

TEREZA CRISTINA SAMICO CAVALCANTE

Este exemplar corresponde a redação final da Tese  
defendida por Tereza C.S. Cavalcante e  
aprovada pela Comissão Julgadora  
Campinas 14.04.1986  
Quivo S. [assinatura]

EFEITO DO 7,12-DIMETILBENZANTRACENO (DMBA) E DE DIETAS LIPÍDICAS  
SOBRE A ATIVIDADE DA ATPase MITOCONDRIAL E A COMPOSIÇÃO DOS ÁCI-  
DOS GRAXOS DOS LIPÍDIOS DE MITOCÔNDRIAS DO TECIDO MAMÁRIO DE RA-  
TAS.

Tese apresentada ao Instituto de Bio-  
logia da Universidade Estadual de  
Campinas, para a obtenção do Título  
de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. QUIVO SCHWARTZBURD TAHIN

CAMPINAS

1986

" Imagine there's no country  
It isn't hard to do  
Nothing to kill or die for  
And no religion too  
Imagine all the people  
Living life in peace ... " (J.Lennon)

A Elias José e Maria Iêda, meus pais ,  
pela transmissão dos princípios de dedica  
ção, honestidade e respeito.

Ao Romário, Rafael, Carolina, Thiago Mel  
lo e Letícia, minha família, pelos sa-  
crifícios que passaram no desenvolviment  
o deste trabalho.

Ao Prof.Dr.Quivo Schwartzburd Tahin pe-  
la orientação e principalmente pela ami-  
zade que tem sempre me dedicado.

Ao Fernando Guimarães pela esperança de  
continuação deste trabalho.

In Memoriam de Antônio Carlos Corsini,  
Belmiro de Araujo Mello, José Maurício  
Rosa e Terezinha de Lourdes Piovezana, a  
migos que deixaram saudades.

## AGRADECIMENTOS

- Ao Prof.Dr.Luis Sebastião Prigenzi por ter permitido que parte deste trabalho fosse desenvolvido no Departamento de Patologia Clínica da FCM.
- Ao Prof.Dr.João Feijão da Seção de Fitoquímica do Instituto Agronômico de Campinas por ter cedido os instrumentos para as esterificações dos ácidos graxos.
- Ao Prof.Dr.Emílio Segundo Contreras Guzmán pela ajuda na fabricação do óleo de sardinha.
- Ao Prof.Dr.Paulo Arruda do Departamento de Genética do Instituto de Biologia da UNICAMP pelo empréstimo do cromatógrafo.
- Ao Prof.Dr.Daniel Barrera Arellano pela ajuda na preparação da emulsão de DMBA.
- Ao médico-patologista Marcelo Alvarenga pelas análises anátomo-patológicas deste trabalho.
- Ao Prof.Dr.Armando Mâncio de Camargo por ter cedido o Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da UNICAMP, bem como pela participação na inoculação e cirurgia dos animais de experimentação.
- Aos Profs.Drs.Armando Mâncio Camargo, Avelino Rodrigues de Oliveira, Carlos Roberto Douglas Rodrigues, Débora Tavares, Edson Rosa Pimentel e Regina Pisani pelas sugestões e correções feitas a este trabalho.
- À Profª Dra.Shirlei Maria Recco Pimentel pelas sugestões nas análises estatísticas.
- Aos amigos Célia Garlipp, Clara Tahin, Fátima Alves, Humberto Santo Neto, José Oscar Gaspar, Laudenir Priolli, Luís Previero Neto, Maria Aparecida Cropanisi, Moacir Francisco da Silva, Ronilson Moreno, Silvio Margarido, Waldir Murari e Zélia



de Faria pelo incentivo constante no desenvolvimento deste trabalho.

- À Maria Teresa Bueno pela dedicação no trabalho datilográfico.
- À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pela ajuda dispensada a este trabalho.
- Ao CECAN/CAISM pelo apoio dado a este trabalho.

## ÍNDICE

	Páginas
ABREVIACÕES, SINAIS E SIGLAS .....	I-II
1. INTRODUÇÃO .....	01-02
2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1. A glândula mamária .....	03-04
2.2. O 7,12-dimetilbenzantraceno ou DMBA .....	04-08
2.3. Breve histórico sobre as teorias e fatores envolvidos nas neoplasias malignas .....	08-11
2.4. A indução de neoplasias .....	11-12
2.5. Mitocôndria .....	12-15
2.6. Fatores Nutricionais .....	15-17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Animais .....	18
3.2. Inoculação e tratamento .....	19
3.3. Preparação da emulsão de DMBA e da emulsão placebo .....	19
3.4. PREPARAÇÃO DA DIETA SEMI-SINTÉTICAS E ISOCA LÓRICAS	
3.4.1. Obtenção do óleo de sardinha .....	19-20
3.4.2. Preparação das dietas .....	20
3.5. Amostras teciduais para os estudos histoló- gicos .....	20-21
3.6. Obtenção das mitocôndrias do tecido mamário ..	21-22
3.7. Dosagem de proteínas .....	22
3.8. Dosagem da atividade específica de ATPase mi- tocondrial do tecido mamário de ratas .....	22
3.9. Dosagem do fósforo inorgânico .....	23
3.10. Extração dos lipídios das mitocôndrias do te- cido mamário de ratas .....	23-24
3.11. Preparação dos metil-ésteres dos ácidos gra- xos dos lipídios mitocondriais .....	24
3.12. Análise cromatográfica dos metil-ésteres dos ácidos graxos dos lipídios mitocondriais do tecido mamário .....	24-25
3.13. Análise estatística .....	25
4. RESULTADOS	
4.1. Ingestão das dietas e peso corpóreo .....	33-46
4.2. Análises histológicas .....	47-54

4.3. Atividade específica da ATPase mitocondrial do tecido mamário de ratas controles ou tratadas com DMBA .....	55-62
4.4. Comparação da atividade específica da ATPase mitocondrial do tecido mamário de ratas controles ou tratadas com DMBA, alimentadas com a dieta óleo de semente de girassol ou com dieta óleo de sardinha após 30 ou 63 dias ...	63-65
4.5. Análise da composição percentual dos ácidos graxos dos lipídios mitocondriais do tecido mamário de ratas controles ou tratadas com DMBA, alimentadas com a dieta óleo de semente de girassol ou dieta óleo de sardinha após 30 ou 63 dias .....	66-72
4.6. Estudo comparativo da incorporação dos ácidos graxos nos lipídios mitocondriais do tecido mamário de ratas controles e tratadas com DMBA, alimentadas com a dieta óleo de semente de girassol ou óleo de sardinha após 30 ou 63 dias .....	72-73
5. DISCUSSÃO .....	88-92
6. CONCLUSÕES .....	93-94
7. RESUMO .....	95-96
8. SUMMARY .....	97-98
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	99-122

## ABREVIACÕES, SINAIS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
A.E.	Atividade específica
AG	cido graxo
AGMI	cido graxo monoinsaturado
AGPIIn-3	cido graxo poliinsaturado n-3
AGPIIn-6	cido graxo poliinsaturado n-6
AGS	cido graxo saturado
amps	Ampres
ANS	cido 1,2,4-aminonaftolsulfnico
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
B.M.	Banho-maria
BSA	Soro albumina bovina
cm	Centímetro
DEGS	Dietileno-glicol-succinato
DMBA	7,12-dimetilbenzantraceno
DNA	cido desoxirribonucléico
EDTA	cido etilendiaminotetraactico
g	Grama
G.L.	Grau de liberdade
HAN	Hiperplasia alveolar nodular
HCL	cido clorídrico
H.E.	Hematoxilina-eosina
HEB	Hiperplasia ductal terminal
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina-N <sup>1</sup> -2-etanessulfnico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	cido sulfúrico
<b>I.N.</b>	Infranadante
i.p.	Intraperitoneal
Kcal	Quilocaloria
Kg	Quilo
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis-Menten
KOH	Hidróxido de potássio
l	Litro
ml	Militro
mm	Milimolar
mg	Miligrama
Mg <sup>2+</sup>	Magnésio

MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MS	Solução manitol-sacarose
MSE	Solução manitol-sacarose EDTA
mv	Milivolt
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sódio
NH <sub>4</sub> Cl	Cloreto de amônio
nm	Nanômetro
N.S.	Estatisticamente não significativo
Pi	Fósforo inorgânico
ppt	Precipitado
rpm	Rotações por minuto
S.N.	Sobrenadante
t	Teste t de Student
TCA	Ácido tricloroacético
T.R.	Tempo de retenção
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
µl	Microlito
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
vol	Volumes
V <sub>max</sub>	Velocidade máxima
λ	Lambda (comprimento de luz)
"	Polegada
~	Aproximadamente

## 1. INTRODUÇÃO

O 7,12-dimetilbezantraceno (DMBA) é um hidrocarbó-neto policíclico, que apresenta propriedades pró-carcinogênicas e pró-mutagênicas bem conhecidas (MILLER,1978). Tem ainda um po-der teratogênico e aterogênico (CURRIE et alii,1970), alto grau de citotoxicidade "in vivo", particularmente na adrenal e no cére-bro de fetos, bem como em células cultivadas "in vitro" (DIGIO-VANNI E JUCHAU,1980). Tem sido usado por várias décadas como a-gente indutor de processos carcinogênicos em animais de labora-tório, principalmente como indutor do câncer mamário (HUGGINS et alii, 1961).

Sabe-se que dietas ricas em lipídios, podem desen-volver certas patologias como as doenças cardiovasculares (DYER-BERG et alii,1978; RENAUD et alii,1979; SANDERS et alii,1978 e JAKUBOWSKI & ARDLIE,1978), diabetes mellitus e obesidade ( VER-GROESEN,1977), distúrbios na resposta imunológica e hiperplasia esplênica (BOISSONNEAUT & JOHNSTON, 1983 e LOCNISKAR et alii , 1983).

Estudos recentes têm demonstrado que a ação carcinogênica do DMBA no tecido mamário é dependente do fator dietário lipídico (CARROLL & KHOR, 1970; CARROLL & KHOR, 1971 e DAYTON et alii, 1977), e que este aumenta a incidência do câncer mamário espontâneo em humanos e em animais de laboratório (CARROLL & DAVIDSON, 1982).

Os lipídios ingeridos alteram a composição dos ácidos graxos de todos os tecidos e mesmo das organelas celulares, não só de humanos como de animais de laboratório (TAHIN et alii, 1981 e TAHIN, 1985).

Os ácidos graxos que existem nas células dos tecidos dos mamíferos e de outros animais superiores e inferiores, bem como dos vegetais, pertencem a quatro famílias distintas (TAHIN, 1985). A família dos ácidos graxos saturados (AGS), a dos ácidos graxos monoinsaturados n-9 (AGMI n-9) ou do ácido oléico (18:1 n-9), a dos ácidos graxos poliinsaturados n-6 (AGPI n-6) ou do ácido linoléico (18:2 n-6) e a dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3) ou do ácido linolênico (18:3 n-3) (MARKLEY, 1969). Existem evidências que mostram o antagonismo entre as famílias dos ácidos graxos poliinsaturados não apenas nos seus papéis biológicos e patológicos, como também nos seus processos metabólicos (BRENNER, 1969; SCHRIYVER & PRIVETT, 1982 e TAHIN, 1985).

Os lipídios têm papel essencial em vários processos membrana-dependentes, como a atividade da ATPase mitocondrial (KAGAWA & RACKER, 1966), o transporte de cálcio através da membrana mitocondrial que é dependente da composição dos ácidos graxos que esterificam os fosfolipídeos estruturais das membranas desta organela (TAHIN et alii, 1980), entre outros.

Possuindo o DMBA a capacidade de induzir neoplasias no tecido mamário, sabendo-se que estas são dependentes da dieta lipídica, que a atividade da ATPase mitocondrial é também dependente do conteúdo lipídico da membrana interna da organela e que esta atividade encontra-se alterada nas suas propriedades e na quantidade em alguns tipos de neoplasias (MELNICK et alii, 1977), este trabalho teve como objetivo o estudo comparativo das primeiras alterações morfológicas e bioquímicas (atividade da ATPase mitocondrial e conteúdo dos ácidos graxos das mitocôndrias) do tecido mamário de ratas Sprague-Dawley virgens com 50-60 dias de vida, inoculadas intraperitonealmente com uma dose única de DMBA (20mg/ml) e alimentadas com dietas lipídicas antagônicas (óleo de semente de girassol ou óleo de sardinha), observadas após 30 ou 63 dias de experimento.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. A GLÂNDULA MAMÁRIA

A mama é uma glândula tubuloalveolar, existente na classe Mammalia, de origem subcutânea com função nutricional dependente de estímulo interno (hormonal) e externo (sucção), que se desenvolve ao longo do cordão mamário, desde a axila até a virilha, em ambos os lados da linha média ventral do tórax e abdômen (BLOOM & FAWCETT, 1977). O número de glândulas varia com a espécie e cada mama é formada por um epitélio glandular suspenso em tecido conectivo subcutâneo, envolvido por tecido adiposo, apresentando um sistema de ductos coletores que terminam nos mamilos, os quais se abrem na superfície da pele (PITELKA, 1977 e KUZMA, 1971). Esta glândula é ainda formada por lobos irregulares de distribuição radial a partir do mamilo, que se subdividem em lóbulos (unidade secretora da glândula) de vários tamanhos, sendo que os menores são formados por túbulos alongados (ducto alveolar), recobertos por pequenas evaginações saculares (alvéo



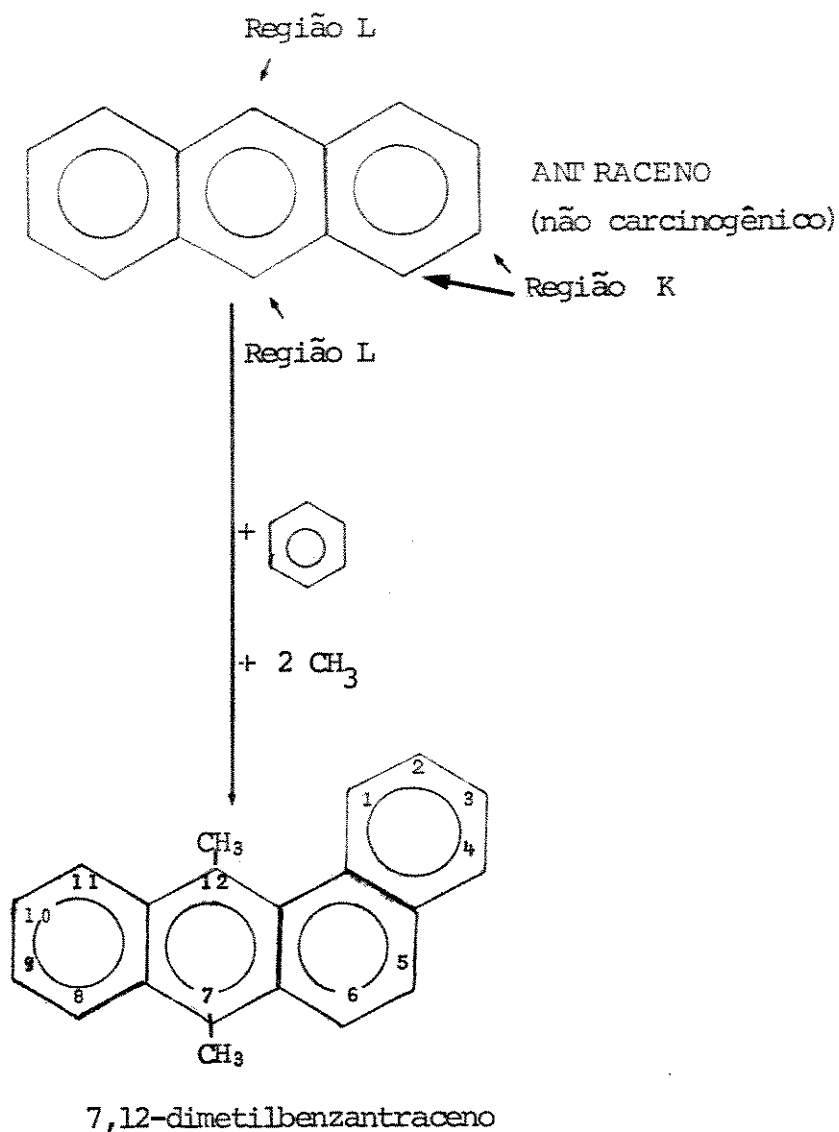
los) (**BLOOM & FAWCETT**,1977 e **PITELKA**,1977).

## 2.2. O 7,12-DIMETILBENZANTRACENO OU DMBA

Os carcinógenos químicos diferem da maioria dos outros agentes ambientais e farmacológicos por terem uma ação usualmente irreversível, por apresentar efeitos sinérgicos com os fatores ambientais (carcinogênicos ou não carcinogênicos), por atuar de maneira cumulativa, mesmo em dose única embora as vezes não apresentem efeitos detectáveis e finalmente por ter um mecanismo de ação, particularmente com respeito a interação com os elementos genéticos do hospedeiro, distinto da grande maioria dos outros agentes farmacológicos. Segundo este mesmo autor, os carcinógenos químicos são divididos em primários (substância que para agirem não necessitam ativação metabólica), pro-carcinógenos (substâncias que requerem ativação metabólica) e co-carcinógenos (substâncias que potencializam a ação do carcinógeno ou do pro-carcinógeno).

O DMBA é um dos mais potentes pro-carcinógenos sintéticos conhecidos. Sua estrutura química é derivada do antraceno (que por si só não tem ação pro-carcinogênica), mas a adição do núcleo benzênico, a região K e a adição de dois radicais metila a região L do antraceno confere a molécula grande poder carcinogênico (**ARCOS & ARGUS**,1968 e **WEISBURGER**, 1980) (ESQUEMA 1). Devido aos seus efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos, é comumente aceito que o DMBA possa ser convertido em um metabólico ativo via citocromo P-450/P-450<sub>C</sub>, dependente do sistema monoaminoxidase (**DIGIOVANNI & JUCHAU**,1980 e **BALANI et alii**, 1985).

O tecido mamário representa o alvo clássico para a carcinogênese produzida pelo DMBA (**HUGGINS et alii**,1961). **DAO & SINHA** (1972), demonstraram que a indução do câncer pelo DMBA em cultura de tecido mamário requeria uma ativação metabólica deste composto na própria glândula. Baseado nesta consideração **TAMULSKI et alii** (1973) compararam o metabolismo do DMBA no tecido mamário e no tecido hepático de ratas fêmeas, demonstrando diferenças qualitativas. O tecido hepático cataliza a conversão de todos os três metabólitos do DMBA (o 7-hidroximetil-12-metilbenzantraceno o 12-hidroximetil-7-metilbenzantraceno e o 7,12-dihidro



REGIÃO K : região de maior densidade eletrônica na molécula, e a ligação 5,6 é a menor das ligações deste sistema aromático (DIGIOVANNI & JUCHAU, 1980)

REGIÃO L : região entre C<sub>7</sub> e C<sub>12</sub> de maior reatividade química (DIGIOVANNI & JUCHAU, 1980).

ESQUEMA 1 - ESTRUTURA DO DMBA

ximetilbenzantraceno), mas a formação do 7,12-dihidroximetilbenzantraceno (ESQUEMA 2), não foi detectada quando o tecido mamário foi usado como fonte de enzima (TAMULSKI et alii, 1973 e DiGIOVANNI & JUCHAU, 1980). O metabólito do DMBA encontrado em maior concentração no tecido mamário é o 12-hidroximetil-7-metilbenzantraceno, no fígado é o 7-hidroximetil-2-metilbenzantraceno e no pâncreas é o 5,6-epóxi-7-hidroximetil-12-metilbenzantraceno (DiGIOVANNI & JUCHAU, 1980 e BLACK et alii, 1981 e OWEN et alii, 1981).

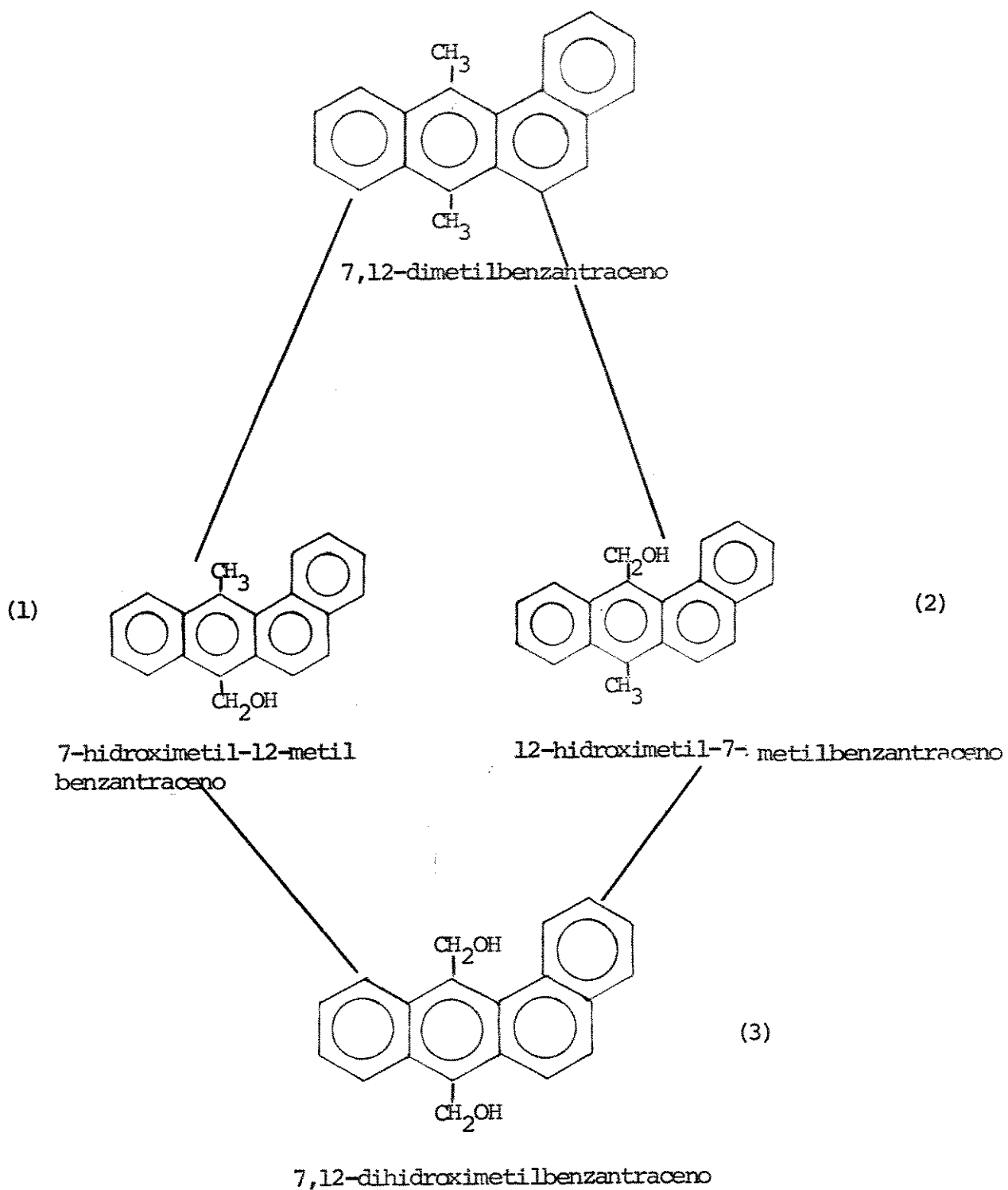
HUGGINS et alii (1961), fizeram um estudo comparativo da indução do câncer mamário por DMBA, 3-metilcolantreno (3-MC) e 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) e observaram maior incidência no número dos tumores, em menor tempo e com doses baixas, quando o indutor usado foi o DMBA.

Sabe-se que este composto reage "in vivo" e "in vitro" com ácidos nucleicos e proteínas, inibindo em ambas condições, a síntese do DNA (BROOKES & LAWIEZ, 1964; HEIDELBERGER, 1964 e BROOKES & HEIDELBERGER, 1969), parecendo afetar primariamente as células na fase S do ciclo mitótico (MARQUARDT & PHILLIPS, 1970).

MEDINA et alii (1980), comparando o câncer mamário de ratas e camundongos induzido pelo DMBA, com a expressão do vírus MuMTV e com as características morfológicas e hormonais dos tumores resultantes, observaram que o DMBA foi capaz de induzir o câncer mamário em ratas virgens com alta frequência (69%), em ratas estimuladas por hormônio (81%) e em camundongos fêmeas ovariectomizadas (55%) e que havia aumento na expressão do vírus MuMTV.

TAY & RUSSO (1981), estudando o efeito da idade e paridade na ligação do DMBA ao DNA no reparo do DNA danificado na fase logarítmica e na confluençial de cultura de células do tecido mamário de ratas jovens e virgens, velhas e virgens e ratas grávidas, sugeriram que a idade e a paridade não só diminui a ligação do DMBA ao DNA das células epiteliais mamárias, como também aumenta a eficiência do reparo do DNA, o que poderia explicar a baixa sensibilidade das ratas velhas e virgens bem como das grávidas à carcinogênese mamária induzida por este composto.

SUGIYAMA et alii (1981), estudando a ação de diferentes carcinógenos químicos, entre eles o DMBA, ao nível de cromossomas, observaram que os padrões de distribuição das aberrações cromossômicas e as alterações das cromátides irmãs ao



ESQUEMA 2 - PRINCIPAIS METABÓLITOS DO DMBA

longo dos cromossomas, foram atribuídas a replicação tardia do DNA nas regiões cromossômicas vulneráveis ao DMBA.

**MINASIAN-BATMANIAN & JABARA** (1981), estudando o efeito do tratamento hormonal e de outras drogas no crescimento de tumores mamários induzidos pelo DMBA em ratas adenoovariectomizadas, observaram que o mecanismo da ação da progesterona, para a manutenção do crescimento tumoral, era diferente do mecanismo de ação da prolactina, bem como independente dos níveis de prolactina circulante.

**NAKAMURA** et alii (1981), relacionando a função adrenal e a indução do câncer mamário induzido pelo DMBA em ratas Sprague-Dawley, observaram que a carcinogênese induzida pode ser promovida por esteróides adrenocorticais endógenos, provavelmente através de uma relação metabólica entre o DMBA e os esteróides.

**YOSHIDA** et alii (1982), relacionando a carcinogênese mamária e o estado hormonal, observaram que o câncer induzidos pelo DMBA em machos e fêmeas Sprague-Dawley, independia da presença das gônadas.

Sabe-se também que ratas alimentadas com dieta rica em ácidos graxos poliinsaturados n-6 e inoculadas com DMBA, desenvolvem a carcinogênese mamária mais rapidamente do que animais que se alimentam com dietas ricas em ácidos graxos saturados, parecendo que o ácido graxo poliinsaturado n-6 age como um co-carcinogênico na fase promocional do desenvolvimento tumoral, alterando preferencialmente o estado hormonal do animal (**CHAN** et alii, 1975; **LIPSETT**, 1979; **IP**, 1980; **IP** et alii, 1980 e **CHAN & DAO**, 1981).

### **2.3. BREVE HISTÓRICO SOBRE AS TEORIAS E FATORES ENVOLVIDOS NAS NEOPLASIAS MALIGNAS**

Em 1877 **COHNHEIM** postulou, que as neoplasias malignas se originariam das células embrionárias, que não seguem o padrão normal de diferenciação, permanecendo latentes no indivíduo adulto. Estas células por diferentes tipos de estímulos externos se multiplicariam desordenadamente, levando a uma catástrofe celular, já que no adulto faltariam aqueles regula-

dores existentes no embrião, que se encarregariam da diferenciação celular e da parada do crescimento das células, dado este apoiado por **POTTER** (1957) e por **WEINSTEIN** (1968).

**VIRCHOW** (1880), postulou que as neoplasias malignas eram produzidas por irritação constante de um determinado grupo de células, que passariam de normais à neoplásicas com alteração do padrão genético, o que foi confirmado por **BOVERI** (1914). Por outro lado, **BAUER** (1928), sugeriu que as neoplasias malignas eram uma consequência da exposição dos seres vivos a fatores externos produtores de mutação nas células somáticas. **FURTH & SOBELL** (1947), postularam que as transformações malignas requeriam proliferação celular e que o fenótipo característico deste estado podia ser devido à perda de funções especializadas e ao aparecimento de proteínas, que estariam presentes nos estados embrionários dos diferentes tecidos.

**GREEN** (1954), postulou que, quando os agentes químicos cancerígenos reagiam com as proteínas celulares havia uma mudança na identidade imunológica celular e que as células não estariam mais sujeitas aos mecanismos de controles homeostáticos, transformando-se assim em células neoplásicas.

**WARBURG** (1956 a,b), preconizou que as células produtoras de neoplasias malignas eram derivadas das normais, as quais tinham sofrido um dano irreversível na respiração celular, dano este que seria compensado por um aumento no processo de fermentação, que levaria as células normais a se transformarem em células indiferenciadas com crescimento desenfreado, dando origem assim as células cancerosas.

Outros autores postularam que a interação das células com cancerígenos químicos, alterariam proteínas citoplasmáticas repressoras, as quais induziriam a síntese de enzimas com função de estimular o crescimento e a divisão das células, agora tornadas malignas (**PITOT & HEIDELBERGER**, 1963 e **SACHS**, 1984).

Um outro grupo de autores sugeriram que certa informação viral, seria integrada ao DNA cromossômico em alguma etapa inicial da evolução dos vertebrados, persistindo como parte intrínseca deste DNA e que as radiações ou os agentes carcinogênicos químicos atuariam desreprimindo o oncógeno pré-existente (**HUEBNER & TODARO**; 1969 e **WEINBERG**, 1984).

Ainda um outro grupo de pesquisadores, sugeriram que a transformação de células normais em células malignas se iniciaria a partir da expressão de mutações silenciosas ( **KINSELLA**

& **RADMAN**,1978), mudanças na expressão de um determinado gene a partir do reparo do DNA (**HOLLIDAY**,1979), translocações ( **CROCE & KLEIN**,1985), trissomias e rearranjos (**YUNIS**,1983; **SPOONER & COOPER**,1972 e **NOWELL & HUNGERFORD**,1960) ou a herança de um gene alelo dominante autossômico (**KING**,1981).

As neoplasias malignas humanas e de animais de laboratório, particularmente as do tecido mamário, são influenciadas por uma série de fatores. A prolactina, na indução do câncer mamário de ratas, é vista mais como agente de condicionamento, do que como agente permissivo (**LIPSETT**,1982). O estradiol, juntamente com determinados fatores de risco para o câncer mamário (menarca precoce, menopausa tardia, obesidade, entre outros), estimula o crescimento do epitélio dos ductos mamários favorecendo a implantação do processo neoplásico (**MacMAHON et alii**,1973; **HOOVER et alii**,1976 e **LIPSETT**,1982 ).

A interação existente entre células tumorais e plaquetas, células tumorais e parede celular do endotélio de vasos , são fatores importantes no aparecimento das metástases tumorais a distância, dependentes de prostaglandinas (**HONN et alii**,1983). O câncer de mama ainda está relacionado, com o de ovário, endométrio e os sarcomas cerebrais (**MARKS**,1981). A ausência de gravidez, primeira gravidez tardia, menopausa tardia, baixo número de partos, doenças benignas da mama, têm sido relatado como sendo fatores que favorecem o aparecimento de neoplasias malignas da mama (**MARKS**,1960; **MacMAHON et alii**, 1970 ; **YUASA & MacMAHON**,1970; **ANDERSON**,1971; **LEWINSON & NETO**,1971;**STASZEWSKI**,1971; **LIN et alii**,1971; **TRICHOPOULOS et alii**,1972; **MacMAHON et alii**,1973; **HENDERSON et alii**,1974; **DE WAARD**,1975;**CHOI et alii**,1978; **DAY et alii**,1978; **DE WAARD**,1978; **PRIOR & WATERHOUSE**,1978; **TULINIUS et alii**,1978 e **WINDER et alii**,1978 a,b).

