

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

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

Fábia de Oliveira Andrade

Dissertação para obtenção do grau de  
**MESTRE**

Orientador:  
Prof. Dr. Thomas Prates Ong

São Paulo  
2010

Fábia de Oliveira Andrade

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

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Thomas Prates Ong  
orientador/presidente

---

1.º examinador

---

2.º examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

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

## AGRADECIMENTOS

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

À minha família por ser meu porto seguro;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À Marguite por ter sido sempre muito atenciosa e solícita;

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

Ao Rodrigo pela convivência;

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

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

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

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

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

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

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

Les Brown

## RESUMO

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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



## LISTA DE FIGURAS

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

## LISTA DE TABELAS

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

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

