horas de sono perdidas e por acreditarem que eu poderia alcançar meus objetivos.

À minha irmã Milene, pela compreensão e carinho.

À minha orientadora, professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, pelos conselhos, pela orientação e confiança. Muito obrigada pela oportunidade de trabalharmos juntas desde a graduação!

Às minhas eternas amigas e irmãs Sara Almeida e Gardênia Campos pelos exemplos de vida, por me ouvir nas horas difíceis, pelo apoio incondicional, pelo otimismo e por todo carinho.

Aos amigos do mestrado, em especial à Ceres Mattos, Daniela Silva, Gisele Carvalho, Júnia Geraldo e Damiana Diniz, por muito contribuírem para a realização das análises e à Maria Carolina Mendes, quem muito auxiliou na elaboração do projeto de pesquisa.

Às professoras Renata Nascimento e Sônia Machado pela confiança e co-orientação neste trabalho.

Ao professor Sérgio de Paula pela confiança, coorientação e pela parceria científica estabelecida, a qual possibilitou ampliar nossos horizontes.

À professora Sylvia Franceschini, que com palavras acolhedoras me ajudou a superar obstáculos. À você Sylvia, minha eterna gratidão!

À professora Andréia Queiroz pela colaboração oferecida durante a realização das análises.

À professora Ana Vlória Moreira pela disponibilidade e por aceitar participar da banca de defesa da dissertação.

À professora Helena Sant'Ana pela disponibilidade e por abrir as portas do laboratório de Análises de Vitaminas que coordena, para que pudesse ser realizada parte das análises.

Aos colegas do laboratório de Imunologia pela hospitalidade, em especial ao Alípio, pela paciência, companheirismo, seriedade, profissionalismo e pelos ensinamentos.

À Thanise e à Sandra pelo auxílio durante a realização das análises laboratoriais.

Ao Jarbas pelas conversas, ensinamentos e auxílio durante as análises dos resultados.

Às voluntárias por acreditarem em nossa pesquisa e aceitarem em participar deste estudo.

À FAPEMIG pela concessão do financiamento que viabilizou a execução do projeto de pesquisa.

Aos funcionários e professores do Departamento de Nutrição e Saúde e à Universidade Federal de Viçosa pela formação a mim concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

Muito obrigada!

## BIOGRAFIA

**Monise Viana Abranches**, filha de Edson José Abranches e de Eloísa Maria Viana Abranches, nasceu no dia 13 de outubro de 1983 na cidade de Viçosa, MG.

Cursou o ensino médio no Colégio de Aplicação – COLUNI, órgão da Universidade Federal de Viçosa em Viçosa, MG entre 1998-2000.

Em março de 2002 ingressou no curso de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, obtendo seu título de graduação em Nutrição em março de 2007.

Em março de 2007 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Valor Nutricional, Funcional e Controle de Qualidade de Alimentos e de Dietas.

Defendeu sua dissertação aos 29 de junho de 2009 para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	ix
RESUMO .....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1 – INTRODUÇÃO .....	1
1.1- Referências Bibliográficas.....	4
2 – OBJETIVOS .....	6
2.1 – Objetivo Geral .....	6
2.2 – Objetivos Específicos.....	6
3- REFERENCIAL TEÓRICO.....	7
3.1- Aspectos conceituais.....	7
3.2- A carcinogênese e o ciclo celular .....	8
3.3- O câncer de mama.....	9
3.4- Biomarcadores: inovação na avaliação da ingestão alimentar.....	15
3.5- Danos oxidativos e seus efeitos na carcinogênese.....	16
3.6- Vitaminas antioxidantes: potenciais agentes contra a carcinogênese.....	18
3.7- Câncer e marcadores do processo inflamatório .....	22
3.8- Referências Bibliográficas.....	25
4- METODOLOGIA.....	31
4.1 – Delineamento do estudo e casuística .....	31
4.2. Amostragem .....	31
4.3 – Materiais e Métodos.....	32
4.3.1 – Variáveis sócioeconômicas .....	33
4.3.2 – Variáveis clínicas, ginecológicas e obstétricas .....	33
4.3.4 – Tabagismo, Ingestão de Álcool e Atividade Física.....	34
4.3.5 – Análise da Ingestão Alimentar .....	35
4.3.6 – Avaliação Antropométrica .....	36
4.3.7 – Avaliação Bioquímica.....	37
4.4 - Análises Estatísticas.....	43
4.5 - Aspectos Éticos.....	43
4.5.1 - Consentimento .....	43
4.5.2 - Comitê de Ética.....	43
4.6 - Referências Bibliográficas.....	44
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
5.1 – Caracterização da Amostra .....	47
5.1.1 – Referências Bibliográficas .....	53
5.2 – Artigo: Vitaminas antioxidantes e citocinas estão alteradas em câncer de mama .....	54
RESUMO .....	54
ABSTRACT .....	55
5.2.1 – Introdução .....	56



5.2.2 – Metodologia .....	58
5.2.3 – Análises Estatísticas .....	63
5.2.4 – Resultados .....	63
5.2.5 – Discussão .....	69
5.2.6 – Referências Bibliográficas .....	76
6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	82
7 – ANEXOS .....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg/dL: Microgramas por decilitro

µg/g: Microgramas por grama

µg: Micrograma

µL: Microlitro

BRCA1: Breast Cancer 1 (gene supressor de tumor)

BRCA2: Breast Cancer 2 (gene supressor de tumor)

CA: Grupo Caso

CACON: Centro de Alta Complexidade em Oncologia

CDI: Carcinoma Ductal Invasivo

CDIS: Carcinoma Ductal In Situ

c-DNA: Ácido Desoxirribonucléico complementar

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLIS: Carcinoma Lobular In Situ

CMI: Câncer de Mama Invasivo

CO: Grupo Controle

CONEP: Comitê de Ética Nacional em Pesquisa

Ct: *Cycle threshold* (ponto onde um aumento exponencial na quantidade de amplificado (fluorescência) é primeiramente detectado no ciclo da RT-PCR)

DBM: Grupo Doença Benigna da Mama

DBM: Grupo Doença Benigna da Mama

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DPSA: Doença Proliferativa Sem Atipia

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

FHEMIG: Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais

g: Força centrífuga relativa (aceleração da gravidade)

HDA: Hiperplasia Ductal Atípica

IFN $\gamma$ : Interferon gama

IL-10: Interleucina 10

IL-8: Interleucina 8

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMC: Índice de Massa Corporal

INCA: Instituto Nacional do Câncer

kg/m<sup>2</sup>: Quilogramas por metro quadrado  
kg: Quilogramas  
m: metros  
MG: Minas Gerais  
mL: Mililitros  
mRNA: Ácido Ribonucléico mensageiro  
NK: Natural *Killer*  
°C: Grau Celsius  
p: Nível de significância estatística  
pb: Pares de bases  
PCR: *Polymerase Chain Reaction*  
QSFA: Questionário Semiquantitativo de Frequência Alimentar  
RNA: Ácido Ribonucléico  
RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real  
tA: Tempo de anelamento  
tM: Temperatura de *melting*  
TRH: Terapia de Reposição Hormonal  
UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto  
UFV: Universidade Federal de Viçosa  
WHO: World Health Organization

## RESUMO

ABRANCHES, Monise Viana, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2009.

**Vitaminas antioxidantes, citocinas e câncer de mama: um estudo caso-controlado.** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Coorientadores: Sylvania do Carmo Castro Franceschini, Sérgio Oliveira de Paula e Sônia Machado Rocha Ribeiro.

Células tumorais e do sistema imune estimulam a secreção de uma variedade de citocinas e radicais livres que exacerbam o processo inflamatório, podendo culminar com a propagação do câncer. Diversos fatores ambientais podem resguardar o organismo contra o câncer. Dentre estes, o aumento do consumo de compostos antioxidantes, como as vitaminas A e E, parece diminuir o estresse oxidativo por decréscimo do dano celular causado por radicais livres formados durante as reações inflamatórias e modular a resposta imunológica. Avaliar níveis plasmáticos e teciduais de  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno e diferentes mediadores inflamatórios em mulheres com câncer. A amostra foi composta por 75 mulheres, sendo 25 casos de câncer de mama (grupo CA), 26 com doença benigna da mama (grupo DBM) e 24 controles (grupo CO). Realizou-se a análise de variáveis socioeconômicas, clínicas, ginecológicas, obstétricas, antropométricas, comportamentais, além da ingestão de  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno. Foram mensuradas as concentrações plasmáticas e teciduais destes compostos e dos marcadores inflamatórios IL-8, IL-10 e IFN- $\gamma$  no tecido adiposo mamário. Foram realizadas análises univariadas, bivariadas e multivariadas para verificar os possíveis fatores que melhor explicam a ocorrência deste tipo câncer. Foi verificada maior ingestão de  $\alpha$ -tocoferol ( $p = 0,04$ ) e  $\beta$ -caroteno ( $p = 0,011$ ) pelo grupo DBM, quando comparado ao grupo CA. A concentração de  $\alpha$ -tocoferol tecidual esteve significativamente reduzida no grupo CA. Não foram encontradas diferenças significantes ao se comparar o grupo CA e CO, considerando-se estas variáveis. Os mediadores inflamatórios, IL-10, IL-8 e IFN $\gamma$  estiveram aumentados em 231%, 49,1% e 57,5%, respectivamente, no grupo CA em relação ao grupo DBM. A menor ingestão e conseqüente menor concentração tecidual de  $\alpha$ -tocoferol podem aumentar a chance de desenvolvimento do câncer de mama. Os resultados encontrados no presente estudo sugerem a existência de efeitos biológicos dos nutrientes sobre o sistema imunológico. A maior concentração tecidual de mediadores pró-inflamatórios no grupo de mulheres com câncer de mama demonstra que esta doença envolve a resposta imune na tentativa de eliminar as células cancerígenas. Por outro lado, a maior síntese de IL-10, mediador anti-inflamatório, pode ser um mecanismo de proteção

contra a ação exacerbada dos compostos pró-inflamatórios. Sugere-se o desenvolvimento de estudos voltados a esta temática com o intuito de melhor elucidar os potenciais fatores de risco e de proteção contra o câncer de mama, bem como os mecanismos envolvidos na interação nutrientes-sistema imunológico.

## ABSTRACT

ABRANCHES, Monise Viana, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2009.

**Antioxidant vitamins, cytokines and breast cancer: a case-control study.**

Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-Advisers: Sylvia do Carmo Castro Franceschini, Sérgio Oliveira de Paula and Sônia Machado Rocha Ribeiro.

Tumoral cells and immune system cells can stimulate the secretion of several kinds of cytokines and free radicals aggravating the inflammatory process that may lead to the propagation of cancer. Various environmental factors may protect the body against cancer. Among these, the increased consumption of antioxidants such as vitamins A and E seems to decrease oxidative stress by decreasing the cellular damage caused by free radicals formed during inflammatory reactions and moreover modulate the immune response. Evaluate plasmatic and tecidual levels of  $\alpha$ -tocopherol, retinol and  $\beta$ -carotene and others inflammatory mediators in women with cancer. The sample was comprised of 75 women, so that, 25 with breast cancer (CA group), 26 with Benign Breast Disease (BBD group) and 24 in Control group (CO group). Were carried out socioeconomic analysis, beyond clinical, gynecological, obstetric, anthropometric, behavioral and intake of  $\alpha$ -tocopherol, retinol and  $\beta$ -carotene. Were measured the plasmatic and tecidual concentrations of these compounds and of inflammatory markers IL-8, IL-10 and IFN- $\gamma$  in mammary adipose tissue. Were performed univariate, bivariate and multivariate analysis to determine the possible factors that can explain the occurrence of this kind of cancer. Was found a higher ingestion of  $\alpha$ -tocopherol ( $p = 0.04$ ) and  $\beta$ -carotene ( $p = 0.011$ ) by BBD group, in comparison with CA group. The tecidual concentration of  $\alpha$ -tocopherol was significantly reduced in CA group. No significant differences were found between CA and CO groups, considering these variables. Inflammatory mediators, IL-10, IL-8 and IFN were increased by 231 %, 49.1 % and 57.5 %, respectively, in CA group in comparison as DBM group. The lower ingestion and consequent lower tecidual concentration of  $\alpha$ -tocopherol may increase the possibility of developing breast cancer. The results of this study suggest the existence of biological effects of nutrients on the immune system. The highest tecidual concentration of pro-inflammatory mediators in the group of women with breast cancer shows that this disease involves the immune response in an attempt to eliminate cancer cells. On the other hand, the enhanced synthesis of IL-10, anti-inflammatory mediator, may be a protective mechanism against the action exacerbated the pro-inflammatory compounds. The development of further studies involving this issue are necessary in order to

elucidate the potential risk factors and of protection against breast cancer and the mechanisms involved in the interaction between nutrients and immune system.

## 1 – INTRODUÇÃO

A carcinogênese é um processo complexo, ainda não completamente elucidado e ocorre em múltiplas etapas. As células se tornam malignas em decorrência de uma série de mutações progressivas e cumulativas provocadas pela interação entre agentes físicos, químicos e biológicos com o material genético. Todavia, mecanismos de eliminação destas alterações podem ser ativados (AMENDOLA; VIEIRA, 2005).

O ciclo de divisão celular é composto por eventos de replicação do DNA e divisão celular, os quais são processos coordenadamente controlados para atender às necessidades do organismo (COLLINS et al., 1997). Alterações nos mecanismos que regulam esses processos podem modificar a fisiologia da célula normal e, eventualmente, conduzir ao desenvolvimento de um tumor (AMENDOLA; VIEIRA, 2005).

Embora as células disponham de mecanismos de reparo que removem a maior parte das lesões introduzidas no DNA, uma pequena parcela delas não chega a ser reparada ou a reparação não é eficiente e, como consequência, podem surgir as mutações. O processo de transformação neoplásica inicia-se quando estas mutações alteram a expressão de proto-oncogenes e genes supressores de tumor, os quais regulam direta ou indiretamente a proliferação e a diferenciação celular (AMENDOLA; VIEIRA, 2005). Desta forma, a conexão entre o ciclo celular e o câncer é claro: a maquinaria do ciclo celular controla a proliferação e a diferenciação da célula, e o câncer é uma doença referente à inapropriada realização destes processos (COLLINS et al., 1997).

O desenvolvimento do tumor é um processo prolongado e cíclico, de contínua interação entre as células tumorais e o microambiente que as circundam, no qual as células que compõem o estroma e a matriz extracelular exercem papéis decisivos. Embora as mutações em genes cruciais possam representar eventos iniciadores da tumorigênese, a inflamação crônica parece favorecer a completa transição para a malignidade (RONNOV-JESSEN; BISSELL, 2009). Evidências apontam que o microambiente tumoral, o qual é amplamente influenciado pelas células inflamatórias, é um participante indispensável do processo neoplásico, por auxiliar a proliferação, sobrevivência e migração das células alteradas. As células tumorais fazem uso das moléculas sinalizadoras da resposta imune (principalmente de leucócitos infiltrados), tais como as selectinas, quimiocinas e de seus receptores para invadir, migrar para



outros tecidos (COUSSENS; WERB, 2002). A resposta imune inicialmente considerada anti-tumor, passa a ser utilizada pelas células cancerosas como mecanismo de proliferação e invasão tecidual exacerbando o processo inflamatório e liberação de radicais livres.

Vitaminas antioxidantes e compostos pró-vitamínicos parecem exercer efeito protetor contra a ação de substâncias com grande potencial de danificar o DNA, minimizando a propagação da cascata de reações que culminam com a formação de radicais livres, em especial de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). As ERO podem levar, em curto prazo, à síntese de outros compostos envolvidos no estresse oxidativo; acionamento das defesas imunológicas (como a ativação de fagócitos, que poderiam levar ao excesso de produção de radicais livres) e, em longo prazo, à iniciação, promoção e progressão do tumor (ROCK et al., 1996). As vitaminas podem ainda atuar conjuntamente com o sistema imunológico, por meio de eventos celulares (a deficiência de vitamina E está associada à diminuição da produção de anticorpos pelos linfócitos B e redução da proliferação das células T sob estímulo) e moleculares (o  $\beta$ -caroteno pode levar ao aumento do percentual de monócitos expressando várias das moléculas de superfícies necessárias para a apresentação do antígeno à outras células que compõem o sistema imunológico) (HUGHES, 2000).

No cenário epidemiológico brasileiro, as estimativas para o ano de 2008 e 2009 apontam que poderão ocorrer 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma serão, entre as mulheres, os cânceres de mama (49 mil casos novos, com risco de 50,71 casos a cada 100 mil mulheres brasileiras) e de colo do útero (19 mil) e, entre os homens, os cânceres de próstata (49 mil) e pulmão (27 mil) (BRASIL, 2007). Neste contexto, a compreensão dos mecanismos envolvidos na carcinogênese da mama tem recebido considerável atenção.

O câncer de mama origina-se da acumulação de alterações genéticas que induzem às mudanças na expressão do padrão de genes e proteínas que atuam em um complexo sistema de sinalização celular (GRIZZI et al., 2008). Essas alterações aberrantes, quando reunidas em uma única célula da mama, podem romper o sistema de controle responsável pela interrupção do ciclo celular, reparo das alterações genéticas e, ou desencadeamento da apoptose, a ponto de assumir autonomamente as funções celulares de maneira errada e irregular. A replicação contínua das células geneticamente

modificadas resulta na formação de uma colônia de células anormais que podem acumular outras mutações para eventualmente iniciar o câncer (WREN, 2007).

A etiologia do câncer de mama ainda é pouco compreendida, mas vários fatores de risco têm sido identificados, tais como os efeitos do padrão alimentar, grupos alimentares, bem como nutrientes isolados e outros determinantes nutricionais sobre o risco de desenvolvimento deste tipo de câncer (BISSONAUTH et al., 2008). O papel dos aspectos nutricionais na gênese do câncer de mama permanece controverso. Um grande número de fatores alimentares, incluindo o consumo de frutas e hortaliças (ZHANG et al., 1999; GANDINI et al., 2000), produtos lácteos (KNEKT et al., 1996), carnes (KNEKT et al., 1994), e aspectos alimentares como a ingestão de lipídios (CIBEIRA; GUARAGNA, 2006; THIEBAUT et al., 2009) e vitaminas antioxidantes (KIM et al., 2001; SATO et al., 2002) têm sido intensamente avaliados em relação ao risco de desenvolvimento de câncer de mama.

À luz destes achados, investigar os possíveis mecanismos moleculares que atuam na carcinogênese da mama feminina é de suma importância, principalmente considerando os efeitos que determinados compostos nutrientes podem exercer, seja de maneira direta ou por meio de sua relação com o sistema de defesa do organismo, para que assim sejam propostos novos mecanismos de prevenção e tratamento contra o câncer, em especial o de mama.

## 1.1- Referências Bibliográficas

AMENDOLA, L. C. B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, n.4, p.325-330, 2005.

BISSONAUTH, V.; SHATENSTEIN, B.; GHADIRIAN, P. Nutrition and breast cancer among sporadic cases and gene mutation carriers: An overview. **Cancer Detection and Prevention**, v.32, p.52-64, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA. 2007.

COLLINS, K.; JACKS, T.; PAVLETICH, N. P. The cell cycle and cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.2776-2778. 1997.

COUSSENS, L.M; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860-867, 2002.

GANDINI, S.; MERZENICH, H.; ROBERTSON, C. et al. Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetables consumption and the intake of associated micronutrients. **European Journal of Cancer**, v.36, p.636-646, 2000.

GRIZZI, F.; BICCARI, S. D.; MAGGIO, A. D. I.; et al. The complex dynamics of breast cancer. **Current Women's Health Reviews**, v.4, n.3, p.200-209, 2008.

HUGHES, D. A. Dietary antioxidants and human immune function. **British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin**, v.25, p.35-41, 2000.

KAMANGAR, F.; DORES, G. M.; ANDERSON, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **Journal of Clinic Oncology**, v.24, n.14, May 10, p.2137-2150, 2006.

KAUFMANN, W. K. Initiating the uninitiated: replication of damaged DNA and carcinogenesis. **Cell Cycle**, v.6, n.12, Jun 15, p.1460-7, 2007.

KEY, T. J.; VERKASALO, P. K.; BANKS, E. Epidemiology of breast cancer. **The Lancet Oncology**, v.2, p.133-140, 2001.

KIM, M. K.; AHN, S. H.; LEE-KIM, Y. C. Relationship of serum alpha-tocopherol, carotenoids and retinol with the risk of breast cancer. **Nutrition Research**, v.21, p.797-809, 2001.

KNEKT, P.; JARVINEN, R.; SEPPANEN, R. et al. Intake of dairy products and the risk of breast cancer. **British Journal of Cancer**, v.73, p.687-691, 1996.

\_\_\_\_\_; STEINECK, G., JÄRVINEN, R. et al. Intake of fried meat and risk of cancer: A follow-up study in Finland. **International Journal of Cancer**, v.59, p.756-760, 1994.

MANTOVANI, A.; MARCHESI, F.; PORTA, C. et al. Inflammation and cancer: Breast cancer as a prototype. **The Breast**, v.16, p.S27-S33, 2007.

ROCK, C. L.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: Vitamin C, Vitamin E, and the carotenoids. **Journal of the American Dietetic Association**, v.96, p.693-702, 1996.

RONNOV-JESSEN, L.; BISSELL, M. J. Breast cancer by proxy: can the microenvironment be both the cause and consequence? **Trends in Molecular Medicine**, v.15, n.1, p.5-13, 2009.

SATO, R.; HELZLSOUER, K. J.; ALBERG, A. J. et al. Prospective Study of Carotenoids, Tocopherols, and Retinoid Concentrations and the Risk of Breast Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.11, p.451-457, 2002.

WREN, B. G. The origin of breast cancer. **Menopause**, v.14, n.6, p.1060-1068, 2007.

ZHANG, S.; HUNTER, D. J.; FORMAN, M. R. et al. Dietary Carotenoids and Vitamins A, C, and E and Risk of Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.91, n.6, p.547-556, 1999.

## 2 – OBJETIVOS

### 2.1 – Objetivo Geral

Avaliar níveis alimentares e bioquímicos de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), vitamina A (retinol) e pró-vitamina A ( $\beta$ -caroteno) e a expressão de mediadores inflamatórios no tecido mamário sobre a chance de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres atendidas em serviço público de mastologia no período de janeiro a julho de 2006.

### 2.2 – Objetivos Específicos

- Analisar as características de ingestão alimentar, dados clínicos, sócio-econômicos e antropométricos das mulheres com e sem câncer de mama.
- Analisar a ingestão alimentar e a concentração de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), vitamina A (retinol) e pró-vitamina A ( $\beta$ -caroteno) no tecido adiposo mamário de mulheres com câncer de mama, doença benigna da mama e controle.
- Analisar o conteúdo de vitamina A (retinol) e pró-vitamina A ( $\beta$ -caroteno) plasmático das amostras de sangue das mulheres componentes da amostra participantes do estudo.
- Analisar a expressão de mediadores inflamatórios (INF $\gamma$ , IL-8 e IL-10) no tecido adiposo mamário das mulheres submetidas à biópsia ou cirurgia da mama.

### 3- REFERENCIAL TEÓRICO

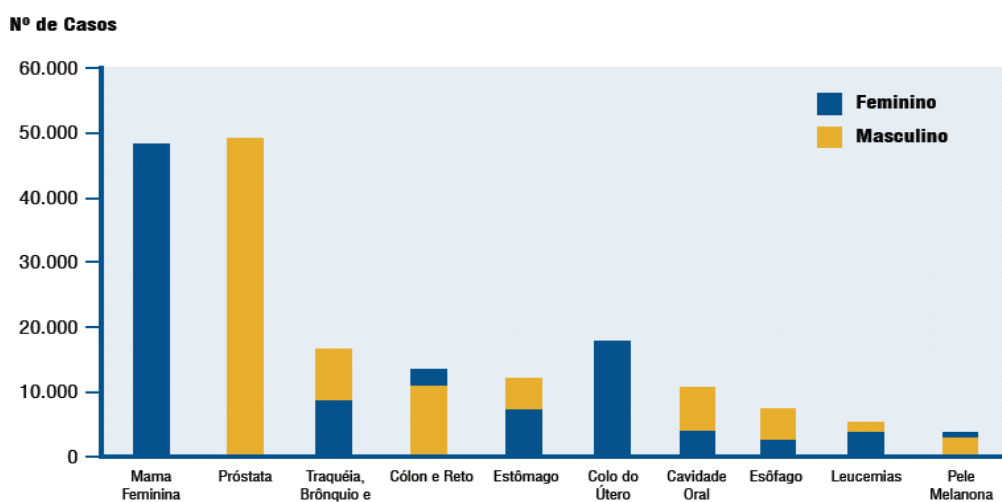
#### 3.1- Aspectos conceituais

O câncer é uma doença genética e a carcinogênese é o processo por meio do qual ocorrem relevantes alterações gênicas (KAUFMANN, 2007). A carcinogênese envolve múltiplas etapas, é considerado complexo e ainda pouco elucidado. As células se tornam malignas através de uma série de mutações progressivas e cumulativas ocorridas no DNA celular. Essas mutações são induzidas pela ação de agentes físicos, químicos e biológicos que danificam o material genético, acarretam alterações aberrantes que podem permanecer durante a replicação do DNA (AMENDOLA; VIEIRA, 2005; KAUFMANN, 2007).

Dentre os diferentes tipos de câncer, o de mama é o que contribuiu para o maior número de óbitos entre as mulheres em todo o mundo (KAMANGAR et al., 2006). Apesar dos países em desenvolvimento apresentarem menor incidência desta doença, observa-se um aumento crescente do número de novos casos (KEY et al., 2001) o que permite considerar o câncer de mama como um problema de saúde pública (SCHWARTSMANN, 2001; PADILHA e PINHEIRO, 2004). O câncer de mama representa, no cenário epidemiológico brasileiro, a principal causa de morte por câncer entre as mulheres, com exceção do câncer de pele não melanoma. Esse tipo de câncer foi responsável, no ano de 2005, por 502 mil óbitos e as estimativas de incidência para os anos de 2008 e 2009 apontam que ocorrerão, entre as mulheres, 49 mil casos novos (Figura 1) (BRASIL, 2007). Uma vez reconhecida a elevada incidência e mortalidade por câncer de mama, a prevenção, bem como o controle deste tipo de neoplasia, são de grande relevância (PADILHA; PINHEIRO, 2004).

A interação entre fatores ambientais e endógenos resulta no desenvolvimento do câncer de mama, sendo a dieta um dos aspectos mais relevantes implicados no surgimento desta doença (WÄRRI et al., 2007). Acredita-se que cerca de 35% dos diversos tipos de câncer poderiam ser evitados por meio do consumo de uma dieta saudável (GARÓFOLO et al., 2004). Diversos estudos têm analisado a existência de associações entre padrões alimentares e o risco de desenvolvimento de câncer de mama (VAN GILS et al., 2005; RONCO et al., 2006; WU et al., 2009). Apesar de controversos constata-se, em muitos destes trabalhos, a inversa associação entre o consumo de frutas e hortaliças, alimentos ricos em vitaminas e pró-vitaminas

antioxidantes e o risco de neoplasia da mama (MALIN et al., 2003; GAUDET et al., 2004).



**Figura 1** - Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2008, na população brasileira, sem pele não melanoma.

Fonte: Reproduzida com permissão do Ministério da Saúde/Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2007.

A ação destes compostos parece estar envolvida na modulação do estado redox (LI et al., 2009) que em desequilíbrio, pode propagar danos no material genético e demais compartimentos da célula e levar a ativação do sistema imunológico (HUGHES, 2001).

Em virtude da relevância do tema abordado, o presente referencial teórico visa expor aspectos relevantes da carcinogênese da mama, como o estadiamento da doença, os fatores de risco, a ingestão alimentar, as interações entre compostos presentes no microambiente tecidual e as estruturas celulares que o compõe, assim como as implicações no desenvolvimento da neoplasia da mama, principalmente no que tange a importância das vitaminas E ( $\alpha$ -tocoferol), A (retinol) e da pró-vitamina A ( $\beta$ -caroteno).

### 3.2- A carcinogênese e o ciclo celular

O ciclo celular governa a transição da etapa quiescente (G0) para a etapa de proliferação enquanto assegura a fidelidade da transcrição genética. As fases associadas à síntese de DNA (fase S) e mitose (fase M) são separadas por intervalos de crescimento e reorganização celulares denominados G1 e G2 (COLLINS et al. 1997; DICKSON ; SCHWARTZ, 2009). A adequada progressão do ciclo celular é monitorada por mecanismos de controle (*checkpoints*) que corrigem possíveis defeitos ocorridos durante a síntese do DNA e segregação cromossômica. A ativação dos *checkpoints* induz ao atraso ou à paralisação do ciclo celular por vias de sinalização ativas mediada

por enzimas. O impedimento da evolução do ciclo permite às células reparar esses prejuízos, prevenindo então a transmissão dessas alterações às células-filhas (MALUMBRES ; BARBACID, 2009).

Não obstante as células disponham destas ferramentas de correção, uma pequena parcela das lesões introduzidas no DNA não chega a ser reparada ou a correção ocorre de forma ineficiente e, como consequência surgem as mutações. O processo de transformação neoplásica se inicia quando estas mutações alteram a função de genes que regulam direta ou indiretamente a proliferação ou a diferenciação das células, como os proto-oncogenes e genes supressores de tumor (AMENDOLA; VIEIRA, 2005).