Um outro fator de risco que favorece as neoplasias malignas mamárias, parece ser a ingestão de dietas com um grande conteúdo de gorduras (**CARROLL et alii**,1968; **STOCKS**,1970; **HOWELL**,1974; **CHABON et alii**,1974; **ARMSTRONG & DOLL**,1975; **PHILLIPS**,1975; **HANKIN & RAWLINGS**,1978; **HEMS**,1978; **MILLER et alii**, 1978; **NOMURA et alii**,1978; **PAWLEGA & WALLACE**,1980; **NIELSEN & HANSON**,1980 e **CARROL et alii**,1981), a qual agiria como um agente cocarcinogênico (**WEISBURGER**,1980), potencializando a ação de fatores que interferem no desenvolvimento da carcinogênese mamária (**LAVIK & BAUMANN**,1941; **CHAN et alii**,1975; **HWANG et alii**,1975, **HOPKINS & WEST**,1976; **DUPONT et alii**,1978; **HANKIN & RAW** -

LINGS, 1978; HILLYARD & ABRAHAM, 1979; KNAZEK & LIU, 1979 e KALAMEGHAM & CARROLL, 1984).

#### 2.4. A INDUÇÃO DE NEOPLASIAS.

Os agentes produtores de neoplasias são classificados em três grupos, os agentes físicos, os virais e os agentes químicos (GOMEZ & ROSADO, 1981).

A descrição de neoplasias malignas induzidas por agentes físicos, tem sido relatada já a partir do início deste século. VONJAGIE et alii (1911) descreveram três casos de leucemia em radiologistas. Outro exemplo de neoplasias induzidas no homem por irradiação, pode ser observado na população sobrevivente da explosão atômica das cidades de Hiroshima e Nagasaki (LAMERTON, 1964). Parece que as radiações ionizantes, atacam o DNA cromossômico e determinadas proteínas importantes para o reparo do mesmo (CLEAVER, 1969 e MORIN et alii, 1977).

As neoplasias induzidas por agentes virais, foram também relatadas desde o início deste século. ELLERMAN & BANG (1908), produziram leucemia em galinhas saudáveis, através da inoculação de extrato leucêmico livre de células e postularam, que a doença teria sido produzida por um vírus existente no extrato leucêmico. ROUS (1910), obteve sarcomas em galinhas saudáveis, inoculando-as com extrato livre de células de sarcoma de galinha. BITTNER (1936), observou que ratos amamentados por ratas com câncer de mama, desenvolveram neoplasias e este autor postulou que o fator do desenvolvimento da referida neoplasia era de origem viral. GROSS (1951), obteve leucemia murina em camundongos saudáveis, através da inoculação de filtrados de células leucêmicas murina. Provavelmente quando o vírus oncôgeno infecta as células não tolerantes, há a multiplicação viral no interior destas células, juntamente com transformações morfológicas e de crescimento, diferentes das células normais, acarretando com isso o processo neoplásico (GOMEZ & ROSADO, 1981 e PITOT et alii, 1981).

Na natureza existe uma série de substâncias que são cancerígenas (POTT, 1775 e BROCKES & LAWIEZ, 1964). REHN (1895), observou que trabalhadores que manipulavam cristais de corante de anilina, desenvolviam com maior frequência câncer de bexiga do que o resto da população normal. YAMAGIWA & ICHIKAWA (1916)



induziram pela primeira vez a carcinogênese experimental, aplicando o alcatrão na pele de coelhos. **KENNAWAY** (1955), separou do alcatrão o 3,4-benzopireno e demonstrou que esta substância era carcinogênica. As substâncias mais usadas experimentalmente na indução de neoplasias, são as nitrosaminas, que são alquilantes do radical guanina do DNA (**LAWLEY**, 1972) e os hidrocarbonetos policíclicos, que se unem às células ocasionando o aparecimento de falsas bases na duplicação do DNA, favorecendo o aparecimento de mutações, o que explicaria a conversão de uma célula normal em neoplásica (**GOMEZ & ROSADO**, 1981). Por outro lado **FARBER** (1980), sugere que todos os agentes químicos indutores da carcinogênese atuariam na fase de iniciação das neoplasias, induzindo a formação de células resistentes que cresceriam em ambientes desfavoráveis ao crescimento das células normais. Este mesmo autor ainda sugere três etapas importantes na fase de iniciação das neoplasias, a indução de células resistentes, por um mecanismo essencialmente irreversível, a formação de um estímulo para a proliferação destas células (por exemplo, via necrose de um número significativo de células normais vizinhas àquelas resistentes) e a proliferação destas células alteradas.

Desde os achados de **McCOY** (1909), a morfologia dos tumores mamários, induzidos por compostos químicos em animais de laboratório, tem sido estudada intensivamente e a conclusão geral é que não há uma classificação histológica definitiva para estes tumores, já que existe uma grande variação na morfologia, não só entre os diferentes tipos de tumores bem como entre os componentes histológicos de um mesmo tumor em diferentes pontos (**DUNNING** et alii, 1951; **YOUNG** et alii, 1963; **MIDDLETON**, 1965 e **ARCHER & ORLANDO**, 1968). **KOMITOWSKY** et alii (1982), tentaram classificar os tumores mamários induzidos pelo DMBA em ratas, usando uma terminologia histológica que permitisse a comparação destes tumores com os encontrados em mulheres e os dividiram em fibroepiteliais, epiteliais e de tecidos conectivos.

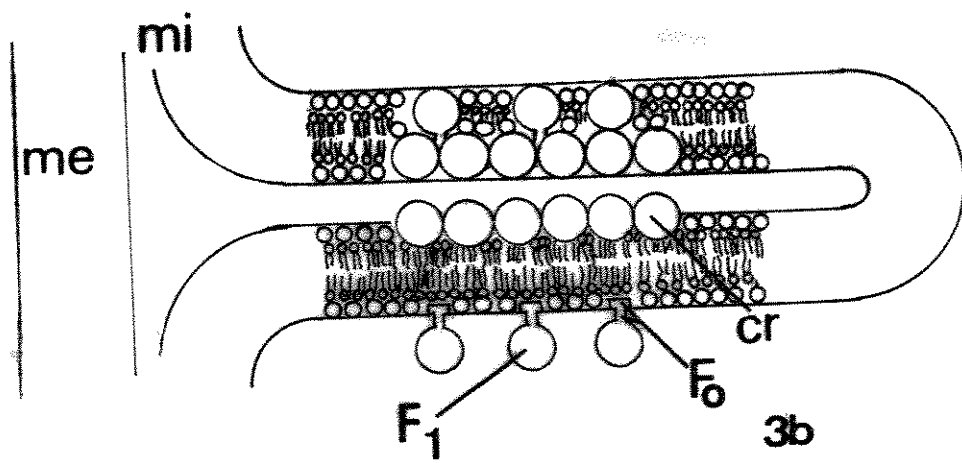
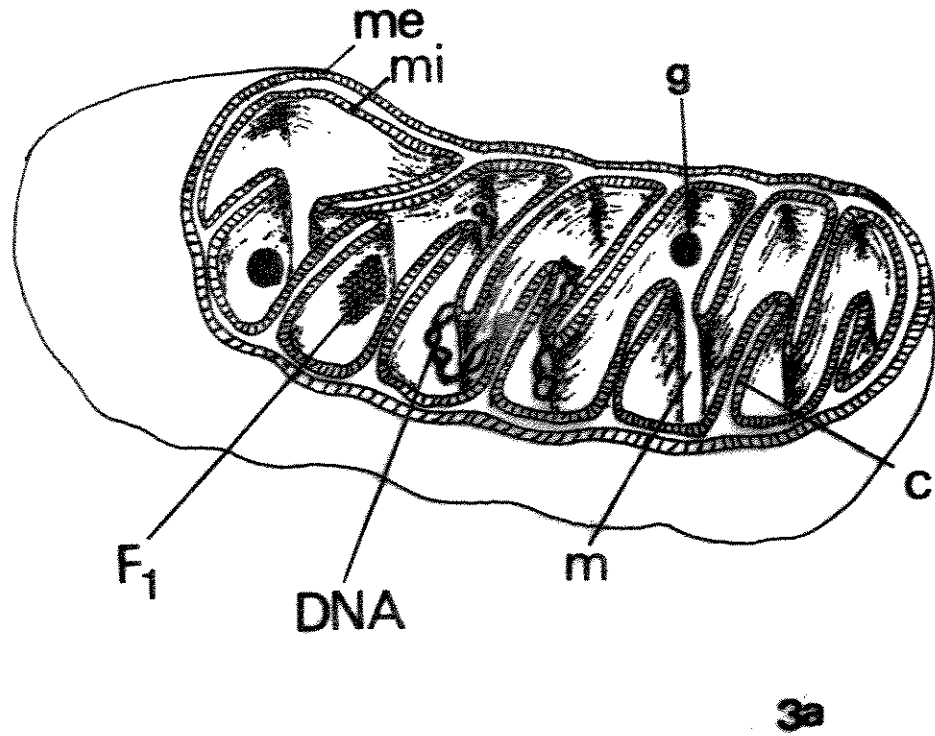
## 2.5. MITOCÔNDRIA

A mitocôndria é uma organela celular, formada por dupla membrana de lipoproteínas, a externa está relacionada com as propriedades de permeabilidade e a interna envia para dentro

da cavidade mitocondrial as cristas mitocondriais ; possui ainda DNA, matriz mitocondrial e grânulos densos (ESQUEMA 3a), (ROODYN, 1968 e SJÖSTRAND & BERNHARD, 1976). A membrana interna divide a organela em dois espaços, o externo (contido entre as duas membranas) e o interno (circundado pela membrana interna) que está ocupado por material denso, a matriz mitocondrial (ROODYN, 1968). Ainda segundo este autor, as cristas são consideradas invaginações de membrana interna, os grânulos densos são agregados de sais de cálcio insolúveis, na forma de hidroxapatita, ou sais de bário, magnésio ou de fosfato. As mitocôndrias desempenham funções vitais para a vida da célula, como a oxidação dos ácidos graxos, respiração celular, fosforilação oxidativa, transporte de íons e uma série de reações metabólicas (ROODYN, 1968 e HILTUNEN et alii, 1983). Na membrana interna desta organela, estão localizados os citocromos, algumas desidrogenases e o complexo ATPásico (ESQUEMA 3b), associados a fosforilação oxidativa e na membrana externa está localizada a monoaminooxidase que é uma enzima importante na metabolização de alguns compostos com ação carcinogênica (LEHNINGER, 1976 e DIGIOVANI & JUCHAU, 1980).

RACKER (1970), observou que vesículas submitocondriais fosforilantes submetidas a tratamento mecânico, de drogas ou enzimático dividiam-se em duas frações, uma membranosa que era deficiente em fosforilar o ADP mas que ainda assim catalizava o transporte eletrônico e outra fração, de natureza proteica e solúvel, que catalizava a hidrólise do ATP mas não o transporte eletrônico. Esse autor ainda observou que a combinação destas duas frações, restaurava a fosforilação oxidativa e que esta podia ser desacoplada pelo 2,4-dinitrofenol e inibida pela oligomicina. Em vistas destes resultados, foi observado que a membrana mitocondrial contribuía com as enzimas do transporte eletrônico e que a fração proteica solúvel ( $F_1$ ), representava o complexo enzimático requerido na hidrólise do ATP (LEHNINGER, 1976).

O complexo  $F_1$ -ATPásico é formado por três componentes funcionais (ESQUEMA 7b), o fator  $F_1$  que é solúvel em água e responsável pela atividade catalítica ATPásica, o fator  $F_0$  proteolípídico que atua como canal de prótons na membrana interna e sensível à oligomicina e a diciclohexilcarboimida e o componente I, um peptídeo regulador da síntese do ATP durante a fosforilação oxidativa (PULLMANN & MONROY, 1963; PEDERSEN,



ESQUEMA 3 - ESQUEMATIZAÇÃO DA MITOCÔNDRIA E DO COMPLEXO ATPÁSICO  
3a - m = matriz mitocondrial; me = membrana externa; mi = membrana interna; g = grânulos densos; c = crista mitocondrial; DNA e F<sub>1</sub> = partícula F<sub>1</sub>.  
3b - cr = cadeia respiratória; F<sub>1</sub> = fator F<sub>1</sub>; F<sub>0</sub> = fator F<sub>0</sub>, (retirado do livro BIOLOGIA CELULAR de E.D.P. De Robertis, W.W. Nowinski e F.A. Sãez, p.174,1972).

1975; MITCHELL, 1976 e PEDERSEN, 1978).

Em geral o conteúdo de lipídios das células tumorais refletem as alterações na composição das membranas (RUGGIERI & FALLANI 1968 a,b e FEO et alii, 1973 a,b). MELNICK et alii (1977) examinando possíveis diferenças no estado físico dos lipídios de membranas mitocondriais, na expressão da atividade da ATPase, de fígado de ratos com tumores e sem tumores, observaram que a atividade de ligação da ATPase, com o ATP no material estudado eram comparáveis e que diferenças na composição dos lipídios das membranas não alterava a atividade enzimática.

Estudos comparativos da ATPase da membrana plasmática  $Mg^{2+}$ -dependente de células de fígado normal, de fígado em regeneração e do hepatoma de Yoshida 66, mostraram que nas células em regeneração e nas de hepatoma o  $K_M$  para o ATP e a  $V_{max}$  da ATPase era menor que nas células do fígado normal (OHNISHI et alii, 1982; WILKIE et alii, 1983).

Estudo comparativo da composição dos fosfolipídios das membranas mitocondriais e microsossomais de diferentes tumores no período de diferenciação, demonstraram que as mudanças no conteúdo dos fosfolipídios das mitocôndrias e microsossomas eram menores nos tumores do que nos tecidos normais (TIMOFEEVA et alii, 1981).

Estudando-se a influência da composição da dieta lipídica sobre as mitocôndrias de coração de ratas Sprague-Dawley, foi observado que a dieta é um fator determinante significativo na quantidade das classes dos fosfolipídios das membranas mitocondriais, que a atividade ATPásica foi em parte determinada pela dieta lipídica e que os ácidos graxos da dieta é um fator importante desta e de outras funções membrana-dependentes (INNIS & CLANDININ, 1981 a,b).

## 2.6. FATORES NUTRICIONAIS

Em 1929 BURR & BURR observaram o aparecimento de uma nova doença em ratos, a qual era caracterizada pelos seguintes sinais: diminuição de crescimento do animal, necrose da cauda, queda de pelos, dermatites generalizados, prolapso de pênis e morte prematura. Estes autores ainda observaram que esta nova

doença era causada por uma deficiência de lipídios dietários e que a adição de 2% de gordura à dieta prevenia o aparecimento da doença, chegando mesmo, em alguns casos a cura da mesma. Posteriormente, foi observado que a regressão desta doença, ocorria não só pela adição de gordura às dietas, mas que a adição de 1% do ácido linoléico era suficiente para que ocorresse a remissão da mesma, introduzindo-se desta maneira o conceito de ácidos graxos essenciais (HOLMAN, 1961; MOHRHAUER & HOLMAN, 1963; PASCAUD & LAVABRE, 1966; GUARNIERI & JOHNSON, 1970; HASSAM, 1977; MacDONALD et alii, 1983 e TAHIN, 1985) que não são sintetizados pelo organismo, mas incorporados pelos tecidos através da ingestão dietária, com funções importantes para a vida da célula e que ainda são precursores dos ácidos graxos poliinsaturados das famílias n-6 e n-3 (HOLMAN, 1961; GUARNIERI & JOHNSON, 1970; CRAWFORD et alii, 1978 e MacDONALD et alii, 1983).

Em humanos o ácido linoléico tem papel importante no desenvolvimento de funções fisiológicas normais e mesmo em quadros patológicos, como por exemplo doenças cardiovasculares, doenças aterogênicas, hipertensão induzida por sódio, diabetes, aumento da permeabilidade da pele à água, aumento de susceptibilidade à infecções bacterianas, esterelidade masculina e feminina e carcinogênese mamária (VLES, 1971; VERGROESEN, 1977; VLES & HOUTSMULLER, 1977; SANDERS et alii, 1978; VLES, 1978; RENAUD et alii, 1979; MCGREGOR et alii, 1980 e IRITANI & NARITA, 1984).

Em animais de laboratório, tem sido demonstrado que os ácidos graxos essenciais são mais indispensáveis nos animais jovens do que nos adultos e que a quantidade mínima ideal para o desenvolvimento do animal seria de 2% das calorias totais dietárias na forma de ácido linoléico (HOLMAN, 1961; GUARNIERI & JOHNSON, 1970; VLES, 1971 e PASCAUD, 1980). Para o crescimento normal e a prevenção de doenças dos peixes, o ácido linoléico é o ácido graxo essencial (LEGER, 1980 e PASCAUD, 1978).

Existem evidências, demonstrando que as diferentes famílias de ácidos graxos poliinsaturados agem antagonicamente, não apenas em seus papéis biológicos como também nos seus papéis metabólicos, particularmente na síntese de seus ácidos graxos (RICHARDSON et alii, 1962; GARCIA & HOLMAN, 1965; BRENNER & PELUFFO, 1966; BRENNER, 1969; BRENNER et alii, 1969; VLES, 1971; VANE, 1971; HASSAM & CRAWFORD, 1976; DYERBERG et alii, 1978; HASSAM & CRAWFORD, 1978; MAZLIAK, 1980; LEGER, 1980; TAHIN et alii, 1980; YAO et alii, 1980; BASS et alii, 1981; SCHRIYVER & PRIVETT,

1982; **CHERN & KINSELLA**,1983 a,b; **EMILSSON & GUDBJARNASON**, 1983; **FUJIWARA** et alii,1983; **MacDONALD** et alii,1983; **OWLIN**,1983 e **MO RISAKI** et alii,1983).

**TANNENBAUM** (1959), foi um dos primeiros pesquisadores que se preocupou com o possível papel da dieta lipídica no desenvolvimento da carcinogênese. Mais recentemente, foram publicados vários trabalhos que relacionam a ingestão de dietas ricas em lipídios, tanto em humanos quanto em animais de laboratório, com a incidência do câncer mamário (**CARROLL** et alii, 1968; **DAO & ABRAHAM**,1975 e 1976; **HOPKINS E WEST**, 1977; **ENIG** et alii, 1978, **CARROLL & DAVIDSON**,1982; **TAHIN** et alii,1982 ; **CARROLL**, 1983 ; **KING** et alii,1979 e **JUKES**,1979).

A ingestão de dietas com quantidades elevadas de ácidos graxos poliinsaturados, especialmente do ácido linoléico, afetam a fase promocional da carcinogênese mamária induzida pelo DMBA (**HOPKINS & WEST**,1976; **HOPKINS & CARROLL**,1979;**KING** et alii,1979; **CHAN & DAO**,1981; **EL-KHATIB & CORA**,1981; **HILL**,1981; **HOPKINS** et alii,1981; **MIYAMOTO-TLAVEN** et alii,1981 **CARROLL & DAVIDSON**,1982; **KIDWELL** et alii,1982; **KRITCHEVSKY**,1982 e **KRITCHEVSKY** et alii,1984), alterando o estado hormonal do animal de experimentação (**CHAN** et alii,1975; **KNAZEK & LIU**,1979, **NAGASAWA**,1979; **IP** et alii,1980; **COHEN**,1981; **DAVE** et alii,1981; **YANAI** et alii,1981; **LIPSETT**,1982 e **ROGERS** et alii,1982), afetando funções enzimáticas específicas que atuam transformando uma substância pro-carcinogênica em um carcinógeno ativo (**WEINHOUSE**, 1955 ; **MILLER & MILLER**; 1971; **MAUGH**,1974 e **KRITCHEVSKY**,1982 ) , contribuindo na modificação do conteúdo calórico (**LAVIK & BAUMANN**,1941; **LAVIK & BAUMANN**,1943; **WAXLER** et alii,1979 e **BURKE** et alii,1980) ou afetando o sistema imunológico ( **PACE-ASCIAK & WOLFE**,1968; **HWANG** et alii,1975; **RAO & ABRAHAM**,1977; **DUPONT** et alii,1978, **HILLYARD & ABRAHAM**,1979; **MAHMUD & MIURA**,1981 e **ABRAHAM & HILLYARD**,1983) via síntese de prostaglandinas dependentes do conteúdo do ácido araquidônico.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Neste trabalho, foram utilizadas ratas Sprague-Dawley, obtidas do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia, da cidade de São Paulo.

Estes animais, foram acasalados no Biotério Central da UNICAMP e para tanto foi utilizado o sistema de harém, segundo o descrito por **FESTING** (1976).

As ratas após o desmame (21 dias de vida), foram mantidas em gaiolas (6-8 ratas/gaiola) e alimentadas "ad libitum" com água e a ração Probiotério G (Anderson-Clayton), até o início do tratamento com o DMBA e com as dietas contendo 12% de lipídios.

Estes animais foram mantidos, durante o acasalamento a temperatura de 22-23°C, com fotoperiodismo de 12 h de luz e 12 h de escuro. Durante os tempos experimentais (30 e 63 dias) os mesmos foram mantidos a temperatura ambiente, com aproximadamente 18 h de luz e 18 h de escuro.

### 3.2. INOCULAÇÃO E TRATAMENTO DIETÁRIO DOS ANIMAIS

Grupos de ratas (6-8 animais /grupo) com 50-60 dias de vida, com um peso médio de 125,1 g ( $\pm$ 13,9) com parasitos convencionais do trato intestinal (Syphacia obvelata e Aspicularis tetraptera), foram inoculados i.p. com 1 ml de uma emulsão placebo (animais controles) ou 1 ml de uma emulsão contendo 20 mg de DMBA (animais tratados).

Após a inoculação, os grupos de animais controles ou tratados, foram colocados para se alimentarem "ad libitum" com água e as dietas semi-sintéticas e isocalóricas, durante 30 ou 63 dias.

### 3.3. PREPARAÇÃO DA EMULSÃO DE DMBA E DA EMULSÃO PLACEBO

As emulsões de DMBA ou de placebo, foram preparadas segundo o descrito por SCHURR (1979), com as seguintes modificações: cada 50 ml da emulsão DMBA continha 0,4 g% de Tween 40 (emulsificante), 1,2 g% de lecitina de soja, 15 g% de óleo de soja, 83 g% de água destilada estéril e 20 mg/ml de DMBA. A emulsão placebo, continha todos os ingredientes acima descritos, com exceção do DMBA.

Todas estas substâncias foram colocadas em becker e homogeneizadas em um ULTRA-TURRAX (mod. T4555 - Nr. 32717 da Janke e Kunkel) com rotação média, durante 3 minutos. Esta operação foi repetida com intervalos de 5 minutos de descanso, até a obtenção de uma emulsão perfeita. Posteriormente, este material foi autoclavado em frascos lacrados, por 15 minutos à 110°C e em seguida armazenado a 4°C, até o momento do uso.

### 3.4. PREPARAÇÃO DAS DIETAS SEMI-SINTÉTICAS E ISOCALÓRICAS

#### 3.4.1. OBTENÇÃO DO ÓLEO DE SARDINHA

Para a obtenção do óleo foi usado a sardinha (Sardinella brasiliensis Steidachner, 1789).

Cada 10 Kg do pescado foi cortado em um corta



dor industrial (mod. HERMANN), foi adicionado em seguida 2 l de água. Este material foi cozido a 90°C por 30 minutos. Após o cozimento, foi filtrado (saco de algodão), a fração sólida (torta) descartada e a fração líquida foi adicionada NaCl 1% (acelerar a separação da fração oleosa contida no filtrado), colocada em um freezer frigorífico a -20°C por aproximadamente 18 horas. A fração inferior (gelatina) foi desprezada e a fração superior (semi-sólida) de cor amarela, foi adicionada sulfato de sódio anidro e puro (para absorção da água e precipitação das proteínas). O material assim tratado, foi colocado em B.M. a 56°C, com agitação ocasional, por aproximadamente 18 horas. Posteriormente, foi filtrado, em gase, a fase inferior descartada e o filtrado (óleo de sardinha), foi estocado em frascos âmbar a -20°C até o momento do uso (ESQUEMA 4).

#### 3.4.2. PREPARAÇÃO DAS DIETAS

Todos os ingredientes que fizeram parte das dietas semi-sintéticas e isocalóricas, foram pesados individualmente em balança comum (FILIZOLA), misturados por 3 minutos, em misturador de alta rotação (SPAN-UTIL, mod.TWEEDY). Após, foram acondicionadas, em recipientes plásticos hermeticamente fechados, armazenadas em seguida a 3°C até o momento de uso.

A composição dos macro e micro nutrientes das dietas, bem como as fontes lipídicas das mesmas encontram-se na TABELA 1.

A TABELA 2 mostra a composição percentual dos ácidos graxos presentes nas dietas óleo de semente de girassol ou óleo de sardinha.

#### 3.5. AMOSTRAS TECIDUAIS PARA OS ESTUDOS HISTOLÓGICOS

Ao término de cada experimento (30 ou 63 dias), os animais foram sacrificados. Foram retirados fragmentos aleatórios do tecido mamário dos animais controles ou tratados com o DMBA, de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, que foram lavados em solução de NaCl 0,9 g% gelada e imediatamente fixados em formol-cálcio (10 g de acetato de cálcio:1000 ml de formalina 9 ve -

zes diluída).

Para cada grupo de animais (controles ou tratados com DMBA), de cada dieta (óleo de semente de girassol ou óleo de sardinha) e a cada tempo (30 ou 63 dias) foi feito "pool" do tecido fixado. No momento do estudo histológico, foi retirado aleatoriamente 3 pedaços de tecido de cada grupo, que foram incluídos em parafina. Este material foi cortado, cortes seriados de 8  $\mu$ m de espessura, corados pela hematoxilina-eosina, segundo o descrito por BEHMER et alii (1976). As lâminas foram analisadas em fotomicroscópio ZEISS (mod.3), com aumento de 400X.

### 3.6. OBTENÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS DO TECIDO MAMÁRIO

As mitocôndrias do tecido mamário de ratas (controles ou tratadas com DMBA), foram obtidas segundo BLOCK & FLEISCHER (1976), modificado por TAHIN et alii (1981).

Cada grama do tecido mamário foi picado e lavado (aproximadamente 5 vezes), com solução gelada de NaCl 0,9 g% (para retirar o sangue presente). Em seguida foi adicionado 20 ml da solução MSE (210 mM de manitol:70 mM de sacarose:0,1 g% de BSA:3 mM de HEPES:0,1 mM de EDTA a pH 7,4 ajustado com solução de TRIS-HCl 0,1 M pH 8,5). Posteriormente, foi homogeneizada em homogeneizador tipo POTTER (mod.TE-099 da TECNAL) a baixa rotação com 5 movimentos completos (subida e descida). Logo após, foi homogeneizada em homogeneizador do tipo TURRATEC (mod. TE-102 da TECNAL) a baixa rotação por 10 segundos, com intervalos de igual tempo (todas estas etapas foram realizadas em banho de gelo).

Este homogenato foi centrifugado a 1000rpm/15 minutos/0°C, em centrífuga BECKMANN (mod. J2/21 com rotor JA/20). O precipitado (P-1) foi descartado e o líquido sobrenadante (LS-1) foi centrifugado a 10.000 rpm/10 minutos/0°C. O líquido sobrenadante (LS-2), resultante desta nova centrifugação, foi descartado e o precipitado (P-2), foi lavado 2 vezes com 10 ml de solução MSE, nas mesmas condições de centrifugação já descritas. O líquido sobrenadante (LS-3), foi descartado e o precipitado (P-3), foi lavado 1 vez com solução MS (210 mM de manitol:70 mM de sacarose: 0,1 g% de BSA:3 mM de HEPES a pH 7,4 a

justado com solução de TRIS-HCl 0,1 M pH 8,5), nas condições de centrifugação anteriormente descritas. O líquido sobrenadante (LS-4) foi descartado e o precipitado (P-4) foi suspenso em solução MS (mitocôndrias), estocado a -20°C para análises posteriores: dosagem de proteínas, dosagem da ATPase e preparação de metil-ésteres (ESQUEMA 5).

### 3.7. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A determinação do conteúdo protéico, foi realizada tendo como base o método descrito por **LOWRY** et alii (1951) que se fundamenta na reação do reagente de Folin-Ciocalteu (10g de tungstato de sódio:1,8 g de óxido de molibdênio:5 ml de ácido fosfórico 85 %:75 ml de água destilada) com os radicais fenólicos dos resíduos de tirosina, encontrados nas proteínas.

### 3.8. DOSAGEM DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ATPase MITOCONDRIAL DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS.

A dosagem da atividade específica da ATPase mitocondrial do tecido mamário de ratas (controles ou tratadas com o DMBA), foi baseada no trabalho de **PIMENTEL E TAHIN** (1980).

A um volume final de 100 µl de mitocôndrias suspensas em MS, foi adicionado 0,5 ml do substrato da reação enzimática (6 mM de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ :6 mM de ATP em solução TRIS-HCl a pH 8,5), colocada a 37°C/10 minutos. A reação foi encerrada com 0,6 ml de uma solução de TCA 10%. Posteriormente, foi centrifugada, em centrífuga EPENDORFF (mod.3901), a 14.000 rpm/4 minutos/temperatura ambiente. No sobrenadante obtido desta centrifugação (1 ml), foi dosado a quantidade de fósforo inorgânico liberado pela reação enzimática.

Neste trabalho a atividade específica da ATPase foi definida como a quantidade de fósforo inorgânico liberado (em µg), pela quantidade de proteína presente nas amostras (em mg) por minuto a 37 °C.

### 3.9. DOSAGEM DO FÓSFORO INORGÂNICO

O fósforo inorgânico, foi dosado segundo o método descrito por **FISKE & SUBBAROW** (1925), modificado por **TAHIN** et alii (1985).

Para cada 1 ml de amostra, foi adicionado 1 ml de solução contendo 4 volumes de molibdato de amônio 3 g% em  $H_2SO_4$  3,75 N e 1 volume de solução ANS<sup>(\*)</sup>. Os tubos foram vigorosamente agitados e deixados à temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, a reação foi lida em espectrofotômetro **BECKMANN** (mod.24), em cubetas de quartzo, com caminho óptico de 0,5 cm de espessura a um  $\lambda = 700$  nm.

### 3.10. EXTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS DAS MITOCONDRIAS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS

A extração dos lipídios mitocondriais do tecido mamário das ratas (controles ou tratadas com o DMBA), foi realizada segundo o método descrito por **FOLCH** et alii (1951), modificado por **TIETZ** (1970<sub>a</sub>).

Para cada 1 ml de suspensão de mitocôndrias em MS foi adicionado 5 ml de metanol e homogeneizados em homogeneizador **TURRAX** (mod.TE-102 da **TECNAL**), na velocidade 3 por 30 segundos. O material foi colocado para descansar por 5 minutos, em banho de gelo e toda a operação novamente repetida. Em seguida, foi adicionado 20 ml de clorofórmio e homogeneizado nas condições anteriormente descritas. Este material foi centrifugado a 15.000 rpm/15 minutos/0°C, em centrífuga **BECKMANN** (mod.J2/21 - rotor JA/20), para melhor separação das frações líquidas.

