



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Carolina Dumke de Siqueira

**Estudo de predição de intercorrências lactacionais (EPIL): *uma abordagem fisiológica e tumoral***

Florianópolis

2023

Carolina Dumke de Siqueira

**Estudo de predição de intercorrências lactacionais (EPIL): *uma abordagem fisiológica e tumoral***

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Fabíola Branco Filippin Monteiro, Dr<sup>ª</sup>.

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Ana Carolina Rabello de Moraes, Dr<sup>ª</sup>.

Florianópolis

2023

Siqueira, Carolina Dumke de

Estudo de predição de intercorrências lactacionais (EPIL) :  
uma abordagem fisiológica e tumoral / Carolina Dumke de  
Siqueira e coorientadora, Fabíola Branco Filippin Monteiro, coorientadora,  
Ana Carolina Rabello de Moraes, 2023.

205 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina,  
Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em  
Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Leite materno. 3. Glândula mamária. 4. Câncer  
de mama. 5. Proteína Sérica Amiloide A. I. Monteiro, Fabíola  
Branco Filippin. II. Moraes, Ana Carolina Rabello de. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia. IV. Título.

Carolina Dumke de Siqueira

**Estudo de predição de intercorrências lactacionais (EPIL): uma abordagem fisiológica e tumoral**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 01 de novembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Eduardo Monguilhott Dalmarco, Dr.  
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Carlos Rodrigo Zárate Bladés, Dr.  
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof<sup>a</sup>. Leila Zanatta, Dr<sup>a</sup>.  
Instituição Universidade do Estado de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Farmácia.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola Branco Filippin Monteiro  
Orientadora

Florianópolis, 2023.

Para todos que permaneceram.

## AGRADECIMENTOS

E, por fim, a parte mais difícil da tese. É muito mais fácil escrever algo baseado em evidências do que em sentimentos, o que talvez torne esta seção tão importante quanto (ou até mais) do que todas as outras. Foram cinco anos de graduação em farmácia, dois anos de mestrado e mais quatro anos de doutorado, totalizando onze anos, ou também, visto de outra forma, 96.426 horas. Onze anos dentro de uma universidade pública, 100% gratuita e de qualidade, por mais que isso soe um pouco clichê. Então, primeiramente, obrigada UFSC e PPGfar. Além dos onze anos sendo acolhida pela universidade, também foram seis anos de bolsa CAPES, o que me leva a necessidade de agradecer também pelas agências de fomento (CAPES, FAPESC, CNPq), obrigada.

Há muitos anos eu repito a mesma frase: “ciência não se faz sozinho”, sendo assim, não poderia deixar de agradecer a todos que não me deixaram sozinha. Foram oito anos sendo também acolhida pela Professora Tania Pasa e seu grupo de pesquisa, o GEIMM. Oito anos que me senti fazendo parte do grupo e que fui auxiliada das mais diversas maneiras. Obrigada por me permitirem. Claramente não posso deixar também de agradecer o meu grupo de pesquisa, coordenado pela professora e também minha orientadora, Fabíola. Obrigada LAITA e todos os seus integrantes por caminharem comigo e tornarem tudo mais leve. Obrigada a todos que riram comigo quando algo dava errado e também comemoraram quando algo dava certo, por que ciência também é isso.

Fui muito abençoada de ainda poder contar com outros grupos de pesquisa, que também não poderia deixar de agradecer. Obrigada Professora Rozangela e Dra. Valdelúcia, ou, melhor ainda, Roza e Val. Que sorte a minha poder dizer que não criei só parcerias para pesquisa, mas também uma amizade. Também, obrigada Professora Fátima por ter sido tão dedicada e me aberto as suas portas, você foi um anjo. Obrigada Professora Elaine, que me recebeu em outro estado e me proporcionou tanto. Para todas vocês, mulheres, que foram tão importantes e especiais, novamente, obrigada.

Como se não bastasse, ainda tive a grande honra de poder fazer pesquisa em outro país. Fui até a Austrália e lá encontrei as melhores pessoas que eu poderia sonhar. Ainda acredito que tenha sido o destino, mas não poderia deixar de agradecer a Professora Kelly e a Luiza, bem como todo o grupo de pesquisa, que em pouco tempo já se tornaram inesquecíveis.

Para a minha família e meus amigos, ainda me faltam palavras. Obrigada pelo apoio, pelo acolhimento, por acreditarem em mim (muitas vezes mais do que eu mesma) e me segurarem quando eu precisei, que força eu teria sem vocês?

Para meu namorado. Que parágrafo difícil. Já são mais de três anos me dando colo, compreendendo as minhas fases, me ouvindo falar sobre todos os meus experimentos e ainda viajando o mundo para me encontrar na Austrália. Toda essa jornada não foi fácil, mas seria muito mais difícil sem você. Obrigada.

Agora, Professora Fabíola e Professora Ana, essa parte é para vocês. Embora nunca tenha dito diretamente para as duas, sempre falei aos quatro ventos o quanto eu tive a sorte de ter a melhor dupla de orientadoras que eu poderia imaginar. Vocês são maravilhosas. Obrigada a vocês e ao universo por ter nos unido. Foram anos de parceria, ensinamentos, acolhimento e amadurecimento, obrigada por se fazerem presentes.

Quantos “obrigada” cabem numa tese? Aqui foram treze, mas sinto que nunca seria o suficiente. Chego ao fim de um ciclo com o coração cheio e a mente também. Que sorte a minha.

“Não sabendo que era impossível, foi lá e fez”. (Jean Cocteau)

## RESUMO

A glândula mamária é uma glândula exócrina cuja principal função é a produção de leite para alimentar o recém-nascido. A morfogênese da mama se inicia no período embrionário, porém, seu maior desenvolvimento ocorre durante o período de lactação. Durante a lactação, por meio do estímulo da sucção do recém-nascido no mamilo e na aréola, o leite secretado pelos alvéolos é transportado pelo ducto lactífero até o mamilo, permitindo a amamentação. O leite materno é considerado o alimento ideal para o recém-nascido, por isso, a Organização Mundial da Saúde recomenda o aleitamento materno exclusivo até os seis meses de vida. A produção insuficiente de leite é uma das razões mais frequentes para a interrupção precoce da amamentação, e a causa desse problema pode estar relacionada com a mãe, o recém-nascido ou ambos. A fim de auxiliar as mães com baixa produção de leite materno, têm-se usado fármacos galactagogos, que tem potencial para estimular a produção de leite materno, e acredita-se que a metformina possa atuar como um galactagogo por meio de seu papel como fármaco sensibilizador de insulina. Em relação à composição do leite, estudos constataram a expressão da proteína sérica amiloide A (SAA), tanto no leite materno quanto nas células mamárias, no entanto, ainda não se sabe qual é a função desta proteína em ambos os casos. Portanto, este estudo tem como objetivo analisar a composição do leite materno e relacioná-la com fatores associados à mãe, bem como estudar a função da SAA na mama por meio de modelos celulares, a fim de elucidar possíveis fatores associados à diminuição precoce da lactogênese e à duração do aleitamento materno. Para isso, foram avaliadas amostras de sangue, colostro e culturas de células epiteliais mamárias quanto à expressão de SAA, bem como de diversas citocinas. O papel da metformina como um possível galactagogo também foi investigado utilizando-se uma abordagem *in silico*. Como resultados, observou-se que a composição do leite materno se mantém estável em diferentes situações, indicando que ele se adapta para atender às necessidades do recém-nascido. No entanto, o estado nutricional pode interferir na continuação da amamentação. Além disso, as concentrações mais elevadas de citocinas pró-inflamatórias no colostro podem indicar a necessidade do recém-nascido de receber essas citocinas para o desenvolvimento de seu sistema imunológico e gastrointestinal. Na mama, a SAA pode estimular a expressão de IL-6 e inibir a captação de glicose, podendo estar relacionada com a diminuição precoce da amamentação devido à redução na produção de leite materno, bem como à involução mamária. A metformina pode apresentar potencial para aumentar a produção de leite nesses casos, o que não pôde ser confirmado com os ensaios *in vitro*. Isso provavelmente se deve ao curto período de tratamento; no entanto, os resultados da dinâmica molecular mostraram-se promissores.

**Palavras-chave:** Leite materno. Glândula mamária. Proteína Sérica Amiloide A. Metformina.

**MECHANISMS OF EARLY REDUCTION IN LACTOGENESIS BASED ON THE  
COMPREHENSION OF BREAST PHYSIOLOGY: A CLINICAL, *IN VITRO* AND *IN  
SILICO* APPROACH**

The mammary gland is an exocrine gland whose primary function is the production of milk to feed the baby. Mammary gland morphogenesis begins in the embryonic period, but its greatest development occurs during lactation. During lactation, through the stimulation of the baby's suction on the nipple and areola, the milk secreted by the alveoli is transported through the lactiferous duct to the nipple, allowing breastfeeding. Breast milk is considered the ideal food for the newborn; therefore, the World Health Organization recommends exclusive breastfeeding for the first six months of life. Insufficient milk production is one of the most common reasons for early cessation of breastfeeding, and the cause of this problem may be related to the mother, the baby, or both. In order to help mothers with low breast milk production, galactagogue drugs have been used, which have the potential to stimulate breast milk production, and it is believed that metformin may act as a galactagogue through its role as an insulin sensitizer. Regarding the composition of milk, studies have found the expression of serum amyloid A (SAA) protein, both in breast milk and in breast cells, however, it is not yet known what the function of this protein is in both cases. Therefore, this study aims to analyze the composition of breast milk and relate it to factors associated with the mother, as well as to study the function of SAA in the mammary gland through cellular models, to elucidate possible factors associated with early lactogenesis decline and the duration of breastfeeding. To do this, samples of blood, colostrum, and mammary epithelial cell cultures were evaluated for SAA expression, as well as various cytokines. The role of metformin as a possible galactagogue was also investigated using an *in silico* approach. As a result, it was observed that the composition of breast milk remains stable in different situations, indicating that it adapts to meet the baby's needs. However, nutritional status can interfere with continuation of breastfeeding. Additionally, higher concentrations of pro-inflammatory cytokines in colostrum may indicate the newborn's need to receive these cytokines for the development of their immune and gastrointestinal systems. In the mammary gland, SAA may stimulate the expression of IL-6 and inhibit glucose uptake, potentially being related to the early breastfeeding cessation due to reduced breast milk production, as well as mammary involution. Metformin may have the potential to increase milk production in these cases, which could not be confirmed with *in vitro* assays. This is likely due to the short treatment period; however, the results of molecular dynamics were promising.

**Keywords:** Breast milk. Mammary gland. Serum Amyloid A Protein. Metformin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Divisão das três partes da tese.....	15
Figura 2 – Desenvolvimento da mama .....	17
Figura 3 – Desenho esquemático da formação da mama embrionária.....	18
Figura 4 – Desenho esquemático da mama e lóbulos mamários.....	20
Figura 5 – Alvéolo mamário.....	21
Figura 6 – Desenho esquemático da MEC.....	22
Figura 7 – Desenvolvimento do alvéolo mamário durante a gestação.....	24
Figura 8 – Estrutura química da metformina.....	29
Figura 9 – Vias de sinalização induzidas pelo TLR4.....	37
Figura 10 – Via da MAPK/Erk.....	38
Figura 11 – Ativação da via p38 MAPK.....	40
Figura 12 – Sinalização da via PI3K/Akt.....	41
Figura 13 – Linhagem celular MCF-10A.....	50
Figura 14 – Fluxograma da metodologia computacional utilizada.....	57
Figura 15 - Desenho experimental e coleta de amostras de soro.....	65
Figura 16 – Concentrações séricas de IL-6, MCP, prolactina e progesterona de acordo com estado nutricional.....	66
Figura 17 – Concentração de IL-6 e MCP-1 de acordo com tipo de parto.....	67
Figura 18 - Correlação entre as determinações séricas.....	67
Figura 19 - Comparações entre o peso do recém-nascido de acordo com o estado nutricional e estado de amamentação.....	69
Figura 20 - Desenho experimental e coleta de amostras de colostro.....	70
Figura 21 – Análise dos componentes do colostro separados por estado nutricional das mães.....	71
Figura 22 – Análise dos componentes do colostro agrupados por idade materna.....	73
Figura 23 – Análise dos componentes do colostro avaliados de acordo com o tipo de parto.....	75
Figura 24 – Análise dos componentes do colostro avaliados de acordo com o desfecho da amamentação.....	77

Figura 25 – Razão entre marcadores pró e anti-inflamatórios no colostro.....	78
Figura 26 – Comparação entre as concentrações de citocinas sérias e no colostro.....	79
Figura 27 – Distribuição dos parâmetros avaliados no colostro e seus pontos discrepantes.....	80
Figura 28 – Comorbidades e complicações apresentadas antes e durante a gestação.....	84
Figura 29 - Hipótese de vias de sinalização da SAA na mama.....	85
Figura 30 – Citotoxicidade dos inibidores.....	86
Figura 31 – Citotoxicidade da metformina.....	87
Figura 32 – Contagem de células tratadas com SAA e inibidores específicos.....	88
Figura 33 – Ensaio clonogênico.....	89
Figura 34 – Porcentagem da área total do poço ocupada pela colônia.....	90
Figura 35 – Concentração de marcadores inflamatórios no sobrenadante celular.....	91
Figura 36 – Concentração IL-6 no sobrenadante celular.....	92
Figura 37 – Concentração IL-6 no sobrenadante celular após tratamento com metformina.....	93
Figura 38 – Ensaio de captação de glicose.....	94
Figura 39 – Análise por microscopia eletrônica de transmissão.....	95
Figura 40 – Avaliação do número de mitocôndrias.....	96
Figura 41 – Hipótese de mecanismo de ação da metformina como galactagogo.....	97
Figura 42 – Expressão dos genes selecionados em diferentes tecidos.....	98
Figura 43 – Expressão de <i>SLC22A3</i> nas células mamárias.....	99
Figura 44 – Alvos da metformina encontrados na base de dados Signor 3.0.....	101
Figura 45 – Qualidade do modelo gerado.....	102
Figura 46 – PROCHECK do modelo gerado.....	103
Figura 47 – Qualidade do modelo gerado.....	104
Figura 48 – Estrutura química da metformina.....	105
Figura 49 – Taxa de ocupação de ligações de hidrogênio.....	107
Figura 50 – Gráfico de RMSD.....	108
Figura 51 – Representação das interações entre ligante e proteína.....	108
Figura 52 – Representação das cavidades da proteína.....	109
Figura 53 – Predição da localização do OCT3.....	110
Figura 54 – <i>Pocket</i> de interação entre proteína e ligante.....	111

Figura 55 – Interação entre proteína e ligante.....	112
Figura 56 – Fisiologia do câncer de mama.....	131
Figura 57 – Sinalização de ER $\alpha$ .....	134
Figura 58 – Estrutura da proteína p53.....	136
Figura 59 – Sinalização de p53.....	137
Figura 60 – Isoformas de p53.....	139
Figura 61 – Expressão de proteínas por imunofluorescência.....	152
Figura 62 – Expressão relativa das proteínas.....	153
Figura 63 - Análise confirmatória de resistência ao tamoxifeno.....	154
Figura 64 – Resposta ao estradiol.....	154
Figura 65 – GFP após transdução.....	155
Figura 66 – Expressão gênica após transdução da célula MCF-7 TAMR.....	156
Figura 67 – Expressão gênica após transdução da célula MCF-7 LTED.....	156
Figura 68 – Western blot após transdução da célula MCF-7 TAMR.....	157
Figura 69 – Expressão proteica após transdução da célula MCF-7 TAMR.....	157
Figura 70 – Western blot após transdução da célula MCF-7 LTED.....	158
Figura 71 - Expressão proteica após transdução da célula MCF-7 LTED.....	158
Figura 72 - Confluência após transdução da célula MCF-7 TAMR.....	159
Figura 73 - Viabilidade após transdução da célula MCF-7 TAMR.....	160
Figura 74 - Confluência após transdução da célula MCF-7 LTED.....	160
Figura 75 - Viabilidade após transdução da célula MCF-7 LTED.....	161
Figura 76 – Ensaio de confluência ZR75-1.....	162
Figura 77 – Ensaio de viabilidade ZR75-1.....	162
Figura 78 – Cultura 3D ZR75-1.....	163
Figura 79 – Tamanho dos esferoides ZR75-1.....	163
Figura 80 – Viabilidade dos esferoides ZR75-1.....	164

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fármacos mais comumente utilizados como galactagogos.....	27
Tabela 2 – Bases de dados, funções e características.....	56
Tabela 3 – Características das participantes (N=180) .....	63
Tabela 4 – Estado da amamentação (N=118).....	64
Tabela 5 – Associação entre estado da amamentação e estado nutricional.....	68
Tabela 6 – Composição do colostro.....	70
Tabela 7 – Expressão dos genes em diferentes tecidos.....	98
Tabela 8 – Informações referentes às mutações.....	100
Tabela 9 – Perfil ADMET da metformina.....	105
Tabela 10 - Sequências de shRNAs.....	145

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMP – Adenosina monofosfato
- AMPK – Proteína quinase ativada por AMP
- CIAM - Central do incentivo ao aleitamento materno
- CTD – Terminal carboxila
- DMEM - Meio de *Eagle* Modificado por Dulbecco
- DM2 – Diabetes tipo 2
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- ECA - Enzima conversora de angiotensina
- EGF - Fator de crescimento epidérmico
- ELISA - Ensaio imunoenzimático
- ER – Receptor de estrogênio
- ERK - Quinase regulada por sinais extracelulares
- FGF - Fator de crescimento de fibroblastos
- FIL – Inibidor de *feedback* de gestação
- GFP - Partículas de fluorescência verde
- GH - Hormônio de crescimento
- GLUT – Transportador de glicose
- GMP – Glicomacropéptido
- GROMACS - *Groningen Machine for Chemical Simulations*
- GTE<sub>x</sub> - *Genotype-Tissue Expression*
- HER2 – Receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2
- HIV - Vírus da imunodeficiência humana
- HR – Receptores hormonais
- HTLV - Vírus linfotrópico da célula humana
- HU-UFSC/EBSERH - Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago
- IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina 1
- IL-1RA - Antagonista do receptor de IL-1
- IMC – Índice de massa corporal
- LPS - Lipopolissacarídeo
- LTED - Privação de estrogênio a longo prazo
- MAPK - Quinase ativada por mitógenos

MEC - Células epiteliais mamárias alveolares polarizadas

MiRNA - MicroRNA

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

NEC - Enterocolite necrosante

NVP – Número de partículas, volume e temperatura

NPT - Número de partículas, volume e pressão

OMS - Organização Mundial da Saúde

OCT3 - *Solute carrier family 22 member 3*

OD – Domínio de tetramerização

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PI3K - Fosfoinositídeo 3-quinase

PIP3 - Fosfatilinositol (3,4,5) trifosfatos

PLIP - *Protein-Ligand Interaction Profiler*

PM – Peso molecular

PR – Receptor de progesterona

PRL - Prolactina

PRR – Região rica em prolina

RN – Recém-nascido

RI - Resistência à insulina

RMSD - *Root Mean Square Deviation*

RTK - Receptor de tirosina quinase

SAA - Proteína sérica amiloide A

SOP - Síndrome do ovário policístico

TAD – Transativação amino-terminal

TAMR – Resistente à tamoxifeno

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TLR4 – *Toll-like receptor 4*

TPM - Transcritos por milhão

T-reg – Células T reguladoras

VMD - *Visual Molecular Dynamics*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
2.1	DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA MAMÁRIA .....	17
2.1.1	<b>Desenvolvimento embrionário</b> .....	17
2.1.2	<b>Desenvolvimento puberal</b> .....	18
2.1.3	<b>Desenvolvimento reprodutivo</b> .....	19
2.2	A MAMA NA GRAVIDEZ E LACTAÇÃO .....	19
2.2.1	<b>Adipócitos rosa</b> .....	23
2.3	LACTOGÊNESE .....	24
2.3.1	<b>Galactagogos</b> .....	26
2.3.1.1	<i>Metformina</i> .....	28
2.4	COMPOSIÇÃO DO LEITE MATERNO .....	31
2.4.1	<b>Macro e micronutrientes</b> .....	31
2.4.2	<b>Proteínas</b> .....	32
2.4.3	<b>Lipídios</b> .....	32
2.4.4	<b>Oligossacarídeos</b> .....	33
2.4.5	<b>Citocinas e quimiocinas</b> .....	34
2.5	PROTEÍNA SÉRICA AMILOIDE A .....	35
2.5.1	<b>Vias de sinalização da SAA</b> .....	37
2.5.1.1	<i>ERK1/2</i> .....	38
2.5.1.2	<i>p38 MAPK</i> .....	39
2.5.1.3	<i>PI3K/Akt</i> .....	41
2.6	JUSTIFICATIVA .....	41
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	43

3.1.1	<b>Objetivos Específicos</b> .....	43
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	45
4.1	<b>ESTUDO CLÍNICO</b> .....	45
4.1.1	<b>Casuística e aspectos éticos</b> .....	45
4.1.2	<b>Determinação de marcadores em amostras séricas</b> .....	46
4.1.2.1	<i>Coleta das amostras de soro</i> .....	46
4.1.2.2	<i>Determinação de parâmetros bioquímicos</i> .....	46
4.1.2.3	<i>Determinação de IL-6 e MCP-1</i> .....	47
4.1.3	<b>Determinação de marcadores em amostras de colostro</b> .....	47
4.1.3.1	<i>Coleta das amostras de colostro</i> .....	47
4.1.3.2	<i>Determinação de SAA, leptina, PCR, IL-1<math>\beta</math>, TNF-<math>\alpha</math>, IL-8, IL-6, MCP-1, IL-10 e IFN-<math>\gamma</math></i> .....	47
4.1.3.3	<i>Determinação de proteína total</i> .....	48
4.1.3.4	<i>Determinação de ácido graxo</i> .....	48
4.1.3.5	<i>Determinação de quilocalorias (Kcal) e porcentagem de gordura</i> .....	49
4.1.4	<b>Análise estatística</b> .....	49
4.2	<b>ESTUDO IN VITRO</b> .....	50
4.2.1	<b>Cultura celular</b> .....	51
4.2.2	<b>Viabilidade celular</b> .....	51
4.2.3	<b>Proliferação celular</b> .....	52
4.2.4	<b>Ensaio clonogênico</b> .....	52
4.2.5	<b>Determinação das concentrações de IL-6, MCP-1, IFN-<math>\gamma</math> e SAA em sobrenadante celular</b> .....	53
4.2.6	<b>Ensaio de captação de glicose</b> .....	53
4.2.7	<b>Dosagem de proteína pelo método de Lowry</b> .....	54
4.2.8	<b>Microscopia eletrônica de transmissão</b> .....	54
4.2.9	<b>Análise estatística</b> .....	55
4.3	<b>ESTUDO IN SILICO</b> .....	55

4.3.1	Análise do transportador de metformina .....	55
4.3.2	Escolha da proteína .....	57
4.3.3	Análise da qualidade estrutural e validação dos modelos gerados .....	59
4.3.4	Análise do ligante.....	59
4.3.5	<i>Docking</i> molecular .....	60
4.3.6	Dinâmica molecular .....	61
5	<b>RESULTADOS</b> .....	63
5.1	ESTUDO CLÍNICO .....	63
5.1.1	Dados clínicos .....	63
5.1.2	Análises no soro .....	65
5.1.3	Análises no colostro .....	69
5.2	ESTUDO <i>IN VITRO</i> .....	84
5.2.1	Hipótese .....	84
5.2.2	Viabilidade celular.....	85
5.2.3	Proliferação celular .....	87
5.2.4	Ensaio clonogênico.....	88
5.2.5	Dosagem de marcadores inflamatórios pelo método de ELISA.....	91
5.2.6	Ensaio de captação de glicose .....	93
5.2.7	Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão .....	94
5.3	ESTUDO <i>IN SILICO</i> .....	96
5.3.1	Hipótese .....	96
5.3.2	Análise do transportador de metformina .....	97
5.3.3	Interações fisiológicas.....	101
5.3.4	Qualidade dos modelos gerados .....	102
5.3.4.1	<i>Proteína 4ZHX</i> .....	102
5.3.4.2	<i>Transportador OCT3</i> .....	103
5.3.5	Predições do perfil ADMET .....	104

