



Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Mestrado em Patologia Experimental

**AZEITE E DIETA MEDITERRÂNICA NUM MODELO DE NEOPLASIA
EXPERIMENTAL DA MAMA**

Dissertação submetida por:
Ana Filipa dos Reis Baltazar Vicente

Setembro de 2010

A Faculdade de Medicina de Coimbra não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e à forma desta dissertação (Regulamento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, art. 108º, & único).

Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Aos meus pais

À minha irmã

Aos meus amigos

AGRADECIMENTOS

A elaboração e o desenvolvimento deste trabalho não seriam possíveis sem a força e os meios de todos os que o apoiaram e a quem devo uma sincera palavra de gratidão pela ajuda para subir este importante degrau da vida académica.

Ao Senhor Professor António Silvério Cabrita, pela oportunidade concedida, pela confiança e pelo apoio ao longo de todo o curso de mestrado, assim como na co-orientação da presente dissertação. Agradeço também ao Senhor Professor as ideias, os preciosos ensinamentos e a constante motivação.

À Senhora Professora Paula Pereira pela valiosa amizade e pelo apoio incansável no decorrer de todo este trabalho, pela inspiração e dinâmica de ideias inesgotáveis, e não seria justo deixar de referir o privilégio que sinto por trabalhar diariamente ao seu lado.

À Senhora Professora Fernanda Mesquita pelo rigor científico, e ambição que nos transmite para trabalhar.

Agradeço também à Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz e ao Instituto de Patologia Experimental a disponibilidade de meios para a realização de todo o trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	10
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. A INFLUÊNCIA DA ALIMENTAÇÃO E DA NUTRIÇÃO NO CANCRO DA MAMA	16
1.1.1. A INFLUÊNCIA DOS ALIMENTOS/NUTRIENTES NO CANCRO DA MAMA	20
1.1.1.1. A INFLUÊNCIA DO BALANÇO ENERGÉTICO	23
1.1.1.2.. OS ÁCIDOS GORDOS DO AZEITE	24
1.1.1.3. O EFEITO PROTECTOR DOS FRUTOS E VEGETAIS	25
1.1.2. AS MODIFICAÇÕES DECORRENTES DO PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DOS ALIMENTOS	27
1.2. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS TUMORES MAMÁRIOS DO RATO E SUA RELAÇÃO COM O CARÁCTER DE MALIGNIDADE	33
2. OBJECTIVOS	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. METODOLOGIA DO ESTUDO EXPERIMENTAL	42
3.2. ESTUDO HISTOPATÓLOGICO DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS	47
4. RESULTADOS	51
4.1. RESULTADOS PRÉVIOS DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	52
4.1.1. AVALIAÇÃO PONDERAL DOS ANIMAIS	52
4.2. COMPARAÇÃO DO NÚMERO E TAMANHO DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS ENCONTRADAS NOS DIFERENTES GRUPOS	53
4.3. RESULTADOS DA HISTOPATOLOGIA	57
5. DISCUSSÃO	73
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

Índice de Figuras

Figura 1 - Factores que podem influenciar a carcinogénese mamária (Cabrita e Pereira, 2010)	17
Figura 2 - Factores de risco de cancro (Doll and Peto, 1981)	18
Figura 3 - Factores que interferem no estado hígido e na alimentação de cada indivíduo (Cabrita e Pereira, 2010)	19
Figura 4 - Formação das nitrosaminas nos alimentos	31
Figura 5 - Esquema da metodologia utilizada no trabalho experimental anterior	45
Figura 6 - Carcinoma invasivo com padrão arquitectónico cribriforme presente na glândula mamária no Grupo B (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação x100)	58
Figura 7 - Comedocarcinoma da glândula mamária de um rato fêmea Sprague-Dawley do Grupo B (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação x100)	60
Figura 8 - Carcinoma Papilar da glândula mamária de um rato fêmea Sprague-Dawley do Grupo C (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação x40)	61
Figura 9 - Corte da glândula mamária de um rato do Grupo C apresentando ainda características originais, nomeadamente o mamilo e os seios lactíferos (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação x200)	62
Figura 10 - Carcinoma Papilar da glândula mamária de um rato fêmea Sprague-Dawley do Grupo D (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação x40)	63
Figura 11 - Carcinoma Cribriforme da glândula mamária de um rato fêmea Sprague-Dawley do Grupo D (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação x40)	64
Figura 12 - Elevado pleomorfismo nuclear, destacado com setas pretas, presente num carcinoma da glândula mamária encontrado no Grupo B. Evidenciam-se igualmente algumas mitoses com setas vermelhas (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação x400)	70

Figura 13 - Elevado pleomorfismo nuclear, destacado com setas pretas, presente num carcinoma da glândula mamária encontrado no Grupo D. Evidenciam-se igualmente algumas mitoses com setas vermelhas (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação x400)

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Grupos de animais e respectivos suplementos adicionados à ração padrão.	44
Tabela 2 - Composição nutricional da ração padrão Panalab AO4	46
Tabela 3 - Classificação segundo Scarff-Bloom Richardson	50
Tabela 4 - Variações ponderais por grupo	53
Tabela 5 - Comparação do número de lesões tumorais nos diferentes grupos	54
Tabela 6 - Comparação do número de tumores por animal nos diferentes grupos	55
Tabela 7 - Comparação do tamanho das neoplasias encontradas nos diferentes grupos	56
Tabela 8 - Padrão arquitectónico das neoplasias mamárias	57
Tabela 9 - Parâmetros histopatológicos das neoplasias mamárias	65
Tabela 10 - Contagem de mitoses nas neoplasias mamárias	67
Tabela 11 - Associação entre o Pattern Grade e o Nuclear Grade	68
Tabela 12 - Associação entre o Pattern Grade e a Contagem de mitoses	69
Tabela 13 - Associação entre o Nuclear Grade e a contagem de mitoses	69

RESUMO

Os resultados dos vários estudos epidemiológicos indiciam um papel determinante da alimentação no risco de cancro da mama. Os alimentos e os nutrientes, assim como as suas técnicas de processamento e confecção culinária podem ter um papel protector ou pejorativo na carcinogénese, incluindo no que diz respeito à glândula mamária.

A complexidade da alimentação humana e a crescente necessidade de identificar alimentos e nutrientes envolvidos assim como estudar os mecanismos através dos quais essa influência é exercida despoletou a realização de estudos em animais de laboratório. Tendo sido as condições experimentais plenamente estabelecidas e validadas, este tipo de estudos permite investigar o papel de alimentos e/ou nutrientes isoladamente ou combinados na carcinogénese mamária, em grande parte dos casos quimicamente induzida com carcinogénios específicos e de efeitos conhecidos.

O presente trabalho pretende dar continuidade a um projecto de investigação sobre o papel da alimentação do tipo mediterrânico na carcinogénese mamária. No mesmo projecto foram utilizados ratos fêmea da estirpe Sprague-Dawley a que foi administrado o carcinogénio 7,12 dimetilbenzantraceno nos animais dos grupos de estudo. Este trabalho teve a duração de 150 dias tendo todos os animais sobrevivente sido sujeitos ao

processo de necrópsia para observação do hábito interno e externo, incluindo os tumores mamários e extra-mamários encontrados em cada animal.

Realizado o estudo experimental propriamente dito, pretendeu-se complementar os dados da observação macroscópica dos tumores mamários com parâmetros histológicos que pudessem ser indicadores da sua malignidade. Para o efeito, foram comparados os principais parâmetros histopatológicos dos tumores provenientes do grupo que apenas recebeu a ração padrão com os do grupo suplementado com azeite e ainda com os animais do grupo que receberam uma refeição do tipo mediterrânico. Conferiram-se também os resultados provenientes do grupo que foi poupado da administração do carcinogénio e que apenas recebeu a ração padrão, não tendo sido tal como se esperava, encontrados quaisquer tumores.

Os resultados deste estudo histopatológico vieram confirmar o possível benefício do consumo de azeite na carcinogénese mamária. Os tumores provenientes dos animais que receberam esta gordura alimentar como suplemento apresentavam diferenças significativas no que diz respeito aos três principais indicadores histológicos de malignidade tumoral – extensão das áreas sólidas, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica.

No que diz respeito ao grupo suplementado com a refeição do tipo mediterrânico, os resultados deste estudo não foram tão evidentes quanto se esperava. Nos tumores deste grupo destacou-se sobretudo o elevado pleomorfismo nuclear mas ainda assim, os

tumores encontrados apresentaram alguns indicadores positivos como a baixa contagem mitótica e baixa extensão de áreas sólidas.

Tendo em conta os resultados deste e do trabalho anterior, considera-se relevante a continuidade dos trabalhos experimentais com disciplinas complementares como a histopatologia, com o objectivo de avaliar possíveis marcadores e indicadores da malignidade tumoral que possam ter expressão semelhante no ser humano e podendo estar relacionados com o prognóstico clínico.

ABSTRACT

Epidemiologic data reveal an important role of food and nutrition in breast cancer risk. Foods and nutrients, as well as processing and cooking techniques can have a protective or pejorative in carcinogenesis process, also in the mammary gland.

The human nutrition complexity and the growing need to identify foods and nutrients involved and also the mechanisms through which they exert their effect motivated experimental studies using laboratory animals. Because the experimental conditions are fully established and had been previously validated, in this type of studies it is possible to investigate the role of foods and nutrients, isolated or combined, on mammary gland carcinogenesis chemically induced with specific and well known carcinogens.

The present work pretends to continue a previous investigation project about the role of Mediterranean diet type in mammary carcinogenesis. In that project, female Sprague-Dawley rats were used and submitted to 7,12 dimethylbenzanthracene administration. Necropsy procedure was conducted in all the surviving animals after 150 days. The internal and external compartments were examined and all mammary or extra-mammary tumors were removed for further analysis.

Considering biologic materials and results from the previous work, the next purpose was to combine macroscopic observation data with histologic parameters that could serve as malignancy

indicators. With this purpose we considered animals from four relevant groups, from which only one was saved from carcinogen administration. The four groups received standard food; however in two of them it was added a specific supplement in study. One was supplemented with olive oil and the other with a Mediterranean diet type meal.

As expected, the group saved from carcinogen administration did not have any tumors in the end of the study. The results from the present work confirmed the previous possibility of a protective role from the consumption of olive oil. Significant differences were found between the neoplastic lesions from this group and the tumors from the group that only received the standard food and the carcinogen in what concerns to the three main histologic parameters considered as indicators of tumoral malignancy – solid areas extension, nuclear pleomorphism and mitotic count.

The results from the group supplemented with the Mediterranean diet type meal were not so evident and clear. This group tumors had a higher nuclear pleomorphism despite of lower solid areas extension and low mitotic counts.

Considering the results from both work projects, it is important to note that as seen complementary techniques like histopathology can add an important help on the evaluation of possible hallmarks and indicators of tumor malignancy that can have similar expression in humans and that can be associated with clinical prognosis

1. INTRODUÇÃO

1.1. A influência da alimentação e da nutrição no cancro da mama

A etiologia do cancro da mama, à semelhança de outras formas de doença oncológica maligna, é complexa e multifactorial. São vários os factores de risco já identificados, tais como de natureza genética, epigenética, ambiental, alimentar e comportamental, entre outros ¹⁻⁵.

Os mecanismos inerentes ao desenvolvimento e progressão do cancro da mama não estão até à data totalmente fundamentados. Considera-se no entanto que no processo de carcinogénese, à semelhança das outras formas de cancro, a etapa da iniciação se caracteriza pelo desenvolvimento de um comportamento maligno da célula, que pode ser desencadeado de diversas maneiras tais como a alteração da função genética ⁶⁻⁷, modificações ao nível dos mecanismos cruciais do ciclo celular ⁶, hábitos e estilos de vida menos salutar, sabendo-se também que determinadas condições ambientais podem constituir importantes fontes de dano conduzindo ao aparecimento de células anormais.

Vários têm sido os estudos que têm como objectivo determinar quais os factores que podem desencadear o cancro da mama, uma vez que a elevada mortalidade, o impacto socioeconómico, a qualidade de vida entre outras consequências são significativamente afectados por esta doença (Figura 1).

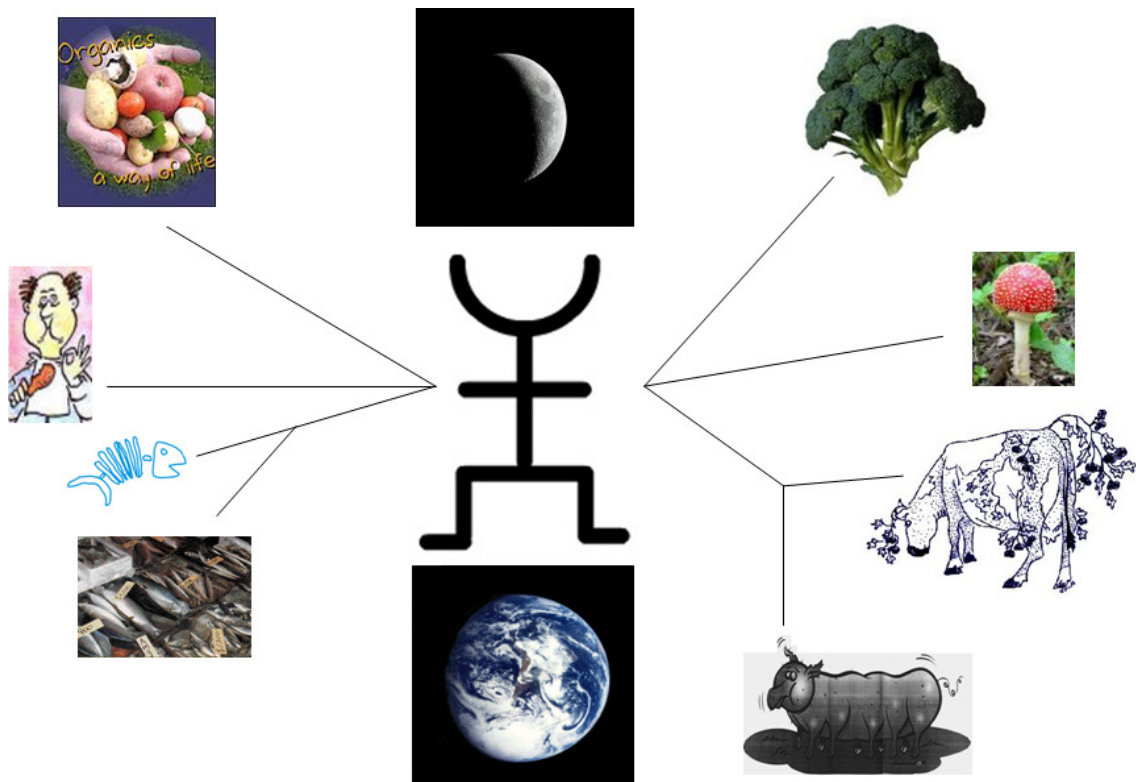


Figura 1 - Factores que podem influenciar a carcinogénese mamária (Cabrita e Pereira, 2010).

Uma extensa revisão bibliográfica efectuada em 1981 por Doll and Peto mostrou que a alimentação contribui para cerca de 35% do total de casos de cancro ⁸ (Figura 2).

Erros alimentares	35%
Tabaco	30%
Ambiente profissional	4%
Álcool	3%
Poluição e ambiente	2%

Figura 2 - Factores de risco de cancro (Doll and Peto, 1981).

A alimentação, ou melhor dizendo, aquilo que cada indivíduo ingere está intimamente associado ao seu estado hígido. Sabendo-se que existem vários factores naturais ou artificiais, provocados ou provenientes de alterações a outros níveis que influenciam o estado hígido, entre eles encontram-se os factores sociais ou socioeconómicos, ambientais ou ecológicos, emocionais ou psicológicos, genéticos ou epigenéticos que interligados à segurança e qualidade dos alimentos exercem funções determinantes influenciadoras da qualidade de vida (Figura 3).