A fração líquida inferior (FLI-1) foi desprezada (água + proteínas) e a fração líquida superior (FLS-1) foi adicionada 0,2 volumes de solução de NaCl 0,1M. Em seguida, a FLS-1 foi vigorosamente agitada, por 5 minutos em **VORTEX** a temperatura ambiente. Posteriormente foi centrifugada a 10.000 rpm/5 minutos/0°C, colocada lentamente em funil de separação por aproximadamente 10 minutos. A fase inferior foi recolhida (LIPÍDIOS),

---

(\*) A solução ANS, foi preparada segundo o descrito por **TIETZ** (1970<sub>b</sub>).

concentrada em fluxo contínuo de nitrogênio e estocada em frascos âmbar a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento de uso (ESQUEMA 6).

### 3.11. PREPARAÇÃO DOS METIL-ÉSTERES DOS ÁCIDOS GRAXOS DOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS

A preparação dos metil-ésteres dos ácidos graxos dos lipídios mitocondriais do tecido mamário das ratas (controles ou tratadas com o DMBA), foi baseada no método de **HARTMANN & LAGO** (1973).

Para cada 1 ml de lipídio mitocondrial do tecido mamário, foi adicionado 5 ml de solução de KOH 0,5 N em metanol. Esta mistura, foi colocada em refluxo a  $50^{\circ}\text{C}$ /5 minutos, após foi adicionado 15 ml da mistura de esterificação (60 ml de metanol:3 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado:2,0 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) e o refluxo continuou por mais 3 minutos.

Esta solução (metil-ésteres dos lipídios mitocondriais) foi transferida para o funil de decantação e a mesma foi adicionada 2 a 5 ml de hexano (passagem dos lipídios da fase aquosa para a fase apolar). Após vigorosa agitação, a fase líquida inferior (FLI-1) foi desprezada, a fase líquida superior (FLS-1) foi lavada 3 vezes com 50 ml de água destilada (retirada de prováveis impurezas). Os metil-ésteres dos AG mitocondriais foram filtrados, em  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e puro (desidratação), concentrado em fluxo contínuo de nitrogênio, sob aquecimento de  $57^{\circ}\text{C}$  e em seguida armazenado, em frascos âmbar, a  $-20^{\circ}\text{C}$  (ESQUEMA 7).

### 3.12. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS METIL-ÉSTERES DOS ÁCIDOS GRAXOS DOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS DO TECIDO MAMÁRIO

A cromatografia gasosa-líquida, dos metil-ésteres dos ácidos graxos mitocondriais do tecido mamário de ratas (controles ou tratadas com o DMBA), foi baseada no método descrito por **GERHARDT & GEHRKE** (1977).

O cromatógrafo utilizado foi o da VARIAN (mod.2440),

com detector de chama de hidrogênio ionizado , coluna de níquel de 2m/1/8" de 80-100"mesh", empacotada com 17% de DEGS estabilizado sobre chromosorb W.H.P.

A temperatura do injetor variava de 215-230°C e a do detector de 270-280°C. A programação da temperatura, durante o desenvolvimento do cromatograma, foi inicialmente de 50°C e aumentava de 15°C/minuto, até uma temperatura final de 240°C. As velocidades dos gases foram de:nitrogênio (10 ml/15 segundos), hidrogênio (17ml/5 segundos) e ar sintético (10 ml/2 segundos). A velocidade do papel foi de 1 cm/minuto.

As amostras dos metil-ésteres dos AG mitocondriais e os padrões (Sigma), foram suspensos em 100 µl de clorofórmio:metanol (2:1,v/v). Foi inoculado no cromatógrafo 1 a 2 µl desta solução. Os tempos de retenção dos padrões (TABELA 3 ) e das amostras foram dados em minutos e as áreas dos picos foram medidas , empregando-se a seguinte fórmula.

$$A = B \times h$$

onde:

A = área do pico, expressa em mm<sup>2</sup>.

B = base do pico.

h = altura do pico.

### 3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas dos resultados encontrados, foi empregado o teste "t STUDENT", segundo SPIEGEL (1972).

---

Observações: a- A dosagem das proteínas mitocondriais, bem como a da atividade enzimática, foi realizada individualmente, com triplicatas.  
b- Após foram feitos "pools" das amostras (4-5 amostra/pool), para a extração dos lipídios e metilação dos mesmos.

TABELA 1 . COMPOSIÇÃO DAS DIETAS.

INGREDIENTES	% PESO	Kcal/100g
Sacarose	10,0	41,0
Maizena	28,8	119,0
Caseína	25,0	108,0
Óleo (*)	12,0	112,0
Farinha de trigo	10,0	41,0
Leite em pó integral	10,0	100,0
Mistura Salina (**)	2,0	-
Mistura vitamínica (***)	1,0	-
Celulose	1,0	-
Bitartarato de colina	0,2	-
TOTAL	100,0	521,0

(\*) Óleo de semente de girassol, marca Zillo (dieta óleo de semente de girassol) ou óleo de sardinha (dieta óleo de sardinha).

(\*\*) Para cada 3 kg de mistura salina tinham-se: 63,4 g de citrato ferroso; 660 ml de ácido fosfórico xaroposo; 480 ml de HCl; 92 g de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 141 g de carbonato de potássio; 342 g de carbonato de magnésio; 111 g de ácido cítrico; 2,48 g de fluoreto de sódio; 0,79 g de sulfato manganoso; 0,24 g de alúmen de potássio e 0,20 g de iodeto de potássio.

(\*\*\*) Para cada 1000 Kg de dieta tinham-se: o seguinte complexo vitamínico: 0,6 g de tiamina-HCl; 0,6 g de riboflavina USP; 0,7 g de piridoxina-HCl; 3,0 g de niacina; 1,6 g de pantotenato de cálcio; 1,2 g de ácido fólico; 0,02 g de biotina; 1,0 g de cianocobalamina B12 0,1%; 0,016 g de vitamina A palmitato 250 cws; 0,001 g de vitamina D<sub>3</sub> hidro; 0,005 g de menadiona; 400 g de cloreto de colina 50%; 50 g de ácido ascórbico e 542 g de sacarose moída.

Observação: os percentuais dos ingredientes dietários estão de acordo com as normas do COMMONWEALTH BUREAU OF NUTRITION, 1979.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO PERCENTUAL (%) DOS ÁCIDOS GRAXOS DOS LIPÍDIOS DAS DIFERENTES DIETAS.

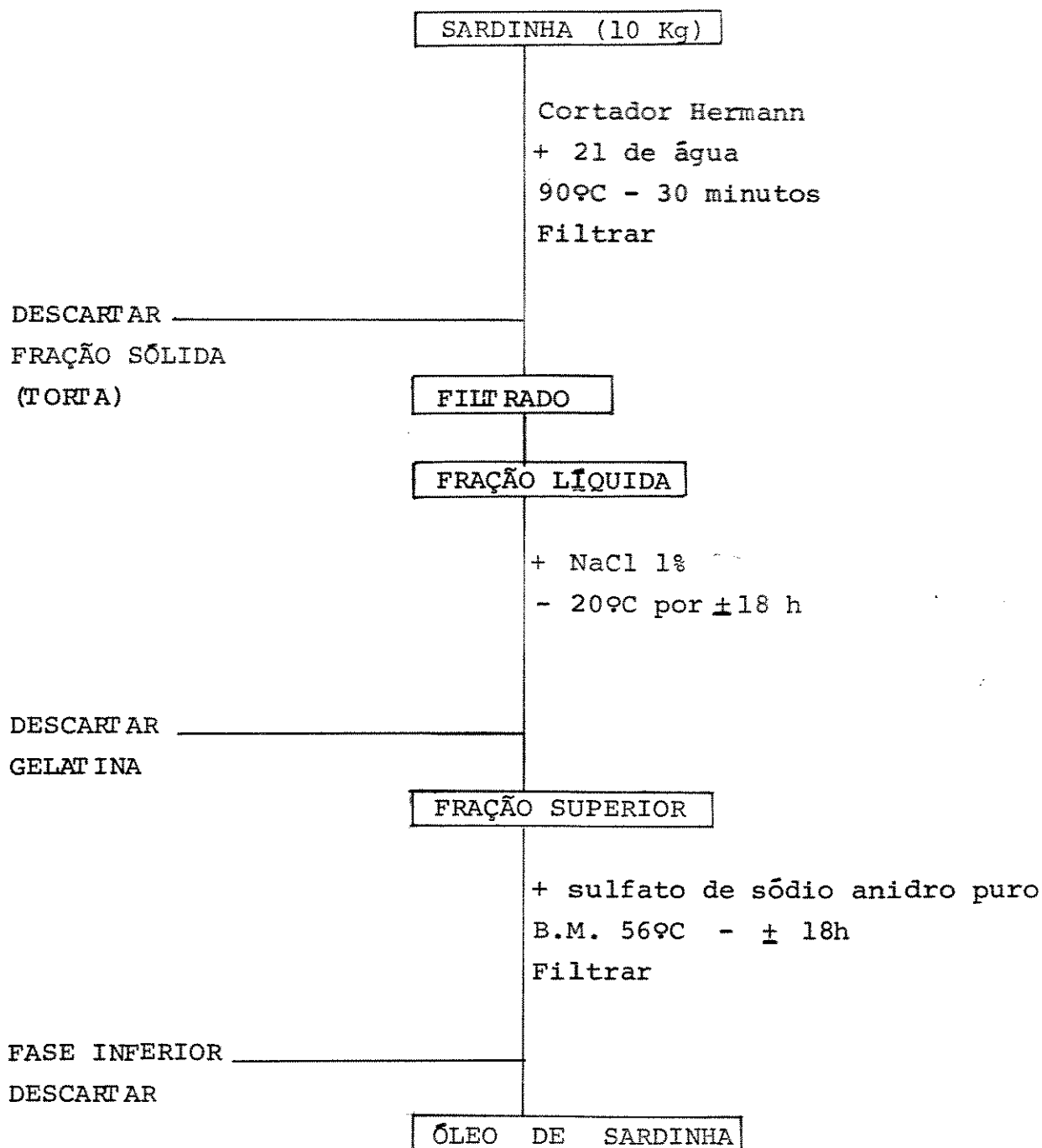
AG (%)	Dieta óleo de semente de girassol	Dieta óleo de sardinha
10:0	-	0,9
12:0	0,3	1,6
14:0	3,5	12,5
16:0	12,3	21,9
16:1 n-7	0,6	6,2
18:0	0,4	7,8
18:1 n-9	19,9	20,3
18:2 n-6	57,6	4,7
18:3 n-3	0,5	2,2
20:0	-	0,7
20:1 n-9	0,9	0,9
20:4 n-6	1,9	-
20:5 n-3	-	16,4
22:5 n-6	0,5	-
22:6 n-3	1,6	3,1
AGS TOTAL	16,5	45,4
AGMI TOTAL	21,4	27,4
AGPI n-6 TOTAL	60,0	4,7
AGPI n-3 TOTAL	2,1	21,7



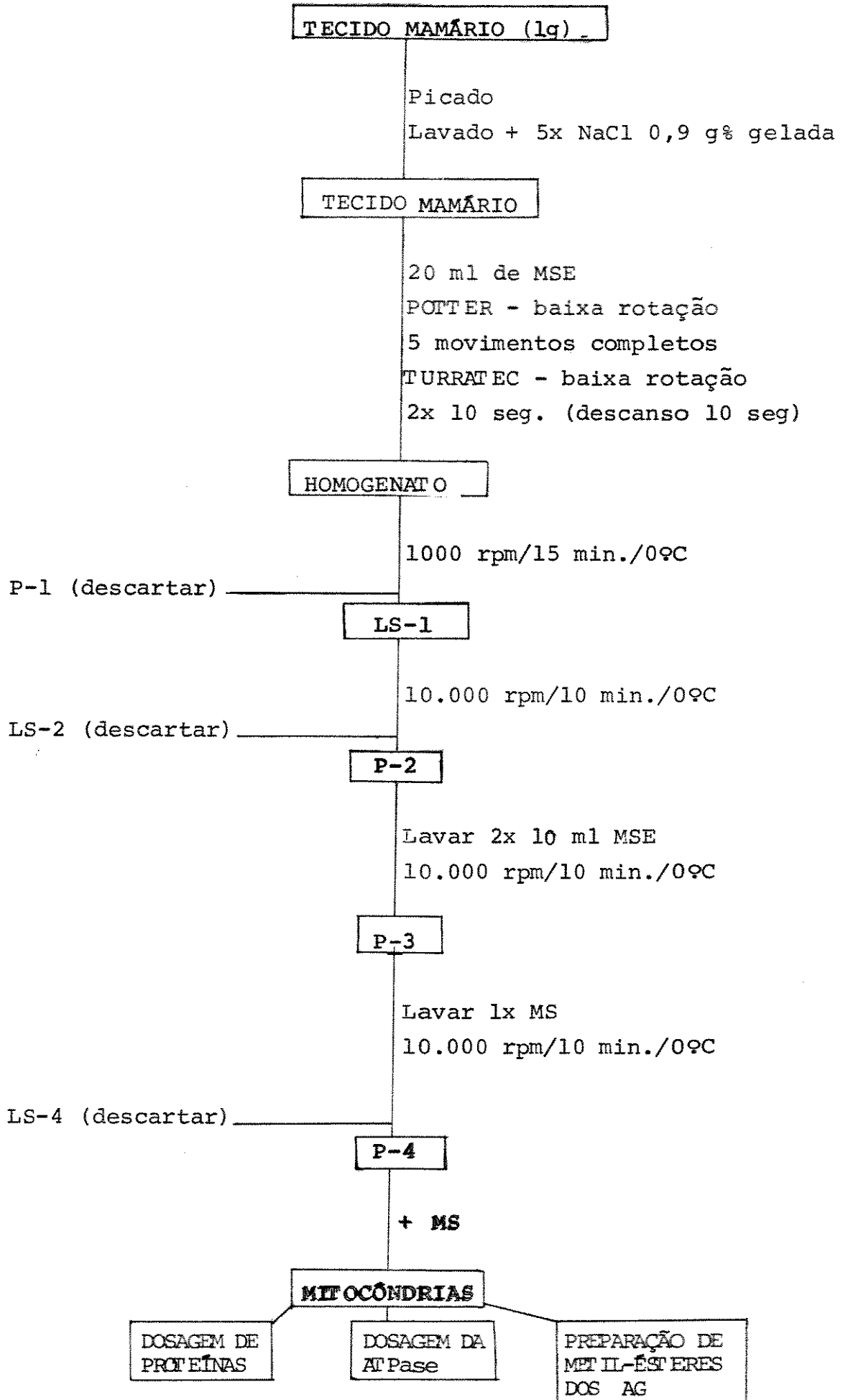
TABELA 3 - TEMPO DE RETENÇÃO DOS PADRÕES DOS METIL-ÉSTERES DOS ÁCIDOS GRAXOS.

AG	NOME	T.R. (*)
6:0	hexanóico	1,6
7:0	heptanóico	2,4
8:0	octanóico	3,4
8:1	octamonoenóico	4,1
9:0	nonanóico	4,2
10:0	decanóico	5,1
10:1	decamonoenóico	5,6
11:0	undecanóico	5,8
11:1	undecamonoenóico	6,1
12:0	laúrico	6,5
12:1	dodecamonoenóico	7,1
14:0	mirístico	7,5 - 7,8
14:1	miristoléico	8,1
14:2	tetradecadienóico	8,5
15:0	pentadecanóico	8,8
16:0	palmitico	8,6 - 9,4
16:1 n-7	palmitoléico	8,9 - 9,7
17:0	heptadecanóico	10,0
16:2 n-7	hexadecadienóico	10,3
18:0	esteárico	9,9 - 10,6
18:1 n-9	oléico	10,4 - 10,8
19:0	nonadecanóico	10,9
18:2 n-6	linoléico	10,9 - 11,4
20:0	eicosanóico	11,2 - 11,8
18:3 n-3	linolênico	11,3 - 12,0
20:1 n-9	eicosamonoenóico	11,8 - 12,1
20:3 n-9	eicosatrienóico n-9	11,9 - 12,2
20:3 n-6	eicosatrienóico n-6	12,0 - 12,3
20:4 n-6	araquidônico	12,3 - 12,5
20:3 n-3	eicosatrienóico n-3	12,7
22:0	docosanóico	12,1 - 12,4
22:4 n-3	docosatetraenóico	14,6
22:5 n-6	docosapentaenóico n-6	15,0
22:5 n-3	docosapentaenóico n-3	15,5
22:6 n-3	docosahexaenóico	16,0 - 16,5
24:4 n-6	tetracosatetraenóico n-6	17,5
24:6 n-3	tetracosahexaenóico n-3	20,0

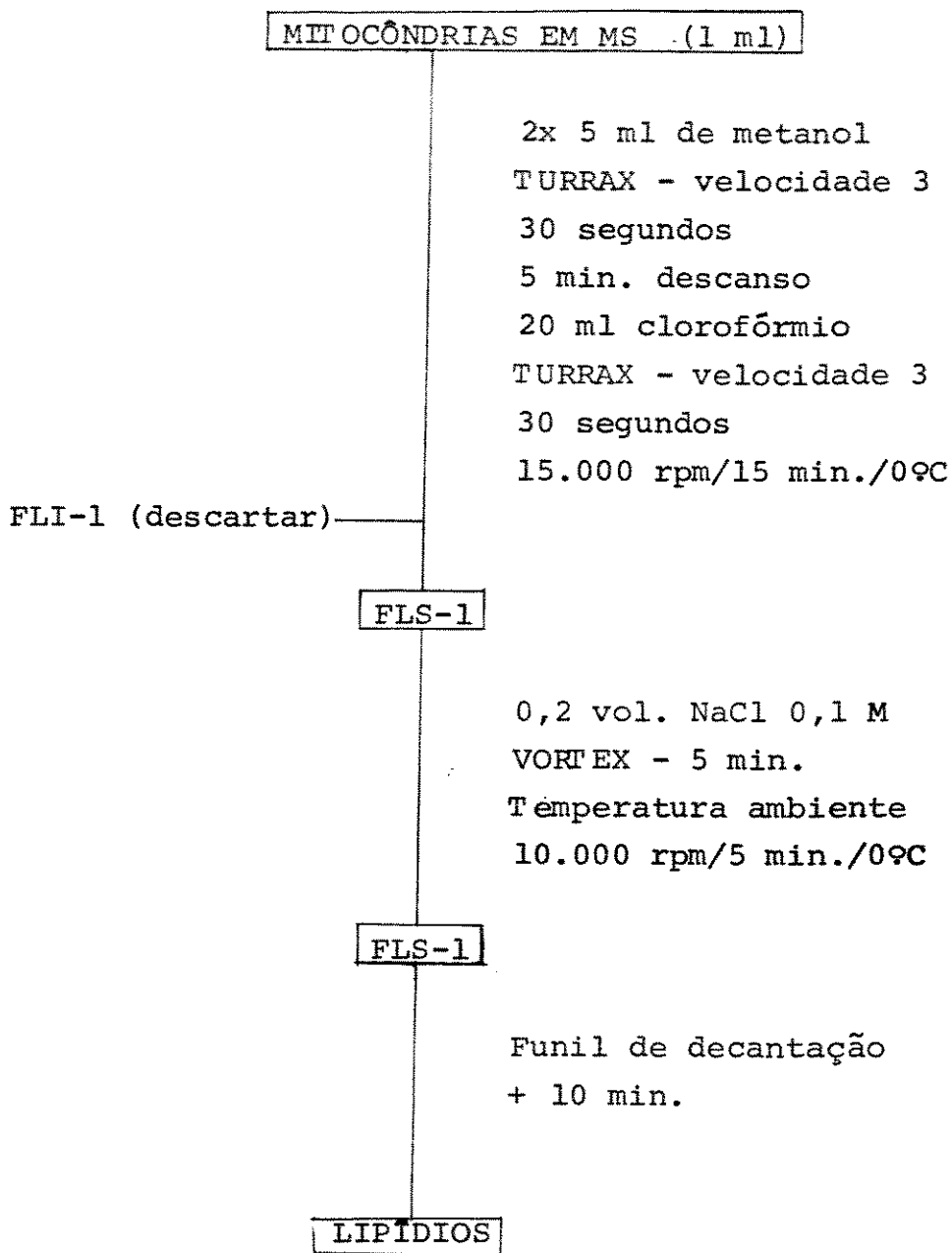
(\*) T.R. = Tempo de retenção em minutos.



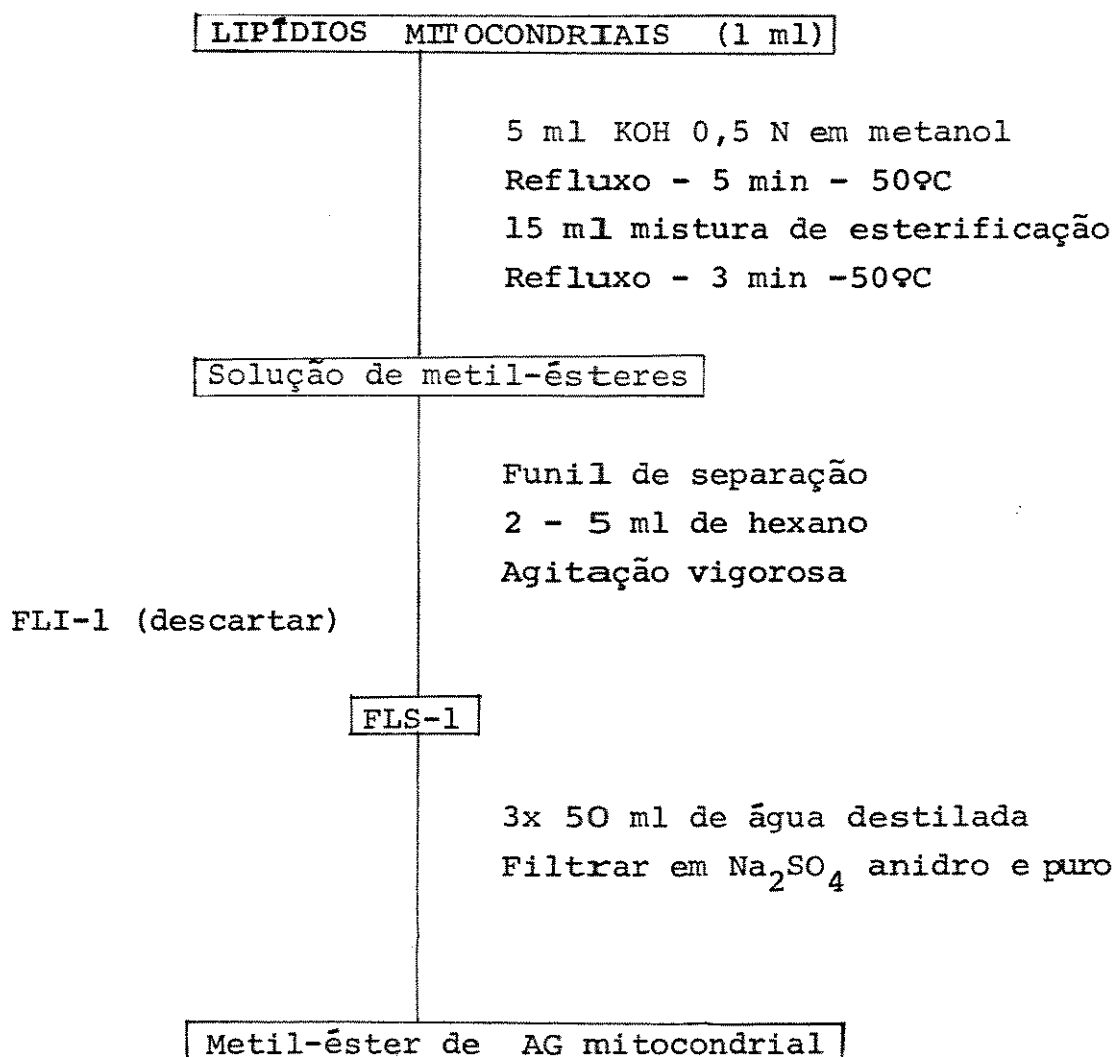
ESQUEMA 4 - OBTENÇÃO DO ÓLEO DE SARDINHA



ESQUEMA 5 - OBTENÇÃO DAS MITOCÔNDRIAS DO TECIDO MAMÁRIO.



ESQUEMA 6 - EXTRAÇÃO DOS LIPÍDIOS DAS MITOCÔNDRIAS DO TECIDO MAMÁRIO.



ESQUEMA 7 - PREPARAÇÃO DOS METIL-ÉSTERES DOS ÁCIDOS GRAXOS DOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. INGESTÃO DAS DIETAS E PESO CORPÓREO

A partir do momento da inoculação da emulsão placebo ou da emulsão contendo 20 mg de DMBA, respectivamente animais controles e tratados, os mesmos foram passados da ração normal de biotério (0,35% de gordura animal de origem bovina : 29,7% de gordura originária de diferentes vegetais), para as dietas contendo 12% de lipídios totais. A dieta com 12% de óleo de semente de girassol continha, 57% de ácido linoléico : 0,5% de ácido linolênico : 2,4% de outros AGPI n-6, enquanto que a de óleo de sardinha continha, 4,7% de ácido linoléico:2,2% de ácido linolênico : 19,5 % de outros AGPI n-3 (TABELA 3).

Três vezes por semana, foi feito o acompanhamento da quantidade de ração ingerida pelos grupos de animais, bem como a determinação do peso corpóreo dos animais de cada grupo experimental (30 ou 63 dias).

Nos grupos de animais de 30 dias de experimento e alimentados com a dieta óleo de semente de girassol, não foram

observadas nenhuma alteração significativa na ingestão da dieta pelos animais. Os controles ingeriram em média 10,9 g, enquanto que os tratados com o DMBA ingeriram em média 10,5 g (TABELA 4 e FIGURA 1). Este fato, também foi observado com relação ao peso corpóreo, já que os animais controles apresentaram ao final dos 30 dias de experimento, peso médio de 164,3 g, enquanto que os tratados tinham peso médio de 167,9 g (TABELA 5 e FIGURA 1). Ainda com relação a esta dieta, foi observado que durante os 63 dias de experimento, os animais tratados ingeriram menor quantidade da dieta (valor médio de 10,4 g), quando comparados com os animais controles (valor médio de 12,1 g), mas esta diferença não foi significativa (TABELA 6 e FIGURA 2) e que os animais controles apresentaram peso médio de 166,0 g, enquanto os tratados pesaram em média 171,9 g, valor este também não significativo (TABELA 7 e FIGURA 2).

Nos grupos de animais de 30 dias de experimento e alimentados com a dieta óleo de sardinha, não foi observado nenhuma alteração significativa na ingestão da dieta. Os animais controles ingeriram em média 9,6 g da dieta, enquanto que os tratados ingeriram em média 9,1 g da dieta (TABELA 8 e FIGURA 3). Todavia, houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no peso corpóreo dos animais tratados e alimentados com esta dieta (peso médio de 154,4 g), quando comparados com os seus respectivos controles, os quais apresentaram um peso médio de 133,0 g (TABELA 9 e FIGURA 3). Ainda com relação a esta dieta, foi observado que durante os 63 dias de experimento, os animais tratados ingeriram em média 11,1 g da dieta, enquanto que os seus controles ingeriram em média 10,9 g, valor este não significativo (TABELA 10 e FIGURA 4) e que os animais controles apresentaram um peso médio de 166,7 g, enquanto que os tratados tiveram um peso médio de 170,1 g, diferença esta também não significativa (TABELA 11 e FIGURA 4).

TABELA 4 - VALOR MÉDIO DA INGESTÃO (g/dia) DA DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL DO GRUPO DE ANIMAIS, DURANTE 30 DIAS.

<u>TEMPO</u>	<u>GRUPO</u>	<u>DE</u>	<u>ANIMAIS</u>
<u>DIAS</u>	<u>CONTROLES</u>		<u>TRATADOS</u>
1	10,0		6,5
3	10,4		8,6
7	13,0		11,4
9	9,2		9,6
11	7,7		9,2
14	13,2		11,8
16	11,1		10,9
18	11,4		10,0
21	9,4		11,7
23	10,7		10,8
25	10,4		12,1
28	11,9		13,1
30	13,9		10,0
$\bar{x}$	19,9 ± 1,7		10,5 ± 1,7

ANIMAIS CONTROLES: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão placebo.

ANIMAIS TRATADOS: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão contendo 20 mg DMBA.



TABELA 5 - MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DO PESO CORPÓREO (g) DOS ANIMAIS ALIMENTADOS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL, DURANTE 30 DIAS.

<u>TEMPO</u>	<u>GRUPO</u>	<u>DE</u>	<u>ANIMAIS</u>
<u>DIAS</u>	<u>CONTROLES</u>		<u>TRATADOS</u>
0	136,0 ± 21,9		145,4 ± 15,6
1	139,8 ± 19,8		143,3 ± 14,2
3	146,6 ± 24,0		146,1 ± 18,0
7	154,5 ± 23,4		147,1 ± 21,5
9	159,2 ± 22,2		159,0 ± 16,9
11	163,1 ± 16,9		159,6 ± 16,9
14	169,0 ± 23,1		167,6 ± 19,4
16	169,5 ± 23,9		171,2 ± 18,9
18	171,2 ± 24,8		176,4 ± 19,8
21	174,2 ± 23,5		180,8 ± 19,4
23	176,7 ± 25,5		184,0 ± 8,6
25	176,6 ± 23,4		186,0 ± 17,9
28	181,1 ± 24,6		190,4 ± 18,2
30	183,3 ± 25,3		194,4 ± 19,4
$\bar{x}$	164,3 ± 15,1		167,9 ± 18,0

ANIMAIS CONTROLES: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão placebo.

ANIMAIS TRATADOS: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão contendo 20 mg DMBA.