5.3.6	<b>Docking e dinâmica molecular</b> .....	106
5.3.6.1	<i>Complexo proteína 4ZHX e metformina</i> .....	106
5.3.6.2	<i>Complexo transportador OCT3 e metformina</i> .....	109
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	113
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	123
8	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	124
9	<b>IMPACTO SOCIAL</b> .....	124
	<b>CAPÍTULO II</b> .....	125
	<b>RESUMO</b> .....	126
	<b>BREAST CANCER AND P53: HOW TO OVERCOME CURRENT BARRIERS IN BREAST CANCER TREATMENT</b> .....	127
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	128
1.1	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA.....	128
1.2	FATORES DE RISCO .....	129
1.3	FISIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA.....	129
1.4	TRATAMENTO.....	132
1.5	SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO.....	133
1.6	PAPEL DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO NO CÂNCER DE MAMA .....	134
1.7	INTERAÇÃO ENTRE RECEPTOR DE ESTROGÊNIO E P53.....	135
1.8	SINALIZAÇÃO DE P53 .....	136
1.9	MUTAÇÕES DE P53 .....	138
1.10	REATIVAÇÃO DE P53 .....	138
1.11	ISOFORMAS DE P53 .....	139
1.11.1	Isoforma $\Delta 40p53$ .....	141
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	142
2.1	OBJETIVO GERAL.....	142
2.1.1	<b>Objetivos específicos</b> .....	142
3	<b>METODOLOGIA</b> .....	143
3.1	CULTURA CELULAR.....	143

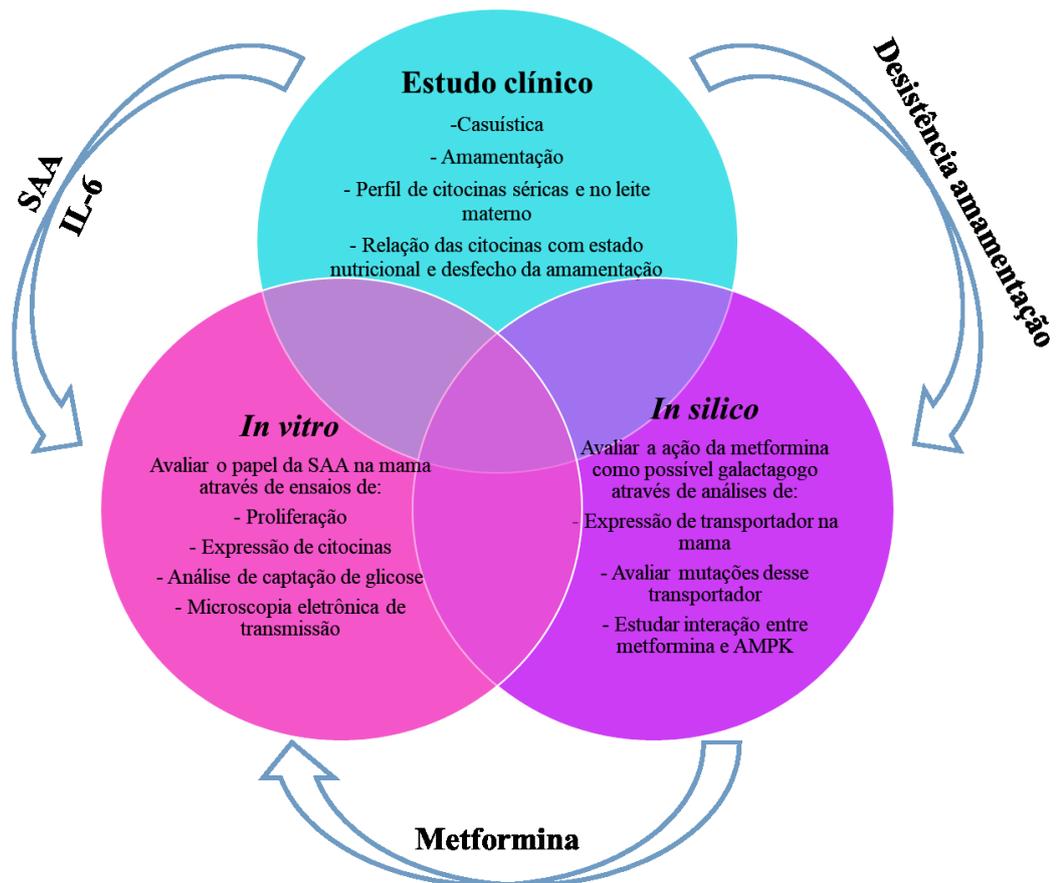
3.1.1	<b>Meio de cultura</b> .....	143
3.2	SUPEREXPRESSÃO DE $\Delta$ 40P53 .....	144
3.3	ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA .....	144
3.4	<i>KNOCKDOWN</i> DE $\Delta$ 40P53 E P53 .....	145
3.5	ENSAIO DE CONFLUÊNCIA .....	146
3.6	ENSAIO DE VIABILIDADE .....	147
3.7	WESTERN BLOT .....	147
3.8	RT-PCR .....	148
3.8.1	<b>Extração e quantificação de RNA</b> .....	148
3.8.2	<b>Transcrição reversa</b> .....	149
3.8.3	<b>RT-PCR</b> .....	149
3.9	CULTURA TRIDIMENSIONAL .....	150
3.9.1	<b>Tamanho dos esferóides</b> .....	150
3.9.2	<b>Viabilidade dos esferóides</b> .....	151
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	151
4	<b>RESULTADOS</b> .....	152
4.1	EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA .....	152
4.2	CONFIRMANDO RESISTÊNCIA AO TAMOXIFENO .....	153
4.3	AVALIANDO RESPOSTA AO ESTROGÊNIO .....	154
4.4	TRANSDUÇÃO .....	155
4.4.1	<b>RT-qPCR</b> .....	155
4.4.2	<b>Western Blot</b> .....	157
4.4.3	<b>Avaliando resposta das células transduzidas</b> .....	159
4.5	AVALIANDO RESPOSTA AO TAMOXIFENO E ESTROGÊNIO .....	161
4.5.1	<b>Esferóides</b> .....	162
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	166
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	172

<b>7</b>	<b>IMPACTO SOCIAL.....</b>	<b>172</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>173</b>
	<b>APÊNDICE A – TABELA DE AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL .....</b>	<b>191</b>
	<b>ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA.....</b>	<b>194</b>
	<b>ANEXO B – QUESTIONÁRIO .....</b>	<b>197</b>

## 1 APRESENTAÇÃO

Este trabalho está dividido em três diferentes abordagens: estudo clínico, pela análise de soro derivado de sangue total e leite materno; estudo *in vitro*, utilizando-se linhagem celular epitelial mamária; e estudo *in silico*, empregando-se bancos de dados e *softwares* de domínio público (Figura 1). Todas as partes contemplam um estudo generalizado de fatores que podem levar a diminuição precoce da lactogênese, levando à interrupção da amamentação. Ao final do estudo, espera-se propor, por meio do estudo *in silico*, a predição de um possível fármaco que possa atuar de forma benéfica pela estimulação da lactogênese em mães com baixa produção de leite. A ordem dos resultados segue a ordem cronológica dos experimentos, que foram sendo planejados de acordo com os resultados antecedentes.

Figura 1 – Divisão das três partes da tese.



Fonte: a autora

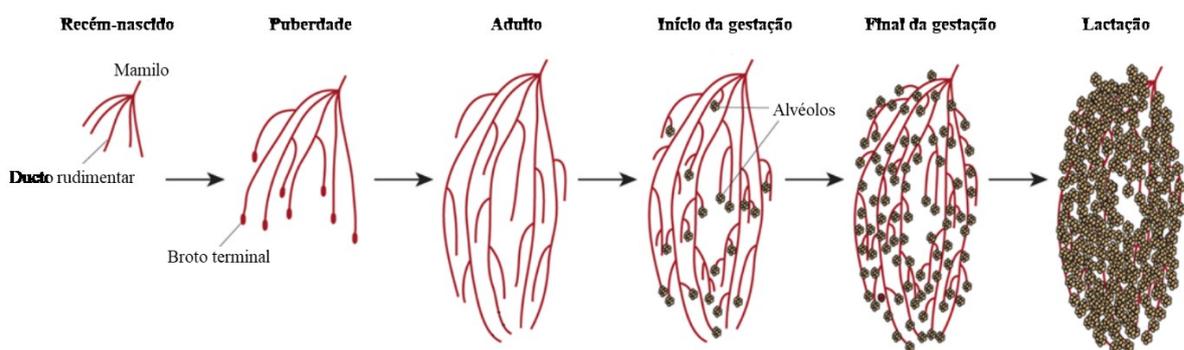
Além disso, o estudo conta com um segundo capítulo referente ao trabalho desenvolvido durante o período de doutorado sanduíche na Austrália, que objetiva avaliar a relação entre isoformas de p53 e sinalização de estrogênio no câncer de mama, com o intuito de melhorar os tratamentos já utilizados para o câncer.

## 2 INTRODUÇÃO

### 2.1 DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA MAMÁRIA

A glândula mamária, originada da ectoderme, é uma glândula exócrina que tem como principal função a produção do leite para alimentação do recém-nascido. A morfogênese da mama se inicia já no período embrionário, no entanto, seu maior desenvolvimento se dá no período de lactação (RUSIDZÉ *et al.*, 2021). O primeiro estágio se inicia no útero, aproximadamente na sétima semana gestacional, momento em que se inicia a formação do ducto rudimentar que irá se desenvolver até a puberdade, fase em que serão formados os brotos terminais pela liberação de estrogênio. Durante a vida adulta, os ductos se encontram mais amadurecidos e ramificados e é no início da gestação que começa a formação das estruturas lóbuloalveolares em resposta ao estímulo da progesterona. Ao decorrer da gestação, essas estruturas amadurecem e a fase da lactação é o momento em que se encontram mais desenvolvidas (Figura 2) (ZWICK *et al.*, 2018). Dessa forma, pode-se dizer que existem três estágios principais de desenvolvimento da glândula mamária: embrionário, puberal e reprodutivo (RUSIDZÉ *et al.*, 2021).

Figura 2 – Desenvolvimento da mama.



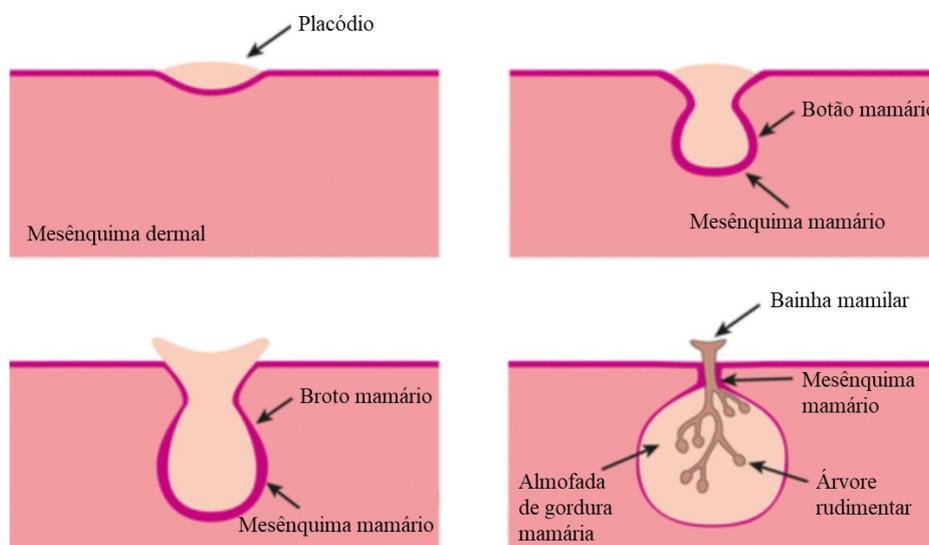
Fonte: Adaptado de Watson e Khaled (2020)

#### 2.1.1 Desenvolvimento embrionário

Dentre as fases do desenvolvimento mamário, a fase embrionária é a única que ocorre independentemente de estímulos hormonais. Um estudo em camundongos demonstrou que o

início da formação da glândula mamária se dá pela expressão do gene *Wnt10b*, através de estrias bilaterais que vão desde os membros superiores até os membros inferiores (WATSON; KHALED, 2020). Essas estrias resultam em linhas mamárias que dão origem a cinco pares de placódios, que posteriormente sofrem uma invaginação, dando origem aos botões mamários, que se incorporam dentro de um mesênquima mamário (REGAN *et al.*, 2012). Ao sofrer uma hipertrofia celular e um recrutamento de células ectodérmicas, esses botões aumentam de tamanho, formando um broto primário que invade o mesênquima mamário, iniciando o desenvolvimento de uma estrutura ramificada e a bainha mamilar. Com a proliferação do broto primário, o mesmo se estende até a almofada de gordura mamária, que é composta por numerosos pré-adipócitos e que darão origem ao tecido adiposo mamário (FU *et al.*, 2020). Neste momento, a ramificação do ducto se inicia, gerando uma árvore ductal rudimentar, presente do nascimento até a puberdade (Figura 3) (WANG *et al.*, 2005).

Figura 3 – Desenho esquemático da formação da mama embrionária.



Fonte: Adaptado de Fu *et al.* (2020)

### 2.1.2 Desenvolvimento puberal

Pelo aumento das concentrações de estrogênio circulante durante a puberdade, os ductos mamários se alongam e se ramificam, gerando uma árvore ductal que se estende por toda a gordura mamária. Nas pontas dos ductos, formam-se botões terminais, que são compostos por uma camada interna que dará origem ao epitélio luminal e uma camada externa que dará origem

ao mioepitélio. Uma vez que os ductos se alongam até os limites da almofada de gordura mamária, os botões terminais não estão mais presentes e a árvore ductal encontra-se totalmente desenvolvida, sendo formada então por ductos primários, ductos segmentares e subsegmentares (PAINE; LEWIS, 2017). Esses ductos subsegmentares culminam nos ductos terminais, que formam uma coleção de ductos denominados ácinos. A junção desses ácinos se dá por um tecido conjuntivo frouxo intralobular e é chamada de unidade terminal ducto-lobular (FU *et al.*, 2020).

### 2.1.3 Desenvolvimento reprodutivo

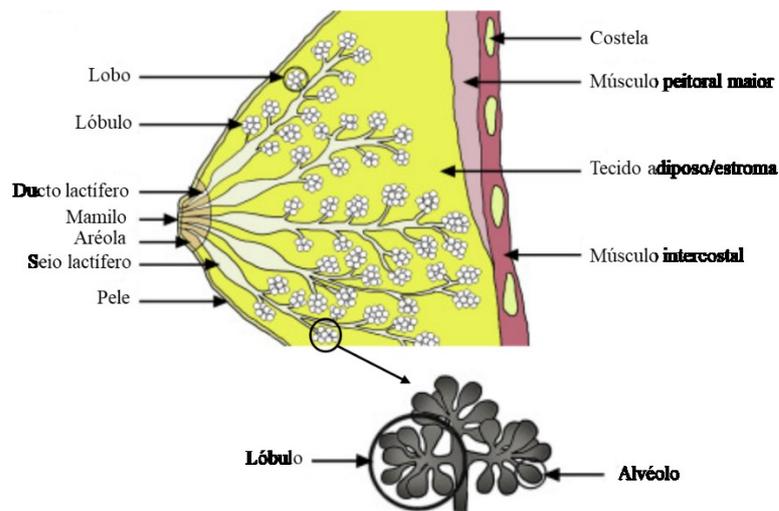
Durante a vida adulta, a glândula mamária ainda pode apresentar alterações na morfologia ductal. Na gravidez, ocorre uma maior ramificação dos ductos e a formação de unidades alveolares na ponta deles, devido ao estímulo da progesterona e prolactina (STERNLICHT *et al.*, 2006). A principal função das células alveolares é a síntese e secreção do leite materno na lactação, por isso, elas se diferenciam em células secretoras especializadas ao final da gravidez (ROSEN, 2012). Durante essa fase secretora que se inicia ao final da gestação, ocorre a expressão de proteínas do leite, como a  $\alpha$ -lactalbumina e gotículas de lipídio começam a se formar (ANDERSON *et al.*, 2007). Após o desmame, a glândula mamária se remodela, as células alveolares sofrem morte celular e a mama involui, voltando a um estado idêntico ao que se encontrava antes da gestação. As mudanças que ocorrem na glândula mamária durante o ciclo reprodutivo demonstram a plasticidade deste tecido, que se adapta ao longo da vida para atender as necessidades fisiológicas (WATSON; KREUZALER, 2011).

## 2.2 A MAMA NA GRAVIDEZ E LACTAÇÃO

Enquanto na mama da mulher adulta não grávida há uma predominância de tecido conjuntivo e adiposo, e o tecido epitelial é escasso, o início da gravidez é marcado por mudanças tanto organizacionais quanto funcionais da glândula mamária, em que ocorre uma proliferação de células ductais e alveolares, promovendo um crescimento da mama, concomitantemente com a redução do tecido adiposo (TRUCHET; HONVO-HOUÉTO, 2017). Esse desenvolvimento leva à formação de um extenso sistema ductal ramificado e uma infinidade de alvéolos derivados dos brotos terminais (JAVED; LTEIF, 2013).

Durante este período, a mama é formada por diversos ductos lactíferos, ao final dos ductos encontram-se os lobos, contendo numerosos lóbulos, que por sua vez, são formados por inúmeros alvéolos, que são as unidades secretoras de leite (Figura 4). Durante a lactação, pelo estímulo realizado no mamilo e aréola pela sucção do recém-nascido, o leite secretado pelos alvéolos é transportado através do ducto lactífero até o mamilo, possibilitando a amamentação (TRUCHET; HONVO-HOUÉTO, 2017).

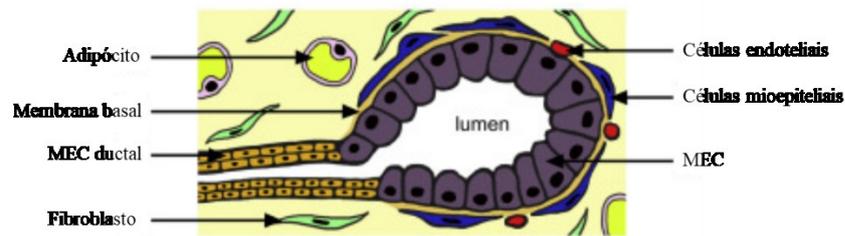
Figura 4 – Desenho esquemático da mama e lóbulos mamários.



Fonte: Adaptado de Truchet e Honvo-Houéto (2017)

Os alvéolos mamários são formados por uma monocamada de células epiteliais mamárias alveolares polarizadas (MEC), dispostas em torno de um lúmen central, onde o leite é secretado. Ao redor da MEC, encontra-se uma membrana basal que é circundada por células mioepiteliais contráteis, permitindo a secreção do leite no momento da lactação. Além disso, no estroma dos alvéolos, encontram-se células endoteliais, adipócitos e fibroblastos (Figura 5) (TRUCHET; HONVO-HOUÉTO, 2017).

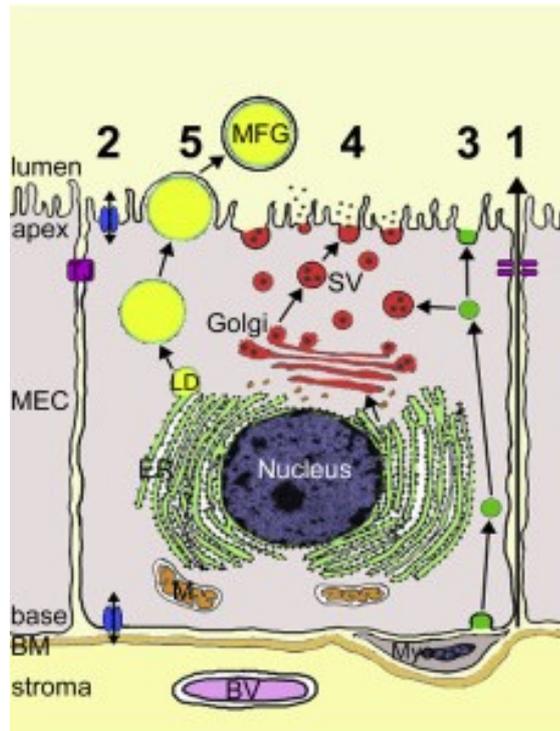
Figura 5 – Alvéolo mamário.



Fonte: Adaptado de Truchet e Honvo-Houéto (2017)

Os componentes do leite materno são secretados no lúmen do alvéolo por diferentes vias através da MEC. Como pode ser visto na Figura 6, por meio da via paracelular (1), ocorre o transporte de componentes plasmáticos e leucócitos, processo que ocorre durante a gravidez, início da lactação, involução ou durante um processo inflamatório. O movimento de íons, água e glicose presentes no leite materno se dá pelos transportadores de membrana (2) encontrados na membrana apical e basolateral da MEC. Por um processo de transcitose vesicular (3), imunoglobulinas atingem o lúmen central dos alvéolos, sendo também importantes componentes do leite materno. Já as proteínas do leite, a lactose, o cálcio e outros componentes da fase aquosa do leite são transportados através de vesículas secretoras (4) e liberados por exocitose no lúmen central. Formadas no retículo endoplasmático, as gotículas lipídicas crescem durante o seu transporte até o ápice da MEC e são então liberadas no lúmen como glóbulos de gordura do leite (5), fazendo parte, portanto, da composição da fração lipídica do leite materno (TRUCHET; HONVO-HOUÉTO, 2017).

Figura 6 – Desenho esquemático da MEC.



MEC, células epiteliais mamárias alveolares polarizadas; BV, vaso sanguíneo; LD, gotícula lipídica; SV, vesícula secretora; MFG, glóbulo de gordura do leite; Myo, célula mioepitelial, M, mitocôndria; ER, retículo endoplasmático. Fonte: Truchet e Honvo-Houéto (2017)

O aumento do número e do tamanho das células MEC durante a gravidez e lactação se dá pela regulação de hormônios sistêmicos como o estrogênio, a progesterona, a prolactina, o hormônio de crescimento (GH), a insulina, os glicocorticoides, as proteínas relacionadas ao hormônio da paratireoide e fatores locais como o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) (JAVED; LTEIF, 2013). Além disso, tanto a MEC quanto as células estromais também tem função de produzir componentes de matrizes extracelulares como proteoglicanos, hialuronano, fibronectina e lamnina, que são importantes para o crescimento e manutenção da função da glândula mamária (KASS *et al.*, 2007). Ao final da primeira metade da gestação, a estrutura da árvore ductal é estabelecida, ou seja, a sua estrutura não muda, o que ocorre apenas é a sua ramificação e a formação dos alvéolos. Por isso, neste momento, pequenos volumes de colostro podem ser observados no lúmen central do alvéolo e nos ductos lactíferos, sinalizando a diferenciação secretora e funcional da MEC. No último trimestre, ocorre uma redução na proliferação dos alvéolos, no entanto, eles aumentam de tamanho devido a uma distensão do

lúmen central pelo acúmulo de colostro. Além do aumento da atividade da MEC, há também um aumento do fluxo sanguíneo mamário durante a gestação, fato que persiste durante a lactação e se mantém até o desmame (TRUCHET; HONVO-HOUÉTO, 2017). Mais recentemente, viu-se que essa estrutura alveolar pode ser também formada a partir dos adipócitos presentes na glândula mamária, esses adipócitos com características de alvéolo mamário foram então denominados adipócitos rosa (CINTI, 2018).