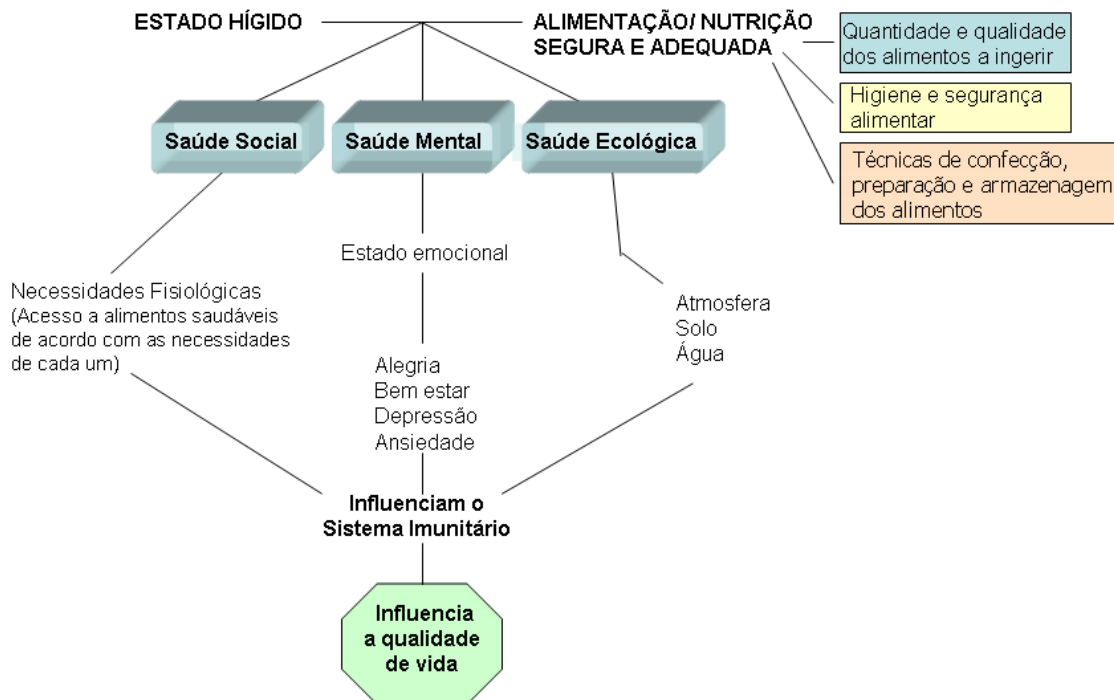


Figura 3 - Factores que interferem no estado hígido e na alimentação de cada indivíduo (Cabrita e Pereira, 2010).

A evolução do homem tem sido notória ao longo dos tempos mas, apesar desta certeza, o perfil genético não tem acompanhado esta evolução⁹ e conseqüentemente existem ainda outras condicionantes que influenciam a qualidade de vida, tais como, o estilo e hábitos de vida onde se incluem as seguintes variáveis: sedentarismo ou realização de actividade física excessiva (vigorexia), ingestão alimentar excessiva que conduz ao excesso de peso ou até mesmo à obesidade (Figura 4) ou um consumo alimentar insuficiente que leva à anorexia e à desnutrição alimentar e ainda uma ingestão alimentar monótona ou bizarra

que é responsável pela possibilidade de inúmeras carências alimentares em diversos nutrientes. Todos estes fenómenos alimentares constituem factores de risco de diversas patologias, entre elas, o cancro da mama ¹⁰⁻¹².

Neste trabalho pretende-se enfatizar a importância da alimentação/nutrição e a sua influência ao longo das etapas da carcinogénese mamária.

1.1.1. Influência dos alimentos/nutrientes no cancro da mama

Os estudos epidemiológicos conduzidos até ao momento actual permitiram identificar os alimentos e/ou grupos de alimentos mais frequentemente associados com o aumento ou diminuição do risco da doença.

O elevado consumo de bebidas alcoólicas ¹³⁻¹⁷, de alimentos ricos em açúcar como doces e sobremesas ¹⁸⁻¹⁹, carnes vermelhas ²⁰⁻²², leite e derivados completos ²³⁻²⁴ está associado ao aumento do risco de cancro. Pelo contrário, a ingestão suficiente de frutos e vegetais ²⁵⁻²⁸, leguminosas ²⁹, peixes de água fria ³⁰⁻³², azeite ³³⁻³⁷ e de chá ³⁸⁻⁴¹ parece ter o efeito inverso.

No entanto, estas associações merecem sempre alguma controvérsia, na medida em que os resultados não são

consistentes e a significância estatística nem sempre é suficientemente forte, além de, não estarem totalmente fundamentados os mecanismos que justifiquem esta influência ^{15, 42-43}. A complexidade e diversidade dos hábitos alimentares podem pôr em causa a aplicabilidade das conclusões destes estudos. Outra situação que pode dificultar a sua aplicabilidade é o facto de a maior parte destes estudos considerarem apenas a ingestão isolada de alimentos e/ou nutrientes e não considerarem as interacções que podem ocorrer entre alimentos e com o organismo quando se juntam alimentos e se utilizam diferentes técnicas culinárias ou de processamento na sua preparação ⁴³. Destaque-se ainda a possível alteração da estrutura, disponibilidade e acção dos vários constituintes dos alimentos depois de ingeridos, devido às interligações entre si sofridas ao longo do aparelho digestivo ⁴⁴.

Como factores externos está comprovado que o clima, o tipo de solo, as condições atmosféricas, entre outros parâmetros, podem fazer variar a composição nutricional dos alimentos, diferentes concentrações em macro e micronutrientes, anti-nutrientes, compostos bioactivos como os fitoquímicos poderão ser alguns dos exemplos a considerar ⁴⁵⁻⁴⁶.

Outro aspecto a considerar nos estudos efectuados que necessita de ser bem fundamentado e estruturado é o facto de nem sempre ser possível estabelecer uma associação dose – efeito, isto é, para considerar que determinado alimento ou conjunto de alimentos exerce uma acção benéfica ou pejorativa no

organismo é indispensável comprovar a qualidade do alimento e em que quantidade deve ser ingerido para causar o efeito pretendido, o que apenas poderá ser feito, utilizando indicadores bioquímicos. Algumas acções, dose - efeito, são facilmente determinadas quando para estas medições se utilizam indicadores como o colesterol, os triglicéridos, a glicemia mas o que teoricamente parece consensual, na prática torna-se de difícil experimentação e verificação em humanos por razões de ética profissional.

Sabe-se ainda que poderão existir interacções entre nutrientes provenientes de um ou vários alimentos que exerçam uma influência sinérgica ou antagónica ⁴⁷.

Todos estes aspectos parecem determinantes critérios de influência de alguns alimentos e grupos de alimentos anteriormente referidos com o risco de cancro da mama, pelo que no âmbito do presente estudo, merece especial atenção o esclarecimento da influência do balanço energético e da gordura, o potencial efeito protector dos hortofrutícolas frescos e das possíveis alterações devidas ao processamento e das técnicas de confecção dos alimentos.

1.1.1.1. A influência do balanço energético

A existência de um excesso calórico pode ser favorável à gênese de uma neoplasia maligna na medida em que facilita e promove a proliferação celular ⁴⁸. O déficit calórico poderá também constituir um factor de risco tal como se verificou de forma clara e significativa, tanto em casos de anorexia nervosa ⁴⁹⁻⁵⁰ como em populações sujeitas a longos períodos de fome ocorridos, por exemplo, em situações de guerra ⁵¹. Estes resultados podem justificar-se pela possibilidade de uma adaptação do organismo quando a ingestão alimentar normaliza ⁵¹.

A obesidade, intrinsecamente relacionada com o excesso calórico, tem um forte impacto metabólico e hormonal igualmente propício à neoplasia maligna mamária ⁵². A este respeito, parece haver um aumento do risco na mulher depois da menopausa ⁵³⁻⁵⁶. Importa igualmente destacar a influência da distribuição da gordura corporal, sendo que a distribuição considerada do tipo andróide (na zona abdominal) constitui um factor de risco já comprovado por vários estudos e em várias patologias de onde se destaca o cancro da mama ^{10, 54, 57-58}.

Na origem da obesidade e de todas as consequências a ela relacionadas está geralmente um excessivo consumo alimentar. Os alimentos que mais se relacionam com a neoplasia da mama, actuando como factores de risco, são: o aumento do consumo de açúcar, de produtos açucarados, de produtos ricos em gordura

sobretudo saturada, e de bebidas alcoólicas. O processamento dos produtos alimentares influencia a digestão e absorção, uma vez que alimentos ricos em hidratos de carbono muito refinados e pobres em fibra, cuja velocidade de absorção é muito rápida, poderão também estar associados ao aumento do risco de cancro da mama ⁵⁹⁻⁶². Entre os factores que podem influenciar a diminuição ou aumento da absorção e como tal influenciar a composição corporal de cada indivíduo estão o índice glicémico e a carga glicémica ⁶³⁻⁶⁴.

1.1.1.2. Os ácidos gordos do azeite

O papel do consumo de gordura, no risco de cancro da mama, é particularmente controverso, na medida em que um consumo excessivo deste macronutriente está associado ao aumento do risco da doença ⁶⁵, mas vários estudos epidemiológicos e experimentais evidenciaram um efeito protector de determinados ácidos gordos, nomeadamente os polinsaturados da família ómega 3 ⁶⁶⁻⁶⁷ e o ácido oleico ⁶⁸.

De facto, o consumo de azeite parece estar associado não só à diminuição do risco da doença cardiovascular mas também do cancro, sendo uma fonte privilegiada de ácido oleico (anti-inflamatório, anti-aterogénico, entre outras propriedades), mas

também de vitamina E e de compostos fenólicos que exercem uma importante acção antioxidante ⁶⁸⁻⁷³.

O efeito benéfico evidenciado no consumo de azeite e de peixes de águas frias pode dever-se aos ácidos gordos presentes nestes alimentos, o ácido oleico e ácidos gordos polinsaturados da família ómega 3 dos quais os mais importantes são os ácidos gordos eicosapentanoico (EPA) e docosahexanoico (DHA), respectivamente.

O azeite, é a gordura alimentar tradicional dos países mediterrânicos ⁷⁴, bem como o consumo de pescado conhecido como "azul" no qual se incluem: a sardinha, o carapau, a cavala, a sarda entre outros peixes de água fria, fontes privilegiadas de DHA e EPA, cuja acção protectora e preventiva de várias doenças está comprovada ⁷⁵, bem como a possibilidade de conferir um efeito protector na carcinogénese ^{32, 66, 76-77}.

1.1.1.3. O efeito protector dos frutos e vegetais

Reconhece-se a importância de uma alimentação rica em frutos e vegetais na prevenção de várias doenças e na promoção da saúde. A sua riqueza em fibra, vitaminas, minerais e fitoquímicos, todos potenciais anti-carcinogénicos ⁷⁸⁻⁷⁹, permite atribuir-lhes um papel protector no cancro da mama.

Na composição deste grupo de alimentos destaca-se o benefício da ingestão de determinados compostos tais como: fibra ^{15, 26-27, 80}, carotenóides ⁸¹⁻⁸²; folatos ⁸³; compostos organosulfurados como os isotiocianatos ⁸⁴ e os indóis ⁸⁵, presentes nas crucíferas ⁸⁶⁻⁸⁷; vitamina C ⁸⁸ e polifenóis ⁸⁹ de onde se destacam: a quercetina ⁹⁰, o resveratrol ⁹¹ e as catequinas ^{40, 92}.

Tal como acima referido no ponto 1.1., associar doses de alimentos e/ou nutrientes e obter como consequência determinados efeitos é muito controverso, como está comprovado pelos diversos estudos cujos resultados são inconsistentes ¹⁵. Os motivos que podem pôr em causa estes efeitos quer benéficos quer prejudiciais são: a elevada variação da composição nutricional consoante a sazonalidade, a origem, o solo e até a sua forma de produção, além da enorme variedade de ecótipos de cada um dos alimentos incluídos nestes grupos alimentares.

1.1.2. As modificações decorrentes do processamento tecnológico dos alimentos

O processamento tecnológico dos alimentos veio melhorar a qualidade organoléptica, facilitar a conservação e introduzir uma maior variedade de escolha na alimentação humana ⁹³⁻⁹⁴. No entanto, é essencial saber fazer as escolhas alimentares acertadas para cada indivíduo uma vez que existem métodos de processamento, armazenagem, confecção entre outros, de alimentos que podem influenciar significativamente, o efeito fisiológico dos alimentos em causa e dos seus constituintes, permitindo a ingestão de substâncias com capacidade carcinogénica.

A confecção culinária parece ser um dos factores que mais pode afectar a digestibilidade e absorção dos alimentos. Um dos exemplos mais notórios é o exercido no teor e na qualidade da fibra alimentar, uma vez que a cozedura de vegetais parece aumentar o teor de fibra solúvel e diminuir o de fibra insolúvel ⁹⁵. Estas diferenças podem influenciar o efeito fisiológico destes alimentos no risco de cancro devido ao distinto efeito dos dois tipos de fibra ⁹⁶. Por um lado, a fibra solúvel atrasa o esvaziamento gástrico e o tempo total de digestão melhorando o controlo dos níveis de glicemia ⁹⁷ mas possivelmente aumenta o tempo de exposição aos carcinogénios, um efeito oposto ao da

fibra insolúvel que acelera o trânsito intestinal e parece também ter um efeito protector pelo seu efeito no controlo do peso ^{96, 98}.

Embora o aquecimento possa promover a perda de vitaminas hidrossolúveis e termolábeis como a vitamina C ⁹⁹, este parece aumentar a biodisponibilidade de outros compostos, tal como do licopeno (carotenóide de cor vermelha presente em grande quantidade no tomate), pois este só exerce a sua acção como antioxidante quando é activado pelo calor ¹⁰⁰⁻¹⁰¹. O aquecimento parece também promover a retenção de folato ¹⁰², um dado importante na medida em que a sua ingestão parece estar inversamente relacionada com o risco de cancro da mama ¹⁰³⁻¹⁰⁴.

Por outro lado, sabe-se que as técnicas de confecção podem ser um veículo de carcinogénios, sendo os mais frequentes na alimentação as aminas heterocíclicas e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos ¹⁰⁵. Verificou-se que o consumo de carne muito cozinhada a temperaturas elevadas, por fritura profunda ou quando grelhada, parece estar associado a um aumento do risco de cancro da mama ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Estas condições são propícias à formação das aminas heterocíclicas ¹⁰⁹, e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos abundantes nas superfícies carbonizadas do alimento ¹¹⁰. É igualmente importante ter em conta que, na fritura profunda os óleos são aquecidos a temperaturas entre os 240-270°C, promovendo assim a formação de compostos mutagénicos como por exemplo a acroleína, o benzeno, o formaldeído e o 1,3-butadieno ¹¹¹.

Actualmente, alguns alimentos largamente consumidos são sujeitos a técnicas de preservação e outras tecnologias para melhoria da sua cor e sabor, nomeadamente através de técnicas como o fumeiro e a fermentação. Entre os aditivos utilizados para conservação e melhoria do sabor destaca-se o nitrato de sódio que pode ser convertido em nitrito por acção bacteriana durante a armazenagem ou já depois de ingerido graças à flora da cavidade oral. Em meio ácido, o nitrito tende a reagir com as aminas presentes no alimento produzindo-se compostos N-nitroso como as nitrosaminas. Nos processos de secagem, os óxidos de nitrogénio produzidos pela combustão do ar, a que é exposto o alimento actuam como compostos nitrosantes e reagem com as aminas do alimento, levando igualmente à produção de nitrosaminas¹¹². Estes mecanismos estão descritos na Figura 5.

As concentrações mais elevadas destes potentes agentes cancerígenos podem ser encontradas em produtos de carne ou peixe curados, assim como em alimentos sujeitos a processos de secagem, salga ou armazenados em ambientes húmidos. Jakszyn *et al.* conduziram um estudo de avaliação do consumo de fontes de nitritos e nitrosaminas em Espanha, para tal analisaram o teor de n-nitrosodimetilamina em diversos alimentos, tendo verificado que: as carnes curadas, os produtos de charcutaria (como o bacon e as salsichas), o queijo e a cerveja preta eram alguns dos principais fornecedores destas substâncias com acção carcinogénica¹¹³. Estes resultados coincidem com os dados obtidos

por Griesenbeck *et al.* ¹¹⁴ e com outros previamente descritos ¹¹². Alguns destes alimentos eram também importantes fontes de nitritos em conjunto com os cereais e hortícolas ¹¹³ (Figura 5). Os nitratos estão naturalmente presentes em diversas espécies vegetais, sendo essencial na sua nutrição e sem qualquer efeito tóxico directo. No entanto, podem ser convertidos em nitritos por acção bacteriana quando as condições de conservação são deficientes ou no próprio processo de amadurecimento, levando à produção endógena de nitrosaminas, um processo favorecido em meio ácido como acontece no estômago e através da acção da flora bacteriana presente na cavidade oral ¹¹².