A regulação homeostática do número de células no tecido normal reflete um balanço preciso entre a proliferação e a morte celular. A morte celular programada (apoptose) provê um mecanismo de proteção contra o câncer, pela remoção das células mutadas que potencialmente interferem na função normal do tecido e conduzem à transformação neoplásica. Desta forma, a apoptose exerce um importante papel na taxa de crescimento do tumor. A apoptose mediada pela proteína p53 é um exemplo de mecanismo de prevenção da proliferação celular induzida pela ativação de oncogenes (ANISIMOV, 2009). A p53 controla a progressão de células da fase G1 para a fase S do ciclo celular, atuando como regulador negativo do crescimento celular em resposta a ocorrência de dano ao DNA com o intuito de propiciar a integridade genômica (SIROMA; BARACAT, 2006).

Em decorrência dos mecanismos de reparo, o processo de formação do câncer é geralmente lento, podendo levar vários anos para que uma célula prolifere e dê origem a um tumor detectável. Esse processo é composto por múltiplos estágios: iniciação, onde os genes sofrem ação de fatores cancerígenos; promoção, onde os agentes oncopromotores atuam na célula já alterada; e estágio de progressão, caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível da célula (BRASIL, 2002). Todos estes processos podem ser influenciados pelo microambiente que circunda a célula iniciadora da carcinogênese.

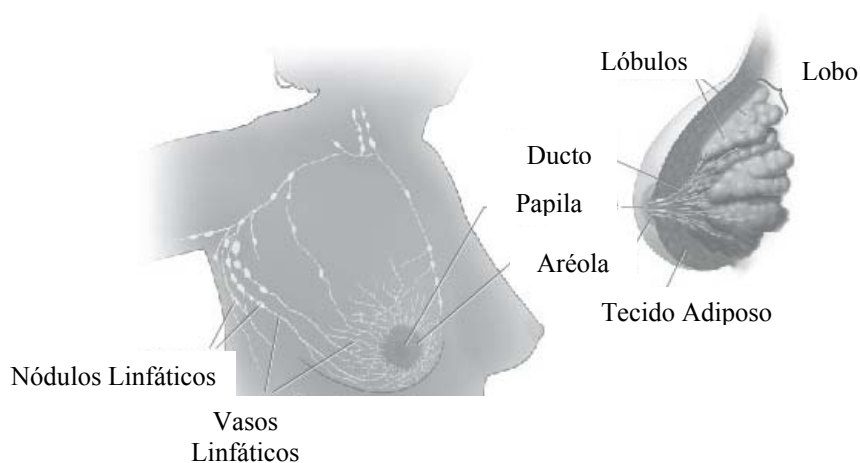
### 3.3- O câncer de mama

#### *A anatomia das mamas*

As mamas são órgãos pares, localizadas na parede anterior do tórax, sobre os músculos Grande Peitoral. Externamente, cada mama, na sua região central, é composta



por uma aréola e uma papila. A partir desta estrutura exteriorizam-se aproximadamente 15 a 20 orifícios ductais que correspondem às vias de drenagem das unidades funcionantes – os lobos mamários. Os lobos se ramificam em pequenas estruturas denominadas lóbulos, os quais em sua porção terminal são compostos por grupos de ácinos cujas células podem secretar leite (BRASIL, 2002). O tecido adiposo preenche os espaços entre os lóbulos e os ductos. As mamas também apresentam vasos linfáticos que são conduzidos para pequenos órgãos – os nódulos linfáticos. Grupos de nódulos linfáticos localizam-se próximo às mamas, nas axilas; anteriormente à clavícula; no peito, atrás do esterno e em muitas outras regiões do corpo (Figura 2). Os nódulos linfáticos capturam bactérias, células cancerosas e substâncias prejudiciais ao organismo (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2007).



**Figura 2-** Ilustração da anatomia da mama.

Fonte: Reproduzida com permissão do National Cancer Institute (2007).

As mamas têm como função principal a produção de leite para a amamentação, mas também possuem grande importância psicológica para a mulher, representando papel fundamental na construção da auto-imagem feminina. Além disso, desempenham também função erógena e de atração sexual (BRASIL, 2002).

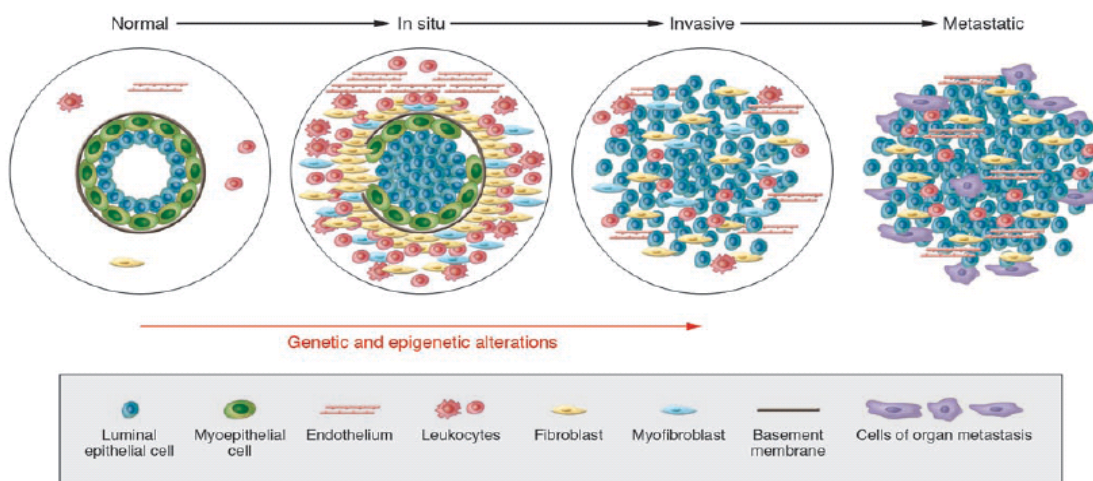
Diante da importância destas estruturas, estudar melhor as alterações nas mesmas, especialmente o câncer é de grande relevância.

#### *Evolução do câncer de mama*

A hipótese da história natural da neoplasia da mama envolve a completa progressão (última fase do desenvolvimento da doença), definida por estágios. Inicia-se

com a hiperproliferação das células ductais (estágio pré-maligno de hiperplasia ductal atípica - HDA), evolui para a neoplasia *in situ* (estágio pré-invasivo do carcinoma ductal *in situ* - CDIS), progride para um estágio potencialmente invasivo e letal (carcinoma ductal invasivo – CDI) e, finalmente, para a doença metastática (Figura 3) (MA et al., 2003; POLYAK, 2007).

O câncer de mama não é uma doença singular, mas é composto de distintos subtipos associados a diferentes resultados clínicos (POLYAK, 2007). Baseado em dados epidemiológicos, as lesões morfológicamente definidas podem ser categorizadas como aquelas com pouco potencial maligno (por exemplo, hiperplasia típica ou doença proliferativa sem atipia – DPSA), aquelas com significativo potencial maligno (por exemplo, HDA) e lesões malignas, mas ainda não invasivas (por exemplo, CDIS) (O’CONNELL et al., 1994).



**Figura 3-** Modelo hipotético da progressão do tumor da mama. É esquematizado o tecido normal, *in situ*, invasivo (invasivo) e a progressão o carcinoma metastático (metastatic). Os ductos normais da mama são compostos de uma membrana basal (basement membrane) e uma camada de células epiteliais (luminal epithelial cell) e mioepiteliais (myoepithelial cell). As células que compõem o estroma incluem leucócitos (leukocytes), fibroblastos (fibroblast), miofibroblastos (myofibroblast) e células endoteliais (endothelium). No carcinoma *in situ* as células mioepiteliais são alteradas e seu número diminui potencialmente devido à degradação da membrana basal. Ao mesmo tempo, aumenta o número de fibroblastos, miofibroblastos, linfócitos e células endoteliais. A perda das células mioepiteliais e da membrana basal resulta no carcinoma invasivo, no qual as células tumorais podem invadir os tecidos circundantes e migrar para órgãos distantes, conduzindo eventualmente à metástase.

Fonte: Reproduzida com a permissão da American Society for Clinical Investigation. POLYAK, K. Breast câncer: Origins and evolution. The Journal of Clinical Investigation, v. 117, n. 11, p.3155-3163, 2007.

O estadiamento da neoplasia da mama é dividido em quatro etapas, determinadas pelo tamanho do tumor, comprometimento nodal e metástases:

*Estágio 0 (carcinoma in situ)*

- Carcinoma Lobular *in situ* (CLIS): células anormais compõem o revestimento de um lóbulo. CLIS raramente se torna um câncer invasivo, porém estando em uma mama aumenta o risco de câncer para ambas as mamas.

- Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS): células anormais recobrem o ducto. O CDIS também é denominado carcinoma intraductal. As células modificadas não se propagam para o exterior do ducto. Tais células não invadem o tecido da mama próximo. Se não tratado o CDIS algumas vezes se torna invasivo.

#### *Estágio I*

- É um estágio precoce do câncer de mama invasivo. O tumor não é maior que 2 cm de diâmetro. As células cancerosas não se espalharam além da mama.

#### *Estágio II (configura-se por uma das características abaixo)*

- O tumor não é maior que 2 cm de diâmetro e se propagou para nódulos linfáticos na axila.

- O tumor possui entre 2 e 5 cm de diâmetro e não se espalhou para os nódulos linfáticos da axila.

- O tumor possui entre 2 e 5 cm de diâmetro e se espalhou para os nódulos linfáticos da axila.

- O tumor possui mais de 5 cm de diâmetro e não se espalhou para os nódulos linfáticos da axila.

#### *Estágio III (o câncer é localmente avançado). Este estágio é subdividido em IIIA, IIIB e IIIC*

- O estágio IIIA possui uma das seguintes características: a) O tumor não é maior que 5 cm, se propagou para nódulos linfáticos da axila que estão unidos entre si ou a outras estruturas, ou o câncer atingiu nódulos linfáticos localizados atrás do esterno. b) O tumor possui mais de 5 cm de diâmetro. O câncer se espalhou para nódulos linfáticos da axila que estão anexados entre si ou a outras estruturas, ou o câncer se propagou para nódulos linfáticos presentes atrás do esterno.

- O estágio IIIB é um tumor que tem crescimento para dentro da parede torácica ou pele da mama. Ele pode estar associado com turgecência da mama ou com nódulos na pele da mama. Neste estágio o tumor pode apresentar as seguintes características: a) pode ter se espalhado para nódulos linfáticos da axila. b) pode ter se propagado para nódulos linfáticos que estão unidos uns aos outros ou a outras estruturas, ou o câncer pode ter atingido nódulos linfáticos atrás do esterno. c) O câncer de mama inflamatório é um tipo de câncer raro. A mama apresenta-se vermelha e inchada porque as células cancerosas bloqueiam os vasos linfáticos localizados na pele da mama.

- No estágio IIIC o tumor tem tamanho variado, mas pode ter acometido as seguintes localizações: a) nódulos linfáticos presentes atrás do esterno e na axila, b) nódulos linfáticos localizados acima ou abaixo da subclávia.

#### *Estágio IV*

- Caracteriza-se por câncer metastático distante, ou seja, o câncer se espalhou para outras partes do corpo.

O câncer recorrente é o câncer que voltou a se desenvolver após um período de tempo em que ele não poderia ser detectado. Ele pode recorrer localmente na mama ou na parede torácica, ou em qualquer outra parte do corpo, como ossos, fígado ou pulmão (BRASIL, 2004; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2007).

O câncer de mama invasivo (CMI) é uma das neoplasias malignas letais mais comuns que afetam as mulheres ocidentais. Acredita-se que a maioria dos CMI se desenvolve por longos períodos de tempo a partir de lesões benignas pré-existentes. Existem muitos tipos de lesões benignas da mama, mas somente poucos tipos parecem ter significativo potencial pré-maligno. As principais lesões pré-malignas reconhecidas hoje são referidas a HDA, HLA, CDIS e CLIS. Todas essas lesões possuem alguma propriedade maligna como relativa perda do controle de crescimento, mas elas possuem pouca habilidade para invadir e espalhar para outros tecidos, sendo assim, são consideradas pré-malignas (ALLRED et al., 2001).

#### *Principais Fatores de Risco*

As causas exatas do câncer de mama ainda não estão completamente elucidadas, mas presumivelmente elas compreendem uma complexa associação entre a suscetibilidade genética e fatores ambientais (como a industrialização, consumo de alimentos ricos em gorduras e açúcares) (RAY; HUSAIN, 2001).

Os principais fatores associados à carcinogênese da mama incluem: envelhecimento (muitos casos de câncer de mama ocorrem em mulheres com idade superior a 60 anos), terapia de reposição hormonal na menopausa com uso de estrogênio e progesterona (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2007), nuliparidade (PAIVA et al., 2002), menarca precoce (antes dos 11 anos), menopausa tardia (após os 55 anos), primeira gestação a termo após os 30 anos, ciclos menstruais menores que 21 dias, mãe, irmã ou filha com história de câncer de mama na pré-menopausa, dieta rica em gordura animal, dieta pobre em fibras, obesidade (principalmente após a menopausa), radiações

ionizantes, etilismo, padrão socioeconômico elevado, residência em área urbana, cor branca (BRASIL, 2002), sedentarismo (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2007). Por outro lado, os principais fatores associados ao risco diminuído de câncer de mama compreendem: menarca após os 14 anos, menopausa antes dos 45 anos, primeira gestação a termo e amamentação precoces (idade inferior a 30 anos), atividade física regular e hábitos alimentares saudáveis (baixo teor de gordura, sal e açúcar; aumento no teor de grãos integrais, tubérculos, vegetais e frutas) (BRASIL, 2002).

Muitos dos fatores descritos acima podem ser potencialmente evitados. Há evidências que fatores alimentares como a baixa ingestão de frutas e hortaliças, possam influenciar os estágios de iniciação, promoção e progressão do câncer no mundo e, principalmente nos países em desenvolvimento (DANAEI et al., 2005).

Estima-se que a baixa ingestão de frutas e hortaliças contribua como segunda causa para o desenvolvimento de cânceres preveníveis, o que corresponde a aproximadamente 5% da origem dos cânceres que poderiam ser evitados (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). A variação internacional da incidência de câncer de mama e estudos de imigrações populacionais revelam que a incidência de câncer de mama em mulheres que imigraram de países com menor taxa deste tipo de câncer para países com maior incidência (principalmente os ocidentais) aumenta com o tempo até se assemelhar às taxas das populações dos países que receberam os imigrantes, levando à hipótese que a dieta é um fator que influencia o risco para esta doença. As mudanças no padrão de consumo alimentar são sugeridas como uma das principais responsáveis pelo aumento da incidência de câncer (FREUDENHEIM et al., 1996; GREENWALD, 2001; GROVER; MARTIN, 2002; JOHN et al., 2005; RASTOGI et al. 2008).

Algumas pesquisas indicam que a alta ingestão de frutas e hortaliças pode atuar como fatores de proteção contra o câncer de mama (FREUDENHEIM et al., 1996; RAY; HUSAIN, 2001; KEY et al., 2003). Adicionalmente, exemplos de constituintes alimentares que vêm sendo estudados em triagens clínicas de prevenção do câncer de mama incluem as vitaminas A e E (GREENWALD, 2001), além de outros compostos. Trabalhos também sugerem uma melhora do prognóstico e da expectativa de vida (aumento de 20 a 90%) de pacientes que passaram a consumir compostos antioxidantes por meio da ingestão de frutas e vegetais, após o diagnóstico da doença. Ressalta-se que a variabilidade na ingestão alimentar e erros inerentes a sua mensuração é um aspecto que dificulta os estudos de associação entre fatores alimentares e a incidência de câncer de mama (FINK et al., 2006).

Tradicionalmente, em estudos populacionais os principais métodos de avaliação da ingestão alimentar incluem o questionário de frequência alimentar, o recordatório e o registro alimentar (TOGO et al., 2003; ANDERSEN et al., 2005) os quais têm por objetivo estimar os alimentos ingeridos em uma dieta habitual (TANGNEY et al., 1987).

A verificação de associações entre a ingestão e o risco de doenças em estudos epidemiológicos é limitada pela dificuldade de se mensurar o consumo de forma acurada. Este problema é inerente aos diferentes métodos de avaliação da ingestão alimentar que dependem do relato individual. O sub-relato é um fenômeno complexo que envolve fatores emocionais, sociais, físicos e cognitivos, podendo comprometer desta forma as inferências feitas a partir de estudos de avaliação da ingestão alimentar (SCAGLIUSI; LANCHÁ JÚNIOR, 2003). Apesar de úteis na prática clínica e em pesquisas epidemiológicas, os métodos de avaliação da ingestão de alimentos, podem induzir aos erros devido à utilização de tabelas com valores médios de nutrientes, dificuldade na estimativa da porção do alimento, entre outros (GARCIA, 2004).

A obtenção de um método que forneça dados válidos e confiáveis em estudos epidemiológicos é tarefa difícil, uma vez que não existe um padrão ouro para a avaliação da ingestão de alimentos e nutrientes (LOPES, 2003). Desta forma, a interpretação dos resultados obtidos nestes trabalhos deve ser feita com cautela e o desenvolvimento de marcadores bioquímicos que possam validar a ingestão de diversos nutrientes é desejável (SCAGLIUSI; LANCHÁ JÚNIOR, 2003).

#### 3.4- Biomarcadores: inovação na avaliação da ingestão alimentar

Em decorrência da dificuldade em mensurar a ingestão de alimentos, os biomarcadores da ingestão alimentar surgem como uma nova perspectiva para avaliar de forma acurada a ingestão pregressa ou usual de alimentos (ANDERSEN et al., 2005), uma vez que eles não dependem da memória dos indivíduos (WILD et al. 2001). A utilização de biomarcadores tem sido considerada um avanço para as pesquisas em nutrição, uma vez que os nutrientes podem ser aferidos diretamente dos compartimentos corpóreos, reduzindo os possíveis erros inerentes aos métodos de avaliação dietética, o que facilita a avaliação do estado nutricional (BLANCK et al., 2003).

Tem sido demonstrada inversa associação entre variáveis alimentares, como a ingestão de carotenóides, em especial de  $\beta$ -caroteno (ZHANG et al., 1999), e vitamina E

(FREUDENHEIM et al., 1996; RAY; HUSAIN, 2001) e o risco de desenvolvimento de câncer de mama. Suas concentrações plasmáticas e teciduais refletem a quantidade provida pela dieta, principalmente originárias de frutas, hortaliças, sementes oleaginosas e óleos sendo, portanto, considerados marcadores da ingestão destes alimentos (VAN KAPPEL et al., 2001; POLLARD et al., 2003).

Vale ressaltar que este tipo de avaliação pode sofrer influência de fatores não alimentares como: tamanho corporal, adiposidade (NATARAJAN et al., 2004), variabilidade interindividual (WILD et al. 2001), processos fisiológicos (POLLARD et al., 2003), sazonalidade alimentar resultante das estações do ano (LOPES et al., 2003), os quais limitam a exatidão dos resultados. Neste sentido, biomarcadores podem ser usados em estudos com o intuito de mensurar a biodisponibilidade do nutriente no microambiente tecidual. Todavia sua associação a metodologias utilizadas para a avaliação da ingestão alimentar pode propiciar melhor observância da condição do micronutriente no organismo (WILD et al. 2001; POLLARD et al., 2003).

### 3.5- Danos oxidativos e seus efeitos na carcinogênese

A transformação neoplásica implica em uma complexa série de mudanças celulares e moleculares mediadas por agentes que podem afetar a transição destas etapas (VALKO et al., 2004; ANISIMOV, 2009). Embora a iniciação e a progressão do tumor sejam conduzidas pela aquisição de alterações genéticas, o microambiente tecidual desempenha importante papel na indução dessas modificações. As interações entre as células (epiteliais, mioepiteliais, fibroblastos, adipócitos, leucócitos, dentre outras) e as moléculas que compõem a matriz extracelular e modulam a especificidade tecidual mamária, podem condicionar eventos carcinogênicos e determinar a duração de cada estágio (LIN; POLLARD, 2007; POLYAK, 2007). As modificações do microambiente tumoral influenciam a taxa de proliferação das células transformadas e, conseqüentemente, o desenvolvimento do tumor (ANISIMOV, 2009).

Evidências experimentais sugerem um importante papel dos radicais livres, em especial das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), no processo de desenvolvimento do câncer. Na estrutura dos átomos e das moléculas, os elétrons associam-se normalmente em pares. Radicais livres ou espécies reativas são espécies independentes que contém um ou mais elétrons não pareados. A presença de elétron não pareado na molécula aumenta sua reatividade química, característica que lhe confere grande instabilidade, por tender a acoplar o elétron não pareado com um outro que esteja presente em

estruturas próximas, comportando-se como receptor (oxidantes) ou como doador (redutores) (LEITE; SARNI, 2003).

De modo geral, a produção intracelular de ERO é considerada normal em níveis fisiológicos e exerce papel vital na regulação da sinalização celular e expressão gênica (BERRA et al., 2006). O aumento da concentração celular de ERO, e subsequente estresse oxidativo, originado por mecanismos fisiológicos ou por exposição à carcinógenos, contribui para o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis, como o câncer. Estima-se que em uma célula possam ocorrer  $10^5$  lesões oxidativas por dia (VALKO et al., 2004). Prejuízos persistentes no DNA podem resultar na paralisação ou indução da transcrição, vias de transdução de sinais, erros de replicação, e instabilidade genômica, fenômenos estes observados na carcinogênese (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre os oxidantes e os antioxidantes, em favor do primeiro, resultando em um substancial aumento dos radicais livres em nível celular (ROCK et al., 1996). As ERO podem ser produzidas por fontes endógenas e exógenas. As fontes exógenas incluem luz ultravioleta, irradiação ionizante e agentes químicos. Dentre as potenciais fontes endógenas citam-se a fosforilação oxidativa e a ativação de células inflamatórias (BIANCHI; ANTUNES, 1999; BERRA et al., 2006).

Durante o metabolismo oxidativo mitocondrial, a maior parte do oxigênio consumido é reduzido à água, porém estima-se que aproximadamente 5% das moléculas de oxigênio sejam convertidas a ERO, inicialmente o ânion superóxido é formado por uma redução eletrônica do oxigênio molecular. O superóxido pode ser convertido pela superóxido dismutase a peróxido de hidrogênio. Na presença de íons metálicos parcialmente reduzidos, como o ferro, o peróxido de hidrogênio é convertido ao radical hidroxil por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss. O radical hidroxil é altamente reativo e pode interagir com ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004).

Células que compõem o sistema de defesa, tais como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, são consideradas adicionais fontes endógenas e grandes geradoras de ERO. Os macrófagos ativados, por meio da “explosão respiratória”, conduz a um rápido e transitório aumento na captação de oxigênio que ocasiona a geração de várias ERO, incluindo ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (um potente radical



livre que participa da sinalização celular) (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004). Moléculas como as de peróxido de hidrogênio podem atravessar a membrana celular e entrar na célula acarretando mudanças no estado redox intracelular. Adicionalmente, quando presente no meio extracelular o peróxido de hidrogênio, pelo processo de oxirredução, pode também alterar o estado redox do meio e induzir danos na molécula de DNA (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os radicais livres também atuam como mensageiros das vias de sinalização intracelular das células inflamatórias. Cita-se como exemplo a ativação do fator nuclear *kappa* B (NF *kappa* B), induzida pelo peróxido de hidrogênio e bloqueada pela vitamina E. Este fator nuclear está envolvido na transcrição de genes pró-inflamatórios, incluindo citocinas (interleucinas 1, 2, 6 e 8), moléculas de adesão celular e óxido nítrico sintase e é considerado um importante mediador no sinal de transdução para atividade inflamatória induzida por citocinas (LEITE; SARNI, 2003).

Em contrapartida, uma grande variedade de sistemas de defesa está envolvida na proteção das macromoléculas celulares contra a ação devastadora das ERO. Estes sistemas são compostos pelas enzimas antioxidantes (Cu/Zn-superóxido dismutase, superóxido dismutase contendo manganês, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, dentre outras), algumas vitaminas ( $\alpha$ -tocopherol e ácido ascórbico) (ANISIMOV, 2009) e carotenóides (VALKO et al., 2004).

O aumento do consumo de frutas e hortaliças, ricas fontes exógenas de antioxidantes, tem sido indicado como um critério de diminuição do estresse oxidativo e do risco de câncer (LI et al., 2009). Dessa forma, protege os tecidos contra a injúria, e conseqüentemente, reduz a incidência de doenças crônicas não transmissíveis.

### 3.6- Vitaminas antioxidantes: potenciais agentes contra a carcinogênese

A síntese contínua de radicais livres durante processos metabólicos levou ao desenvolvimento de vias de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos causados por estes compostos. Antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em concentrações reduzidas quando comparada a do substrato oxidável, retarda ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Antioxidantes lipofílicos constituintes de frutas, hortaliças, sementes oleaginosas, tais como vitamina A e E e carotenóides tem recebido considerável atenção

na prevenção do câncer de mama. Estudo realizado por Kim et al. (2001) que avaliou a relação entre as concentrações séricas de vitaminas antioxidantes ( $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno) e o risco de câncer de mama em mulheres coreanas, mostrou inversa associação entre estas vitaminas e o risco de câncer de mama. Resultado semelhante foi observado por Sato et al. (2002), que encontraram maior risco de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres que possuíam menores concentrações séricas de  $\beta$ -caroteno e, para os demais micronutrientes, verificou-se uma tendência de proteção destas vitaminas contra o câncer de mama. Kabat et al. (2009), constataram que o  $\beta$ -caroteno esteve inversamente associado ao câncer de mama nas mulheres avaliadas.

Esses compostos vitamínicos lipofílicos parecem inibir o processo envolvido na carcinogênese, metabolismo carcinogênico e proliferação celular, bem como aumentar as defesas imunes (DORJGOCHOO et al., 2008). Estas ações são devidas principalmente à capacidade dos mesmos em bloquear a ação de radicais livres sobre lipídios, aminoácidos e bases do DNA, evitando a perda da integridade celular (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A vitamina A parece ter um papel vital na supressão da carcinogênese pelo aumento da imunidade contra o tumor através de vários mecanismos e por atuar como regulador do ciclo celular, modulando a síntese e a metilação do DNA (RAY e HUSAIN, 2001), bem como a diferenciação da célula (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Efeitos imunomodulatórios da vitamina A tem sido demonstrados em linhagens de células natural *killer* (NK), por meio da ativação destas células, e em linfócitos B, estimulando o crescimento e o desenvolvimento deste tipo celular. Além disso, o retinol tem sido usado como cofator das vias de ativação de células T (ALLENDE et al., 1997).

A vitamina E é o nome genérico de um grupo de oito compostos com propriedades lipossolúveis. Cada um destes compostos possui atividade biológica específica, sendo o  $\alpha$ -tocoferol o de maior atividade no organismo humano, dado o seu potencial antioxidante (VALKO et al., 2004). O  $\alpha$ -tocoferol é considerado o principal antioxidante da membrana celular e sua mais importante atividade é proteger esta estrutura contra a peroxidação lipídica (PADILHA; PINHEIRO, 2004). O  $\alpha$ -tocoferol também parece ser um potente indutor da apoptose em células epiteliais da mama, além de atuar em combinação com drogas quimioterápicas inibindo significativamente a metástase (KLINE et al., 2004). No organismo humano, o tecido adiposo é o principal

depósito periférico de vitamina E, o qual contém aproximadamente 80% a 90% do  $\alpha$ -tocoferol (ROCK et al. 1996).

Os carotenóides são pigmentos naturais encontrados geralmente em frutas e hortaliças, entretanto não podem ser sintetizados por animais e humanos, sendo a sua principal fonte alimentar os alimentos de origem vegetal. Existem mais de 600 carotenóides na natureza, os quais podem ser agrupados em carotenos, xantofila e licopeno (VALKO et al., 2004). Estes pigmentos, em especial o  $\beta$ -caroteno, possuem características antioxidantes e podem ser incorporados aos tecidos humanos (tais como  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno, licopeno, luteína/zeaxantina, dentre outros). Desta forma, eles são de interesse para o conhecimento da etiologia de várias enfermidades humanas que envolvem dano oxidativo, em especial o câncer (AL-DELAIFY et al., 2004).

A atividade antioxidante dos carotenóides compreende a habilidade estrutural das duplas conjugadas deslocarem elétrons não pareados. Esta é uma das principais capacidades do  $\beta$ -caroteno, que seqüestra fisicamente oxigênio “singlet” e reage com radicais livres tais como peroxil, hidroxil e superóxido, evitando a peroxidação lipídica (VALKO et al., 2004).

O  $\beta$ -caroteno pode também influenciar a resposta imune mediada por células através da função de monócitos, que necessita dos receptores do complexo de histocompatibilidade principal classe II para executar suas ações. Esta pró-vitamina pode aumentar a expressão destes receptores na superfície celular destas células de defesa (HUGHES, 2001). Adicionalmente às funções antioxidantes dos carotenóides, verifica-se que estes compostos atuam na supressão da transformação neoplásica por aumentarem as “Gap junctional communication” (BERTRAM, 2004).

A “Gap junctional communication”, ou “Gap junction”, é uma forma de comunicação célula-célula mediada pela permuta de pequenas moléculas entre células vizinhas, são formadas por conexinas e estão sujeitas a uma dinâmica regulação. A perda das conexinas e, conseqüentemente das “Gap junctions”, é uma das marcas da carcinogênese, todavia sua indução nas células cancerosas conduz à reversão do fenótipo destas células e diferenciação e regulação do crescimento celular. No câncer de mama, a expressão das conexinas é inversamente correlacionada ao potencial metastático, provavelmente devido à perda da cooperação entre as células vizinhas, levando a heterogeneidade celular e dissociação das células do tumor (CARYSTINOS et al., 2001). Vale ressaltar que a principal via do metabolismo do  $\beta$ -caroteno conduz á

formação da vitamina A (retinol) (ZIOUZENKOVA et al. 2007) e assim como observado para a vitamina E, o tecido adiposo é o principal local de armazenamento de carotenóides (ROCK et al., 1996).