### 2.2.1 Adipócitos rosa

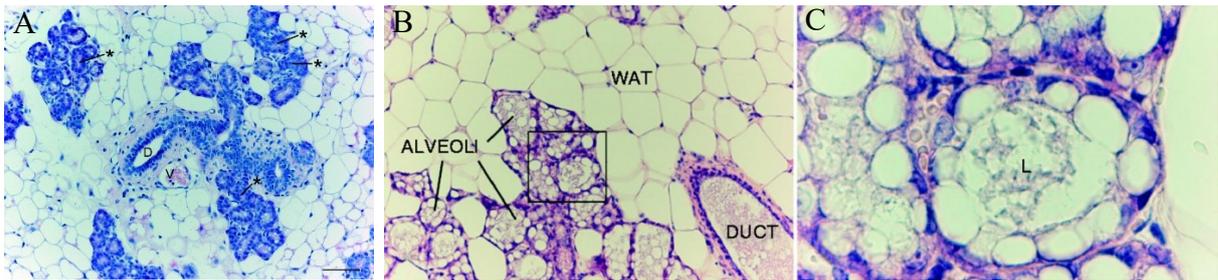
Sabe-se que os adipócitos são capazes de sofrer um processo chamado de transdiferenciação, em que ocorre uma conversão fisiológica e reversível de um fenótipo para outro, através de um estímulo fisiológico, alterando a sua morfologia e função celular (GIORDANO; FRONTINI; CINTI, 2016). Como exemplo já muito bem descrito na literatura, tem-se a transdiferenciação de adipócitos brancos em adipócitos bege, induzida por baixas temperaturas e com função de termorregulação (SIDOSSIS; KAJIMURA, 2015). Esse “escurecimento” do tecido adiposo branco tem demonstrado efeitos de proteção contra à obesidade, principalmente através da termogênese e, possivelmente, gasto energético associado. Por isso, este tecido tem sido alvo de estudos para possíveis terapias farmacológicas no tratamento da obesidade (GIRALT; VILLARROYA, 2013).

Como citado anteriormente, descobriu-se que a gordura subcutânea mamária de camundongos fêmeas também sofre um processo de transdiferenciação durante a gravidez, lactação e pós-lactação, que resulta na formação de estruturas alveolares secretoras de leite. Essas estruturas alveolares são formadas por células glandulares epiteliais contendo abundantes gotículas lipídicas citoplasmáticas, apresentando assim, características de adipócitos e são chamadas de adipócitos rosa, devido à cor do órgão adiposo durante a gravidez e lactação (CINTI, 2018).

O estudo de Giordano e colaboradores (2014) sugere que os alvéolos mamários se desenvolvem em duas etapas e por dois mecanismos diferentes: no primeiro estágio da gravidez, os alvéolos são constituídos por células epiteliais sem gotículas lipídicas citoplasmáticas e são derivados da proliferação de células-tronco. Já no segundo estágio da gravidez, os alvéolos são formados por células epiteliais carregadas de gotículas lipídicas, ao mesmo passo em que a gordura subcutânea diminui progressivamente (Figura 7) (GIORDANO *et al.*, 2014). Os dados

encontrados nesse estudo suportam a possibilidade de que no segundo estágio da gravidez, os adipócitos mamários adquiram características semelhantes a células epiteliais, provavelmente sob estímulos hormonais, formando alvéolos secretores de leite derivados do tecido adiposo (MORRONI *et al.*, 2004).

Figura 7 – Desenvolvimento do alvéolo mamário durante a gestação.



(A) Glândula mamária de um camundongo fêmea no dia 10 de gestação. Na primeira fase da gravidez, os alvéolos (asterisco) são constituídos por células epiteliais sem gotículas lipídicas citoplasmáticas. D, ducto; V, vaso sanguíneo. (B) e (C) Glândula mamária de um camundongo fêmea no dia 17 de gestação. Na segunda fase da gravidez, os alvéolos são constituídos por células epiteliais carregadas de lipídios (adipócitos rosa). C é o aumento da área enquadrada em B. Coloração por hematoxilina-eosina. WAT, tecido adiposo branco; L, lúmen central. Fonte: Adaptado de Giordano *et al.* (2014)

Todo essa etapa de desenvolvimento dos alvéolos mamários é necessária para iniciar a produção do leite materno para promover o aleitamento, processo denominado de lactogênese (PANG; HARTMANN, 2007).

### 2.3 LACTOGÊNESE

A lactogênese é definida como o processo de produção e secreção do leite materno e envolve a maturação das células alveolares. Ela ocorre em duas etapas: iniciação secretora (lactogênese I) e ativação secretora (lactogênese II) (PANG; HARTMANN, 2007).

A lactogênese I se inicia durante a segunda metade da gestação, momento em que ocorrem mudanças físicas que incluem hipertrofia dos adipócitos, desenvolvimento dos ductos e lóbulos mamários, multiplicação e desenvolvimento dos alvéolos. Nesse momento, começa a produção do leite, no entanto, sua secreção é controlada pela alta concentração de progesterona circulante que é liberada pela placenta. Nessa fase, pequenas quantidades de leite podem ser secretadas (NEVILLE; MORTON; UMEMURA, 2001).

A lactogênese II se inicia após a retirada da placenta, resultando em uma queda da concentração de progesterona e estrogênio, bem como aumento da concentração de prolactina, cortisol e insulina, levando a alta produção e secreção de leite após o parto. Esse segundo estágio da lactogênese é considerado “atrasado” quando a produção do leite não ocorreu em até 72 horas após o parto (LYONS *et al.*, 2020). Ressalta-se que alguns fatores levam ao retardo da ativação secretora e menor volume inicial de leite como primiparidade, parto cesáreo, obesidade, mães com fragmentos de placenta retidos, diabetes e partos vaginais estressantes (JEVITT; HERNANDEZ; GROËR, 2007).

A produção de leite materno é controlada por um mecanismo de controle de oferta, sendo a ocitocina um hormônio essencial nesse processo (LYONS *et al.*, 2020). O estímulo da sucção do lactente culmina na liberação de ocitocina pela hipófise posterior, que se liga a receptores nas células mioepiteliais localizadas nos alvéolos e ductos lactíferos, resultando na contração dessas células, permitindo assim, a secreção do leite até o mamilo (KENT; PRIME; GARBIN, 2012). Além disso, a prolactina também possui um papel regulador na produção do leite, sendo liberada pela glândula pituitária anterior. A prolactina é um hormônio regulado positiva e negativamente, mas seu principal controle vem de fatores inibitórios hipotalâmicos, como a dopamina, que atuam na subclasse D2 dos receptores de dopamina presentes nos adenomas lactotróficos (PILLAY; DAVIS, 2022).

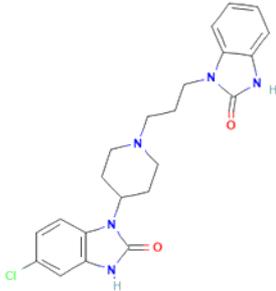
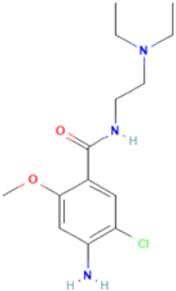
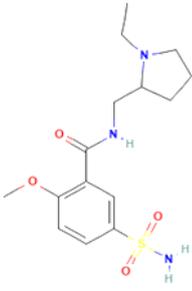
A síntese do leite é também regulada pelo inibidor de *feedback* de gestação (FIL) (KENT; PRIME; GARBIN, 2012). O FIL é uma proteína sintetizada pelas células epiteliais secretoras, os lactócitos, que se acumula no lúmen central dos alvéolos bem como outros constituintes do leite materno. Esse inibidor leva à diminuição da síntese do leite com o seu acúmulo no lúmen central e, quando o leite é removido pela mama, a concentração do FIL diminui e a síntese do leite aumenta novamente (BYROM, 2012). O FIL tem função de inibir a secreção do leite e é sintetizado em momentos que, mesmo que os alvéolos estejam distendidos, não ocorre a remoção do leite, ou seja, quando não há o estímulo da sucção ou ordenha (VAN VELDHUIZEN-STAAS, 2007). A concentração do FIL aumenta em períodos em que há acúmulo de leite, regulando a produção negativamente e diminuindo o volume de leite produzido. Essa inibição da secreção do leite é reversível e dependente da concentração de FIL e não afeta a composição do leite (BYROM, 2012). Sendo assim, se não houver o estímulo da sucção, esta proteína se acumula, levando à diminuição na produção de leite e, conseqüentemente, à involução da mama (KENT; PRIME; GARBIN, 2012).

No entanto, em determinadas situações, o processo de lactogênese não ocorre da maneira esperada e o volume de leite produzido não é o suficiente para alimentar o recém-nascido. A produção insuficiente de leite é uma das razões mais frequentes para a interrupção precoce da amamentação e a causa desse problema pode estar relacionada com a mãe, o recém-nascido ou ambos (STUEBE *et al.*, 2014). Alguns dos fatores que podem levar a baixa produção de leite são algumas doenças como diabetes, síndrome do ovário policístico (SOP), obesidade, entre outros, que causam uma alteração dos hormônios responsáveis pela lactação (HARRISON *et al.*, 2016). Nesses casos, uma possibilidade de tratamento para aumentar o volume de leite produzido é utilizando galactagogos (LEE *et al.*, 2016).

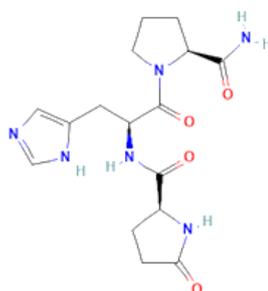
### 2.3.1 Galactagogos

Galactagogos são substâncias que tem potencial de estimular a produção de leite materno e que diferem dos nutrientes essenciais para lactação como o zinco (LEE *et al.*, 2016). Eles podem ser classificados em galactagogos naturais e farmacológicos, no entanto, não há ainda medicamentos com a finalidade de estimular a lactação, dessa forma, todo o uso de fármacos galactagogos é *off label*. Dentre os galactagogos farmacológicos, destacam-se a domperidona, a metoclopramida, a sulpirida e o hormônio liberador de tireotrofina (Tabela 1) (HAASE *et al.*, 2016). Em relação aos galactagogos naturais, existe grande número de ervas que podem ser utilizadas na forma de chás, cápsulas ou extratos de tintura e, dentre elas, destacam-se o feno-grego (*Trigonella foenum-graecum*), a erva-doce (*Foeniculum vulgare*), o anis (*Pimpinella anisum*), a moringa (*Moringa oleifera*) e a arruda-caprária (*Galega officinalis*) (MARASCO; WEST, 2020).

Tabela 1 – Fármacos mais comumente utilizados como galactagogos.

Fármaco	Estrutura química e peso molecular (PM)	Propriedades farmacológicas
Domperidona PubChem CID: 3151	425,911 	Antagonista periférico específico do receptor de dopamina D2, com atividade antiemética, gastrocinética e galactagoga
Metoclopramida PubChem CID: 4168	299,79 	Membro da classe das benzamidas e antagonista da dopamina D2. É um agente antiemético utilizado no tratamento da doença do refluxo gastroesofágico, prevenção de náuseas, vômitos e para estimular o esvaziamento gástrico
Sulpirida PubChem CID: 5355	341,4 	Membro da classe das benzamidas e antagonista do receptor D2 da dopamina. Tem sido utilizado terapêuticamente como antidepressivo, antipsicótico e como auxiliar digestivo
Protirelina (hormônio liberador de tireotropina)	362,38	Análogo sintético do peptídeo endógeno

---

 PubChem CID: 638678


hormônio liberador de tireotropina. É um hormônio tróptico tripeptídeo, liberado pelo hipotálamo, que estimula a liberação do hormônio estimulador da tireóide e da prolactina da hipófise anterior

---

Fonte: Pubchem e Drugbank. Acessado em 10 de agosto de 2022

O mecanismo de ação dos galactagogos varia, mas pode ser dividido em três diferentes formas: I) atuando diretamente na síntese do leite, melhorando a síntese do leite corrigindo alguma disfunção hormonal; II) estimulando a lactação; III) tornando o reflexo de ejeção do leite mais intenso (GRZESKOWIAK; WLODEK; GEDDES, 2019). Vale ressaltar que, por se tratar um mecanismo ainda não tão bem elucidado, deve-se tomar cuidado ao ingerir essas substâncias, pois não há um consenso em relação à dose ideal e todas elas podem desencadear reações adversas (FOONG *et al.*, 2020).

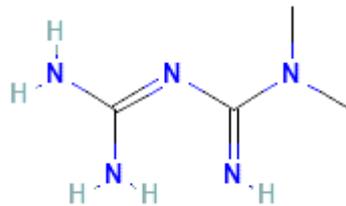
Além destes, recentemente surgiu a hipótese da metformina como um potencial galactagogo, por meio de seu papel como fármaco sensibilizador da insulina (GRZESKOWIAK; WLODEK; GEDDES, 2019), porém, poucos estudos que avaliaram o seu papel como estímulo da produção de leite materno foram realizados até o momento.

### 2.3.1.1 Metformina

A metformina (1,1-dimethylbiguanide, PubChem CID 4091) é um fármaco pertencente a classe das biguanidas, com atividade hipoglicemiante com raro desencadeamento de acidose láctica (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2022). A metformina é o tratamento de primeira linha para a diabetes tipo 2 (DM2) e é considerado um medicamento essencial pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Figura 8). Ela melhora efetivamente o controle glicêmico em pacientes com DM2 e possui um perfil de segurança bem estabelecido, raramente causando hipoglicemia. Ela também é usada para resistência à insulina na SOP (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). O mecanismo de ação da metformina ainda

permanece incerto, no entanto, sabe-se que o efeito antidiabético dela se dá, principalmente, pela inibição da gliconeogênese hepática (LAMOIA; SHULMAN, 2021). Ela pode ser usada isoladamente ou em combinação com sulfonilureias, tiazolidinedionas, medicamentos à base de incretinas, inibidores do cotransportador-2 de glicose sódica ou outros agentes hipoglicemiantes (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2022).

Figura 8 – Estrutura química da metformina.



Fonte: Pubchem. Acessado em 10 de agosto de 2022

A resistência à insulina (RI) e a hiperinsulinemia secundária afetam entre 65-70% das mulheres com SOP. Pacientes com SOP apresentam maior prevalência de intolerância à glicose, DM2, dislipidemia e inflamação subclínica crônica (DEUGARTE *et al.*, 2005). Muitas dessas mulheres também apresentam fenótipo de sobrepeso ou obesidade, o que agrava ainda mais a sua RI. Estudo anterior demonstrou a segurança e eficácia da metformina em mulheres com SOP durante a gravidez. Ele sugere que, quando usada durante a gravidez, a metformina reduz o risco de aborto espontâneo no primeiro trimestre, diabetes gestacional e macrosomia fetal (EHRMANN *et al.*, 2006).

Mulheres diagnosticadas com SOP podem correr o risco de apresentarem baixa produção de leite (RIDDLE; NOMMSEN-RIVERS, 2016). Por isso, o estudo de Vanky e colaboradores (2012) avaliou se o tratamento pré-natal com metformina melhoraria os resultados da lactação de mulheres diagnosticadas com SOP. Para isso, mulheres com SOP foram randomizadas para tratamento com metformina ou placebo, desde o primeiro trimestre até o parto. A média de tempo de aleitamento materno exclusivo no grupo placebo foi de 3,9 meses e no grupo metformina foi de 4,5 meses, não havendo diferença no aleitamento materno entre os grupos. Portanto, o uso de metformina possivelmente não foi uma intervenção eficaz na coorte estudada para aumentar a produção de leite em mulheres diagnosticadas com SOP (VANKY *et al.*, 2012).

Considerando a hipótese da metformina como um potencial fármaco galactagogo, mais recentemente, Nommsen-Rivers e colaboradores (2019) realizaram um ensaio clínico randomizado para determinar os efeitos da metformina no aumento da produção de leite materno e, para isso, avaliaram um grupo de mulheres tratadas com metformina e um grupo “placebo” de mulheres com baixa produção de leite e sinais de resistência à insulina. Neste estudo, o volume médio de produção de leite foi 68 mL maior nas participantes que receberam metformina em comparação com os participantes que receberam placebo, entretanto, essa diferença não foi considerada significativa. No entanto, houve um aumento na produção de leite entre as pacientes que continuaram fazendo uso de metformina durante todo o período de tratamento, enquanto a produção no grupo “placebo” diminuiu. Esses resultados apoiam a ideia de que uma intervenção que melhora a sensibilidade à insulina pode ser útil para aumentar a produção de leite (NOMMSEN-RIVERS *et al.*, 2019). Entretanto, dada a quantidade limitada de estudos e evidências sobre o efeito da metformina na amamentação e lactação, seu papel como potencial galactagogo ainda permanece incerto. Para tanto, precisa-se compreender a biologia do transporte de glicose na glândula mamária.

A glicose é o principal precursor da lactose, que é sintetizada nas vesículas de Golgi das células MEC durante a lactação. O processo de entrada de glicose nas células mamárias é mediado por transportadores facilitadores de glicose (GLUTs), sendo que a mama expressa principalmente GLUT1 e GLUT8 (ZHAO *et al.*, 2014). Ao entrar na célula, a glicose é conjugada com UDP-galactose por meio da lactose sintase, resultando na produção de lactose, que, além de ser um dos principais componentes do leite materno, sua concentração também determina o volume do leite, sendo assim, a entrada de glicose na célula e, conseqüentemente, a produção de lactose, são responsáveis pela quantidade de leite produzida pela lactante (MARDONES; VILLAGRÁN, 2012).

A produção suficiente de leite é essencial, pois o leite materno é considerado o alimento ideal para o recém-nascido, por isso, a OMS recomenda o aleitamento materno exclusivo até os seis meses de vida (WHO, 2021b). Além da produção suficiente, a composição do leite também é importante e, além da lactose, o leite é também composto por diversos macro e micronutrientes (KAKUMA *et al.*, 2007).

## 2.4 COMPOSIÇÃO DO LEITE MATERNO

Além de conter as quantidades ideais de nutrientes e compostos bioativos que propiciam a nutrição correta para o recém-nascido em desenvolvimento e fornecer proteção ao sistema imune ainda imaturo, sua composição também se modifica ao longo da lactação para atender corretamente às necessidades do recém-nascido (KAKUMA *et al.*, 2007).

### 2.4.1 Macro e micronutrientes

O leite materno pode ser classificado em colostro, leite de transição e leite maduro, sendo que a composição deles varia ao longo da lactação. O colostro é o primeiro fluido a ser produzido e é secretado em pequenas quantidades entre os primeiros dois a quatro dias após o parto (LYONS *et al.*, 2020). A sua cor, composição e consistência são distintas, sendo bastante rico em proteínas e minerais do soro do leite como cloreto, sódio e magnésio e apresenta concentrações mais baixas de lactose, gordura, cálcio e potássio em comparação com o leite maduro (BROWN, 2021). O leite de transição, por sua vez, é secretado a partir do quinto dia até a segunda semana após o parto, apresentando maiores volumes para favorecer o crescimento e as necessidades nutricionais do recém-nascido em crescimento. O leite de transição também é rico em proteínas e possui uma concentração mais alta de lactose em relação ao colostro (THURL *et al.*, 2010). A partir da segunda semana, se inicia a secreção do leite maduro, que se estende até o final da lactação. Neste momento, ocorre uma diminuição constante nas concentrações de proteína no leite, ao passo que a concentração de lipídios aumenta, sendo os lipídios considerados a principal fonte de energia do leite. Paralelamente a isso, as concentrações de lactose também aumentam gradativamente e permanecem constantes até o final da lactação, sendo este o principal carboidrato do leite (LYONS *et al.*, 2020). Mesmo que muitos avanços tenham sido feitos em relação às formulações infantis, ela ainda não se equipara ao leite materno, visto que sua composição não varia de acordo com as necessidades da criança (AHERN *et al.*, 2019).

### 2.4.2 Proteínas

O proteoma do leite materno humano é extremamente complexo, contendo mais de 1.500 compostos diferentes e, dentre as proteínas totais, 83 delas são mais abundantes (BECK *et al.*, 2015). Como funções principais das proteínas, tem-se o fornecimento de proteção contra deficiências e patógenos específicos, maturação dos órgãos e sustentação do crescimento do lactente (LÖNNERDAL, 2016).

Dentre as principais proteínas encontradas no leite, citam-se as caseínas que, mesmo em concentrações baixas, possuem um papel fundamental na saúde do recém-nascido. O seu hidrolisado, o glicomacropéptido (GMP), contém baixas concentrações de fenilalanina, sendo, então, muito utilizado nos produtos alimentícios para crianças com fenilcetonúria (DALY *et al.*, 2020). A digestão das caseínas também produz peptídeos com potencial inibitório da enzima conversora de angiotensina (ECA), demonstrando uma redução significativa da pressão arterial sistólica e diastólica e diminuição de danos inflamatórios e oxidativos (CADÉE *et al.*, 2007).

A proteína  $\alpha$ -lactalbumina é uma das proteínas mais abundantes do leite, compondo mais de um terço do teor de proteínas totais. Ela tem atividade prébiotica, estimulando o crescimento de *Bifidobacterium infantis*, importante colonizador do intestino do recém-nascido (LAYMAN; LÖNNERDAL; FERNSTROM, 2018). Além disso, seus peptídeos melhoram a absorção de íons de ferro, cálcio e zinco, que exercem ação antimicrobiana importante, principalmente contra bactérias Gram-positivas (SANDSTRÖM *et al.*, 2008).

A lactoferrina apresenta-se em elevadas concentrações no colostro e está em menor concentração no leite maduro, desempenhando um papel importante no combate a bactérias, fungos e vírus patogênicos e também na regulação do sistema imune (SAMUKAWA *et al.*, 2011). Outra proteína importante que compõe o leite materno é a osteopontina, que atua na remodelação óssea, modulação da inflamação e do sistema imune (HASCHKE; HAIDEN; THAKKAR, 2017).

### 2.4.3 Lipídios

Os fosfolipídios e os esfingolipídios são componentes importantes da fração lipídica do leite e também os mais predominantes (CONTARINI; POVOLO, 2013). Os fosfolipídios são uma importante fonte de colina, que é um nutriente essencial para o desenvolvimento fetal

e metabolismo do recém-nascido. Ao longo da gravidez, a placenta fornece as quantidades necessárias de colina ao feto, resultando em altas concentrações plasmáticas de colina (HOGEVEEN *et al.*, 2013). Ela também é um importante componente do leite materno, visto que ela auxilia o desenvolvimento cerebral e do sistema nervoso fetal e neonatal e também auxilia a formação de sinapses e a organização cerebral. Por isso, os fetos e os recém-nascidos requerem grande quantidade de colina (MAAS *et al.*, 2017). Os esfingolipídios estão relacionados a sinalização celular, cujos efeitos promovem regulação do crescimento celular, diferenciação, apoptose e recrutamento de células imunes (NILSSON, 2016).

Os triacilgliceróis contribuem com cerca de 98-99% da gordura do leite humano e as suas propriedades são influenciadas pela sua composição de ácidos graxos (KOLETZKO, 2017), que estão relacionados com a absorção de gordura e cálcio e também são importantes para o desenvolvimento neuronal do recém-nascido (NOVAK; DYER; INNIS, 2008).

#### **2.4.4 Oligossacarídeos**

Presente em maiores concentrações no colostro, os oligossacarídeos do leite humano são o terceiro componente mais abundante no leite materno, atrás apenas da lactose e dos lipídios (SMILOWITZ *et al.*, 2013). A sua estrutura depende de genes específicos, sendo assim, cada lactante sintetiza um subconjunto único, que é influenciado pela sua genética e por enzimas que processam os oligossacarídeos do leite (OKUNOLA *et al.*, 2020). Além de variar entre lactantes, também variam na mesma mulher de acordo com as fases da amamentação (CHATURVEDI *et al.*, 2001).

Com a função de nutrir a microbiota do trato gastrointestinal infantil, os oligossacarídeos são considerados agentes prebióticos, promovendo o crescimento de microrganismos benéficos no microbioma intestinal infantil, sendo responsáveis pela modulação da resposta imunológica das células epiteliais intestinais e na prevenção contra adesão de patógenos ao epitélio intestinal, prevenindo, assim, infecções (MOROZOV *et al.*, 2018). Eles podem atuar como inibidores das enterotoxinas produzidas pelo *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli*, e auxiliam no controle da infecção por *Campylobacter jejuni* e *Entamoeba histolytica* (ADAMS; GUTIÉRREZ; GUTIÉRREZ, 2019).

#### 2.4.5 Citocinas e quimiocinas

As citocinas do leite materno são de extrema importância para compor a deficiência das mesmas no recém-nascido, tendo como função modular a resposta inflamatória do lactente. Dentre as citocinas presentes no leite, destacam-se a IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  (DAWOD; MARSHALL, 2019). Devido à ação dos inibidores de protease ( $\alpha$ 1-antiquimiotripsina e  $\alpha$ 1-antitripsina), essas citocinas chegam inalteradas ao intestino do lactente, podendo cumprir suas funções, regulando a função imunológica, hematopoiese, inflamação, compensando a imaturidade do sistema imunológico neonatal e consequentemente insuficiência anti-inflamatória e a resposta anti-infecciosa. Embora as citocinas e quimiocinas tenham múltiplas funções no leite materno, elas podem ser classificadas entre pró-inflamatórias, que aumentam a inflamação defendendo o organismo da infecção e anti-inflamatórias, que reduzem a inflamação (QUITADAMO; COMEGNA; CRISTALLI, 2021).