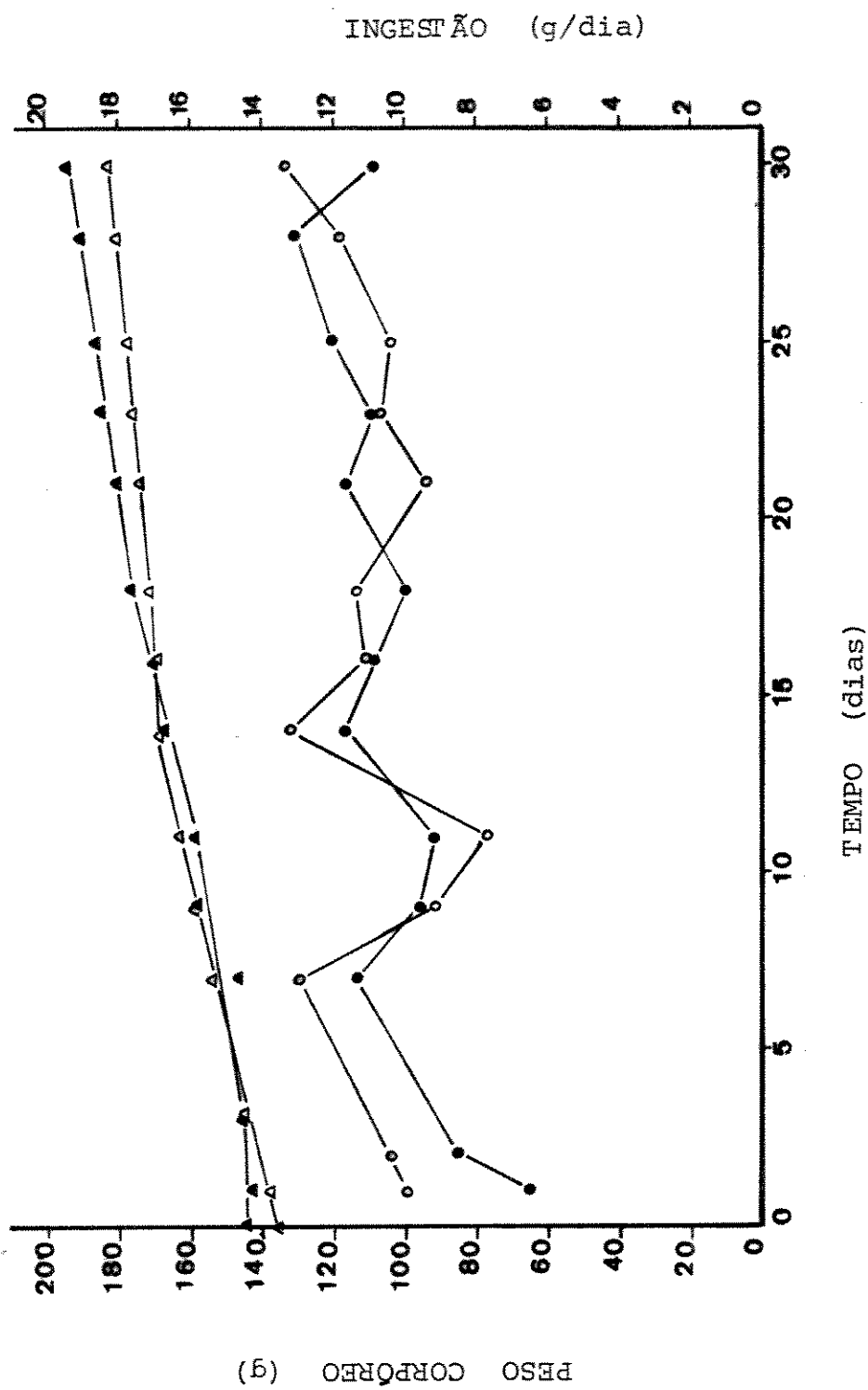


FIGURA 1 - INGESTÃO DA DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL (g/dia) PELOS ANIMAIS CONTROLES (o — o) E TRATADOS COM DMBA (● — ●) E GANHO DE PESO CORPÓREO (g) DOS ANIMAIS CONTROLES (Δ — Δ) E TRATADOS (▲ — ▲), DURANTE 30 DIAS

TABELA 6 - VALOR MÉDIO DA INGESTÃO (g/dia) DA DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL DO GRUPO DE ANIMAIS , DURANTE 63 DIAS.

<u>TEMPO</u>	<u>GRUPO</u>	<u>DE</u>	<u>ANIMAIS</u>
<u>DIAS</u>	<u>CONTROLES</u>		<u>T RAT ADOS</u>
1	12,9		7,9
3	11,5		9,2
7	13,6		12,8
9	6,6		7,9
11	8,5		10,6
14	14,8		15,1
16	11,7		10,1
18	11,9		10,5
21	11,1		10,5
23	16,4		9,1
25	7,5		8,4
28	18,4		11,3
30	12,5		10,2
32	13,3		9,5
36	7,6		5,8
37	13,1		10,5
39	11,7		10,3
41	13,4		10,7
43	4,9		4,7
45	11,8		6,5
48	15,3		16,5
50	14,6		11,0
52	12,6		6,1
55	8,2		12,4
57	15,5		15,0
59	16,3		16,1
63	11,6		12,3
$\bar{x}$	12,1 ± 3,2		10,4 ± 3,0

ANIMAIS CONTROLES: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão placebo.

ANIMAIS TRATADOS: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão contendo 20 mg DMBA.

TABELA 7 - MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DO PESO CORPÓREO (g) DOS ANIMAIS ALIMENTADOS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL, DURANTE 63 DIAS.

<u>TEMPO</u>	<u>GRUPO</u>	<u>DE</u>	<u>ANIMAIS</u>
<u>DIAS</u>	<u>CONTROLES</u>		<u>TRATADOS</u>
0	112,0 ± 20,2		126,1 ± 16,4
1	114,5 ± 22,3		128,2 ± 17,9
3	121,2 ± 21,8		132,2 ± 16,9
7	129,7 ± 24,4		139,1 ± 19,9
9	137,8 ± 25,4		144,7 ± 9,8
11	140,3 ± 24,1		150,9 ± 10,3
14	143,8 ± 23,9		154,0 ± 12,7
16	150,6 ± 24,4		159,0 ± 13,7
18	153,4 ± 23,3		162,4 ± 13,2
21	159,5 ± 25,5		161,6 ± 15,0
23	163,0 ± 25,2		167,7 ± 14,4
25	162,4 ± 25,1		164,7 ± 14,5
28	170,8 ± 25,3		174,0 ± 13,7
30	171,3 ± 24,6		176,6 ± 14,2
32	175,8 ± 24,8		179,8 ± 12,8
36	181,4 ± 23,9		184,3 ± 13,2
37	183,3 ± 24,1		187,3 ± 13,7
39	186,1 ± 23,4		187,7 ± 12,4
41	185,7 ± 26,3		190,9 ± 12,9
43	176,2 ± 23,8		175,6 ± 12,1
45	190,6 ± 27,8		187,4 ± 14,5
48	192,9 ± 28,7		195,6 ± 14,6
50	190,2 ± 23,8		200,8 ± 14,1
52	191,7 ± 24,2		206,6 ± 17,0
55	184,8 ± 21,0		198,0 ± 12,1
58	191,7 ± 23,9		192,0 ± 11,3
60	194,8 ± 25,2		192,7 ± 11,4
63	194,8 ± 25,2		192,7 ± 11,4
$\bar{X}$	166,0 ± 25,8		171,9 ± 23,2

ANIMAIS CONTROLES: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão placebo.

ANIMAIS TRATADOS: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão contendo 20 mg DMBA.

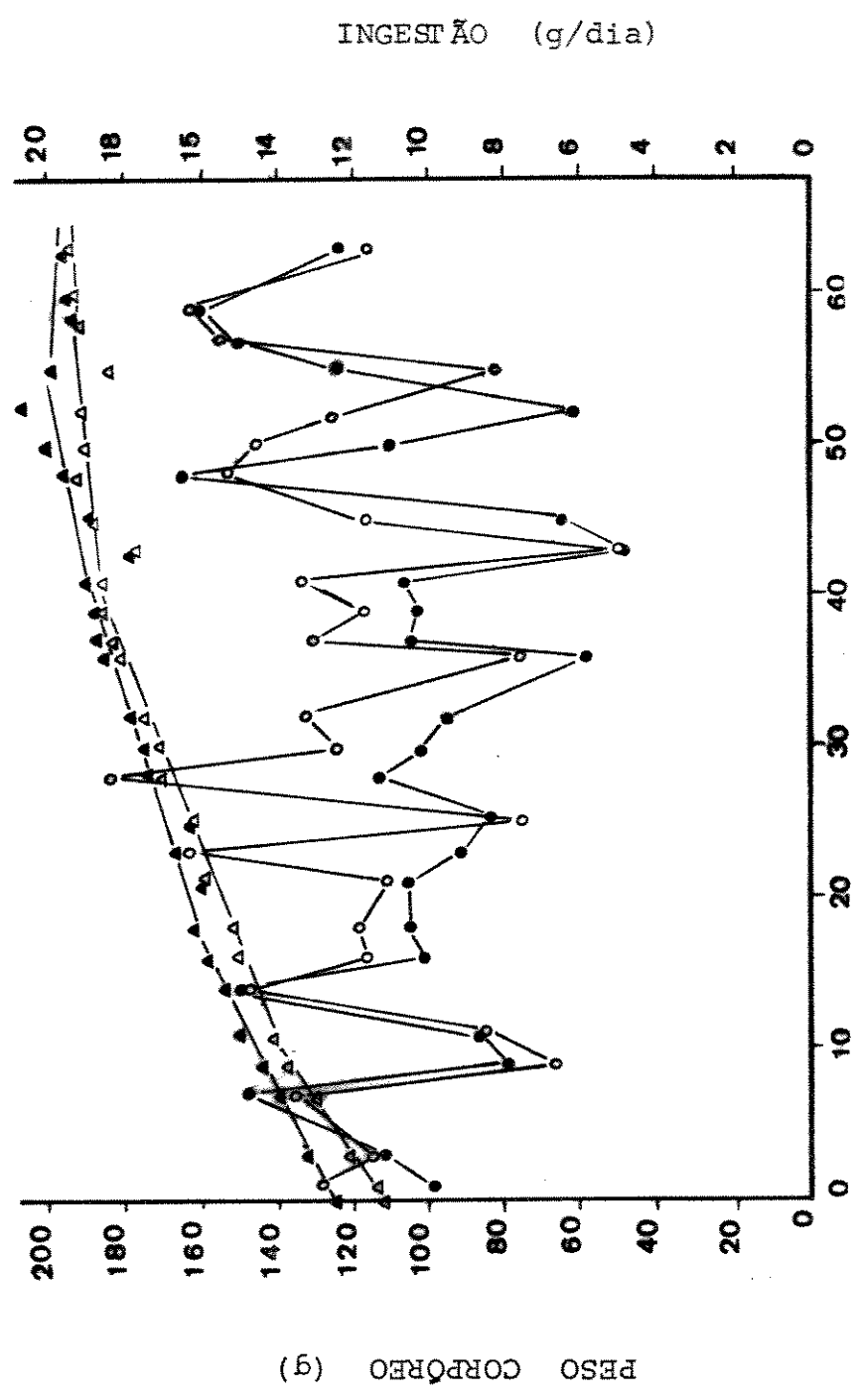


FIGURA 2 - INGESTÃO DA DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL (g/dia) PELOS ANIMAIS CONTROLES (○ — ○) E TRATADOS COM DMBA (● — ●) E GANHO DE PESO CORPÓREO (g) DOS ANIMAIS CONTROLES (▲ — ▲) E TRATADOS (▲ — ▲), DURANTE 63 DIAS

TEMPO (dias)

INGESTÃO (g/dia)

PESO CORPÓREO (g)

TABELA 8 - VALOR MÉDIO DA INGESTÃO (g/dia) DA DIETA ÓLEO DE SARDINHA DO GRUPO DE ANIMAIS, DURANTE 30 DIAS.

<u>TEMPO</u>	<u>GRUPO</u>	<u>DE</u>	<u>ANIMAIS</u>
<u>DIAS</u>	<u>CONTROLES</u>		<u>TRATADOS</u>
2	8,6		8,9
4	11,8		5,7
7	9,9		10,3
9	8,4		9,4
11	9,6		9,5
14	9,3		13,1
16	9,8		9,0
18	8,0		8,4
22	10,1		8,9
23	9,7		9,1
25	9,8		9,3
28	13,9		10,2
30	5,9		6,5
$\bar{x}$	9,6 ± 1,8		9,1 ± 1,7

ANIMAIS CONTROLES: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão placebo .

ANIMAIS TRATADOS: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão contendo 20 mg DMBA.

TABELA 9 - MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DO PESO CORPÓREO (g) DOS ANIMAIS ALIMENTADOS COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA, DURANTE 30 DIAS.

<u>TEMPO</u>	<u>GRUPO</u>	<u>DE</u>	<u>ANIMAIS</u>
<u>DIAS</u>	<u>CONTROLES</u>		<u>TRATADOS</u>
0	96,8 ± 7,2		136,6 ± 10,2
2	103,6 ± 6,4		110,2 ± 26,2
4	95,1 ± 5,9		131,0 ± 19,6
7	114,8 ± 6,2		134,2 ± 24,2
9	119,7 ± 6,4		144,1 ± 17,2
11	126,6 ± 7,8		149,2 ± 18,1
14	134,5 ± 8,8		155,5 ± 18,8
16	141,4 ± 9,0		159,9 ± 18,5
18	146,8 ± 11,0		168,0 ± 17,4
22	153,6 ± 10,1		172,4 ± 14,5
23	152,9 ± 10,0		172,7 ± 14,7
25	153,4 ± 11,5		172,2 ± 14,7
28	166,0 ± 11,7		183,5 ± 15,1
30	157,3 ± 5,7		173,0 ± 11,7
$\bar{x}$	133,0 ± 23,7		154,4 ± 21,0

ANIMAIS CONTROLES: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão placebo.

ANIMAIS TRATADOS: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão contendo 20 mg DMBA.

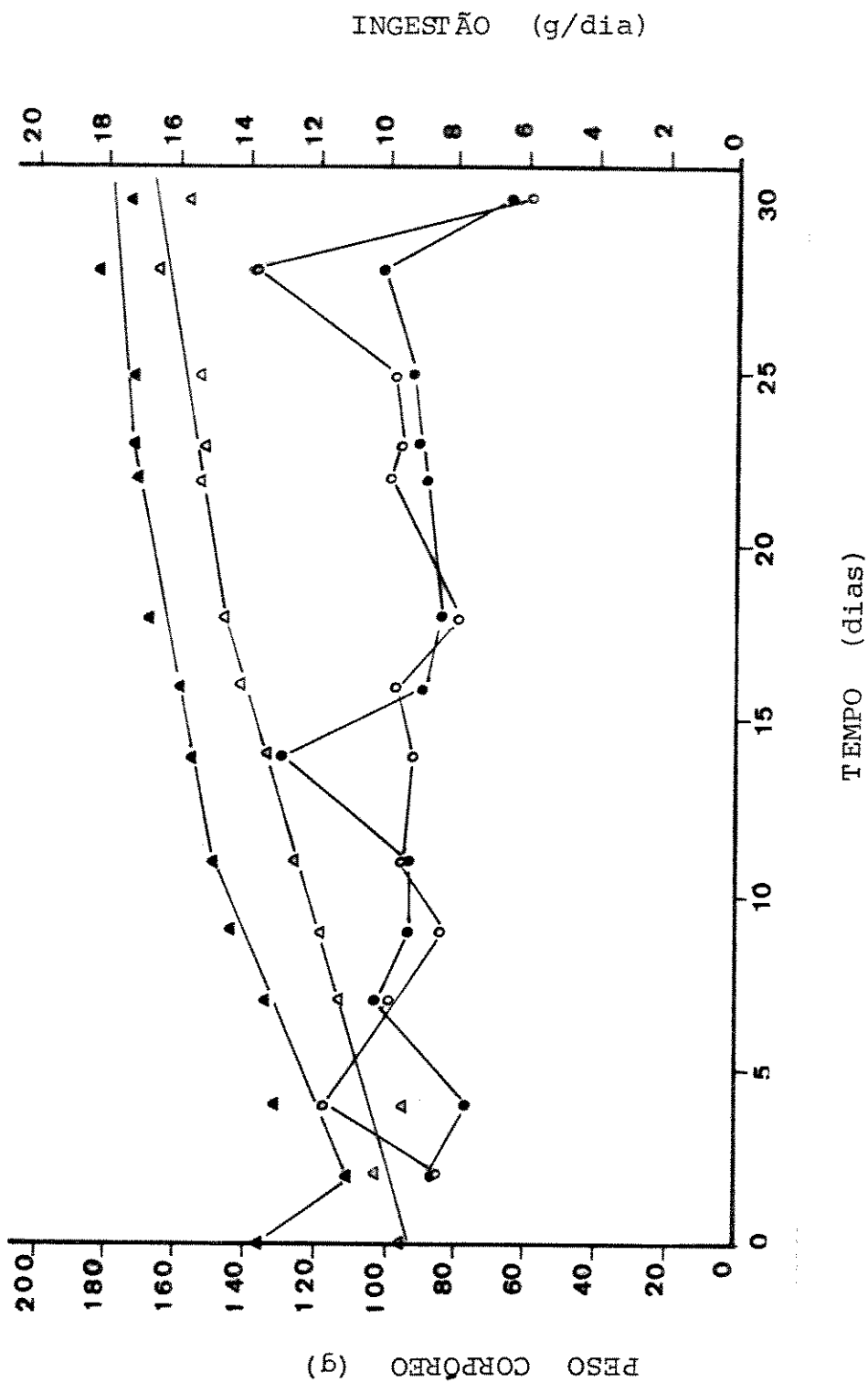


FIGURA 3 - INGESTÃO DA DIETA ÓLEO DE SARDINHA (g/dia) PELOS ANIMAIS CONTROLES (○) E TRATADOS COM DMBA (●) E GANHO DE PESO CORPÓREO (g) DOS ANIMAIS CONTROLES (△) E TRATADOS (▲), DURANTE 30 DIAS



TABELA 10 -VALOR MÉDIO DA INGESTÃO (g/dia) DA DIETA ÓLEO DE SARDINHA DO GRUPO DE ANIMAIS , DURANTE 63 DIAS.

<u>TEMPO</u>	<u>GRUPO</u>	<u>DE</u>	<u>ANIMAIS</u>
<u>DIAS</u>	<u>CONTRÓLES</u>		<u>TRATADOS</u>
1	10,6		7,8
3	10,9		6,7
6	14,2		12,0
8	11,2		8,7
10	11,9		11,1
13	11,0		10,2
15	13,4		8,9
17	9,8		10,0
20	13,2		10,9
22	6,7		10,5
24	9,7		9,6
28	11,3		11,4
29	10,9		10,6
34	8,9		8,0
36	6,3		9,7
38	5,5		4,7
41	14,7		15,8
43	15,3		15,6
45	7,3		7,7
48	10,8		11,9
50	11,7		11,9
52	13,4		15,0
55	10,7		13,7
57	12,7		16,9
59	10,2		12,4
63	12,0		17,4
-			
X	10,9 ± 2,5		11,1 ± 3,1

ANIMAIS CONTRÓLES: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão placebo.

ANIMAIS TRATADOS: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão contendo 20 mg DMBA.

TABELA 11 - MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DO PESO CORPÓREO (g) DOS ANIMAIS ALIMENTADOS COM A DIETA ÓLEO DE SAR - DINHA, DURANTE 63 DIAS.

<u>TEMPO</u>	<u>GRUPO</u>	<u>DE</u>	<u>ANIMAIS</u>
<u>DIAS</u>	<u>CONTROLES</u>		<u>TRATADOS</u>
0	112,1 ± 15,9		126,2 ± 16,8
1	113,8 ± 16,4		122,2 ± 15,4
3	120,0 ± 15,3		126,0 ± 13,8
6	125,2 ± 18,4		129,4 ± 22,8
8	132,0 ± 17,2		138,6 ± 15,5
10	138,9 ± 16,8		143,1 ± 16,3
13	144,2 ± 15,9		146,4 ± 14,7
15	150,5 ± 15,9		153,6 ± 19,7
17	153,2 ± 16,0		151,5 ± 15,6
20	155,7 ± 15,6		162,0 ± 14,8
22	161,3 ± 16,2		161,3 ± 17,0
24	160,8 ± 12,4		163,4 ± 7,2
28	169,5 ± 21,4		173,4 ± 17,1
29	175,8 ± 19,5		178,1 ± 17,9
30	173,3 ± 18,1		179,6 ± 18,8
34	177,3 ± 19,8		182,9 ± 19,5
36	185,3 ± 21,0		183,4 ± 17,8
38	182,2 ± 20,7		182,6 ± 20,8
41	178,3 ± 28,5		189,4 ± 19,3
43	193,1 ± 22,5		193,4 ± 21,0
45	194,3 ± 22,3		192,8 ± 21,0
48	191,0 ± 21,1		191,4 ± 20,6
50	195,3 ± 22,5		195,4 ± 20,3
52	195,8 ± 22,7		195,9 ± 19,8
55	187,4 ± 25,0		196,6 ± 19,6
57	203,8 ± 22,4		204,4 ± 20,5
59	197,4 ± 22,8		201,4 ± 21,7
63	220,5 ± 23,3		201,1 ± 21,4
$\bar{x}$	166,7 ± 28,1		170,1 ± 26,2

ANIMAIS CONTROLES: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão placebo.

ANIMAIS TRATADOS: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão contendo 20 mg DMBA.

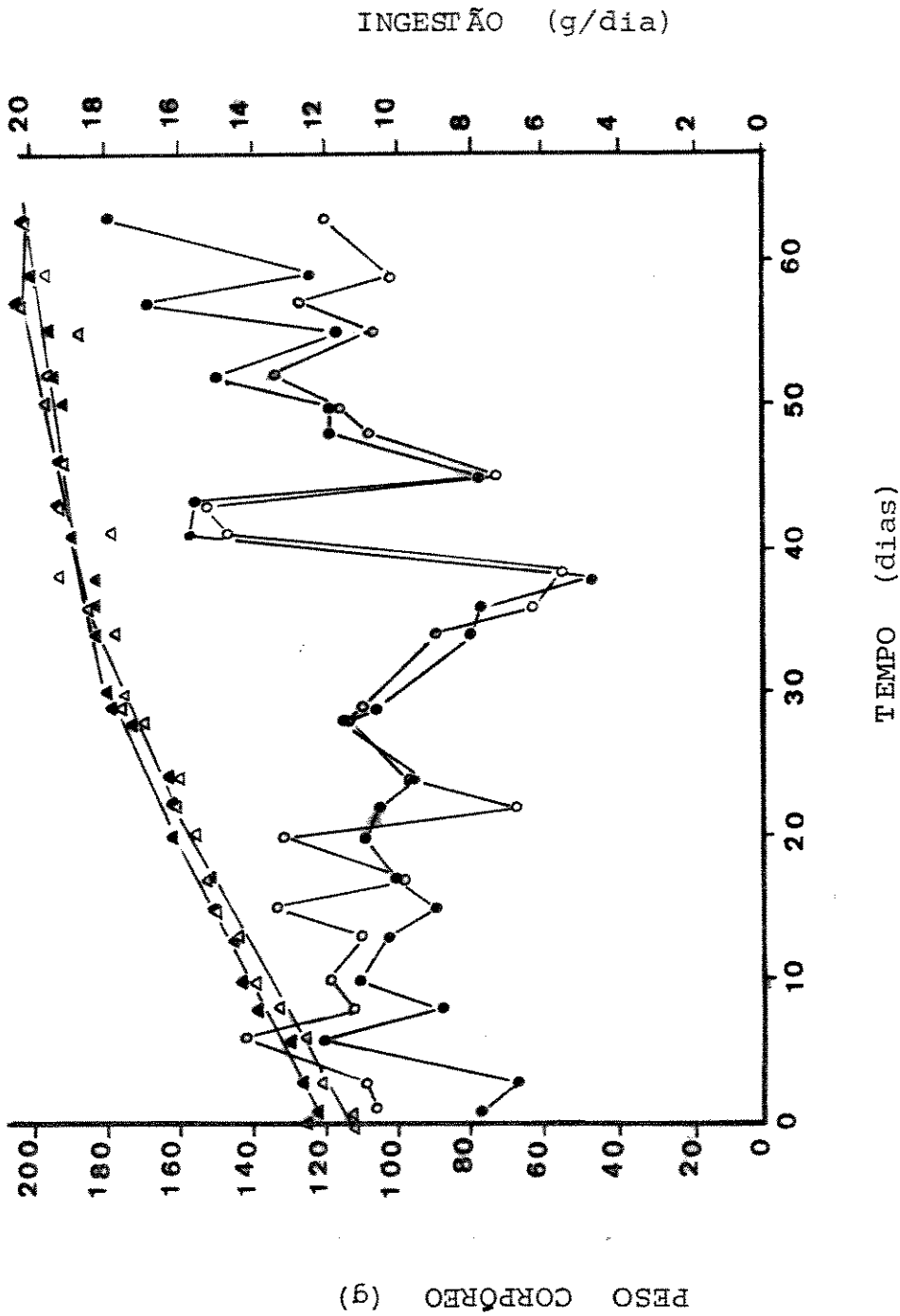


FIGURA 4 - INGESTÃO DA DIETA ÓLEO DE SARDINHA (g/dia) PELOS ANIMAIS CONTROLES (○) E TRATADOS COM DMEB (●) E GANHO DE PESO CORPÓREO (g) DOS ANIMAIS CONTROLES (△) E TRATADOS (▲), DURANTE 63 DIAS

## 4.2. ANÁLISES HISTOLÓGICAS

### 4.2.1. TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL OU DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 DIAS.

No grupo de animais controles, alimentados com a dieta óleo de semente de girassol após 30 dias de experimento, foram obtidos os seguintes padrões histológicos: ducto revestido por células epiteliais, recobertas por células mioepiteliais (FIGURA 5a) e ducto hiperplásico com luz central patente ou com obliteração da luz central (FIGURA 5b).

No grupo de animais controles, alimentados com a dieta óleo de sardinha após 30 dias de experimento, foram obtidos os seguintes padrões histológicos: ducto revestido por células epiteliais, recobertas por células mioepiteliais (FIGURA 5c) e ducto com discreta hiperplasia epitelial (FIGURA 5d).

Estes resultados, mostraram que os animais alimentados com a dieta óleo de semente de girassol, quando comparados com os alimentados com a dieta óleo de sardinha, apresentaram um padrão de hiperplasia do tecido mamário mais severo (FIGURA 5b).

### 4.2.2. TECIDO MAMÁRIO DAS RATAS TRATADAS ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL OU DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 DIAS.

No grupo de animais tratados com DMBA e alimentados com a dieta óleo de semente de girassol após 30 dias de experimento, foram obtidos os seguintes padrões histológicos: ducto com discreta hiperplasia epitelial (FIGURA 6a) ou ducto com intensa hiperplasia epitelial do tipo HEB (FIGURA 6b).

No grupo de animais tratados e alimentados com a dieta óleo de sardinha após 30 dias de experimento, foram obtidos os seguintes padrões histológicos: ducto com discreta hiperplasia epitelial do tipo HEB (FIGURA 6c) ou nódulo alveolar hiperplásico do tipo HAN (FIGURA 6d).

Estes resultados, demonstraram que o tratamento dos animais com o DMBA, em ambas as dietas, provocou o apare

cimento de padrões histológicos que variaram desde as hiperplasias discretas (FIGURA 6a) até as mais severas, como as do tipo HEB (FIGURA 6b e 6c) ou as do tipo HAN (FIGURA 6b).

#### **4.2.3. TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES E TRATADAS ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL OU DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 63 DIAS.**

No grupo de animais controles alimentados com a dieta óleo de semente de girassol após 63 dias de experimento, foi obtido o seguinte padrão histológico: ducto com discreta hiperplasia do tipo HEB (FIGURA 7a). No grupo de animais tratados com o DMBA, alimentados com a mesma dieta e no mesmo tempo experimental, foi obtido o seguinte padrão histológico: nódulo alveolar hiperplásico do tipo HAN (FIGURA 6b).

No grupo de animais controles alimentados com a dieta óleo de sardinha após 63 dias de experimento, foi obtido o seguinte padrão histológico: ducto revestido por células epiteliais, recobertas por células mioepiteliais (FIGURA 7c). No grupo de animais tratados com DMBA, alimentados com a mesma dieta e no mesmo tempo experimental, foi obtido o seguinte padrão histológico: ducto com vacuolização citoplasmática por atividade secretora (FIGURA 7d).

Estes resultados, demonstraram que aqueles animais, controles ou tratados com DMBA, alimentados com a dieta óleo de semente de girassol após 63 dias de experimento, apresentaram alterações histológicas mais severas do que os que se alimentaram com a dieta óleo de sardinha no mesmo período de tempo.