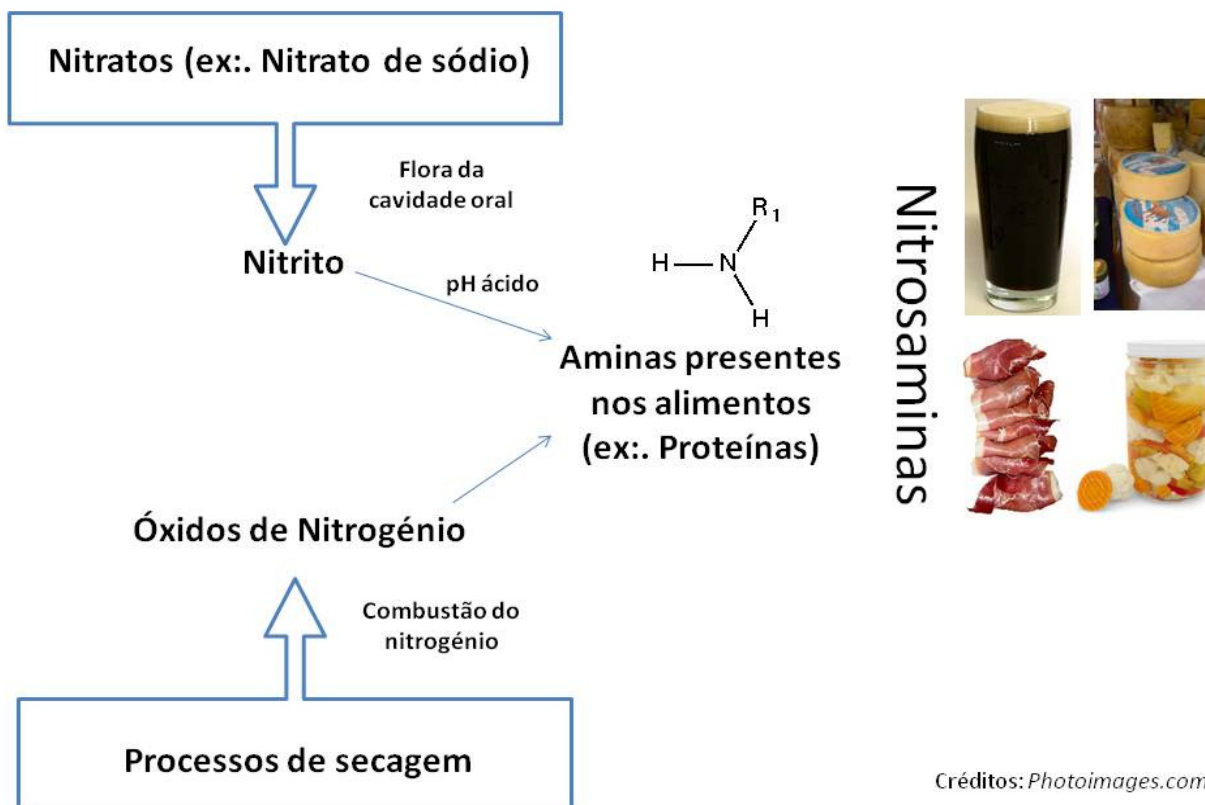


Figura 4 - Formação das nitrosaminas nos alimentos.

À luz destes pressupostos, a influência da alimentação e da nutrição, no risco de cancro da mama, parece ser uma variável complexa, podendo exercer um efeito preventivo ou predisponente da génese e desenvolvimento de uma neoplasia maligna. Esta influência pode ser determinada através da acção da qualidade e/ou da quantidade dos alimentos, tendo em vista o seu valor calórico, a sua riqueza em nutrientes e outros constituintes, bem como da sua sinergia ou antagonismo e das modificações decorrentes da sua confecção ou técnicas de conservação.

1.2. Parâmetros de avaliação histopatológica dos tumores mamários do rato e sua relação com o carácter de malignidade

A utilização de modelos animais, especificamente os pequenos roedores como o rato, veio permitir monitorizar o efeito de alimentos, nutrientes, medicamentos e outros factores ao longo e no processo da carcinogénese. Nestes estudos as condições experimentais estão já devidamente padronizadas e validadas ¹¹⁵⁻¹¹⁶, a carcinogénese é induzida por meio de um carcinogénio químico como por exemplo o 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) ou a N-metilnitrosureia (NMU).

Durante o estudo procede-se à monitorização de parâmetros como o peso, modificação da alimentação dos animais, introduzindo ou retirando alimentos ou até mesmo controlando a proporção dos diversos nutrientes a administrar. No decurso do estudo é igualmente possível fazer uma avaliação do rendimento de indução, podendo assim verificar se a introdução de uma modificação dietética teve ou não efeito no número de animais afectados e no número de tumores originados.

A utilização do rato como modelo animal para estudos sobre o cancro da mama está validada e é uma prática comum. A aparente semelhança da morfologia histopatológica e a dependência em comum de factores hormonais justificaram esta escolha, sendo hoje plenamente aceites e padronizadas as

condições experimentais ¹¹⁶⁻¹¹⁷. Nestes estudos, é possível monitorizar diversas variáveis inerentes ao prognóstico clínico ao longo de todo o procedimento experimental, sendo os tumores induzidos por meio de um carcinogénio químico. Terminado o procedimento, os materiais biológicos recolhidos no procedimento de necrópsia podem ser alvo de estudos posteriores, como a avaliação histológica, que complementa os dados da observação macroscópica das neoplasias mamárias. Nesse sentido, no presente capítulo apresentam-se os critérios considerados relevantes na associação entre os aspectos morfológicos e a malignidade das lesões.

A malignidade dos tumores pode ser determinada através da observação macroscópica dos mesmos, do estudo histopatológico e da análise do seu comportamento biológico. Numa revisão sobre a histologia dos tumores mamários do rato, Russo e Russo constataram que os carcinomas têm geralmente uma textura suave e carnuda, sendo bastante vascularizados e com áreas hemorrágicas e necróticas. Pelo contrário, os fibroadenomas têm uma textura elástica e firme, uma cor clara, sem indícios de hemorragia ou necrose. Na observação histológica, um dos critérios de malignidade, de maior destaque, é a perda da normal arquitectura da glândula mamária formando-se papilas ou algum polimorfismo estrutural. São também comuns alterações citológicas características como o aumento do tamanho celular e sobretudo nuclear, com um nucléolo proeminente, evidenciam-se

algumas mitoses e se ocorre invasão dos tecidos adjacentes, determina-se o seu carácter invasivo ¹¹⁸.

O carácter histopatológico das neoplasias mamárias pode ser avaliado de acordo com critérios previamente validados como os presentes na escala de Scarff-Bloom Richardson. Neste método, consideram-se como parâmetros de avaliação a extensão das áreas sólidas do tumor, o pleomorfismo nuclear e o número de mitoses conforme será descrito na Metodologia da presente dissertação. Elston e Ellis estabeleceram uma possível relação entre o grau histológico e o nível de diferenciação dos tumores, sendo utilizados os mesmos critérios no rato ou no humano e podendo ser uma valiosa ferramenta na avaliação do prognóstico clínico ¹¹⁹.

No que diz respeito ao comportamento biológico, merece especial relevo a capacidade de metastização do tumor em órgãos distantes, tais como nos nódulos linfáticos ou nos pulmões.

No entanto segundo Russo and Russo a existência de metástases experimentais de carcinogénese quimicamente induzida é apenas relatada por poucos investigadores ^{116, 118}. Estes autores justificam esta aparente falha da capacidade de metastização, à curta duração dos estudos pois consideram que apenas em estudos prolongados por cerca de 2 a 3 anos, ou seja essencialmente toda a vida do animal, é que as metástases se tornam evidentes.

No entanto saliente-se que o aparecimento de tumores extramamários poderá ser um potencial indicador de uma possível futura metastização.

2. OBJETIVOS

A influência da alimentação na carcinogénese mamária está documentada mas levanta ainda muitas dúvidas sobre os mecanismos através dos quais os alimentos e/ou os nutrientes exercem o seu efeito protector ou pejorativo.

A realização de estudos experimentais permite um estudo mais alargado não só, a ocorrência de tumores, como sobre o seu comportamento biológico e tendo em conta parâmetros que possam ser considerados indicadores de diferenciação e de malignidade. Nesse sentido, o presente trabalho pretende dar continuidade a um projecto experimental sobre a influência da Alimentação do tipo Mediterrânico no cancro da mama. Dele resultou numa Tese de Doutoramento em Ciências Biomédicas na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

No trabalho realizado previamente, dos quatro grupos de vinte e quatro animais cada, dois grupos receberam além da designada "ração padrão", que corresponde a alimentação aconselhada e apropriada para este tipo de roedores, um suplemento alimentar específico. Esta suplementação caracterizou-se por azeite virgem extra e uma refeição considerada do tipo mediterrânico e designada por "sardinhada à portuguesa". Saliente-se que qualquer destes suplementos foi administrado em quantidades cujo valor calórico total fosse exactamente igual (341 kcal/ kg de "ração padrão"). Para além desta suplementação alimentar foi igualmente administrado um carcinogénio químico, neste caso o 7,12 Dimetilbenzantraceno, aos animais de todos os grupos, com

excepção de um dos grupos que por constituir o grupo controlo tumoral apenas lhe foi administrada a ração padrão. Os resultados obtidos revelaram um possível benefício do consumo de azeite na carcinogénese mamária mas não evidenciaram benefícios na administração de uma dieta que pretendia mimetizar uma refeição considerada como do tipo mediterrâneo.

No enquadramento exposto, tendo em conta as inconsistências previamente encontradas na associação entre alimentos, nutrientes e cancro da mama considerou-se relevante proceder ao estudo histológico dos tumores mamários encontrados.

Para o efeito foram objectivos do presente trabalho avaliar os principais parâmetros histopatológicos associados à malignidade tumoral, nomeadamente:

- Padrão arquitectónico da lesão neoplásica;
- Carácter invasivo da lesão neoplásica;
- Pleomorfismo nuclear da lesão neoplásica;
- Extensão das áreas sólidas da lesão neoplásica;
- Contagem das mitoses da lesão neoplásica;

Os três últimos correspondem aos critérios de avaliação do grau histológico, previamente associado com o prognóstico clínico em vários estudos epidemiológicos.

Estes dados irão permitir complementar os resultados obtidos no trabalho anterior. Neste sentido, os resultados do presente trabalho poderão trazer valiosas informações sobre o possível efeito protector do consumo de azeite na carcinogénese mamária.

Pretende-se também aprofundar o estudo das lesões neoplásicas dos animais suplementados com a refeição do tipo mediterrânico nomeadamente no que diz respeito aos indicadores de malignidade anteriormente referidos, no sentido de esclarecer se este tipo de regime exerceu algum benefício na carcinogénese mamária. Uma vez que apesar da alimentação do tipo mediterrânico ser considerada preventiva de uma série de doenças e estar associada a uma melhoria da qualidade de vida, são poucos os estudos experimentais em animais, desenhados de forma a analisar qual o efeito único de uma mistura de alimentos, pois na sua grande maioria são testados alimentos de forma isolada ou até mesmo nutrientes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e no Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz e vem no seguimento de um trabalho experimental anteriormente realizado no âmbito de um Doutoramento em Ciências Biomédicas efectuado na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, que foi autorizado pela Comissão de Ética competente tal como previsto pela na alínea b) do nº 49 da Portaria nº 1005/92 de 23 de Outubro e seguiu todas as normas vigentes de bem-estar animal. Os aspectos relevantes da metodologia do estudo experimental que deu origem ao trabalho serão sumariamente descritos no ponto 3.1. nomeadamente no que se refere às condições de manutenção dos animais, às suas características, à administração do carcinogénio e ao processo de necrópsia.

3.1. Metodologia do estudo experimental

Do projecto inicial consideraram-se quatro grupos de 24 ratos fêmea da estirpe Sprague-Dawley provenientes dos Laboratórios Charles River (Barcelona). Todos receberam a ração padrão ("Panalab" tipo AO4) estando a sua composição nutricional descrita na Tabela 2, e água *ad libitum*. Os Grupos C e D receberam, além da ração padrão, um suplemento de azeite (50ml/Kg de ração padrão) e de uma refeição característica da alimentação do tipo mediterrânico denominada por "Sardinhada à

portuguesa”, respectivamente. A referida refeição foi constituída por batata cozida, 32 g de sardinha assada, 4,3 g de tomate, 3,5g de pimento e 0,196 g de cebola ¹²⁰.

A carcinogénese mamária foi induzida quimicamente através de uma sonda gástrica com 20mg de 7,12 Di-metilbenzantraceno dissolvidos em 1ml de azeite. Somente os animais do Grupo A foram poupados desta administração, este procedimento foi realizado quando os ratos tinham aproximadamente 50 dias de idade.

Durante os 150 dias de duração do estudo, os animais foram pesados quinzenalmente tendo a primeira pesagem sido feita no dia de administração do carcinogénio e a última no momento do sacrifício. Esta metodologia está sumariamente esquematizada na Figura 5.

Todos os animais sacrificados foram submetidos a um processo de necrópsia com o objectivo de observar o hábito externo e interno. A esse respeito, merece especial referência a contagem dos tumores por animal, distinguindo-se os de localização mamária e extra-mamária, assim como a medição do seu volume com base nos três diâmetros ortogonais. Foram igualmente descritos aspectos relevantes da sua morfologia macroscópica nomeadamente a tonalidade, consistência, superfície externa e de secção. Seguiu-se a colheita de fragmentos para observação em macroscopia óptica convencional e a avaliação das

características histopatológicas, o que constitui o âmbito do presente trabalho.

Grupo	Ração <i>Standard</i>	Carcinógeno (DMBA)	Suplemento alimentar	Total energético (kcal/100g)
A	+	-	-	300
B	+	+	-	300
C	+	+	Azeite	341
D	+	+	Sardinhada à Portuguesa	341

Tabela 1 - Grupos de animais e respectivos suplementos adicionados à ração padrão.