Foram detectadas elevadas concentrações de IL-1 no leite materno e sua função também foi demonstrada em estudos *ex vivo* e *in vitro*. O antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA) compete com a citocina pró-inflamatória, limitando a inflamação. Aparentemente, no leite materno, os sistemas inflamatórios e anti-inflamatórios estão em equilíbrio, no entanto, dependendo da condição, esse sistema sofre um desequilíbrio para conseguir atender àquela necessidade (AREND, 2002).

O colostro é particularmente rico em IL-2, que auxilia no recrutamento de células T, necessárias na produção da resposta imune antígeno-específica do recém-nascido, que é notoriamente carente no recém-nascido (QUITADAMO; COMEGNA; CRISTALLI, 2021). O Colostro é também rico em IL-10, que possui sua concentração máxima nas primeiras 24 horas de vida do recém-nascido e tem potencial anti-inflamatório. Essa citocina tem sido fortemente associada com regulação da inflamação intestinal (DAWOD; MARSHALL, 2019). A IL-8, também presente em grandes concentrações no colostro, protege o recém-nascido de sepse e NEC. Em estudos *in vitro*, a exposição de células intestinais à IL-8 estimulou a proliferação e diferenciação das células intactas e estimulou a vitalidade das células com lesão, sugerindo que essa citocina tenha um papel no desenvolvimento fisiológico do intestino (MAHESHWARI *et al.*, 2002).

Os neonatos são deficientes na produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , porém, estas estão presentes no leite materno. O IFN- $\gamma$  está envolvido em vias de sinalização que aumentam a permeabilidade intestinal e melhora a ativação dos macrófagos no intestino (YU *et al.*, 2018). Já o TNF- $\alpha$  desempenha uma função de célula imune reguladora e contribui para a inflamação sistêmica (NOLAN; PARKS; GOOD, 2020).

Com elevadas concentrações no leite materno, o TGF- $\beta$  é uma citocina multifuncional expressa por grande parte das células (GILA-DIAZ *et al.*, 2019). Suas principais funções estão associadas à modulação da resposta imune, regulando a proliferação e diferenciação celular e diminuindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Devido a sua propriedade imunomoduladora, essa citocina auxilia na maturação da defesa intestinal por meio da indução de imunoglobulinas na glândula mamária e no trato gastrointestinal do recém-nascido, auxiliando no reparo da mucosa intestinal (BRADFORD *et al.*, 2017).

Pode-se perceber que a composição do leite é bastante complexa e que cada componente cumpre uma determinada função. Mas a composição do leite vai além dos nutrientes e compostos citados anteriormente e como exemplo temos a proteína sérica amiloide A (SAA), que também será abordada no presente trabalho.

## 2.5 PROTEÍNA SÉRICA AMILOIDE A

As SAAs são formadas por até 104 aminoácidos e estão relacionadas com a resposta de fase aguda, podendo aumentar sua concentração em até mil vezes em 24 horas, principalmente em situações como inflamação, trauma, infecção e até mesmo câncer (SACK JR, 2018). Em humanos, essas proteínas podem ser classificadas em SAA1, SAA2, SAA3 e SAA4, sendo a SAA1 e SAA2 ainda subdivididas em SAA1 $\alpha$ , SAA1 $\beta$ , SAA1 $\gamma$ , SAA2 $\alpha$  e SAA2 $\beta$  e suas estruturas e funções diferem entre si. Várias funções já foram descritas para a SAA, mas a função geral ainda não está clara. Viu-se que ela está relacionada à migração de leucócitos pela da indução de quimiocinas, quimioatração de monócitos (DE BUCK *et al.*, 2015), células dendríticas imaturas, neutrófilos e linfócitos T (GOUWY *et al.*, 2015). Além disso, também tem o potencial de induzir citocinas, macrófagos do tipo M2, tem um papel no transporte de colesterol, entre outros (BUCK *et al.*, 2016).

A SAA é expressa em diversos tecidos como fígado, cérebro, cólon, esôfago, coração, útero, adipócitos, entre outros. Ela encontra-se também altamente expressa em algumas

doenças, principalmente no câncer (URIELI-SHOVAL *et al.*, 1998). As concentrações séricas de SAA foram correlacionadas positivamente com a gordura corporal em humanos (ZHAO, Y. *et al.*, 2010). Além disso, um estudo sugeriu que a SAA faz parte da via de sinalização do lipopolissacarídeo (LPS), estando associada com inflamação, obesidade e resistência à insulina. A restrição de sono também foi um fator que estimulou a expressão de SAA, tanto em humanos quanto camundongos. Essa restrição de sono causou um aumento de LPS, que tem a capacidade de causar alterações morfológicas no tecido adiposo podendo promover a proliferação de pré-adipócitos e inflamação tecidual. Este estudo então sugere que concentrações aumentadas de SAA podem ser parte da sinalização que liga o sono insuficiente às suas comorbidades associadas como obesidade e DM2 (OLIVEIRA *et al.*, 2017). A presença de SAA em células placentárias, mais especificamente em trofoblastos do primeiro e terceiro trimestre de gestação, sugere que esta proteína possua uma função importante na progressão da gravidez, por meio da modulação da invasão trofoblástica, necessária nos estágios iniciais da gestação e também manutenção do equilíbrio entre citocinas anti e pró-inflamatórias, necessário para a manutenção da tolerância materno-fetal (SANDRI *et al.*, 2014).

Na mama, via-se apenas a expressão de SAA1, SAA2, SAA4 e não de SAA3, no entanto, Larson e colaboradores (2003) detectaram a expressão do gene *SAA3* humano por RT-PCR após a estimulação das células epiteliais da glândula mamária com o hormônio lactacional prolactina (PRL) ou pelo LPS estimulante de fase aguda (LARSON *et al.*, 2003).

No leite materno também já foi detectada a presença de SAA. Knee e colaboradores (2015) determinaram a concentração da proteína SAA3 no leite materno utilizando o método de imunoenensaio enzimático e relataram a presença da proteína em todas as amostras analisadas e também a diminuição da concentração com o passar do tempo, sendo o colostro o tipo de leite mais abundante em SAA (KNEE *et al.*, 2015). Já Sack e colaboradores (2018) viram a expressão da SAA1 no colostro humano, resultando na exposição do recém-nascido durante a gestação e concluíram que essa proteína pode estar envolvida com a fisiologia intestinal durante o período neonatal precoce (SACK *et al.*, 2018).

Adicionalmente, foi sugerido anteriormente por Filippin-Monteiro e colaboradores (2011) que o efeito da SAA na proliferação de uma linhagem de pré-adipócitos (3T3-L1) foi mediada pela via de sinalização ERK1/2, no entanto, não foi possível elucidar os papéis das vias PI3K e p38MAPK. Outro achado importante, foi a inibição de GLUT4 e a estimulação de

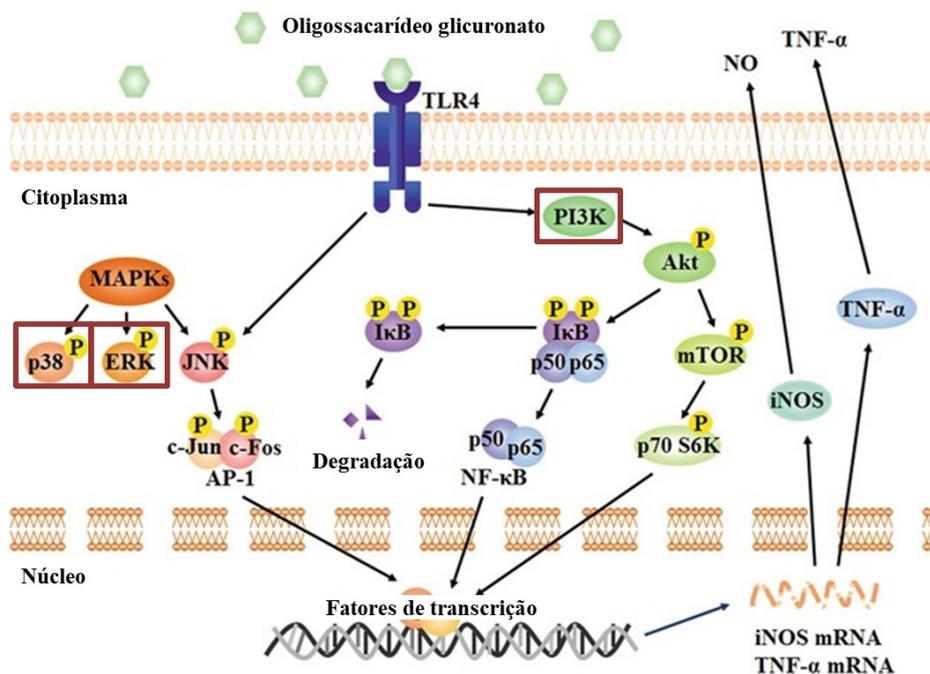
liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- $\alpha$ ) através do estímulo com SAA (FILIPPIN-MONTEIRO *et al.*, 2011).

### 2.5.1 Vias de sinalização da SAA

Sandri e colaboradores (2002) foram os primeiros a observar que a SAA induziu a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos via TLR4 (*toll-like receptor 4*) e sugeriram que a SAA atua como um ligante de TLR4 endógeno. Ademais, usando inibidores específicos, os autores também demonstraram que a produção de NO era dependente da ativação das vias da MAPKs, ERK1/2 e p38 (SANDRI *et al.*, 2008) (Figura 9).

Com um importante papel em diversos processos celulares, a família da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) possui alguns membros bem caracterizados como a quinase regulada por sinais extracelulares (ERK), p38MAPK e JNK-MAPK (KÖHLER, 2012). Já a via da fosfoinosítideo 3-quinase (PI3K) é importante na mediação da sobrevivência celular e transporte de glicose (PIXU LIU, HAILING CHENG, THOMAS M. ROBERTS, 2011).

Figura 9 – Vias de sinalização induzidas pelo TLR4.



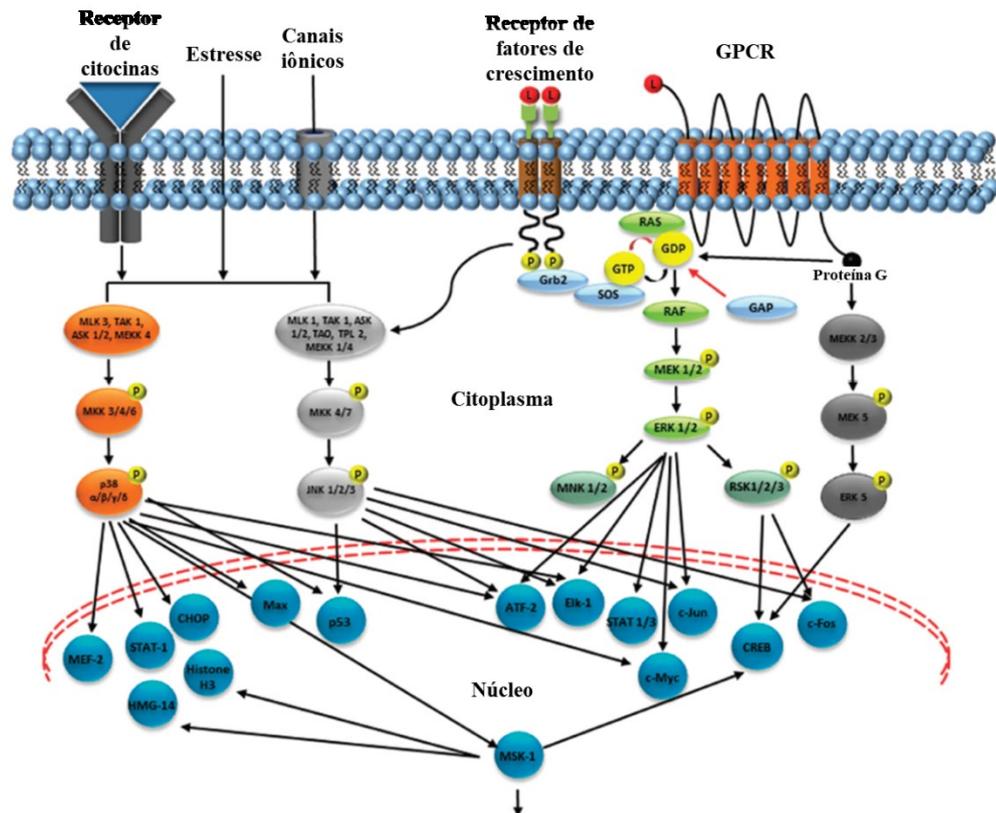
A sinalização de TLR4 acarreta na ativação de diversas vias de sinalização. Em destaque, as vias de interesse:

ERK1/2, p38MAPK e PI3K. Adaptado de Fang *et al.* (2017).

### 2.5.1.1 ERK1/2

A cascata das quinases reguladas por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2) é uma via de sinalização que participa da regulação de vários processos celulares como proliferação, diferenciação, sobrevivência, apoptose e resposta ao estresse (WORTZEL; SEGER, 2011). A ativação dessa cascata ocorre principalmente por meio de receptores de membrana como os de tirosina quinase, integrinas e canais iônicos (MARMOR; SKARIA; YARDEN, 2004). A partir do sinal emitido pelos receptores, ocorre o recrutamento de proteínas adaptadoras como a GRB2 e fatores de troca de nucleotídeos como o SOS, que, por sua vez, induzem a ativação de Ras na membrana plasmática da célula ou na membrana de organelas celulares. O Ras ativado transmite um sinal que ativa as proteínas quinases Rafs dessa cascata (WELLBROCK; KARASARIDES; MARAIS, 2004). Após a ativação, as Rafs transmitem seu sinal fosforilando MEK1/2, que ativam então seus substratos ERK1/2, que são seus únicos alvos, sugerindo que MEK1/2 serve como componente determinante na ativação da cascata ERK1/2 (Figura 10) (WORTZEL; SEGER, 2011).

Figura 10 – Via da MAPK/Erk.



Diferenciação celular, proliferação, progressão do ciclo celular, apoptose, sobrevivência, expressão de genes, migração, motilidade, invasão, metástase e interação da matriz celular

Visão geral da ativação das MAPKs com ênfase na via da ERK 1/2. Fonte: Adaptado de Mandal *et al.* (2015).

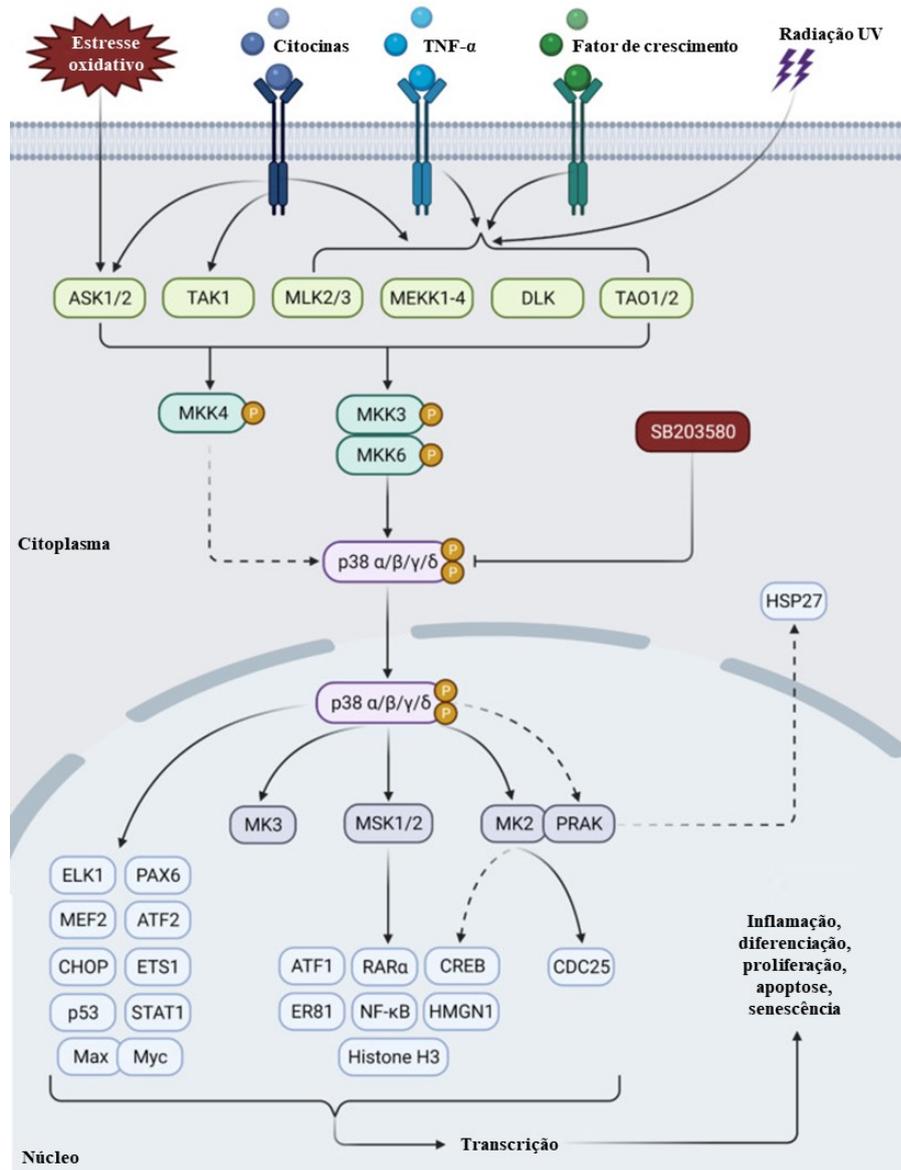
### 2.5.1.2 *p38* MAPK

A via *p38* também faz parte da via de sinalização de MAPK e ela atua no controle da apoptose e na liberação de citocinas por macrófagos e neutrófilos (MITTELSTADT *et al.*, 2005). Esta via pode ser ativada por diferentes receptores ou por estresse ambiental como radiação, dano ao DNA, estresse oxidativo, entre outros. Esses receptores ativam MAPKs específicas como MLK2/3, MEKKs, ASK1/2 e TAO1/2/3. Essas quinases enviam sinais que ativam quinases secundárias como MKK6 e MKK3, que por sua vez ativam *p38*. Uma vez ativado, o *p38* transmite sinais para moléculas reguladoras de fosforilação, fatores de transcrição entre outros (Figura 11) (CUENDA; ROUSSEAU, 2007).

A via da *p38* MAPK possui diferentes funções já bem elucidadas como controlar a progressão e diferenciação de mioblastos por meio da atividade do fator de transcrição, remodelação da cromatina e desenvolvimento de mRNAs que codificam reguladores da

diferenciação celular. Ela também atua na migração celular, inflamação pela ativação de citocinas pró-inflamatórias, apoptose e proliferação celular (CUADRADO; NEBREDA, 2010).

Figura 11 – Ativação da via p38 MAPK.

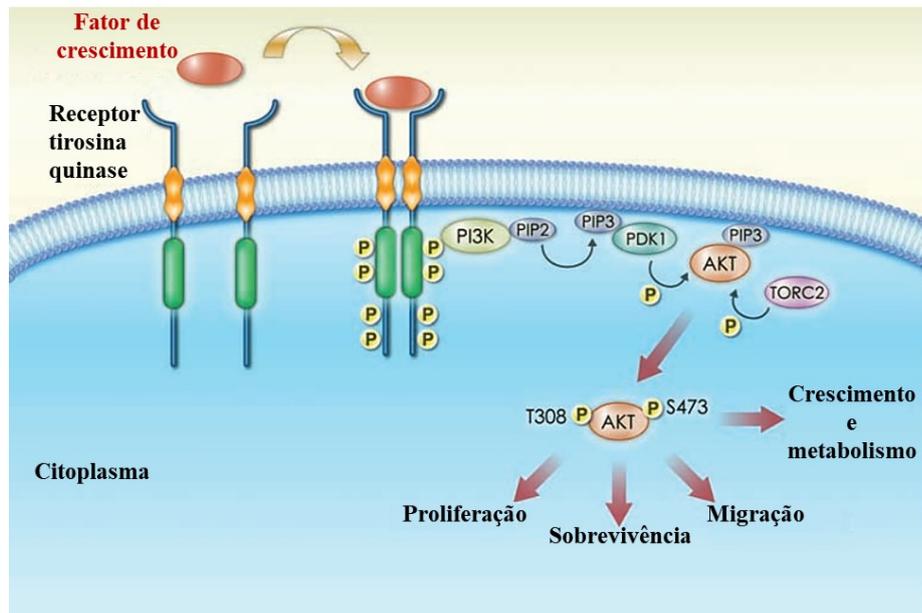


As p38 MAPKs fazem parte da família MAPK e são ativadas principalmente por estresse ambiental e citocinas inflamatórias. O primeiro componente da cascata é uma MAPKKK, que fosforila e ativa MKK3/6 e, posteriormente, a p38 MAPK, que está envolvida na regulação de várias moléculas e fatores de transcrição. Fonte: Adaptado de JIA *et al.* (2022).

### 2.5.1.3 PI3K/Akt

Também conhecida como proteína quinase B, a Akt possui um papel crítico na regulação de diversas funções celulares como metabolismo, crescimento, proliferação, sobrevivência, transcrição e síntese de proteínas (LIU *et al*, 2011). A cascata de sinalização da Akt pode ser ativada por receptores tirosina quinase, integrinas, receptores de citocinas, de linfócitos B e T, receptores acoplados à proteína G entre outros estímulos que induzem a produção de PIP3 (fosfatilinositol (3,4,5) trifosfatos) por meio da PI3K (fosfoinositida 3-quinase). Essa produção ativa PDK1 na membrana celular, que fosforila Akt, levando a sua ativação e, conseqüentemente, a sua atividade enzimática (Figura 12) (HERS; VINCENT; TAVARÉ, 2011).

Figura 12 – Sinalização da via PI3K/Akt.



Esquema da via de sinalização PI3K/AKT. Receptores de tirosina quinase, integrinas, receptores de citocinas entre outros recrutam PI3K após ativação e fosforilação e induzindo a produção de PIP3, que ativa AKT e ativando assim toda a via e regulando o crescimento celular. Fonte: Adaptado de SELLERS *et al*. (2008).

## 2.6 JUSTIFICATIVA

Há ainda muitas lacunas a respeito dos constituintes do leite materno e suas funções, principalmente em humanos, visto a dificuldade de coleta de materiais biológicos das mães, por

estarem extremamente sensibilizadas e também por questões éticas e legais. Também há dificuldade em compreender quais fatores levam a intercorrências durante a amamentação como a baixa produção do leite. Além disso, formas de reverter essas intercorrências e promover um aleitamento bem-sucedido ainda é um assunto que precisa ser pesquisado. Considerando isso, se faz necessário um avanço crítico no estudo do leite materno humano como um sistema biológico que envolve fatores como a fisiologia materna e também a dieta, o ambiente e infecções, bem como as influências do leite no recém-nascido em desenvolvimento. A falta de compreensão desse sistema biológico contribui para a falta de políticas que incentivem a amamentação exclusiva, pois as incertezas acerca da composição do leite e das funções dos seus componentes resultam no não reconhecimento da importância da biologia desse sistema no contexto da síntese do leite, da duração e da amamentação exclusiva. As atuais abordagens para analisar os componentes do leite são insuficientes para compreender a sua contribuição na saúde materno-infantil, portanto se faz necessário abordagens que possam melhorar as estratégias e intervenções que apoiem a lactação, amamentação e práticas de alimentação infantil, principalmente para mulheres e recém-nascidos que vivem em ambientes subnutridos e insalubres. Portanto, estudos que envolvem esses mecanismos e possíveis tratamentos para melhorar a produção de leite materno devem ser realizados a fim de auxiliar o aleitamento materno e compreensão das suas vias associadas à produção de leite materno. Neste trabalho, buscou-se evidenciar fatores externos que afetam a composição do leite e a amamentação, bem como a função da SAA na mama, uma vez que esta foi detectada tanto na mama quanto no leite materno. Até onde se sabe, esse é o primeiro trabalho que busca estudar a função desta proteína na mama. O presente estudo também visou estudar a metformina como um possível fármaco capaz de aumentar a síntese do leite em mães com produção insuficiente. Com o intuito de obter uma abordagem mais completa do tema composição do leite materno e amamentação neste trabalho optou-se por avaliar o leite empregando-se um estudo clínico e a mama por meio de estudo *in vitro* e *in silico*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a composição do leite materno e a função da SAA na mama, bem como avaliar o efeito da metformina na lactogênese, a fim de elucidar possíveis fatores associados a diminuição precoce da lactogênese e aumentar a duração do aleitamento materno.