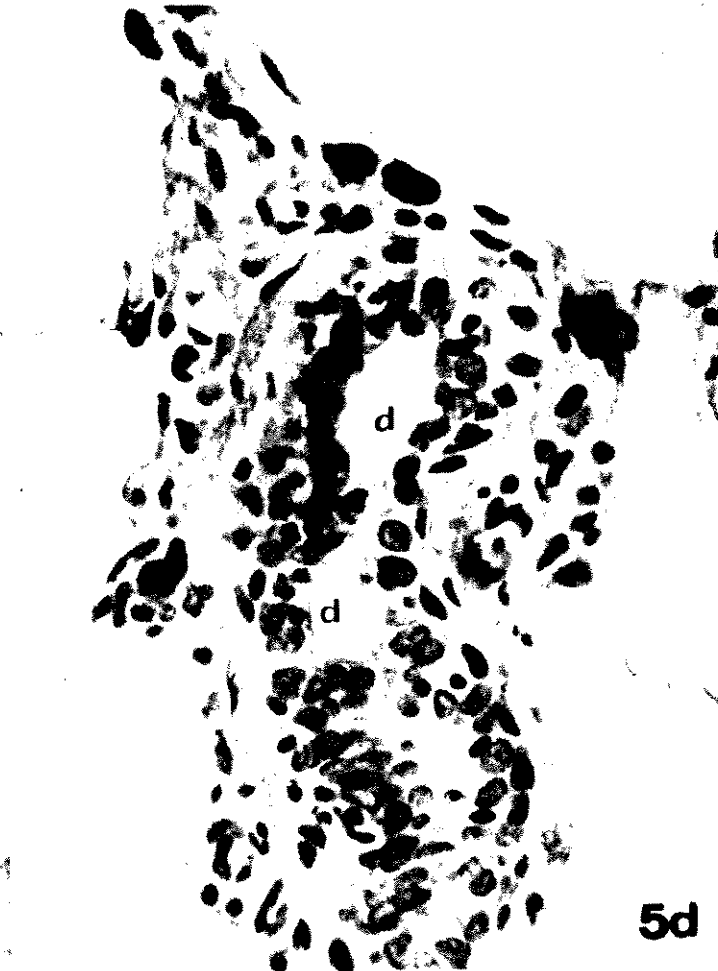
5a



5b



5c



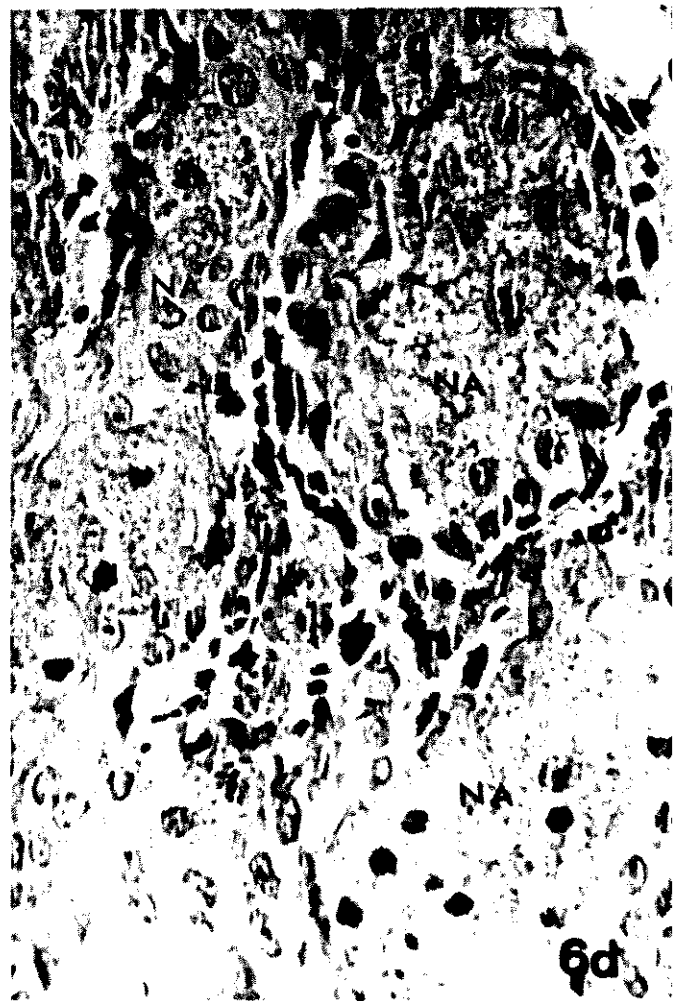
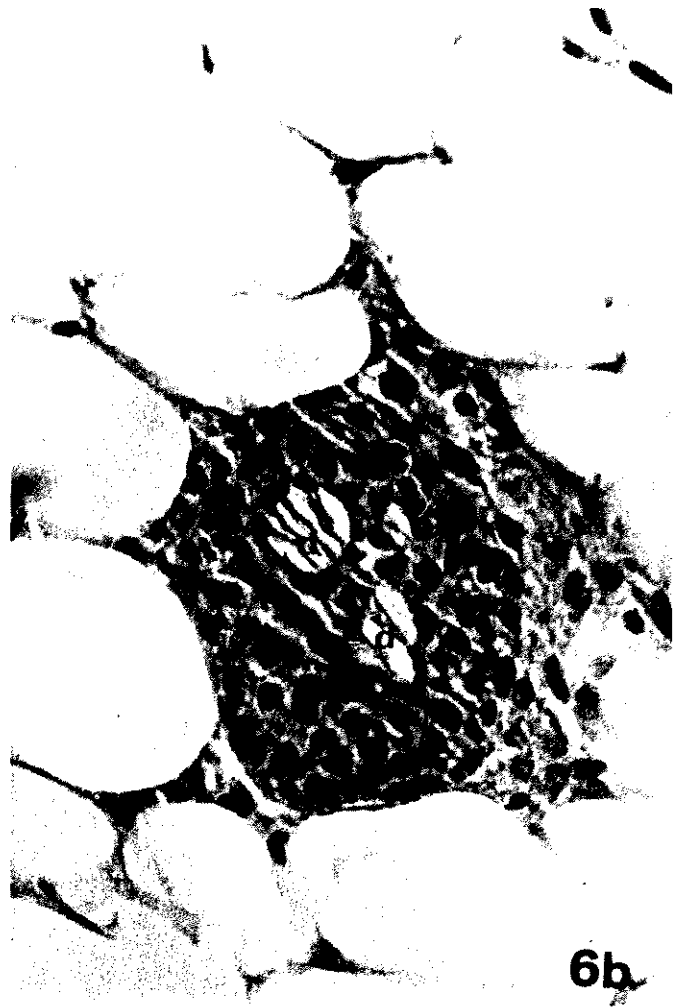
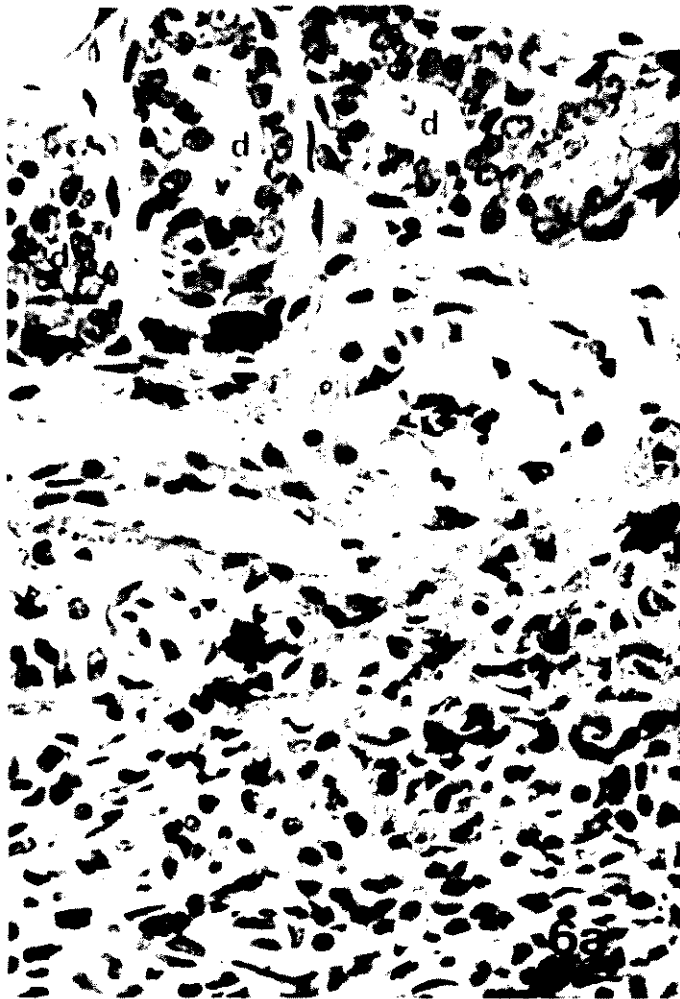
5d

FIGURA 5a - RATA CONTROLE, ALIMENTADA COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL APÓS 30 DIAS. DUCTO (d) REVESTIDO POR CÉLULAS EPITELIAIS ( ↓ ), RECOBERTA POR CÉLULAS MIOEPITELIAIS ( ↓↓ ). H.E. (400X).

FIGURA 5b - RATA CONTROLE, ALIMENTADA COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL APÓS 30 DIAS. DUCTO ( d ) HIPERPLÁSICO COM LUZ CENTRAL PATENTE (lado de baixo da foto) OU HIPERPLÁSICO COM OBLITERAÇÃO DA LUZ CENTRAL (lado de cima da foto) .H.E.(400X).

FIGURA 5c - RATA CONTROLE, ALIMENTADA COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 DIAS. DUCTO ( d ) REVESTIDO POR CÉLULAS EPITELIAIS ( ↓ ), RECOBERTA POR CÉLULAS MIOEPITELIAIS ( ↓↓ ). H.E. (400X).

FIGURA 5d- RATA CONTROLE, ALIMENTADA COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 DIAS. DUCTO ( d ) COM DISCRETA HIPERPLASIA EPITELIAL: H.E. (400X).





- FIGURA 6a - RATA TRATADA COM DMBA E ALIMENTADA COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL APÓS 30 DIAS. DUCTOS (d) COM DISCRETA HIPERPLASIA EPITELIAL (lado de cima da foto). H.E. (400X).
- FIGURA 6b - RATA TRATADA COM DMBA E ALIMENTADA COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL APÓS 30 DIAS. DUCTO (d) COM DISCRETA HIPERPLASIA EPITELIAL DO TIPO HEB. H.E. (400X).
- FIGURA 6c - RATA TRATADA COM DMBA E ALIMENTADA COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 DIAS. DUCTO (d) COM DISCRETA HIPERPLASIA EPITELIAL DO TIPO HEB. H.E. (400X).
- FIGURA 6d - RATA TRATADA COM DMBA E ALIMENTADA COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 DIAS. NÓDULO ALVEOLAR (NA) HIPERPLÁSICO DO TIPO HAN. H.E. (400X).

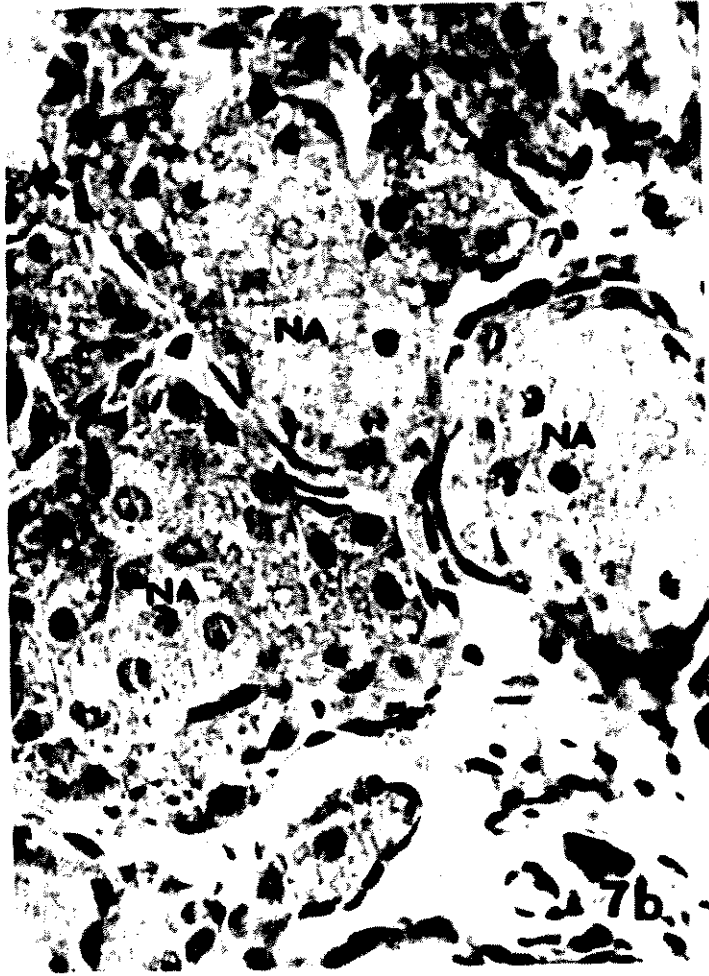


FIGURA 7a - RATA CONTROLE, ALIMENTADA COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL APÓS 63 DIAS. DUCTO (d) COM DISCRETA HIPERPLASIA DO TIPO HEB. H.E. (400X).

FIGURA 7b - RATA TRATADA COM DMBA E ALIMENTADA COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL APÓS 63 DIAS. NÓDULO ALVEOLAR (NA) HIPERPLÁSICO DO TIPO HAN.H.E. (400X).

FIGURA 7c - RATA CONTROLE, ALIMENTADA COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 63 DIAS. DUCTO (d) REVESTIDO POR CÉLULAS EPITELIAIS (↓), RECOBERTAS POR CÉLULAS MIOEPITELIAIS (↓↓). H.E. (400X).

FIGURA 7d - RATA TRATADA COM DMBA E ALIMENTADA COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 63 DIAS. DUCTO (d) COM VACUOLIZAÇÃO CITOPLASMÁTICA (VC) POR ATIVIDADE SECRETORA. H.E. (400X).

#### 4.3. ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ATPASE MITOCONDRIAL DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES OU TRATADAS COM DMBA.

##### 4.3.1. RATAS ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL.

As mitocôndrias do tecido mamário das ratas tratadas com o DMBA e alimentadas com a dieta óleo de semente de girassol após os 30 dias de experimento, apresentaram uma atividade específica da ATPase 92% superior ao seu respectivo controle (TABELA 12 e FIGURA 8), valor este significativo ao nível de 1% (TABELA 13). Após os 63 dias, a atividade específica desta enzima no tecido mamário das ratas tratadas com o DMBA e alimentadas com a mesma dieta, foi 88% superior ao seu respectivo controle (TABELA 12 e FIGURA 8), valor este significativo ao nível de 1% (TABELA 13).

Ratas controles após 63 dias de experimento alimentadas com esta dieta, apresentaram a atividade específica da ATPase mitocondrial do tecido mamário 134% superior às ratas controles de 30 dias de experimento (TABELA 12 e FIGURA 8), valor este significativo ao nível de 1% (TABELA 13). Quando foi comparado a atividade enzimática específica da ATPase do tecido mamário das ratas tratadas, alimentadas com esta dieta após os 63 dias de experimento com a das ratas controles após os 30 dias de experimento, notou-se que a atividade específica desta enzima no tecido mamário das ratas tratadas com o DMBA após os 63 dias foi 342% superior a das ratas controles após os 30 dias de experimento (TABELA 12 e FIGURA 8), valor este significativo ao nível de 1% (TABELA 13). Do mesmo modo, quando foi comparada a atividade específica desta enzima no tecido mamário de ratas tratadas com DMBA e alimentadas com esta dieta após os 63 dias de experimento e a das ratas tratadas com DMBA e alimentadas com a dieta após os 30 dias de experimento, foi observado que as ratas tratadas com o DMBA e após os 63 dias, apresentaram uma atividade específica da enzima 130% superior a das tratadas após os 30 dias de experimento (TABELA 12 e FIGURA 8), valor significativo ao nível de 1% (TABELA 13).

TABELA 12 - ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ATPase MITOCONDRIAL DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL, APÓS 30 OU 63 DIAS.

	TEMPO (DIAS)			
	30		63	
	CONTROLES	TRATADOS	CONTROLES	TRATADOS
A.E.	17,2 ± 6,4 (16)	33,1 ± 21,4 (16)	40,3 ± 12,0 (8)	76,0 ± 19,2 (7)

A.E. = atividade específica ( $\mu\text{g Pi liberado/mg prote\u00edna/min. a } 37^{\circ}\text{C}$ ).

ANIMAIS CONTROLES: inoculados i.p. com 1 ml da emuls\u00e3o placebo.

ANIMAIS TRATADOS: inoculados i.p. com 1 ml da emuls\u00e3o contendo 20 mg DMBA.

( ) Os n\u00fameros entre par\u00eanteses indicam a quantidade de animais usados em cada experimento.

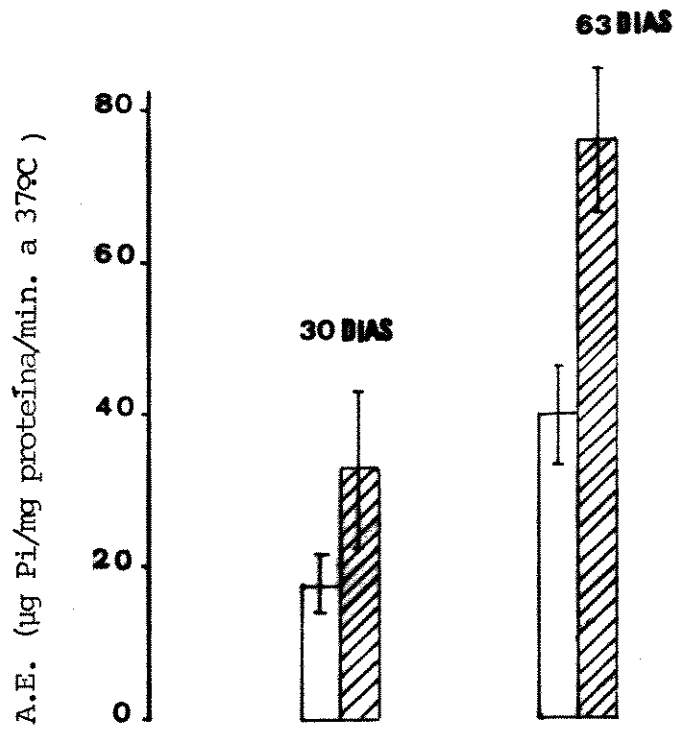


FIGURA 8 - ATIVIDADE ESPECÍFICA (A.E.) DA ATPase MITOCONDRIAL DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES ( □ ) E TRATADAS COM DMBA ( ▨ ), ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMEN E DE GIRASSOL APÓS 30 OU 63 DIAS.

TABELA 13 - TESTE DE STUDENT PARA COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ATPase MITOCONDRIAL DO TECIDO MAMÁ - RIO DE RATAS CONTROLES (C) OU TRATADAS COM O DMBA (T), ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL APÓS 30 OU 63 DIAS.

CONDIÇÕES DO TESTE	TEMPO (DIAS)			
	30		63	
	GL	t	GL	t
T <sub>30</sub> x C	30	2,74 <sup>(**)</sup>	14	3,94 <sup>(**)</sup>
C <sub>63</sub> x C <sub>30</sub>	-	-	22	4,81 <sup>(**)</sup>
T <sub>63</sub> x C <sub>30</sub>	-	-	22	8,22 <sup>(**)</sup>
T <sub>63</sub> x T <sub>30</sub>	-	-	22	4,22 <sup>(**)</sup>

(\*\*). Significativo ao nível de 1%.

#### 4.3.2. RATAS ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA.

As mitocôndrias do tecido mamário das ratas tratadas com o DMBA e alimentadas com a dieta óleo de sardinha, após os 30 dias de experimento, apresentaram uma atividade específica da ATPase 7% superior ao seu respectivo controle (TABELA 14 e FIGURA 9), valor este estatisticamente não significativo (TABELA 15). Após os 63 dias, a atividade específica desta enzima no tecido mamário das ratas tratadas com o DMBA e alimentadas com a mesma dieta, foi 18% superior ao seu respectivo controle (TABELA 14 e FIGURA 9), valor este também estatisticamente não significativo (TABELA 15).

Ratas controles após 63 dias de experimento e alimentadas com esta dieta, apresentaram a atividade específica da ATPase mitocondrial do tecido mamário 34% superior às ratas controles de 30 dias de experimento (TABELA 14 e FIGURA 9), valor este estatisticamente não significativo (TABELA 15). Quando foi comparado a atividade específica da ATPase do tecido mamário de ratas tratadas, alimentadas com esta dieta após 63 dias de experimento com a das ratas controles após os 30 dias de experimento, notou-se que a atividade específica desta enzima no tecido mamário das ratas tratadas com DMBA e alimentadas com esta dieta após os 63 dias de experimento foi 57% superior a das ratas controles após os 30 dias de experimento (TABELA 14 e FIGURA 9), valor este significativo ao nível de 1% (TABELA 15). Do mesmo modo, quando foi comparada a atividade específica desta enzima no tecido mamário de ratas tratadas com DMBA e alimentadas com esta dieta após os 63 dias de experimento e a das ratas tratadas com DMBA e alimentadas com esta dieta após os 30 dias de experimento, foi observado que as ratas tratadas com o DMBA e após os 63 dias, apresentaram uma atividade específica da enzima 47% superior às tratadas após os 30 dias de experimento (TABELA 14 e FIGURA 9), valor este significativo ao nível de 1% (TABELA 15).



TABELA 14 - ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ATPase MITOCONDRIAL DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA, APÓS 30 OU 63 DIAS.

	TEMPO (DIAS)			
	30		63	
	<u>CONTROLES</u>	<u>TRATADOS</u>	<u>CONTROLES</u>	<u>TRATADOS</u>
A.E.	37,6 ± 9,2 (14)	40,2 ± 16,0 (14)	50,3 ± 25,8 (8)	59,2 ± 15,3 (7)

A.E. = atividade específica ( $\mu\text{g}$  de Pi liberado/mg proteína/min. a 37°C).

ANIMAIS CONTROLES: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão placebo.

ANIMAIS TRATADOS: inoculados i.p. com 1 ml da emulsão contendo 20 mg DMBA.

( ) Os números entre parênteses indicam a quantidade de animais usados em cada experimento.

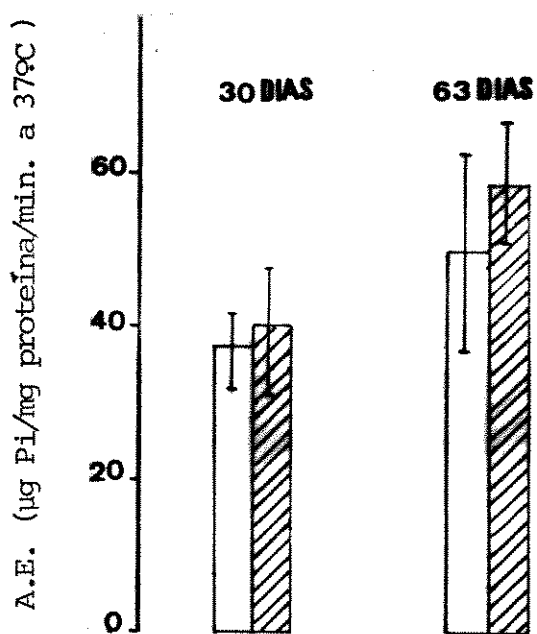


FIGURA 9 - ATIVIDADE ESPECÍFICA (A.E.) DA ATPase MITOCONDRIAL DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES ( □ ) E TRATADAS COM DMBA ( ▨ ), ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 OU 63 DIAS.

TABELA 15 - TESTE DE STUDENT PARA COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ATPase MITOCONDRIAL DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES (C) OU TRATADAS COM DMBA (T), ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 OU 63 DIAS.

CONDIÇÕES DO TESTE	TEMPO (DIAS)			
	30		63	
	GL	t	GL	t
T x C	26	0,47	13	0,62
C <sub>63</sub> x C <sub>30</sub>	-	-	20	1,30
T <sub>63</sub> x C <sub>30</sub>	-	-	19	3,20 (**)
T <sub>63</sub> x T <sub>30</sub>	-	-	19	2,81 (**)

(\*\*) Significativo ao nível de 1%.

**4.4. COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA ATPase MITOCONDRIAL DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES OU TRATADAS COM DMBA, ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL OU COM DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 OU 63 DIAS.**

O grupo de animais controles alimentados com a dieta óleo de sardinha após os 30 dias de experimento apresentaram uma atividade específica da ATPase mitocondrial do tecido mamário 118% superior aos controles alimentados com a dieta óleo de semente de girassol (FIGURA 10), valor este significativo ao nível de 1% (TABELA 16), enquanto que após os 63 dias de experimento, os animais alimentados com a dieta óleo de sardinha, apresentaram a atividade específica da enzima 24% superior aos controles alimentados com a dieta óleo de semente de girassol (FIGURA 10), valor este estatisticamente não significativo (TABELA 16).

O grupo de animais tratados com o DMBA e alimentados com a dieta óleo de sardinha após os 30 dias de experimento, apresentaram uma atividade específica desta enzima 21% superior a dos tratados e alimentados com a dieta óleo de semente de girassol (FIGURA 10), valor este estatisticamente não significativo (TABELA 16), ao passo que após os 63 dias de experimento, os animais tratados e alimentados com a dieta óleo de semente de girassol, apresentaram uma atividade específica para esta enzima 28% superior aos tratados com o DMBA e alimentados com a dieta óleo de sardinha (FIGURA 10), valor este estatisticamente não significativo (TABELA 16).

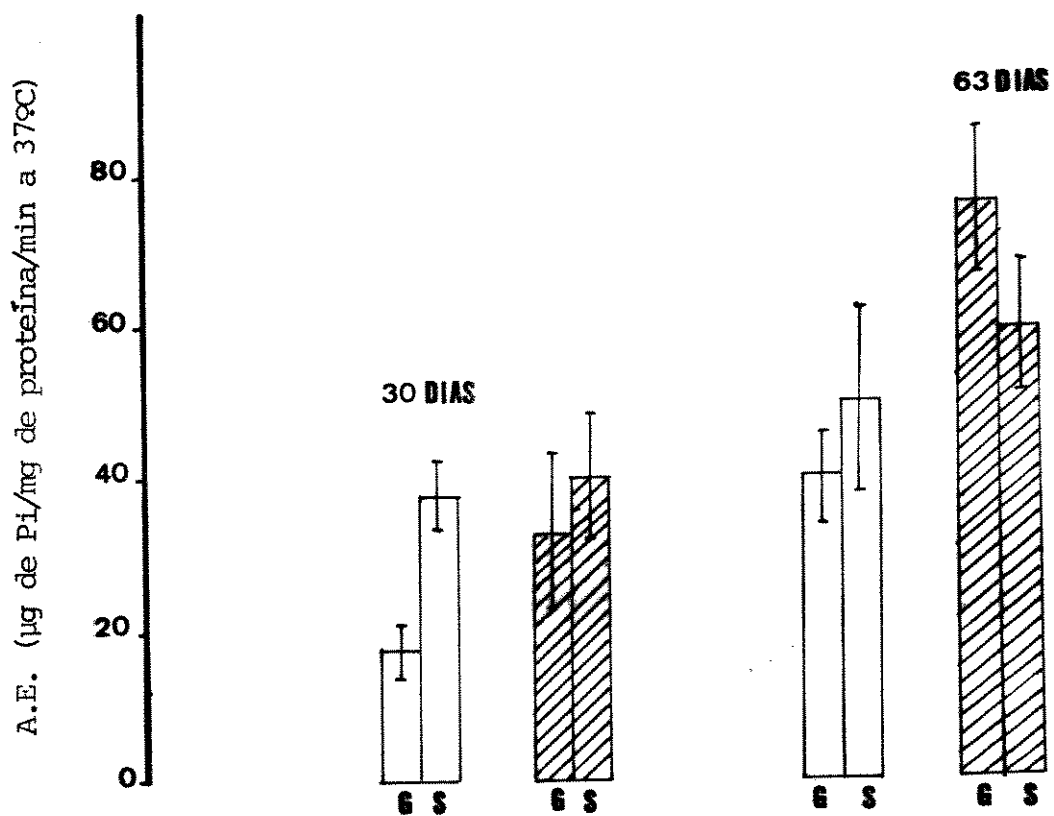


FIGURA 10 - ATIVIDADE ESPECÍFICA (A.E.) DA ATPase MITOCONDRIAL DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES (□) E TRATADAS COM DMBA (▨), ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL (G) OU DIETA ÓLEO DE SARDINHA (S) APÓS 30 OU 63 DIAS

TABELA 16 - TESTE DE **STUDENT** PARA COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA **ATPase** MITOCONDRIAL DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES (CS) E TRATADAS (TS) E ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 OU 63 DIAS OU RATAS CONTROLES (CG) E TRATADAS COM DMBA (TG) E ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL NOS MESMOS TEMPOS EXPERIMENTAIS.

CONDIÇÕES DO TESTE	GL	t
CS <sub>30</sub> x CG <sub>30</sub>	28	6,1 <sup>(**)</sup>
CS <sub>63</sub> x CS <sub>63</sub>	14	1,2
TS <sub>30</sub> x TG <sub>30</sub>	28	0,8
TG <sub>63</sub> x TS <sub>63</sub>	12	1,5

(\*\*) Significativo ao nível de 1%.

#### 4.5. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DOS ÁCIDOS GRAXOS DOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES OU TRATADAS COM DMBA, ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL OU DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 OU 63 DIAS.

##### 4.5.1. DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL

Quando foi comparado, o percentual de incorporação dos ácidos graxos saturados (AGS) pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário de ratas controles alimentadas com esta dieta, após 63 dias com o grupo de 30 dias de experimento, foi observado:

a) decréscimo na incorporação pelos lipídios mitocondriais dos AGS (TABELA 17) heptanóico (7:0), nonanóico (9:0) e undecanóico (11:0);

b) aumento da incorporação pelos lipídios das mitocôndrias dos AGS (TABELA 17) mirístico (14:0) e palmítico (16:0)

Estes resultados mostraram um decréscimo de 8% no percentual total de incorporação dos AGS, pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário das ratas controles, alimentadas com esta dieta após os 63 dias de experimento (FIGURA 11).

Quando foi comparado o percentual de incorporação dos AGS pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário das ratas tratadas com DMBA alimentadas com esta dieta, com os seus respectivos controles, foi observado:

a) após os 30 dias de experimento, decréscimo na incorporação pelos lipídios da organela do AGS, caprótico (6:0), heptanóico e mirístico (TABELA 17); aumento na incorporação do ácido laúrico (12:0) e palmítico (TABELA 17), resultando no decréscimo de 30% do percentual total de incorporação dos AGS, pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário das ratas tratadas com DMBA (FIGURA 11);

b) após os 63 dias de experimento, decréscimo na incorporação pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário do ácido mirístico (TABELA 17), que resultou no decréscimo de 20% no percentual total de incorporação dos AGS pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário das ratas tratadas pelo DMBA (FIGURA 11).

Quando foi comparado, o percentual de incorporação dos ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) pelos lipídios das mitocôndrias do tecido mamário das ratas controles alimentadas com a dieta óleo de semente de girassol, após os 63 dias de experimento com o grupo de 30 dias, foi observado:

a) decréscimo na incorporação pelos lipídios da organela dos AGMI (TABELA 17) heptamonoenólico(7:1), octamonoenólico(8:1), decamonoenólico(10:1) e dodecamonoenólico(12:1);

b) aumento da incorporação pelos lipídios mitocondriais dos AGMI (TABELA 17) palmitoléico(16:1n-7), oléico(18:1n-9) e eicosamonoenólico(20:1n-9).

Estes valores, resultaram no decréscimo de 52% no percentual total de incorporação dos AGMI, pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário das ratas controles (FIGURA 12). Quando foi comparado o percentual de incorporação dos AGMI pelos lipídios das mitocôndrias do tecido mamário de ratas tratadas com o DMBA, alimentadas com esta dieta com os seus respectivos controles, foi observado:

a) após os 30 dias de experimento, decréscimo na incorporação pelos lipídios das mitocôndrias dos AGMI hepta e octamonoenólico; aumento na incorporação pelos lipídios das mitocôndrias dos ácidos graxos deca, dodecamonoenólico e palmitoléico (TABELA 17), resultando no aumento de 29% no percentual de incorporação dos AGMI totais (FIGURA 12) pelos lipídios da organela dos animais tratados com DMBA;

b) após os 63 dias de experimento foi observado, decréscimo na incorporação pelos lipídios das mitocôndrias dos ácidos miristoléico(14:1) e eicosamonoenólico(20:1); aumento na incorporação pelos lipídios das mitocôndrias dos ácidos graxos palmitoléico e oléico (TABELA 17), que resultou no aumento de 51% no percentual de incorporação dos AGMI totais (FIGURA 12) pelos lipídios da organela dos animais tratados com DMBA.

Na comparação do percentual de incorporação dos ácidos graxos poliinsaturados n-6 (AGPI n-6), pelos lipídios das mitocôndrias do tecido mamário dos animais controles alimentados com a dieta óleo de semente de girassol, após 63 dias com o grupo de 30 dias de experimento foi observado:

a) decréscimo na incorporação pelos lipídios da organela do ácido eicosatrienólico(20:3n-6); aumento na incorporação pelos lipídios mitocondriais dos ácidos graxos (TABELA 17) linoléico(18:2n-6) e araquidônico(20:4n-6), que resultou no au



mento de 30% na incorporação dos AGPI n-6 totais pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário dos animais controles após 63 dias (TABELA 13).

Quando foi comparado o percentual de incorporação dos AGPI n-6, pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário de ratas tratadas com DMBA alimentadas com esta dieta com os seus respectivos controles, foi observado que:

a) após os 30 dias de experimento, decréscimo na incorporação pelos lipídios da organela do ácido araquidônico (20:4n-6); aumento na incorporação pelos lipídios das mitocôndrias (TABELA 17) dos ácidos linoléico e docosapentaenóico (22:5n-6), resultando no aumento de 44% no percentual de incorporação dos AGPI n-6 totais (FIGURA 13), pelos lipídios da organela do tecido mamário dos animais tratados com DMBA;

b) após os 63 dias de experimento, aumento na incorporação pelos lipídios das mitocôndrias dos ácidos graxos (TABELA 17) linoléico, eicosatrienóico e docosapentaenóico (22:5n-6), resultando o aumento de 66% no percentual total de incorporação dos AGPI n-6, pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário (FIGURA 13) das ratas tratadas com DMBA.

Na comparação do percentual de incorporação dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3), pelos lipídios das mitocôndrias do tecido mamário dos animais controles alimentadas com a dieta óleo de semente de girassol, após 63 dias com o grupo de 30 dias de experimento, foi observado:

a) aumento na incorporação pelos lipídios da organela dos seguintes AGPI n-3 (TABELA 17), ácido linolênico (18:3n-3), eicosatrienóico, eicosapentaenóico (20:5n-3) e docosahexaenóico (22:6n-3), resultando no aumento de 59% na incorporação dos AGPI n-3 totais, pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário dos animais controles após os 63 dias de experimento (FIGURA 14).