O equilíbrio entre oxidantes, antioxidantes e o estado redox celular é importante para a regulação da expressão de genes. Mudanças no estado redox podem ser associadas ao processo de diferenciação, multiplicação e envelhecimento celular. Enquanto as ERO atuam como segundos mensageiros, os antioxidantes podem influenciar os níveis celulares destes compostos e então modular a ação destas espécies sobre a expressão de genes. A regulação da expressão de genes sensível ao estado redox ocorre através de alterações na estabilidade de mRNA e de proteínas.

Derivados de compostos antioxidantes, como o ácido retinóico, podem atuar diretamente sobre a expressão gênica, seja ligando-se ao receptor de ácido retinóico, um membro da família de receptores nucleares de hormônios esteroidais, ou ao receptor retinóide X, outro receptor nuclear/fator de transcrição ativado por ligante (ZIOUZENKOVA et al., 2007). Estudo realizado por Kim et al. (2006) mostrou que o ácido retinóico, um composto derivado da clivagem do  $\beta$ -caroteno reduziu a proliferação de células MCF-7 (uma linhagem de células de câncer de mama humano) em 20,7%. Os autores discutem que esta inibição pode ter envolvido a expressão de genes que induzem a diferenciação e o bloqueio da proliferação, e a ativação de enzimas antioxidantes e de proteínas envolvidas na apoptose, regulação do ciclo celular e reparo do DNA, conforme observado a partir dos resultados encontrados.

Considerando-se que a intensidade e a natureza das defesas antioxidantes dependem do estado nutricional e da ingestão de nutrientes, a intervenção nutricional pode ter efeito imunomodulador pela repleção de substâncias antioxidantes em pacientes em situação de estresse (LEITE; SARNI, 2003). Trabalhos indicam que as células cancerígenas sintetizam uma quantidade aumentada de DNA, RNA e proteínas quando comparadas às células normais, as quais podem ser controladas pela administração de vitaminas (RAY; HUSAIN, 2001; CHO et al, 2003).

Vale ressaltar que por serem moléculas de alta reatividade, os antioxidantes podem agir como pró-oxidantes. Embora a vitamina E seja considerada relativamente segura, a administração de altas doses em longo tempo pode ter efeito pró-oxidante (MILLER et al., 2005). Os carotenóides podem perder sua efetividade como antioxidante quando em altas concentrações e na condição de elevadas concentrações de

oxigênio. Este efeito é devido à geração de produtos deletérios oriundos da oxidação do  $\beta$ -caroteno acarretada pela exposição às ERO encontradas no tabaco ou por processos metabólicos (YOUNG; LOWE, 2001).

### 3.7- Câncer e marcadores do processo inflamatório

As células do sistema imunológico interagem fortemente por meio da comunicação célula-célula, particularmente via receptores de membrana. Por serem ricas em ácidos graxos poliinsaturados, as membranas celulares são suscetíveis à peroxidação, a qual pode levar a perda da integridade da membrana, alterar sua fluidez, o que resulta em alterações na sinalização intracelular e na função da célula. Desta forma, a exposição à ERO pode contribuir para a redução da comunicação entre as células e, a produção de ERO pelas células fagocitárias do sistema imunológico pode danificar as estruturas celulares circundantes se estas não forem protegidas por antioxidantes (HUGHES, 2001) aumentando o risco de desenvolvimento do câncer (DE VISSER et al., 2006).

O processo inflamatório parece estar intimamente ligado ao aumento do risco de câncer, uma vez que implica em mudanças do microambiente tecidual. Se por um lado as células tumorais estimulam a síntese e a secreção de uma variedade de fatores de crescimento, citocinas e proteases (POLYAK, 2007). Por outro, a contribuição do processo inflamatório na carcinogênese também vem sendo reconhecida (KOZŁOWSKI et al., 2003).

A compreensão do desenvolvimento e da progressão do câncer de mama sugere que estes processos são influenciados por propriedades intrínsecas das células tumorais, células inflamatórias, quimiocinas, citocinas, dentre outras estruturas e compostos. Um novo paradigma que está sendo amplamente aceito é o de que as células inflamatórias podem afetar tais processos por secretarem uma grande variedade de fatores, incluindo quimiocinas e citocinas (BEN-BARUCH, 2003) que favorecem a progressão do tumor em vez de promoverem uma resposta anti-tumor (YAN et al., 2006).

No ambiente tumoral as células geneticamente alteradas e as células que compõem o estroma tecidual respondem ao estímulo das células de defesa secretando quimiocinas e citocinas que facilitam a proliferação das células cancerosas por aumentarem o recrutamento de células leucocitárias. Estas, após ativação, liberam

fatores angiogênicos, mitogênicos, enzimas proteolíticas e quimiocinas, o que acarreta o recrutamento de um maior número de células inflamatórias e estimula a angiogênese para sustentar o crescimento do tumor e facilitar a metástase (YAN et al., 2006; RAMAN et al., 2007).

Por outro lado, a produção local de citocinas no microambiente tumoral é crucial para a manutenção da resposta imune contra as células cancerosas e a presença de citocinas supressoras deste processo pode impedir a resposta efetora do organismo contra o câncer (LLANES-FERNÁNDEZ et al., 2006). O ponto chave do desenvolvimento do câncer consiste na capacidade de evasão das células tumorais mediante a “vigilância imunológica”.

As citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular, que são rapidamente e usualmente secretadas por diferentes células após estimulação. Elas agem sobre diferentes células-alvo adjacentes oferecendo um efeito aditivo, sinérgico ou antagônico às ações das células cancerosas. De maneira geral, as citocinas são mediadores intercelulares que regulam a sobrevivência, crescimento, diferenciação e funções efetoras das células (LLANES-FERNÁNDEZ et al., 2006).

Recentemente a contribuição das citocinas, tem sido demonstrada para o câncer. As citocinas podem estimular o crescimento celular e contribuir para a metástase. Se permanentemente sintetizadas estas substâncias podem ser utilizadas como marcadores de ativação do sistema imune. Produzidas por macrófagos, monócitos e linfócitos as interleucinas 8 (IL-8) e 10 (IL-10) podem exercer vários efeitos sobre o sistema imune e estão relacionadas a angiogênese, crescimento e proliferação das células cancerosas. Estes mediadores inflamatórios têm sido descritos como indicadores de mal prognóstico em pacientes com câncer de mama, por suas concentrações séricas estarem em elevadas nestes indivíduos (KOZŁOWSKI et al., 2003).

A IL-10 é uma citocina multifuncional, produzidas pelos linfócitos Th2, pode inibir a resposta imune do tipo celular e as funções das células Th1 (CD4<sup>+</sup>) imunocompetentes, pelo bloqueio da função de apresentação de antígenos por estas células (LLANES-FERNÁNDEZ et al., 2009), as quais são capazes de produzir IL-8, acarretando a progressão da malignidade (KOZŁOWSKI et al., 2003). Estudo realizado por Llanes-Fernández et al. (2009), evidenciou associação inversa entre a IL-10 e a p53, o que reflete o efeito supressor da IL-10 no microambiente do tumor, e sua associação inversa com um marcador de apoptose foi sugerido como indicativo do aumento da

agressividade do tumor. Uma possível explicação para o resultado encontrado é a bloqueio da expressão de algumas citocinas pela p53, todavia a regulação negativa destas moléculas pode ser perdida quando há uma deficiência da p53 ocasionada, por exemplo, por mutações.

A IL-8 é uma citocina pró-inflamatória, originalmente identificada como quimioatrativa de neutrófilos, esta citocina é produzida por células epiteliais, fibroblastos e tumorais, as quais também possuem receptores para esta interleucina (BENOY et al., 2004). De acordo com Derin et al. (2007), os níveis de IL-8 séricos podem ser usados na determinação do câncer de mama metastático, todavia mais estudos são necessários para confirmar este achado.

Enquanto algumas citocinas estimulam a proliferação e a invasão do câncer de mama, outras, como os interferons, inibem este processo. O interferon gama (IFN- $\gamma$ ) é produzido principalmente pelas células Th1 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e NK. Seu efeito anti-proliferativo provavelmente é devido ao aumento da morte celular por estimular a atividade de algumas enzimas caspases (1, 7 e 8) e exercer atividade antiangiogênica (NICOLINI et al., 2006). Segundo García-Tuñón et al. (2007), o IFN- $\gamma$  inibe o crescimento celular por paralisar o ciclo celular por meio da ativação da proteína p21.

Diante do exposto, verifica-se que uma extensa variedade de moléculas sinalizadoras está implicada nos processos que podem evitar ou facilitar a carcinogênese. Um importante fator que deve ser considerado se refere à concentração de tais moléculas no microambiente intra e extracelular. Assim como os radicais livres executam funções importantes nas células, o sistema imunológico, juntamente com os antioxidantes, são as principais formas de defesa do organismo, todavia o desequilíbrio no estado redox é quem irá conduzir às modificações que podem levar ao câncer de mama.

Para se restaurar o equilíbrio fisiológico são necessárias mudanças no estilo de vida, em especial nos hábitos alimentares os quais podem prover compostos vitamínicos que atuam nos mecanismos de proteção contra o câncer, seja através de suas funções antioxidantes ou imunomodulatórias. Com isso, mais estudos são necessários para averiguar os mecanismos de interação entre dos nutrientes ingeridos na dieta e os componentes que participam do sistema de defesa, para que assim sejam propostos novos mecanismos de prevenção e tratamento contra o câncer, em especial o de mama.

### 3.8- Referências Bibliográficas

AL-DELAIMY, W. K.; VAN KAPPEL, A. L.; FERRARI, P. et al. Plasma levels of six carotenoids in nine European countries: report from the European prospective investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). **Public Health Nutrition**, v.7, n.6, p.713-722, 2004.

ALLENDE, L. M.; CORELL, A.; MADROÑO, A. et al. Retinol (vitamin A) is a cofactor in CD3-induced human t-lymphocyte activation. **Immunology**, v.90, n.3, p.388-396, 1997.

ALLRED, D. C.; MOHSIN, S. K.; FUQUA, S. A. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. **Endocrine-Related Cancer**, v.8, n.1, p.47-61, 2001.

AMENDOLA, L. C. B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.51, n.4, p.325-330, 2005.

ANDERSEN, L. F.; VEIERØD, M. B.; JOHANSSON, L. et al. Evaluation of three dietary assessment methods and serum biomarkers as measures of fruit and vegetable intake, using the method of triads. **British Journal of Nutrition**, v.93, n.4, p.519-527, 2005.

ANISIMOV, V. N. Carcinogenesis and aging 20 years after: Escaping horizon. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.130, n.1-2, p.105-121, 2009.

BEN-BARUCH, A. Host microenvironment in breast cancer development Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor–microenvironment interactions. **Breast Cancer Research**, v. 5, p. 31-36, 2003.

BENOY, I. H.; SALGADO, R.; DAM, P. V. et al. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. **Clinical Cancer Research**, v.10, n.21, p.7157-7162, 2004.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. et al. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1340-1344, 2006.

BERTRAM, J. S. Induction of connexin 43 by carotenoids: functional consequences. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n. 430, p. 120–126, 2004.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BLANCK, H. M.; BOWMAN, B. A.; COOPER, G. R. et al. Laboratory issues: Use of nutritional biomarkers. **Journal of Nutrition**, v.133, p.888S-894S, 2003. Suppl 3.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria nacional de assistência à saúde. Instituto nacional de câncer. Coordenação de prevenção e vigilância - (CONPREV). **Falando sobre câncer de mama**. Rio de Janeiro: MS/INCA. 2002.

BRASIL. **Controle do câncer de mama: Documento de consenso**. Rio de Janeiro: INCA. 2004.



BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Instituto nacional de câncer. Coordenação de prevenção e vigilância de câncer. **Estimativas 2008: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA. 2007.

CARYSTINOS, G. D.; BIER, A.; BATIST, G. The role of connexin-mediated cell–cell communication in breast cancer metastasis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 6, n. 4, p. 431-440, 2001

CHO, E.; SPIEGELMAN, D.; HUNTER, D. J. et al. Premenopausal intakes of vitamins A, C, and E, folate, and carotenoids, and risk of breast cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.12, n.8, p.713-720, 2003.

COLLINS, K.; JACKS, T.; PAVLETICH, N. P. The cell cycle and cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.2776–2778, 1997.

DANAEI, G.; VANDER HOORN, S.; LOPEZ, A. D. et al. Causes of cancer in the world: Comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **Lancet**, v.366, n.9499, p.1784-1793, 2005.

DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews Cancer**, v.6, n.1, p.24-37, 2006.

DERIN, D.; SOYDINC, H. O.; GUNEY, N. et al. Serum IL-8 and IL-12 levels in breast cancer. **Medical Oncology**, v.24, n.2, p.163-168, 2007.

DICKSON, M. A.; SCHWARTZ, G. K. Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. **Current Oncology**, v.16, n.2, p.36-43, 2009.

DORJGOCHOO, T.; GAO, Y. T.; CHOW, W. H. et al. Plasma carotenoids, tocopherols, retinol and breast cancer risk: Results from the shanghai women health study (SWHS). **Breast Cancer Research and Treatment**, 2008.

FINK, B. N.; GAUDET, M. M.; BRITTON, J. A. et al. Fruits, vegetables, and micronutrient intake in relation to breast cancer survival. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.98, n.2, p.199-208, 2006.

FREUDENHEIM, J. L.; MARSHALL, J. R.; VENA, J. E. et al. Premenopausal breast cancer risk and intake of vegetables, fruits, and related nutrients. **Journal of the National Cancer Institute**, v.88, n.6, p.340-348, 1996.

GARCIA, R. W. D. Representações sobre consumo alimentar e suas implicações em inquéritos alimentares: Estudo qualitativo em sujeitos submetidos à prescrição dietética. **Revista de Nutrição**, v.17, n.1, p.15-28, 2004.

GARCIA-TUNON, I.; RICOTE, M.; RUIZ, A. A. et al. Influence of IFN-gamma and its receptors in human breast cancer. **BMC Cancer**, v.7, p.158, 2007.

GAROFOLLO, A.; AVESANI, C. M.; CAMARGO, K. G. et al. Diet and cancer: an epidemiological view. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n.4, p.491-505, out./dez, 2004.

GAUDET, M. M.; BRITTON, J. A.; KABAT, G. C. et al. Fruits, vegetables, and micronutrients in relation to breast cancer modified by menopause and hormone

- receptor status. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.13, n.9, p.1485-1494, 2004.
- GREENWALD, P.; CLIFFORD, C. K.; MILNER, J. A. Diet and cancer prevention. **European Journal of Cancer**, v.37, n.8, p.948-965, 2001.
- HUGHES, D. A. Dietary carotenoids and human immune function. **Nutrition**, v.17, n.10, p.823-827, 2001.
- JOHN, E. M.; PHIPPS, A. I.; DAVIS, A. et al. Migration history, acculturation, and breast cancer risk in hispanic women. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.14, n.12, p.2905-2913, 2005.
- KABAT, G. C.; KIM, M.; ADAMS-CAMPBELL, L. L. et al. Longitudinal study of serum carotenoid, retinol, and tocopherol concentrations in relation to breast cancer risk among postmenopausal women. **American Journal of Clinical Nutrition**, n. 9, p. 1-8, 2009.
- KAMANGAR, F. DORES, G. M.; ANDERSON, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: Defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **Journal of Clinical Oncology**, v.24, n.14, May 10, p.2137-2150, 2006.
- KAUFMANN, W. K. Initiating the uninitiated: Replication of damaged DNA and carcinogenesis. **Cell Cycle**, v. 6, n.12, Jun 15, p.1460-1467, 2007.
- KEY, T. J.; VERKASALO, P. K.; BANKS, E. Epidemiology of breast cancer. **The Lancet Oncology**, v.2, p.133-140, 2001.
- KEY, T. J.; ALLEN, N. E.; SPENCER, E. A. et al. Nutrition and breast cancer. **Breast**, v. 12, n. 6, p.412-416, 2003.
- KIM, K. N.; PIE, J. E.; PARK, J. H. et al. Retinoic acid and ascorbic acid act synergistically in inhibiting human breast cancer cell proliferation. **Journal of Nutrition Biochemistry**, n. 17, p. 454-462, 2006.
- KIM, M. K.; AHN, S. H.; LEE-KIM, Y. C. Relationship of serum  $\alpha$ -tocopherol, carotenoids and retinol with the risk of breast cancer. **Nutrition Research**, v. 21, p. 797-809, 2001.
- KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.44, p.239-267, 2004.
- KLINE, K.; YU, W.; SANDERS, B. G. Vitamin E: Mechanisms of action as tumor cell growth inhibitors. **Journal of Nutrition**, v.131, n.1, p.161S-163S, 2001.
- KOZLOWSKI, L.; ZAKRZEWSKA, I.; TOKAJUK, P. et al. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. **Roczniki Akademii Medycznej W Białymstoku**, v.48, p.82-84, 2003.
- LI, Y.; AMBROSONE, C. B.; MCCULLOUGH, M. J. et al. Oxidative stress related genotypes, fruit and vegetable consumption, and breast cancer risk. **Carcinogenesis**, v.30, n.5, p.777-784, 2009.

- LIN, E. Y.; POLLARD, J. W. Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. **Cancer Research**, v.67, n.11, p.5064-5066, 2007.
- LLANES-FERNANDEZ, L.; ÁLVAREZ-GOYANESA, R. I.; ARANGO-PRADO, M. D. C. Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients. **The Breast**, v. 15, p. 482-489, 2006.
- LLANES-FERNANDEZ, L.; ARANGO-PRADO, M. D. C.; ALCOCER-GONZÁLEZ, J. M. et al. Association between the expression of IL-10 and T cell activation proteins loss in early breast cancer patients. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.135, n.2, p.255-264, 2009.
- LOPES, A. C. S.; CAIAFFA, W. T.; MINGOTI, S. A. et al. Ingestão alimentar em estudos epidemiológicos. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.6, n.3, p.209-219, 2003.
- MALIN, A. S.; QI, D., SHU, X. O. et al. Intake of fruits, vegetables and selected micronutrients in relation to the risk of breast cancer. **International Journal of Cancer**, v.105, n.3, p.413-418, 2003.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v.9, n.3, p.153-166, 2009.
- MA, X. J.; SALUNGA, R.; TUGGLE, J. T. et al. Gene expression profiles of human breast cancer progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.10, p.5974-5979, 2003.
- MILLER, E. R.; PASTOR-BARRIUSO, R.; DALAL, D. et al.; Meta-Analysis: High-Dosage Vitamin E Supplementation May Increase All-Cause Mortality. **Annals of Internal Medicine**, v. 142, n. 1, 1-11, 2005.
- NATARAJAN, L.; ROCK, C. L.; MAJOR, J. M. et al. On the importance of using multiple methods of dietary assessment. **Epidemiology**, v.15, n.6, p.738-745, 2004.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE, **The Breasts**. 2007. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>>. Acesso em: 04 abr. 2009.
- NICOLINI, A.; CARPIB, A.; ROSSI, G. Cytokines in breast cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.17, p.325-337, 2006.
- O'CONNELL, P.; PEKKEL, V.; FUQUA, S. et al. Molecular genetic studies of early breast cancer evolution. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.32, n.1, p.5-12, 1994.
- PADILHA, P. D. C.; PINHEIRO, R. D. L. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.50, n.3, p.251-260, 2004.
- PAIVA, C. E.; RIBEIRO, B. S.; GODINHO, A. A. et al. Fatores de risco para câncer de mama em juiz de fora (mg): Um estudo caso-controle. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.48, n.2, p.231-235, 2002.
- POLLARD, J.; WILD, C. P.; WHITE, K. L. et al. Comparison of plasma biomarkers with dietary assessment methods for fruit and vegetable intake. **European Journal of Cancer**, v.37, n.8, p.988-998, 2003.

- POLYAK, K. Breast cancer: Origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, v.117, n.11, p.3155-3163, 2007.
- RAMAN, D.; BAUGHER, P. J.; THU, Y. M. et al. Role of chemokines in tumor growth. **Cancer Letters**, v. 256, p. 137-165, 2007.
- RASTOGI, T.; DEVESA, S.; MANGTANI, P. et al. Cancer incidence rates among South Asians in four geographic regions: India, Singapore, UK and US. **International Journal of Epidemiology**, v.37, n.1, p.147-160, 2008.
- RAY, G.; HUSAIN, S. A. Role of lipids, lipoproteins and vitamins in women with breast cancer. **Clinical Biochemistry**, v.34, p.71-76, 2001.
- ROCK, C. L.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. et al. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: Vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **Journal of the American Dietetic Association**, v.96, p.693-702, 1996.
- RONCO, A. L.; DE STEFANI, E.; BOFFETTA, P. et al. Food patterns and risk of breast cancer: A factor analysis study in Uruguay. **International Journal of Cancer**, v.119, n.7, p.1672-1678, 2006.
- SARNI, R. O. S.; LEITE, H. P. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.
- SATO, R.; HELZLSOUER, K. J.; ALBERG, A. J. et al. Prospective study of carotenoids, tocopherols, and retinoid concentrations and the risk of breast cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 11, p. 451-457, 2002.
- SCHWARTSMANN, G. Breast cancer in south america: Challenges to improve early detection and medical management of a public health problem. **American Society of Clinical Oncology**, v.19, p.118s-124s, 2001.
- SCAGLIUSI, F. B.; JÚNIOR, A. H. L. Subnotificação da ingestão energética na avaliação do consumo alimentar. **Revista de Nutrição**, v.16, n.4, p.471-481, 2003.
- SIROMA, M. S.; BARACAT, F. F. Associação entre a presença da proteína p53 e o grau de diferenciação em carcinomas ductais invasivos de mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.28, n.5, p.298-303, 2006.
- TANGNEY, C. C.; SHEKELLE, R. B.; RAYNOR, W. et al. Intra- and interindividual variation in measurements of beta-carotene, retinol, and tocopherols in diet and plasma. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.45, n.4, p.764-769, 1987.
- TOGO, P.; HEITMANN, B. L.; SØRENSEN, T. I. et al. Consistency of food intake factors by different dietary assessment methods and population groups. **British Journal of Nutrition**, v.90, n.3, p.667-678, 2003.
- VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.266, n.1-2, p.37-56, 2004.
- VAN GILS, C. H.; PEETERS, P. H. M., RIBOLI, E. Consumption of vegetables and fruits and risk of breast cancer. **JAMA**, v.293, n.2, Jan 12, p.183-193, 2005.

VAN KAPPEL, A. L. STEGHENS, J. P.; ZELENIUCH-JACQUOTTE, A. et al. Serum carotenoids as biomarkers of fruit and vegetable consumption in the new york women's health study. **Public Health Nutrition**, v.4, n.3, p.829-835, 2001.

WARRI, A. M.; SAARINEN, N. M.; MÄKELÄ, S. I. Can modulation of mammary gland development by dietary factors support breast cancer prevention? **Hormone Research**, v.68, n.5, p.248-260, 2007.

WILD, C. P.; ANDERSSON, C.; O'BRIEN, N. M. et al. A critical evaluation of the application of biomarkers in epidemiological studies on diet and health. **British Journal of Nutrition**, v.86, p.S37-53, 2001. Suppl 1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer**. What is the impact of cancer in your country? (Mortality and burden). Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 04 mai. 2009.

WU, A. H. YU, M. C.; TSENG, C. C. et al. Dietary patterns and breast cancer risk in Asian American women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.89, n.4, p.1145-1154, 2009.

YAN, L.; G. Anderson, M.; DeWitte, M. et al. Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. **European Journal of Cancer**, v. 42, p. 793-802, 2006.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 20–27, 2001.

ZIOUZENKOVA, O.; ORASANU, G.; SUKHOVA, G et al. Asymmetric cleavage of beta-carotene yields a transcriptional repressor of retinoid x receptor and peroxisome proliferator-activated receptor responses. **Molecular Endocrinology**, v.21, n.1, p.77-88, 2007.

ZHANG, S.; HUNTER, D. J.; FORMAN, M. R. et al. Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 6, p. 547-556, 1999.

## **4- METODOLOGIA**

### **4.1 – Delineamento do estudo e casuística**

Estudo observacional do tipo caso-controle, o qual foi realizado na Maternidade Odete Valadares da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, durante o período de janeiro a julho de 2006.

O setor de mastologia desta maternidade foi por 23 anos referência nacional no tratamento do câncer de mama e possuía em sua equipe mastologistas, cirurgião plástico, psicólogos e outras especialidades. No ano de 2005, a unidade foi responsável por 25% das cirurgias de câncer de mama da Região Metropolitana de Belo Horizonte e pelo atendimento de 1.000 consultas por mês. A FHEMIG, em janeiro de 2006, determinou a transferência de parte da equipe de mastologia da Maternidade Odete Valadares para o Hospital Alberto Cavalcanti, também localizado em Belo Horizonte, onde foi criado um Centro de Alta Complexidade em Oncologia (CACON).

A população estudada foi composta por mulheres atendidas pelo serviço de mastologia ou pelo serviço de ginecologia desta maternidade, encaminhadas pelos postos de saúde para realização de mamografia, consulta e acompanhamento ambulatorial e procedimentos cirúrgicos para propedêutica e tratamento.

Como critério de inclusão, foi considerado que as mulheres selecionadas deviam ser pacientes da Maternidade Odete Valadares. Todas as mulheres encaminhadas para procedimentos cirúrgicos da mama foram convidadas a participar do estudo. Já as mulheres que receberam qualquer outro tipo de atendimento nos serviços de mastologia ou ginecologia deviam possuir mamografia recente, para caracterização do grupo.

Foram excluídas do estudo mulheres com história pessoal de qualquer outro tipo de câncer, ou aquelas cujo resultado do exame anatomopatológico fosse suspeito ou indeterminado para o padrão citopatológico de malignidade. O inquérito alimentar não foi aplicado nas voluntárias que residiam fora da região metropolitana de Belo Horizonte, ou que residiam a menos de 10 anos nessa região; tinham patologias que necessitasse de modificações alimentares como diabetes, insuficiência renal ou gota, e; apresentavam diagnóstico de doença benigna da mama ou câncer de mama em período anterior à data da entrevista.

### **4.2. Amostragem**

Devido ao período de transição pelo qual o serviço de mastologia passava, com parte de sua equipe sendo transferida para o Hospital Alberto Cavalcanti, o número de cirurgias foi menor que o esperado no referido período de janeiro a julho de 2006.

A amostra foi calculada a partir do número de cirurgias realizadas pelo serviço de mastologia. O referido serviço realizava em média cerca de 1.220 cirurgias por ano, das quais aproximadamente 230 eram diagnosticadas como câncer de mama e as demais mulheres apresentavam doença benigna ou realizavam outros procedimentos cirúrgicos na mama. Com isso, no período de 6 meses esperava-se atingir a amostragem de 103 casos de câncer de mama, considerando perda de 10% (exclusão ou não participação).

Todas as pacientes que realizaram cirurgia da mama durante o período de coleta de dados foram convidadas a participar do estudo. A coleta foi realizada por Nutricionistas e estudantes de Nutrição previamente treinados, os quais desconheciam o diagnóstico das pacientes, exceto nos casos daquelas que não apresentavam câncer de mama ou doença benigna da mama. Os questionários e as amostras coletadas foram codificados e o banco de dados somente foi conhecido após a análise do material biológico. As mulheres que compuseram os grupos estudados foram pareadas por idade numa faixa de  $\pm 5$  anos. As voluntárias foram divididas em 3 grupos:

- Caso (CA): composto por mulheres com diagnóstico positivo para o câncer de mama comprovado pelo exame anatomopatológico.

- Doença Benigna da Mama (DBM): formado por mulheres com diagnóstico de alterações fibrocísticas da mama ou outras doenças benignas da mama não proliferativas.

- Controle (CO): composto por mulheres que possuíam mamografia recente (máximo de 2 anos anterior a data da entrevista), ausência de história pessoal de câncer, ausência de qualquer lesão benigna ou maligna na mama e ausência de história familiar de câncer de mama.

#### 4.3 – Materiais e Métodos

Foram utilizados questionários previamente validados (OLIVEIRA, 2004) contendo perguntas sobre indicadores socioeconômicos, história clínica, ginecológica e obstétrica, tabagismo e consumo alimentar (Anexos I e II). Foram aferidas também medidas antropométricas. Das voluntárias encaminhadas para a cirurgia da mama foi coletado amostra de material biológico para análise posterior. Todos os procedimentos foram realizados em um único encontro.

#### 4.3.1 – Variáveis sócioeconômicas

Foi avaliado o local de residência (pertencente ou não à região metropolitana de Belo Horizonte); a escolaridade, categorizada segundo o IBGE (2000); e a rendas familiar e *per capita* mensais.

#### 4.3.2 – Variáveis clínicas, ginecológicas e obstétricas

História prévia de lesão benigna da mama: foi investigada a existência ou não de história de doença benigna da mama considerando a memória e conhecimento da paciente sobre sua história clínica.

História prévia de câncer: foi investigada a existência ou não de história anterior de câncer considerando a memória e conhecimento da paciente sobre sua história clínica.

História familiar de neoplasia da mama: em caso afirmativo, optou-se por subdividir a presença de câncer de mama em parentes de primeiro grau, considerando mãe, irmãs e filha; e parentes de segundo e terceiro graus, considerando avó, tia e prima, conforme descrito por (JOBSEN et al., 2000).

Diabetes, gota e insuficiência renal: A história pessoal de diabetes, gota e insuficiência renal foi investigada e, em caso afirmativo, não era realizado o QSFA para evitar a presença de fatores que pudessem confundir a análise de consumo alimentar.

Idade da menarca: idade em anos da primeira menstruação.

Idade da primeira gestação: idade em anos em que ocorreu a primeira gravidez completa.