##### 3.1.1 Objetivos Específicos

Estudo clínico

- Determinar o perfil inflamatório sérico e estado nutricional de mães entre 24-48h após o parto atendidas em hospital terciário de referência;
- Determinar o estado do aleitamento materno por meio de acompanhamento remoto durante os seis primeiros meses pós-parto;
- Determinar a concentração de macromoléculas do leite materno das amostras coletadas;
- Determinar o perfil de marcadores inflamatórios e componentes do leite materno bem como a sua relação com o estado nutricional da mãe, características clínicas maternas e do recém-nascido e o desfecho da amamentação;

Estudo *in vitro*

- Avaliar o efeito do SAA sobre a proliferação de células mamárias;
- Investigar em qual via de sinalização a SAA atua em células mamárias;
- Avaliar a expressão de citocinas em células mamárias após estímulo com SAA e/ou metformina;
- Avaliar a capacidade de captação de glicose de células mamárias a partir de estímulo com SAA e/ou metformina;
- Identificar alterações morfológicas nas células mamárias após estímulo com SAA e/ou metformina;

Estudo *in silico*

- Investigar o potencial galactagogo da metformina na mama;
- Avaliar a expressão de transportadores de metformina na glândula mamária;
- Elencar as possíveis mutações do principal transportador de metformina da mama;
- Determinar a interação entre metformina e seu transportador na glândula mamária;
- Determinar a interação entre metformina e a proteína AMPK.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ESTUDO CLÍNICO

#### 4.1.1 Casuística e aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU – UFSC/EBSERH) e pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CAAE 68008317.4.0000.0121) (ANEXO A). As participantes foram recrutadas em até 48h após o parto. Para participar, as voluntárias aceitaram todos os procedimentos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram incluídas no estudo mães internadas no Alojamento Conjunto que aceitassem participar do estudo. Foram excluídas do estudo mães portadoras do vírus HIV (vírus da imunodeficiência humana) 1-2 e HTLV (vírus linfotrófico da célula humana) 1-2 ou que apresentavam qualquer outro impedimento clínico descrito pela equipe médica para amamentação. A avaliação do estado nutricional da gestante foi realizada conforme a idade gestacional, utilizando a tabela desenvolvida por Atalah e colaboradores em 1997 (APÊNDICE A). A partir disso, as mães foram divididas em quatro grupos de estado nutricional: baixo peso, peso adequado, sobrepeso e obesidade.

Em questionário (ANEXO B) previamente montado e também aplicado pela equipe do projeto, foram coletadas as seguintes informações:

- Peso pré-gestacional referido;
- Peso atual;
- Altura;
- Aspectos socioeconômicos (nível escolar e ocupação);
- Tipo de parto;
- Número de filhos;
- Amamentações anteriores (se houver);
- Peso do RN;
- Complicações na gravidez.

Algumas das respostas, como o peso atual, altura, tipo de parto, peso do RN e complicações na gravidez foram retiradas dos prontuários das participantes e dos RN.

Além disso, as participantes foram acompanhadas mensalmente por até seis meses e foram orientadas a comparecer às visitas mensais ao pediatra de escolha (rede privada ou Unidade Básica de Saúde) e receberam informações sobre a importância da amamentação. Informações sobre o estado de amamentação foram coletadas e definidas da seguinte forma:

- Amamentação exclusiva - o recém-nascido recebe apenas leite materno e não são dados outros líquidos ou sólidos, nem mesmo água, exceto solução de reidratação oral, ou gotas/xaropes de vitaminas, minerais ou medicamentos;

- Aleitamento misto - os recém-nascidos recebem leite materno e/ou qualquer alimentos ou líquidos, incluindo leite não humano e fórmula (WHO, UNICEF, USAID, 2010).

#### **4.1.2 Determinação de marcadores em amostras séricas**

##### *4.1.2.1 Coleta das amostras de soro*

O sangue periférico foi coletado por punção venosa entre 24-48h após o parto. As amostras de sangue foram coletadas em tubos à vácuo de 8 mL, centrifugados a 700 g por 15 minutos e o soro obtido foi transferido para tubos do tipo *eppendorfs*. As amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento das análises.

##### *4.1.2.2 Determinação de parâmetros bioquímicos*

Com o intuito de caracterizar metabolicamente as participantes a partir da coleta das amostras de soro materno, os parâmetros bioquímicos colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, VLDL-colesterol, triglicerídeos, glicose e ácido úrico foram determinados através de método colorimétrico (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) utilizando-se o equipamento BS-120 (Mindray Medical International Co., Shenzhen, China). Adicionalmente, os hormônios prolactina e progesterona também foram determinados nas amostras de soro por meio do equipamento automatizado Advia Centaur XP Immunoassay. O método de quimioluminescência por micropartículas foi utilizado para as determinações hormonais. Os conjuntos diagnóstico Advia Centaur PRL e Advia Centaur PRGE (Siemens Healthcare, Amadora, Portugal) foram utilizados para as dosagens de prolactina e progesterona,

respectivamente. Os resultados do ensaio foram expressos em mg/dL para as dosagens bioquímicas e em ng/mL para as dosagens hormonais.

#### *4.1.2.3 Determinação de IL-6 e MCP-1*

As concentrações de IL-6 e MCP-1 foram determinadas através de ensaio imunoenzimático de acordo com as instruções do fabricante (Kit DuoSet; Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). A sensibilidade do ensaio foi de 2,2 pg/mL para IL-6 e de 1,0 pg/mL para MCP-1.

Para a análise dos dados, uma curva padrão foi criada traçando a absorbância média para cada padrão no eixo y com a concentração no eixo x e desenhando uma curva de melhor ajuste através de oito pontos no gráfico. Por meio da equação da reta, foi possível calcular a concentração de cada amostra. Os resultados do ensaio foram expressos em pg/mL.

### **4.1.3 Determinação de marcadores em amostras de colostro**

#### *4.1.3.1 Coleta das amostras de colostro*

Para a coleta do leite materno (colostro), aproximadamente 2 mL de amostra foi solicitado e obtido por ordenha manual, procedimento usual recomendado e facilitado pelos profissionais do Central do Incentivo ao Aleitamento Materno (CIAM) entre 24-48h após o parto. As amostras foram coletadas em copos coletores, posteriormente transferidas para *ependorfs* e armazenadas a -80 °C até o momento das análises.

#### *4.1.3.2 Determinação de SAA, leptina, PCR, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-8, IL-6, MCP-1, IL-10 e IFN- $\gamma$*

Previamente às análises, as amostras de colostro foram centrifugadas a 11.200 g por 30 minutos a 4 °C, dessa forma, foi possível retirar a gordura do leite, etapa sugerida pelo fabricante com o intuito de eliminar possíveis interferentes. As concentrações de SAA, leptina, PCR, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8, IL-6, MCP-1, IL-10 e IFN- $\gamma$  foram determinados nas amostras de colostro através de ensaio imunoenzimático de acordo com as instruções do fabricante (Kit DuoSet; Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). A sensibilidade do ensaio foi de

0,41ng/mL para SAA, 1,0 ng/mL para Leptina, 0,8 pg/mL para PCR, 1,0 pg/mL para IL-1 $\beta$ , 6,23 pg/mL para TNF- $\alpha$ , 7,5 ng/mL para IL-8, 2,2 pg/mL para IL-6, 1,0 pg/mL para MCP-1, 0,4 pg/mL para IL-10 e 0,173 pg/mL para IFN- $\gamma$ .

Para a análise dos dados, uma curva padrão foi criada traçando a absorbância média para cada padrão no eixo y e com a concentração no eixo x e desenhando uma curva de melhor ajuste através de oito pontos no gráfico. Por meio da equação da reta, foi possível calcular a concentração de cada amostra. Posteriormente, todos os resultados foram normalizados usando a concentração de proteína total. Os resultados do ensaio foram expressos em pg/mL ou ng/mL.

#### *4.1.3.3 Determinação de proteína total*

Para a determinação de proteínas no colostro através de método colorimétrico, primeiramente foi preparada a curva de calibração utilizando-se o padrão de albumina (Thermo Scientific Pierce™ BCA Protein Assay Kit, MA, EUA) e o reagente de trabalho (mistura 1:50 do reagente B com o reagente A) fornecidos no conjunto diagnóstico. Para a análise, foram utilizadas placas de 96 poços, onde foram adicionados 25  $\mu$ L de cada ponto da curva e das amostras, posteriormente, adicionou-se 200  $\mu$ L do reagente de trabalho já previamente preparado e homogeneizado em agitador por 30 segundos. Posteriormente, a placa foi incubada a 37 °C durante 30 minutos e a absorbância foi lida utilizando-se leitor de microplacas em comprimento de onda de 562 nm. Os dados foram analisados a partir da interpolação das amostras com a curva padrão. Os resultados do ensaio foram expressos em mg/mL.

#### *4.1.3.4 Determinação de ácido graxo*

Para a dosagem quantitativa de ácidos graxos nas amostras de colostro, foi utilizado o método colorimétrico enzimático empregando-se o conjunto diagnóstico NEFA-HR(2) (Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss, Germany). Os reagentes foram previamente preparados pela mistura do solvente de cor A com o solvente A e do solvente de cor B com o solvente B, resultando nos reagentes R1 e R2, respectivamente. Para os ensaios, foi utilizada uma placa de 96 poços onde, primeiramente, foram pipetadas a curva de calibração e as amostras misturadas com os reagentes R1 e R2, de acordo com as proporções e instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada após 7,5 minutos de incubação utilizando-se um leitor de

microplaca em comprimento de onda de 546 nm. Os dados foram analisados a partir da interpolação das amostras com a curva padrão. Os resultados do ensaio foram expressos em mmol/L.

#### 4.1.3.5 Determinação de quilocalorias (Kcal) e porcentagem de gordura

Amostras de colostro foram aquecidas em banho-maria a 40 °C por 15 minutos e agitadas em vórtex. As amostras aquecidas foram colocadas em capilares, vedadas e centrifugadas por 15 minutos. Após a separação do creme e do soro, o teor de gordura e Kcal foram determinados pelo método proposto por Fujimori e colaboradores (FUJIMORI *et al.*, 2015):

$$\text{Teor de gordura} = \% \text{creme} - 0,59/1,46 \quad (1)$$

$$\text{Kcal/L} = (68,8 \times \% \text{creme}) + 290 \quad (2)$$

onde a  $\% \text{creme} = \text{coluna de creme (mm)} \times 100$

Os resultados do ensaio foram expressos em Kcal ou porcentagem.

#### 4.1.4 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A simetria dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis não paramétricas (análises das amostras de soro e leite materno) foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney U e os resultados foram expressos em mediana e menor e maior valor encontrado. O teste Qui-quadrado foi utilizado para associação dos resultados da amamentação com o estado nutricional. A regressão logística foi realizada para avaliar a associação entre IL-6 e o estado da amamentação após os seis meses de acompanhamento das participantes. Todas as correlações apresentadas foram avaliadas usando-se o coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ). O nível de significância foi estabelecido em  $P \leq 0,05$  para todas as análises.

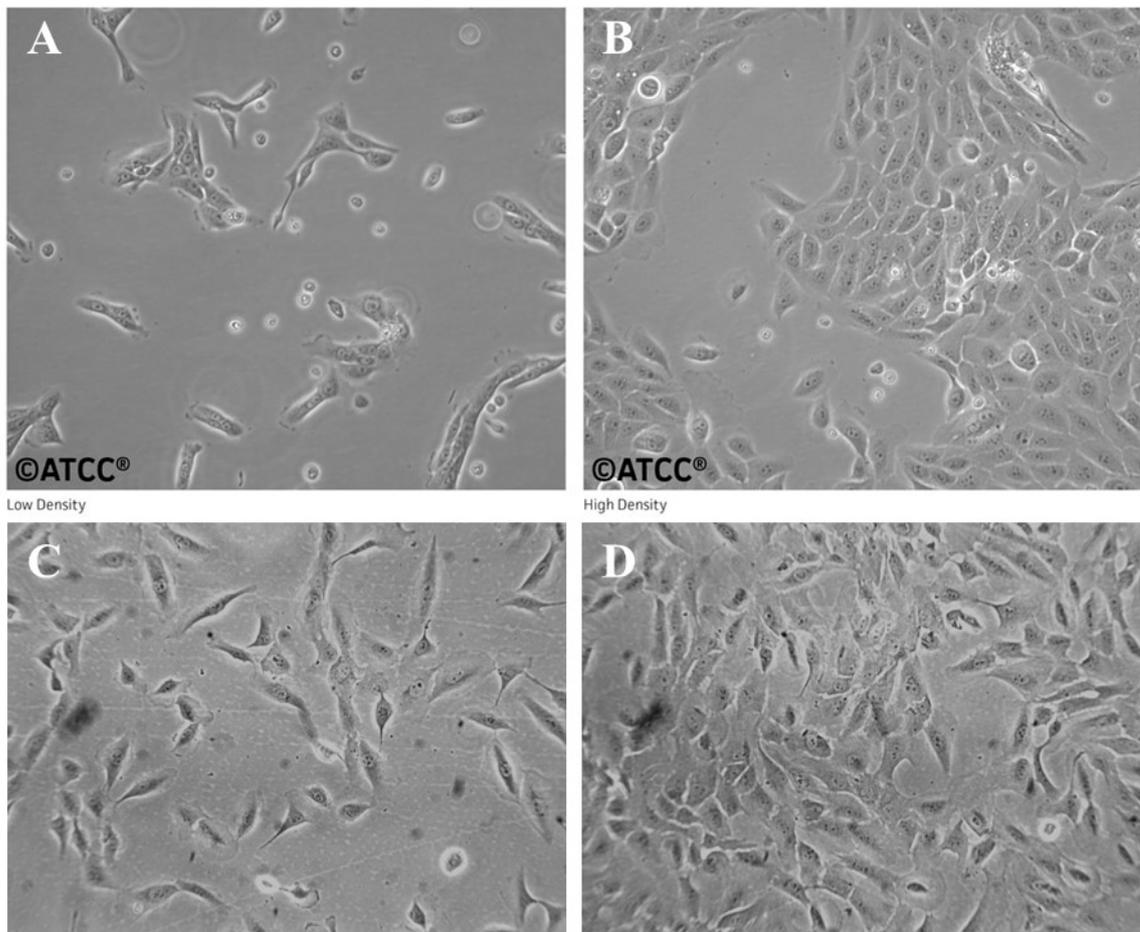
## 4.2 ESTUDO *IN VITRO*

### 4.2.1 Cultura celular

Para este estudo, foi utilizada a linhagem celular de mama humana MCF-10A (CRL10317, ATCC). A MCF-10A é uma linhagem de células epiteliais não-tumorigênica que foi isolada em 1984 da glândula mamária de uma mulher branca de 36 anos com mamas fibrocísticas (Figura 13).

Figura 13 – Linhagem celular MCF-10A.

ATCC Number: **CRL-10317**  
Designation: **MCF-10A**



Linhagem celular de mama humana MCF-10A cultivada em Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM)/mistura de Nutrientes de Ham F12 (1:1). Aumento de 10x. (A) baixa densidade celular, foto retirada da ATCC®; (B) alta densidade celular, foto retirada da ATCC®; (C) baixa densidade celular, foto retirada pela autora; (D) alta densidade celular, foto retirada pela autora. Fonte: (A) e (B): ATCC®; (C) e (D): a autora

A linhagem celular de mama humana MCF-10A foi cultivada em garrafas plásticas para cultura celular, contendo meio de *Eagle* Modificado por Dulbecco (DMEM)/mistura de Nutrientes de Ham F12 (1:1) acrescido de 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 10 mM de HEPES e suplementado com 2,5 mM de L-glutamina, 5% de soro de cavalo, 10 µg/mL de insulina humana, 0,5 µg/mL de hidrocortisona e 10 ng/mL de EGF. As células foram mantidas em estufa umidificada a 37 °C, em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

#### 4.2.2 Viabilidade celular

O ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio] foi utilizado para avaliar a viabilidade celular em resposta aos inibidores farmacológicos específicos de ERK1/2 (PD98059), p38MAPK (SB203580) e PI3K (wortmannin) e em resposta ao tratamento com o fármaco metformina. Para avaliar a citotoxicidade desses inibidores e da metformina para a linhagem celular de mama humana MCF-10A, as células foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^3$  células por poço em placas de 96 poços. Após 48 h do plaqueamento, o meio de cultura foi trocado e, após 96 h do plaqueamento, o meio de cultura foi trocado por meio de cultura com privação de soro, a 0,5, 5 e 10% de soro de cavalo. Após 144 h do plaqueamento, as células foram tratadas com os inibidores nas seguintes concentrações:

PD98059: 50 µM

SB203580: 10 µM

Wortmannin: 100 nM

E, para a metformina, nas seguintes concentrações: 1, 2, 4, 8, 16 e 32 mM.

Células incubadas apenas com meio de cultura foram utilizadas como controle. Após o período de 48 h de tratamento com os inibidores ou com a metformina, o meio de cultura dos poços foi substituído por uma solução de MTT com meio de cultura (0,5 mg/mL) por 2 h, retirado e adicionado 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolução dos cristais. Para determinar a concentração de MTT reduzido a formazan pelas desidrogenases mitocondriais das células viáveis, a absorbância foi medida em espectrofotômetro Perkin-Elmer LS55 (Boston, Massachusetts, EUA) em comprimento de onda de 540 nm. Este experimento foi realizado em triplicata em três dias consecutivos. Os resultados do ensaio foram expressos em porcentagem de células viáveis.

### 4.2.3 Proliferação celular

Para o ensaio de proliferação celular, foram utilizados os mesmos inibidores farmacológicos específicos de ERK1/2 (PD98059), p38MAPK (SB203580) e PI3K (wortmannin). Para isso, as células MCF-10A foram plaqueadas na concentração de  $3 \times 10^4$  células por poço em placas de 24 poços. Após 48h do plaqueamento, o meio de cultura foi trocado e, após 96 h do plaqueamento, o meio de cultura foi trocado por meio de cultura com privação de soro (0,5% de soro de cavalo). Após 144 h do plaqueamento, as células foram pré-tratadas com os inibidores isoladamente nas concentrações de 50  $\mu$ M (PD98059), 10  $\mu$ M (SB203580) e 100 nM (wortmannin) ou em associação com 5  $\mu$ g/mL de rSAA. Após 48h de tratamento, as células foram tripsinizadas e a tripsina foi inativada utilizando meio de cultura. A proliferação celular foi avaliada pela contagem de células utilizando-se a câmara de Neubauer e corante Trypan blue. Para isso, foi feita a média do número de células contabilizadas nos quatro quadrantes da câmara, multiplicado pelo fator de diluição das células e então multiplicado pelo fator de correção da câmara. Este experimento foi realizado em triplicata em três dias consecutivos. Os resultados do ensaio foram expressos em número de células/mL.

### 4.2.4 Ensaio clonogênico

As células previamente tratadas com 5  $\mu$ g/mL de rSAA, 50  $\mu$ M de PD98059, 10  $\mu$ M de SB203580 e/ou 100 nM de Wortmannin foram semeadas em placas de 6 poços em uma densidade de 500 células/poço. As células foram mantidas em cultura por mais sete dias a 37 °C em uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, e o meio de cultura foi trocado a cada 48 h. Após o 7º dia, quando as células já haviam formado colônias suficientemente grandes, o meio foi removido dos poços e as células foram lavadas cuidadosamente com tampão fosfato-salino (PBS) 1X. Posteriormente, o PBS foi removido e as células foram fixadas com glutaraldeído 6% (v/v). Após a fixação das células, foi adicionada uma solução de cristal violeta 0,5% (p/v) em cada poço durante 30 minutos para corar as colônias. Após a incubação, o corante foi removido cuidadosamente e os poços foram lavados com água e secados ao ar à temperatura ambiente (21 °C). Após secagem total dos poços, foram obtidas imagens digitais das colônias utilizando-se uma câmera. A área das colônias foi analisada utilizando-se o software ImageJ (V1.51p) e o plugin ColonyArea (BOURNE, 2010). Este experimento foi realizado em

triplicata em três dias consecutivos. Os resultados do ensaio foram expressos em escala de intensidade e porcentagem de área ocupada pelas colônias.

#### **4.2.5 Determinação das concentrações de IL-6, MCP-1, IFN- $\gamma$ e SAA em sobrenadante celular**

As amostras do sobrenadante celular foram coletadas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  antes da determinação da concentração dos marcadores por ELISA. As concentrações de IL-6, MCP-1, IFN- $\gamma$  e SAA foram determinadas por ELISA, de acordo com as instruções do fabricante BD OptEIA™ (Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) para as análises de IL-6, MCP-1 e IFN- $\gamma$ , e Invitrogen™ (Camarillo, California, EUA) para a análise de SAA. A metodologia para determinação das citocinas por ELISA foi semelhante à realizada anteriormente utilizando amostras de colostro (item 3.4.2), desconsiderando apenas a etapa inicial de extração de gordura no leite. Além disso, o conjunto diagnóstico da SAA já possuía as placas sensibilizadas com anticorpos, sendo assim, não foi necessária a etapa prévia de sensibilização da placa. A sensibilidade do ensaio foi de 2,2 pg/mL para IL-6, 1,0 pg/mL para MCP-1, 0,173 pg/mL para IFN- $\gamma$  e 4 ng/mL para SAA. Os resultados do ensaio de ELISA foram expressos em pg/mL ou ng/mL.

#### **4.2.6 Ensaio de captação de glicose**

Primeiramente, as células MCF-10A foram plaqueadas na concentração de  $5 \times 10^3$  células por poço em placas de 96 poços. Após 48 h do plaqueamento, o meio de cultura foi trocado e, após 96 h, as células foram mantidas em privação de soro em meio de cultura a 0,5% de soro de cavalo. Após 144 h do plaqueamento, as células foram tratadas com 5  $\mu\text{g/mL}$  de rSAA e/ou 8 mM de metformina e um controle sem tratamento também foi mantido. Após 48h do tratamento, o meio de cultura foi removido e todos os poços foram lavados com PBS 1X. Os poços então foram acrescidos de 100  $\mu\text{L}$  de Krebs Ringer (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1,3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) com  $^{14}\text{C}$ -DG (0,1  $\mu\text{Ci/mL}$ ) e incubados durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após incubação, todo o líquido foi retirado e todos os poços foram novamente lavados com PBS 1X para tirar o excesso de radioativo. Foi então adicionado 200  $\mu\text{L}$  de NaOH 0,5M para lise celular e destes, foram utilizados 25  $\mu\text{L}$  e

dissolvidos em 1 mL de líquido de cintilação. Os restantes das amostras foram utilizados para determinação de proteína pelo método de Lowry. As amostras foram mantidas em geladeira até o momento da leitura, realizada em cintilador Tri-Carb® 2800TR LSA (Perkin Elmer, EUA). Os resultados do ensaio de captação foram expressos em nmol de glicose/mg de proteína.

#### 4.2.7 Dosagem de proteína pelo método de Lowry

A dosagem de proteínas das amostras utilizadas para o ensaio de captação de glicose foi realizada utilizando-se o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Primeiramente, foram preparadas as soluções de carbonato de cálcio 4%, hidróxido de sódio 0,2 M, sulfato de cobre 1%, tartarato de sódio e potássio 2% e solução padrão de albumina bovina 1 mg/mL. Após, foi feita a diluição da solução padrão de albumina para preparar a curva de calibração do teste. Foi pipetado 20 µL de cada ponto da curva e das amostras em placa de 96 poços. Posteriormente, foi preparada a solução Cupro Alcalina, através da diluição das soluções preparadas anteriormente. Foram adicionados 160 µL da solução Cupro em cada poço e a placa foi incubada durante 10 min. Após, foi adicionado 16 µL do reativo de Folin Ciocalteau 1:4 em cada poço e a placa foi novamente incubada durante 30 min. Ao final, foi feita a leitura da absorvância em 725 nm e o cálculo da concentração de proteínas foi realizado.