Quando foi comparado o percentual de incorporação dos AGPI n-3 pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário de ratas tratadas com DMBA, alimentadas com esta dieta, com os seus respectivos controles, foi observado:

a) após os 30 dias de experimento, aumento na incorporação pelos lipídios mitocondriais dos ácidos eicosatrienóico (20:3n-3) e docosahexaenóico (TABELA 17), resultando no aumento de 13% na incorporação dos AGPI n-3 totais pelos lipídios da organela (FIGURA 14) do tecido mamário das ratas trata-

das;

b) após os 63 dias de experimento, decréscimo na incorporação pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário dos AGPI n-3 linolênico, eicosatrienóico, eicosapentaenóico e docosahexanóico (TABELA 17), resultando no decréscimo de 48% no percentual de incorporação dos AGPI n-3 totais pelos lipídios das organelas dos animais tratados com DMBA (FIGURA 14).

#### 4.5.2. DIETA ÓLEO DE SARDINHA

Quando foi comparado, o percentual de incorporação dos ácidos graxos saturados (AGS) pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário de ratas controles alimentadas com esta dieta, após os 63 dias de experimento com o grupo de 30 dias de experimento, foi observado:

a) decréscimo na incorporação pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário dos seguintes AGS, heptanóico, nonanóico, undecanóico e laúrico (TABELA 18);

b) aumento na incorporação pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário dos seguintes AGS (TABELA 18), mirístico, palmítico e esteárico (18:0).

Estes valores mostraram um decréscimo de 4% no percentual total de incorporação do AGS, pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário das ratas controles, alimentadas com esta dieta após os 63 dias de experimento (TABELA 15).

Quando foi comparado o percentual de incorporação dos AGS pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário de ratas tratadas com DMBA e alimentadas com esta dieta, com os seus respectivos controles, foi observado:

a) após os 30 dias de experimento, decréscimo na incorporação pelos lipídios mitocondriais dos AGS heptanóico, nonanóico, laúrico e palmítico (TABELA 18); aumento na incorporação do ácido undecanóico, resultando no decréscimo de 23% no percentual total de incorporação dos AGS pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário das ratas tratadas com DMBA (FIGURA 15);

b) após os 63 dias de experimento, decréscimo na incorporação pelos lipídios mitocondriais dos AGS heptanóico, nonanóico, undecanóico e laúrico (TABELA 18); aumento na incorpo

poração do ácido graxo esteárico, resultando no decréscimo de 21,4% no percentual total de incorporação dos AGS pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário de ratas tratadas com DMBA (FIGURA 15).

Quando foi comparado, o percentual de incorporação dos ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) pelos lipídios das mitocôndrias do tecido mamário das ratas controles alimentadas com esta dieta, após os 63 dias de experimento com o grupo de 30 dias, foi observado:

a) decréscimo na incorporação pelos lipídios da organela dos AGMI, hepta, octa, undeca e dodecamononóico (TABELA 18);

b) aumento na incorporação pelos lipídios da organela dos AGMI, decamononóico, palmitoléico e oléico (TABELA 18).

Estes valores resultaram no decréscimo de 20,5% no percentual total de incorporação dos AGMI pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário das ratas controles (FIGURA 16).

Quando foi comparado o percentual de incorporação dos AGMI pelos lipídios das mitocôndrias do tecido mamário de ratas tratadas com DMBA, alimentadas com esta dieta com os seus respectivos controles, foi observado:

a) após os 30 dias de experimento, decréscimo na incorporação pelos lipídios das mitocôndrias do AGMI heptamononóico (TABELA 18); aumento na incorporação dos AGMI, undeca, dodeca e miristoléico, não resultando nenhuma diferença significativa na percentagem total de incorporação dos AGMI pelos lipídios mitocondriais da organela do tecido mamário dos animais tratados com o DMBA (FIGURA 16);

b) após os 63 dias de experimento, decréscimo na incorporação pelos lipídios das mitocôndrias dos AGMI hepta, octa, deca, dodecamononóico e miristoléico (TABELA 18); aumento na incorporação dos AGMI palmitoléico, oléico e eicosatrienóico (TABELA 18), não resultando nenhuma diferença significativa na percentagem total de incorporação dos AGMI pelos lipídios mitocondriais da organela do tecido mamário dos animais tratados com DMBA (FIGURA 16).

Na comparação do percentual de incorporação dos ácidos graxos poliinsaturados n-6 (AGPI n-6), pelos lipídios das mitocôndrias do tecido mamário dos animais controles alimentados com esta dieta, após os 63 dias com o grupo de 30 dias de experimento, foi observado o aumento na incorporação pelos li-

lipídios mitocondriais dos AGPI n-6 linoléico, eicosatrienóico e araquidônico (TABELA 18), resultando no aumento de 190% na incorporação dos AGPI n-6 totais pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário dos animais controles após os 63 dias (FIGURA 17).

Quando foi comparado o percentual de incorporação dos AGPI n-6, pelos lipídios mitocondriais de ratas tratadas com DMBA, alimentadas com esta dieta com os seus respectivos controles, foi observado:

a) após os 30 dias de experimento, decréscimo na incorporação pelos lipídios mitocondriais dos ácidos graxos linoléico e docosapentaenóico (TABELA 18); aumento na incorporação pelos lipídios mitocondriais dos ácidos araquidônico e docosatetraenóico (TABELA 18), resultando no aumento de 20% no percentual de incorporação dos AGPI n-6 totais (FIGURA 17) pelos lipídios da organela do tecido mamário das ratas tratadas com DMBA;

b) após os 63 dias de experimento, aumento na incorporação pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário dos AGPI n-6 araquidônico e docosatetraenóico (TABELA 18), resultando no aumento de 52% no percentual total de incorporação dos AGPI n-6, pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário (FIGURA 17) das ratas tratadas com DMBA.

Na composição do percentual de incorporação dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3), pelos lipídios das mitocôndrias do tecido mamário dos animais controles alimentados com esta dieta, após 63 dias de experimento com o grupo de 30 dias, foi observado um aumento na incorporação pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário dos AGPI n-3 eicosatrienóico, docosaheptaenóico e tetracosahexaenóico (TABELA 18), resultando no aumento de 47,5% na incorporação dos AGPI n-3 totais, pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário dos animais controles após os 63 dias de experimento (FIGURA 18).

Quando foi comparado o percentual de incorporação dos AGPI n-3 pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário de ratas tratadas com DMBA, alimentadas com esta dieta, com os seus respectivos controles, foi observado:

a) após os 30 dias de experimento, decréscimo na incorporação pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário do ácido linolênico; aumento na incorporação dos ácidos graxos eicosatrienóico, eicosapentaenóico e docosaheptaenóico (TABELA 18), resultando no aumento de 108% na incorporação dos AGPI n-3 to-

tais pelos lipídios da organela (FIGURA 18) do tecido mamário das ratas tratadas com DMBA;

b) após os 63 dias de experimento, aumento na incorporação pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário dos ácidos graxos eicosatrienóico e docosahexaenóico (TABELA 18), resultando no aumento de 63% na incorporação dos AGPI n-3 totais pelos lipídios da organela (FIGURA 18) do tecido mamário das ratas tratadas com DMBA.

#### **4.6. ESTUDO COMPARATIVO DA INCORPORAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS NOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES E TRATADAS COM DMBA, ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL OU ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 OU 63 DIAS.**

##### **4.6.1. AGS TOTAIS APÓS 30 OU 63 DIAS**

Após 30 ou 63 dias de experimento, houve discreto aumento na incorporação dos AGS totais pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário das ratas controles ou das tratadas pelos DMBA, alimentadas com a dieta óleo de sardinha em relação a dieta óleo de semente de girassol (FIGURA 19).

##### **4.6.2. AGMI TOTAIS APÓS 30 OU 63 DIAS**

Após os 30 dias de experimento, foi observado aumento na incorporação dos AGMI totais pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário das ratas controles alimentadas com a dieta óleo de sardinha, quando comparadas com as que se alimentaram com a dieta óleo de semente de girassol (FIGURA 20). Este aumento, não foi confirmado nos animais tratados com DMBA e comparados com o que está acima descrito (FIGURA 20). Estes dados também se repetiram após os 63 dias de experimento (FIGURA 20).

#### 4.6.3. AGPI n-6 TOTAIS APÓS 30 OU 63 DIAS

Após os 30 ou 63 dias de experimento, tanto os animais controles quanto os tratados com DMBA e alimentados com a dieta óleo de semente de girassol, apresentaram um aumento importante na incorporação pelos lipídios mitocondriais dos AGPI n-6 (FIGURA 21).

#### 4.6.4. AGPI n-3 TOTAIS APÓS 30 OU 63 DIAS

Após os 30 dias de experimento, os animais controles alimentados com a dieta óleo de semente de girassol, incorporam em seus lipídios mitocondriais mais AGPI n-3 que os alimentados com a dieta óleo de sardinha (FIGURA 22), no entanto este fenômeno de incorporação foi revertido nos animais tratados com DMBA (FIGURA 22).

A incorporação dos AGPI n-3 após os 63 dias de experimento, pelos lipídios mitocondriais dos animais controles ou tratados pelos DMBA frente as duas dietas, foi semelhante à ocorrida após os 30 dias de experimento (FIGURA 22).

TABELA 17 - COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DOS ÁCIDOS GRAXOS (AG) DOS LIPÍDIOS DE MITOCÔNDRIAS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES E TRATADAS DURANTE 30 OU 63 DIAS, ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL.

AG (%)	TEMPO (DIAS)			
	30		63	
	NORMAIS	TRATADOS	NORMAIS	TRATADOS
6:0	1,3	0,1	tr <sup>(*)</sup>	0,3
7:0	4,9	2,0	tr	0,8
7:1	3,0	0,8	tr	0,4
8:0	0,3	0,1	tr	0,2
8:1	7,5	5,7	tr	tr
9:0	6,2	5,0	tr	0,6
9:1	tr	tr	tr	0,5
10:0	1,0	0,7	tr	0,2
10:1	4,5	5,1	tr	0,4
11:0	4,4	4,8	tr	0,2
11:1	0,2	0,4	tr	0,6
12:0	1,0	2,9	tr	0,2
12:1	1,7	4,5	tr	0,2
14:0	20,0	8,8	28,1	17,4
14:1	1,2	1,4	1,6	0,7
14:2	0,7	1,4	0,2	0,3
16:0	7,2	10,5	14,1	14,4
16:1n-7	0,2	3,4	2,4	3,6
16:2n-7	0,2	0,1	1,2	1,1
18:0	6,0	5,2	6,0	7,0
18:1n-9	8,1	13,0	11,7	20,1
18:2n-6	4,4	9,6	7,3	14,0
18:3n-3	2,3	2,0	4,8	1,7
20:1n-9	0,5	0,4	2,0	0,3
20:3n-9	tr	tr	1,6	0,7
20:3n-6	1,0	0,9	tr	1,9
20:3n-3	4,1	5,1	6,6	4,6
20:4n-6	3,5	1,9	4,0	3,4
20:5n-3	0,6	0,4	2,4	0,3
22:4n-6	0,4	0,4	0,8	0,4
22:5n-6	tr	0,5	tr	0,4
22:5n-3	tr	tr	tr	0,1
22:6n-3	1,6	2,3	4,8	2,4
24:4n-6	tr	0,1	tr	tr
24:1	-	-	-	-
24:6n-3	0,1	0,1	tr	0,2

ANIMAIS NORMAIS: inoculados i.p. com 1ml de placebo

ANIMAIS TRATADOS: inoculados i.p. com 1ml de uma emulsão contendo 20mg de DMBA.

(\*) tr = traços.

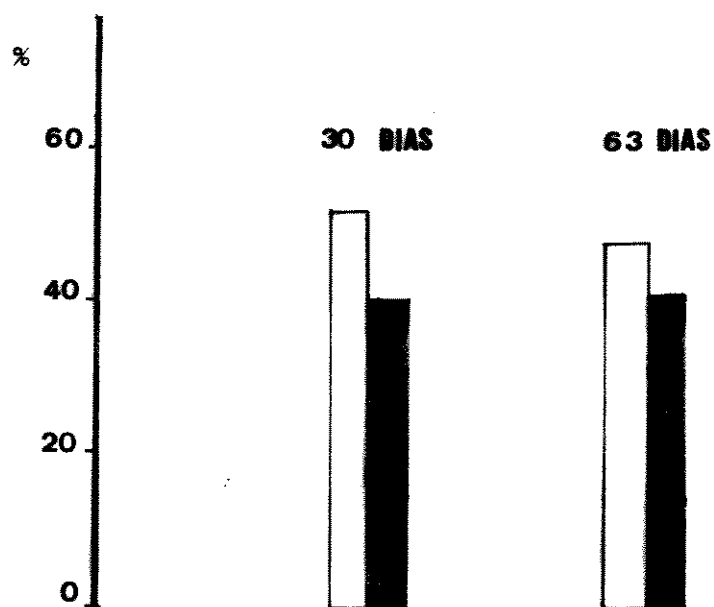


FIGURA 11 - COMPOSIÇÃO (%) DOS AGS TOTAIS DOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES ( □ ) OU TRATADAS COM DMBA ( ■ ) APÓS 30 OU 63 DIAS, ALIMENTADAS COM A DIETA Ó LEO DE SEMENTE DE GIRASSOL.



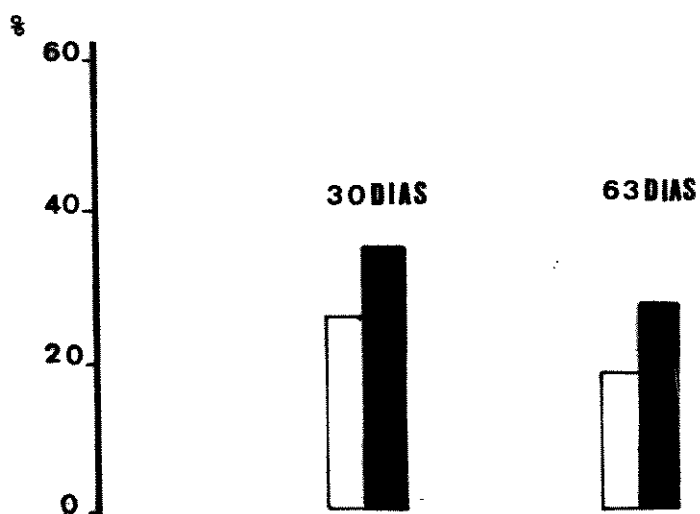


FIGURA 12 - COMPOSIÇÃO (%) DOS AGMI DOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES ( □ ) OU TRATADAS COM DMBA ( ■ ) APÓS 30 OU 63 DIAS E ALIMENTADAS COM DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL

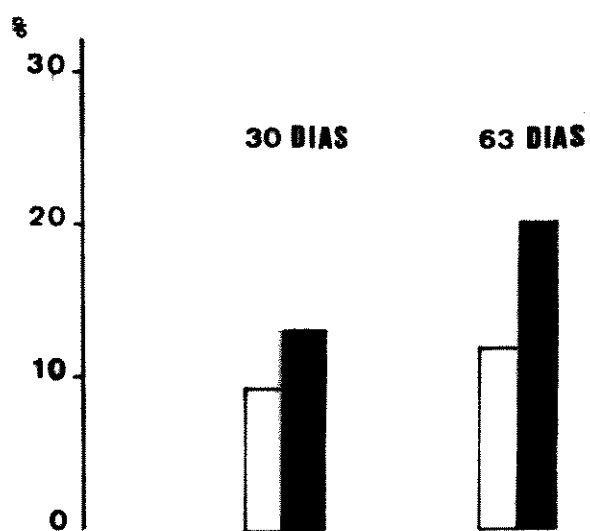


FIGURA 13 - COMPOSIÇÃO (%) DOS ACPI n-6 TOTAIS DOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES ( □ ) E TRATADAS COM DMBA ( ■ ) APÓS OS 30 OU 63 DIAS DE EXPERIMENTO E ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL.

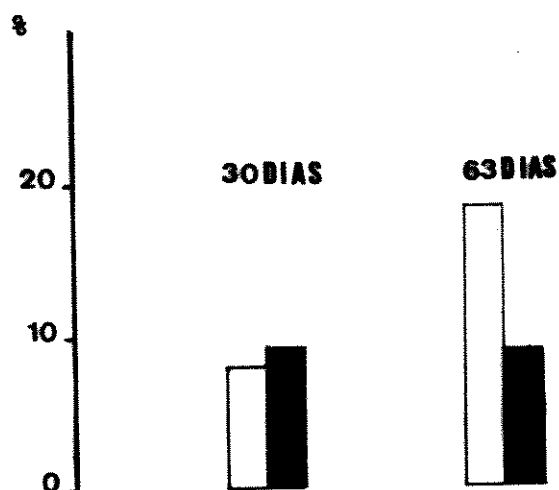


FIGURA 14 - COMPOSIÇÃO (%) DOS AGPI n-3 TOTAIS DOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES ( □ ) E TRATADAS COM DMBA ( ■ ) APÓS 30 E 63 DIAS, ALIMENTADAS COM DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL

TABELA 18 - COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DOS ÁCIDOS GRAXOS (AG) DOS LIPÍDIOS DE MITOCÔNDRIAS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES OU TRATADAS, DURANTE 30 OU 63 DIAS, ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA.

AG (%)	TEMPO (DIAS)			
	30		63	
	NORMAIS	TRATADOS	NORMAIS	TRATADOS
6:0	0,1	0,1	0,2	0,7
7:0	9,0	6,2	4,7	1,2
7:1	5,6	3,5	1,1	0,2
8:0	0,5	0,5	0,5	0,2
8:1	10,2	9,3	4,3	0,9
9:0	8,0	7,0	4,7	0,5
9:1	-	-	-	-
10:0	0,4	tr (*)	0,5	0,2
10:1	tr	tr	2,9	0,4
11:0	5,8	6,6	3,8	tr
11:1	5,0	6,0	0,4	tr
12:0	2,8	0,3	1,5	0,5
12:1	2,4	3,4	1,5	0,2
14:0	14,9	14,3	16,4	15,1
14:1	1,2	2,6	1,1	0,5
14:2	1,3	2,6	1,4	0,4
16:0	8,9	5,5	13,0	15,8
16:1n-7	2,9	3,0	3,6	4,7
16:2n-7	tr	tr	tr	0,4
18:0	4,2	4,0	7,3	9,1
18:1n-9	5,9	5,9	12,7	19,8
18:2n-6	3,2	2,6	4,6	5,8
18:3n-3	2,3	1,6	2,8	2,0
20:1n-9	tr	tr	0,2	0,8
20:3n-6	tr	tr	1,7	1,6
20:3n-3	1,5	3,0	2,7	8,2
20:4n-6	0,3	2,7	2,6	5,1
20:5n-3	1,4	6,5	1,1	0,5
22:4n-6	0,1	0,8	0,1	0,7
22:5n-6	0,3	tr	tr	0,5
22:5n-3	tr	0,1	tr	0,3
22:6n-3	0,7	1,3	1,8	3,3
24:4n-6	0,1	0,1	tr	tr
24:1	0,3	0,1	tr	tr
24:6n-3	0,2	0,2	0,6	0,4

ANIMAIS NORMAIS: inoculados i.p. com 1ml de placebo

ANIMAIS TRATADOS: inoculados i.p. com 1ml de uma emulsão contendo 20mg de DMBA.

(\*) tr = traços.

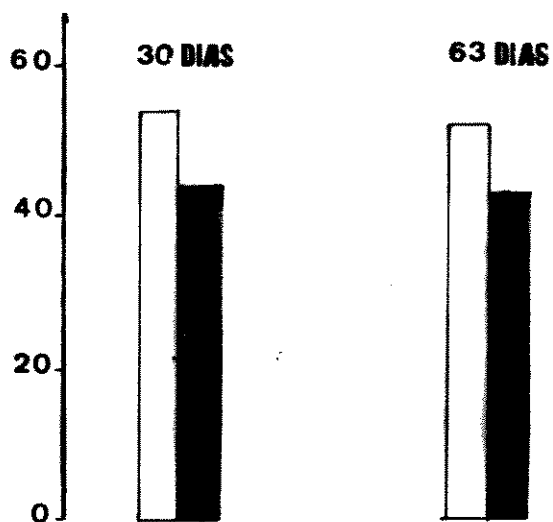


FIGURA 15 - COMPOSIÇÃO (%) DOS AGS TOTAIS DOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES ( □ ) E TRATADAS COM DMBA ( ■ ) APÓS 30 E 63 DIAS, ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA.

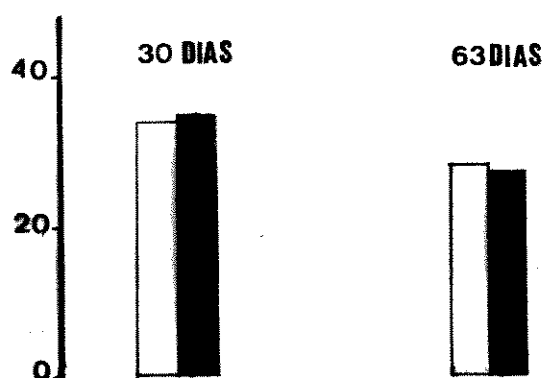


FIGURA 16 - COMPOSIÇÃO (%) DOS AGMI TOTAIS DOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES ( □ ) E TRATADAS COM O DMBA ( ■ ) APÓS 30 OU 63 DIAS, ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA

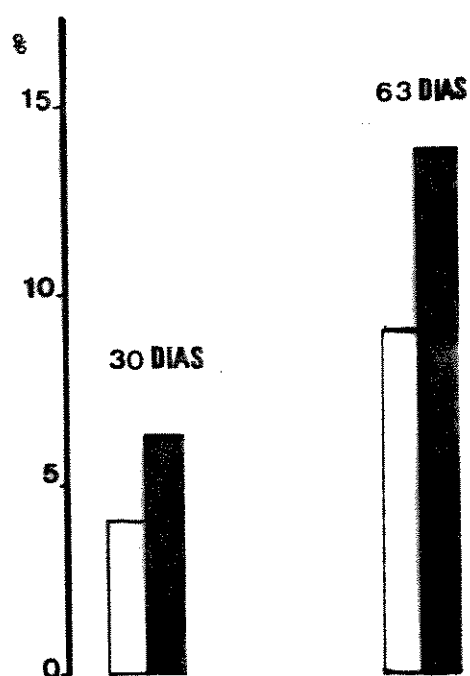


FIGURA 17 - COMPOSIÇÃO (%) DOS AGPI n-6 TOTAIS DOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES ( □ ) E TRATADAS ( ■ ) APÓS 30 OU 63 DIAS, ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA.

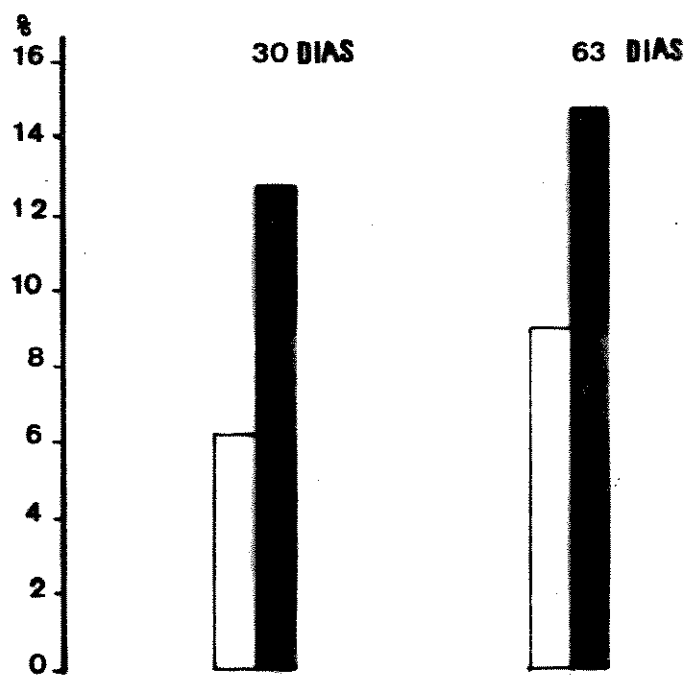


FIGURA 18 - COMPOSIÇÃO (%) DOS AGPI n-3 TOTAIS DOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES ( □ ) E TRATADAS COM DMBA ( ■ ) APÓS 30 OU 63 DIAS, ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA.



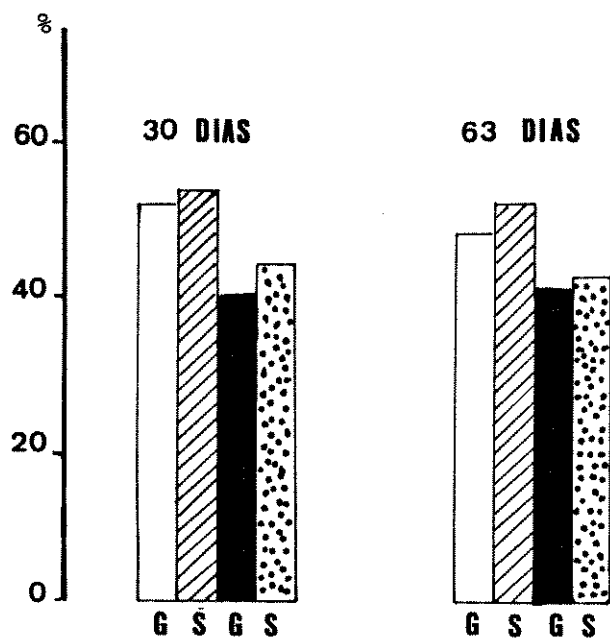


FIGURA 19 - COMPOSIÇÃO (%) DOS AGS TOTAIS DOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES ( □ ) E TRATADAS COM DMBA ( ■ ), ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL E DE RATAS CONTROLES ( ▨ ) E TRATADAS COM DMBA ( ▩ ), ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 OU 63 DIAS.

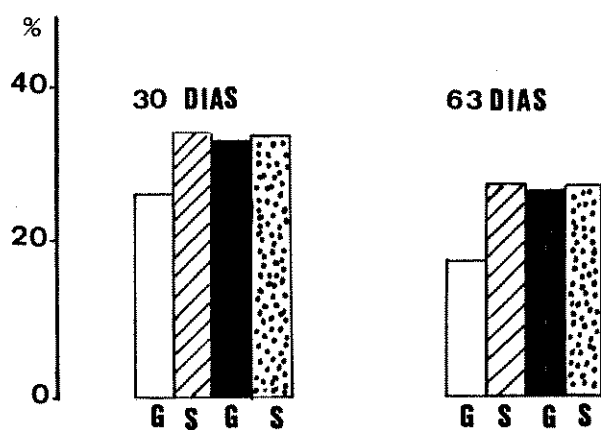


FIGURA 20 - COMPOSIÇÃO (%) DOS AGMI TOTAIS DOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES ( □ ) OU TRATADAS COM DMBA ( ■ ), ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL E RATAS CONTROLES ( ▨ ) OU TRATADAS COM DMBA ( ▩ ), ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 OU 63 DIAS.

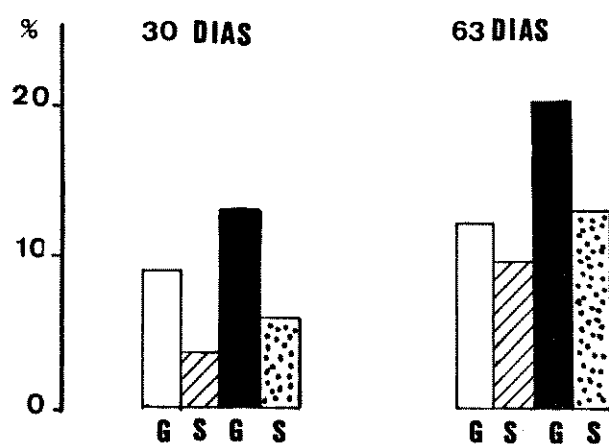


FIGURA 21 - COMPOSIÇÃO (%) DOS AGPI n-6 TOTAIS DOS LIPÍDOS MITOCONDRIAIS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES (  $\square$  ) OU TRATADAS COM DMBA (  $\blacksquare$  ), ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL E DE RATAS CONTROLES (  $\text{▨}$  ) OU TRATADAS COM DMBA (  $\text{▩}$  ), ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 OU 63 DIAS.

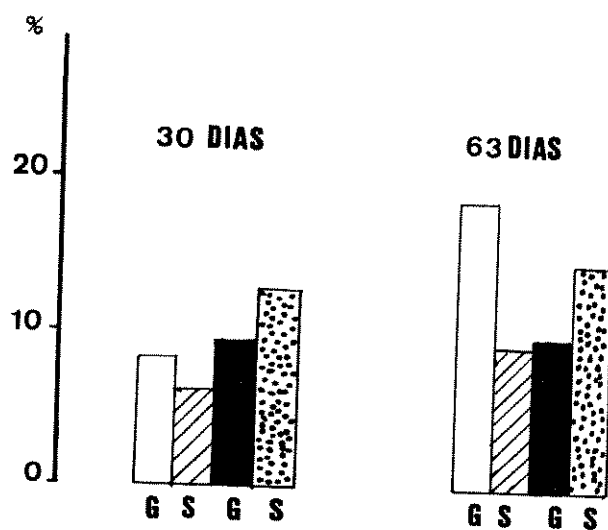


FIGURA 22 - COMPOSIÇÃO (%) DOS AGPI n-3 TOTAIS DOS LIPÍDIOS MITOCONDRIAIS DO TECIDO MAMÁRIO DE RATAS CONTROLES ( □ ) OU TRATADAS COM DMBA ( ■ ), ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SEMENTE DE GIRASSOL E DE RATAS CONTROLES ( ▨ ) OU TRATADAS COM DMBA ( ▩ ), ALIMENTADAS COM A DIETA ÓLEO DE SARDINHA APÓS 30 OU 63 DIAS.

## 5. DISCUSSÃO

Foi demonstrado (FIGURAS 1-4), que embora tenha havido um aumento discreto na ingestão da dieta óleo de semente de girassol pelos animais controles nos diferentes tempos experimentais, quando comparados com os animais que ingeriram a dieta óleo de sardinha, este aumento praticamente não interferiu no ganho de peso corpóreo, o qual foi semelhante em ambas as dietas.

Por outro lado, foi observado que as ratas tratadas com o DMBA e alimentadas com a dieta óleo de sardinha, após os 30 dias de experimento quando comparadas com seus respectivos controles, apresentaram um aumento significativo do peso corpóreo ( $p < 0,05$ ). Esta diferença, embora estatisticamente significativa não reflete um evento biológico, já que o grupo de animais tratados com o DMBA e alimentados com esta dieta tinham no início do experimento, um peso médio superior ao dos seus respectivos controles (TABELA 9). No entanto os animais tratados com o DMBA e alimentados com a dieta óleo de semente de girassol após 30 ou 63 dias e os alimentados com a

dieta óleo de sardinha após os 63 dias de experimento, não apresentaram diferenças significativas no ganho de peso corpóreo, dados estes que estão coerentes com a literatura (**SELENSKAS** et alii, 1984), onde foi observado que diferentes tipos e quantidades de lipídios não alteram o peso de ratas Sprague - Dawley submetidas a diferentes concentrações de DMBA em diferentes tempos experimentais.

Observações histológicas têm demonstrado que a capacidade de proliferação do tecido glandular mamário é de replicação lenta (**HEAH**, 1977 e **ZAJICEK**, 1981), no entanto a carcinogênese induzida por compostos químicos requer uma proliferação celular mais acentuada (**CAYAMA** et alii, 1978). Sabe-se também que hiperplasias ductais terminais (HEBs) estão presentes na glândula mamária de aproximadamente 70% de ratas seguindo-se ao tratamento com o DMBA após uma semana e que os nódulos alveolares hiperplásicos (HANs) aparecem após um período mais longo, seguindo-se o tratamento com o DMBA (**PURNELL**, 1980).