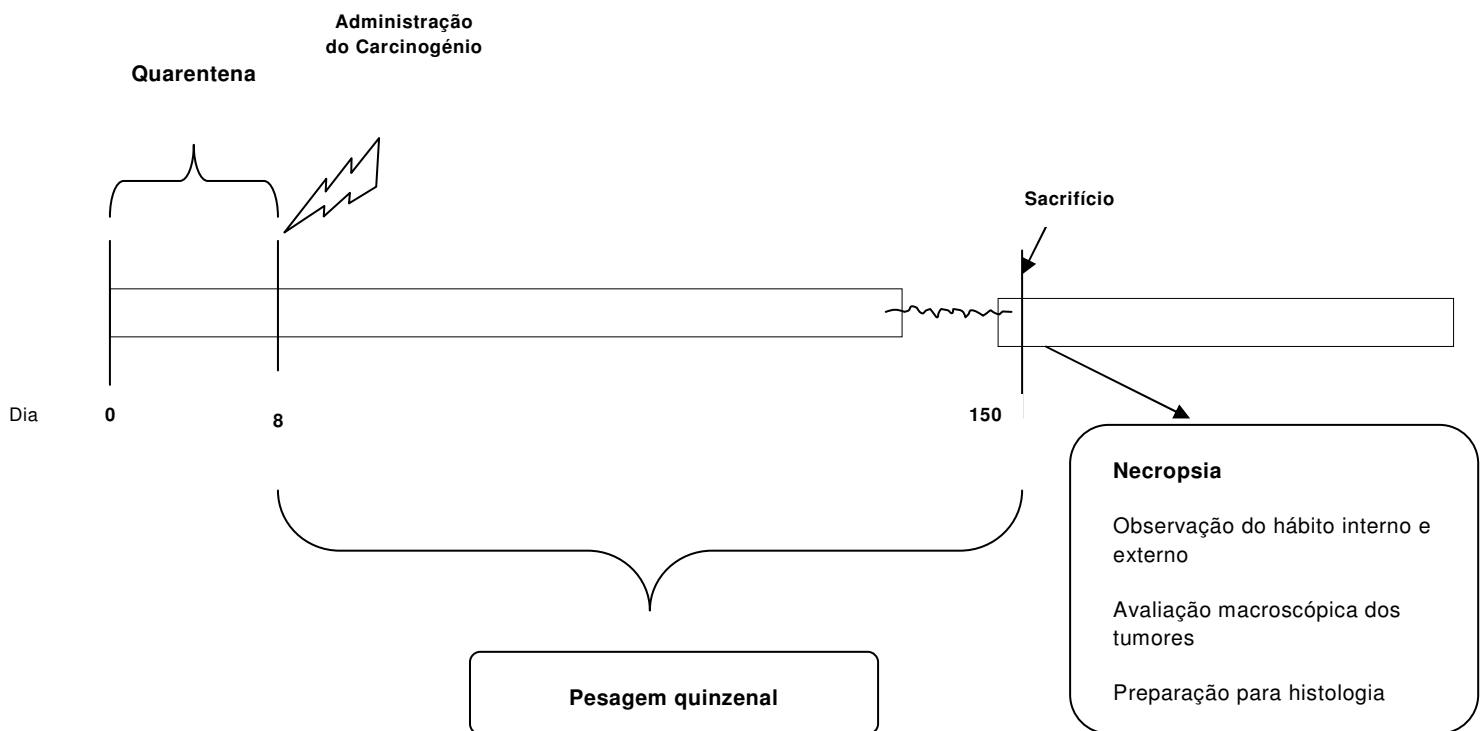


Figura 5 – Esquema da metodologia utilizada no trabalho experimental anterior.

Valores por 100g de ração		
Valor energético	300Kcal	Minerais Fósforo (0,59 mg), cálcio (0,83 mg), potássio (0,670 mg), sódio (0,19 mg), magnésio (0,2 mg), manganésio (9 mg), ferro (24 mg), cobre (3 mg), zinco (9,5 mg), iodo (0,03 mg) e cobalto (0,15 mg).
Gordura bruta	2,7g	
Fibra bruta	3,7g	
Glúcidos	58,5g	
Proteína bruta	15,5g	Vitaminas Vitamina A (0,075 UI), vitamina D ₃ (0,015 UI), vitamina B ₁ (0,07 mg), vitamina B ₂ (0,65 mg), ácido pantoténico (0,165 mg), vitamina B ₆ (0,02 mg), vitamina B ₁₂ (0,0002 mg), vitamina E (0,3 mg), vitamina K ₃ (0,025 mg), vitamina PP (0,75 mg), ácido fólico (0,0,5 mg), biotina (0,0004 mg), colina (0,016 mg).

Tabela 2 - Composição nutricional da ração padrão Panalab AO4

3.2. Estudo histopatológico das neoplasias mamárias

Os fragmentos retirados dos tumores mamários foram fixados em formaldeído neutro tamponado, processados e incluídos em parafina tendo depois sido cortados com um micrótomo rotativo, estendidos numa lâmina e corados com Hematoxilina-Eosina.

No âmbito dos objectivos propostos, foram avaliados os seguintes parâmetros na observação histológica com microscópio de luz:

- Classificação do tipo de lesão, nomeadamente benigna, maligna; *in situ* ou invasiva;
- Padrão arquitectural;
- Grau histológico com base na Classificação *Scarff-Bloom Richardson e Elston & Ellis*.

O carácter invasivo foi avaliado tendo em conta a presença de um crescimento anormal de células epiteliais no tecido conjuntivo e outros tecidos adjacentes, verificando-se geralmente a ausência da membrana basal. No que diz respeito à malignidade, conforme foi descrito no Capítulo II, a perda da estrutura característica alveólo-tubular é um dos critérios na sua avaliação.

Os tumores mamários induzidos com DMBA apresentam mais frequentemente um padrão arquitectural do tipo papilar, podendo

apresentar também áreas cribiformes e com menor frequência surgem os comedocarcinomas. Foi por isso contabilizada a proporção de cada uma das estruturas observadas.

Finalmente, o carácter histológico foi avaliado de acordo com o método descrito por Elston and Ellis ¹¹⁹, tendo em conta a formação tubular ou extensão de áreas sólidas; o pleomorfismo nuclear e o número de mitoses (Tabela 3).

No que diz respeito à formação tubular, inversamente relacionada com a extensão das áreas sólidas, procedeu-se à contagem de dez unidades epiteliais distinguindo-se quantas tinham um aspecto glandular. Este critério foi avaliado com uma ampliação de 100x. Este parâmetro é designado por *pattern grade*.

Na avaliação do pleomorfismo nuclear, ou *nuclear grade*, foi tida em conta a dimensão, a forma e se era possível observar o nucléolo. A diferença era mais ténue entre o grau II e grau III tendo sido aplicado o critério de aparência vesicular ou nucléolo proeminente.

Finalmente, para a contagem de mitoses foi necessária uma ampliação de 400x. Mediu-se o tamanho do campo do microscópio e foram procuradas mitoses num espaço de 10 campos de elevada ampliação na periferia neoplasia. Consideramos que esta avaliação é o parâmetro com maior margem de erro dada a dificuldade em distinguir as mitoses de outros artefactos, sendo importante aplicar sempre o mesmo critério. Segundo Elston & Ellis ¹¹⁹, o

núcleo deve evidenciar uma morfologia característica de qualquer uma das fases do seu ciclo.

A análise estatística dos resultados obtidos no presente trabalho foi feita no software SPSS versão 17. Procedeu-se aos testes à normalidade da distribuição das diversas variáveis, considerando como hipótese nula terem uma distribuição normal, a significância foi inferior a 0,05 para todas as variáveis consideradas pelo que foi necessário utilizar testes não paramétricos.

Tendo em conta os objectivos do presente trabalho, compararam-se os dados do Grupo B separadamente com os dos Grupos C e D, pelo que o teste utilizado foi o de Mann-Whitney para 2 amostras independentes e utilizando o módulo de testes exactos no intervalo de confiança de 95%, Na comparação da frequência das diversas variáveis relacionando dois parâmetros histológicos como o *pattern* e o *nuclear grade*, ou *pattern grade* com a contagem mitótica e outras descritas na secção Resultados, foi utilizado o teste do qui-quadrado.

Critério	Nível atribuído
Formação tubular ou <i>Pattern Grade</i>	
>75%	I
10-75%	II
<10%	III
Pleomorfismo nuclear ou Nuclear Grade	
Núcleos pequenos e com nucléolo pouco evidente	I
Pleomorfismo moderado, nucléolo visível	II
Forma vesicular ou muito alterada com nucléolo proeminente	III
Contagem de mitoses (nº Mitoses/10 campos de alta potência)	
≤ 3	I
4 a 6	II
7 a 9	III
10 a 19	IV
≥ 20	V

Tabela 3 - Classificação segundo Scarff-Bloom Richardson

4. RESULTADOS

4.1. Resultados prévios do procedimento experimental

Considerou-se relevante apresentar alguns resultados obtidos do trabalho experimental a que pretendemos dar continuidade, nomeadamente no que diz respeito ao ganho de peso dos animais, ao número e ainda ao tamanho de lesões tumorais encontradas.

4.1.1. Avaliação ponderal dos animais

Verificou-se um aumento do peso em todos os grupos (Tabela 4), o com diferenças estatisticamente significativas entre grupos ($p < 0,05$). Quando comparados os grupos, os pesos diferiam também significativamente entre o Grupo B e o C, assim como entre o B e o D, e os dois grupos suplementados ($p < 0,05$)¹¹⁹.

Grupo	Valor Calórico Total (Kcal/100g)	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Ganho ponderal	p
I	300	207 ± 12,1	345,9 ± 38,7	67,1 ± 17,8	p < 0,05
II	341	204,9 ± 11,4	320,3 ± 20,8	56,3 ± 12,1	p < 0,05
IV	341	189,7 ± 8,6	324,9 ± 34,9	71,3 ± 17,2	p < 0,05
VII	341	165,8 ± 8,9	322,4 ± 31,8	94,5 ± 19,9	p < 0,05

Tabela 4 - Variações ponderais por grupo

4.2. Comparação do número e tamanho das neoplasias mamárias encontradas nos diferentes grupos.

Não se observaram quaisquer neoplasias mamárias no grupo A. O número de tumores diferia significativamente entre o Grupo B (33 neoplasias) e cada um dos grupos suplementados em estudo conforme se apresenta na Tabela 5 (p < 0,05).

Grupo	Animais no final do estudo (n)	Animais no final do estudo sem tumor (n)	Lesões tumorais mamárias (n)	Lesões tumorais extramamárias (n)	Lesões tumorais totais (n)
A	22	22	0	0	0
B	22	6	33	1	34
C	18	4	53	0	53
D	18	5	32	5	37

Tabela 5 - Comparação do número de lesões tumorais nos diferentes grupos

A maioria dos animais do Grupo B apresentavam 3 a 5 tumores (40,9%), enquanto 39% dos animais do Grupo C e 44,4% do Grupo D possuíam 1-2 tumores (Tabela 6).

Grupo	0 tumores	1-2 tumores	3-5 tumores	6-8 tumores	≥ 9 tumores
A	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
B	9,1%	31,8%	40,9%	0,0%	0,0%
C	22,2%	39,0%	22,2%	5,6%	11,1%
D	16,7%	44,4%	33,3%	5,6%	0,0%

Tabela 6 - Comparação do número de tumores por animal nos diferentes grupos

No que diz respeito ao tamanho, este foi avaliado em função do volume das neoplasias distinguindo-se as seguintes cinco categorias:

- Tipo A (**volume $\leq 0,033 \text{ cm}^3$**);
- Tipo B (**$0,033 \text{ cm}^3 < \text{volume} \leq 0,267 \text{ cm}^3$**);
- Tipo C (**$0,267 \text{ cm}^3 < \text{volume} \leq 0,904 \text{ cm}^3$**);
- Tipo D (**$0,904 \text{ cm}^3 < \text{volume} \leq 2,143 \text{ cm}^3$**);
- Tipo E (**volume $> 2,143 \text{ cm}^3$**).

Conforme se apresenta na Tabela 7, a maioria das neoplasias dos Grupos B (39,39%) e D (46,88%) são de grande dimensão enquanto no Grupo C, 33,96% têm um volume entre 0,033 cm³ e 0,267 cm³. A análise estatística evidenciou diferenças estatísticas significativas na comparação do padrão com cada um dos grupos suplementados, e entre estes quando comparados independentemente (p <0,05).

Grupo	Tipo A	Tipo B	Tipo C	Tipo D	Tipo E
A	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
B	0,00%	15,15%	21,21%	24,24%	39,39%
C	5,66%	33,96%	28,30%	16,98%	15,09%
D	9,38%	12,50%	9,38%	21,88%	46,88%

Tabela 7 - Comparação do tamanho das neoplasias encontradas nos diferentes grupos

4.3. Resultados da histopatologia

Conforme referido anteriormente, não foi encontrada nenhuma lesão tumoral nos animais do Grupo A. As neoplasias mamárias encontradas nos animais dos restantes grupos eram carcinomas invasivos.

No que diz respeito ao seu padrão arquitectónico, verifica-se que a maioria apresentava áreas cribriformes e papilares em simultâneo (Tabela 8).

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Papilar	0%	2,63%	32,08%	10,5%
Cribriforme	0%	36,84%	20,75%	50%
Papilar e Cribriforme	0%	42,11%	41,51%	39,5%
Papilar, Cribriforme e Comedo	0%	5,26%	0%	0%
Papilar e Comedo	0%	2,63%	1,89%	0%
Cribriforme and Comedo	0%	10,53%	3,77%	0%

Tabela 8 - Padrão arquitectónico das neoplasias mamárias

Entre as neoplasias do Grupo B encontrou-se igualmente o padrão cribriforme isolado (Figura 6) e alguns comedocarcinomas (Figura 7).

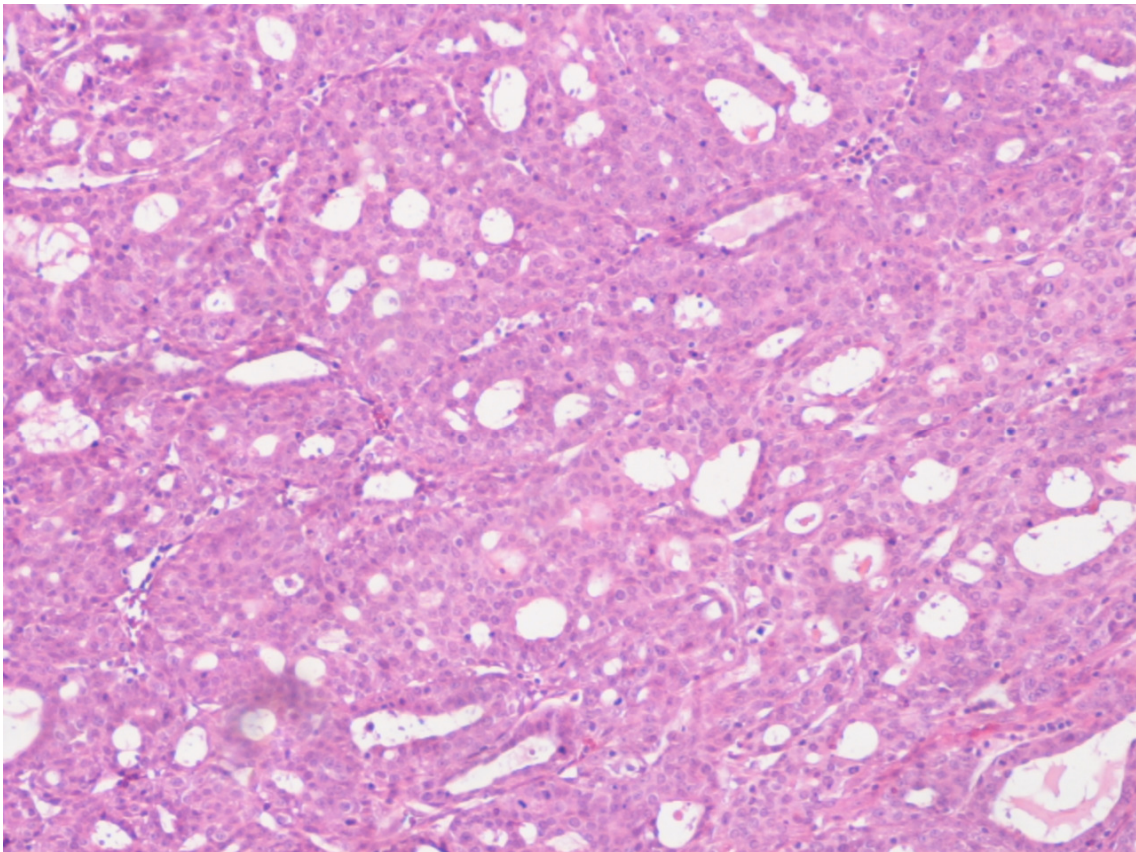


Figura 6 – Carcinoma invasivo com padrão arquitetónico cribriforme presente na glândula mamária no Grupo B (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação x100).

Conforme foi apresentado na Tabela 8, a vasta maioria das neoplasias apresentou extensas áreas cribriformes, isoladamente ou

combinadas com áreas papilares. Na Figura 7 evidencia-se a presença de extensas áreas sólidas com células epiteliais neoplásicas interrompidas por lúmen de formas arredondas ou irregular de várias dimensões, características do padrão arquitectónico cribriforme invasivo, a foto diz respeito a uma lâmina do Grupo B onde também foram encontrados comedocarcinomas, apresenta-se um exemplo na Figura 8. Este padrão arquitectónico, tendencialmente de maior malignidade pela alteração significativa da arquitectura normal da glândula mamária, caracteriza-se pela presença de distensão dos ductos lactíferos com várias camadas de células epiteliais e geralmente rodeado de indícios necróticos.