#### 4.2.8 Microscopia eletrônica de transmissão

Primeiramente, as células MCF-10A foram plaqueadas na concentração de  $3 \times 10^4$  células por poço em placas de 24 poços. Após 48 h do plaqueamento, o meio de cultura foi trocado e, após 96 h, as células foram mantidas em meio de cultura com privação de soro (0,5% de soro de cavalo). Após 144 h do plaqueamento, as células foram tratadas com 5 µg/mL de rSAA e/ou 8 mM de metformina.

Após 48 h de incubação com os tratamentos, as células foram tripsinizadas, transferidas para *ependorfs* e centrifugadas para retirar todo o meio de cultura e os tratamentos. Após, foram fixadas utilizando-se solução fixadora de paraformaldeído 4%, glutaraldeído 3% e cacodilato de sódio 0,1 M. Após 24 h em solução fixadora, as células foram lavadas três vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e então fixadas com tetróxido de ósmio 1% durante 2 h. As células foram então novamente lavadas três vezes com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e

posteriormente desidratadas com concentrações crescentes de álcool. Após a etapa de desidratação, iniciou-se o processo de infiltração, com concentrações crescentes de resina SPURR<sup>®</sup>. Depois da última etapa de infiltração, a resina contendo o *pellet* de células foi polimerizada a 70 °C durante 48 h. Após, foram feitos cortes ultrafinos contendo as células e colocados sobre o *grid*, contrastados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo para ser então realizada a visualização da morfologia e organelas celulares em microscópio eletrônico de transmissão 100 kV (JEM 1011, JEOL, EUA).

#### 4.2.9 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A simetria dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos (experimentos *in vitro*) foram expressos em média ± desvio padrão e as diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni quando três ou mais variáveis e teste t de Student quando comparadas duas variáveis. O nível de significância foi estabelecido em  $P \leq 0,05$  para todas as análises.

### 4.3 ESTUDO *IN SILICO*

#### 4.3.1 Análise do transportador de metformina

Primeiramente, foi realizada uma revisão na literatura em que se detectou que o uso da metformina durante a gestação é seguro e compatível com a amamentação (AMAEFULE *et al.*, 2020) e que poucos estudos analisaram o papel deste fármaco como galactagogo. No entanto, a partir da análise de Nommsen-Rivers e colaboradores, sugere-se que ela seja promissora (NOMMSEN-RIVERS *et al.*, 2019).

Sendo assim, para determinar o papel da metformina na mama como um possível galactagogo, primeiramente, foi avaliada a presença no tecido mamário de genes específicos que codificam os transportadores da metformina. Para isso, inicialmente, foi utilizada a base de dados de transcriptoma GTEx (*genotype-tissue expression*) (<https://gtexportal.org/home>), em que se avaliou cada um dos genes e sua expressão na mama, assim, foram selecionados os genes

mais expressos. Esses genes foram também pesquisados na base de dados *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>), onde foi possível fazer uma análise do transcriptoma e proteoma em diferentes tecidos para cada gene, permitindo a caracterização de cada um deles no tecido mamário.

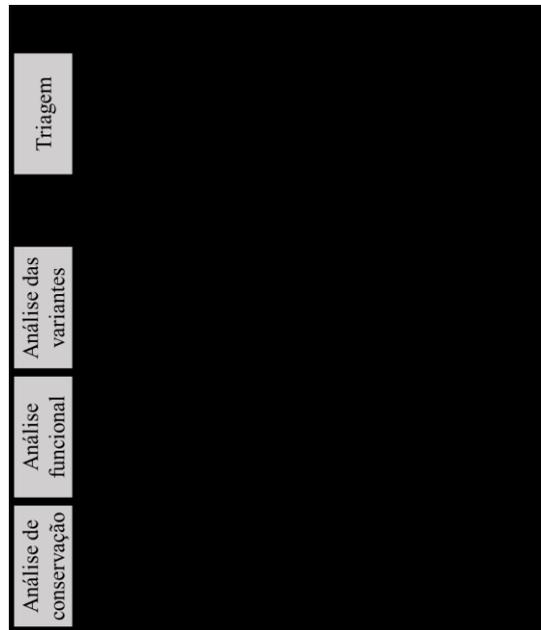
Ao final das análises, o gene que apresentou maior expressão de proteína no tecido mamário foi analisado na base de dados genômica dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), com o intuito de verificar variantes desse gene, avaliando-se a distribuição populacional (frequência alélica). Dentre as diversas variantes analisadas, as mutações do tipo *missense* foram submetidas a análise a partir de algoritmos preditivos PredictSNP (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp/>) (Figura 14). Por último, para avaliar os efeitos estruturais dessas mutações, foi utilizada a plataforma HOPE (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>) (Tabela 2).

Tabela 2 – Bases de dados, funções e características.

Base de dados	Função	Característica
GTEX	Avaliar correlações entre o genótipo e os níveis de expressão de genes em tecidos específicos	Possui um total de 17.382 amostras de diversos tecidos
<i>The Human Protein Atlas</i>	Mapeamento de todas as proteínas humanas em células, tecidos e órgãos	Análise de proteoma em 17.268 proteínas
dbSNP	Banco de dados de domínio público para pesquisa polimorfismos genéticos	Pode ser utilizado para mapeamento físico, análise funcional, farmacogenômica, estudos de associação e estudos evolutivos
PredictSNP	Previsão de mutações relacionadas à doença	Contém mais de 43.000 mutações
HOPE	Análise de efeitos estruturais e funcionais de mutações	Constrói um relatório com texto, figuras e animações, tornando-o mais intuitivo

Fonte: plataformas GTEx, *The Human Protein Atlas*, dbSNP, PredictSNP e HOPE

Figura 14 – Fluxograma da metodologia computacional utilizada.



Fonte: a autora

### 4.3.2 Escolha da proteína

A escolha da proteína quinase ativada por 5'-AMP (adenosina monofosfato) utilizada para os estudos de *docking* e dinâmica molecular foi realizada a partir do estudo do mecanismo de ação da metformina. Sendo assim, primeiramente utilizou-se a plataforma Signor 3.0 (<https://signor.uniroma2.it/>) para identificar possíveis alvos da metformina em humanos, buscando como entidade “*metformin*” e aplicando o filtro “*Homo sapiens*”. Signor 3.0 é um repositório público de relações causais anotadas manualmente entre proteínas humanas, produtos químicos de relevância biológica, estímulos e fenótipos (SURDO *et al.*, 2023). Estudos apontam para um papel regulador da metformina que pode atuar na modulação positiva do gene *PRKAA2*, que codifica a subunidade catalítica alfa-2 da proteína quinase ativada por 5'-AMP (ZHOU, G. *et al.*, 2001). O transportador OCT3 (*Solute carrier family 22 member 3*, sinônimo *Organic Cation Transporter-3*) utilizado para o estudo de *docking* molecular foi selecionado da maneira descrita anteriormente no item 3.4.1.

A realização das simulações computacionais depende da utilização da estrutura 3D da proteína de interesse. Para tanto, buscou-se a proteína codificada de acordo com o gene selecionado e também um identificador que cumprisse os critérios de seleção que incluíram a resolução de no máximo 3Å e cuja caracterização estrutural tivesse sido resolvida empregando o método de raio X, por possuir uma melhor qualidade.

Dados adicionais disponíveis na Uniprot (COUDERT *et al.*, 2023) para o gene *PRKAA2* (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P54646>) e para o gene *SLC22A3* (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/O75751>) também foram considerados na seleção das estruturas para os ensaios *in silico*.

O consórcio UniProt (*Universal Protein Knowledgebase*) (<https://www.uniprot.org>) apresenta uma base de dados de livre acesso, com informações de sequências de proteínas e de suas funções, na qual muitas das entradas procedem de projetos de sequenciamento de genomas (UNIPROT, 2023). Ademais, a UniProt apresenta indicadores que oferecem uma estimativa inicial da qualidade das informações disponíveis as quais incluem a revisão do conteúdo com base na UniProtKB (Swiss-Prot) e um escore atribuído à anotação (annotation score). Como um dos componentes do consórcio o UniProtKB/Swiss-Prot atua na curadoria especializada dos dados. As proteínas AMPK e OCT3 selecionadas apresentaram dados curados e o maior escore de anotação (5/5).

Após essa busca inicial, foram selecionadas as estruturas cristalográficas das proteínas humanas AMPK e OCT3. A estrutura da AMPK encontra-se depositada na Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/>) (BERMAN *et al.*, 2000) sob o código 4ZHX (<https://www.rcsb.org/structure/4ZHX>) (LANGENDORF *et al.*, 2016) e a estrutura cristalográfica do transportador OCT3 está depositada na PDB sob o código 7ZH0 (<https://www.rcsb.org/structure/7ZH0>) (KHANPPNAVAR *et al.*, 2022). Tal seleção se baseou em escores indicativos da qualidade estrutural geral e local descritos no item 3.4.3.

Adicionalmente, a proteína 4ZHX foi também avaliada quanto à sua expressão na mama humana nas plataformas Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) e The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>). Ambas as plataformas permitem mapear as proteínas humanas em células, tecidos e órgãos através da integração de várias tecnologias ômicas (PAPATHEODOROU *et al.*, 2018).

### 4.3.3 Análise da qualidade estrutural e validação dos modelos gerados

Para a geração de cada modelo por homologia da cadeia de interesse das proteínas AMPK e OCT3, foram empregadas as sequências FASTA correspondentes às entradas PDB 4ZHX e PDB 7ZH0, respectivamente. Dados complementares foram obtidos na Base de dados UniProt para AMPK (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P54646/entry#structure>) e para OCT3 (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/O75751/entry#structure>).

Os algoritmos do servidor Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) utilizaram como alvo (*target*) as sequências FASTA das proteínas de interesse para gerar modelos por homologia. Entre os modelos gerados foi selecionado apenas o que apresentou maior identidade (100%) e maior valor de estimativa de qualidade global do modelo ou GMQE (Global Model Quality Estimate) comparativamente aos dados cristalográficos depositados no banco de dados (WATERHOUSE *et al.*, 2018).

A qualidade das estruturas 3D dos modelos foi avaliada através dos softwares Swiss-Model Qmean (<https://swissmodel.expasy.org/qmean/>), ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), Procheck (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>) e PDBSum (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>) (LASKOWSKI; THORNTON, 2017; R. A. LASKOWSKI, M. W. MACARTHUR, 1993; STUDER *et al.*, 2020; WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). Todas essas ferramentas avaliam a qualidade do modelo 3D a partir de diversos dados como estereoquímica, distâncias, além de potenciais estatísticos e são empregadas na validação do modelo gerado.

Adicionalmente, a ferramenta Phobius (KROGH; SONNHAMMER; KA, 2004) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/phobius/>) foi aplicada no estudo apenas do transportador OCT3 de maneira a facilitar a visualização dos domínios transmembrana.

### 4.3.4 Análise do ligante

A estrutura química do ligante (metformina) foi extraída do Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e do Zinc15 (<https://zinc15.docking.org/>), que são bancos de dados de moléculas e compostos químicos. Para a análise de qualidade da estrutura, foram utilizados os softwares MarvinSketch 22.16, 2022 (<http://www.chemaxon.com>) e o Avogadro 1.2.0 (<https://avogadro.cc/>). Ambos os softwares permitem a construção e visualização de

fórmulas estruturais e moleculares com visualização 2D e 3D, bem como acesso ao mecanismo de correção de erros de ligação e estrutura (HANWELL *et al.*, 2012). Após análise de qualidade, foi selecionada a estrutura encontrada no Zinc15, pois o conformer extraído do Pubchem apresentava um erro de ligação. Com os SMILES (Simplified Molecular Input Entry System) da estrutura do Zinc15, foi possível realizar o perfil ADMET do ligante, onde avaliou-se os descritores físico-químicos, as propriedades farmacocinéticas e toxicidade. Foram utilizados então ferramentas de predições de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, através das plataformas SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) e ADMETLab 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/>) (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017; XIONG *et al.*, 2021).

#### 4.3.5 *Docking* molecular

Foi possível iniciar a preparação para o *docking* molecular a partir dos arquivos finais gerados para o ligante e para cada cadeia da proteína isolada. Para tanto, houve a remoção de água e de ligantes co-cristalizados os quais foram excluídos do modelo por homologia gerado durante a etapa de preparação dos arquivos. Nessa etapa, também foi realizada a minimização da energia usando o campo de força AMBER ff14SB no software UCSF Chimera, versão 1.16 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) (TROTT, OLEG; OLSON, 2011), tanto para a estrutura 3D de cada proteína quanto para a do ligante. Na sequência, os arquivos gerados foram submetidos ao programa ACPYPE para permitir a conversão do formato dos mesmos. Isso permitiu a aprovação da topologia pelos softwares empregados na etapa de dinâmica molecular. O aplicativo ACPYPE (SOUSA; VRANKEN, 2012) utiliza a ferramenta AmberTools (SALOMON-FERRER; CASE; WALKER, 2013) para gerar a topologia a ser utilizada nas simulações de dinâmica molecular.

As simulações do *docking* proteína-ligante foram então realizadas utilizando o software AutoDock Vina/UCSF Chimera versão 1.16 utilizando os parâmetros *default*. As dimensões da caixa de simulação ou Grid Box foram otimizadas de acordo com os escores de energia de ligação preditos pelo AutoDock Vina. Os cálculos foram realizados automaticamente para cada uma das poses do ligante durante os ensaios preliminares. Uma vez estabelecidas as coordenadas e o tamanho da caixa de simulação foram conduzidos os ensaios de *docking*, em triplicata. Durante esses ensaios foram gerados arquivos contendo todas as poses do ligante nas coordenadas espaciais otimizadas (x, y e z) com os valores de escores de energias de ligação

calculadas (kcal/mol). Assim, na sequência, foi realizada a separação das poses do ligante previstas pelo software AutoDock Vina, através do aplicativo Vina split. Dessa maneira foi possível gerar os arquivos 3D individualmente para cada uma das poses do ligante (arquivo extensão .pdbqt). Cada arquivo do ligante foi utilizado juntamente com o arquivo da proteína (.pdbqt) para construir o arquivo do complexo proteína-ligante (extensão .pdb) no software PyMOL (Molecular Graphics System Versão 4.6.0 Open Source) (<https://pymol.org/2/>).

As análises posteriores foram realizadas apenas para o arquivo (.pdb) contendo a proteína interagindo com o ligante na posição com o menor escore de energia de ligação e menor valor de *Root Mean Square Deviation* (RMSD) e que também apresentou interações do tipo ligações de hidrogênio. Tais análises foram efetuadas com o objetivo de verificar a existência de ligações de hidrogênio e de interações hidrofóbicas importantes para a formação e manutenção do complexo proteína-ligante. Para tanto, foram utilizados os softwares Ligplot+ v2.2 (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>) e Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (<https://bio.tools/plip>) (ADASME *et al.*, 2021). Adicionalmente, empregou-se a mesma pose do complexo proteína-ligante para proceder a verificação daqueles resíduos importantes na manutenção do complexo proteína-ligante. Nessa etapa foram empregadas as ferramentas disponíveis no Proteins Plus (<https://proteins.plus/>).

#### 4.3.6 Dinâmica molecular

Este ensaio foi realizado apenas para a proteína AMPK. Para isso, foi utilizada a pose do ligante que apresentou menor escore de energia de ligação e menor RMSD a partir do docking molecular calculados pelo AutoDock Vina.

As simulações *in silico* possibilitam algumas análises de interações previstas para o complexo formado entre proteína e ligante. As simulações de dinâmica molecular foram realizadas durante 10 ns utilizando o pacote Groningen Machine for Chemical Simulations (GROMACS) versão 2018.4 (SPOEL *et al.*, 2005). Para esse ensaio, foi utilizado o protocolo estabelecido pelo Dr. Lemkul com poucas modificações (LEMKUL, 2019).

O complexo proteína-ligante foi solvatado empregando o modelo de água TIP3P (KLEIN, 1983). Em seguida, o sistema foi neutralizado e a energia minimizada. O sistema foi equilibrado sob as constantes NVP (número de partículas, volume e temperatura) e NPT (número de partículas, volume e pressão) (T = 300 K; P = 1 bar). A simulação de dinâmica foi

realizada sob essas condições por um período de 10 ns. Para a análise de dados da dinâmica molecular, utilizou-se o programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996). Enquanto que o programa `readHBmap.py` (Python 2) permitiu visualizar a existência de ligações de hidrogênio durante a simulação, bem como as suas respectivas taxas de ocupação (LEMKUL; ALLEN; BEVAN, 2010). Adicionalmente, as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas do complexo foram também obtidas através de representações 2D utilizando o software Ligplot+ v2.2.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ESTUDO CLÍNICO

#### 5.1.1 Dados clínicos

Centos e oitenta mães foram incluídas no estudo, todas foram acompanhadas pela Equipe do CIAM. No entanto, nem todas as voluntárias concordaram em doar a amostra de sangue para obtenção do soro ou de colostro. Também não foi possível monitorar o estado de amamentação de todas as participantes. Portanto, de 180 mães recrutadas, 87 concordaram com a coleta de sangue, 130 concordaram com a coleta de colostro e 118 foram acompanhados durante seis meses para avaliar resultados da amamentação.

A Tabela 3 apresenta as características das 180 mulheres internadas no Alojamento Conjunto do HU-UFSC/EBSERH que foram incluídas no estudo. Após a aplicação de questionário e avaliação de prontuário, obtiveram-se os dados clínicos das mulheres. Adicionalmente, a partir das análises bioquímicas, caracterizou-se as pacientes metabolicamente (Tabela 3). Os valores de referência apresentados são os valores sem jejum, que foi o caso da coleta das amostras das participantes.

Tabela 3 – Características das participantes (N=180).

Variáveis	Dados das participantes	Valores de referência
Idade	26 anos e 7 meses (16 – 44)	
Peso pré-gestacional (kg)	62 (41 – 119)	
Peso pós-gestacional (kg)	75 (55 – 125)	
Ganho de peso (kg)	13 (0 – 31)	
Idade gestacional	39 semanas e 5 dias (33 – 45)	
Peso do recém-nascido (kg)	3,35 (2,16 – 4,91)	
Tipo de parto (%)		
- Normal	63	
- Cesárea	37	
Escolaridade (%)		
- Ensino superior	16	

- Ensino médio	44	
- Técnico	4	
- Ensino fundamental	36	
Estado nutricional (%)		
- Baixo peso	13	
- Adequado	37	
- Sobrepeso	29	
- Obesidade	21	
Colesterol total (mg/dL)	216 (99 – 306)	<190 mg/dL
HDL-colesterol (mg/dL)	56 (26 – 104)	>40 mg/dL
LDL-colesterol (mg/dL)	124 (33 – 220)	<130 mg/dL
VLDL-colesterol (mg/dL)	27 (17 – 52)	<160 mg/dL
Triglicerídeo (mg/dL)	156 (73 – 418)	<175 mg/dL
Glicose (mg/dL)	91 (55 – 145)	<200 mg/dL
Ácido úrico (mg/dL)	5 (1,9 – 6,4)	1,5 - 6 mg/dL
Prolactina (ng/mL)	209,3 (76,22 – 598)	35 a 600ng/mL
Progesterona (ng/mL)	10,87 (0,87 – 148,15)	NE

Resultados expressos em mediana (menor e maior valor) ou em frequência relativa. NE – não estabelecido.

Fonte: a autora

Pelo acompanhamento remoto em até seis meses após o parto, em que as pacientes foram questionadas a respeito do aleitamento, foi possível estratificar as mães em grupos de acordo com o estado da amamentação (Tabela 4).

Tabela 4 – Estado da amamentação (N=118).

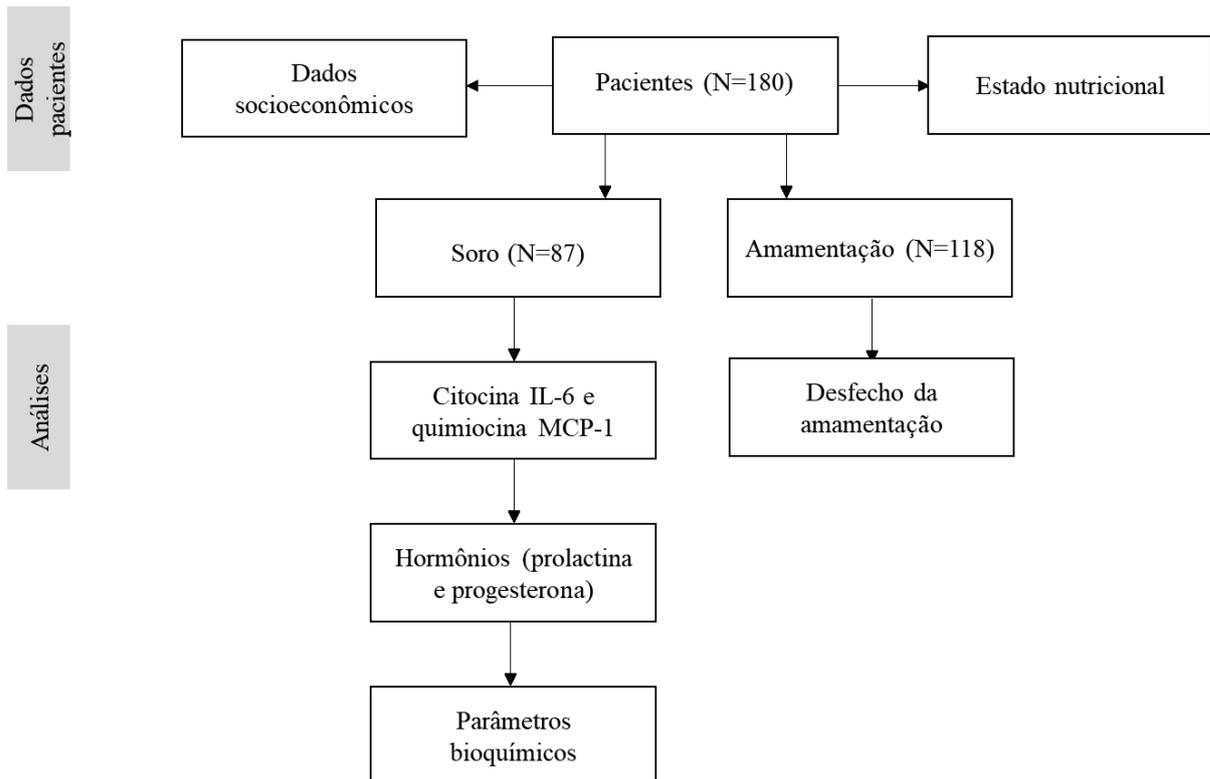
<b>Forma de aleitamento</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>	<b>N</b>
Amamentação exclusiva	74,58	88
Aleitamento misto	25,42	30

Fonte: a autora

### 5.1.2 Análises no soro

Para facilitar a compreensão, a Figura 15 mostra o desenho experimental das análises no soro em detalhes.