Número de gestações com filhos vivos: número de gestações no qual o filho foi considerado nascido vivo, ou seja, após a expulsão ou extração completa do corpo materno, independentemente do tempo de duração da gestação, manifestou algum sinal de vida (respiração, choro, movimento de músculos de contração voluntária, batimento cardíaco), ainda que tenha falecido em seguida (IBGE, 2000).

Aleitamento materno: aleitamento predominante (leite materno é a única fonte de alimento para o recém-nascido, podendo ocasionalmente receber água ou chá); aleitamento materno parcial (recebia outros alimentos como sucos e papas); ambos por



um período mínimo de seis meses (COFFIN et al., 1997; TESSARO et al., 2003; OSIS et al., 2004).

Uso de contraceptivo oral: avaliou se a mulher fazia ou fez uso e o tempo de administração.

Idade da Menopausa: idade em anos, avaliada pela ausência de menstruação por um período de 12 meses anterior à entrevista (FAVARATO, 2000).

Terapia de reposição hormonal (TRH): presença ou ausência da TRH (considerando a via de administração e o tempo de uso).

#### 4.3.3 – Estadiamento do tumor

Estadiamento do tumor: a classificação das neoplasias malignas da mama foi realizada segundo critério da sexta edição do Sistema TNM, da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (GREENE et al., 2002) (Anexos III e IV). Todos os dados do tumor foram obtidos dos laudos do exame anátomopatológico arquivados nos prontuários dos voluntários na Maternidade Odete Valadares. Os laudos foram analisados após as cirurgias da mama, tendo sido realizado o estadiamento patológico do tumor.

#### 4.3.4 – Tabagismo, Ingestão de Álcool e Atividade Física

Tabagismo: as voluntárias foram questionadas quanto ao hábito ou não de fumar. Em caso positivo, foi averiguada a quantidade de cigarros fumados por dia, o tipo de cigarro e o período em que eram fumantes (USDOHAH, 1989). Foram classificadas tabagistas as pacientes que fumavam pelo menos um cigarro ao dia, independente do tempo de uso. As não-tabagistas incluíram as mulheres que nunca fumaram e aquelas que pararam de fumar a cinco anos ou mais.

Ingestão de álcool: as voluntárias foram questionadas quanto ao consumo de bebidas alcoólicas como cachaça, cerveja, martini, campari, vinho e outros. Em caso afirmativo, eram questionadas quanto ao período de consumo (ano de início e fim), quantidade estimada consumida (copo, garrafa ou lata) e a frequência (diária, semanal ou mensal).

Foram classificadas como consumidoras as mulheres cuja ingestão foi de pelo menos 1 dose (10 g de álcool) de qualquer bebida alcoólica com frequência diária ou

superior a 5 dias por semana (WHO, 2001; WHO, 2004). As mulheres que nunca consumiam álcool ou consumiam com pouca frequência, sem apresentar repercussões sistêmicas da bebida, foram classificadas como não consumidoras. O cálculo da quantidade de álcool, em gramas, consumido por dia foi realizado de acordo com o Anexo V.

Atividade física: as mulheres foram questionadas sobre a prática ou não de atividade física. Em caso de resposta positiva, foram questionados a frequência semanal e o tempo gasto para que realizassem a atividade física. A classificação do nível de atividade física foi baseada nos parâmetros elaborados pelo Centro de Estudos do Laboratório de Aptidão Física de São Caetano do Sul – (CELAFISCS, 2004), através do Questionário Internacional de Atividade Física – IPAQ.

Foi classificada como sedentária a mulher que não realizava nenhuma atividade física; como pouco ativa aquela que executava alguma atividade física por pelo menos 10 minutos/dia durante os cinco dias da semana ou apresentava um total de 150 minutos por semana nas atividades moderadas e vigorosas; como ativa, aquela que apresentava atividade vigorosa com frequência superior ou igual a três dias por semana, com duração superior ou igual a 20 minutos por sessão ou atividade moderada ou caminhada com frequência superior ou igual a cinco dias por semana, com duração superior ou igual a 30 minutos por sessão, ou qualquer atividade somada (caminhada + moderada + vigorosa) que resultasse numa frequência igual ou superior a cinco dias por semana e tempo gasto superior ou igual a 150 minutos por semana (CELAFISCS, 2004).

#### *4.3.5 – Análise da Ingestão Alimentar*

Ingestão alimentar: para avaliação da ingestão alimentar foi utilizado como instrumento o questionário semiquantitativo de frequência de consumo alimentar (QSFA) (Anexo II). Foi aplicado um questionário previamente validado para população da região estudada (OLIVEIRA, 2004). O questionário foi composto por 146 itens, agrupados em: vegetais folhosos, vegetais B e C, carnes em geral, leite e derivados, lipídios, leguminosas, salgadinhos e outros petiscos industrializados, pães e similares, cereais e farináceos, sobremesa e frutas, e foi adaptado de acordo com os nutrientes de interesse. As mulheres eram orientadas a relatar a frequência de consumo dos alimentos ao dia, semana, mês ou trimestre, ou ainda aqueles raramente e nunca consumidos. Com a finalidade de minimizar os erros de estimativa da porção do alimento foi utilizado um

álbum fotográfico de porções e utensílios de medidas caseiras (ZABOTTO et al., 1996). Os alimentos relatados em medidas caseiras ou unidades foram convertidos em gramas por dia de consumo. Para tanto foi utilizada, preferencialmente, como referência a Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras (PINHEIRO, 2004) e o livro fotográfico de medidas caseiras (ZABOTTO et al., 1996). Caso o alimento relatado não fosse encontrado nesses materiais foram procuradas informações nas embalagens dos produtos industrializados ou, em último caso, estimado o peso a partir de um alimento semelhante. O questionário possuía ainda algumas questões sobre o perfil qualitativo da dieta, tais como, forma de preparo e utilização dos alimentos, adição de outros condimentos, dentre outros aspectos relacionados à alimentação. O QSFA objetivou estimar o consumo relativo a um período de até dois anos antes do aparecimento do sintoma da doença (WILLET, 1998).

A análise do QSFA foi realizada com o auxílio do *software* Diet PRO versão 4.0 (MONTEIRO e ESTEVES, 2001). A composição química dos alimentos contidos no QSFA foi personalizada e inserida no *software*. Preferencialmente foi utilizada a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (NEPA/UNICAMP, 2006), caso o alimento ou nutriente de interesse não fosse encontrado nesta tabela, foi adotada a Tabela Americana do *United States Department of Agriculture* (USDA, 2001), como segunda opção. Ainda assim, se não encontrada a composição do alimento foi utilizada a Tabela de Composição de Alimentos (PHILIPPI, 2002) ou informações contidas nos rótulos fornecidas pela indústria. Foram analisados: energia, vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), vitamina A (retinol) e pró-vitamina A ( $\beta$ -caroteno).

#### 4.3.6 – Avaliação Antropométrica

Peso: foi aferido utilizando-se balança eletrônica TANITA<sup>®</sup> - *Tanita Body Fat Monitor Scale* (Modelo TBF 531<sup>®</sup>, *Tanita Corporation of America, Illinois*), com capacidade para 150 kg e sensibilidade de 100g. A pesagem foi realizada conforme as técnicas preconizadas por Jelliffe (1966). As voluntárias vestiam o menor número de roupas possível, sendo utilizado um avental de pano, e retirado sapatos e adornos. Todas foram orientadas a permanecer no centro da plataforma com o peso distribuído centralmente entre os pés, com olhar para o horizonte, até a confirmação do valor (FRISANCHO, 1993).

Estatura: foi aferida com o auxílio do estadiômetro vertical Alturaexata<sup>®</sup> que possui uma haste rígida dotada de uma escala bilateral de 35 a 213 cm e divisão de 1 mm, bem como uma base de sustentação metálica. As pacientes foram medidas descalças, com calcanhares unidos, joelhos juntos e os pés formando um ângulo de 45°, em posição ereta, olhando para o horizonte, de modo que as costas permanecessem o mais retas possível, possibilitando que a fossa poplíteia, as nádegas e os ombros pudessem aproximar ou tocar a haste rígida do estadiômetro. A leitura foi realizada no milímetro mais próximo quando o esquadro móvel acompanhando a haste vertical encostou-se à cabeça do indivíduo (JELLIFE, 1966; FRISANCHO, 1993).

Índice de Massa Corporal (IMC): o IMC foi calculado com os dados obtidos de peso e estatura, pela relação do peso, dado em quilograma (kg), pela estatura dada em metro (m) elevada ao quadrado (OMS, 1995). A avaliação do estado nutricional foi feita pelo IMC e o critério adotado para a classificação do IMC foi o estabelecido para adultos pela Organização Mundial de Saúde (1995). Dessa forma, mulheres com IMC menor que 18,5 kg/m<sup>2</sup> foram classificadas como baixo peso, de 18,5 a 24,9 kg/m<sup>2</sup> como eutróficas, de 25,0 a 29,9 kg/m<sup>2</sup> como sobrepeso e maior que 30 kg/m<sup>2</sup> como obesidade.

#### *4.3.7 – Avaliação Bioquímica*

No dia da cirurgia, após jejum de 12 horas e após anestesia, foi coletado 15 mL de sangue periférico em EDTA em frascos codificados. O sangue foi centrifugado para obtenção do plasma, separado em alíquota de 1 mL e armazenado a -80°C até o momento da análise. Para as mulheres do grupo controle, amostras de sangue periférico foram coletadas por um técnico especializado no laboratório do banco de sangue da maternidade e tratadas como descrito anteriormente.

Durante a cirurgia, uma amostra de tecido adiposo (aproximadamente 1,0 g) adjacente ao tumor da mama (Figura 4) foi coletada em frasco codificado e imediatamente armazenado em nitrogênio líquido, sob proteção da luz (Figura 5). Posteriormente, esse material foi transferido para a Universidade Federal de Viçosa e armazenado em freezer -80°C até o momento da análise.



**Figura 4-** Amostra do tecido adiposo da mama de mulheres atendidas pelo serviço de mastologia da Maternidade Odete Valadares, Belo Horizonte, MG.



**Figura 5-** Armazenamento em nitrogênio líquido do material biológico coletado das mulheres atendidas pelo serviço de mastologia da Maternidade Odete Valadares, Belo Horizonte, MG.

4.3.7.1- Determinação de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), Vitamina A (retinol) e Pró-vitamina A ( $\beta$ -caroteno)

#### 4.3.7.1.1 – Aparatos

Para a extração dos componentes a serem analisados foi empregado vórtex (Velp Científica), centrífuga para tubos (Quimis), balança analítica (GEHAKA, modelo AG 200) e banho-maria (Quimis). Para o preparo dos padrões foi utilizado espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601) e balança analítica (GEHAKA, modelo AG 200). Para o preparo das fases móveis foram utilizados vibrador ultrassônico, sistema de filtração All Glass e membranas de filtração de 0,45  $\mu$ m de porosidade.

O sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, modelo SCL 10AT VP) empregado para análise de vitamina E e A e  $\beta$ -caroteno foi composto de bomba de alta pressão, modelo LC-10AT VP; injetor automático com alça de amostragem de 50  $\mu$ l, modelo SIL-10AF; coluna de fase reversa C-18 e detector de arranjo de diodos UV-visível, modelo SPD-M10A. O sistema foi controlado pelo “software” Multi System, Class Vp 6.12.

#### 4.3.7.1.2 – Reagentes e outros materiais

Para a extração das vitaminas e pró-vitamina foram utilizados os seguintes reagentes com grau de pureza para análise (p.a.): metanol, hidróxido de potássio (F. Maia, Brasil), acetona (Proquímios, Brasil), éter de petróleo (Isofar, Brasil), acetato de

etila (Vetec), pirogalol (Synth), cloreto de sódio (Chemco), isopropanol (F. Maia), etanol (Cinética) e hexano (Dinâmica).

Para a análise das vitaminas e pró-vitamina foram utilizados os seguintes reagentes: metanol (Tedia) grau HPLC. A água ultrapura foi produzida em sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, USA). O padrão de  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno foi adquirido da Sigma Aldrich, Alemanha. Antes da injeção as amostras e soluções padrão foram filtradas em unidades filtrantes HV Millex, em polietileno, 0,45  $\mu$ m de porosidade.

#### *4.3.7.1.3 - Extração de vitaminas E e A e $\beta$ -caroteno e preparo de padrões*

Durante as análises químicas, as amostras foram mantidas sob proteção da luz solar e artificial, pela utilização de vidrarias âmbar, papel alumínio e cortinas do tipo “blackout”, e sob proteção do oxigênio através da utilização de vidrarias com tampas e de ambiente com gás nitrogênio após obtenção dos extratos para análise.

As vitaminas E ( $\alpha$ -tocoferol), A (retinol) e pró-vitamina A ( $\beta$ -caroteno) foram extraídas segundo o método de Ueda e Igarashi (1990). Em 400  $\mu$ L de plasma ou 100 mg de tecido adiposo foi acrescentado 1 mL de solução de pirogalol (6% em etanol). As amostras foram incubadas em banho-maria a 70°C por 5 min. Foi adicionado 0,2 mL de solução de KOH (60% em metanol) e procedeu-se a incubação em banho-maria a 70°C por 30 min. Os tubos de ensaio foram resfriados em banho-de-gelo. Foram acrescentados 4,5 mL de NaCl 1,0% às amostras que foram então homogeneizadas em vórtex. Em seguida, foram adicionados 3,0 mL de acetato de etila (10,0% em hexano). As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min. Os sobrenadantes foram retirados e reservados em frasco âmbar. As amostras foram secas em nitrogênio e posteriormente congeladas em freezer até a análise por CLAE.

A pureza das soluções padrão foi avaliada por espectrofotometria, baseando-se na absorvância máxima. Os coeficientes de absorvidade utilizados foram 70,8 para  $\alpha$ -tocoferol, 1820 para retinol (retinil acetato) e 2592 para  $\beta$ -caroteno (BALL, 1998). Os comprimentos de onda de máxima absorção, em etanol a 96% para o  $\alpha$ -tocoferol: 292 nm; em isopropanol para o retinol: 325; e em éter de petróleo para o  $\beta$ -caroteno: 450 nm (BALL, 1998; PENTEADO, 2003).

#### *4.3.7.1.4 - Análise cromatográfica*

A curva padrão de  $\alpha$ -tocoferol foi construída considerando-se o menor e o maior pico das amostras injetadas. Utilizou-se injeção em duplicata, de cinco concentrações crescentes de soluções padrão entre 0,078 e 105,0  $\mu\text{g/mL}$ . A concentração real da solução padrão estoque foi verificada por espectrofotometria e corrigida adequadamente para as demais concentrações. A equação e coeficientes de absorvância molar usados para cálculo da concentração foram:

$C (\mu\text{g/mL}) = \text{ABS} \times 10^4 / E_{1\text{cm}}^{1\%}$ , onde  $C$  é a concentração real, ABS é a absorvância máxima (lida a 292 nm), em etanol 96% e  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  é o coeficiente de absorvância (70,8) (BALL, 1998).

A curva analítica de retinol foi construída com injeção, em duplicata, de cinco concentrações crescentes de soluções padrões (entre 0,033 e 9,08  $\mu\text{g/mL}$ ). Para construção da curva padrão de  $\beta$ -caroteno foi feita injeção, em duplicata, de cinco concentrações crescentes de soluções padrão (entre 0,011 e 96,6  $\mu\text{g/mL}$ ). A concentração real dos padrões de retinol e  $\beta$ -caroteno foi determinada por espectrofotometria e adequadamente corrigida. A equação e coeficientes de absorvância molar usados para cálculo das concentrações foram:

$C (\mu\text{g/mL}) = \text{ABS} \times 10^4 / E_{1\text{cm}}^{1\%}$ , onde  $C$  é a concentração real, ABS é a absorvância máxima (lida a 325 para retinol e 450 nm para  $\beta$ -caroteno), em isopropanol para retinol e éter de petróleo para  $\beta$ -caroteno e  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  é o coeficiente de absorvância (1830 para retinol e 2592 para  $\beta$ -caroteno) (BALL, 1998; PENTEADO, 2003).

As análises de  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno nas amostras de plasma e de tecido adiposo foram realizadas por CLAE. As análises dos compostos seguiram as seguintes condições cromatográficas: coluna cromatográfica Macherey-Nagel C18, 250 x 4,6 mm; detector espectrofotométrico de arranjos de diodos; fase móvel – metanol: água ultrapura (98:2); fluxo da fase móvel: 1,7 mL/minuto; tempo de corrida: 8 minutos para o plasma e 16 minutos para o tecido adiposo, sendo os três compostos analisados em uma única corrida (análise simultânea). Os cromatogramas foram lidos em comprimento de onda de 292 nm ( $\alpha$ -tocoferol), 325 nm (retinol) e 450 nm ( $\beta$ -caroteno).

Antes da injeção as amostras secas foram resuspensas em 0,1 mL de metanol e filtradas em unidades filtrantes, com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$ . O extrato foi, então, adicionado em *vials*, injetando-se na coluna cromatográfica 50  $\mu\text{L}$  das amostras.

A identificação das vitaminas foi realizada comparando os tempos de retenção obtidos para os padrões (acetato de  $\alpha$ -tocoferol, acetato de retinol,  $\beta$ -caroteno, para vitamina E, A e  $\beta$ -caroteno, respectivamente) e para as amostras. Além disso, foram comparados os espectros de absorção do padrão e dos picos de interesse nas amostras, utilizando-se o detector de arranjos de diodos.

A partir das curvas analíticas obtidas, foram calculadas as concentrações do  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno presentes nas amostras. O valor real da concentração nas amostras foi obtido pelos cálculos das diluições realizadas.

Os testes de recuperação foram realizados pela adição de padrão às amostras na proporção de cerca de 50 % do conteúdo médio original das mesmas. As porcentagens de recuperação foram obtidas a partir da diferença percentual entre os teores iniciais analisados e os adicionados às amostras (BALL, 1998).

A determinação da faixa de linearidade foi feita pela injeção, em duplicata, de volumes crescentes das soluções padrão das vitaminas nas mesmas condições cromatográficas usadas para análise das amostras. Os dados obtidos para áreas dos picos na concentração usada para cada composto em estudo foram usados para análise de regressão linear. A avaliação da linearidade foi feita pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ). O limite de detecção foi determinado como a concentração em que a razão entre a altura do pico de interesse e o ruído da linha de base fosse 3, o limite de quantificação foi considerado como sendo 10 vezes o limite de detecção (ZAO et al. 2004).

#### 4.3.7.2- Análise dos mediadores do processo inflamatório

##### 4.3.7.2.1 – *Extração do RNA*

O RNA mensageiro (mRNA) total das amostras do tecido adiposo da mama foi extraído utilizando o reagente TRIzol de acordo com as orientações fornecidas pelo fabricante. O Trizol (1 mL por 150 mg de tecido) foi adicionado à amostra, agitado por 30 segundos em vórtex e incubado à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foram adicionados 150  $\mu$ L de clorofórmio, agitando manualmente por 15 segundos e incubando à temperatura ambiente por 2 minutos. Após centrifugação (12.000 x g, por 15 minutos à 4°C), a fase aquosa foi transferida para um novo eppendorf de 2 mL, no qual foram adicionados 380  $\mu$ L de isopropanol. A amostra foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, e então centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Após



este processo, o sobrenadante foi cuidadosamente desprezado, e o precipitado foi lavado com 750  $\mu\text{L}$  de etanol gelado (75%), mantendo esta solução estocada a  $-70^{\circ}\text{C}$  “overnight”. Após este período, a amostra foi centrifugada (7500 g por 10 minutos à  $20^{\circ}\text{C}$ ), desprezando-se cuidadosamente o sobrenadante e secando precipitado no próprio tubo em estufa ( $37^{\circ}\text{C}$ ). Na última fase, a amostra foi suspendida em 40  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (autoclavada 2 vezes) e incubada por 10 minutos a  $35^{\circ}\text{C}$ , a fim de facilitar a solubilização do RNA extraído.

#### 4.3.7.2.2 – Confeccção do DNA complementar

O DNA complementar (c-DNA) foi confeccionado utilizando 17  $\mu\text{L}$  de mRNA extraído a uma concentração de 0,118  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ao qual foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  do random primers. Em seguida a solução foi aquecida a  $70^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos em banho-maria, colocada em banho de gelo por 2 minutos e centrifugada a 1300 rpm por 1 minuto. Foram acrescentados 5,3  $\mu\text{L}$  do 5X reaction buffer, 2  $\mu\text{L}$  do dNTP e 1  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. As amostras foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Adicionou-se então, 1  $\mu\text{L}$  da enzima M-MuLV Reverse Transcriptase. As amostras foram incubadas a  $42^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos, posteriormente a  $70^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos e armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a quantificação dos marcadores.

#### 4.3.7.2.3 – Análise quantitativa dos genes alvo

A quantificação dos genes alvo foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR) no equipamento ABI Prism 5700 Sequence Detection System, utilizando o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green. O ciclo da PCR envolveu uma desnaturação inicial de  $95^{\circ}\text{C}$  (10 minutos) e então 40 ciclos, com 1 minuto de desnaturação ( $94^{\circ}\text{C}$ ), 1 minuto de anelamento ( $56^{\circ}\text{C}$ ) e 2 minutos de alongamento ( $72^{\circ}\text{C}$ ), seguidos da curva padrão de dissociação.

As seqüências dos “primers” utilizados (*sense e antisense*) e suas propriedades de reação estão descritas no Anexo VI. As condições de PCR foram otimizadas considerando a concentração do “primers”, ausência de formação de dímeros, eficiência na amplificação dos genes alvo e controle dos genes constituintes.

Para cada reação foram utilizados 10  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -actina (1000 nM), 10  $\mu\text{L}$  “primers” (2000 nM), 2,5  $\mu\text{L}$  de cDNA e 12,5  $\mu\text{L}$  de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Cálculos para determinação do nível relativo de expressão do gene foram feitos de acordo com instruções do usuário - User’s Bulletin from Applied

Biosystems – com referência a  $\beta$ -actina da amostra, usando o método “cycle threshold” (Ct). O Ct é ponto onde um aumento exponencial significativo na quantidade de amplificado (fluorescência) é primeiramente detectado (geralmente 10 vezes o valor inicial). As médias dos valores de Ct das mensurações em duplicata foram usadas para calcular a expressão do gene alvo, com a normalização do controle interno ( $\beta$ -actina). Os valores encontrados para os indivíduos do grupo CA foram comparados aos valores encontrados para o grupo DBM para calcular o aumento na expressão do gene, utilizando a fórmula  $2^{-\Delta Ct}$ , também de acordo com o Manual do Usuário.

#### 4.4 - Análises Estatísticas

Realizou-se análises univariadas, bivariadas e multivariadas. Foram aplicados os T de *student* e Mann-Whitney, após a verificação da normalidade pelo teste Kolmogorv-Smirnov, e o teste Qui-quadrado. Realizou-se regressão multivariada para os parâmetros que apresentaram significância igual ou inferior a 25% nos testes de comparação de médias ou medianas. Para as variáveis contínuas, foram comparados os valores inferiores aos superiores à média ou à mediana do grupo, obtida de acordo com suas distribuições. A correlação de Sperman foi aplicada entre as variáveis relacionadas à resposta imunológica e a concentração tecidual dos compostos vitamínicos analisados.

Utilizaram-se os *softwares* Sigma Statistical<sup>®</sup> for Windows, versão 2.03, Epi Info, versão 6.0 e Stata, versão 7.0 para a análise dos dados e o nível de rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5 - Aspectos Éticos

##### 4.5.1 - Consentimento

Foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido das voluntárias ou responsáveis, após serem orientadas sobre os objetivos da pesquisa, o protocolo e os procedimentos a serem realizados, bem como os riscos e benefícios da participação no estudo (Anexo VII).

##### 4.5.2 - Comitê de Ética

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto, Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG) e Comitê de Ética Nacional em Pesquisa (CONEP) (Anexo VIII).

#### 4.6 - Referências Bibliográficas

- BALL, G. F. M. **Bioavailability and analysis of Vitamin in foods**. London: Chapman & Hall, 1998.
- BAUM, K.; PAGANO, M.; HORTON, N. Stata: data analysis and statistical software. Version. 7.0. Stata Corporation. 2000.
- BIRADS. **Breast imaging reporting and data system bi-rads tm**. Reston, Virginia, p.19. 1998
- CENTRO DE ESTUDOS DO LABORATÓRIO DE APTIDÃO FÍSICA DE SÃO CAETANO DO SUL (CELAFISCS). **Questionário Internacional de Atividade Física - Versão Curta**. 2004. Disponível em <[www.celafiscs.com.br](http://www.celafiscs.com.br)>. Acesso em: 10 jun. 2008.
- COFFIN, C. J.; LABBOK, M. H.; BELSEY, M. Breastfeeding definitions. **Contraception**, v.55, n.6, p.323-325, 1997.
- DEAN, A. G.; DEAN, J. A., COULOMBIER, D. et al. Epi Info: A Word-Processing, Database, and Statistics Program for Public Health on IBM-compatible Microcomputers. Version 6.0. The Division of Surveillance and Epidemiology Epidemiology Program Office Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1996. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/epiinfo/Epi6/EI6dnjp.htm>>. Acesso em: 07 jun 2009.
- DEVARENNE, C.; YORK, J.; GRANDA, J. et al. Sigma Statistical for Windows. Version 2.03. 1995.
- FAVARATO, M. E. C. S. **A mulher coronariopata no climatério após a menopausa: Implicações na qualidade de vida**. (Mestrado em Saúde Materno Infantil). Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 2000. 73 p.
- FRISANCHO, A. R. **Anthropometric standards for assessment of growth and nutritional status**. University of Michigan Press, Michigan, USA, 1993.
- GREENE, F.; PAGE, D. L.; FLEMING, I. D. et al. **AJCC cancer staging manual**. New York. 2002
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo demográfico 2000**. Resultados do universo. 2007. Disponível em: <[www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)>.
- JELLIFFE, D. B. The assessment of the nutritional status of the community (with special reference to field surveys in developing regions of the world). **Monogr Ser World Health Organ**, v.53, p.3-271, 1966.
- JOBSEN, J. J.; MEERWALDT, J. H.; VAN DER PALEN, J. et al. Family history in breast cancer is not a prognostic factor? **The Breast**, v.9, p.83-87, 2000.
- MONTEIRO, J.; ESTEVES, E. Diet PRO: sistema de suporte à avaliação nutricional e prescrição de dietas. Versão 4.0. As Sistemas, 2001. 1 CD-ROM.
- NEPA/UNICAMP. **Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO, versão 2**. NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO, U.E.D.C.U. Campinas. 2007 2006.

OLIVEIRA, R. C. **Avaliação dos fatores associados à neoplasia maligna da mama em mulheres atendidas no ambulatório de mastologia do hospital e maternidade Odete Valadares, Belo Horizonte - Minas Gerais.** 2004. 113f. Programa de pós-graduação em Ciência da Nutrição, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

OSIS, M. J. D.; DUARTE, G. A.; PÁDUA, K. S. et al. Aleitamento materno exclusivo entre trabalhadoras com creche no local de trabalho. **Revista Saúde Pública**, v. 38, n.2, p. 172-179, 2004.

PENTEADO, M. V. C. **Vitaminas:** aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. Barueri, SP: Manole, 2003. 612 p.

PHILIPPI, S. T. **Tabela de composição de alimentos: Suporte para decisão nutricional.** Brasília: Coronário. 2002. 107 p.

PINHEIRO, A. B. V. L., E.M.A.; BENZECRY, E.H.; GOMES, M.C.S.; COSTA, V.M. **Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras.** . São Paulo: Atheneu. 2004. 131 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 5, p. 191-225, 1989.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Latin American food sources of carotenoids. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 49, n. 1, p. 74S-84S, 1999.

TESSARO, S.; BERIA, J. U.; TOMASI, E. et al. Amamentação e câncer de mama: Estudo de caso-controle no sul do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v.19, n.6, p.1593-1601, 2003.

UEDA, T.; IGARASHI, O. Determination of vitamin E in biological specimens and foods by HPLC - pretreatment of samples and extraction of tocopherols. **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 7, n. 2, p. 79-96, 1990.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **USDA nutrient database for standard reference.** United States of America (Beltsville, Maryland) 2001.

USDOHAH, S. **Reducing the health consequences of smoking 25 years of progress a report of the surgeon general.** Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health. Rockville, Maryland. 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The Alcohol Use Disorders: Identification Test Guidelines for Use in Primary Care.** 2. ed. 2001. 40p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on alcohol.** Geneva, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Physical status:** the use and interpretation of anthropometry. Technical Report Series. Geneva, 1995. 452p.

WILLET, W. C. **Nutritional epidemiology.** New York: Oxford University Press. 1998. 514 p.

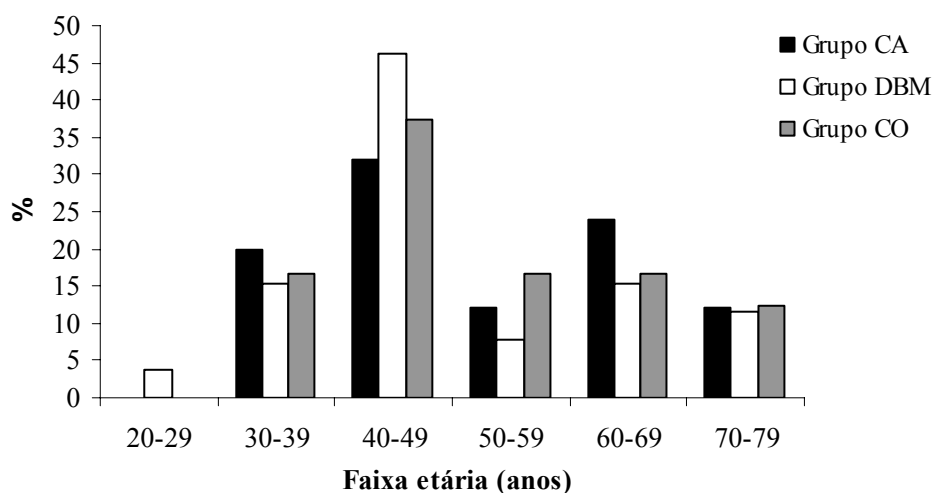
ZABOTTO, C. B.; VIANA, R. P. T.; GIL, M. F. **Registro fotográfico para inquéritos dietéticos:** utensílios e porções. Goiânia: INAN, v.1. 1996. 74 p.