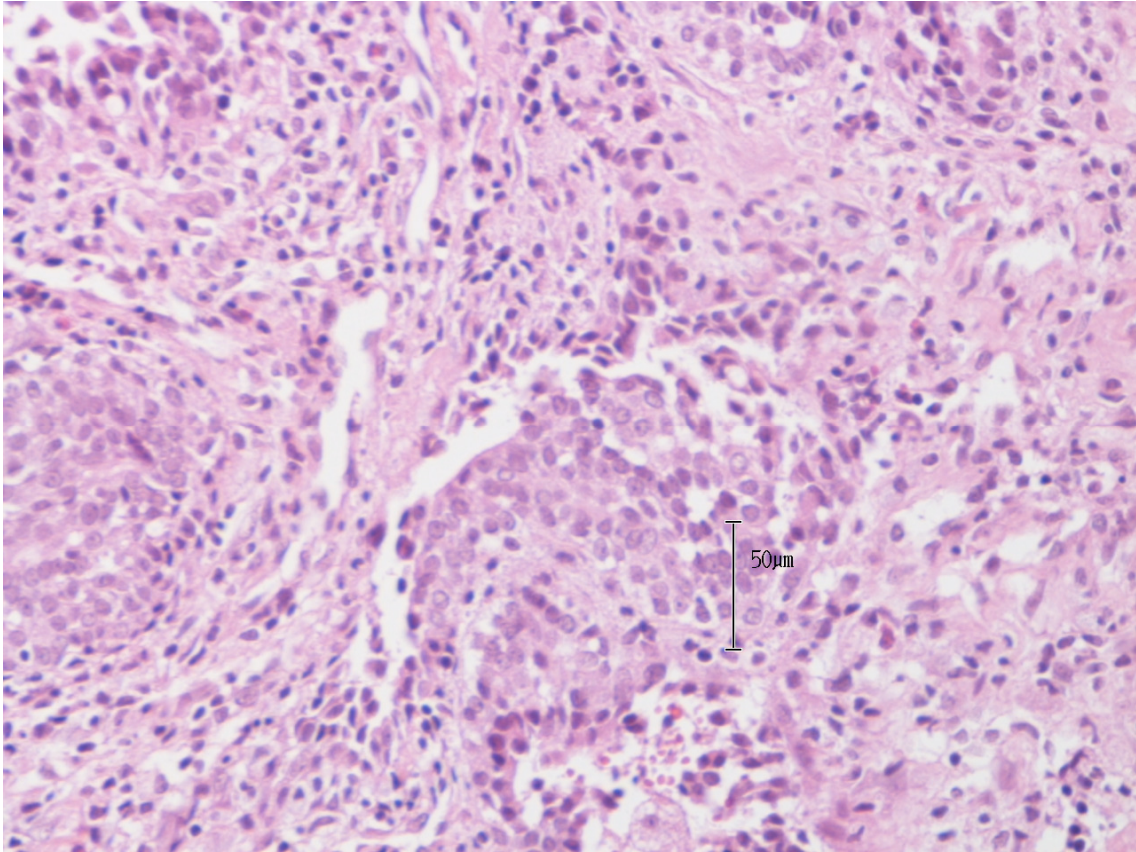


Figura 7 – Comedocarcinoma da glândula mamária de um rato fêmea Sprague-Dawley do Grupo B. (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação x100).

No Grupo C, verificaram-se alguns carcinomas unicamente com áreas papilares (Figura 8). Este padrão arquitectónico mantém a maioria das características da arquitectura normal da glândula mamária e caracteriza-se pela presença de projecções do

epitélio, rodeadas por pequenas extensões de tecido conjuntivo
118.

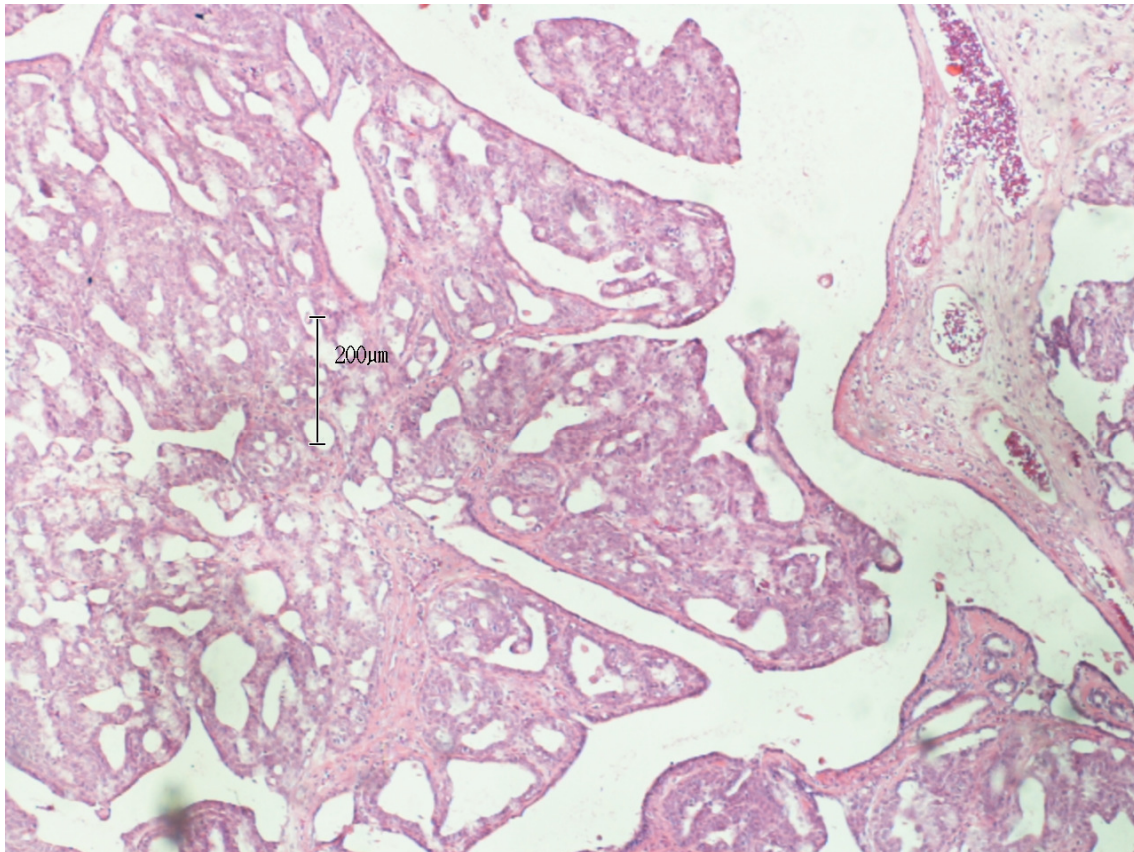


Figura 8 – Carcinoma Papilar da glândula mamária de um rato fêmea Sprague-Dawley do Grupo C. (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação x40).

Importa destacar no Grupo C, o dos animais suplementados com azeite, que alguns fragmentos retirados apresentavam ainda a arquitectura normal da glândula mamária tendo-se mesmo

distinguido ainda um corte proveniente da região do mamilo com os seios lactíferos visíveis e destacados (Figura 9).

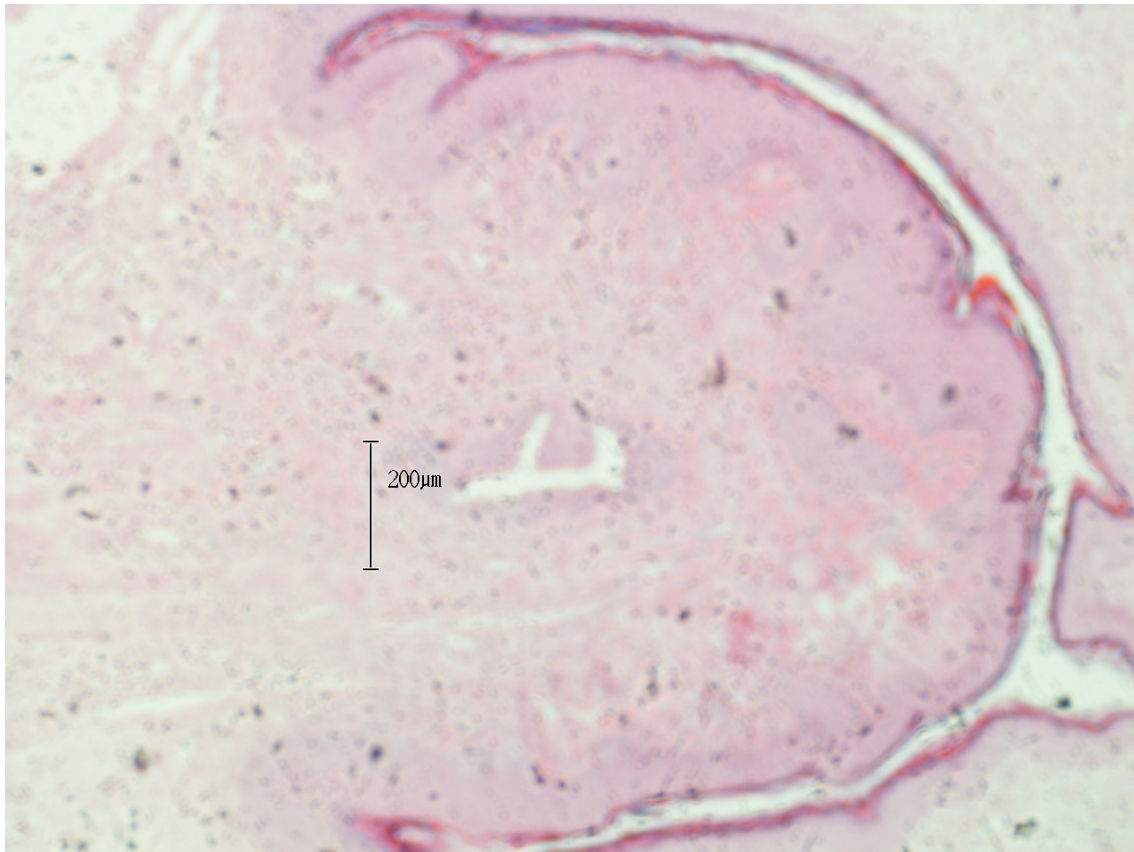


Figura 9 – Corte da glândula mamária de um rato do Grupo C apresentando ainda características originais, nomeadamente o mamilo e os seios lactíferos (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação x200).

Um dos principais indicadores de malignidade tumoral é a perda da arquitectura normal da glândula mamária. No Grupo C,

suplementado com azeite, as neoplasias mamárias apresentaram características de melhor diferenciação e conseqüentemente menor malignidade. Não surpreende talvez por isso ter-se encontrado ainda algumas estruturas intactas como se apresenta na Figura anterior.

No Grupo D, os carcinomas papilares tinham uma morfologia particularmente distinta (Figura 10) mas cerca de 50% apresentavam unicamente o padrão cribriforme (Figura 11).

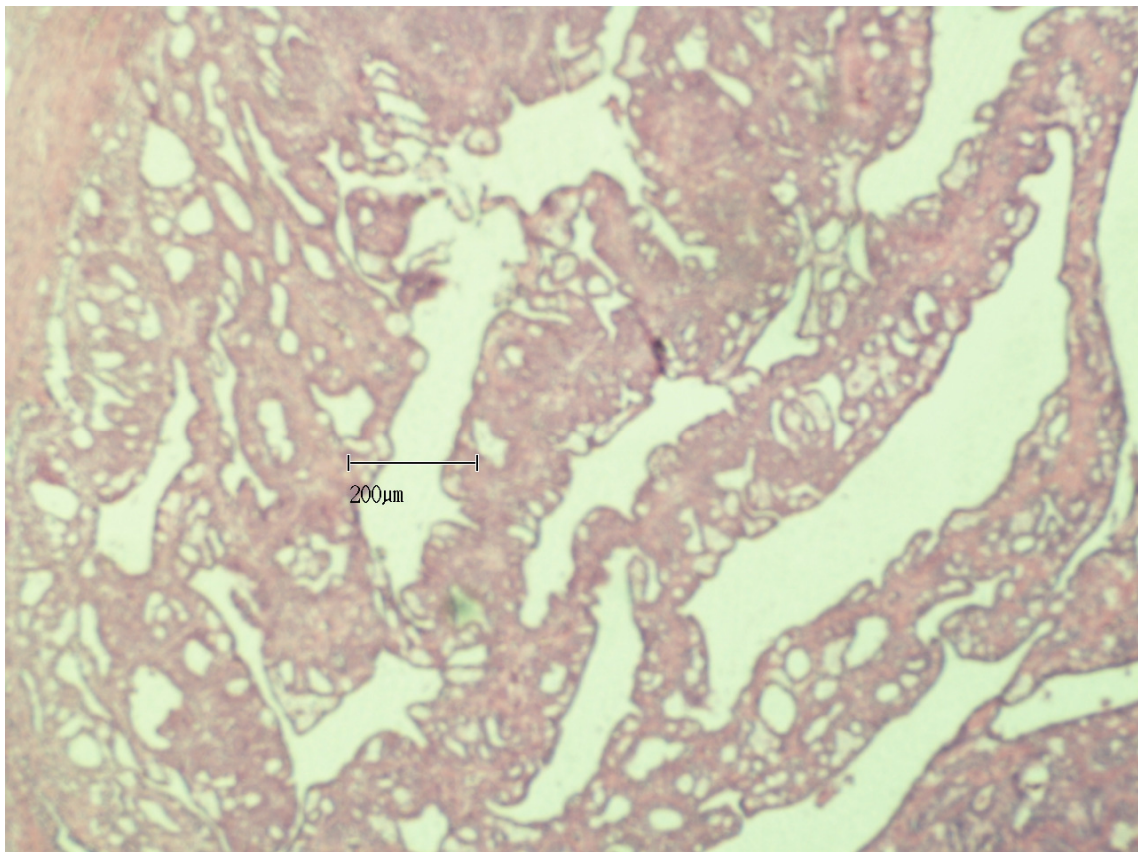


Figura 10 – Carcinoma Papilar da glândula mamária de um rato fêmea Sprague-Dawley do Grupo D (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação

x40). Nesta foto merece especial destaque as inúmeras projecções papilares separadas por camadas finas de tecido conjuntivo.

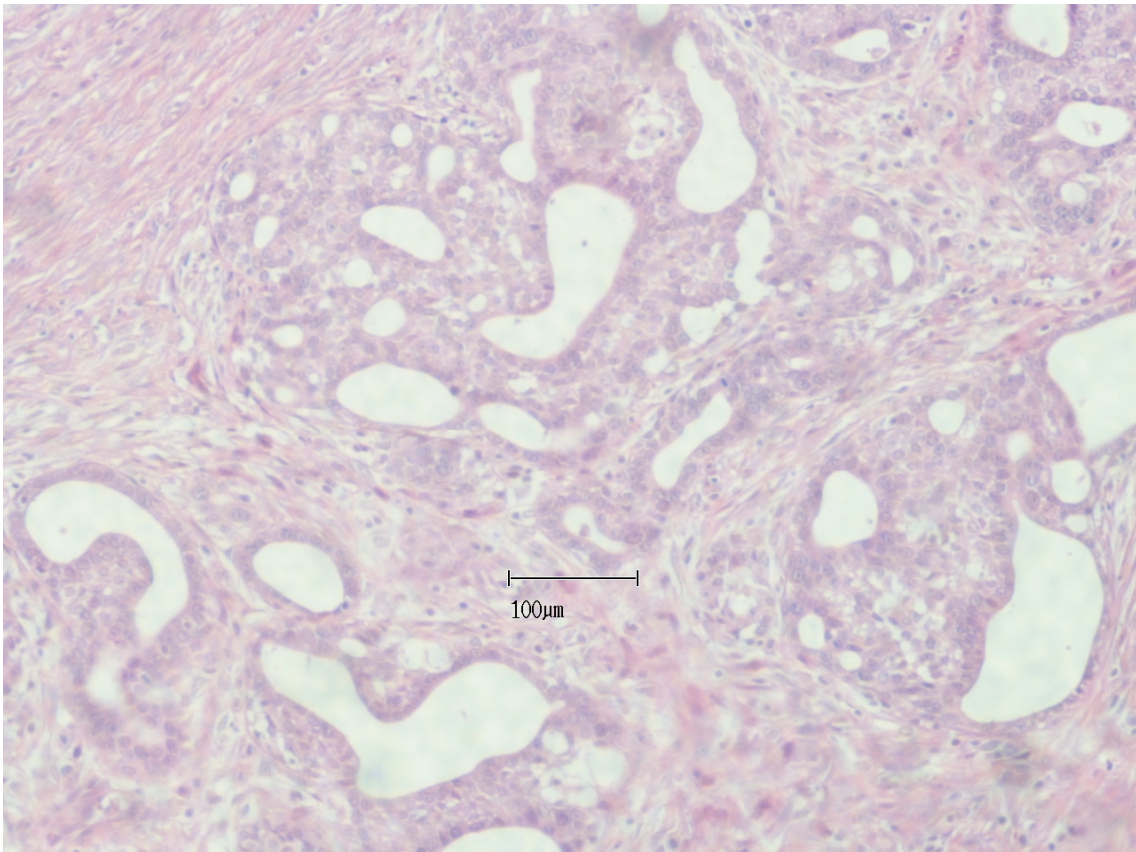


Figura 11 – Carcinoma Cribriforme da glândula mamária de um rato fêmea Sprague-Dawley do Grupo D (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação x40). Note-se a baixa extensão de áreas sólidas, ou seja, elevada formação tubular distinguindo-se significativamente da Figura 7.