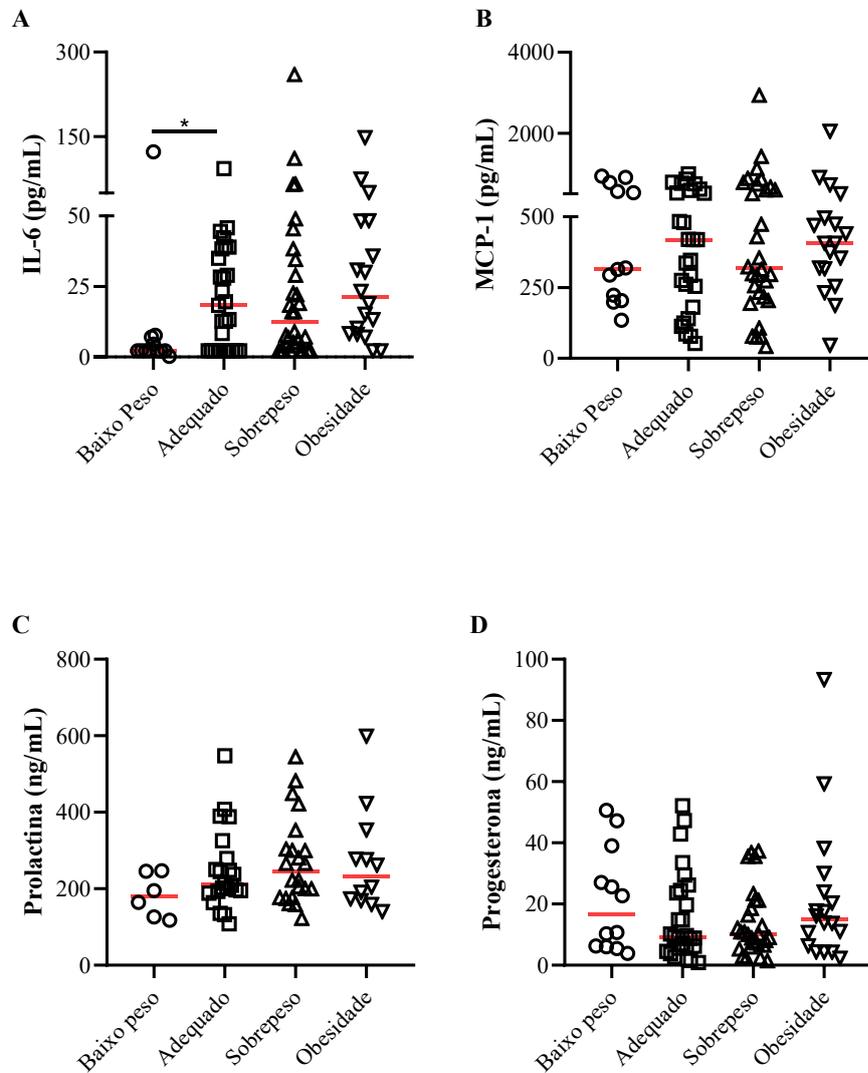
Figura 15 - Desenho experimental e coleta de amostras de soro.



Fonte: a autora

As citocinas e hormônios analisados foram IL-6, MCP-1, prolactina e progesterona durante o período pós-parto e a concentração de citocinas e hormônios foram comparados com o estado nutricional da mãe. Como pode ser observado na Figura 16, as concentrações séricas encontradas de MCP-1 354,2 pg/mL (2936,3 – 41,6) foram maiores que as de IL-6 12,6 pg/mL (260,1 – 2,2), além disso, mães com baixo peso tiveram concentração sérica de IL-6 após a gravidez significativamente menor do que mães de peso adequado ( $P < 0,01$ ). Em relação às análises hormonais, não houveram diferenças significativas entre os grupos (Figura 16).

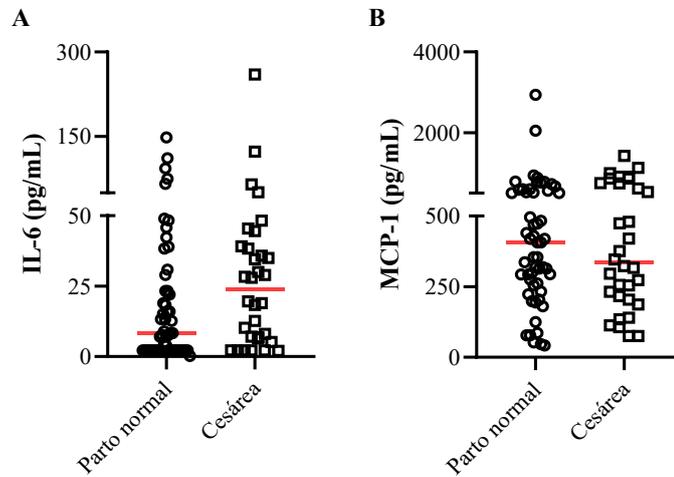
Figura 16 – Concentrações séricas de IL-6, MCP, prolactina e progesterona de acordo com estado nutricional.



Concentração sérica de (A) IL-6, (B) MCP-1, (C) Prolactina e (D) Progesterona de acordo com estado nutricional. Traço vermelho = mediana. \*Diferença significativa ( $P < 0,01$ ). Teste Mann-Whitney U. MCP-1, proteína quimioatraente de monócitos 1; IL-6, interleucina 6. Fonte: a autora

A concentração das citocinas também foi avaliada em relação ao tipo de parto (Figura 17), no entanto, não houveram diferenças significativas entre os grupos.

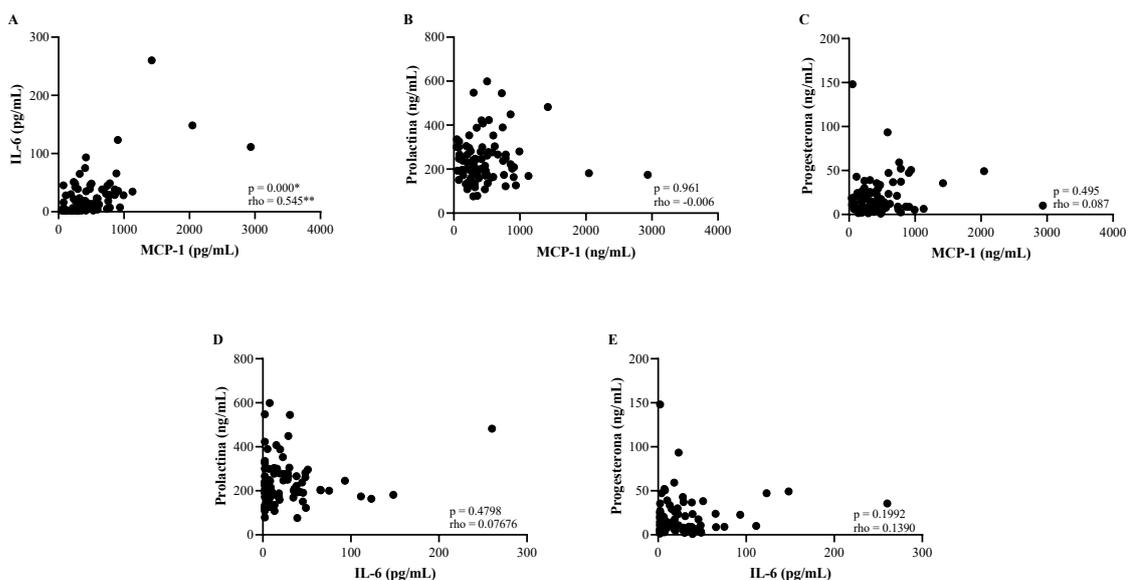
Figura 17 – Concentração de IL-6 e MCP-1 de acordo com tipo de parto.



Concentração sérica de (A) IL-6 e (B) MCP-1 de acordo com o tipo de parto. Traço vermelho = mediana. Teste t de student. MCP-1, proteína quimioatratante de monócitos 1; IL-6, interleucina 6. Fonte: a autora

As concentrações séricas de prolactina e progesterona foram correlacionadas com as concentrações de IL-6 e MCP-1 presentes no soro, e também foi realizada a correlação entre as concentrações de IL-6 e de MCP-1. Ao final desta análise, foi encontrada uma correlação positiva entre a concentração de IL-6 e MCP-1 ( $P < 0,0005$ ) no soro materno (Figura 18).

Figura 18 - Correlação entre as determinações séricas.



Correlação entre as concentrações séricas de (A) IL-6 e MCP-1, (B) prolactina e MCP-1, (C) progesterona e MCP-1, (D) prolactina e IL-6 e (E) progesterona e IL-6. \*Correlação significativa. Rho – coeficiente de correlação de Spearman. MCP-1, proteína quimioatraente de monócitos 1; IL-6, interleucina 6. Fonte: a autora

Por meio da regressão logística, foi observada uma tendência entre o desfecho da amamentação e as concentrações de IL-6, ou seja, mães com concentrações de IL-6 acima da mediana são menos propensas a amamentar ( $P=0,06$ ). Além disso, pelo teste de qui-quadrado, foi encontrada uma associação entre o estado nutricional da mãe e o estado de aleitamento materno, sugerindo que mulheres com sobrepeso ou obesidade são menos propensas a manter o aleitamento materno exclusivo quando comparadas a mães com estado nutricional adequado (Tabela 5).

Tabela 5 – Associação entre estado da amamentação e estado nutricional.

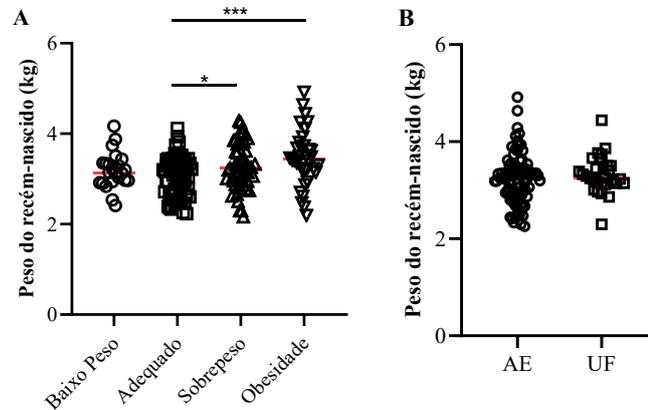
Estado nutricional	Estado da amamentação (%)		Valor de P
	Amamentação exclusiva	Aleitamento misto	
Baixo peso	62	38	0.034*
Adequado	89	11	
Sobrepeso	72	28	
Obesidade	61	39	

Qui-quadrado foi utilizado para análise do estado nutricional e da amamentação; \*Associação significativa.

Fonte: a autora

O peso do recém-nascido foi comparado de acordo com o estado nutricional da mãe e o estado de amamentação (Figura 19). A análise demonstrou que os filhos de mães que estavam acima do peso ou obesas após a gravidez tiveram um peso ao nascer maior do que as mães com peso adequado. Não foram encontradas diferenças entre os pesos dos recém-nascidos de acordo com o estado da amamentação.

Figura 19 - Comparações entre o peso do recém-nascido de acordo com o estado nutricional e estado de amamentação.

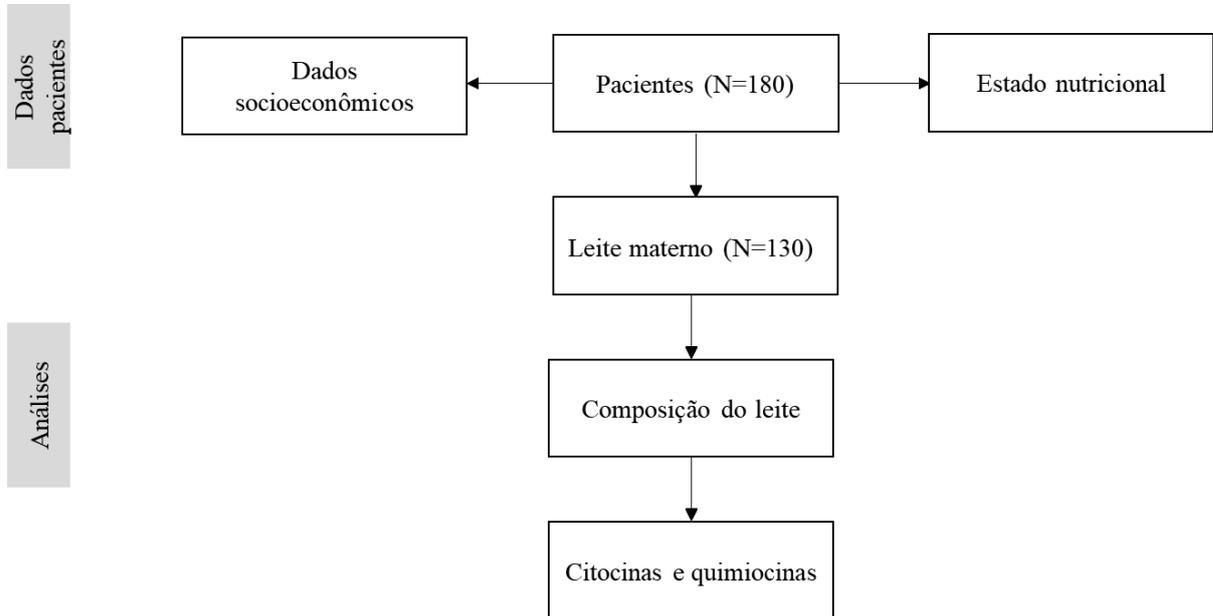


(A) Peso do recém-nascido de acordo com o estado nutricional e (B) estado de amamentação. Traço vermelho = mediana. AE, amamentação exclusiva; UF, uso de fórmula infantil. Teste t de Student e Mann-Whitney U. \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,0005$ . Fonte: a autora

### 5.1.3 Análises no colostro

Das 180 mulheres incluídas no estudo, foram analisadas 130 amostras de colostro coletadas entre 24-48 h após o parto. Destas amostras de colostro, foram realizadas as análises de composição, de perfil de citocinas e de quimiocinas (Figura 20).

Figura 20 - Desenho experimental e coleta de amostras de colostro.



Fonte: a autora

As amostras de colostro foram primeiramente caracterizadas em relação à sua composição de proteínas totais, ácido graxo, porcentagem de gordura e Kcal (Tabela 6).

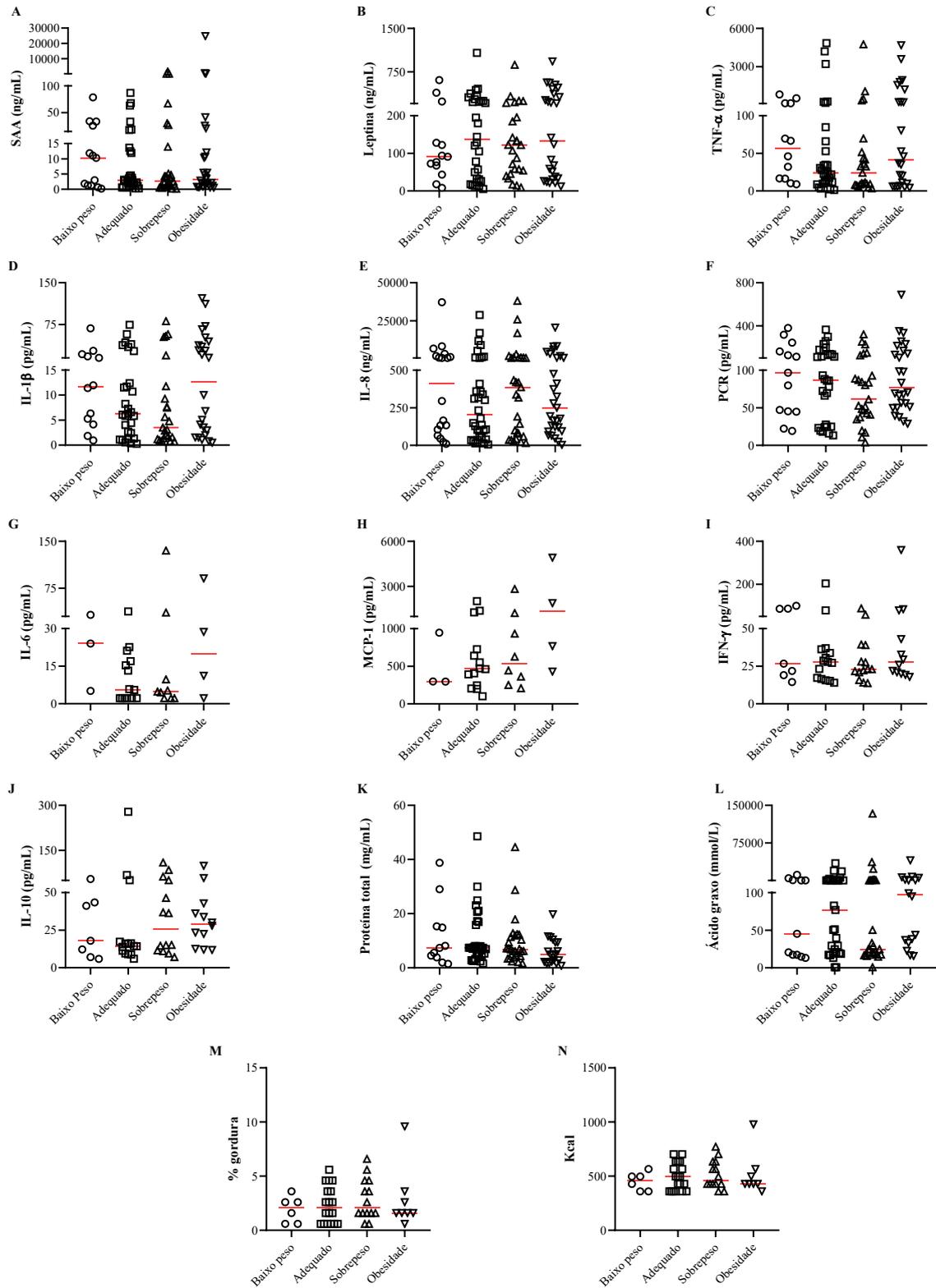
Tabela 6 – Composição do colostro.

<b>Parâmetro</b>	<b>Mediana (menor e maior valor)</b>
Proteína total (mg/mL)	7,04 (0,77- 48,58)
Ácido graxo (mmol/L)	47,79 (0,791– 133263,3)
Gordura (%)	1,59 (0,59 – 9,59)
Kcal	427,6 (358,8 – 978)

Fonte: a autora

Neste estudo, buscou-se avaliar quais fatores poderiam influenciar na composição do leite materno, para isso, foi realizada a análise da concentração de citocinas e dos outros componentes avaliados no colostro em relação ao estado nutricional da mãe. Como pode ser visto na Figura 21, não houve diferença significativa entre os grupos para nenhum parâmetro avaliado.

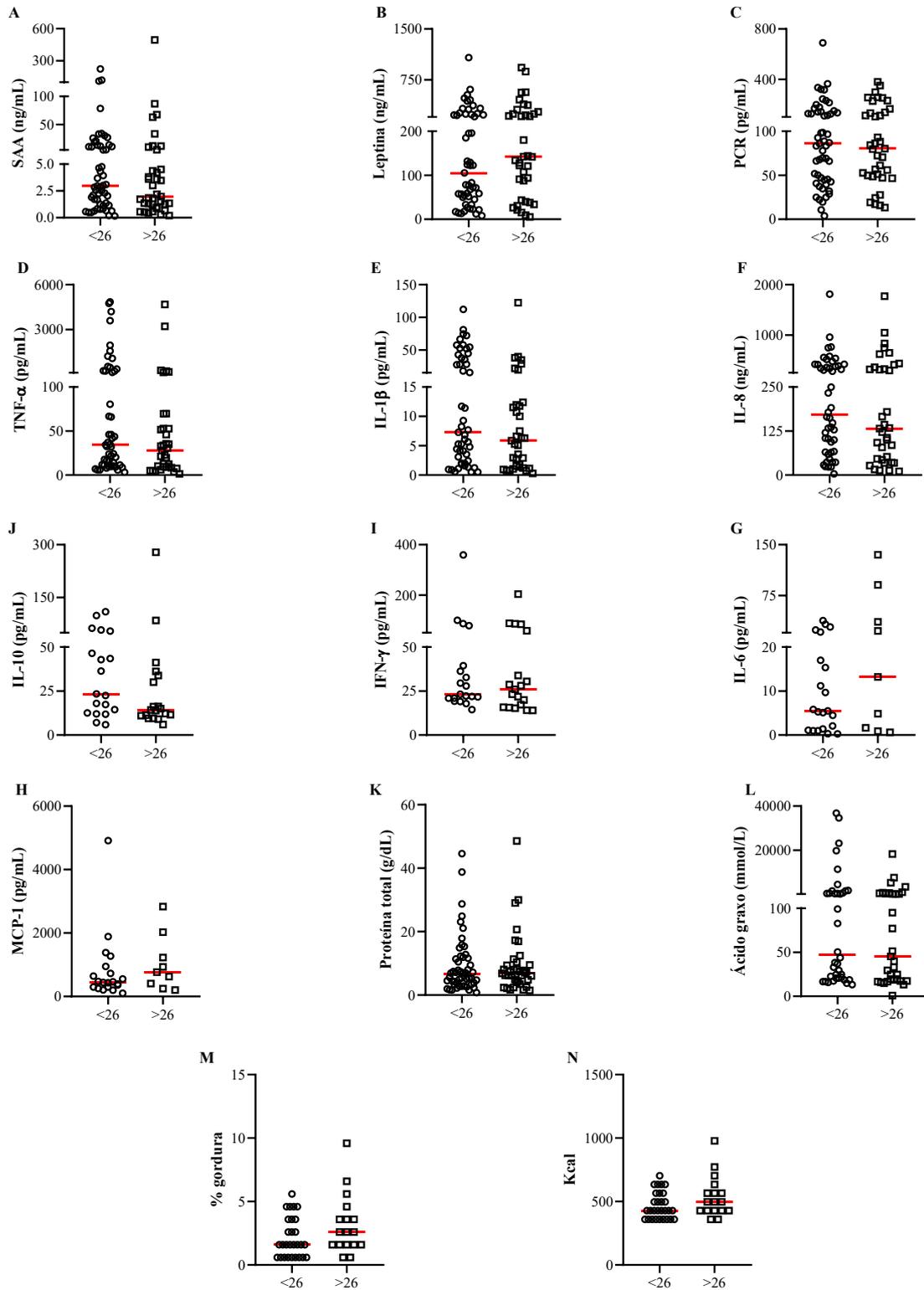
Figura 21 – Análise dos componentes do colostro separados por estado nutricional das mães.



Concentrações de (A) SAA, (B) leptina, (C) TNF- $\alpha$ , (D) IL-1 $\beta$ , (E) IL-8, (F) PCR, (G) IL-6, (H) MCP-1 (I) IFN- $\gamma$ , (J) IL-10, (K) proteína total, (L) ácido graxo, (M) % de gordura e (N) Kcal no colostro de mães durante o período pós-natal precoce, agrupadas em categorias de estado nutricional. Traço vermelho = mediana. Teste Mann-Whitney U. SAA, proteína sérica amiloide A; PCR, proteína C-reativa; TNF, fator de necrose tumoral; IL-1 $\beta$ , interleucina 1 beta; IL-8, interleucina 8; IL-6, interleucina 6; MCP-1, proteína quimioatratante de monócitos; IFN- $\gamma$ , interferon gamma; IL-10, interleucina 10. Fonte: a autora

Também, foi avaliada a relação entre os componentes do colostro com a idade materna. Para isso, as participantes foram divididas em dois grupos: acima e abaixo da mediana de idade, que foi de 26 anos (Figura 22). Neste caso, também não foi encontrada diferença entre os grupos.