Neste trabalho, foi observado que o efeito das duas dietas sobre o padrão histológico do tecido mamário das ratas controles alimentadas com ambas as dietas após 30 ou 63 dias de experimento foram semelhantes (FIGURAS 5a-5d, 7a e 7c). Os resultados encontrados, com relação aos padrões histológicos do tecido mamário dos animais tratados com DMBA, foram também semelhantes e mais severos do que aqueles encontrados nos animais controles. Foram encontrados padrões histológicos do tipo HEB e HAN após 30 dias de experimento nos animais alimentados com ambas as dietas (FIGURAS 6b-6d) e nos animais alimentados com a dieta óleo de semente de girassol após os 63 dias (FIGURA 7b). Embora estes resultados não sejam conclusivos, foi observado casos histológicos mais graves no grupo de animais alimentados com a dieta óleo de semente de girassol após os 63 dias de tratamento com o DMBA do que naqueles tratados e alimentados com a dieta óleo de sardinha durante o mesmo período, dados estes que estão de acordo com o observado na literatura (**MIDDLETON**, 1965; **ARCHER & ORLANDO**, 1968; **PURNELL**, 1980 e **ABRAHAM** et alii, 1984), onde foi demonstrado que dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados n-6, causam em animais de laboratório tratados com DMBA, alterações histológicas do tecido mamário severas que favorecem a implantação rápida da carcinogênese mamária.

Os resultados obtidos neste trabalho, mostraram que as diferentes dietas lipídicas foram capazes de promover diferenças na atividade específica da ATPase (TABELAS 12 e 14), o que está de acordo com o descrito por **INNIS & CLANDININ**(1981b) que sugerem que a atividade ATPásica "in vivo" deva ser influenciada pela dieta lipídica, através de prováveis alterações da composição dos lipídios vizinhos ao complexo ATPásico. Por outro lado, o tratamento com o DMBA aumentou a atividade da ATPase mitocondrial independente do tempo e das dietas utilizadas (TABELAS 12 e 14). Os animais alimentados com a dieta óleo de sardinha e tratados com o DMBA após os 30 dias de experimento, apresentaram uma atividade específica da ATPase superior aos do grupo da dieta óleo de semente de girassol, embora estatisticamente não significante (TABELA 16). Este efeito foi invertido após os 63 dias, o que nos leva a supor que o efeito do DMBA sobre a atividade da enzima estudada, possa também ser dependente da composição lipídica dietária, o que está de acordo com o trabalho de **MELNICK et alii** (1977), onde estes autores citam a existência de uma dependência do grau de insaturação lipídica, bem como da cadeia dos ácidos graxos que esterificam os fosfolipídios das membranas mitocondriais, alterando com isso as propriedades físicas de membrana que causariam mudanças na atividade desta enzima.

Animais controles ou tratados com o DMBA, alimentados com ambas as dietas nos diferentes tempos, incorporaram AGS totais nos lipídios mitocondriais de modo semelhante (FIGURA 19), o mesmo acontecendo na incorporação dos AGMI totais pelos lipídios mitocondriais nas condições acima descritas (FIGURA 20), embora tenha havido diferenças quantitativas na incorporação destes ácidos graxos pelos lipídios mitocondriais (TABELAS 17 e 18). Animais de laboratório tratados com DMBA e alimentados com dietas lipídicas ricas em AGS e AGMI, como é o caso do óleo de coco, têm a velocidade do crescimento tumoral diminuída quando comparados com os que se alimentam com dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados (**CARROLL & DAVIDSON**, 1982; **KRITCHEVSKY**, 1982 e **CARROLL**, 1983). Nas dietas estudadas neste trabalho, o conteúdo total do AGS e AGMI foram superiores ao dos AGPI<sub>n</sub>-6 e n-3 (TABELA 2), principalmente na dieta óleo de sardinha. Sabe-se que dietas ricas em AGS e AGMI (**TAHIN et alii**, 1981), como é o caso da gordura de porco, apresenta importante incorporação do ácido oléico pelas

membranas mitocondriais que acarretam inibição no processo de alongação do ácido linoléico a araquidônico, o que é precursor de substâncias importantes no mecanismo de defesa do organismo (**CENTURY & HORWITT**, 1964; **COHEN**, 1981; **MAHMUD & MIURA**, 1982 e **WAGNER** et alii, 1982).

Naqueles animais que estavam se alimentando com a dieta óleo de semente de girassol, o tratamento com o DMBA favoreceu maior incorporação pelos lipídios mitocondriais do ácido linoléico, no entanto não houve aumento no conteúdo do ácido araquidônico (TABELA 17). Esse fenômeno parece sugerir que o DMBA, possa estar inibindo a ação de dessaturases específicas, que atuam na transformação do ácido linoléico a araquidônico, via a produção do ácido linolênico ou talvez impedindo a síntese do ácido araquidônico por inibição da alongação do ácido linoléico o que estaria de acordo com os dados da literatura (**BRENNER & PELUFFO**, 1966; **BRENNER**, 1969 e **BRENNER** et alii, 1969), favorecendo o acúmulo do ácido eicosatrienóico n-6 que é também precursor do ácido araquidônico. Por outro lado, naqueles animais tratados com o DMBA e alimentados com a dieta óleo de sardinha não foi observado alteração na incorporação pelos lipídios mitocondriais do ácido linoléico, apesar do aumento significativo na incorporação do ácido araquidônico, o qual persistiu com o passar do tempo, embora com menor intensidade (TABELA 18). Como pode-se notar, foi encontrado nos animais alimentados com a dieta óleo de sardinha e tratados com o DMBA, efeito contrário aos daqueles alimentados com óleo de semente de girassol, com relação a incorporação dos ácidos graxos poliinsaturados n-6 o que reforça a hipótese da competição dietária entre as famílias de ácidos graxos poliinsaturados frente ao tratamento pelo DMBA.

Os animais controles alimentados com a dieta óleo de girassol, apresentaram uma incorporação dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário superior aos que estavam se alimentando com a dieta óleo de sardinha (TABELA 17). Este dado está em desacordo com a literatura (**TAHIN** et alii, 1981), onde esses autores informam que animais alimentados com dieta de óleo de fígado de bacalhau (rico em AGPI n-3), quando comparados com animais alimentados com dieta de óleo de semente de girassol, incorporam nos lipídios mitocondriais de diferentes tecidos, como por exemplo fígado, coração e encéfalo, mais ácidos graxos poliinsaturados



n-3 do que n-6, o que nos leva a supor que esta seja uma resposta individual do tecido mamário frente as dietas estudadas. Por outro lado, o tratamento com o DMBA aumentou a incorporação dos ácidos graxos poliinsaturados n-3, nos animais alimentados com a dieta óleo de sardinha as custas, principalmente, do aumento de incorporação dos ácidos eicosatrienóico, eicosa-pentaenóico e docosa-hexaenóico (TABELA 18). O mesmo não acontecendo naqueles animais submetidos ao mesmo tratamento mas alimentados com a dieta óleo de semente de girassol, mostrando mais uma vez que o DMBA está favorecendo o antagonismo entre estas duas famílias de ácidos graxos poliinsaturados.

O aumento na incorporação do ácido linoléico pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário das ratas estudadas com diminuição da incorporação do ácido araquidônico nos animais alimentados com a dieta óleo de semente de girassol e tratados com DMBA, o aumento na incorporação do ácido araquidônico nos animais alimentados com a dieta óleo de sardinha e tratado com DMBA e o aumento na incorporação pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 naqueles animais alimentados com a dieta óleo de sardinha e tratados com DMBA, talvez explique as alterações morfológicas do tecido mamário e as da atividade específica da ATPase mitocondrial desse tecido, encontradas nas ratas submetidas a estas duas dietas e ao tratamento com o DMBA, o que estaria de acordo com dados experimentais de outros autores (RICHARDSON et alii, 1962; MOHRHAUER & HOLMAN, 1963; CARROLL et alii, 1968; STANCLIFF et alii, 1969; WHITE et alii, 1974; HOPKINS & WEST, 1976; RAO & ABRAHAM, 1977; PEDERSEN, 1978; HILLYARD & ABRAHAM, 1979; HOPKINS & CARROLL, 1979; KING et alii, 1979; CHAN & DAO, 1981; EL-KHATIB & CORA, 1981; INNIS & CLANDININ, 1981 a,b; MLYA-MOIO-TLAVEN et alii, 1981; CARROLL & DAVIDSON, 1982; ABRAHAM & HILLYARD, 1983; CARROLL, 1983; KALAMEGHAM & CARROLL, 1984; KRIT-CHEVSKY et alii, 1984; SELENSKAS et alii, 1984 e TAHIN, 1985), os quais enfatizam a ação co-carcinogênica dos ácidos graxos poliinsaturados dietário, que potencializam a ação do DMBA na produção de processos neoplásicos do tecido mamário de ratas.

## 6. CONCLUSÕES

- 6.1. Não houve diferenças importantes, entre a ingestão das diferentes dietas e o ganho de peso corpóreo nos animais estudados.
- 6.2. Embora os resultados não tenham sido conclusivos, existe a tendência de que os animais alimentados com a dieta óleo de semente de girassol e tratados com o DMBA, apresentem danos no tecido mamário mais severos do que os que se alimentaram com a dieta óleo de sardinha e foram tratados com o DMBA.
- 6.3. A atividade ATPásica mitocondrial do tecido mamário foi dependente da dieta lipídica usada, do tempo e do tratamento pelo DMBA. No grupo dietário óleo de semente de girassol, o DMBA causou um aumento maior após os 63 dias de experimento em relação ao grupo de 30 dias do que no grupo dietário

óleo de sardinha, comparando-se com os seus respectivos controles.

- 6.4. Não houve diferenças importantes na incorporação pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário das ratas controles ou tratadas com DMBA, dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados totais, embora tenha havido diferenças qualitativas na incorporação dos mesmos.
- 6.5. Animais alimentados com a dieta óleo de semente de girassol e tratados com o DMBA, incorporaram em seus lipídios mitocondriais do tecido mamário grandes quantidades de ácido linoléico, sem contudo aumentar a incorporação do ácido araquidônico. Este fato não se repetiu com os animais alimentados com a dieta óleo de sardinha nas mesmas condições, onde não foi observado aumento na incorporação do ácido linoléico, embora tenha havido aumento na incorporação do ácido araquidônico.
- 6.6. Os animais controles alimentados com a dieta óleo de semente de girassol incorporaram mais AGPI n-3 do que os que se alimentaram com a dieta óleo de sardinha, enquanto que o tratamento com o DMBA inverteu o processo de incorporação pelos lipídios mitocondriais do tecido mamário dos animais submetidos a ambas as dietas.

## 7. RESUMO

Ratas Sprague-Dawley virgens de 50-60 dias de idade, quando inoculadas i.p. com 20 mg/ml de DMBA e alimentadas com dietas semi-sintéticas e isocalóricas, contendo 12% de lipídios, provenientes do óleo de semente de girassol (rica em AGPI n-6) ou do óleo de sardinha (rica em AGPI n-3), não apresentaram diferenças importantes no ganho de peso corpóreo nos tempos de 30 ou 63 dias. O tecido mamário das ratas alimentadas com a dieta óleo de semente de girassol, apresentou alterações histológicas mais severas do que o das alimentadas com a dieta óleo de sardinha, após o tratamento com o DMBA nos tempos estudados. A atividade específica da ATPase mitocondrial do tecido mamário dos animais controle e tratados com o DMBA, apresentou alterações mais significativas naqueles animais alimentados com a dieta óleo de semente de girassol, quando comparada com os que se alimentaram com a dieta óleo de sardinha nos tempos estudados. No grupo óleo de semente de girassol, as atividades específicas da ATPase foram de  $17,2 \pm 6,4$  e  $40,3 \pm 12,0$  unidades de atividade ATPásica ( $p < 0,01$ ), respectivamente aos dias 30 ou 63 de ex

perimento para as ratas controles e de  $33,1 \pm 21,4$  e  $70,0 \pm 19,2$  unidades específica de ATPase ( $p < 0,01$ ), respectivamente após os 30 ou 63 dias de experimento com DMBA. Neste grupo dietário, o tratamento com o DMBA causou aumento na atividade específica da ATPase de 92% ( $p < 0,01$ ) e 88% ( $p < 0,01$ ), respectivamente após 30 ou 63 dias. No grupo de óleo de sardinha, as atividades específicas da ATPase foram de  $37,6 \pm 9,2$  e  $50,3 \pm 25,8$  unidades de ATPase específica (N.S.) para as ratas controles e de  $40,2 \pm 16,0$  e  $59,2 \pm 15,3$  unidades específicas de atividade ATPásica ( $p < 0,01$ ) para as ratas tratadas com DMBA, respectivamente após 30 ou 63 dias. Neste grupo dietário o DMBA também causou o aumento na atividade ATPásica, porém não foi estatisticamente significativa. Quanto a incorporação dos ácidos graxos pelos lipídios das mitocôndrias, ressaltamos que nos animais controles não foi detectado alterações importantes na incorporação dos AGS totais e AGMI totais frente às duas dietas e ao tempo de experimento; que os AGPI n-6 foram mais incorporados pelos animais alimentados com a dieta óleo de semente de girassol, quando comparados com os que se alimentaram com a dieta óleo de sardinha nos tempos estudados, o mesmo acontecendo com os AGPI n-3. O tratamento com o DMBA diminui a incorporação pelos lipídios das mitocôndrias dos AGS totais, aumentou a incorporação dos AGMI totais naqueles animais alimentados com a dieta óleo de semente de girassol, aumentou a incorporação dos AGPI n-6, principalmente do ácido linoléico e eicosatrienóico, sem contudo aumentar a incorporação do ácido araquidônico nos animais alimentados com a dieta óleo de semente de girassol, ocorrendo o efeito contrário nos animais alimentados com a dieta óleo de sardinha e aumentou a incorporação dos AGPI n-3 pelos lipídios mitocondriais, dos animais alimentados com a dieta óleo de sardinha, quando comparados com os que se alimentaram com a dieta óleo de semente de girassol nos tempos estudados.

## 8. SUMMARY

Female virgin rats Sprague-Dawley (50-60 days old), were injected, i.p., with 20 mg/ml of 7,12-dimethylbenzenanthracene (DMBA) and fed semipurified and isocaloric diets, containing 12% of sunflower seed oil (rich in AGPI n-6) or 12% of sardine oil (rich in AGPI n-3), during 30 or 63 days. During the experimental time all groups of rat, present few alterations on the gain of body weights. Rats fed sunflower seed oil showed, more severe histological alterations in the mammary tissues after DMBA treatment in comparasion to controls and to sardine oil. ATPase activity mammary mitochondria were alter in function of time, diet and DMBA treatment , after 30 or 63 days, respectively. ATPase of control animals of sunflower seed oil diet were  $17,2 \pm 6,4$  and  $40,3 \pm 12,0$  units of ATPase activity ( $p < 0,01$ ), and after DMBA treatment we found  $33,1 \pm 21,4$  and  $70,0 \pm 19,2$  units of ATPase activity ( $p < 0,01$ ) after 30 or 63 days, respectively; the specific ATPase of control animals fed sardine oil, were  $37,6 \pm 9,2$  and  $50,3$

$\pm 25,8$  units of specific ATPase (N.S.), and after DMBA treatment, were  $40,2 \pm 16,0$  and  $59,2 \pm 15,3$  units of ATPase ( $p < 0,01$ ). In sunflower seed oil group, after 30 or 63 days of DMBA treatment we observed an increase of 92% ( $p < 0,01$ ) and 88% ( $p < 0,01$ ), respectively in comparison to controls. In sardine oil group the alterations caused by DMBA treatment after 30 or 63 days in comparison of controls group was not significant. There was not important alterations on total saturated fatty acid (SFA), and total monounsaturated fatty acid (MUFA) contents on mammary mitochondrial lipids of two diets group. The total n-6 polyunsaturated fatty acid (PUFA) and n-3 fatty acids of mitochondrial lipids sunflower seed oil were higher than sardine oil group in function of time. DMBA treatment cause an increase in the SFA contents, and on the n-6 PUFA contents in sunflower seed oil group, mainly increasing linoleic acid and eicosatrienoic acid but no arachidonic acid. However, in the sardine oil group it was observed the reversal event, increasing n-3 PUFA after DMBA treatment.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. & HILLYARD, L.A. Effects of dietary 18-carbon fatty acid on growth of transplantable mammary adenocarcinoma in mice. J. natn. Cancer Inst., 71(3):601-5, 1983.

\_\_\_\_\_.; FAULKIN, L.J.; HILLYARD, L.A. & MITCHELL, D.J. Effect of dietary fat on tumorigenesis in the mouse mammary gland. J. natn. Cancer Inst., 72(6):1421-9, 1984.

ANDERSON, D.E. Some characteristics of familial breast cancer. Cancer, 28:1500-4, 1971.



- ARCHER, F.L. & ORLANDO, R.A. Morphology, natural history, and enzyme patterns in mammary tumors of the rat induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. Cancer Res., 28:217-24, 1968.
- ARCOS, J.C. & ARGUS, M.F. Molecular geometry and carcinogenic activity of aromatic compounds: new perspectives. Adv. Cancer Res., 11:305-8, 1968.
- ARMSTRONG, B. & DOLL, R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries with special reference to dietary practices. Int. J. Cancer, 15:617-31, 1975.
- BALANI, S.K.; YEH, H.J.C.; RYAN, D.E.; THOMAS, P.E.; LEVIN, W. & JERINA, D.M. Absolute configuration of the 5,6-oxide formed from 7,12-dimethylbenz(a)anthracene by cytochrome P450<sub>C</sub>. Biochem. biophys. Res. Commun., 130(2):610-16, 1985.
- BASS, D.A.; THOMAS, M.J.; GOETZIL, E.J.; de CHATELEF, L.R. & McCALL, C.E. Lipoxygenase-derived products of arachidonic acid mediate stimulation of hexose uptake in human polymorphonuclear leukocytes. Biochem. biophys. Res. Commun., 100:1-7, 1981.
- BAUER, K.H. Mutations-theorie der geschwulstentstehung. In: SPRINGE, J., ed. Übergang von koperzellen in geschwulstzellen durch gen-  
anderg. Berlin, Hirschwald, 1928. p.iii + 72.
- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C. & NETO, A.G.F. Coloração pela hematoxilina-eosina. In: EDART, ed. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. São Paulo, Edart, 1976. p.80.
- BITTNER, J.J. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. Science, 84:162, 1936.
- BLACK, Jr. O.; MURRILL, E. & FRANSKA, C. Metabolism of a carcinogen (7,12-dimethylbenzanthracene) in the presence of the Long-Evans rat. Res. Commun. Chem. pathol. Pharmacol., 33(1):103-18, 1981.
- BLOCK, H.G.O. & FLEISCHER, S. Purification of D-β-hidroxybutirate apodehydrogenase, a lecithin-requiring enzyme. In: FLEISCHER, S. & PACKER, L., eds. Biomembranes. New York, Academic Press, 1974. p.374-7.

- BLOOM, W. & FAWCETT, D.W. Glândulas mamárias. In: BLOOM, W. & FAWCETT, D.W., eds. Tratado de histologia. Rio de Janeiro, Latinoamericana Ltda., 1977. p.834-42.
- BOISSONNEAUT, G.A. & JOHNSTON, P.V. Essential fatty acid deficiency, prostaglandin synthesis and humoral immunity in Lewis rats. J.Nutr., 113:1187-94, 1983.
- BOVERI, T. Zur frage der entstehung maligner tumoren Fisher. JENA, 4:6, 1914.
- BRENNER, R.R. Reciprocal interaction in the desaturation of linoleic acid into  $\gamma$ -linoleic acid and eicosa-8,11,14-trienoic into arachidonic. Lipids, 4(6):621-3, 1969.
- \_\_\_\_\_. & PELUFFO, R.O. Effect of saturated and unsaturated fatty acids on the desaturation in vitro of palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids. J.biol.Chem., 241:5213-9, 1966.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; NERVI, A.M. & DE THOMAS, M.E. Competitive effect of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -linolenil-coA and arachidonyl coA in linolenil-coA desaturation to  $\gamma$ -linolenil-coA. Biochem.biophys. Acta, 176:430-2, 1969.
- BROOKES, P. & LAWIEZ, P. Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbon to the nuclei acids of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbon and the binding to DNA. Nature, 202:781-4, 1964.
- \_\_\_\_\_. & HEIDELBERGER, R. Isolation and degradation of DNA from cells treated with tritium labeled 7,12-dimethylbenz(a)anthracene: studies on the nature of binding of this carcinogen to DNA. Cancer Res., 29:157-65, 1969.
- BURKE, M. BRYSON, E.I. & KARK, A.E. Dietary intakes, resting metabolic rates on body composition in benign and malignant gastrointestinal disease. Br.med.J., 80:211-5, 1980.
- BURR, G.O. & BURR, M.M. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. J.biol.Chem., 82:345-67, 1929.

- CARROLL, K.K. The role of dietary fat in carcinogenesis. In: PERKINS, E.G. & VISEK, W.J., eds. Dietary fats and health. Champayng, American Oil Chemistry Soc., 1983. p.710-20.
- \_\_\_\_\_. & DAVIDSON, M.B. The role of lipids in tumorigenesis. In: ARNOFF, M.S.; van EYS, J. & WANG, Y-M., eds. Molecular interrelations of nutrition and cancer. New York, Raven Press, 1982. p. 237-45.
- \_\_\_\_\_.; GAMMAL, E.B. & PLUNKETT, E.R. Dietary fat and mammary cancer. Can.med.Ass., 98:590-4, 1968.
- \_\_\_\_\_.; HOPKINS, G.J.; KENNEDY, T.G. & DAVIDSON, M.B. Essential fatty acids in relation to mammary carcinogenesis. Prog.Lipid Res., 20:685-90, 1981.
- \_\_\_\_\_. & KHOR, H.T. Effects of dietary fat and dose of 7,12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene on mammary tumor incidence in rats. Cancer Res., 30:2260-4, 1970.
- \_\_\_\_\_. & \_\_\_\_\_. Effects of the level and type of dietary fat on incidence of mammary tumors induced in female Sprague-Dawley rats by 7,12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene. Lipids, 6:415-20, 1971.
- CAYAMA, E.; TSUDA, H.; SARMA, D.S.R. & FARBER, E. Initiation of chemical carcinogenesis requires cell proliferation. Nature, 275:602, 1978.
- CENTURY, B. & HORWITT, M.K. Role arachidonic acid in nutritional encephalomalacia: interrelationship of essential and nonessential polyunsaturated fatty acid. Arch.biochem.Biophys., 104:416-22, 1964.
- CHABON, A.B.; TAKEUCHI, S. & SOMMERS, S.C. Histological differences in breast carcinoma of Japanese and American women. Cancer, 33:1577-9, 1974.
- CHAN, P.C. & DAO, T.L. Enhancement of mammary carcinogenesis by high-fat diet in Fischer, Long-Evans, and Sprague-Dawley rats. Cancer Res., 41:164-7, 1981.

- CHAN, P.C.; DIDATO, F. & COHEN, L.A. High dietary fat, elevation of rat serum prolactin and mammary cancer (38758). Proc.Soc.exp. Med., 149:133-5, 1975.
- CHERN, J.C. & KINSELLA, J.E. Concurrent release and reacylation of fatty acid by kidney cells selective incorporation of arachidonic acid. Biochem.biophys.Acta, 750:7-13, 1983a.
- \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. The effects of unsaturated fatty acids on the synthesis of arachidonic acid in rats kidney cells. Biochem.biophys.Acta, 750:465-71, 1983b.
- CHOI, N.W.; HOWE, G.R.; MILLER, A.B.; MATTEWS, V.; MORGAN, R.W.; MUNAN, L.; BURCH, J.D.; FEATHER, J.; JAIN, M. KELLY, A. An epidemiological study of breast cancer. Am.J.Epidemiol., 107:510-21, 1978.
- CLEAVER, J.E. Xeroderma pigmentosum: a human disease in which an initial stage of DNA repair is defective. Proc.natn.Acad.Sci., 63:428-34, 1969.
- COHEN, L.A. Mechanisms by which dietary fat may stimulate mammary carcinogenesis in experimental animals. Cancer Res., 41:3808-10, 1981.
- COHNHEIM, J. Vorlesungen ueber allgemeine pathologie. In: HIRSCHWALD, A., ed. Handbuch fuer aerzte und studierende. Berlin, Hirschwald, 1877. p.1.
- COMMONWEALTH BUREAU OF NUTRITION. Control of diets in laboratory animal experimentation. Nutr.Abstr.Rev.B., 49(11):413-9, 1979.
- CRAWFORD, M.A.; CASPERD, N.M. & SINCLAIR, A.J. The long chain metabolites of linoleic acid and linolenic acid in liver and brain herbivores and carnivores. Comp.biochem.Physiol., 54B:395-401, 1978.
- CROCE, C. & KLEIN, G. Chromosome translocations and human cancer. Sci.Am., 252(3):54-60, 1985.
- CURRIE, A.R.; BIRD, C.C.; CRAWFORD, A.M. & SIMS, P. Embryopathic effects of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and its hydroxymethyl

- derivatives in the Sprague-Dawley rat. Nature,226(6):911-4,1970.
- DAO,T.L. & SINHA,D.K. Mammary adenocarcinoma induced in organ cul-  
ture by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. J.natn.Cancer Inst.,  
49:591-93,1972.
- DAVE,J.R.; KNAZEK,R.A. & LIU,S.C. Prolactin modifies the fluidity  
of rat livers membranes. Biochem.biophys.Res.Comm.,100(1):45 -  
51,1981.
- DAY,N.E.; MUENZ,L. & TULINIUS,H. Some aspects of familial breast  
cancer. In:GRUNDMANN,E. & BECK,L.,eds. Early diagnosis of bre-  
ast cancer. Campaing, Stuttgart, Gustav Fischer,1978. p.29-36.
- DAYTON,S.; HASHIMOTO,S. & WOLLMAN,J. Effects of high-oleic acid  
and high-linoleic safflower oils on mammary tumors induced in ra-  
ts by 7,12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene. J.Nutr.,107:1353-60,1977.
- DE WAARD,F. Breast cancer incidence and nutritional status with  
particular reference to body weight and height. Cancer Res.,35:  
3351-6,1975.
- \_\_\_\_\_. Nutritional aspects of breast cancer and the possi-  
ble bearing on screening programs. In:GRUNDMANN,E. & BECK,L.,eds.  
Early diagnosis of breast cancer. Champaign,Stuttgart,Gustav Fis-  
cher,1978. p.37-41.
- DIGIOVANNI,J. & JUCHAU,M.R. Biotransformation and bioactivation of  
7,12-dimethylbenz(a)anthracene (7,12-DMBA). Drug metab.Rev.,11(1):  
61-101,1980.
- DUNNING,W.F.; CURTIS,M.R. & MADSEN, M.E. Diethylstilbestrol-indu-  
ced mammary gland and bladder cancer in reciprocal F<sub>1</sub> hybrids  
between two inbred lines of rats. J.path.Bact.,7:238,1951.
- DUPONT,J.; MATHIAS,M.M. & CONNALY,P.T. Prostaglandin synthesis as  
a function of dietary linoleate concentration. Feden.Proc.,37:  
445- 50 ,1978.

- DYERBERG, J.; BANG, H.O.; MONCADA, S. & VANE, J.R. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. Lancet, 2:117-9, 1978.
- EL-KHATIB, S.M. & CORA, E.M. Role of high-fat diet in tumorigenesis in C57BL/L mice. J.natn.Cancer Inst., 66(2):297-301, 1981.
- ELLERMANN, A. & GUDBJARNASSON, S. Reversible alterations in fatty acid profile of glycerolphospholipids in rat heart muscle induced by repeated norepinephrine administration. Biochem.biophys. Acta, 750:1-6, 1983.
- ENING, M.G.; MUNN, R.J. & KEENEY, M. Dietary fat and cancer trends - a critique. Feden.Proc., 37(9):2215-20, 1978.
- FARBER, E. The genesis of cancer with chemicals. Archs.path.Lab. Med., 104:499-502, 1980.
- FEO, F.; CANUTO, R.A. & GARCEA, R. Acceptor control ratio of mitochondria. Factors affecting it in Morris hepatoma 5123 and Yoshida hepatoma AA-130. Eur.J.Cancer, 9:203-14, 1973a.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; BERTONE, G.; GARCEA, R. & PIANI, P. Cholesterol and phospholipid composition of mitochondria and microsomes isolated from Morris hepatoma 5123 and rat liver. FEBS Lett., 33:229-32, 1973b.
- FESTING, M.F.W. Production methods. In: UFAW, ed. The UFAW handbook of the care and management of laboratory methods. 5 Edinburgh, Churchill Livingstone, 1976. p.57-73.
- FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. J.biol.Chem., 66:375-400, 1925.
- FOLCH, J.; ASCOLI, I.; LEES, M.; MEATH, J.A. & LeBARON, F.N. Preparation of lipide extracts from brain tissues. J.biol.Chem., 191:833-41, 1951.
- FURTH, J. & SOBEL, H. Neoplastic transformation of granulosa cells in grafts of normal ovaries into spleen of gonadectomized mice. J.natn.Cancer Inst., 8(1):7-16, 1947.

- FUJIWARA, Y.; OKAYASU, T.; ISHIBASHI, T. & IMAI, Y. Immunolochemical evidence for the enzymatic difference of  $\Delta^6$ -desaturase in rat liver microsomes. Biochem.biophys.Res.Comm., 110(1):36-41, 1983.
- GARCIA, P.T. & HOLMAN, R.T. Competitive inhibitions in the metabolism of polyunsaturated fatty acids studied via the composition of phospholipids, tryglycerides and cholesteryl esteres of rat tissue. J.Am.Oil Chem.Sci., 42:1137-41, 1965.
- GERHARDT, K.O. & GEHRKE, C.W. Rapid microdetermination of fatty acids in biological material by gas-liquid chromatography. J.Chromat., 143:335-44, 1977.
- GOMEZ, P. & ROSADO, A. Historia de la investigación del cancer. Arch. invest.Méd., 12:361-75, 1981.
- GREEN, H.N. An immunological concept of cancer: a preliminary report. Br.Med.J., 2:1374-80, 1954.
- GROSS, L. Spontaneous leukemia developing in C<sub>3</sub>H mice extracts, or AK embryous. Proc.Soc.exp.Biol., 76:27-35, 1951.
- GUARNIERI, M. & JOHNSON, R. The essential fatty acid. Adv.Lipid Res., 8:115-74, 1970.
- HANKIN, J.H. & RAWLINGS, M.S. Diet and breast cancer: a review. Am. J.clin.Nutr., 31:2005-16, 1978.
- HARTMANN, L. & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esteres from lipids. Lab.prat., 20:475-94, 1973.
- HASSAM, A.G. The influence of  $\alpha$ -linoleic acid (18:3  $\omega$ 3) on the metabolism of  $\gamma$ -linoleic acid (18:3  $\omega$ 6) in the rat. Br.J.Nutr., 38:137-40, 1977.
- \_\_\_\_\_ & CRAWFORD, M.A. Influence of natural dietary  $\gamma$ -linoleic acid on the milk and liver lipids of suckling rate. Nutr. metab., 20:112-6, 1976.