ZAO, B; THAM, S. Y.; LU, J. et al. Simultaneous determination of vitamins C, E and  $\beta$ -carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 2, p. 200-204, 2004.

## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 – Caracterização da Amostra

O presente estudo revelou a participação de 75 mulheres, com idade entre 20 e 79 anos que atenderam aos critérios de inclusão na pesquisa. Frente à ampla faixa etária estudada, atentou-se para garantir certa homogeneidade da amostra quanto à idade, sendo as mulheres pareadas por  $\pm 5$  anos, em uma proporção de 1 mulher do grupo CA para 1 mulher do grupo DMB e 1 mulher do grupo CA para 1 mulher do grupo CO (Figura 6).

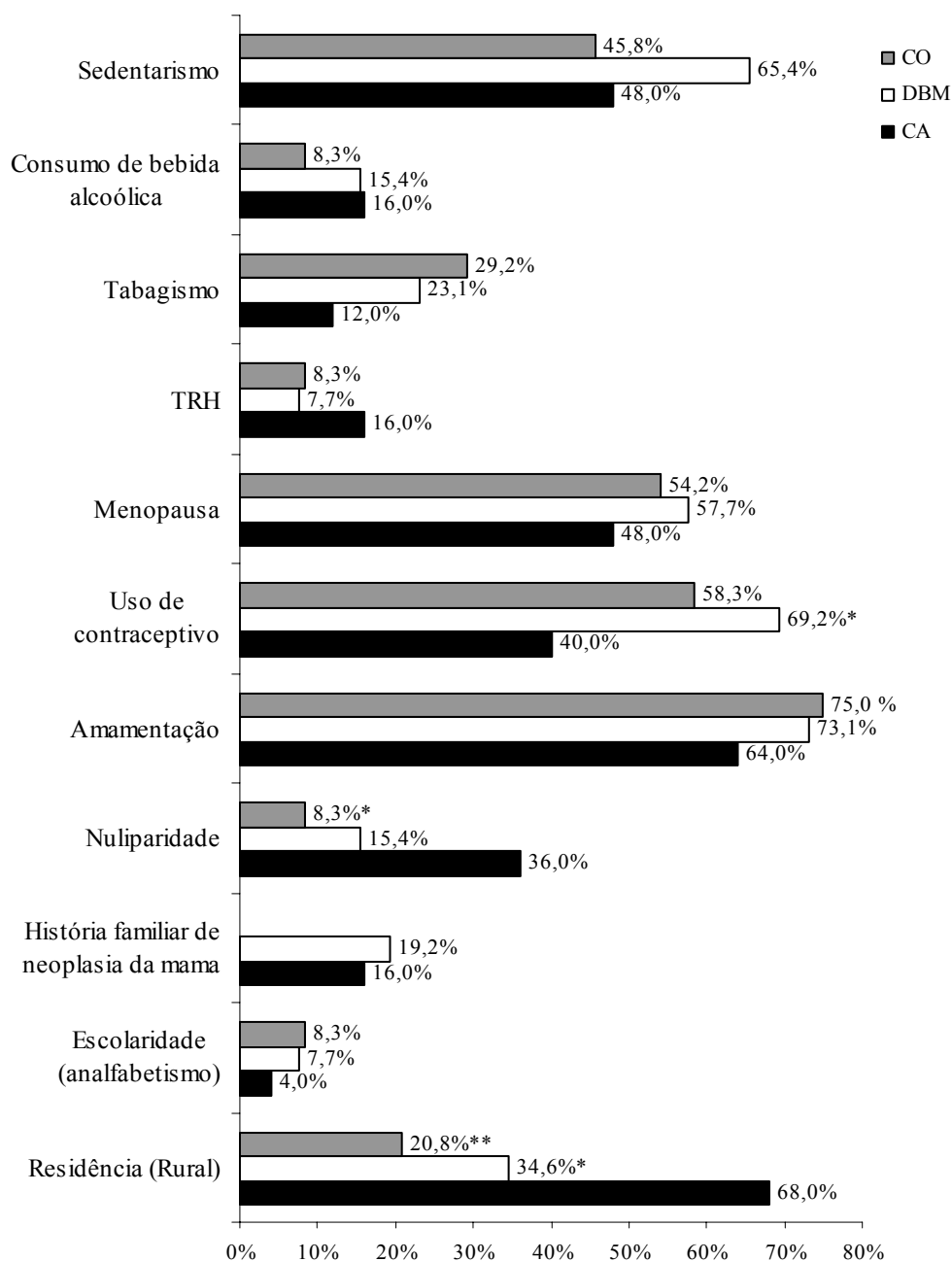


**Figura 6-** Distribuição por faixa etária da população estudada pertencente ao Grupo Caso (CA), Doença Benigna da Mama (DBM) e Controle (CO).

Quanto à distribuição por faixa etária, verificou-se maior prevalência de CA de mama na faixa de idade compreendida entre 40-49 anos, com mediana de 47,0 anos, o que reafirma um dos principais fatores associados à incidência da carcinogênese da mama, o envelhecimento. Este resultado revela a tendência monofásica da maior prevalência de câncer de mama, a qual tendeu a se aproximar dos 50 anos. Resultado semelhante foi observado por PAIVA, et al. (2002) que encontraram maior prevalência de câncer de mama em mulheres com idade por volta de 50 anos.

Das mulheres selecionadas para o estudo 47,7% residiam na zona rural, sendo que destas 68,0% pertencia ao grupo CA, 34,6% ao grupo DBM e 20,8% ao grupo CO (Figura 7). A descrição da situação conjugal revelou que 50,7% eram casadas e 25,3% eram solteiras (IBGE, 2000). Quanto à escolaridade, foi observado que 22,7% das mulheres possuíam ensino até a 4ª série completo; 16,3%, ensino médio completo; 6,7%

superior completo e que 6,4% das mulheres eram analfabetas (Figura 7). A caracterização da profissão/ocupação (IBGE, 2000) mostrou que 53,3% das voluntárias realizavam serviços domésticos.



**Figura 7-** Caracterização da amostra segundo os grupos e as variáveis estudadas. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

Dentre as variáveis clínicas, ginecológicas e obstétricas e considerando-se os fatores de exclusão, observou-se que o maior percentual de mulheres com história familiar de câncer de mama pertencia ao grupo DBM (19,2%). O maior percentual de mulheres nulíparas pertenciam ao grupo CA (36,0%), sendo a diferença significativa

quando comparada ao grupo CO ( $p < 0,05$ ). O grupo CO foi o que apresentou maior número de mulheres que amamentaram (75,0 %). O uso de contraceptivos orais foi maior entre as mulheres que pertenciam aos grupos DBM e CO, 69,2% e 58,3%, respectivamente. Distribuição similar de mulheres foi observada para a variável menopausa, onde o maior percentual de voluntárias que estavam na menopausa compunha os grupos DBM e CO (57,7% e 54,2%, respectivamente), todavia, que as que faziam TRH pertenciam principalmente ao grupo CA (16,0%) (Figura 7).

Verificou-se que o tabagismo foi relatado por aproximadamente 23,1% das mulheres que pertenciam ao grupo DBM e por 29,2% das mulheres que compunham o grupo CO (Figura 7).

A ingestão de álcool, 1 dose por dia, com frequência diária ou superior a 5 dias por semana (WHO, 2001; WHO, 2004), foi citada de forma semelhante entre as mulheres que compuseram os diferentes grupos, de maneira a não apresentar diferença significativa (Figura 7).

O sedentarismo foi verificado principalmente entre as mulheres do grupo DBM, seguido pelas mulheres do grupo CA (Figura 7). Vale ressaltar que dentre as mulheres analisadas apenas 13,3% foram consideradas ativas e 32,0% pouco ativas, as demais foram consideradas sedentárias segundo o CELAFISCS (2004), o que indica a redução da prática de exercícios físicos pelas mulheres que compuseram os diferentes grupos.

Os valores de renda mensal familiar e *per capita*, idade da menopausa, idade da menarca, idade da primeira gestação, número de gestações com filhos vivos, tempo de uso de contraceptivos, tempo de TRH, peso, estatura e IMC são apresentados nas Tabelas 1 e 2. Para estas variáveis não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos.

Em relação ao IMC, enfatiza-se que 56,0%, 57,7% e 79,2% das mulheres que foram incluídas no grupo CA, DBM e CO, respectivamente, apresentavam excesso de peso caracterizado por IMC maior que 25 kg/m<sup>2</sup>. Dessas, o maior percentual de obesidade (IMC  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>) foi apresentado pelo grupo CA (71,4%), seguido pelo grupo DBM (53,3%) e pelo grupo CO (21,5%). É importante ressaltar que a obesidade pode ser considerada fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama. Como revelado nos estudos realizados por Rapp et al. (2005) e Owiredu et al. (2009), a incidência de câncer de mama foi associada à elevação do IMC. Adicionalmente, a



obesidade andróide parece ser o tipo de obesidade que significativamente associada ao câncer de mama (SCHAPIRA et al., 1990).

No presente estudo não foi constatada diferença significativa quanto à energia total ingerida pelas voluntárias que compuseram os diferentes grupos, o que corrobora com os elevados percentuais de mulheres com excesso de peso anteriormente descrito. Por outro lado, verificou-se melhor padrão alimentar quanto à ingestão de vitaminas antioxidantes nos grupos DBM e CO quando comparados ao grupo CA.

**Tabela 1** – Características dos casos de câncer de mama maligno e dos casos de doença benigna da mama.

Variável		CA (n=25)		DBM (n=26)		p
		Média ±DP	Mediana (Min – Máx)	Média ±DP	Mediana (Min – Máx)	
Renda familiar	(Reais)	766,6 ± 408,5	700,00 (200,00 - 1600,00)	1044,20 ± 553,7	960,00 (95,00 - 2500,00)	0,99 <sup>2</sup>
Renda <i>per capita</i>	(Reais)	226,5 ± 121,4	200,00 (60,00 - 450,00)	343,80 ± 261,79	320,00 (16,00 - 1200,00)	0,08 <sup>2</sup>
Idade da menarca	(anos)	13,2 ± 2,04	13,00 (9,00 - 17,00)	12,64 ± 1,60	12,00 (10,00 - 17,00)	0,28 <sup>1</sup>
Idade da 1ª gestação	(anos)	24,9 ± 6,27	24,00 (16,00 - 38,00)	22,59 ± 4,21	22,00 (16,00 - 30,00)	0,19 <sup>1</sup>
Gestação com filhos vivos		2,7 ± 3,45	2,00 (0,00 - 14,00)	3,00 ± 2,34	3,00 (0,00 - 9,00)	0,29 <sup>2</sup>
Tempo de uso de contraceptivo	(anos)	5,3 ± 6,69	2,00 (0,50 - 18,00)	5,96 ± 6,89	2,50 (0,33 - 22,00)	0,53 <sup>2</sup>
Idade da Menopausa	(anos)	47,2 ± 6,09	48,00 (37,00 - 55,00)	44,23 ± 8,86	46,00 (29,00 - 65,00)	0,36 <sup>1</sup>
Tempo em TRH	(anos)	3,6 ± 3,61	3,00 (0,25 - 8,00)	0,75 ± 0,35	0,75 (0,50 - 1,00)	0,35 <sup>1</sup>
Peso	(kg)	67,5 ± 14,28	64,80 (46,00 - 99,60)	67,49 ± 14,09	66,90 (47,20 - 103,80)	0,99 <sup>1</sup>
Altura	(m)	1,6 ± 0,05	1,56 (1,48 - 1,69)	1,58 ± 0,06	1,57 (1,45 - 1,71)	0,62 <sup>1</sup>
IMC	(kg/m <sup>2</sup> )	27,6 ± 6,17	22,5 (17,00 - 37,00)	27,03 ± 5,50	23,00 (20,00 - 40,00)	0,80 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Teste t Student

<sup>2</sup> Mann-Whitney

**Tabela 2** - Características dos casos de câncer de mama maligno e dos controles.

Variável		CASO (n = 25)		CO (n = 24)		p
		Média ± DP	Mediana (Min – Máx)	Média ±DP	Mediana (Min – Máx)	
Renda familiar	(Reais)	766,60 ± 408,53	700,00 (200,00 - 1600,00)	916,30 ± 749,98	700,00 (200,00 - 3000,00)	0,84 <sup>2</sup>
Renda <i>per capita</i>	(Reais)	226,48 ± 121,44	200,00 (60,00 - 450,00)	270,08 ± 296,94	175,00 (80,00 - 1400,00)	0,60 <sup>2</sup>
Idade da menarca	(anos)	13,20 ± 2,04	13,00 (9,00 - 17,00)	13,04 ± 1,82	13,00 (9,00 - 17,00)	0,78 <sup>1</sup>
Idade da 1ª gestação	(anos)	24,86 ± 6,27	24,00 (16,00 - 38,00)	22,04 ± 4,70	21,50 (15,00 - 34,00)	0,14 <sup>2</sup>
Gestação com filhos vivos		2,72 ± 3,45	2,00 (0,00 - 14,00)	3,33 ± 2,20	3,00 (0,00 - 8,00)	0,46 <sup>1</sup>
Tempo de uso de contraceptivo	(anos)	5,27 ± 6,69	2,00 (0,50 - 18,00)	3,90 ± 5,57	1,75 (0,16 - 18,00)	0,54 <sup>2</sup>
Idade da Menopausa	(anos)	47,18 ± 6,09	48,00 (37,00 - 55,00)	45,76 ± 5,23	46,00 (35,00 - 53,00)	0,54 <sup>2</sup>
Tempo em TRH	(anos)	3,56 ± 3,61	3,00 (0,25 - 8,00)	5,08 ± 6,95	0,16 (5,08 - 10,00)	0,72 <sup>1</sup>
Peso	(kg)	67,47 ± 14,28	64,80 (46,00 - 99,60)	68,20 ± 18,48	66,00 (41,20 - 113,00)	0,87 <sup>1</sup>
Altura	(m)	1,57 ± 0,05	1,56 (1,48 - 1,69)	1,55 ± 0,07	1,54 (1,42 - 1,69)	0,24 <sup>1</sup>
IMC	(kg/m <sup>2</sup> )	27,45 ± 6,17	22,5 (17,00 - 37,00)	28,08 ± 6,20	27,5 (18,00 - 44,00)	0,72 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Teste t Student

<sup>2</sup> Mann-Whitney

### 5.1.1 – Referências Bibliográficas

CENTRO DE ESTUDOS DO LABORATÓRIO DE APTIDÃO FÍSICA DE SÃO CAETANO DO SUL (CELAFISCS). **Questionário Internacional de Atividade Física - Versão Curta**. 2004. Disponível em: <www.celafiscs.com.br>. Acesso em: 10 jun. 2008.

SCHAPIRA, D. V.; KUMAR, N. B.; LYMAN, G. H. et al. Abdominal obesity and breast cancer risk. **Annals of Internal Medicine**, v. 112, n. 3, p. 182-186, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo demográfico 2000**. Resultados do universo. 2007. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. 2000.

OWIREDU, W. K.; DONKOR, S.; ADDAI, B. W. Serum lipid profile of breast cancer patients. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 4, p. 332-338.

PAIVA, C. E.; RIBEIRO, B. S.; GODINHO, A. S. et al. Fatores de risco para câncer de mama em Juiz de Fora (MG): um estudo caso-controle. **Revista Brasileira de Cancerologia**, n. 48, v. 2, p. 231-237, 2002.

RAPP, K.; SCHROEDER, J.; KLENK, J. et al. Abdominal Obesity and Breast Cancer Risk. **British Journal of Cancer**, v. 93, p. 1062-1067, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The Alcohol Use Disorders: Identification Test Guidelines for Use in Primary Care**. 2. ed. 2001. 40p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on alcohol**. Geneva, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Physical status: the use and interpretation of anthropometry**. Technical Report Series. Geneva, 1995. 452 p.

## 5.2 – Artigo: Vitaminas antioxidantes e citocinas estão alteradas em câncer de mama

### RESUMO

A ingestão de compostos antioxidantes, como as vitaminas A e E, e a pró-vitamina A ( $\beta$ -caroteno), parece diminuir o estresse oxidativo por decréscimo do dano celular causado por radicais livres formados durante reações inflamatórias e outros processos metabólicos, os quais podem influenciar a iniciação e progressão do câncer. As células tumorais e do sistema imune estimulam a secreção de uma variedade de citocinas e radicais livres que exacerbam o processo inflamatório, podendo culminar com a propagação do câncer. O objetivo desta pesquisa foi avaliar níveis plasmáticos e teciduais de  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno e diferentes mediadores inflamatórios em mulheres com câncer. A amostra foi composta por 75 mulheres subdivididas em três grupos: Caso (n = 25), Doença Benigna da Mama (n = 26) e Controle (n = 24). Realizou-se a análise de variáveis socioeconômicas, clínicas, ginecológicas, obstétricas, antropométricas, comportamentais, além da ingestão de  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno. Foram mensuradas as concentrações plasmáticas e teciduais destes compostos e dos mediadores inflamatórios IL-8, IL-10 e IFN- $\gamma$ . Verificou-se maior ingestão de  $\alpha$ -tocoferol (p = 0,04) e  $\beta$ -caroteno (p = 0,011) pelo grupo DBM, quando comparado ao grupo CA. A concentração de  $\alpha$ -tocoferol tecidual foi significativamente reduzida no grupo CA. Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes ao se comparar os grupos CA e CO, considerando-se estas variáveis. A IL-10, IL-8 e IFN $\gamma$  estiveram aumentados em 231%, 49,1% e 57,5%, respectivamente, no grupo CA quando comparado ao grupo DBM. Os resultados encontrados no presente estudo apontam a existência de efeitos biológicos dos nutrientes sobre o sistema imunológico. A maior concentração tecidual de mediadores pró-inflamatórios no grupo de mulheres com câncer de mama demonstra que esta doença envolve a resposta imune na tentativa de eliminar as células cancerígenas. Por outro lado, a maior síntese de IL-10, uma citocina pleiotrópica capaz de limitar a inflamação e atuar como mediador anti-inflamatório, pode ser um mecanismo de proteção contra a ação exacerbada dos compostos pró-inflamatórios. Sugere-se o desenvolvimento de mais estudos voltados a esta temática com o intuito de melhor elucidar os potenciais fatores de risco e de proteção contra o câncer de mama, bem como os mecanismos envolvidos na interação nutrientes-sistema imunológico.

Palavras-chave: câncer de mama,  $\alpha$ -tocoferol, retinol,  $\beta$ -caroteno, citocinas.

ABSTRACT

The ingestion of antioxidants compounds such as vitamins A and E and pro-vitamin A ( $\beta$ -carotene), appears to decrease oxidative stress by decreasing the cellular damage caused by free radicals formed during inflammatory reactions and other metabolic processes, which can influence the initiation and progression of cancer. Tumoral cells and immune system cells stimulate the secretion of several cytokines and free radicals that increase the inflammatory process and may lead to the spread of cancer. The objective of this study was to evaluate plasmatic and tecidual levels of  $\alpha$ -tocopherol, retinol and  $\beta$ -carotene and others inflammatory mediators in women with cancer. The sample was comprised of 75 women, divided into three groups: Case (CA) (n = 25), Benign Breast Disease (BBD) (n = 26) and Control (CO) (n = 24). Were carried out socioeconomic analysis, beyond clinical, gynecological, obstetric, anthropometric, behavioral and of intake of  $\alpha$ -tocopherol, retinol and  $\beta$ -carotene. Were measured the plasmatic and tecidual concentrations of these compounds and of inflammatory mediators IL-8, IL-10 and IFN- $\gamma$ . Was found a higher ingestion of  $\alpha$ -tocopherol (p = 0.04) and  $\beta$ -carotene (p = 0.011) by DBM group, in comparison with CA group. The tecidual concentration of  $\alpha$ -tocopherol was significantly reduced in CA group. No significant differences were found between CA and CO groups, considering these variables. The IL-10, IL-8 and IFN- $\gamma$  were increased in 231 %, 49.1 % and 57.5 %, respectively, in CA group, when compared to BBD group. The results of this study indicate the existence of biological effects of nutrients on the immune system. The highest tecidual concentration of pro-inflammatory mediators in the group of women with breast cancer shows that this disease involves the immune response in an attempt to eliminate cancer cells. On the other hand, the enhanced synthesis of IL-10, a pleiotropic cytokine able to limit inflammation and act as anti-inflammatory mediator, should be a protective mechanism against the action exacerbated of the pro-inflammatory compounds. The development of further studies involving this issue are necessary in order to elucidate the potential risk factors and of protection against breast cancer and the mechanisms involved in the interaction between nutrients and immune system.

Keywords: breast cancer,  $\alpha$ -tocopherol, retinol,  $\beta$ -carotene, cytokines.

### 5.2.1 – Introdução

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais leva ao óbito mulheres em todo o mundo (KAMANGAR et al., 2006). Aproximadamente de 35% dos cânceres poderiam ser evitados por meio do consumo de uma dieta saudável (GARÓFOLO et al., 2004). Há evidências que fatores alimentares como a baixa ingestão de frutas e hortaliças, alimentos ricos em vitaminas e pró-vitaminas antioxidantes, possam influenciar os estágios de iniciação, promoção e progressão do câncer (DANAIEI et al., 2005).

A ação destes compostos parece estar envolvida na modulação do estado redox celular (LI et al., 2009), que em desequilíbrio originado da maior carga de radicais livres, pode levar à prejuízos no material genético e nos demais compartimentos que compõem as células (HUGHES, 2001). Exemplos de constituintes alimentares que vêm sendo estudados em triagens clínicas de prevenção do câncer de mama incluem as vitaminas A e E (GREENWALD, 2001). Pesquisas também vêm sugerindo uma melhora do prognóstico e da expectativa de vida (aumento de 20 a 90%) de pacientes que passaram a consumir compostos antioxidantes por meio da ingestão de frutas e vegetais, após o diagnóstico da doença (FINK et al., 2006).

A vitamina A parece inibir a carcinogênese pelo aumento da imunidade contra o tumor por meio de vários mecanismos e por atuar como regulador do ciclo celular, modulando a síntese e a metilação do DNA (RAY; HUSAIN, 2001), bem como a diferenciação da célula (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) é considerado o principal antioxidante da membrana celular e seu mais importante papel consiste em proteger esta estrutura contra a peroxidação lipídica (PADILHA; PINHEIRO, 2004). O  $\alpha$ -tocoferol também parece ser um potente indutor da apoptose em células epiteliais da mama, além de atuar em combinação com drogas quimioterápicas inibindo a metástase (KLINE et al., 2001).

A atividade antioxidante do  $\beta$ -caroteno compreende a habilidade estrutural das duplas conjugadas deslocarem elétrons não pareados. Devido a esta capacidade é possível sequestrar fisicamente oxigênio *singlet* e reagir com radicais livres tais como peróxido, hidroxil e superóxido, evitando a peroxidação lipídica (VALKO et al., 2004). Além disso, a principal via do metabolismo do  $\beta$ -caroteno leva à formação da vitamina A (retinol) (ZIOUZENKOVA et al., 2007).

O processo inflamatório também parece estar intimamente ligado ao aumento do risco de câncer, uma vez que implica em mudanças do meio celular (POLYAK, 2007). A produção local de citocinas no microambiente tumoral é crucial para a manutenção da resposta imune contra as células cancerosas e a presença de citocinas supressoras deste processo pode impedir a resposta efetora do organismo contra o câncer (LLANES-FERNÁNDEZ et al., 2006).

As interleucinas, um tipo de citocina, podem estimular o crescimento celular e contribuir para a metástase. Se permanentemente sintetizadas estas substâncias podem ser utilizadas como marcadores de ativação do sistema imune. Produzidas por macrófagos, monócitos e linfócitos as interleucinas 8 (IL-8) e 10 (IL-10) podem exercer vários efeitos sobre o sistema imune e estão relacionadas a angiogênese, crescimento e proliferação das células cancerosas. Além disso, estas interleucinas demonstram ser efetivas no prognóstico da doença, estando fortemente associadas ao câncer de mama (KOZŁOWSKI et al., 2003).

A IL-8 é uma citocina pró-inflamatória, originalmente identificada como quimioatrativa de neutrófilos, esta citocina é produzida por células tumorais (BENOY et al., 2004). Citocina multifuncional, a IL-10 é produzida pelos linfócitos Th2, pode inibir a resposta imune do tipo celular e as funções das células Th1 (CD4<sup>+</sup>) imunocompetentes, pelo bloqueio da função de apresentação de antígenos por estas células (LLANES-FERNÁNDEZ et al., 2006), as quais são capazes de produzir IL-8, acarretando a progressão da malignidade (KOZŁOWSKI et al., 2003). Llanes-Fernández et al. (2006), evidenciaram associação inversa entre a IL-10 e a p53, o que reflete o efeito supressor da IL-10 no microambiente do tumor, e sua associação inversa com um marcador de apoptose pode sugerir um aumento na agressividade tumoral.

Citocinas como os interferons inibem o processo de proliferação celular e invasão tumoral. O interferon gama (IFN- $\gamma$ ) é produzido principalmente pelas células Th1 CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e natural *killer* (NK). Seu efeito anti-proliferativo provavelmente é devido ao aumento da morte celular por estimular a regulação de algumas enzimas caspases e uma atividade antiangiogênica desta citocina tem sido observada (NICOLINI et al., 2006).

Embora exista correlação entre a ingestão de nutrientes antioxidantes e, a intensidade e natureza de suas ações sobre os processos bioquímicos celulares, permanece desconhecido se tais nutrientes atuam de forma a defender ou a promover a



ocorrência de câncer de mama e qual é sua influência sobre a expressão de mediadores do sistema imunológico. O presente estudo teve como objetivos avaliar a ingestão de  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno suas concentrações plasmática e tecidual sobre a chance de desenvolvimento de câncer de mama feminino e mensurar as concentrações teciduais e de mediadores inflamatórios (IL-8, IL-10 e IFN- $\gamma$ ).

## 5.2.2 – Metodologia

### 5.2.2.1 - *Casuística*

Tratou-se de um estudo observacional do tipo caso-controle de base hospitalar, realizado na Maternidade Odete Valadares da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, durante o período de janeiro a julho de 2006. O estudo foi desenvolvido após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto, Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG) e Comitê de Ética Nacional em Pesquisa (CONEP).

Como critérios de inclusão ao estudo considerou-se: ser paciente da Maternidade Odete Valadares, Belo Horizonte, Minas Gerais; não possuir história pessoal de qualquer outro tipo de câncer, ou resultado de exame anatomopatológico suspeito ou indeterminado para o padrão citopatológico de malignidade; residir na região metropolitana de Belo Horizonte, por 10 anos ou mais; não apresentar qualquer doença que necessitasse de modificações alimentares como diabetes, insuficiência renal ou gota; não apresentar diagnóstico de doença benigna da mama ou câncer de mama em período anterior à data da entrevista.

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido procedeu-se a realização de uma entrevista realizada por pesquisadores previamente treinados. As voluntárias foram divididas em 3 grupos: *Caso (CA)*: mulheres com diagnóstico de câncer de mama comprovado por exame anatomopatológico; *Doença Benigna da Mama (DBM)*: mulheres com diagnóstico de alterações fibrocísticas da mama ou outras doenças benignas da mama não proliferativas. *Controle (CO)*: mulheres que possuíam mamografia recente (máximo de 2 anos anterior a data da entrevista); ausência de história pessoal de câncer; ausência de qualquer lesão benigna ou maligna na mama e ausência de história familiar de câncer de mama.

Os questionários e as amostras coletadas foram codificados e o banco de dados somente foi conhecido após a análise do material biológico, exceto para o grupo CO. As mulheres que compuseram os grupos estudados foram pareadas por idade numa faixa de  $\pm 5$  anos.

#### 5.2.2.2 - Métodos

##### ***Coleta de Dados***

Aplicou-se questionário previamente validado (OLIVEIRA, 2004) de modo a caracterizar a amostra estudada quanto às questões socioeconômicas, história clínica, ginecológica, obstétrica e estilo de vida. As variáveis relacionadas ao estilo de vida referiram-se ao hábito de fumar, a ingestão de bebida alcoólica, a prática de atividade física e ao consumo alimentar.

Foram classificadas tabagistas as pacientes que fumavam pelo menos um cigarro ao dia, independente do tempo de uso. Foram classificadas como consumidoras de bebidas alcoólicas as mulheres cuja ingestão foi de pelo menos 1 dose (10 gramas de álcool) de qualquer bebida alcoólica com frequência diária ou superior a 5 dias por semana (WHO, 2004). Quanto à prática de atividade física utilizou-se os critérios propostos pelo CELAFISCS (2004), cujas classificações foram: sedentária, pouco ativa ou ativa.

O instrumento utilizado para a avaliação da ingestão alimentar foi o questionário semiquantitativo de frequência de consumo alimentar (QSFA) previamente validado para população estudada (OLIVEIRA, 2004). O questionário foi composto por 146 itens, adaptado de acordo com os nutrientes de interesse, com o objetivo de estimar o consumo relativo a um período de até dois anos antes do aparecimento do sintoma da doença (WILLET, 1998). A análise do QSFA foi realizada com o auxílio do *software* Diet PRO versão 4.0 (MONTEIRO e ESTEVES, 2001). Preferencialmente foi utilizada a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (NEPA/UNICAMP, 2006), seguida pelas tabelas Americana do *United States Department of Agriculture* (USDA, 2001) e de Composição de Alimentos (PHILIPPI, 2002), além de informações contidas nos rótulos dos alimentos. Os nutrientes analisados foram: energia, vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), vitamina A (retinol) e pró-vitamina A ( $\beta$ -caroteno).