No grupo B, 18,42% das neoplasias apresentavam áreas necrosadas ainda que pouco extensas e associadas ao padrão arquitectónico comedocarcinoma. Das neoplasias do Grupo C, apenas 5,66% apresentavam indícios de necrose que não foram encontrados em nenhuma neoplasia do Grupo D havendo diferença significativa entre os grupos e o grupo padrão ($p < 0,05$).

A análise histológica revelou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o grupo padrão e cada um dos restantes (Tabela 9). As neoplasias mamárias do Grupo C apresentavam baixos índices de *pattern grade*, ou seja tinham áreas sólidas pouco extensas, e pouco pleomorfismo nuclear.

Grupo	Pattern Grade			Nuclear Grade		
	I	II	III	I	II	III
A	0%	0%	0%	0%	0%	0%
B	15,8%	52,6%	31,6%	13,2%	81,6%	5,3%
C	44,91%	42,93%	12,16%	39,62%	60,38%	0%
D	42,1%	47,4%	10,5%	2,6%	76,3%	21,1%

Tabela 9 - Parâmetros histopatológicos das neoplasias mamárias

No Grupo D apenas o *pattern grade* pareceu ter beneficiado tendo em conta que 21,1% das neoplasias apresentavam um grau de pleomorfismo nuclear intermédio ou mesmo elevado enquanto no Grupo B apenas 5,3% estavam nesta categoria ainda que com uma elevada contagem mitótica. Podemos distinguir claramente as Figuras 7 e 11, na primeira proveniente do Grupo B verifica-se uma baixa formação tubular enquanto na Figura 11 do Grupo D é clara a menor extensão de áreas sólidas logo a maior formação tubular.

O número de mitoses difere significativamente ($p < 0,05$) entre os Grupos B e C, assim como o B comparado com o D ($p < 0,05$). Não foram encontradas mitoses no Grupo C e mesmo o Grupo D tinha menos animais no grau máximo de índice mitótico (2,6% com 20 ou mais mitoses quando comparado com o Grupo B onde 15,8% tinham esta contagem), de acordo com os dados apresentados na Tabela 10. Nas Figuras 13 e 14 encontram-se evidenciadas algumas mitoses encontradas nas neoplasias mamárias dos Grupos B e D.

Grupo	Contagem de Mitoses (nº mitoses / 10campos de elevada ampliação)				
	≤ 3	4 - 6	7-9	10-19	≥ 20
A	0%	0%	0%	0%	0%
B	26,3%	21,1%	5,3%	31,6%	15,8%
C	0%	0%	0%	0%	0%
D	15,8%	34,2%	13,2%	34,2%	2,6%

Tabela 10 - Contagem de mitoses nas neoplasias mamárias

Relacionando os dois principais parâmetros histopatológicos conforme apresentamos na Tabela 11, extensão de áreas sólidas e pleomorfismo nuclear, verifica-se que uma parte significativa das neoplasias observadas se encontra nos níveis intermédios nos três grupos. Por isso não foi encontrada diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

	Nuclear Grade								
	Group B			Grupo C			Group D		
Pattern Grade	I	II	III	I	II	III	I	II	III
I	10,53%	5,26%	0%	24,3%	20,61%	0%	2.6%	39.5%	0%
II	2,63%	50%	0%	10,9%	32,03%	0%	0%	34,2%	13,2%
III	0%	26,32%	5,26%	4,42%	7,74%	0%	0%	2,6%	7,9%

Tabela 11 - Associação entre o Pattern Grade e o Nuclear Grade

A contagem de mitoses tende a ser mais alta quanto maior a extensão de áreas sólidas (Tabela 12) e o pleomorfismo nuclear (Tabela 13) o que se verifica nos Grupos B e D sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Nestes dois grupos, 2,6% das neoplasias tiveram a pontuação máxima nos dois parâmetros mas no grupo B 13,2% apresentaram pleomorfismo nuclear intermédio com um número elevado de mitoses (Figura 13).

Nº Mitoses/10 campos de elevada ampliação	<i>Pattern Grade</i>					
	Grupo B			Grupo D		
	I	II	III	I	II	III
0 a 3	10,3%	15,8%	0%	7,9%	5,3%	2,6%
4 a 6	5,3%	15,8%	0%	18,4%	15,8%	0%
7 a 9	0%	5,3%	0%	5,3%	5,3%	2,6%
10 a 19	0%	10,5%	21,1%	10,5%	18,4%	5,3%
20 ou mais	0%	5,3%	10,5%	0%	2,6%	0%

Tabela 12 - Associação entre o Pattern Grade e a Contagem de mitoses

Nº Mitoses/10 campos de elevada ampliação	<i>Nuclear Grade</i>					
	Grupo B			Grupo D		
	I	II	III	I	II	III
0 a 3	13,2%	13,2%	0%	2,6%	10,5%	2,6%
4 a 6	0%	21,1%	0%	0%	34,2%	0%
7 a 9	0%	5,3%	0%	0%	10,5%	2,6%
10 a 19	0%	28,9%	2,6%	0%	21,1%	13,2%
20 ou mais	0%	13,2%	2,6%	0%	0%	2,6%

Tabela 13 - Associação entre o Nuclear Grade e a contagem de mitoses

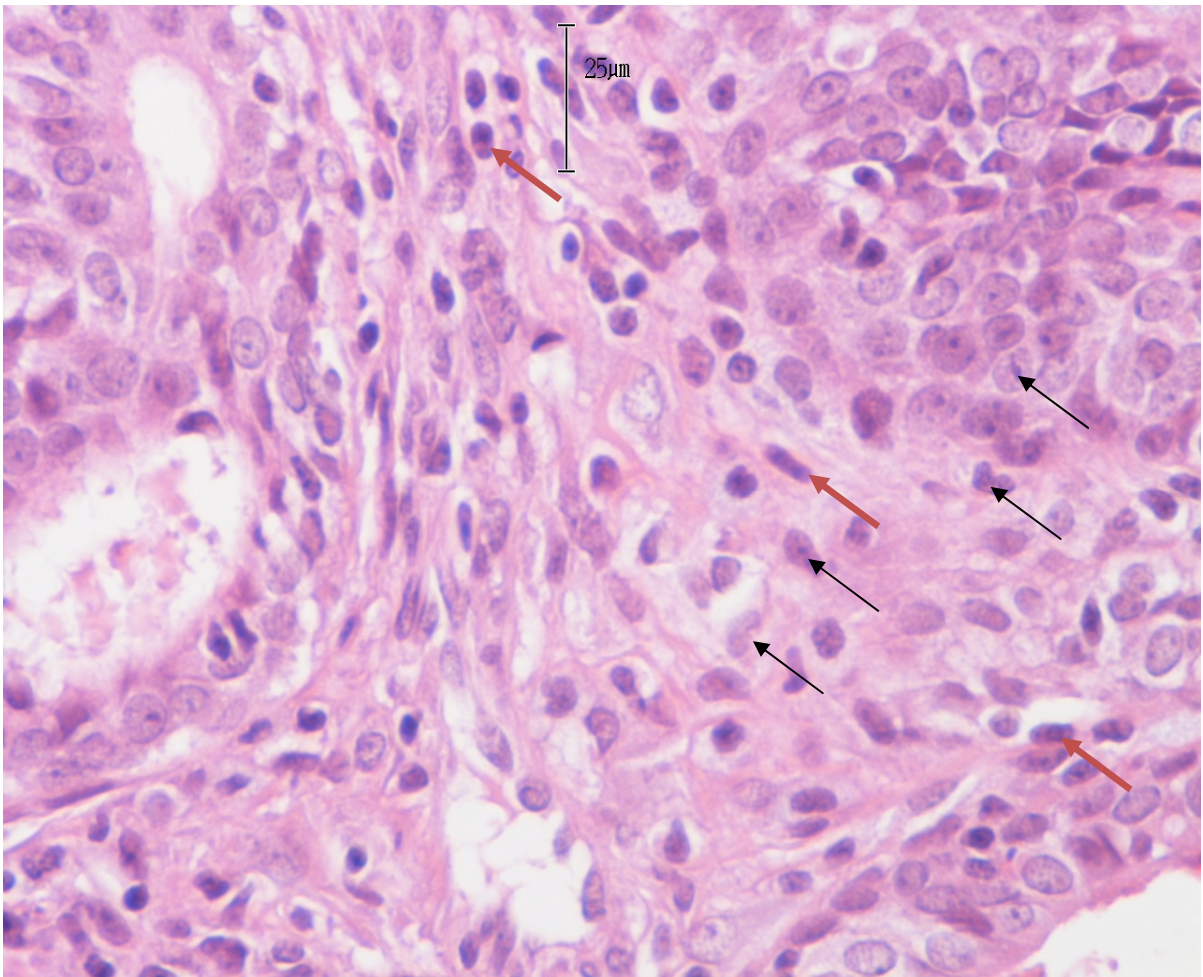


Figura 12 – Elevado pleomorfismo nuclear, destacado com setas pretas, presente num carcinoma da glândula mamária encontrado no Grupo B. Evidenciam-se igualmente algumas mitoses com setas vermelhas (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação x400).

Nas neoplasias mamárias do Grupo B, verificou-se algum pleomorfismo nuclear e uma elevada contagem mitótica o que podemos observar na Figura 12. Além da dimensão, os núcleos pleomórficos distinguem-se pela presença de um nucleólo mais proeminente podendo mesmo assumir formas distintas como vesiculares. Esta alteração pode dificultar significativamente a identificação de mitoses. No Grupo D encontravam-se também neoplasias mamárias com um pleomorfismo nuclear acentuado conforme se pode ver na Figura 13, no entanto tinham uma contagem mitótica inferior.

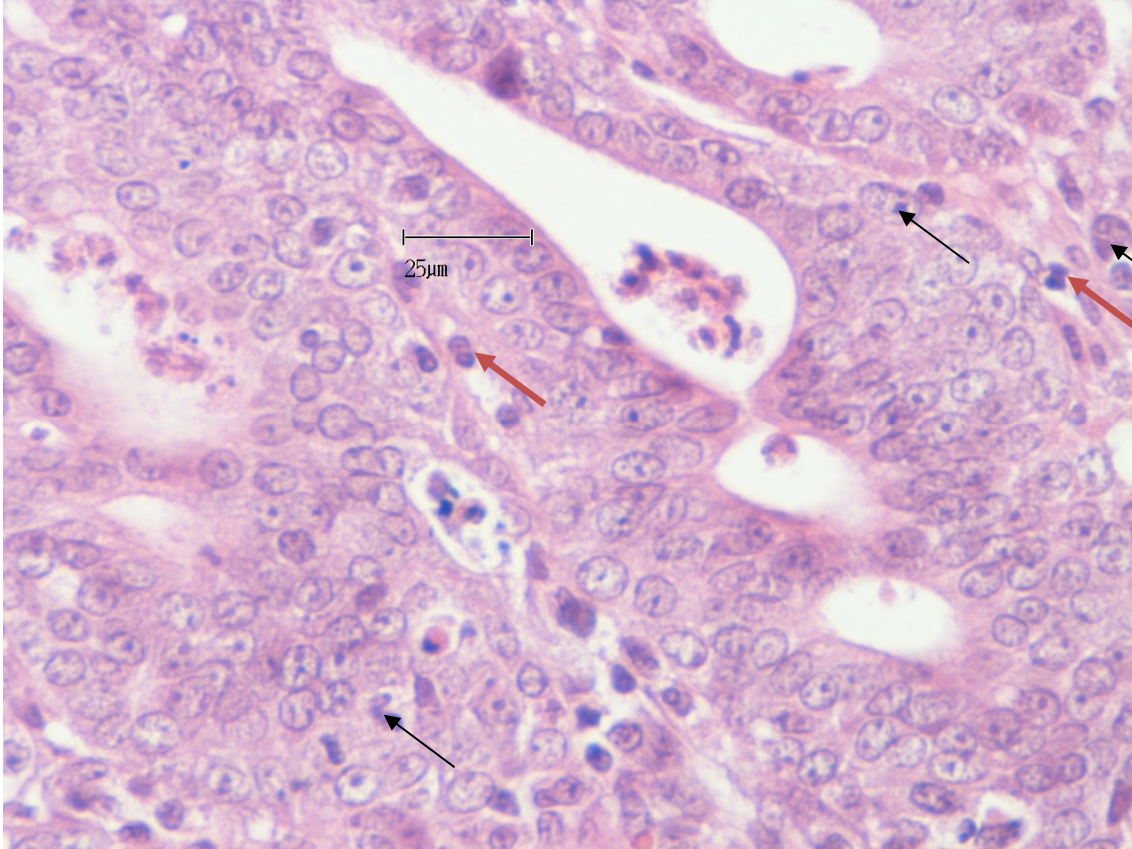


Figura 13 - Elevado pleomorfismo nuclear, destacado com setas pretas, presente num carcinoma da glândula mamária encontrado no Grupo D. Evidenciam-se igualmente algumas mitoses com setas vermelhas (Coloração Hematoxilina-Eosina, Ampliação x400).

5. DISCUSSÃO

A influência da alimentação e da nutrição no processo da carcinogénese é plenamente aceite, no entanto não são claros os mecanismos envolvidos no seu papel pejorativo e/ou protector sendo apenas conhecidos os alimentos, grupos de alimentos e nutrientes potencialmente envolvidos na diminuição ou aumento do risco desta doença. A alimentação do tipo mediterrânico, característica de países como Portugal, Espanha, Itália e Grécia, está desde há muito associada à prevenção de várias doenças, incluindo o cancro. Este padrão de hábitos alimentares caracteriza-se por um consumo de alimentos que podem exercer um efeito protector na carcinogénese nomeadamente os peixes de águas frias, o azeite, os frutos e os vegetais.

Neste trabalho compararam-se, um grupo de animais de laboratório suplementado com azeite e outro grupo suplementado com uma refeição do tipo mediterrânico, conforme descrito na secção intitulada de "Metodologia". Estes dois grupos foram estatisticamente comparados com um grupo controlo, também sujeito à administração do carcinogénio mas recebendo apenas a ração padrão, por questões de método foi ainda incluído um grupo controlo poupado da indução química a quem foi também administrada ração padrão. No trabalho anteriormente efectuado que conduziu a uma tese de doutoramento e ao qual se pretendeu dar continuidade verificou-se um potencial benefício do azeite e um efeito quase nulo da refeição do tipo mediterrânico ¹²⁰.

Pretendeu-se com o presente estudo complementar esses dados com a observação dos fragmentos das lesões neoplásicas ao microscópio de luz, tendo como base determinadas características da morfologia histológica que pudessem evidenciar características de malignidade ou não, nos tumores encontrados.