- HASSAM,A.G. & CRAWFORD,M.A. The effect of dihomo- $\gamma$ -linoleic acid (20:3 n-6) on the composition of phospholipid fatty acid in the liver of rats deficient in essential fatty acids. Br.J. Nutr.,40:155-7,1978.
- HEATH,J.K. Morphogenesis of the mammary gland. Nature,265:587-90,1977.
- HEIDELBERGER,C. Studies of molecular mechanisms of hydrocarbon carcinogenesis. J.Cell.comp.Physiol.,64:129-48,1964.
- HEMS,G. Contributions of diets and childbearing to breast cancer rates. Br.J.Cancer,37:974-82,1978.
- HENDERSON,B.E.; POWELL,D.; ROSARIO,I.; KEYS,C.; HANISCH,R., YOUNG, M.; CASAGRANDE,J.; GERKINS,V. & PIKE,M.C. An epidemiologic study of breast cancer. J.natn.Cancer Inst.,53:609-14,1974.
- HILL, M.J. Dietary fat in human cancer. Proc.Nutr.Soc.,40:15-9, 1981.
- HILLYARD,L.A. & ABRAHAM,S. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on growth of mammary adenocarcinoma in mice and rats. Cancer Res.,39:4430-7,1979.
- HILTUNEN,J.K.; OSMUNDEN,H. & BREMER,J.  $\beta$ -oxidation of polyunsaturated fatty acids having double-bonds of even-numbered positions in isolated rat liver mitochondria. Biochem.biophys.Acta.,752: 223-32,1983.
- HOLLIDAY,R. A new theory of carcinogenesis. Br.J.Cancer,40:513-22,1979.
- HOLMAN,R.T. How essential are fatty acids? J.Am.med.Ass.,178:930-3,1961.
- HONN,K.V.; BUSSE,W.D. & SLOANE,B.F. Prostacyclin and thromboxanes. Implications for their role in tumor cell membranes. Biochem. Pharmacol.,32(1):1-11,1983.



- HOOVER, R.A.; GRAY, L.A.; COLE, P. & MacMAHON, B. Menopausal estrogens and breast cancer. New Engl. J. Med., 295:401-5, 1976.
- HOPKINS, G.J. & CARROLL, K.K. Relationship between amount and type of dietary fat in promotion of mammary carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. J. natn. Cancer Inst., 62 (4):1009-12, 1979.
- \_\_\_\_\_.; KENNEDY, T.G. & CARROLL, K.K. Polyunsaturated fatty acids as promoters of mammary carcinogenesis induced Sprague-Dawley rats by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. J. natn. Cancer Inst., 66 (3):517-22, 1981.
- \_\_\_\_\_. & WEST, C.E. Possible role of dietary fats in carcinogenesis. Life Sci., 19:1103-15, 1976.
- \_\_\_\_\_. & \_\_\_\_\_. Effect of dietary polyunsaturated fat on the growth of a transplantable adenocarcinoma in C3H<sup>VY</sup>fB mice. J. natn. Cancer Inst., 58 (3):753-6, 1977.
- HOWELL, M.A. Factor analysis of international cancer mortality data and percapita food consumption. Br. J. Cancer, 29:328-35, 1974.
- HUEBNER, J.J. & TODARO, G.J. Oncogenes of RNA tumor virus determinants of cancer. Proc. natn. Acad. Sci., 64:1087-92, 1969.
- HUGGINS, C.; GRAND, L. & BRILLANTES, F. Mammary cancer induced by a single feeding of polynuclear hydrocarbons and its suppression. Nature, 189:204-7, 1961.
- HWANG, D.H.; MATIAS, M.M.; DUPONT, J. & MEYER, D.L. Linoleate enrichment of diet and prostaglandin metabolism in rats. J. Nutr., 105:995-1002, 1975.
- INNIS, S.M. & CLANDININ, M.T. Dynamic modulation of mitochondrial membrane physical properties and ATPase activity by diet lipid. Biochem. J., 198:167-75, 1981a.
- \_\_\_\_\_. & \_\_\_\_\_. Mitochondrial-membrane-polar-head-group composition is influenced by diet fat. Biochem. J., 198:231-4, 1981b.

IP,C. Ability of dietary fat to overcome the resistance of natural female rats to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumorigenesis. Cancer Res.,40:2785-9,1980.

\_\_\_\_\_.; YIP,P. & BERNARDIS,L.L. Role of prolactin in the promotion of dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors by diet fat. Cancer Res.,40:374-8,1980.

IRTFANI,N. & NARITA,R. Changes of arachidonic acid and n-3 polyunsaturated fatty acids of phospholipid classes in liver, plasma and platelet during dietary manipulation. Biochem.biophys. Acta,793:441-7,1984.

JAKUBOWSKI,J.A. & ARDLIE,N.G. Modification of human platelet function by diet enriched in saturated or polyunsaturated fat. Atherosclerosis,31:335-44,1978.

JUKES,T.H. Living history: Nutritional discoveries of the 1930s. Introductory remark. Feden.Proc.,38:2679-80,1979.

KAGAWA,Y. & RACKER,E. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation.IX.Reconstruction of oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase. J.biol.Chem.,241:2467-74 , 1966.

KALAMEGHAM,R. & CARROLL,K.K. Reversal of the promotional effect of high-fat diet on mammary tumorigenesis by subsequent lowering of dietary fat. Nutr.Cancer,6(1):22-31,1984.

KENNAWAY,E.L. The identification of carcinogenic compound in coal tar. Br.med.J.,2:749- 55,1955.

KIDWELL,W.R.; KNAZEK,R.A.; VONDERHAAR,B.K. & LOSONCZY,J. Effects of unsaturated fatty acids on the development and proliferation of normal and neoplastic breast epithelium. In:ARNOTT,M.S.;van EYS,J. & WANG,Y-M.,eds. Molecular interrelations of nutrition and cancer. New York,Raven Press,1982. p.219-36.

- KING, M.C. Genetic epidemiology of human cancer. In: BUCHENAL, J. H. & OEFFGEN, H.F., eds. Cancer. New York, Grune & Stratton, 1981. p.397-405.
- KING, M.M.; BAILEY, D.M.; GIBSON, D.D. PITHA, J.V. & McCAY, P.B. Incidence and growth of mammary tumors induced by dimethylbenz(a)anthracene as related to the dietary content of fat and antioxidant. J.natn.Cancer Inst., 63(3):657-63, 1979.
- KINSELLA, A.R. & RADMAN, M. Tumor promoter induces sister chromatid exchange; relevance to mechanisms of carcinogenesis. Proc. natn.Acad.Sci., 75:6149-55, 1978.
- KNAZEK, R.A. & LIU, S.C. Dietary essential fatty acids are required for maintenance and induction of prolactin receptors(40679). Proc.Soc.exp.Biol.Med., 162:346-50, 1979.
- KOMITOWSKY, D.; SASS, B. & LAUB, W. Rat mammary tumor classification : notes on comparative aspects. J.natn.Cancer Inst., 68(1):147-56, 1982.
- KRITCHEVSKY, D. Lipids and cancer. In: ARNOTT, M.S.; van EYS, J. & WANG, Y-M., eds. Molecular interrelations of nutrition and cancer. New York, Raven Press, 1982. p.209-17.
- \_\_\_\_\_.; WEBER, M.M. & KLURFELD, D.M. Dietary fats versus caloric content in initiation and promotion of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary tumorigenesis in rat. Cancer Res., 44:3174-7, 1984.
- KUZMA, J.F. Breast. In: ANDERSON, W.A.D., ed. Pathology. 6 St. Louis, C.V. Mosby Co., 1971. p. 1578.
- LAMERTON, L.F. Radiation carcinogenesis. Br.med.Bull., 20:134-8, 1964.
- LAVIK, P.S. & BAUMANN, C.A. Dietary fat and tumor formation. Cancer Res., 1:181-7, 1941.
- \_\_\_\_\_. & \_\_\_\_\_. Further studies on tumor-promoting action of fat. Cancer Res., 3:749-56, 1943.

- LAWLEY,P.D. The action of alkilating mutagens and carcinogens on nucleic acid. In:NAKAMURA,W.; TOKAYAMA,S.;SUGIMURA,T. & ODASHI MA,O.,eds. N-methyl-N-nitroso compounds as methylating agents. Tkyo, University of Tókyo Press,1972. p.237.
- LEGER,C. Developments recents de la notion d'acides gras essentiels chez poissons. Annls.Nutr.Aliment.,34:207-15,1980.
- LEHNINGER,A.L. Localização das enzimas nas mitocôndrias. In:LEHNINGER,A.L. Bioquímica. 2 São Paulo,Edgard Blucher Ltda, 1976. p.360-3.
- LEWINSON,E.F. & NETO,A.S. Bilateral breast cancer at the Johns Hopkin Hospital. Cancer,28:1297-301,1971.
- LIN,T.M.; CHEN,K.B. & MacMAHON,B. Epidemiologic characteristics of cancer of the breast in Taiwan. Cancer,27:1497-504,1971.
- LIPSETT,M.B. Interactions of drugs,hormones and nutrition in the causes of cancer. Cancer,43:1967-81,1979.
- \_\_\_\_\_. Carcinogenesis of endocrine-related human cancers: interactions of diet and nutrition with the endocryne system. In:ARNOTT,M.S.; vanEYS,J. & WANG,Y-M.,eds. Molecular interrelations of nutrition and cancer. New York,Raven Press,1982. p.61-9.
- LOCKNISKAR,M.; NAUSS,K.M. & NEWEBERNE,P.M. The effect of quality of dietary fat on immune system. J.Nutr.,113:951-61,1983.
- LOWRY,O.H.; ROSENBROUGH,N.J.; FARR,A.L. & RANDALL,R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J.biol.Chem.,193: 265-75,1951.
- MacDONALD,M.L.; ROGERS,Q.R. & MORRIS,J.G. Role of linoleate as an essential fatty acid for the cat independent of arachidonate synthesis. J.Nutr.,113:1422-33,1983.
- MacMAHON,B.; COLE,P.; LIN,T.M.; LOWE,C.R.; MIRRA,A.P.; RAVNIHAR, B.; SALBER,E.J.; VALAORAS,V.G. & YUASA,S. Age at first birth and breast cancer risk. Bull.WHO.,43:209-21,1970.

- MacMAHON, B.; COLE, P. & BROWN, J. Etiology of human breast cancer: a review. J. natn. Cancer Inst., 50:21-42, 1973.
- MAHMUD, J. & MIURA, Y. Effects of stimulators and inhibitors on a rachidonic acid metabolism in hepatoma. Cell. mol. Biol., 27(2/3): 197-202, 1981.
- MARKLEY, K.S. Nomenclature, classification, and discription of individual acids. In: MARKLEY, K.S., ed. Fatty acids. New York, Interscience, 1969. p. 3134-3285.
- MARKS, H.H. Influence of obesity on morbity and mortality. Bull. N.Y. Acad. Med., 36:296-313, 1960.
- MARKS, P.A. Genetically determined susceptibility to cancer. Blood, 58(3):415-9, 1981.
- MARQUARDT, H. & PHILIPS, F.S. The effects of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene on the synthesis of nucleic acid in rapidly dividing hepatic cells in rats. Cancer Res., 30:2000-6, 1970.
- MAUGH, T.H. Chemical carcinogenesis: a long neglected field blossoms. Science, 183:940-4, 1974.
- MAZLIAK, P. Formation des acides gras polyinsaturés dans règne végétal. Annls. Nutr. Aliment., 34:1-18, 1980.
- MCCOY, G.W. A preliminary report on tumors found in wild rats. J. med. Res., 21: 285-96, 1909.
- MCGREGOR, L.; MORAZAIN, R. & RENAUD, S. Effect of dietary linoleic acid on platelet function in the rat. Thromb. Res., 20:499-507, 1980.
- MEDINA, D.; BUDEL, J.S.; SOCHER, S.H. & MILLER, F.L. Mammary tumorigenesis in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-treated C57BL x DBA/2f F<sub>1</sub> mice. Cancer Res., 40:368-73, 1980.
- MELNICK, R.L.; HANSON, R.M. & MORRIS, H.P. Membranous effects on adenosine triphosphatase activities of mitochondria from rat liver and Morris hepatoma 3924A. Cancer Res., 37:4395-9, 1977.

- MIDDLETON, P.J. The histogenesis of mammary tumours induced in the rat by chemical carcinogenesis. Br.J.Cancer., 19:830-9, 1965.
- MILLER, A.B.; KELLY, A.; CHOI, N.W.; MATHEWS, Y.; MORGAN, R.W.; MUNAN, L.; BURCH, J.D.; FEATHER, J.; HOWE, G.R. & JAIN, M. A study of diet and breast cancer. Am.J.Epidemiol., 107:499-509, 1978.
- MILLER, E.C. Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals. Presidential Address. Cancer Res., 38:1479-96, 1978.
- MILLER J.A. & MILLER, E.C. Chemical carcinogens: mechanisms and approaches to its control. J.natn.Cancer Inst., 47:5-8, 1971.
- MINASIAN-BATMANIAN, L.C. & JABARA, A.G. Hormone and drug effects on growth of DMBA mammary tumors and plasma prolactin levels in adrenoovariectomized rats. Br.J.Cancer., 43:832-41, 1981.
- MITCHELL, P. Vectorial chemistry and the molecular mechanism of chemiosmotic coupling: power transmission by proticity. Biochem. Soc.Trans., 4:399-430, 1976.
- MLYAMOTO-TLAVEN, M.J.; HILLYARD, L.A. & ABRAHAM, S. Influence of dietary fat on the growth of mammary ducts in BALB/c mice. J.natn.Cancer Inst., 67(1):179-88, 1981.
- MOHRHAUER, R.H. & HOLMAN, R.T. The effect of dose level of essential fatty acid composition on the rat liver. Lipid Res., 4(2):151-9, 1963.
- MORIN, N.R.; ZELDIN, P.E.; KUBINSKI, Z.O.; BHATTACHARYA, P.K. & KUBINSKI, H. Macromolecular complex produced by chemical carcinogens and ultraviolet radiation. Cancer Res., 37:2802-10, 1977.
- MORISAKI, N.; SAITO, Y. & KUMAGAI, A. Synthesis and metabolism of arachidonyl and eicosapentanoyl-coA in rat. Biochem.biophys. Acta, 752:301-6, 1983.
- NAGASAWA, H. Prolactin: its role in the development of mammary tumors. Med.Hypoth., 5:1117-21, 1979.

NAKAMURA, Y.; KODAMA, M. & KODAMA, T. Relation between adrenal function and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced mammary cancer of the rat. Gann, 72:679-83, 1981.

NIELSEN, N.H. & HANSON, J.P.H. Breast cancer in Greenland selected epidemiological, clinical, and histological features. J.Cancer clin.Oncol., 98:287-99, 1980.

NOMURA, A., HENDERSON, B.E. & LEE, J. Breast cancer and diet among the Japanese in Hawaii. Am.J.clin.Nutr., 31:2020-5, 1978.

NOWELL, P.C. & HUNGERFORD, D.H. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science, 132:1497-99, 1960.

OHNISHI, T.; SUZUKI, T.; SUZUKI, Y. & OZAWA, K. A comparative study of plasma membrane Mg<sup>2+</sup>-ATPase activities in normal, regenerating and malignant cells. Biochem.biophys.Acta, 684:67-74, 1982.

OWEN, B.Jr.; MURRILL, E. & FRANSKA, C. Metabolism of a carcinogen (7,12-dimethylbenzanthracene) in the pancreas of the Long-Evans rat. Res.Communs.Chem.path.Pharmacol., 33(11):103-8, 1981.

OWLIN, E.H. Oxigenation of linoleic and linolenic acid to novel vicinal dihydroxy acids by hepatic microsomes of rabbit. Biochem.biophys.Res.Communs., 111:644-51, 1983.

PACE-ASCIAC, C. & WOLFE, C. & WOLFE, L.S. Inhibition of prostaglandin synthesis by oleic, linoleic, and linolenic acid. Biochem.biophys Acta, 152:784-7, 1968.

PASCAUD, M. Acides gras essentials et development animal. Annls. Nutr.Aliment., 34:175-86, 1980.

\_\_\_\_\_. & LAVABRE, P. Utilisation de l'acide linoleique <sup>14</sup>C par le rate en croissance. In: PASCAUD, M. & LAVABRE, P., eds. Proceedings of the seventh international congress of nutrition. Braunschweig, Verlang Friedr Vieweg & Sohn GmbH, 1966. p.3-7.

PAWLEGA, J. & WALLACE, R. Nutrition and age first birth in breast-cancer risk. Br.J.Cancer, 41(6):941-5, 1980.

PEDERSEN, P.L. Mitochondrial adenosine triphosphate. Bioenerg., 6:243-75, 1975.

- PEDERSEN, P.L. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. Prog.exp.Tumor Res., 22:190-274, 1978.
- PHILLIPS, R.L. Role of life style and dietary habits in risk of cancer among seventh-day adventists. Cancer Res., 35:3513-22, 1975.
- PIMENTEL, E.R. & TAHIN, Q.S. Purification of soluble amphibian liver mitochondrial ATPase. IRCS med.Sci., 8:147, 1980.
- PITELKA, D.R. The mammary gland. In: WEISS, L. & GREEP, R.O., eds. Histology. 4 New York, McGraw Hill Book Co., 1977. p.925-50.
- PITOT, H.C. & HEIDELBERGER, C. Metabolic regulatory circuits and carcinogenesis. Cancer Res., 23:664-700, 1963.
- \_\_\_\_\_.; GOLDSWORTHY, T. & MORAN, S. The natural history of carcinogenesis: implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. Mechanisms of chemical carcinogenesis. J.supramol.Struct.Cell.Biochem., 17:141-54, 1981.
- POTT, P. Chirurgical observation relative to the catarat, the polipus of the nouse, the cancer of scrotum, the different kinds of ruptures, and mortification of the toes and feet. London, Hawes, 1755. p.208.
- POTTER, V.R. The present status of the deletion hypothesis. Univ. Mich.Med.Bull., 23:401- 8, 1957.
- PRIOR, P. & WATERHOUSE, J.A.H. Incidence of bilateral tumours in a population-based series of breast-cancer patients. Two approaches to an epidemiological analysis. Br.J.Cancer, 37:630-4, 1978.
- PULLMAN, M.E. & MONROY, Y.G.C. A naturally accuring inhibitor of mitochondrial ATPase. J.biol.Chem., 238(11):3762-9, 1963.
- PURNELL, D.M. The relationship of terminal duct hyperplasia to mammary carcinoma in 7,12-dimethylbenzan(a)anthracene-treated LEW / Mai rats. Am.J.Pathol., 98:311-24, 1980.



- RACKER, E. The two faces of the inner mitochondrial membrane. Essays Biochem., 6:1-22, 1970.
- RAO, G.A. & ABRAHAM, S. Dietary alterations fatty acid composition of lipid classes in mouse mammary adenocarcinoma. Lipids, 10(10): 641-3, 1975.
- \_\_\_\_\_. & \_\_\_\_\_. Enhanced growth rate of transplanted mammary adenocarcinoma induced in C<sub>3</sub>H mice by dietary linoleate. J. natn. Cancer Inst., 56(2):431-2, 1976.
- \_\_\_\_\_. & \_\_\_\_\_. Reduced growth rate of transplantable mammary adenocarcinoma in C<sub>3</sub>H mice fed eicosa-5,8,11,14-tetraenoic acid. J. natn. Cancer Inst., 58:445-7, 1977.
- REHN, L. Blasengeschwindigkeit bei fuchsin-arbeitern. Arch.klin.Chir., 50:588, 1895.
- RENAUD, S.; DUMONT, E.; GOOSEY, F.; SUPLISSON, A. & THEVENON, C. Platelet functions in relation to dietary fats in farmers from two regions of France. Thromb.diath.Haemorrh., 40(3):518-31, 1979.
- RICHARDSON, T.; TAPPEL, A.L.; SMITH, L.M. & HOULE, C.R. Polyunsaturated fatty acids in mitochondria. J.Lipid Res., 3(3):344-50, 1962.
- ROGERS, A.E.; FERNSTROM, J.A.; GE, K.; McCONNELL, R.G.; LEAVITT, W.W.; WETSEL, W.C.; YANG, S.O. & CAMELIO, E.A. Endocrine interaction in nutritional modulation to mammary carcinogenesis in rats. In: ARNOTT, M.S.; vanEYS, J. & WANG, Y-M., eds. Molecular interrelations of nutrition and cancer. New York, 1982. p.381-99.
- ROODYN, D.B. Survey of the morphology and metabolic activity of mitochondria. III. Structural basis of mitochondrial function. In: ROODYN, D.B., ed. The biogenesis of mitochondria. London, Methuen, 1968. p.103-80.
- ROUS, P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cell. J.exp.Med., 13:397, 1910.

- RUGGIERI, S. & FALLANI, A. Composizione lipidica delle frazioni citoplasmatiche dell'epatoma ascite di Yoshida e del fegato. Spesimentale, 118:313-35, 1968a.
- \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. Comparazione lipidica delle frazioni citoplasmatiche dell'epatoma di Morris 5123 e del fegato. Sperimentale, 118:483-501, 1968b.
- SACHS, L. Growth, differentiation and the reversal of malignancy. Sci. Am., 251(2):30-7, 1984.
- SANDERS, T.A.B.; ELLIS, I.R.; PATH, F.R.C. & DICKERSON, W.T. Studies on vegans: the fatty acid composition of plasma choline phosphoglycerides, erythrocytes, adipose tissues, and breast milk, and some indicators of susceptibility to ischemic heart disease in vegan and omnivore controls. Am. J. Clin. Nutr., 31:805-13, 1978.
- SCHRIYVER, R. & PRIVETT, O.S. Effect of dietary long-chain fatty acids on the biosynthesis of unsaturated fatty acids in rat. J. Nutr., 112:619-26, 1982.
- SCHURR, P.E. Composition and preparation of experimental intravenous fat emulsions. In: HUGGINS, C.B., ed. Experimental leukemia and mammary cancer. Chicago, The University of Chicago Press, 1979. p.177-83.
- SELENSKAS, S.L.; IP, M.M. & IP, C. Similarity between trans fat and saturated fat in modifications of rat mammary carcinogenesis. Cancer Res., 44:1321-6, 1984.
- SJÖSTRAND, F.S. & BERNHARD, N. The structure of mitochondrial membrane in frozen sections. J. Ultrast. Res., 56:233-46, 1976.
- SPIEGEL, M.R. Estatística; Teoria das pequenas amostras. São Paulo, McGraw Hill do Brasil Ltda, 1972. p.310-1.
- SPOONER, M.E. & COOPER, E.H. Chromosome constitution of transitional cell carcinoma of the urinary bladder. Cancer, 29:1401-12, 1972.

- STANCLIFF, R.C.; WILLIAMS, M.A.; UTSUMI, K. & PACKER, L. Essential fatty acid deficiency and mitochondrial function. Arch. Biochem. Biophys., 131:628-42, 1969.
- STASZEWSKI, . Age of menarche and breast cancer. J. natn. Cancer Inst., 47:935-40, 1971.
- STOCKS, P. Cancer mortality in relation to national consumption of cigarettes, solid fuel, tea and coffee. Br. J. Cancer, 24:215-25, 1970.
- SUGIYAMA, T.; UEDA, N.; MAEDA, S.; SHIRAISHI, N.; GOTO-MIMURA, K.; MURAO, S. & CHATTOPADHYAY, S.C. Chemical carcinogenesis in the rat: common mode of action of carcinogens at the chromosomal level. J. natn. Cancer Inst., 67(4):831-9, 1981.
- TAHIN, Q.S. Importância fisiológica e patológica dos ácidos graxos. Arq. Biol. Tecnol., 28(3):335-61, 1985.
- \_\_\_\_\_.; BLUM, M. & CARAFOLI, E. The fatty acid composition of subcellular membranes of rat liver, heart, and brain: diet-induced modifications. Eur. J. Biochem., 121:5-13, 1981.
- \_\_\_\_\_.; \_\_\_\_\_.; LÖTSCHER, H. RITCHER, C. & CARAFOLI, E. Calcium transport across mitochondrial membranes with dietary lipid alterations. Arq. Biol. Tecnol., 23:127-8, 1980.
- \_\_\_\_\_.; CAVALCANTI, T.C. & TAHIN, C.P.B. Simplificação do método de Fiske-Subbarow de dosagem de fosfato inorgânico. Arq. Biol. Tecnol., 28(4):483-91, 1985.
- TAMULSKY, T.S.; MORREAL, C.E. & DAO, T.L. Comparative metabolism of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in liver and mammary tissues. Cancer Res., 33:3117-22, 1973.
- TANNENBAUM, A. Nutrition and cancer. In: HOMBURGER, F., ed. The physiopathology of cancer. 2 New York, Hoeber-Harper, 1959. p. 517-62.

- TAY, L.K. & RUSSO, J. 7,12-dimethylbenz(a)anthracene induced DNA binding and repair synthesis in susceptible and nonsusceptible mammary epithelial cells in culture. J.natn.Cancer Inst., 67(1):155-61, 1981.
- TIETZ, N.W. Extraction of lipids from biological materials. Sample preparations. In: TIETZ, N.W., ed. Fundamentals of clinical laboratory. Philadelphia, W.B.Saunders, 1970a. p.321.
- \_\_\_\_\_. Determination of inorganic phosphate in serum and urine. In: TIETZ, N.W., ed. Fundamentals of clinical laboratory. Philadelphia, W.B.Saunders, 1970b. p.648-50.
- TIMOFEEVA, N.G.; SOROKINA, I.B. & DYATLOVITSKAYA, E.V. Phospholipid composition of mitochondria and microsomes of certain transplantable rat tumors. Biokhimiya, 46(1):11-5, 1981.
- TRICHOPOULOS, D., MacMAHON, B. & COLE, P. Menopause and breast cancer risk. J.natn.Cancer Inst., 48:605-13, 1972.
- TULINIUS, H.; DAY, N.E.; JOHANNESSON, G.; BJARNASON, O. & GONZALES, M. Reproductive factors and risk for breast cancer in Iceland. Int.J.Cancer., 21:724-30, 1978.
- VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action to aspirine like drugs. Nature, 231:232-5, 1971.
- VERGROESEN, A.J. Physiological effects of dietary linoleic acid. Nutr.Res., 35(1):1-5, 1977.
- VIRCHOW, R. Krankheitswesen und Urkrankheitsursachen. Virchows Arch.path.Anat.Physiol., 78:1, 1880.
- VLES, R.O. Graisses alimentaires, acides gras essentiels et prostaglandines. Revue fr.Cps.gras., 6:1-8, 1971.
- \_\_\_\_\_. Effects des corps gras sur le myocarde de diverses especes animales: essais d'evaluation histometrique. Revue fr.Cps.gras., 6:289-95, 1978.

- VLES, R.O. & HOUTSMULLER, U.M.T. Connaissances actuelles sur les graisses alimentaires: leur importance en nutrition humaine. Revue fr.Cps.gras., 11:523-8, 1977.
- VON JAGIE, N.; SCHWARZ, C. & SIEBENROK, L. Blutbefunds bei roetgen. Berl.klin.Wschr., 28:1220, 1911.
- WAGNER, D.A.; NAYLOR, P.H.; KIM, U.; SHEA, W.; IP, C. & IP, M.M. Interaction of dietary fat and the thymus in the induction of mammary tumors by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. Cancer Res., 42:1266-73, 1982.
- WARBURG, O. On respiratory impairment in cancer cells. Science, 18:269-70, 1956a.
- \_\_\_\_\_. On the origin of cancer cells. Science, 123(3191):309-14, 1956b.
- WAXLER, S.H.; BRECHER, G. & BEAL, S.L. The effect of fat-enriched diet on the incidence of spontaneous mammary tumor in obese mice (40683). Proc.Soc.exp.Biol.Med., 162:365-8, 1979.
- WEINBERG, R.A. Cellular oncogenes. Trends Biochem.Sci., 9:131-3, 1984.
- WEINHOUSE, S. Oxidative metabolism of neoplastic tissue. Adv. Cancer Res., 3:269-325, 1955.
- WEINSTEIN, I.B. Japanese cancer center. Gann.Monograph., 4:3-5, 1968.
- WEISBURGER, J.H. Chemical carcinogenesis. In: CASARETT, L.J. & DOULL, J., eds. Toxicology. The basic science of poisons. New York, Macmillan Publishing Co., 1980. p.333-78.
- WHITE, M.T.; ARYA, D.V. & TEWARI, K.K. Biochemical properties of neoplastic cell mitochondria. J.natn.Cancer Inst., 53(2):553-9, 1974.

- WILKIE,D.; EVANS,J.H.; EGILSSON,V.; DIALA,E.S. & COLLIER,D. Mitochondria, cell surface, and carcinogenesis. In:DANIELLI,J.F. ed. International review of cytology. New York, Academic Press, 1983. p.157-89.
- WYNDER,E.L.; CHAN,P.; COHEN,L.; MacCORNACK,F.A. & HILL,P. Etiology and prevention of breast cancer . In:GRUNDMANN,E. & BECK,L., eds. Early diagnosis of breast cancer. Stuttgart,Gustav Fischer,1978a. p.1-28.
- \_\_\_\_\_.; MacCORNACK,F.A. & STELMANN,S.D. The epidemiology of breast in 785 United States Caucasian women. Cancer,41:2341-54,1978b.
- YAMAGIWA,K. & ICHIKAWA,K. Experimentelle studien meber die pathogenese der epithelial geschwulste. Mitt.med.Falk.,15:295,1916.
- YANAI,R.; NAGASAWA,H.; MORI,T. & NAKAJIMA,T. Longterm effects of perinatal exposure to 5-dihydrosterone on normal and neoplastic mammary development in mice. Endocrinol.Japan.,28(2): 231-4,1981.
- YAO,J.K.; NATARAJAN,V. & DYCK,P.J. The sequential alterations of endoneural cholesterol and fatty acid in wallerian degeneration. J.Neurol.,35:933-40,1980.
- YOSHIDA,H.; SUZUKI,M.; ORUGAWA,K.;WADA,S.; FUKUNISHI,P.; OKAMOTO,S. & MATSUMOTO,K. Mammary carcinoma induced by series of intra gastric intubation of 7,12-dimethybenz(a)anthracene in gonadectomized female and male Sprague-Dawley rats. Gann,73:539-42,1982.
- YOUNG,S.; GOWAN,D.M. & SHUTHERLAND,L.E. The histology of induced mammary gland tumors in rats. J.path.Bact.,85:331-40,1963.
- YUASA,S. & MacMAHON,B. Lactation and reproductive histories of breast cancer patients in Tokyo. Japan Bull.WHO., 42:195-204,1970.
- YUNIS,J.J. The chromosomal basis of human neoplasia. Science , 221:227-35,1983.

ZAJICEK, G. The histogenesis of glandular neoplasia. Med.Hypo-  
th., 7:1241-51,1981.

---

OBSERVAÇÕES:

a- As referências bibliográficas citadas neste trabalho estão es-  
critas de acordo com: NORMAS TÉCNICAS DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉC-  
NICAS, editada pelo Instituto de Bibliografia e Documentação, na cidade do  
Rio de Janeiro, no ano de 1977.

b- As abreviaturas dos periódicos citadas neste trabalho estão  
escritas de acordo com o indicado no: WORLD LIST OF SCIENTIFIC PERIODICAL, 4ª  
edição, editado por Peter Brown & George Burcher Stratton pela casa editôra  
Butterworths, na cidade de Londres, no ano de 1976.