### ***Avaliação Antropométrica***

O peso foi aferido utilizando-se balança eletrônica TANITA<sup>®</sup> - *Tanita Body Fat Monitor Scale* (Modelo TBF 531<sup>®</sup>, *Tanita Corporation of America, Illinois*), com capacidade para 150 kg e sensibilidade de 100g. A estatura foi determinada com a utilização de um estadiômetro vertical *Alturaexata*<sup>®</sup> que possui uma haste rígida dotada de uma escala bilateral de 35 a 213 cm e divisão de 1 mm, bem como uma base de sustentação metálica. Ambas as medidas foram aferidas conforme as técnicas preconizadas por Jelliffe (1966) e Frisancho (1993). Calculou-se o Índice de Massa Corporal (IMC) a partir da fórmula: peso/(estatura)<sup>2</sup>, expresso em kg/m<sup>2</sup>. Adotou-se o critério de classificação de IMC estabelecido para adultos pela Organização Mundial de Saúde (1995): IMC menor que 18,5 kg/m<sup>2</sup>, baixo peso; de 18,5 a 24,9 kg/m<sup>2</sup>, eutrófica; de 25,0 a 29,9 kg/m<sup>2</sup>, sobrepeso e maior que 30 kg/m<sup>2</sup>, obesidade.

### ***Análises Bioquímicas***

Os parâmetros bioquímicos analisados foram: concentração plasmática de retinol e  $\beta$ -caroteno e tecidual de  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno do tecido adiposo mamário. Após jejum de 12 horas foi coletado 15 mL de sangue periférico em EDTA em frascos codificados. Após centrifugação o plasma obtido (1 mL) foi armazenado a -80°C até o momento da análise. Uma amostra de tecido adiposo (aproximadamente 1,0 g) adjacente ao tumor da mama foi coletada em frasco codificado e armazenado a -80°C até o momento da análise.

- Extração de vitaminas E e A e  $\beta$ -caroteno e preparo de padrões

Durante as análises químicas, as amostras foram mantidas sob proteção da luz solar e artificial, pela utilização de vidrarias âmbar, papel alumínio e cortinas do tipo “blackout”, e sob proteção do oxigênio através da utilização de vidrarias com tampas e de ambiente com gás nitrogênio após obtenção dos extratos para análise. As vitaminas E ( $\alpha$ -tocoferol), A (retinol) e pró-vitamina A ( $\beta$ -caroteno) foram extraídas segundo o método de Ueda e Igarashi (1990). Posteriormente à extração as amostras foram secas em nitrogênio e congeladas em freezer até a análise.

- Análise cromatográfica

As curvas analíticas de  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno foram construídas considerando-se o menor e o maior pico das amostras injetadas. A concentração real da

solução padrão estoque foi verificada por espectrofotometria e corrigida adequadamente para as demais concentrações.

As análises de  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno, nas amostras de plasma e tecido adiposo da mama, foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), segundo as seguintes condições cromatográficas: coluna cromatográfica Macherey-Nagel C18, 250 x 4,6 mm; detector espectrofotométrico de arranjos de diodos; fase móvel – metanol: água ultrapura (98:2); fluxo da fase móvel: 1,7 mL/minuto; tempo de corrida: 8 minutos para o plasma e 16 minutos para o tecido adiposo, sendo os três compostos analisados em uma única corrida (análise simultânea). Os cromatogramas foram lidos em comprimento de onda de 292 nm ( $\alpha$ -tocoferol), 325 nm (retinol) e 450 nm ( $\beta$ -caroteno). Anteriormente a injeção das amostras, estas foram suspensas em 0,1 mL de metanol, filtradas em unidades filtrantes, com porosidade de 0,45  $\mu$ m e injetados 50  $\mu$ L na coluna cromatográfica.

A identificação das vitaminas foi realizada comparando os tempos de retenção obtidos para os padrões (acetato de  $\alpha$ -tocoferol, acetato de retinol,  $\beta$ -caroteno, para vitamina E, A e  $\beta$ -caroteno, respectivamente) e para as amostras. Além disso, foram comparados os espectros de absorção do padrão e dos picos de interesse nas amostras. As concentrações do  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno presentes nas amostras foram calculadas com base nas curvas analíticas. Foram realizados os testes de recuperação, determinados a faixa de linearidade (avaliada pelo coeficiente de determinação -  $R^2$ ), o limite de detecção e de quantificação (BALL, 1998).

### ***Mediadores do processo inflamatório***

- Extração do RNA

O RNA mensageiro (mRNA) total das amostras do tecido adiposo da mama foi extraído com o reagente TRIzol de acordo com as orientações fornecidas pelo fabricante. O Trizol (1 ml por 150 mg de tecido) foi adicionado à amostra, agitado em vórtex e incubado à temperatura. Em seguida, foi adicionado clorofórmio, agitando o *ependorff* por 15 segundos e incubando-o à temperatura ambiente por 2 minutos. Após centrifugação (12.000 x g, por 15 minutos à 4°C), a fase aquosa foi transferida para novo *ependorff*, no qual foi adicionados isopropanol. A amostra foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, e então centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Após este processo, o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado lavado com

etanol gelado (75%), mantendo esta solução estocada a  $-70^{\circ}\text{C}$  “overnight”. Após este período, a amostra foi centrifugada ( $7500 \times g$  por 10 minutos à  $20^{\circ}\text{C}$ ), desprezando-se o sobrenadante e secando o precipitado em estufa ( $37^{\circ}\text{C}$ ). A amostra foi então suspensa em água ultrapura produzida em sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, USA) e incubada por 10 minutos a  $35^{\circ}\text{C}$ .

- Confeção do DNA complementar

O DNA complementar (c-DNA) foi confeccionado utilizando mRNA extraído a uma concentração de  $0,118 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  ao qual foi adicionado os random primers (Promega). Em seguida, a solução foi aquecida a  $70^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos em banho-maria, colocada em banho de gelo por 2 minutos e centrifugada a 1300 rpm por 1 minuto. Foram acrescentados *5X reaction buffer*, dNTP (Fermentas) e água ultrapura produzida em sistema Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, USA). As amostras foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Adicionou-se a enzima M-MuLV Reverse Transcriptase. As amostras foram incubadas a  $42^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos, posteriormente a  $70^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos e armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a quantificação dos marcadores.

- Análise quantitativa dos genes alvo

A quantificação dos genes alvo foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR) no equipamento ABI Prism 5700 Sequence Detection System, utilizando o sistema de quantificação por fluorescência SYBR-Green. O ciclo da PCR envolveu uma desnaturação inicial de  $95^{\circ}\text{C}$  (10 minutos) e então 40 ciclos, com 1 minuto de desnaturação ( $94^{\circ}\text{C}$ ), 1 minuto de anelamento ( $56^{\circ}\text{C}$ ) e 2 minutos de alongamento ( $72^{\circ}\text{C}$ ), seguidos da curva padrão de dissociação.

Utilizou-se os “primers” (sense e antisense) dos mediadores: IL-10 5' AGATCTCCGAGATGCCTTCA 3' e IL-10 5' CCGTGGAGCAGGTGAAGAAT 3', IL-8 5' GCAGCTCTGTGTGAAGGTGCAG 3' e IL-8 5' CTGTTGTAGGGTTGCCAGATGC 3', IFN- $\gamma$  5' TGAAATATAACAAGTTATATCATG 3' e IFN- $\gamma$  5' TGTTTCGAGGTCGAAGAGCATCCC 3' e  $\beta$ -actina 5' ATGTTTGAGACCTTCAACA 3' e 5' CACGTCAGACTTCATGATGG 3'. As condições de PCR foram otimizadas considerando a concentração do “primer”, ausência de formação de dímeros, eficiência na amplificação dos genes alvo e controle dos genes constituintes.

Para cada reação foram utilizados  $\beta$ -actina (1000 nM), “primers” (2000 nM) (BIONEER), cDNA e SBYR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Cálculos para determinação do nível relativo de expressão do gene foram feitos de acordo com instruções do usuário - *User's Bulletin from Applied Biosystems* – com referência a  $\beta$ -actina da amostra, usando o método “cycle threshold” (Ct). O Ct é ponto onde um aumento exponencial significativo na quantidade de amplificado (fluorescência) é primeiramente detectado (geralmente 10 vezes o valor inicial). As médias dos valores de Ct das mensurações em duplicata foram usadas para calcular a expressão do gene alvo, com a normalização do controle interno ( $\beta$ -actina). Os valores encontrados para os indivíduos do grupo CA foram comparados aos valores encontrados para o grupo DBM para calcular o aumento na expressão do gene, utilizando a fórmula  $2^{-\Delta Ct}$ , também de acordo com o Manual do Usuário.

### 5.2.3 – Análises Estatísticas

Realizou-se análises univariadas, bivariadas e multivariadas. Foram aplicados os T de *student* e Mann-Whitney, após a verificação da normalidade pelo teste Kolmogorv-Smirnov, e o teste Qui-quadrado. Realizou-se regressão multivariada para os parâmetros que apresentaram significância igual ou inferior a 25% nos testes de comparação de médias ou medianas. Para as variáveis contínuas, foram comparados os valores inferiores aos superiores à média ou à mediana do grupo, obtida de acordo com suas distribuições. A correlação de Serman foi aplicada entre as variáveis relacionadas à resposta imunológica e a concentração tecidual dos compostos vitamínicos analisados.

Utilizaram-se os *softwares* Sigma Statistical<sup>®</sup> for Windows, versão 2.03, Epi Info, versão 6.0 e Stata, versão 7.0 para a análise dos dados e o nível de rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.4 – Resultados

As medianas de idade foram similares entre os grupos CA, DBM e CO (47,0, 45,5, 47,0 anos, respectivamente), as quais são mostradas nas Tabelas 3 e 4. Na Tabela 3 pode-se observar as características socioeconômicas e antropométricas, assim como os potenciais fatores que podem influenciar o desenvolvimento do câncer de mama, comparando-se as mulheres do grupo CA e do grupo DBM.

**Tabela 3** – Caracterização dos grupos CA e DBM, quanto a variáveis sócio-econômicas, ginecológicas, obstétricas, antropométricas e comportamentais.

	CA (n=25)	DBM (n=26)	<i>p</i>
<i>Variáveis numéricas - média ± DP; mediana, min-máx</i>			
Idade (anos)	52,4 ± 13,1 47,0 (33,0 – 77,0)	49,2 ± 13,6 45,5 (28,0 - 79,0)	0,48 <sup>2</sup>
Renda familiar (reais)	766,6 ± 408,5 700,0 (200,00 – 1600,0)	1044,20 ± 553,7 960,0 (95,0 - 2500,0)	0,99 <sup>2</sup>
Renda <i>per capita</i> (reais)	226,5 ± 121,4 200,0 (60,0 - 450,0)	343,8 ± 261,8 320,0 (16,0 - 1200,0)	0,08 <sup>2</sup>
Idade da menarca (anos)	13,2 ± 2,0 13,0 (9,0 – 17,0)	12,64 ± 1,60 12,00 (10,00 - 17,00)	0,28 <sup>1</sup>
Idade da 1ª gestação (anos)	24,9 ± 6,3 24,0 (16,0 – 38,0)	22,59 ± 4,21 22,00 (16,00 - 30,00)	0,19 <sup>1</sup>
Gestação com filhos vivos	2,7 ± 3,5 2,0 (0,0 – 14,0)	3,0 ± 2,3 3,00 (0,0 - 9,0)	0,29 <sup>2</sup>
Tempo de uso de contraceptivo oral (anos)	5,3 ± 6,7 2,0 (0,5 – 18,0)	5,96 ± 6,89 2,5 (0,3 - 22,0)	0,53 <sup>2</sup>
Idade da menopausa (anos)	47,18 ± 6,09 48,00 (37,0 – 55,0)	44,23 ± 8,86 46,00 (29,00 - 65,00)	0,36 <sup>1</sup>
Tempo em TRH (anos)	3,6 ± 3,6 3,0 (0,3 – 8,0)	0,75 ± 0,35 0,75 (0,50 - 1,00)	0,35 <sup>1</sup>
Peso (kg)	67,5 ± 14,3 64,8 (46,0 – 99,6)	67,49 ± 14,09 66,90 (47,20 - 103,80)	0,99 <sup>1</sup>
Altura (m)	1,57 ± 0,05 1,56 (1,48 – 1,69)	1,58 ± 0,06 1,57 (1,45 - 1,71)	0,62 <sup>1</sup>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,6 ± 6,2 22,5 (17,0 – 37,0)	27,0 ± 5,5 23,00 (20,0 - 40,0)	0,80 <sup>1</sup>
<i>Variáveis categóricas - porcentagem</i>			
Residência (rural)	68,0%	34,6%	0,02 <sup>3</sup>
Escolaridade (analfabetismo)	4,0%	7,7%	0,51 <sup>4</sup>
História familiar de CA de mama	16,0%	19,2%	0,52 <sup>4</sup>
Nuliparidade	36,0%	15,4%	0,09 <sup>3</sup>
Amamentação	64,0%	73,1%	0,16 <sup>3</sup>
Uso de contraceptivo oral	40,0%	69,2%	0,03 <sup>3</sup>
Menopausa	48,0%	57,7%	0,48 <sup>3</sup>
TRH	16,0%	7,7%	0,31 <sup>4</sup>
Sedentarismo	48,0%	65,4%	0,21 <sup>3</sup>
Consumo de bebida alcoólica	16,0%	15,4%	0,62 <sup>3</sup>
Tabagismo	12,0%	23,1%	0,25 <sup>4</sup>
Nunca ter fumado	72,0%	65,4%	0,92 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Teste t de Student

<sup>2</sup> Mann-Whitney

<sup>3</sup> Qui-quadrado

<sup>4</sup> Correção de Fisher

Os resultados encontrados revelaram que o fato das mulheres residirem em zona rural influenciou de forma significativa a ocorrência de câncer de mama ( $p = 0,02$ ). Foi observado também que uso de contraceptivo oral pareceu ter ação protetora ( $p = 0,03$ ). Os demais parâmetros não diferiram entre os grupos avaliados.

Ao comparar grupos CA e CO quanto às características gerais da amostra (variáveis socioeconômicas e antropométricas), constatou-se que, assim como encontrado na comparação dos CA e DBM, o fato de residir em zona rural influencia de

forma positiva e significativa a ocorrência do câncer de mama ( $p = 0,001$ ). A nuliparidade foi relatada significativamente pelas mulheres do grupo CA ( $p = 0,02$ ). Para as demais variáveis não foi constatada diferença significativa entre os grupos estudados (Tabela 4).

**Tabela 4** - Caracterização dos grupos CA e CO, quanto a variáveis sócio-econômicas, ginecológicas, obstétricas, antropométricas e comportamentais.

	CA (n = 25)	CO (n = 24)	<i>p</i>
<i>Variáveis numéricas - média ±DP; mediana, min-máx</i>			
Idade (anos)	52,4 ± 13,1 47,0 (33,0 - 77,0)	51,6 ± 12,4 47,0 (33,0 - 73,0)	0,780 <sup>2</sup>
Renda familiar (reais)	766,6 ± 408,5 700,0 (200,0 - 1600,0)	916,3 ± 749,98 700,0 (200,0 - 3000,0)	0,840 <sup>2</sup>
Renda <i>per capita</i> (reais)	226,5 ± 121,4 200,0 (60,0 - 450,0)	270,1 ± 296,94 175,0 (80,0 - 1400,0)	0,600 <sup>2</sup>
Idade da menarca (anos)	13,2 ± 2,0 13,0 (9,0 - 17,0)	13,0 ± 1,8 13,0 (9,0 - 17,0)	0,780 <sup>1</sup>
Idade da 1ª gestação (anos)	24,86 ± 6,27 24,00 (16,0 - 38,0)	22,0 ± 4,7 21,5 (15,0 - 34,0)	0,140 <sup>2</sup>
Gestação com filhos vivos	2,7 ± 3,5 2,0 (0,0 - 14,0)	3,3 ± 2,20 3,0 (0,0 - 8,0)	0,460 <sup>1</sup>
Tempo de uso de contraceptivo oral (anos)	5,27 ± 6,69 2,0 (0,5 - 18,0)	3,9 ± 5,6 1,7 (0,16 - 18,0)	0,540 <sup>2</sup>
Idade da menopausa (anos)	47,18 ± 6,1 48,0 (37,0 - 55,0)	45,7 ± 5,2 46,0 (35,0 - 53,0)	0,540 <sup>2</sup>
Tempo em TRH (anos)	3,6 ± 3,6 3,0 (0,3 - 8,00)	5,1 ± 6,9 5,1 (0,16 - 10,0)	0,720 <sup>1</sup>
Peso (kg)	67,5 ± 14,3 64,8 (46,0 - 99,6)	68,2 ± 18,5 66,0 (41,2 - 113,0)	0,870 <sup>1</sup>
Altura (m)	1,57 ± 0,05 1,56 (1,48 - 1,69)	1,55 ± 0,1 1,54 (1,4 - 1,7)	0,240 <sup>1</sup>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27,5 ± 6,2 22,5 (17,0 - 37,0)	28,1 ± 6,20 27,5 (18,0 - 44,0)	0,720 <sup>1</sup>
Residência (rural)	68,0%	20,8%	0,001 <sup>3</sup>
Escolaridade (analfabetismo)	4,0%	8,3%	0,480 <sup>4</sup>
Nuliparidade	36,0%	8,3%	0,020 <sup>3</sup>
Amamentação	64,0%	75,0%	0,400 <sup>3</sup>
Uso de contraceptivo oral	40,0%	58,3%	0,190 <sup>3</sup>
Menopausa	48,0%	54,1%	0,660 <sup>3</sup>
TRH	16,0%	8,3%	0,350 <sup>4</sup>
Sedentarismo	48,0%	45,8%	0,870 <sup>3</sup>
Consumo de bebida alcoólica	16,0%	8,3%	0,350 <sup>4</sup>
Tabagismo	12,0%	23,0%	0,120 <sup>4</sup>
Nunca ter fumado	72,0%	62,6%	0,470 <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Teste t de Student

<sup>2</sup> Mann-Whitney

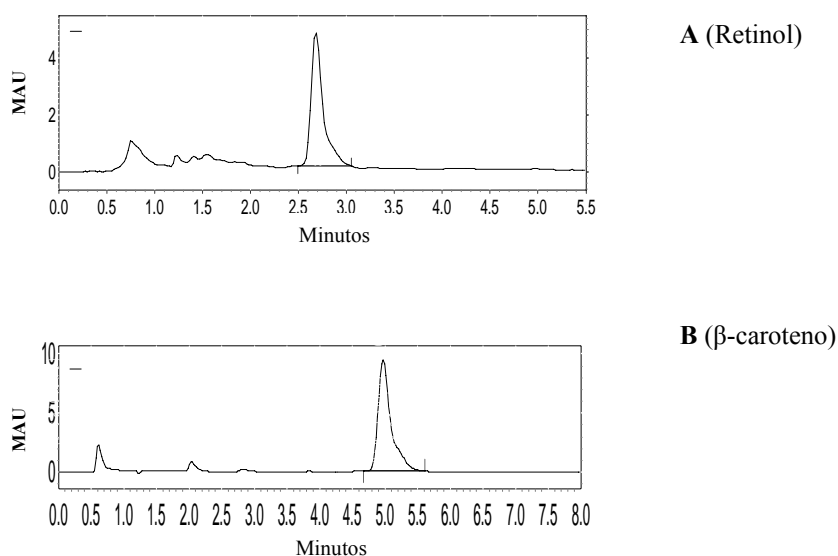
<sup>3</sup> Qui-quadrado

<sup>4</sup> Correção de Fisher

Na Figura 8 é possível observar os cromatogramas típicos da análise de retinol e de  $\beta$ -caroteno plasmáticos. O emprego da coluna C18 possibilitou a detecção simultânea dos compostos vitamínicos nas amostras estudadas. Os três compostos vitamínicos



apresentaram boa linearidade ( $R^2 = 0,99$  para o  $\alpha$ -tocoferol;  $R^2 = 0,98$  para o retinol e  $R^2 = 0,99$  para o  $\beta$ -caroteno). Foi possível verificar boa recuperação dos compostos analisados (89,9 do  $\alpha$ -tocoferol; 95% do retinol e 92% do  $\beta$ -caroteno), o que demonstra que os procedimentos utilizados durante a extração e análise foram adequados para evitar perdas dessas vitaminas. Os limites de detecção encontrados no presente estudo foram iguais a 0,03  $\mu\text{g/mL}$  para o  $\alpha$ -tocoferol, 0,01  $\mu\text{g/mL}$  para o retinol e 0,02  $\mu\text{g/mL}$  para o  $\beta$ -caroteno. O limite de quantificação foi de 0,3  $\mu\text{g/mL}$  para o  $\alpha$ -tocoferol, 0,1  $\mu\text{g/mL}$  para o retinol e 0,2  $\mu\text{g/mL}$  para o  $\beta$ -caroteno.



**Figura 8** - Cromatogramas típicos de retinol (A) e  $\beta$ -caroteno (B) das amostras de plasma analisadas.

Em relação aos fatores alimentares, verificou-se que o menor consumo de  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno esteve significativamente relacionado aos casos de câncer de mama, quando comparado ao grupo DBM. As concentrações plasmáticas das vitaminas não apresentaram tal diferença entre os grupos CA e DBM. Ao analisar o compartimento tecidual, pôde-se constatar que a concentração de  $\alpha$ -tocoferol esteve significativamente reduzida no grupo CA. Os demais fatores considerados neste estudo não apresentaram diferença significativa ao realizar a comparação entre os grupos (Tabela 5).

**Tabela 5** - Caracterização dos grupos CA e DBM, quanto à ingestão de energia,  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno, a concentração plasmática de retinol e  $\beta$ -caroteno e a concentração tecidual de  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno.

Variáveis*	CA (n = 19)	DBM (n = 16)	p
Energia (kcal)	2991,24 ± 1530,02 3780,89 (1005,51 - 8215,45)	3290,56 ± 1298,27 3181,07 (1377,74 - 6056,06)	0,480 <sup>1</sup>
$\alpha$ -tocoferol (mg/dia)	6,06 ± 4,70 4,68 (1,86 - 22,68)	6,90 ± 2,63 7,30 (1,92 - 13,32)	0,040 <sup>2</sup>
Retinol ( $\mu$ g/dia)	977,00 ± 502,05 923,96 (54,99 - 355,05)	1499,09 ± 1041,51 1351,37 (355,05 - 4308,66)	0,180 <sup>2</sup>
$\beta$ -caroteno ( $\mu$ g/dia)	3042,22 ± 2384,48 2298,49 (138,58 - 8231,02)	6667,43 ± 5567,82 3709,63 (1448,77 - 18753,34)	0,010 <sup>2</sup>
Retinol plasmático ( $\mu$ g/dL)	16,25 ± 3,62 15,26 (11,18 - 23,85)	18,44 ± 6,04 17,47 (11,54 - 34,90)	0,280 <sup>2</sup>
$\beta$ -caroteno plasmático ( $\mu$ g/dL)	51,99 ± 26,53 53,89 (6,27 - 89,49)	65,52 ± 39,97 54,88 (26,79 - 173,88)	0,180 <sup>1</sup>
$\alpha$ -tocoferol tecidual ( $\mu$ g/g)	3,12 ± 0,27 3,00 (2,81 - 4,06)	3,39 ± 0,32 3,38 (2,88 - 4,06)	0,005 <sup>1</sup>
Retinol tecidual ( $\mu$ g/g)	0,198 ± 0,039 0,197 (0,145 - 0,280)	0,192 ± 0,045 0,177 (0,144 - 0,153)	0,630 <sup>1</sup>
$\beta$ -caroteno tecidual ( $\mu$ g/g)	0,66 ± 0,30 0,62 (0,32 - 1,23)	0,83 ± 0,45 0,68 (0,26 - 2,00)	0,180 <sup>2</sup>

\*Variáveis expressas em: média ± DP e mediana (min-máx)

<sup>1</sup> Teste t de Student

<sup>2</sup> Mann-Whitney

A análise multivariada (Tabela 6) mostrou que a idade da primeira gestação igual ou superior a 30 anos pode ser fator de risco, independentemente associado às variáveis de confusão, para a ocorrência de câncer de mama. O fato de morar em zona rural também se manteve como fator de risco para a ocorrência desta doença. Considerando-se a média de ingestão de  $\alpha$ -tocoferol como ponto de corte, verificou-se que a ingestão inferior a 6,03 mg/dia desta vitamina possivelmente aumenta a chance de ocorrência deste tipo de agravo em 36,87 independentemente dos fatores de confusão.

**Tabela 6** – Modelo final da análise dos fatores de risco associados ao câncer de mama. Comparação entre os grupos CA e DBM.

	OR (IC 95%)	p
<i>Variáveis não ajustadas por potenciais fatores de confusão*</i>		
Residência (rural)	4,01 (1,08 - 15,44)	0,020
Idade da 1ª gestação ( $\geq$ 30 anos)	4,55 (1,12 - 19,48)	0,010
$\alpha$ -tocoferol ( $<$ 6,03 mg/dia)	9,07 (1,94 - 46,63)	0,001
$\alpha$ -tocoferol tecidual ( $<$ 3,17 $\mu$ g/g)	3,75 (1,91 - 16,09)	0,030
<i>Variáveis ajustadas por potenciais fatores de confusão**</i>		
Residência (rural)	17,85 (1,41 - 224,84)	0,020
Idade da 1ª gestação ( $\geq$ 30 anos)	30,81 (1,67 - 567,04)	0,020
$\alpha$ -tocoferol ( $<$ 6,03 mg/dia)	36,87 (2,38 - 569,81)	0,010
$\alpha$ -tocoferol tecidual ( $<$ 3,17 $\mu$ g/g)	13,56 (1,13 - 162,48)	0,040

\*Qui-quadrado

\*\* Análise de regressão multivariada

Pontos de corte: 30 anos, idade da primeira gestação; 6,03 mg/dia, média de ingestão de  $\alpha$ -tocoferol; 3,17  $\mu$ g/g, média da concentração  $\alpha$ -tocoferol no tecido adiposo mamário.

A comparação entre o grupo CA e o grupo CO não revelou diferença significativa quanto a ingestão de energia e de compostos vitamínicos, bem como de suas respectivas concentrações plasmáticas e teciduais (Tabela 7). Todavia ao realizar a análise de regressão multivariada, foi observado que os fatores de risco que estão independentemente associados ao desenvolvimento de câncer são o fato de morar em zona rural a idade da 1ª gestação superior ou igual a 30 anos (Tabela 8).

**Tabela 7** - Caracterização dos grupos CA e CO, quanto à ingestão de energia,  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno e a concentração plasmática de retinol e  $\beta$ -caroteno.

Variáveis*	CA (n = 19)	CO (n = 24)	p
Energia (kcal)	2991,24 ± 1530,02 3780,89 (1005,51 - 8215,45)	3008,87 ± 1398,90 2532,12 (1258,97 - 7362,22)	0,99 <sup>2</sup>
$\alpha$ -tocoferol (mg/dia)	6,06 ± 4,70 4,68 (1,86 - 22,68)	5,88 ± 2,82 5,24 (2,21 - 13,20)	0,43 <sup>2</sup>
Retinol ( $\mu$ g/dia)	977,00 ± 502,05 923,96 (54,99 - 355,05)	1217,24 ± 814,06 933,58 (348,71 - 4166,37)	0,22 <sup>1</sup>
$\beta$ -caroteno ( $\mu$ g/dia)	3042,22 ± 2384,48 2298,49 (138,58 - 8231,02)	3130,49 ± 1180,21 3352,50 (936,24 - 6058,50)	0,87 <sup>1</sup>
Retinol plasmático ( $\mu$ g/dL)	16,25 ± 3,62 15,26 (11,18 - 23,85)	15,55 ± 2,58 15,33 (11,19 - 21,61)	0,44 <sup>1</sup>
$\beta$ -caroteno plasmático ( $\mu$ g/dL)	51,99 ± 26,53 53,89 (6,27 - 89,49)	61,80 ± 40,24 52,70 (15,45 - 173,88)	0,32 <sup>1</sup>

\*Variáveis expressas em: média ± DP e mediana (min-máx)

<sup>1</sup> Teste t de Student

<sup>2</sup> Mann-Whitney

**Tabela 8** – Modelo final da análise dos fatores de risco associados ao câncer de mama. Comparação entre os grupos CA e CO.