O grau histológico que é um indicador importante da malignidade tumoral, foi avaliado tendo em conta três parâmetros: extensão de áreas sólidas, pleomorfismo nuclear e contagem de mitoses. Elston e Ellis ¹¹⁹ verificaram uma associação entre o grau histológico e o prognóstico dos pacientes, os indivíduos com lesões bem diferenciadas, caracterizadas por um baixo grau histológico, tinham um prognóstico mais favorável.

Nesse sentido, procedeu-se à comparação dos Grupos C e D com o Grupo B. Na avaliação macroscópica, realizada no decurso do trabalho previamente efectuado, as lesões neoplásicas encontradas no Grupo C eram aquelas que apresentavam menores dimensões enquanto que as lesões encontradas no Grupo D mostraram ser de maior volume, não tendo sido encontrados tumores no Grupo A.

No Grupo C, suplementado com azeite, o possível efeito benéfico previamente encontrado foi confirmado do ponto de vista histopatológico tendo-se verificado que estes animais apresentavam neoplasias com baixo índice de extensão das áreas sólidas, baixo pleomorfismo nuclear e inexistência de mitoses, havendo diferença estatística significativa quando comparados com

as neoplasias do Grupo B ($p < 0,05$). No padrão arquitectónico, as diferenças eram também significativas, tendo sido observado um grande número de neoplasias com arquitectura papilar, o padrão associado a uma menor malignidade e conseqüentemente a um prognóstico possivelmente mais favorável ¹¹⁸.

A influência protectora do azeite na prevenção da carcinogénese pode ter sido exercida por um ou mais dos seus constituintes, destacando-se: o ácido oleico, a vitamina E, e diferentes compostos fenólicos. Os antioxidantes, como a Vitamina E, e os compostos fenólicos, parecem afectar o metabolismo dos carcinogénios diminuindo a sua biodisponibilidade o que pode reduzir o dano provocado no ADN ⁷². Por outro lado, o ácido oleico parece intervir sobretudo através da inibição da síntese de prostaglandinas e eicosanóides, estes últimos responsáveis pelos processos de crescimento exacerbado, inibição da apoptose, angiogénese e metastização dos tumores ¹²¹. O beta-sitosterol e o esqualeno, igualmente presentes no azeite, são também anti-carcinogénios e constituem um componente predominante da fracção não-saponificável ¹²²⁻¹²⁵. Estes dados confirmam os encontrados na pesquisa epidemiológica que evidencia uma associação entre o consumo de azeite e um baixo risco de cancro da mama ^{33-35, 37}.

No grupo D, suplementado com a refeição do tipo mediterrânico, destacam-se sobretudo a ausência de comedocarcinomas sendo este tipo de carcinomas aquele que se

caracteriza por uma maior malignidade, no que diz respeito ao padrão arquitectónico das neoplasias mamárias, e das diferenças na extensão de áreas sólidas e na contagem de mitoses, verificou-se um menor número de animais com 20 ou mais mitoses, o que revela a existência de uma diferença significativa quando comparado o Grupo D com o Grupo B ($p < 0,05$). Ainda assim, as neoplasias encontradas apresentaram um pleomorfismo nuclear acentuado, diferindo significativamente do Grupo B ($p < 0,05$).

Esta refeição constitui-se de uma variedade mais alargada de alimentos igualmente típicos neste padrão alimentar, nomeadamente o peixe e os vegetais frescos na forma de uma salada.

Os peixes de águas frias, como é o caso da sardinha, são especialmente ricos em ácidos gordos da série ómega 3, dos quais se destacam conforme referido anteriormente o EPA e o DHA. Larsson ⁶⁶ propôs alguns mecanismos através dos quais estes ácidos gordos podem exercer um efeito protector da carcinogénese, entre os quais se salienta a sua influência nos processos de crescimento e diferenciação celular.

No que diz respeito aos vegetais frescos, são uma importante fonte de vitaminas, minerais e fitoquímicos, constituídos por diversos compostos com acção antioxidante, anticarcinogénica, antimutagénica, entre outras. Os mecanismos mais frequentemente associados ao seu efeito protector incluem a

indução das enzimas de desintoxicação, os efeitos antioxidantes assim como o aprisionamento e diluição dos carcinogénios ⁷⁸.

Os resultados obtidos neste grupo de animais (Grupo D) podem ser justificados através das diversas controvérsias inerentes à composição nutricional e à biodisponibilidade dos constituintes potencialmente protectores dos vegetais, assim como ao facto de terem sido utilizados diferentes métodos de confecção na preparação dos alimentos. Importa igualmente referir que, este estudo inicia uma fase de investigação na área da nutrição pois a administração de uma refeição constituída por diferentes alimentos e como tal diferentes nutrientes que interagem entre si e com o organismo, é a forma encontrada de mimetizar a alimentação humana. Uma vez que o homem alimenta-se não através de alimentos isolados ou nutrientes isolados é necessário analisar de forma conjunta qual o seu efeito, neste caso, no cancro da mama.

Importa ainda relacionar os resultados da avaliação histopatológica com alguns parâmetros avaliados no trabalho experimental anterior ¹²⁰. Conforme se destaca no ponto 4.1. do presente trabalho, os animais do Grupo D foram os que ganharam mais peso com diferença estatisticamente significativa entre este Grupo e o Grupo B assim como quando comparado com o Grupo C ($p < 0,05$). Estes dados merecem especial destaque na medida em que o ganho de peso constitui um factor de risco acrescido para o cancro da mama ⁵³⁻⁵⁴. No que diz respeito às dimensões das lesões tumorais, este grupo apresentou uma percentagem considerável

de neoplasias de grandes dimensões tal como apresentado na Tabela 7 do ponto 4.1., o que pode ser um factor de prognóstico tendo em conta que as lesões de maior volume tendem a estar associadas a uma probabilidade acrescida de surgirem metástases e menores índices de sobrevivência¹²⁶.

Os resultados do presente trabalho vieram confirmar um possível benefício do consumo de azeite na carcinogénese mamária, este efeito advém da constatação de um menor grau histológico das neoplasias mamárias encontradas nos animais suplementados com azeite que se apresentaram mais bem diferenciadas, estes factos são indicadores de menor malignidade e de melhor prognóstico.

No que diz respeito ao grupo suplementado com a refeição do tipo mediterrânico, o trabalho anteriormente realizado e os resultados do estudo histopatológico justificam a realização de estudos posteriores, possivelmente de maior duração e com maior variedade de alimentos característicos deste padrão alimentar para que possa ser mais bem estudada a sua influência na carcinogénese. Ainda assim, parece haver um efeito benéfico uma vez que as neoplasias mamárias encontradas neste grupo apresentam contagens mitóticas igualmente inferiores às do grupo padrão (B).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho pretendeu-se avaliar os possíveis benefícios de uma alimentação do tipo mediterrânico na carcinogénese mamária, tendo os animais sido suplementados com a gordura alimentar mais utilizada neste padrão de alimentação – o azeite, e com uma refeição característica – uma sardinhada.

Os resultados evidenciaram um benefício significativo do azeite nos parâmetros histopatológicos das neoplasias mamárias. Os animais suplementados com azeite apresentaram neoplasias com menor grau histológico, indicador de melhor prognóstico quando comparado com o grupo padrão. Os benefícios do consumo de azeite podem advir da sua riqueza em ácido oleico, vitamina E e compostos fenólicos sendo importante ter em conta em futuros estudos a quantidade e qualidade consumida.

No entanto, a refeição do tipo mediterrânico não apresentou resultados tão convincentes. As neoplasias encontradas nos animais deste grupo tinham menor extensão de áreas sólidas e menor contagem mitótica, no entanto apresentavam um pleomorfismo nuclear considerável. Estes dados corroboram as dificuldades em mimetizar a complexidade da alimentação humana num estudo experimental. Destaque-se também o facto de alguns alimentos incluídos nessa refeição terem sido sujeitos a um método de confecção culinária o que, tal como discutido no enquadramento exposto na Introdução, pode alterar a digestibilidade, biodisponibilidade e o efeito fisiológico no organismo.

A realização de estudos experimentais tem vindo a ser uma importante ferramenta na identificação dos alimentos e nutrientes que podem influenciar a carcinogénese mamária. Além da avaliação macroscópica dos tumores, considerou-se relevante a avaliação de parâmetros indicadores da malignidade tumoral e associados ao prognóstico como os que foram utilizados no presente trabalho, previamente validados por Elston & Ellis no seu trabalho.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McPherson, K., Steel, C., Dixon, J., ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors, and genetics *BMJ*, 2001. **321**: p. 624-628
2. Bray, F., McCarron, P., Parkin, M., The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Research*, 2004. **6**(6): p. 229–239.
3. Kelsey, J.L. and M.D. Gammon, The epidemiology of breast cancer. *CA Cancer J Clin*, 1991. **41**(3): p. 146-165.
4. Hankinson, S., Colditz, G., Willett, W., The lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. *Breast Cancer Research*, 2004. **6**: p. 213-218.
5. Dumitrescu, R.G. and I. Cotarla, Understanding breast cancer risk - where do we stand in 2005? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2005. **9**(1): p. 208-221.
6. Veeck, J. and M. Esteller, Breast Cancer Epigenetics: From DNA Methylation to microRNAs. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2010. **15**(1): p. 5-17.
7. Cebrian, A., P.D. Pharoah, S. Ahmed, *et al.*, Genetic variants in epigenetic genes and breast cancer risk. *Carcinogenesis*, 2006. **27**(8): p. 1661-1669.
8. Doll, R., Peto, R., The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*, 1981. **66**(6): p. 1191-308.

9. Macaulay, V., Richards, M., Hickey, E. *et al.*, The Emerging Tree of West Eurasian mtDNAs: A Synthesis of Control-Region Sequences and RFLPs. *Am J Human Gen*, 1999. **64**(1): p. 232-249.
10. Ames, B.N. and P. Wakimoto, Are vitamin and mineral deficiencies a major cancer risk? *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(9): p. 694-704.
11. Campbell, K.L. and A. McTiernan, Exercise and Biomarkers for Cancer Prevention Studies. *J. Nutr.*, 2007. **137**(1): p. 161S-169.
12. McTiernan, A., Behavioral Risk Factors in Breast Cancer: Can Risk Be Modified? *Oncologist*, 2003. **8**(4): p. 326-334.
13. Boyle, P. and P. Boffetta, Alcohol consumption and breast cancer risk. *Breast Cancer Research*, 2009. **11**(Suppl 3): p. S3.
14. Tjønneland, A., J. Christensen, A. Olsen, *et al.*, Alcohol intake and breast cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes and Control*, 2007. **18**(4): p. 361-373.
15. Michels, K.B., A.P. Mohllajee, E. Roset-Bahmanyar, *et al.*, Diet and breast cancer. *Cancer*, 2007. **109**(S12): p. 2712-2749.
16. Willett, W.C., Diet and breast cancer. *Journal of Internal Medicine*, 2001. **249**(5): p. 395-411.
17. Ellison, R.C., Y. Zhang, C.E. McLennan, *et al.*, Exploring the Relation of Alcohol Consumption to Risk of Breast Cancer. *Am. J. Epidemiol.*, 2001. **154**(8): p. 740-747.
18. Tavani, A., L. Giordano, S. Gallus, *et al.*, Consumption of sweet foods and breast cancer risk in Italy. *Annals of Oncology*, 2006. **17**(2): p. 341-345.

19. Bradshaw, P., S. Sagiv, G. Kabat, *et al.*, Consumption of sweet foods and breast cancer risk: a case–control study of women on Long Island, New York. *Cancer Causes and Control*, 2009. **20**(8): p. 1509-1515.
20. Ferrucci, L.M., A.J. Cross, B.I. Graubard, *et al.*, Intake of meat, meat mutagens, and iron and the risk of breast cancer in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Br J Cancer*, 2009. **101**(1): p. 178-184.
21. Taylor, E.F., V.J. Burley, D.C. Greenwood, *et al.*, Meat consumption and risk of breast cancer in the UK Women's Cohort Study. *Br J Cancer*, 2000. **96**(7): p. 1139-1146.
22. Cho, E., W.Y. Chen, D.J. Hunter, *et al.*, Red Meat Intake and Risk of Breast Cancer Among Premenopausal Women. *Arch Intern Med*, 2006. **166**(20): p. 2253-2259.
23. Moorman, P.G. and P.D. Terry, Consumption of dairy products and the risk of breast cancer: a review of the literature. *Am J Clin Nutr*, 2004. **80**(1): p. 5-14.
24. Ronco, A.L., De stefani, E., Dattoli, R., Dairy foods and risk of breast cancer: a case control study in Montevideo, Uruguay. *Eur J Cancer Prev*, 2002. **11**(5): p. 457-63.
25. Gaudet, M.M., J.A. Britton, G.C. Kabat, *et al.*, Fruits, Vegetables, and Micronutrients in Relation to Breast Cancer Modified by Menopause and Hormone Receptor Status. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2004. **13**(9): p. 1485-1494.

26. Zhang, C.-X., S.C. Ho, Y.-M. Chen, *et al.*, Greater vegetable and fruit intake is associated with a lower risk of breast cancer among Chinese women. *International Journal of Cancer*, 2009. **125**(1): p. 181-188.
27. Gandini, S., H. Merzenich, C. Robertson, *et al.*, Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 2000. **36**(5): p. 636-646.
28. La Vecchia, C., A. Altieri, and A. Tavani, Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: a review of Italian studies. *European Journal of Nutrition*, 2001. **40**(6): p. 261-267.
29. Mathers, J.C., Pulses and carcinogenesis: Potential for the prevention of colon, breast and other cancers. *Br J Nutr*, 2002. **88**(Suppl. 3): p. S273-S279.
30. Kim, J., S.-Y. Lim, A. Shin, *et al.*, Fatty fish and fish omega-3 fatty acid intakes decrease the breast cancer risk: a case-control study. *BMC Cancer*, 2009. **9**(1): p. 216.
31. Terry, P.D., T.E. Rohan, and A. Wolk, Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: a review of the epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr*, 2003. **77**(3): p. 532-543.
32. Gago-Dominguez, M., J.M. Yuan, C.L. Sun, *et al.*, Opposing effects of dietary n-3 and n-6 fatty acids on mammary carcinogenesis: The Singapore Chinese Health Study. *Br J Cancer*, 2003. **89**(9): p. 1686-1692.

33. Trichopoulou A., K.K., Stuver S., et al., Consumption of olive oil and specific food groups in relation to breast cancer risk in Greece. *J Natl Cancer Inst*, 1995. **87**: p. 110-6.
34. Landa, M.-C., Frago, N., Tres, A., Diet and the risk of breast cancer in Spain. *Eur J Cancer Prev*, 1994. **3**: p. 313-320.
35. Martin-Moreno, J.-M.W., W.C.; Gorgojo, L. et al, Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. *Int J Cancer*, 1994. **58**: p. 774-80.
36. García-Segovia, P., A. Sánchez-Villegas, J. Doreste, *et al.*, Olive oil consumption and risk of breast cancer in the Canary Islands: a population-based case-control study. *Public Health Nutrition*, 2006. **9**(1a): p. 163-167.
37. La Vecchia, C., Negri, E., Franceschi, S., Decarli, S., Giacosa, A., Lipworth, L., Olive oil, other dietary fats, and the risk of breast cancer (Italy). *Cancer Causes Control*, 1995. **6**(6): p. 545-50.
38. Wu, A.H., M.C. Yu, C.-C. Tseng, *et al.*, Green tea and risk of breast cancer in Asian Americans. *International Journal of Cancer*, 2003. **106**(4): p. 574-579.
39. Zhang, M., C.D.A.J. Holman, J.-p. Huang, *et al.*, Green tea and the prevention of breast cancer: a case-control study in southeast China. *Carcinogenesis*, 2006: p. bgl252.
40. Sun, C.-L., J.-M. Yuan, W.-P. Koh, *et al.*, Green tea, black tea and breast cancer risk: a meta-analysis of epidemiological studies. *Carcinogenesis*, 2006. **27**(7): p. 1310-1315.