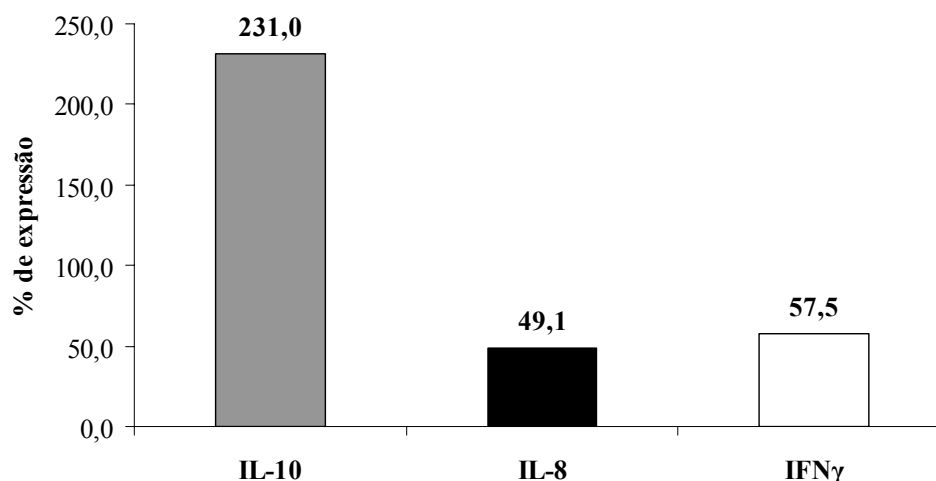
	OR (IC 95%)	p
<i>Variáveis não ajustadas por potenciais fatores de confusão *</i>		
Residência (rural)	8,07 (1,89 - 37,18)	0,0009
Idade da 1ª gestação ( $\geq$ 30 anos)	5,42 (1,23 - 25,75)	0,0090
<i>Variáveis não ajustadas por potenciais fatores de confusão **</i>		
Residência (rural)	12,21 (2,61 - 56,96)	0,0010
Idade da 1ª gestação ( $\geq$ 30 anos)	8,98 (1,75 - 45,99)	0,0080

\*Qui-quadrado

\*\* Análise de regressão multivariada

Ponto de corte: idade da primeira gestação superior a 30 anos.

A expressão das citocinas analisadas no tecido adiposo mamário (IL-10, IL-8 e IFN $\gamma$ ) esteve aumentada no grupo CA ao compará-la com a expressão observada no grupo DBM (Figura 9). A IL-10 foi a citocina mais expressa dentre os mediadores inflamatórios analisados. Vale ressaltar que as demais citocinas também tiveram seus níveis aumentados no tecido adiposo mamário, o que pode caracterizar a ativação do sistema imunológico.



**Figura 9** – Expressão das citocinas IL-10, IL-8 e IFN $\gamma$  do grupo CA em comparação ao grupo DBM.

Diante do aumento da concentração de citocinas no tecido adiposo das mulheres que apresentavam câncer de mama, buscou-se verificar a possibilidade de correlação entre os nutrientes avaliados e a expressão destes mediadores inflamatórios. Constatou-se correlação positiva e significativa entre a expressão de IL-10 e IFN $\gamma$ , e entre a expressão de IL-10 e a concentração de retinol tecidual nas mulheres do grupo CA (Tabela 9). Desta forma, parece haver uma relação entre os mediadores que compõem o sistema imunológico, bem como estes e os nutriente oriundos da dieta.

**Tabela 9** - Correlação da expressão de citocinas e dos compostos vitamínicos teciduais no grupo CA.

	IL-10	IL-8	IFN $\gamma$	$\alpha$ -tocoferol ( $\mu\text{g/g}$ )	Retinol ( $\mu\text{g/g}$ )	$\beta$ -caroteno ( $\mu\text{g/g}$ )
IL-10	1,000	0,391	0,517*	0,022	0,450*	0,075
IL-8	-	1,000	0,369	-0,101	0,390	0,050
IFN $\gamma$	-	-	1,000	-0,051	0,133	-0,020

Coefficiente de Correlação de Spearman (\* $p < 0,05$ )

### 5.2.5 – Discussão

Este estudo é fruto de um trabalho maior inicialmente desenvolvido pela Universidade Federal de Ouro Preto e cuja coleta de dados foi coordenada e realizada por pesquisadores desta Instituição. Alguns fatores de confundimento não observados *a priori* foram considerados para a realização desta pesquisa, como por exemplo, a exclusão da amostra de mulheres com doença benigna da mama caracterizada como

proliferativa, o que propiciou a redução do número de pessoas avaliadas; trabalhosa análise do banco de dados, dentre outros elementos. Desta forma, com o intuito de minimizar os possíveis efeitos de fatores de confundimento optou-se pela realização da análise de regressão multivariada.

Dentre as características sócio-econômicas analisadas, observou-se que o fato de morar em zona rural foi significativo para o desenvolvimento do câncer de mama, sendo independentemente associado à outros fatores. Resultado semelhante foi encontrado por um estudo brasileiro realizado por Paiva et al. (2002) que avaliaram quais fatores de risco contribuíam para a ocorrência de câncer de mama na região geográfica de Juiz de Fora, Brasil. Os autores inferem que uma possível explicação, dentre outras cabíveis, poderia ser a maior exposição a inseticidas do grupo químico dos clorados, os quais principalmente na década de 70 foram utilizados na agricultura brasileira. Estes compostos atuam de maneira a mimetizar os estrogênios, tendo como principal característica um alto efeito residual, podendo, inclusive, permanecer no solo por dezenas de anos.

Na puberdade, a hipófise sintetiza os hormônios folículo-estimulante e luteinizante responsáveis pelo controle hormonal da produção de estrogênio pelos ovários. A partir desta fase as mamas iniciam seu desenvolvimento com a multiplicação dos ácinos e lóbulos. A progesterona, que passa a ser produzida quando os ciclos menstruais tornam-se ovulatórios e que depende da atuação prévia do estrogênio, atua sobre a diferenciação da árvore ducto-lobular mamária. Na vida adulta, o estímulo intermitente de estrogênio e progesterona faz com que o tecido mamário seja modulado durante os ciclos menstruais (BRASIL, 2004; WÄRRI et al., 2007; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2009).

Neste trabalho, ao realizar a comparação entre o grupo CA e DBM, o uso de contraceptivos hormonais de administração oral (estrogênio e, ou progesterona) atuou como fator de proteção contra o câncer de mama. Este achado se opõe ao encontrado em diferentes estudos. Pesquisa realizada por Althuis et al. (2003) revelou que o risco de desenvolvimento de câncer de mama esteve aumentado em mulheres que fizeram uso de contraceptivos orais nos 5 anos anteriores ao diagnóstico de câncer, particularmente nas mulheres mais jovens. Uma análise conduzida por Calle et al. (1996), avaliou resultados de 54 estudos epidemiológicos realizados em vários países e encontrou que mulheres em uso de contraceptivos tinham uma elevação do risco de desenvolvimento de câncer

de mama, o qual foi acentuado nas mulheres que iniciaram o uso ainda adolescentes. Todavia no estudo citado observou-se também que a interrupção do uso de anticoncepcionais hormonais por 10 anos ou mais possibilitou o retorno do risco de desenvolvimento aos mesmos níveis daquelas de mulheres que nunca haviam feito uso deste método. Em contrapartida, o estudo *Women's Contraceptive and Reproductive Experiences* (Women's CARE) verificou que o uso de contraceptivos não aumentou significativamente o risco de desenvolvimento de câncer de mama, independentemente do tempo de uso, resultado semelhante foi constatado por Marchbanks et al. (2002).

Fatores genéticos podem implicar nos resultados encontrados. Assim, corroborando ao encontrado no presente trabalho, no que se refere ao uso de contraceptivos orais atuando como fator protetor ao se comparar o grupo CA e DBM, Milne et al. (2005) ao avaliarem, em um estudo caso-controle mulheres caucasianas dos Estados Unidos, Canadá e Austrália, observaram que o uso de contraceptivo oral por um mínimo de 12 meses foi associado à redução do risco de câncer de mama (78%) em mulheres que possuíam mutação no gene BRCA1, mas o mesmo não foi encontrado em mulheres com mutação no gene BRCA2 e nas mulheres controle. Adicionalmente, fatores econômicos como a menor renda *per capita* e o local de residência podem ter influenciado o resultado encontrado no estudo, uma vez que a menor renda (significativamente reduzida no grupo CA) dificulta o acesso a aquisição de contraceptivos, assim como o fato de morar em zona rural limita o acesso à serviços de saúde de maior complexidade para a obtenção de medicamentos.

Segundo Brasil (2004), o diagnóstico histopatológico de lesão benigna da mama (lesão mamária proliferativa com atipia ou neoplasia lobular *in situ*) é fator de risco para o câncer de mama, assim como a história familiar de câncer de mama. Roberts et al. (1984), verificaram, em estudo longitudinal, um leve aumento do risco de desenvolvimento deste tipo de câncer em mulheres com história de doença benigna da mama (hiperplasia epitelial). Em 2005, Hartmann et al. encontraram que o risco relativo associado a atipia foi 4,24, igualmente comparado com um risco de 1,88 para alterações sem atipia. Não houve relato de aumento do risco de câncer de mama para as mulheres sem história familiar de doença benigna da mama e para aquelas com lesão não proliferativa. Os autores concluíram que os fatores de risco para o câncer de mama, após o diagnóstico da doença benigna da mama, devem considerar a classificação histológica da lesão benigna. Ao comparar a história prévia de doença benigna da mama entre os grupos CA e CO constatou-se que maior percentual de mulheres do grupo CA

apresentava esta característica ( $p = 0,01$ ), o que se assemelha ao encontrado na literatura. Ao comparar o grupo CA e DBM, verificou-se que o maior percentual de mulheres com história de doença benigna da mama pertencia ao grupo DBM, sem haver diferença significativa, o que pode ter sido devido à maior preocupação das mesmas em realizarem acompanhamento clínico após o diagnóstico e a classificação histológica, a qual não foi avaliada neste estudo.

Foi possível observar que a nuliparidade aumentou significativamente a chance de desenvolvimento do câncer de mama, quando comparado os grupos CA e CO. Em concordância com este resultado, Lambe et al. (1996) observaram que o aumento da paridade esteve associado a uma pronunciada redução do risco deste tipo de câncer, sendo que cada nascimento adicional conferiu diminuição do risco em 10%. Uma possível hipótese para a nuliparidade ser considerada como fator de risco, é que devido às mulheres nulíparas não terem interrompido seu ciclo ovulatório, sendo que maior estimulação do tecido mamário pode ocorrer pela ação do estrogênio, conduzindo potencialmente ao câncer (SIMSEK; MARTIN, 2000).

Não foi encontrado estudo brasileiro que avaliasse o consumo e a distribuição entre tecidos de  $\alpha$ -tocoferol, retinol e  $\beta$ -caroteno. No presente trabalho não foi observada diferença significativa entre os grupos CA e CO, quando avaliados o consumo, a concentração plasmática dos compostos vitamínicos estudados. Ao realizar a comparação entre os grupos CA e DBM, em relação à estas mesmas variáveis, constatou-se que a ingestão de  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno foi maior no grupo DBM.

A análise multivariada revelou que a ingestão de  $\alpha$ -tocoferol inferior 6,03 mg/dia aumenta em 36,87 vezes a chance de desenvolvimento de câncer de mama. Ressalta-se que, a interpretação dos resultados oriundos da utilização de Questionário de Frequência Alimentar (QFA) deve ocorrer com cautela. Apesar de ser um método de pouca precisão quanto a de avaliação da ingestão alimentar de micronutrientes, o QFA possui a habilidade de prover informações relativas da ingestão, o que facilita a estimativa da associação de riscos para doenças crônicas (FINK et al., 2006) e, adicionalmente, permite a avaliação do consumo habitual (CINTRA et al., 1997). Vale ressaltar que apesar do número limitado de pessoas avaliadas, a análise do consumo revelou informações importantes quanto a redução da ingestão de compostos antioxidantes.

Ao comparar a mediana de ingestão de  $\alpha$ -tocoferol com o valor de *Estimated Average Requirements for Groups* (EAR) (12,0 mg/dia) (IOM, 2000), observou-se que

ambos os grupos não atingiram ao preconizado, refletindo a necessidade de estímulo do consumo de alimentos fontes desta vitamina pela população tais como grãos integrais, sementes oleaginosas, óleos vegetais, hortaliças verde-escuras, dentre outras. Esta mesma comparação não pôde ser realizada para o  $\beta$ -caroteno pelo fato de não haver, até o presente momento, valor de referência para esta pró-vitamina.

Pesquisa realizada por Gaudet et al. (2004), revelou que apesar de não significativa, o maior consumo de  $\alpha$ -tocoferol (7,9 a 10,7 mg/dia) e  $\beta$ -caroteno (mais de 2.647,4  $\mu$ g/dia) esteve inversamente associado ao risco de desenvolvimento de câncer de mama. Gandini et al. (2000) avaliaram 47 trabalhos e encontraram uma redução do risco de desenvolvimento de câncer de mama (18%) em 11 estudos analisados, dada a maior ingestão de  $\beta$ -caroteno. Zhang et al. (1999) também observaram que o  $\beta$ -caroteno esteve inversamente associado ao risco de câncer de mama em mulheres na pré-menopausa, mas de maneira fraca. Já nas mulheres na pré-menopausa que apresentavam história familiar de câncer de mama a inversa associação foi significativa.

O tecido adiposo contém muitas substâncias que podem ser quantificadas e que são relacionadas à exposições passadas, de interesse em estudos epidemiológicos. Desta forma, o tecido adiposo consiste em um estável depósito de ácidos graxos, vitaminas lipossolúveis dentre outras substâncias solúveis em gordura (KOHLMEIER; KOHLMEIER, 1995). Considerando-se esta particularidade realizou-se a análise tecidual dos compostos vitamínicos e observou-se que apesar dos demais compostos apresentarem-se elevados, apenas a concentração de  $\alpha$ -tocoferol esteve aumentada de maneira significativa no grupo DBM ao compará-lo ao CA.

A análise multivariada revelou que a concentração tecidual inferior a 3,17  $\mu$ g/g aumenta a chance de ocorrência de câncer de mama. Uma provável hipótese da ação protetora do  $\alpha$ -tocoferol contra o câncer de mama relaciona-se à sua atuação impedindo a peroxidação dos ácidos graxos da membrana celular, prevenindo as reações em cascata de síntese de compostos oxidantes deletérios ao material genético e a perda da integridade da membrana (BYERS; PERRY, 1992), além disso, a vitamina E age sobre o sistema imunológico aumentando a proliferação das células T e da síntese de anticorpos (HUGHES, 2000). Análogos do  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E succinato e  $\alpha$ -tocoferol ligado a ácido acético) vêm sendo pesquisados e verifica-se a ação destes sobre a inibição do crescimento de cultura de células de câncer de mama humano, pela indução da paralisação do ciclo celular, diferenciação e apoptose (KLINE et al., 2004).



Enfatiza-se que os carotenóides, em especial o  $\beta$ -caroteno, principal precursor da vitamina A, além de atuar como antioxidante, bloqueando a ação dos radicais livres, parece agir juntamente com os tocoferóis estimulando o sistema imunológico e por esta via agir como protetor contra o câncer (HULTÉN et al., 2001).

O fato da primeira gestação ocorrer em idade avançada aumenta o risco de desenvolvimento de câncer de mama (THULER, 2003). Considerando-se a análise multivariada, observou-se que a primeira gestação com idade maior ou igual a 30 anos eleva a chance de desenvolvimento da carcinogênese mamária. Resultado semelhante foi encontrado por Ozmen et al. (2009) em estudo caso-controle realizado na Turquia em que a chance de câncer de mama aumentou para mulheres que tiveram gestação com idade maior ou igual à 35 anos.

Uma das formas de ação do sistema imunológico é via síntese de citocinas. A produção de citocinas no microambiente tumoral é de vital importância para a manutenção da resposta imune contra as células tumorais e a presença de citocinas supressoras desta resposta pode comprometer a ação efetora do sistema imune. A IL-10, presente no sítio tumoral, parece mediar a imunossupressão (Llanes-Fernández et al., 2009). No presente trabalho observou-se aumento de IL-10 em 231% no grupo CA, quando este foi comparado ao grupo DBM. Significante expressão de IL-10 no tecido mamário neoplásico tem sido observada. Esta citocina é produzida pelas células Th2 e age inibindo as respostas das células Th1, por meio da redução da secreção de citocinas por este tipo celular, e bloqueando a apresentação de antígeno pelas células apresentadoras de antígeno. Llanes-Fernández et al. (2006), determinaram a expressão de IL-10 no microambiente tumoral de mulheres com câncer de mama e sua associação aos marcadores tumorais. Os autores encontraram uma inversa relação entre a IL-10 e a p53, proteína envolvida na paralisação do ciclo celular e concluíram que o aumento da IL-10 pode ser indicador de mal prognóstico, evidenciando estágio mais avançado da doença. Portanto, o fato de ter aumentado a IL-10 representa uma possível exacerbação da multiplicação de células malignas.

Em relação a IL-8 verificou-se que seu aumento foi de 49,1% no grupo CA, em relação ao grupo DBM. A IL-8 participa da ativação do sistema imune e parece ser expressa pelas células neoplásicas da mama. Acredita-se que esta citocina age não somente em favor da invasão e disseminação metastática das células malignas, mas também aumenta a angiogênese do tumor em crescimento (CHAVEY et al., 2008).

Estudo realizado por Kozlowski et al. (2003) mostrou aumento da concentração sérica de IL-8 em pacientes com câncer de mama e correlação positiva com o estágio da doença.

Em referência ao IFN $\gamma$ , este mediador pró-inflamatório, é produzido principalmente pelas células T (CD4+ e CD8+) e pelas células *Natural Killer*. O IFN $\gamma$  ativa os macrófagos, promovendo a diferenciação das células CD4+ imaturas em células maduras Th1 e inibindo a diferenciação das células CD4+ em células Th2 (RAO et al., 2006). Os resultados encontrados neste estudo revelaram aumento da expressão de IFN $\gamma$  no grupo CA em 57,5%, podendo este ser um indicativo das defesas do organismo em tentar eliminar as células malignas. Conforme demonstrado por Pulaski et al. (2002) IFN $\gamma$  é um componente crítico da regulação da resposta fagocítica contra as células metastáticas do câncer de mama.

A positiva e significativa associação encontrada entre o retinol tecidual e a IL-10, evidencia os efeitos biológicos dos nutrientes sobre o sistema imunológico. O retinol parece estimular a proliferação de linfócitos T, célula produtora de IL-10, via receptor CD3 e por meio de uma cascata de reações promove a expressão de citocinas envolvidas na resposta imune (ALLENDE et al., 1997).

O fato da IL-10 secretada pelos linfócitos Th2 favorecer a inibição da secreção de IFN $\gamma$  pelos linfócitos Th1 (REED; PUROHIT, 1997) parece ser evidenciado pela positiva correlação encontrada para as estas citocinas no presente estudo. A maior expressão de IL-10 poderia ser uma possível explicação para resposta antitumor ser ineficaz nas pacientes com câncer de mama. Adicionalmente, as células cancerosas podem usufruir das ações da IL-10, mediador que favorece o crescimento e a proliferação destas células, além de contribuir para a angiogênese.

#### 5.2.5 – Consideração Final

Dentre as características da população avaliada, o fato de morar em zona rural aumenta a chance de desenvolvimento do câncer de mama, assim como a menor renda *per capita*, história prévia de doença benigna da mama e nuliparidade revelaram-se como potenciais fatores favorecedores deste agravo. O uso de contraceptivo atuando como fator protetor pode estar mascarado pela menor renda e dificuldade de acesso aos serviços de saúde pelo grupo CA. A ocorrência da primeira gestação com idade igual ou

superior a 30 anos mostrou ser fator independentemente associado à ocorrência de câncer de mama.

A menor ingestão e conseqüente menor concentração tecidual de  $\alpha$ -tocoferol também podem aumentar a chance para o desenvolvimento carcinogênese mamária.

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem a existência de efeitos biológicos dos nutrientes sobre o sistema imunológico. Além disso, a maior concentração tecidual de mediadores pró-inflamatórios no grupo de mulheres com câncer de mama demonstra que esta doença envolve a resposta imune na tentativa de eliminar as células cancerígenas. Por outro lado, a maior síntese de IL-10, mediador anti-inflamatório, pode ser um mecanismo de proteção contra a ação exacerbada dos compostos pró-inflamatórios.

Sugere-se o desenvolvimento de mais estudos voltados a esta temática com o intuito de melhor elucidar os mecanismos envolvidos na interação entre nutrientes antioxidantes e o sistema imunológico. Além disso, a dificuldade de comparação com outros trabalhos leva-nos a refletir quanto à necessidade de padronização das metodologias empregadas nas pesquisas.

#### 5.2.6 – Referências Bibliográficas

ALLENDE, L. M.; CORELL, A.; MADROIO, A. et al. Retinol (vitamin A) is a cofactor in CD3-induced human T-lymphocyte activation. **Immunology**, v. 90, p. 388-396, 1997.

ALTHUIS, M. D.; BROGAN, D. D.; COATES, R. J., et al. Breast cancers among very young premenopausal women (United States). **Cancer Causes and Control**, v. 14, n. 2, p. 151-160, 2003.

BALL, G. F. M. **Bioavailability and analysis of Vitamin in foods**. London: Chapman & Hall, 1998.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BRASIL. **Controle do câncer de mama**: Documento de consenso. Rio de Janeiro: INCA. 2004.

BYERS, T.; PERRY, G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. **Annual Review of Nutrition**, v. 12, p. 139-159, 1992.

CALLE, E. E.; HEATH, C. W.; MIRACLE-MCMAHILL, H. L.; et al. Breast cancer and hormonal contraceptives: Collaborative reanalysis of individual data on 53.297 women with breast cancer and 100,239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. **Lancet**, v. 347, p. 1713-1727, 1996.

CENTRO DE ESTUDOS DO LABORATÓRIO DE APTIDÃO FÍSICA DE SÃO CAETANO DO SUL (CELAFISCS). **Questionário Internacional de Atividade Física** - Versão Curta. 2004. Disponível em <[www.celafiscs.com.br](http://www.celafiscs.com.br)>. Acesso em: 10 jun. 2008.

CHAVEY, C.; MUHLBAUER, M.; BOSSARD, C. et al. Interleukin-8 Expression Is Regulated by Histone Deacetylases through the Nuclear Factor *kappa* B Pathway in Breast Cancers **Molecular Pharmacology**, v. 74, p. 1359–1366, 2008.

CINTRA, I. P.; VON DER HEYDE, M. E.; SCHMITZ, B. A. S. Métodos de inquéritos dietéticos. **Cadernos de Nutrição**, v. 13, p. 11-23, 1997.

DANAELI, G.; VANDER HOORN, S.; LOPEZ, A. D. et al. Causes of cancer in the world: Comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **Lancet**, v.366, n.9499, p.1784-1793, 2005.

DEAN, A. G.; DEAN, J. A., COULOMBIER, D. et al. Epi Info: A Word-Processing, Database, and Statistics Program for Public Health on IBM-compatible Microcomputers. Version 6.0. The Division of Surveillance and Epidemiology Epidemiology Program Office Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1996. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/epiinfo/Epi6/EI6dnjp.htm>>. Acesso em: 07 jun 2009.

DEVARENNE, C.; YORK, J.; GRANDA, J. et al. Sigma Statistical for Windows. Version 2.03. 1995.

FINK, B. N.; GAUDET, M. M.; BRITTON, J. A. et al. Fruits, vegetables, and micronutrient intake in relation to breast cancer survival. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.98, n.2, p.199-208, 2006.

FRISANCHO, A. R. **Anthropometric standards for assessment of growth and nutritional status**. University of Michigan Press, Michigan, USA, 1993.

GANDINI, S.; MERZENICH, H.; ROBERTSON, C. et al. Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: The role of fruit and vegetables consumption and the intake of associated micronutrients. **European Journal of Cancer**, v.36, p.636-646, 2000.

GAROFALO, A.; AVESANI, C. M.; CAMARGO, K. G. et al. Diet and cancer: an epidemiological view. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n.4, p.491-505, out./dez, 2004.

GAUDET, M. M.; BRITTON, J. A.; KABAT, G. C. et al. Fruits, vegetables, and micronutrients in relation to breast cancer modified by menopause and hormone receptor status. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.13, n.9, p.1485-1494, 2004.

GREENWALD, P.; CLIFFORD, C. K.; MILNER, J. A. Diet and cancer prevention. **European Journal of Cancer**, v.37, n.8, p.948-965, 2001.

HARTMANN, L. C.; SELLERS, T. A.; FROST, M. H.; et al. Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, p.229-237, 2005.

HUGHES, D. A. Dietary antioxidants and human immune function. British Nutrition Foundation, **Nutrition Bulletin**, v. 25, p. 35-41, 2000.

HUGHES, D. A. Dietary carotenoids and human immune function. **Nutrition**, v.17, n.10, p.823-7, 2001.

HULTÉN, K.; KAPPEL, A. L. V. WINKVIST, A. Carotenoids, alpha-tocopherols, and retinol in plasma and breast cancer risk in northern Sweden. **Cancer Causes and Control**, v. 12, p. 529-537, 2001.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Dietary Reference Intakes: Recommended Intakes for Individuals. Estimated Average Requirements for Groups.** National Academy of Sciences. Food and Nutrition Board. Disponível em: <<http://www.iom.edu/Object.File/Master/21/372/0.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2009.

JELLIFFE, D. B. The assessment of the nutritional status of the community (with special reference to field surveys in developing regions of the world). **Monogr Ser World Health Organ**, v.53, p.3-271, 1966.

KAMANGAR, F. DORES, G. M.; ANDERSON, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: Defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **Journal of Clinical Oncology**, v.24, n.14, May 10, p.2137-2150, 2006.

KLINE, K.; YU, W.; SANDERS, B. G. Vitamin E: Mechanisms of action as tumor cell growth inhibitors. **Journal of Nutrition**, v.131, n.1, p.161S-163S, 2001.  
\_\_\_\_\_. Vitamin E and Breast Cancer. **Journal of Nutrition**. v. 134, p. 3458S–3462S, 2004.

KOHLMEIER, L.; KOHLMEIER, M. Adipose Tissue as a Medium for Epidemiologic Exposure Assessment. **Environmental Health Perspectives**, v. 103, 1995. Supl.3.

KOZŁOWSKI, L.; ZAKRZEWSKA, I.; TOKAJUK P. et al. Concentration of Interleukin-6 (Il-6), Interleukin-8 (Il-8) and Interleukin-10 (Il-10) in blood serum of breast cancer patients. **Annales Academiae Medicae Bialostocensis**, v. 48, p. 82-84, 2003.

LAMBE, M.; HSIEH, C. C.; CHAN, H. W.; et al. Parity, age at first and last birth, and risk of breast cancer: a population based study in Sweden. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 38, n. 3, p. 305-311, 1996.

LI, Y.; AMBROSONE, C. B.; MCCULLOUGH, M. J. et al. Oxidative stress related genotypes, fruit and vegetable consumption, and breast cancer risk. **Carcinogenesis**, v.30, n.5, p.777-784, 2009.

LLANES-FERNANDEZ, L.; ALVAREZ-GOYANES, R. I.; ARANGO-PRADO, M. C. et al. Relationship between IL-10 and tumor markers in breast cancer patients. **Breast**, v.15, n.4, p.482-489, 2006.

LLANES-FERNÁNDEZ, L.; ARANGO-PRADO, M. C.; ALCOCER-GONZÁLEZ, J. M. et al. Association between the expression of IL-10 and T cell activation proteins loss in early breast cancer patients. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.135, n.2, 2009. DOI 10.1007/s00432-008-0446-7.

MARCHBANKS, P. A.; MCDONALD, J. A.; WILSON, H. G.; et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 26, p. 2025-2032, 2002.

MILNE, R. L.; KNIGHT, J. A.; JOHN, E. M. et al. Oral Contraceptive Use and Risk of Early-Onset Breast Cancer in Carriers and Noncarriers of BRCA1 and BRCA2 Mutations. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 2, p. 350-356, 2005.

MONTEIRO, J.; ESTEVES, E. Software Diet PRO: Sistema de suporte à avaliação nutricional e prescrição de dietas. Versão 4.0. 2001. 1 CD ROM.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Oral Contraceptives and Cancer Risk: Questions and Answer**. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/oral-contraceptives>>. Acesso em: 14 jun. 2009.

NEPA/UNICAMP. **Tabela brasileira de composição de alimentos - TACO, versão 2**. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. Campinas. 2006.

NICOLINI, A.; CARPIB, A.; ROSSI, G. Cytokines in breast cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.17, p.325-337, 2006.

OLIVEIRA, R. C. **Avaliação dos fatores associados à neoplasia maligna da mama em mulheres atendidas no ambulatório de mastologia do hospital e maternidade Odete Valadares, Belo Horizonte - Minas Gerais. 2004**. 113 f Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Physical Status: The use and interpretation of anthropometry**. Technical report series, 854. OMS. Genebra. 1995.

OZMEN, V.; OZCINAR, B.; KARANLIK, H. et al. Breast cancer risk factors in Turkish women – a University Hospital based nested case control study. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 7 n. 37, *in press*, 2009.

PADILHA, P. D. C.; PINHEIRO, R. D. L. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.50, n.3, p.251-260, 2004.

PAIVA, C. E.; RIBEIRO, B. S.; GODINHO, A. et al. Fatores de Risco para Câncer de Mama em Juiz de Fora (MG): um estudo caso-controle. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 2, p. 231-236, 2002.

PHILIPPI, S. T. **Tabela de composição de alimentos: Suporte para decisão nutricional**. Brasília: Coronário. 2002. 107 p.

POLYAK, K. Breast cancer: Origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, v.117, n.11, p.3155-63, 2007.

PULASKI, B. A.; SMYTH, M. J.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Interferongamma-dependent phagocytic cells are a critical component of innate immunity against metastatic mammary carcinoma. **Cancer Research**, v. 62, p. 4406-4412, 2002.

RAO, V. S. R.; DYER, C. E.; JAMEEL, J. K. A. et al. Potential prognostic and therapeutic roles for cytokines in breast cancer (Review). **Oncology Reports**, v. 15, p. 179-185, 2006.

RAY, G.; HUSAIN, S. A. Role of lipids, lipoproteins and vitamins in women with breast cancer. **Clinical Biochemistry**, v.34, p.71-76, 2001.

REED, M. J.; PUROHIT, A. Breast Cancer and the Role of Cytokines in Regulating Estrogen Synthesis: An Emerging Hypothesis. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 5, p. 701-715, 1997.

SIMSEK, F.; MARTIN, R. Does Nulliparity Influence Estrogen Receptor Status Among Women with Breast Cancer? A North Carolina Pilot Study. SCHS Study. **State Center for Health Statistics**, p.1-6, 2000.

THULER, L. C. Considerações sobre a prevenção do câncer de mama feminino. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 4, p. 277-238, 2003.

UEDA, T.; IGARASHI, O. Determination of vitamin E in biological specimens and foods by HPLC - pretreatment of samples and extraction of tocopherols. **Journal of Micronutrient Analysis**, v. 7, n. 2, p. 79-96, 1990.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **USDA nutrient database for standard reference**. United States of America (Beltsville, Maryland), 2001.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.266, n.1-2, p.37-56, 2004.

WÄRRI, A. M.; SAARINEN, N. M.; MÄKELÄ, S. I. et al. Can modulation of mammary gland development by dietary factors support breast cancer prevention? **Hormone Research**, v.68, n.5, p.248-60, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on alcohol**. Geneva, 2004.

WILLET, W. C. **Nutritional Epidemiology**. New York: Oxford University Press. 1998. 514 p.

ZHANG, S.; HUNTER, D. J.; FORMAN, M. R. et al. Dietary carotenoids and vitamins A, C, and E and risk of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.91, n.6, p.547-556, 1999.

ZIOUZENKOVA, O.; ORASANU, G.; SUKHOVA, G. et al. Asymmetric cleavage of beta-carotene yields a transcriptional repressor of retinoid x receptor and peroxisome proliferator-activated receptor responses. **Molecular Endocrinology**, v.21, n.1, p.77-88, 2007.



## 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do reduzido número de pessoas avaliadas, importantes resultados foram observados em relação à fatores socioeconômicos, obstétricos, alimentar e do microambiente do tecido mamário.

Na a população estudada, a menor ingestão e conseqüente menor concentração tecidual de  $\alpha$ -tocoferol mostraram ser potenciais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama

Os resultados encontrados sugerem a existência de efeitos biológicos dos nutrientes sobre o sistema imunológico, o que foi revelado pela positiva e significativa associação encontrada entre o retinol tecidual e a IL-10. A maior concentração tecidual de mediadores pró-inflamatórios no grupo de mulheres com câncer de mama parece demonstrar que esta doença envolve a resposta imune na tentativa de eliminar as células cancerosas. Por outro lado, a maior expressão de IL-10, mediador anti-inflamatório, pode ser um mecanismo de proteção contra a ação exacerbada dos compostos pró-inflamatórios, ou ainda uma ferramenta utilizada pelas células cancerosas para estimular seu crescimento e proliferação.

Para o presente estudo, o fato de morar em zona rural é um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, assim como a menor renda *per capita*, história prévia de doença benigna da mama e nuliparidade revelaram-se como potenciais fatores. O uso de contraceptivo atuando como fator protetor pode ter sido mascarado pela menor renda e dificuldade de acesso aos serviços de saúde pelo grupo de mulheres com diagnóstico confirmado para o câncer de mama. A ocorrência da primeira gestação com idade igual ou superior a 30 anos mostrou ser fator independentemente associado à ocorrência de câncer de mama.

A compreensão do mecanismo molecular que leva à alteração tecidual é de grande importância para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e, principalmente, de procedimentos de que visem à prevenção da doença por meio da interação nutriente-sistema imunológico e os demais fatores associados. Neste contexto, sugere-se o desenvolvimento de estudos, com maior número de pessoas, voltados a esta temática com o intuito de melhor elucidar os potenciais fatores de risco e de proteção contra o câncer de mama, bem como os mecanismos envolvidos nesta ação, haja vista que na literatura científica não foram encontrados trabalhos que avaliassem este âmbito.

## 7 – ANEXOS

### Anexo I

#### Questionário de Avaliação dos Fatores de Risco para Câncer de Mama

Data da avaliação: \_\_\_\_\_ Número: \_\_\_\_\_

Prontuário: \_\_\_\_\_

#### A. IDENTIFICAÇÃO

1. Nome: \_\_\_\_\_

Identidade: \_\_\_\_\_ Órgão expedidor: \_\_\_\_\_

2. Idade: \_\_\_\_\_ Data Nascimento: \_\_\_\_\_

3. Residência atual: Rua: \_\_\_\_\_ N° \_\_\_\_\_

Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

Tempo de residência: \_\_\_\_\_ anos Zona: (U) Urbana (R) Rural

4. Residência anterior: Rua: \_\_\_\_\_ N° \_\_\_\_\_

Zona: (U) Urbana (R) Rural Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

5. Cidade do nascimento: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Zona: (U) Urbana (R) Rural Tempo de residência: \_\_\_\_\_ anos

6. Situação conjugal: (IBGE/2000)

- (1) Casada/ Consensual (2) Separada/Divorciada/Desquitada  
(3) Solteira (4) Viúva

7. Escolaridade: (IBGE/2000-INCA/2000)

- (1) Não alfabetizada  
(2) Alfabetizada/Alfabetização de adultos  
(3) Antigo primário incompleto/1 -3 série  
(4) Antigo primário incompleto/Elementar completo/1-4-série  
(5) Ginásio incompleto/5-7 série  
(6) Ginásio completo/5-8 série  
(7) Antigo clássico incompleto/Normal incompleto/Ensino médio incompleto  
(8) Antigo clássico completo/Normal completo/Ensino médio completo  
(9) Superior/Superior mestrado/Superior doutorado

8. Ocupação: \_\_\_\_\_

9. Renda líquida mensal: \_\_\_\_\_ 10. N° de membros da família: \_\_\_\_\_

#### B. HISTÓRIA CLÍNICA

1. História prévia de lesão benigna na mama? ( ) Sim ( ) Não
2. História familiar de câncer de mama? ( ) Não há casos  
( ) Sim há casos. Quem? ( ) Avó ( ) Mãe ( ) Tia ( ) Filha ( ) Irmã
3. História pessoal de diabetes? ( ) Sim ( ) Não
4. História pessoal de gota? ( ) Sim ( ) Não
5. História pessoal de Insuficiência renal?? ( ) Sim ( ) Não

#### C. HISTÓRIA GINECO-OBSTÉTRICA

1. Idade da menarca: \_\_\_\_\_

2. Idade da primeira gestação completa: \_\_\_\_\_

3. Número de gestações com filhos vivos: \_\_\_\_\_

4. Número de abortos: \_\_\_\_\_

5. Número de natimortos: \_\_\_\_\_

6. Já amamentou? ( ) SIM ( ) NÃO

Quanto tempo amamentou seus filhos? (OMS/1992)

Filho 1	( ) AME _____ meses ( ) AMP _____ meses ( ) AMEP _____ meses	Filho 2	( ) AME _____ meses ( ) AMP _____ meses ( ) AMEP _____ meses
Filho 3	( ) AME _____ meses ( ) AMP _____ meses ( ) AMEP _____ meses	Filho 4	( ) AME _____ meses ( ) AMP _____ meses ( ) AMEP _____ meses
Filho 5	( ) AME _____ meses ( ) AMP _____ meses ( ) AMEP _____ meses	Filho 6	( ) AME _____ meses ( ) AMP _____ meses ( ) AMEP _____ meses
Filho 7	( ) AME _____ meses ( ) AMP _____ meses ( ) AMEP _____ meses	Filho 8	( ) AME _____ meses ( ) AMP _____ meses ( ) AMEP _____ meses
Filho 9	( ) AME _____ meses ( ) AMP _____ meses ( ) AMEP _____ meses	Filho 10	( ) AME _____ meses ( ) AMP _____ meses ( ) AMEP _____ meses

7. Uso de contraceptivo hormonal: ( ) Oral ( ) Vaginal ( ) Adesivo ( ) Outro

Início: \_\_\_\_\_ Término: \_\_\_\_\_ Tempo: \_\_\_\_\_

8. Idade da menopausa: ( ) SIM \_\_\_\_\_ anos. ( ) NÃO

9. Causa da menopausa: ( ) Espontânea.  
( ) Radiação. ( ) Histerectomia ou retirada dos ovários.

10. Terapia de reposição hormonal:

( ) Sim ( ) Não

Nome comercial: \_\_\_\_\_ Tipo: (J) Conjugado (NJ) Não conjugado

Administração: (O) Oral (V) Vaginal (A) Adesivo ( ) Outro

Início: \_\_\_\_\_ Término: \_\_\_\_\_ Tempo: \_\_\_\_\_

11. Utiliza(ou) algum medicamento por longo prazo? ( ) SIM ( ) NÃO

Qual? \_\_\_\_\_ Indicação: \_\_\_\_\_

Início do uso: \_\_\_\_\_ Término do uso: \_\_\_\_\_

12. Já fez alguma mamografia?

(S) Sim (N) Não

Com que idade fez a primeira mamografia? \_\_\_\_\_ anos.

Quando foi a sua última mamografia? \_\_\_\_\_

Desde a primeira mamografia com que frequência fez as outras?

- (1 ) de 6 em 6 meses.
- (2 ) Anualmente.
- (3 ) 1 vez a cada 2 anos.
- (4 ) 1 vez a cada 3 anos.
- (5 ) 1 vez a cada 4-5 anos.
- (6 ) 1 vez a cada 6-10 anos.
- (7 ) fez menos frequentemente que a cada 10 anos.
- (8 ) Só fez uma vez.

**D.ATIVIDADE FÍSICA (AGITA/2002-INCA/2002)**

Em quantos dias da semana há pelo menos 10 minutos seguidos de atividade leve- aquela na qual não há aumento dos batimentos cardíacos? \_\_\_\_\_

Quanto tempo gasta se exercitando? \_\_\_\_\_

Em quantos dias da semana há pelo menos 10 minutos seguidos de atividade moderada e intensa- aquela na qual há aumento dos batimentos cardíacos? \_\_\_\_\_

Quanto tempo gasta se exercitando? \_\_\_\_\_

**E.ANTROPOMETRIA**

Peso atual: \_\_\_\_\_

Peso usual: \_\_\_\_\_

Altura: \_\_\_\_\_

IMC: \_\_\_\_\_

%GC: \_\_\_\_\_

Peso aos 18 anos: \_\_\_\_\_

IMC aos 18 anos: \_\_\_\_\_

Circunferência cintura: \_\_\_\_\_

Circunferência quadril: \_\_\_\_\_

Ganho de peso? ( ) SIM ( ) NÃO Quantos quilos? \_\_\_\_\_ Quando? \_\_\_\_\_

Perda de peso? ( ) SIM ( ) NÃO Quantos quilos? \_\_\_\_\_ Quando? \_\_\_\_\_

**F.BEBIDAS ALCOÓLICAS**

( ) Sim ( ) Não ( ) Já utilizou.

Bebida	Início	Término	Tempo	Quantidade/Recipiente	Frequência	
Pinga				( ) copo ( ) garrafa	( ) dia ( ) sem. ( ) mês	
Cerveja				( ) copo ( ) garrafa ( ) lata	( ) dia ( ) sem. ( ) mês	
Martini				( ) copo ( ) garrafa	( ) dia ( ) sem. ( ) mês	
Campani				( ) copo ( ) garrafa	( ) dia ( ) sem. ( ) mês	
Vinho				( ) copo ( ) garrafa	( ) dia ( ) sem. ( ) mês	
Outros				( ) copo ( ) garrafa	( ) dia ( ) sem. ( ) mês	

**G.FUMA?** ( ) Sim ( ) Não Tempo? \_\_\_\_\_

Cigarros/dia? \_\_\_\_\_ Tipo cigarro: ( ) Filtro ( ) sem filtro ( ) Fumo/rolo

Já fumou? ( ) Sim ( ) Não Início: \_\_\_\_\_ Término: \_\_\_\_\_

Cigarros/dia? \_\_\_\_\_ Tipo cigarro: ( ) Filtro ( ) sem filtro ( ) Fumo/rolo

## Anexo II

### Questionário Semiquantitativo de Frequência Alimentar

Alimentos <i>VEGETAIS FOLHOSOS</i>	QUANTIDADE MEDIDAS CASEIRAS	FREQÜÊNCIA		MENSAL	NUNCA OU RARAMENTE	Observações
		DIÁRIA	SEMANAL			
Alface						Produto que adicionava nas saladas: <input type="checkbox"/> maionese <input type="checkbox"/> azeite <input type="checkbox"/> sal <input type="checkbox"/> óleo <input type="checkbox"/> limão <input type="checkbox"/> vinagre
Almeirão cru						
Almeirão refogado						
Agrião cru						
Acelga ( ) crua ( ) refogada						
Couve crua						
Couve refogada						
Espinafre ( ) cru ( ) refogado						
Mostrada ( ) crua ( ) refogada						
Orapronóbis						
Repolho cru						
Repolho refogado						
Taioba refogada						
Cheiro verde						
<i>VEGETAIS B e C</i>	<b>MEDIDAS CASEIRAS</b>	<b>DIÁRIA</b>	<b>SEMANAL</b>	<b>QUINZENAL</b>	<b>MENSAL</b>	
Abobrinha						●Quando cozinhava os legumes o que fazia com a água de cocção? <input type="checkbox"/> descartava <input type="checkbox"/> aproveitava ●Ingeriu algum suplemento alimentar? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Qual? _____
Batata barôa						
Batata doce						
Batata inglesa cozida						
Batata inglesa frita						
Mandioca cozida						
Mandioca frita						
Purê de batatas						
Couve flor cozida						
Brócolis						

Cenoura crua  
 Cenoura cozida  
 Beterraba crua  
 Beterraba cozida  
 Chuchu refogado  
 Vagem  
 Quiabo  
 Berinjela frita  
 Berinjela cozida  
 Pepino  
 Tomate  
 Moranga  
 Jiló

●Comia mais vegetais :  
 cozidos  
 refogados.  
 fritos

<i>CARNES EM GERAL</i>	MEDIDAS CASEIRAS	DIÁRIA	SEMANAL	QUINZENAL	MENSAL	NUNCA OU RARAMENTE
Bacon						
Costelinha suína						
Frango assado						
Frango frito						
Carne bovina cozida						
Carne bovina grelhada						
Carne bovina frita						
Carne bovina moída						
Carne suína cozida						
Carne suína grelhada						
Carne suína frita						
Torresmo						
Peixe frito						
Peixe ensopado						
Peixe empanado						
Lingüiça <input type="checkbox"/> suína <input type="checkbox"/> frango						
Hamburguer / Steak / Nuggets						
Almôndega <input type="checkbox"/> bovina <input type="checkbox"/>						

●Costumava comprar carne com gordura? :  
 Sim  Não

●Costumava retirar a gordura da carne para comer? :  
 Sim  Não

●Costumava retirar a pele para comer? :  
 Sim  Não

●Com que frequência frequentava churrascos? :  
 VEZES  mês  trim  rara// nunca

frango  
 Salame  
 Mortadela/Pres./Apresuntado  
 Miúdo fígado ( ) boi ( )  
 frango  
 Miúdos moela  
 Miúdos coração ( ) boi ( )  
 frango  
 Sardinha enlatada ( ) c/ ( ) s/  
 óleo  
 Atum sem óleo ( ) c/ ( ) s/  
 óleo  
 Salsicha hot dog  
 Ovo de galinha frito  
 Ovo de galinha cozido  
 Omelete  
 Chouriço

●Acondicionava as carnes coccionadas em latas de gordura? ( ) sim ( ) não

**LEITE E DERIVADOS**

**MEDIDAS CASEIRAS**

**DIÁRIA SEMANAL QUINZENAL MENSAL NUNCA OU RARAMENTE**

Leite integral  
 Leite desnatado  
 Iogurte/Coalhada  
 Extrato solúvel de soja  
 Queijo minas frescal  
 Queijo prato/mussarela  
 Requeijão cremoso

●Costumava retirar a nata do leite para beber? :  
 ( ) Sim ( ) Não

**LIPÍDIOS**

**MEDIDAS CASEIRAS**

**DIÁRIA SEMANAL QUINZENAL MENSAL NUNCA OU RARAMENTE**

Margarina ( ) comum ( )  
 light ( ) c/ ( ) s/ sal  
 Manteiga ( ) c/ ( ) s/ sal  
 Nata

Produto utilizado na cocção?:  
 ( )óleo( )gordura( )banha( )gordura hidrogenada

**LEGUMINOSAS**

**MEDIDAS CASEIRAS**

**DIÁRIA SEMANAL QUINZENAL MENSAL NUNCA OU RARAMENTE**

Feijão simples  
 Feijoada  
 Soja cozida

Ervilha enlatada  
Ervilha vagem/lentilha/grão de bico

Amendoim

**SALGADINHOS E OUTROS INDUSTRIALIZADOS**

**MEDIDAS CASEIRAS**

**DIÁRIA SEMANAL**

**QUINZENAL**

**MENSAL**

**NUNCA OU RARAMENTE**

Coxinha frita

Pastel frito

Quibe frito

Empadinha assada

Pizza

Pipoca

Chip's ( batatas e outros)

Sopa industrializada

Achocolatado

Cafê

Chá mate

Chá preto

Chá verde

Refrigerante

Molho inglês

Molho soja( Shoyo)

Molho pimenta

Ketchup

Mostarda

**PÃES E SIMILARES**

**MEDIDAS CASEIRAS**

**DIÁRIA SEMANAL**

**QUINZENAL**

**MENSAL**

**NUNCA OU RARAMENTE**

Biscoito de polvilho frito

Biscoito de polvilho assado

Biscoito papa ovo

Biscoito de nata

Biscoito amanteigado

Biscoito recheado industrial

Biscoito água e sal

Biscoito doce

Pão francês

Pão de forma



Pão integral  
 Pão de queijo  
 Bolo simples  
 Broa de fubá

**CEREAIS E FARNACEOS**

**MEDIDAS  
 CASEIRAS**

**DIÁRIA**

**SEMANAL**

**QUINZENAL**

**MENSAL**

**NUNCA OU  
 RARAMENTE**

Arroz cozido  
 Angu  
 Macarrão  
 Farinha de mandioca  
 Farinha de milho  
 Canjiquinha  
 Bambá de couve

**SOBREMESA**

**MEDIDAS  
 CASEIRAS**

**DIÁRIA**

**SEMANAL**

**QUINZENAL**

**MENSAL**

**NUNCA OU  
 RARAMENTE**

Cajuzinho  
 Gelatina  
 Pudim  
 Doce de leite em pasta  
 Chocolate/Bombons  
 Goiabada  
 Doce de fruta  
 Balas/pirulitos/chicletes  
 Ambrosia/quindim  
 Sorvete

**FRUTA A,B,C**

**MEDIDAS  
 CASEIRAS**

**DIÁRIA**

**SEMANAL**

**QUINZENAL**

**MENSAL**

**NUNCA OU  
 RARAMENTE**

Abacate  
 Abacaxi  
 Banana  
 Castanha  
 Laranja  
 Maçã  
 Mamão  
 Melão  
 Manga  
 Uva

Utiliza adoçante? ( ) Sim ( ) Não  
 Marca: \_\_\_\_\_

<i>SUCOS</i>			<b>MEDIDAS CASEIRAS</b>	<b>DIÁRIA</b>	<b>SEMANAL</b>	<b>QUINZENAL</b>	<b>MENSAL</b>	<b>NUNCA OU RARAMENTE</b>
Suco	natural	sabor						
Suco	industrializado	sabor						
Suco pó sabor	_____							

**CONSUMO FAMILIAR MENSAL OU SEMANAL**

<b>ALIMENTO</b>	<b>QUANTIDADE</b>		<b>Nº pessoas q consomem</b>	<b>Consumo individual</b>
	<b>Mensal</b>	<b>Semanal</b>		
1.Leite condensado				
2.Creme de leite				
3. Maionese				
4.Açúcar				
5.Óleo de _____				
6.Gordura hidrogenada/banha				
7.Azeite				
8.Alho				
9.cebola				
10.Caldo Knorr/Arisco				
11.Pasta de alho e sal				
12.Sal				

Somatório dos alimentos cozidos (+ 1mL óleo): \_\_\_\_\_

Somatório dos alimentos fritos (+ 2mL óleo): \_\_\_\_\_

Total de óleo adicionado: \_\_\_\_\_

Número de pessoas que fazem a maior parte das refeições em casa? \_\_\_\_\_

Mudança nos hábitos alimentares nos últimos 5 anos? ( ) SIM ( ) Não

Motivo ( em caso afirmativo): \_\_\_\_\_

### Anexo III

Critérios de estadiamento patológico para o câncer de mama (TNM).

<b>Tumor</b>	
Tumor <i>in situ</i>	pTis
≤ 2 cm	pT1
≤ 1 mm	pT1 mic
Até 0,5 cm	pT1a
0,5 a 1,0 cm	pT1b
1 a 2 cm	pT1c
> 2 a 5 cm	pT2
> 5 cm	pT3
Invadir pele ou músculo ou for carcinoma inflamatório	pT4 (T4a - invade parede torácica, T4b-pele, T4c-ambos, T4d-inflamatório).
<b>Linfonodo</b>	
0 Linfonodos	pN0
Micrometástase, > 0,2 mm e ≤ 2 mm	pN1mi
1 a 3 linfonodos axilares	pN1a
Linfonodos mamários internos com metástase microscópica por biópsia de linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente.	pN1b
1 a 3 linfonodos axilares mamários internos com metástase microscópica por biópsia de linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente.	pN1c
4 a 9 linfonodos axilares	pN2a
Linfonodos mamários internos, clinicamente aparentes, sem linfonodos axilares	pN2b
≥ 10 linfonodos axilares ou infra-claviculares	pN3a
Linfonodos mamários internos, clinicamente aparentes, com linfonodos axilares e mamários internos com metástase microscópica por biópsia de linfonodos sentinela, mas não clinicamente aparente.	pN3b
Linfonodos supra-claviculares	pN3c
<b>Metástase</b>	
Sem metástase à distância	M0
Com metástase à distância	M1

Fonte: Greene et al. (2002).

## Anexo IV

Agrupamento por estádios.

<b>Estádio 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Estádio 1</b>	T1	N0	M0
<b>Estádio II A</b>	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
<b>Estádio II B</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
<b>Estádio III A</b>	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1, N2	M0
<b>Estádio III B</b>	Qualquer T	N3	M0
<b>Estádio III C</b>	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Greene et al. (2002).

## Anexo V

Quantidade de álcool (g) presente nas principais bebidas.

<b>Bebida</b>	<b>Quantidade (mL)</b>	<b>Álcool v/v (%)</b>	<b>Média de álcool (g)<sup>a</sup></b>
Cerveja	350	4 a 6	13
Vinho branco/tinto	100	13 a 15	10
Gim, Rum, Vodka	45	35 a 45	16
Aguardente	45	30 a 38	12
Uísque	45	40 a 45	16
Licores	30	20 a 40	7

Fonte: (WHO, 2001; WHO, 2004).

<sup>a</sup>Fórmula para cálculo de gramas de álcool: volume (mL) x concentração v/v x 0,79

## Anexo VI

Sequência dos “primers” e propriedades de reação.

Gene	Seqüências Sense e Anti-sense	tA (°C) <sup>1</sup>	tM (°C) <sup>2</sup>	pb <sup>3</sup>
B-actina	ATGTTTGAGACCTTCAACA CACGTCAGACTTCATGATGG	56	75	495
IFN- $\gamma$	ATGAAATATACAAGTTATATCATG TGTTTCGAGGTCGAAGAGCATCCC	58	77	501
IL-8	GCAGCTCTGTGTGAAGGTGCAG CTGTTGTAGGGTTGCCAGATGC	57	68	366
IL-10	AGATCTCCGAGATGCCTTCA CCGTGGAGCAGGTGAAGAAT	58	85	307

<sup>1</sup> Temperatura de anelamento

<sup>2</sup> Temperatura de melting

<sup>3</sup> Pares de base

**Anexo VII**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

MATERNIDADE ODETE VALADARES

1- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL  
LEGAL:

NOME DO PACIENTE: \_\_\_\_\_

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: \_\_\_\_\_ ÓRGÃO EXPEDIDOR: \_\_\_\_\_

SEXO: \_\_\_\_\_ DATA NASCIMENTO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

BAIRRO: \_\_\_\_\_ CIDADE: \_\_\_\_\_

TELEFONE: ( ) \_\_\_\_\_

RESPONSÁVEL LEGAL: \_\_\_\_\_

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc): \_\_\_\_\_

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: \_\_\_\_\_ ÓRGÃO EXPEDIDOR: \_\_\_\_\_

SEXO: \_\_\_\_\_ DATA NASCIMENTO: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## 2- DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

TÍTULO DO PROJETO: CORRELAÇÃO ENTRE FATORES DIETÉTICOS, CLÍNICOS E GENÉTICOS E A OCORRÊNCIA DE CÂNCER DE MAMA EM MULHERES ATENDIDAS EM SERVIÇO PÚBLICO DE MAMOGRAFIA EM BELO HORIZONTE, MG.

COORDENADORA: PROFESSORA RENATA NASCIMENTO DE FREITAS / ESCOLA DE NUTRIÇÃO / UFOP

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MÍNIMO

DURAÇÃO DA PESQUISA: 18 MESES



### 3- REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA:

A pesquisa que a senhora está sendo convidada a participar tem como objetivos investigar os fatores da dieta, da composição corporal e genéticos que fazem com que uma mulher tenha mais ou menos chances de desenvolver câncer de mama.

Nesta pesquisa cada participante deverá responder a um questionário, que será aplicado pela equipe no dia da consulta no hospital. De cada participante serão também tomadas medidas de peso, altura, circunferência da cintura, circunferência do quadril e das dobras de gordura subcutânea. Se por acaso, a senhora for submetida à cirurgia ou a biópsia para diagnóstico ou tratamento, serão coletadas uma amostra de sangue (10 mL) e uma amostra de gordura da mama (0,5 a 1,0 g) retirada normalmente nestes procedimentos. O sangue e a amostra de gordura serão enviados para o Laboratório de Epidemiologia Molecular da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto para extração de DNA (material genético) e análises bioquímicas. No DNA serão pesquisados os genes da *MTHFR*, *TYMS*, *MTR*, *APOE*, *LDL-R*, *PPAR* e *FAS*. Estes genes estão relacionados ao metabolismo de gorduras e de ácido fólico (uma vitamina) que são consumidos na dieta. Existem evidências de que alguns tipos de gorduras e o ácido fólico da dieta possam estar associados com o risco de câncer de mama e é isto que queremos pesquisar. Na gordura da mama serão pesquisados os tipos de ácidos graxos (constituintes das gorduras) presentes. A partir da análise dos resultados destes dados é que pesquisaremos que características podem influenciar no desenvolvimento do câncer de mama. O material coletado para este estudo receberá um código e apenas a professora Renata Nascimento de Freitas da Universidade Federal de Ouro Preto saberá a origem do mesmo.

Este material será utilizado apenas para os estudos descritos acima e ao final, será descartado. Em nenhum momento desse estudo, as pessoas que estarão trabalhando com este material saberão que é seu, garantindo o sigilo de seus dados. Nenhuma outra pessoa ou instituição, que não aquelas envolvidas no presente projeto, terá acesso aos questionários ou dados individuais gerados por esta pesquisa. Os resultados deste trabalho serão publicados apenas em veículos de divulgação científica (revistas especializadas e congressos) garantindo-se o anonimato dos participantes. Sua participação ou não neste estudo não influenciará de nenhuma forma no tipo e na qualidade do atendimento médico que você está recebendo ou poderá receber no futuro. Você poderá solicitar aos pesquisadores, a qualquer momento, o seu desligamento do estudo e a retirada dos seus dados.

Você poderá ter conhecimento, se quiser e no momento que desejar, dos resultados da avaliação nutricional e das análises bioquímicas e genéticas. Se necessário e se for de seu interesse, nossa

equipe agendará uma consulta para que a senhora receba aconselhamento genético e aconselhamento nutricional.

É através deste tipo de pesquisa e da divulgação dos resultados, que esperamos poder aumentar nosso conhecimento sobre os fatores que aumentam ou diminuem os riscos de desenvolvimento de câncer de mama. Sua participação poderá ajudar a melhorar os conhecimentos necessários para melhor orientar programas de prevenção que poderão contribuir para diminuir a ocorrência deste câncer que é o que mais mata mulheres em todo mundo.

Caso a senhora queira se informar de mais detalhes sobre a pesquisa agora, ou no futuro, poderá entrar em contato com a Profa. Renata N. Freitas na Escola de Nutrição da UFOP pelo telefone (31) 3559 1838 ou por ligação gratuita para o telefone 9 031 31 3552 0121 por e-mail: [rfreitas@enut.ufop.br](mailto:rfreitas@enut.ufop.br) . Obrigada!

#### 4- ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas.

Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Acesso a qualquer tempo aos resultados desta pesquisa com aconselhamento genético e/ou nutricional se necessário.

Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

## 5- CONSENTIMENTO PÓS – ESCLARECIMENTO

Declaro que, após convenientemente esclarecida pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do protocolo da pesquisa acima especificado.

Belo Horizonte,        de                    de 2006 .

Assinatura do sujeito da pesquisa ou representante legal.

Assinatura do pesquisador (carimbo ou nome legível)

## DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa intitulado “**Correlação entre fatores dietéticos, clínicos e genéticos e a ocorrência de câncer de mama em mulheres atendidas pelo Serviço de Mastologia da Maternidade Odete Valadares em Belo Horizonte, MG**”, sob responsabilidade da pesquisadora professora Renata Nascimento de Freitas, da Universidade Federal de Ouro Preto, foi **analisado e aprovado** pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (CEP/FHEMIG), no dia 14 de julho de 2005, conforme parecer nº 310, e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (CONEP/CNS/MS), no dia 29 de novembro de 2005, conforme parecer nº 1889/2005.

Belo Horizonte, 02 de fevereiro de 2007.

  
**Dr. Robespierre Queiroz da Costa Ribeiro**  
Coordenador do CEP-FHEMIG