41. Kumar, N., L. Titus-Ernstoff, P.A. Newcomb, *et al.*, Tea Consumption and Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2009. **18**(1): p. 341-345.
42. Kritchevsky, D., Diet and Cancer: What's Next? *J. Nutr.*, 2003. **133**(11): p. 3827S-3829.
43. Terry, P., Susuki, R., Hu, F.B., Wolk, A. , A prospective study of major dietary patterns and the risk of breast cancer. . *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2001. **10**: p. 1281-1285.
44. Parada, J. and J.M. Aguilera, Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *Journal of Food Science*, 2007. **72**(2): p. R21-R32.
45. Davis, D.R., M.D. Epp, and H.D. Riordan, Changes in USDA Food Composition Data for 43 Garden Crops, 1950 to 1999. *J Am Coll Nutr*, 2004. **23**(6): p. 669-682.
46. Tubiello, F.N., J.-F. Soussana, and S.M. Howden, Crop and pasture response to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. **104**(50): p. 19686-19690.
47. Michels, K.B. and M.B. Schulze, Can dietary patterns help us detect diet?disease associations? *Nutrition Research Reviews*, 2005. **18**(02): p. 241-248.
48. Grabacka, M., Reiss, K., Anticancer Properties of PPARAlpha-Effects on Cellular Metabolism and Inflammation. *PPAR Res*, 2008. **2008**.
49. Mellemkjær, L., C. Emborg, G. Gridley, *et al.*, Anorexia nervosa and cancer risk. *Cancer Causes and Control*, 2001. **12**(2): p. 173-177.

50. Michels, K.B. and A. Ekblom, Caloric Restriction and Incidence of Breast Cancer. *JAMA*, 2004. **291**(10): p. 1226-1230.
51. Elias, S.G., P.H.M. Peeters, D.E. Grobbee, *et al.*, Breast Cancer Risk After Caloric Restriction During the 1944-1945 Dutch Famine. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2004. **96**(7): p. 539-546.
52. Lorincz, A.M. and S. Sukumar, Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2006. **13**(2): p. 279-292.
53. Ahn, J., A. Schatzkin, J.V. Lacey, Jr, *et al.*, Adiposity, Adult Weight Change, and Postmenopausal Breast Cancer Risk. *Arch Intern Med*, 2007. **167**(19): p. 2091-2102.
54. Huang, Z., W.C. Willett, G.A. Colditz, *et al.*, Waist Circumference, Waist: Hip Ratio, and Risk of Breast Cancer in the Nurses' Health Study. *Am. J. Epidemiol.*, 1999. **150**(12): p. 1316-1324.
55. Montazeri, A., J. Sadighi, F. Farzadi, *et al.*, Weight, height, body mass index and risk of breast cancer in postmenopausal women: a case-control study. *BMC Cancer*, 2008. **8**(1): p. 278.
56. van den Brandt, P.A., D. Spiegelman, S.-S. Yaun, *et al.*, Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies on Height, Weight, and Breast Cancer Risk. *Am. J. Epidemiol.*, 2000. **152**(6): p. 514-527.
57. Schapira, D.V., R.A. Clark, P.A. Wolff, *et al.*, Visceral obesity and breast cancer risk. *Cancer*, 1994. **74**(2): p. 632-639.
58. Sonnenschein, E., P. Toniolo, M. Terry, *et al.*, Body fat distribution and obesity in pre- and postmenopausal breast cancer. *Int. J. Epidemiol.*, 1999. **28**(6): p. 1026-1031.

59. Augustin, L.S.A., J. Polesel, C. Bosetti, *et al.*, Dietary glycemic index, glycemic load and ovarian cancer risk: a case–control study in Italy. *Annals of Oncology*, 2003. **14**(1): p. 78-84.
60. Gallus, S., L. Scotti, E. Negri, *et al.*, Artificial sweeteners and cancer risk in a network of case–control studies. *Annals of Oncology*, 2007. **18**(1): p. 40-44.
61. Lajous, M., M.-C. Boutron-Ruault, A. Fabre, *et al.*, Carbohydrate intake, glycemic index, glycemic load, and risk of postmenopausal breast cancer in a prospective study of French women. *Am J Clin Nutr*, 2008. **87**(5): p. 1384-1391.
62. Sieri, S., V. Pala, F. Brighenti, *et al.*, Dietary glycemic index, glycemic load, and the risk of breast cancer in an Italian prospective cohort study. *Am J Clin Nutr*, 2007. **86**(4): p. 1160-1166.
63. Brand-Miller, J.C., S.H. Holt, D.B. Pawlak, *et al.*, Glycemic index and obesity. *Am J Clin Nutr*, 2002. **76**(1): p. 281S-285.
64. Hare-Bruun, H., A. Flint, and B.L. Heitmann, Glycemic index and glycemic load in relation to changes in body weight, body fat distribution, and body composition in adult Danes. *Am J Clin Nutr*, 2006. **84**(4): p. 871-879.
65. Boyd, N.F., J. Stone, K.N. Vogt, *et al.*, Dietary fat and breast cancer risk revisited: a meta-analysis of the published literature. *Br J Cancer*, 2003. **89**(9): p. 1672-1685.
66. Larsson, S.C., M. Kumlin, M. Ingelman-Sundberg, *et al.*, Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr*, 2004. **79**(6): p. 935-945.

67. Altenburg, J.D. and R.A. Siddiqui, Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Down-Modulate CXCR4 Expression and Function in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Molecular Cancer Research*, 2009. **7**(7): p. 1013-1020.
68. Waterman, E., Lockwood, B., Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev*, 2007. **12**(4): p. 331-42.
69. Cicerale, S., Lucas, L., Keast, R., Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *Int J Mol Sci.*, 2010. **11**(2): p. 458–479.
70. Jaen, International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *European Journal of Clinical Investigation*, 2005. **35**(7): p. 421-424.
71. Lastra, C.A., Barranco, M.D., Motilva, V., Herrerias, J.M., Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. *Current Pharmaceutical Design*, 2001. **7**: p. 933-950.
72. Owen, R.W., A. Giacosa, W.E. Hull, *et al.*, The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 2000. **36**(10): p. 1235-1247.
73. Tripoli, E., M. Giammanco, G. Tabacchi, *et al.*, The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 2005. **18**(01): p. 98-112.
74. Trichopoulou, A., P. Lagiou, H. Kuper, *et al.*, Cancer and Mediterranean Dietary Traditions. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2000. **9**(9): p. 869-873.

75. CHAN, E.J. and L. CHO, What can we expect from omega-3 fatty acids? *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 2009. **76**(4): p. 245-251.
76. Bartsch, H., J. Nair, and R.W. Owen, Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, 1999. **20**(12): p. 2209-2218.
77. Rose, D., Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from in vitro experiments and animal studies. *Am J Clin Nutr*, 1997. **66**(6): p. 1513S-1522.
78. Lampe, J.W., Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr*, 1999. **70**(3): p. 475S-490.
79. Malin, A.S., D. Qi, X.-O. Shu, *et al.*, Intake of fruits, vegetables and selected micronutrients in relation to the risk of breast cancer. *International Journal of Cancer*, 2003. **105**(3): p. 413-418.
80. Pierce, J.P., L. Natarajan, B.J. Caan, *et al.*, Influence of a Diet Very High in Vegetables, Fruit, and Fiber and Low in Fat on Prognosis Following Treatment for Breast Cancer: The Women's Healthy Eating and Living (WHEL) Randomized Trial. *JAMA*, 2007. **298**(3): p. 289-298.
81. Zhang, S., D.J. Hunter, M.R. Forman, *et al.*, Dietary Carotenoids and Vitamins A, C, and E and Risk of Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999. **91**(6): p. 547-556.
82. Sato, R., K.J. Helzlsouer, A.J. Alberg, *et al.*, Prospective Study of Carotenoids, Tocopherols, and Retinoid Concentrations and the Risk

- of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2002. **11**(5): p. 451-457.
83. Larsson, S.C., L. Bergkvist, and A. Wolk, Folate Intake and Risk of Breast Cancer by Estrogen and Progesterone Receptor Status in a Swedish Cohort. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2008. **17**(12): p. 3444-3449.
 84. Fowke, J.H., F.-L. Chung, F. Jin, *et al.*, Urinary Isothiocyanate Levels, Brassica, and Human Breast Cancer. *Cancer Research*, 2003. **63**(14): p. 3980-3986.
 85. Weng, J., Tsai, C., Kulp, S., Chen C., Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer Letters*, 2008. **262**(2): p. 153-163.
 86. Terry, P., A. Wolk, I. Persson, *et al.*, Brassica Vegetables and Breast Cancer Risk. *JAMA*, 2001. **285**(23): p. 2975-2977.
 87. Lampe, J.W. and S. Peterson, Brassica, Biotransformation and Cancer Risk: Genetic Polymorphisms Alter the Preventive Effects of Cruciferous Vegetables. *J. Nutr.*, 2002. **132**(10): p. 2991-2994.
 88. Michels, K.B., L. Holmberg, L. Bergkvist, *et al.*, Dietary antioxidant vitamins, retinol, and breast cancer incidence in a cohort of Swedish women. *International Journal of Cancer*, 2001. **91**(4): p. 563-567.
 89. Lambert, J.D., J. Hong, G.-y. Yang, *et al.*, Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr*, 2005. **81**(1): p. 284S-291.
 90. Verma, A.K., J.A. Johnson, M.N. Gould, *et al.*, Inhibition of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene- and N-Nitrosomethylurea-induced Rat

- Mammary Cancer by Dietary Flavonol Quercetin. *Cancer Research*, 1988. **48**(20): p. 5754-5758.
91. Corre, L.L., N. Chalabi, L. Delort, *et al.*, Resveratrol and breast cancer chemoprevention: Molecular mechanisms. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005. **49**(5): p. 462-471.
 92. Sartippour, M.R., D. Heber, J. Ma, *et al.*, Green Tea and Its Catechins Inhibit Breast Cancer Xenografts. *Nutrition and Cancer*, 2001. **40**(2): p. 149 - 156.
 93. Carmody, R.N. and R.W. Wrangham, The energetic significance of cooking. *Journal of Human Evolution*, 2009. **57**(4): p. 379-391.
 94. Knorr, D., B.I.O. Ade-Omowaye, and V. Heinz, Nutritional improvement of plant foods by non-thermal processing. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2002. **61**(02): p. 311-318.
 95. Khanum, F., M. Siddalinga Swamy, K.R. Sudarshana Krishna, *et al.*, Dietary fiber content of commonly fresh and cooked vegetables consumed in India. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 2000. **55**(3): p. 207-218.
 96. Moore, M., Park, C., Tsuda, H., Soluble and insoluble fiber influences on cancer development. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1998. **27**(3): p. 229-42.
 97. Keogh, J.B., C.W.H. Lau, M. Noakes, *et al.*, Effects of meals with high soluble fibre, high amylose barley variant on glucose, insulin, satiety and thermic effect of food in healthy lean women. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2007. **61**(5): p. 597-604.

98. Slavin, J., Why whole grains are protective: biological mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2003. **62**(01): p. 129-134.
99. Yuan, G.-f., B. Sun, J. Yuan, *et al.*, Effects of different cooking methods on health-promoting compounds of broccoli. *Journal of Zhejiang University - Science B*, 2009. **10**(8): p. 580-588.
100. van het Hof, K.H., C.E. West, J.A. Weststrate, *et al.*, Dietary Factors That Affect the Bioavailability of Carotenoids. *J. Nutr.*, 2000. **130**(3): p. 503-506.
101. Gartner, C., W. Stahl, and H. Sies, Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am J Clin Nutr*, 1997. **66**(1): p. 116-122.
102. McKillop, D., Pentieva, K., Daly, D. *et al.*, The effect of different cooking methods on folate retention in various foods that are amongst the major contributors to folate intake in the UK diet. *Br J Nutr*, 2002. **88**: p. 681–688
103. Rohan, T.E., M.G. Jain, G.R. Howe, *et al.*, Dietary Folate Consumption and Breast Cancer Risk. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000. **92**(3): p. 266-269.
104. Shrubsole, M.J., F. Jin, Q. Dai, *et al.*, Dietary Folate Intake and Breast Cancer Risk. *Cancer Research*, 2001. **61**(19): p. 7136-7141.
105. Sugimura, T., Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*, 2000. **21**(3): p. 387-395.
106. Dai, Q., X.-o. Shu, F. Jin, *et al.*, Consumption of Animal Foods, Cooking Methods, and Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2002. **11**(9): p. 801-808.

107. Kabat, G.C., A.J. Cross, Y. Park, *et al.*, Meat intake and meat preparation in relation to risk of postmenopausal breast cancer in the NIH-AARP diet and health study. *International Journal of Cancer*, 2009. **124**(10): p. 2430-2435.
108. Zheng, W. and S.-A. Lee, Well-Done Meat Intake, Heterocyclic Amine Exposure, and Cancer Risk. *Nutrition and Cancer*, 2009. **61**(4): p. 437 - 446.
109. Knize, M.G. and J.S. Felton, Formation and Human Risk of Carcinogenic Heterocyclic Amines Formed from Natural Precursors in Meat. *Nutrition Reviews*, 2005. **63**(5): p. 158-165.
110. Phillips, D.H., Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 1999. **443**(1-2): p. 139-147.
111. Shields, P.G., G.X. Xu, W.J. Blot, *et al.*, Mutagens From Heated Chinese and U.S. Cooking Oils. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1995. **87**(11): p. 836-841.
112. Lijinsky, W., N-Nitroso compounds in the diet. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 1999. **443**(1-2): p. 129-138.
113. Jakszyn, P., Agudo, A., Berenguer, A. *et al.*, Intake and food sources of nitrites and N-nitrosodimethylamine in Spain. *Public Health Nutrition*, 2006. **9**(6): p. 785-91.
114. Griesenbeck, J., M. Steck, J. Huber, *et al.*, Development of estimates of dietary nitrates, nitrites, and nitrosamines for use with the short

- willet food frequency questionnaire. *Nutrition Journal*, 2009. **8**(1): p. 16.
115. Cardiff, R.D., Validity of mouse mammary tumour models for human breast cancer: Comparative pathology. *Microscopy Research and Technique*, 2001. **52**(2): p. 224-230.
116. Russo, I., Russo, J., Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect*, 1996. **104**(9): p. 938-967.
117. Costa, I., Solanas, M., Eschrich, E., Histopathologic characterization of mammary neoplastic lesions induced with 7,12 dimethylbenz(alpha)anthracene in the rat: a comparative analysis with human breast tumors. *Arch Pathol Lab Med*, 2002. **126**(8): p. 915-27.
118. Russo, J. and I.H. Russo, Atlas and Histologic Classification of Tumors of the Rat Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 2000. **5**(2): p. 187-200.
119. Elston, C., Ellis, I., Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 1991. **19**(5): p. 403-410.
120. Pereira, P., *Alimentos versus Nutrientes característicos da Alimentação do tipo Mediterrânico e sua influência no Cancro da Mama*. 2007, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra: Coimbra.
121. Stoll, B., N-3 fatty acids and lipid peroxidation in breast cancer inhibition. *Br J Nutr*, 2002. **87**(3): p. 193-198.

122. Katdare, M., Singhal, H., Newmark, H., Osborne, M.P., Telang, N.T., Prevention of mammary preneoplastic transformation by naturally-occurring tumor inhibitors. *Cancer Lett*, 1997. **111**: p. 141-147.
123. Murakoshi, M., Nishino, H., Tokuda, H., Iwashima, A., Okuzumi, J., Kitano, H., Iwasaki, R., Inhibition by squalene of the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse-skin carcinogenesis. *Int J Cancer*, 1992. **52**: p. 950-952.
124. Nakagawa, M., Yamaguchi, T., Fukawa, H., Ogata, J., Komiyama, S., Akiyama, S., Kuwano, M. , Potentiation by squalene of the cytotoxicity of anticancer agents against cultured mammalian cells and murine tumor. *Jpn J Cancer Res*, 1985. **76**(4): p. 315-320.
125. Owen, R.W., Haubner, R., Wurtele, G., Hull, E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev*, 2004. **13**(4): p. 319-26.
126. Viste, J., Myers, S., Singh, B., Simko, E., Feline mammary adenocarcinoma: tumor size as a prognostic indicator. *Can Vet J*, 2002. **43**(1): p. 33-37.