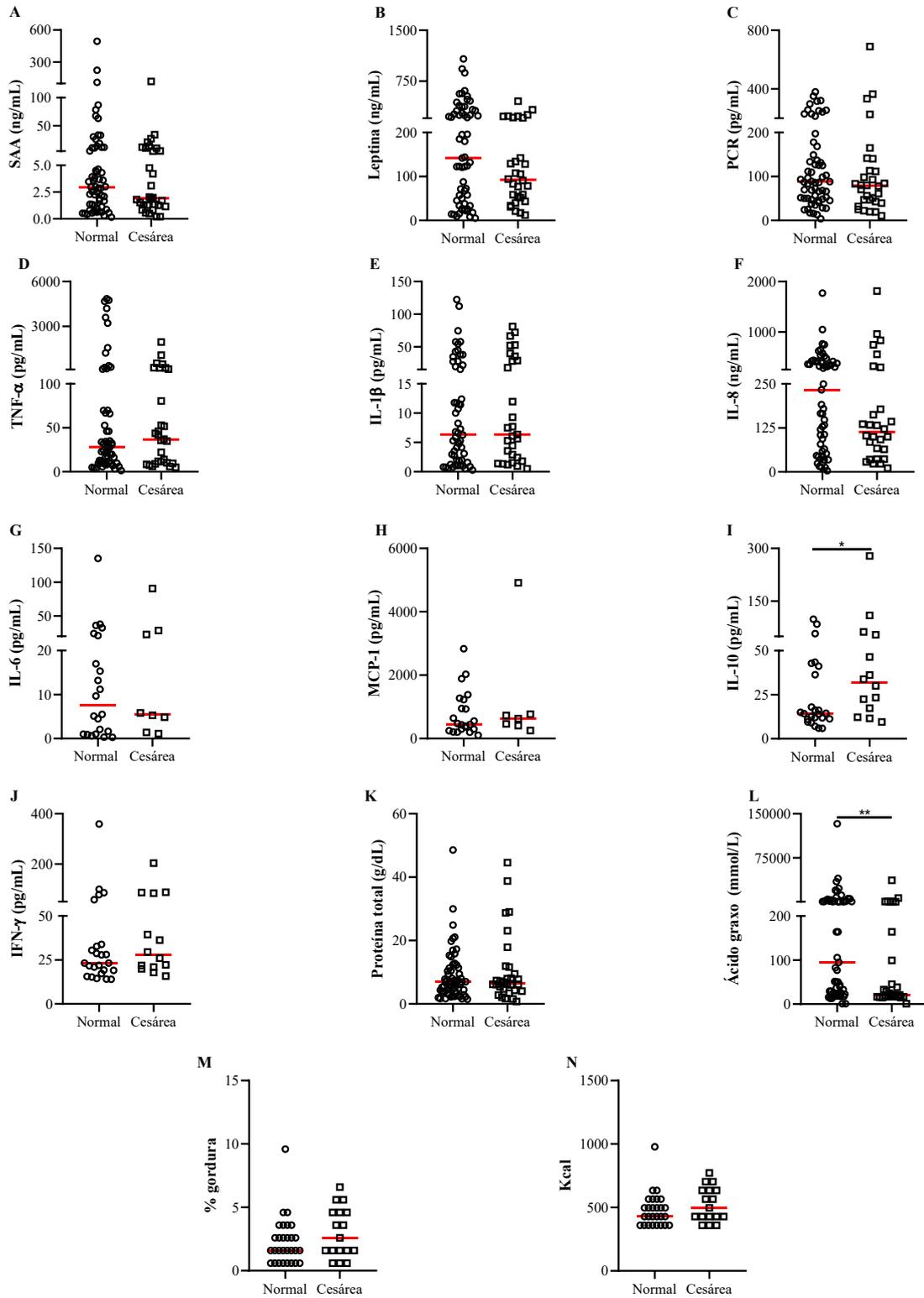
Figura 22 – Análise dos componentes do colostro agrupados por idade materna.



Concentrações de (A) SAA, (B) leptina, (C) TNF- $\alpha$ , (D) IL-1 $\beta$ , (E) IL-8, (F) PCR, (G) IL-6, (H) MCP-1 (I) IFN- $\gamma$ , (J) IL-10, (K) proteína total, (L) ácido graxo, (M) % de gordura e (N) Kcal no colostro de mães durante o período pós-natal precoce, agrupadas por idade. Traço vermelho = mediana. Teste Mann-Whitney U. SAA, proteína sérica amiloide A; PCR, proteína C-reativa; TNF, fator de necrose tumoral; IL-1 $\beta$ , interleucina 1 beta; IL-8, interleucina 8; IL-6, interleucina 6; MCP-1, proteína quimioatraente de monócitos; IFN- $\gamma$ , interferon gamma; IL-10, interleucina 10. Fonte: a autora

Outro parâmetro avaliado foi o tipo de parto, onde buscou-se analisar se a composição do leite varia de acordo com o parto (normal ou cesárea). A figura 23 representa esses dados. Neste caso, viu-se que a concentração de IL-10 foi maior no colostro de mães que tiveram parto cesárea ( $P=0,0472$ ) e, do contrário, a concentração de ácido graxo foi menor ( $P=0,0097$ ).

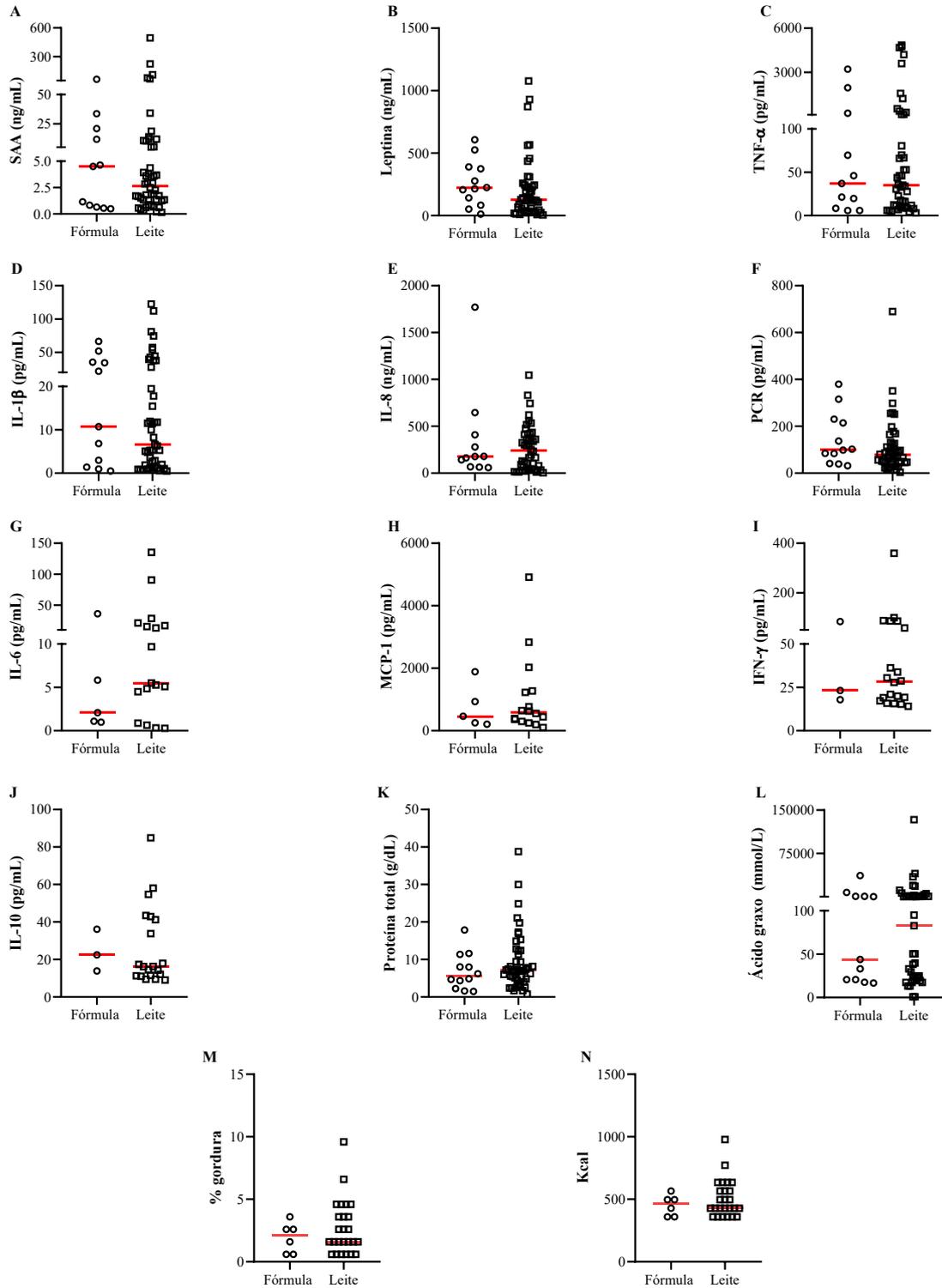
Figura 23 – Análise dos componentes do colostro avaliados de acordo com o tipo de parto.



Concentrações de (A) SAA, (B) leptina, (C) TNF- $\alpha$ , (D) IL-1 $\beta$ , (E) IL-8, (F) PCR, (G) IL-6, (H) MCP-1 (I) IFN- $\gamma$ , (J) IL-10, (K) proteína total, (L) ácido graxo, (M) % de gordura e (N) Kcal no colostro de mães durante o período pós-natal precoce, agrupadas por tipo de parto. Traço vermelho = mediana. Teste Mann-Whitney U. \*P=0,0472; \*\*P=0,0097. SAA, proteína sérica amiloide A; PCR, proteína C-reativa; TNF, fator de necrose tumoral; IL-1 $\beta$ , interleucina 1 beta; IL-8, interleucina 8; IL-6, interleucina 6; MCP-1, proteína quimioatraente de monócitos; IFN- $\gamma$ , interferon gamma; IL-10, interleucina 10. Fonte: a autora

Também buscou-se compreender se a composição do leite materno afeta o desfecho da amamentação. Para isso, foram avaliados os componentes do colostro de acordo com o desfecho da amamentação após os seis meses de acompanhamento (Figura 24). No entanto, não houve diferença entre os grupos em todos os parâmetros avaliados.

Figura 24 – Análise dos componentes do colostro avaliados de acordo com o desfecho da amamentação.



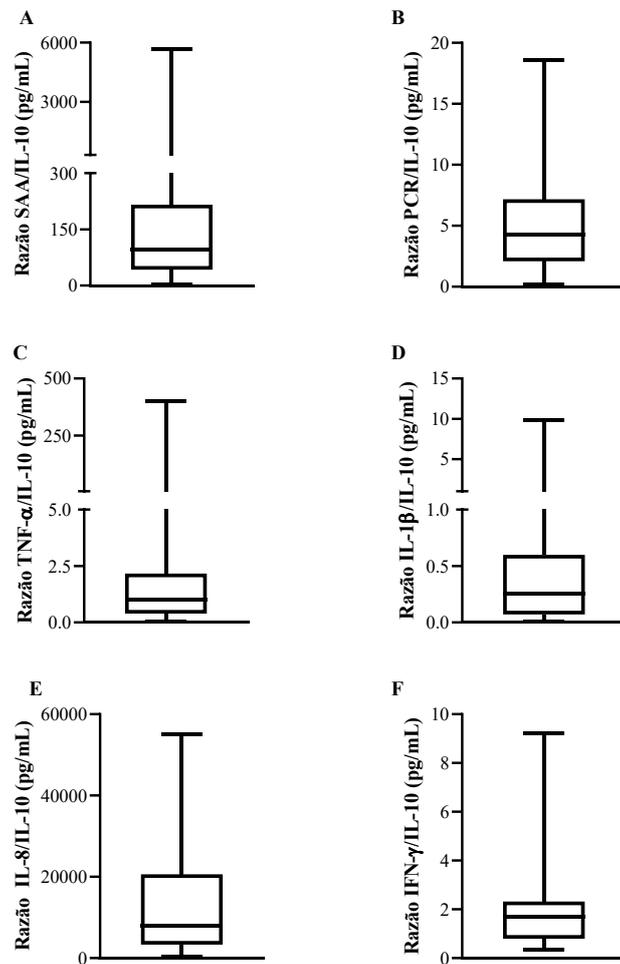
Concentrações de (A) SAA, (B) leptina, (C) TNF- $\alpha$ , (D) IL-1 $\beta$ , (E) IL-8, (F) PCR, (G) IL-6, (H) MCP-1 (I) IFN-

$\gamma$ , (J) IL-10, (K) proteína total, (L) ácido graxo, (M) % de gordura e (N) Kcal no colostro de mães durante o período pós-natal precoce, agrupadas por desfecho da amamentação. O grupo “fórmula” refere-se ao grupo de aleitamento misto e o grupo “leite” refere-se ao grupo de aleitamento exclusivo. Traço vermelho = mediana.

Teste Mann-Whitney U. SAA, proteína sérica amiloide A; PCR, proteína C-reativa; TNF, fator de necrose tumoral; IL-1 $\beta$ , interleucina 1 beta; IL-8, interleucina 8; IL-6, interleucina 6; MCP-1, proteína quimioatratante de monócitos; IFN- $\gamma$ , interferon gamma; IL-10, interleucina 10. Fonte: a autora

Também, foi realizada a análise da relação entre marcadores pró (SAA, PCR, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 e IFN- $\gamma$ ) e anti-inflamatórios (IL-10) no colostro. As análises da razão entre os marcadores mostraram que, na maioria dos casos, há uma maior concentração de marcadores pró do que anti-inflamatórios no colostro, com exceção da IL-1 $\beta$ , que apresentou menor concentração quando comparada à IL-10 (Figura 25).

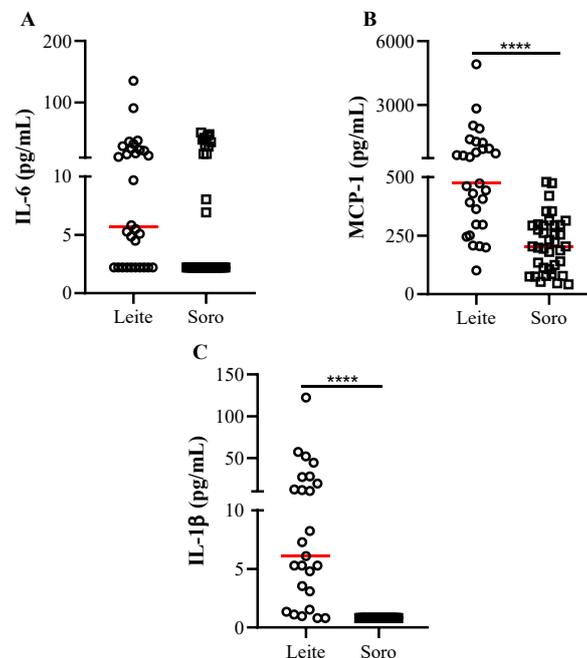
Figura 25 – Razão entre marcadores pró e anti-inflamatórias no colostro.



Razão entre (A) SAA e IL-10, (B) PCR e IL-10, (C) TNF- $\alpha$  e IL-10, (D) IL-1 $\beta$  e IL-10, (E) IL-8 e IL-10, (F) IFN- $\gamma$  e IL-10 no colostro de mães durante o período pós-natal precoce. SAA, proteína sérica amiloide A; PCR, proteína C-reativa; TNF, fator de necrose tumoral; IL-1 $\beta$ , interleucina 1 beta; IL-8, interleucina 8; IFN- $\gamma$ , interferon gamma. Fonte: a autora

Também buscou-se avaliar a diferença entre as concentrações de citocinas no soro e no colostro. Foi observado que há uma maior concentração de MCP-1 e IL-1 $\beta$  no colostro em relação ao soro (Figura 26).

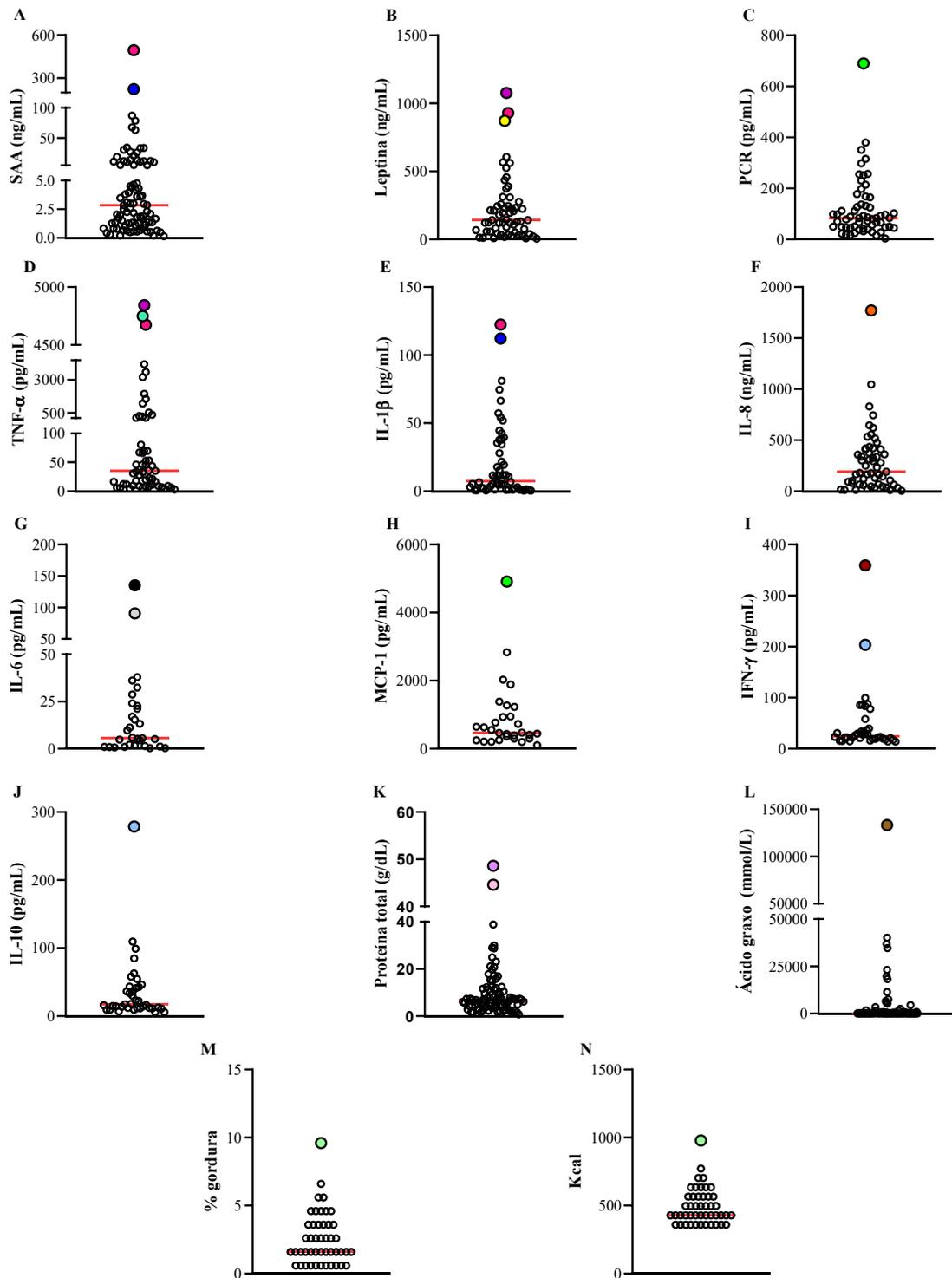
Figura 26 – Comparação entre as concentrações de citocinas sérias e no colostro.



Comparação entre (A) IL-6, (B) MCP-1 e (C) IL-1 $\beta$  no soro e colostro de mães durante o período pós-natal precoce. IL-6, interleucina 6; MCP-1, proteína quimioatraente de monócitos; IL-1 $\beta$ , interleucina 1 beta. Traço vermelho = mediana. \*\*\*\*P<0.0001. Fonte: a autora

Por fim, buscou-se avaliar quais participantes representavam os valores discrepantes em relação às outras amostras de colostro, para compreender se havia algum fator em comum que justificasse as elevadas concentrações de citocinas ou dos outros componentes do leite. A Figura 27 representa a distribuição dos parâmetros avaliados no colostro e seus respectivos pontos discrepantes destacados com diferentes cores.

Figura 27 – Distribuição dos parâmetros avaliados no colostro e seus pontos discrepantes.



Concentrações de (A) SAA, (B) leptina, (C) PCR, (D) TNF- $\alpha$ , (E) IL-1 $\beta$ , (F) IL-8, (G) IL-6, (H) MCP-1 (I) IFN- $\gamma$ , (J) IL-10, (K) proteína total, (L) ácido graxo, (M) % de gordura e (N) Kcal no colostro de mães durante o período pós-natal precoce e seus *outliers* destacados. SAA, proteína sérica amiloide A; PCR, proteína C-reativa;

TNF, fator de necrose tumoral; IL-1 $\beta$ , interleucina 1 beta; IL-8, interleucina 8; IL-6, interleucina 6; MCP-1, proteína quimioatraente de monócitos; IFN- $\gamma$ , interferon gamma; IL-10, interleucina 10. Traço vermelho = mediana. Fonte: a autora

As cores iguais destacadas na Figura 27 representam as mesmas pacientes. Pode-se então perceber que diferentes parâmetros possuem alguns pontos discrepantes em comum. O círculo destacado em rosa pink, presente no painel de SAA (495,1ng/mL), leptina (929,0 ng/mL), TNF- $\alpha$  (4674,2 pg/mL) e IL-1 $\beta$  (122,4 pg/mL), representa uma paciente de 29 anos, com um IMC pré-gestacional de 26,3, classificado como sobrepeso, estado nutricional também classificado como sobrepeso pós-gestação, sem comorbidades prévias, que completou o ensino médio e técnico e hoje atua como operadora de telemarketing. Teve parto normal do seu segundo filho, com o RN pesando 3,6 kg e idade gestacional de 41 semanas.

O círculo destacado em azul royal, presente no painel de SAA (224,2 ng/mL) e IL-1 $\beta$  (112,2 pg/mL), representa uma paciente de 36 anos, com IMC pré-gestacional de 28,9, classificado como sobrepeso, estado nutricional classificado como obesidade pós-gestação, sem comorbidades prévias, que completou o ensino superior e hoje atua no setor financeiro. Teve parto cesárea do seu segundo filho, com o RN pesando 4,64 kg e idade gestacional de 37 semanas. Durante a gestação, a paciente desenvolveu diabetes e hipertensão gestacional.

O círculo destacado em roxo, presente no painel de leptina (1076,8 ng/mL) e TNF- $\alpha$  (4844,0 pg/mL), representa uma paciente de 21 anos, com IMC pré-gestacional de 27,2, classificado como sobrepeso, estado nutricional classificado como adequado pós-gestação, tinha diagnóstico de asma, completou o ensino fundamental e atualmente é dona de casa. Teve parto normal do seu terceiro filho, com o RN pesando 2,465 kg e idade gestacional de 38 semanas. Durante a gestação, a paciente desenvolveu hipertensão gestacional e hiperêmese.

O círculo destacado em amarelo, presente no painel de leptina (871,8 ng/mL), representa uma paciente de 24 anos, com IMC pré-gestacional de 23,7, classificado como adequado, estado nutricional classificado como sobrepeso pós-gestação, sem comorbidades prévias, que completou o ensino médio e atualmente é dona de casa. Teve parto normal do seu primeiro filho, com o RN pesando 3,195 kg e idade gestacional de 39 semanas. Durante a gestação, a paciente desenvolveu anemia.

O círculo destacado em verde limão, presente no painel de PCR (689,5 pg/mL) e MCP-1 (4912,7 pg/mL), representa uma paciente de 25 anos, com IMC pré-gestacional de 25,4, classificado como sobrepeso, estado nutricional classificado como obesidade pós-gestação, sem

comorbidades prévias, que completou o ensino médio e atualmente é atendente. Teve parto cesárea dos seus segundos filhos, que eram gemelares, com os RNs pesando 2,185 kg e 2,760 kg e idade gestacional de 37 semanas. Durante a gestação, desenvolveu hipertensão gestacional.

O círculo destacado em verde água, presente no painel de TNF- $\alpha$  (4749,7 pg/mL), representa uma paciente de 26 anos, com IMC pré-gestacional de 20,9, classificado como adequado, estado nutricional classificado como adequado pós-gestação, sem comorbidades prévias, que completou o ensino médio e atualmente é funcionária de uma fábrica de calçados. Teve parto normal do seu primeiro filho, com o RN pesando 3,340 kg e idade gestacional de 40 semanas. Durante a gestação, não teve complicações.

O círculo destacado em cinza, presente no painel de IL-6 (90,5 pg/mL), representa uma paciente de 28 anos, com IMC pré-gestacional de 28,9, classificado como sobrepeso, estado nutricional classificado como obesidade pós-gestação, sem comorbidades, que completou o ensino fundamental e atualmente é dona de casa. Teve parto cesárea do seu terceiro filho, com o RN pesando 3,925 kg e idade gestacional de 41 semanas. Durante a gestação a paciente não teve complicações.

O círculo destacado em preto, presente no painel de IL-6 (135,1 pg/mL), representa uma paciente de 37 anos, com IMC pré-gestacional de 22,7, classificado como adequado, estado nutricional classificado como sobrepeso pós-gestação, sem comorbidades, que completou o ensino fundamental e atualmente é tosadora. Teve parto normal do seu primeiro filho, com o RN pesando 2,505 kg e idade gestacional de 38 semanas. Durante a gestação a paciente desenvolveu hipertensão gestacional.

O círculo destacado em azul claro, presente no painel de IL-10 (278,5 pg/mL) e IFN- $\gamma$  (203,5 pg/mL), representa uma paciente de 25 anos, com IMC pré-gestacional de 24,7, classificado como adequado, estado nutricional considerado como sobrepeso pós-gestação, sem comorbidades, que completou o ensino fundamental e atualmente é costureira. Teve parto cesárea do seu segundo filho, com o RN pesando 2,16 kg e idade gestacional de 34 semanas. Durante a gestação a paciente desenvolveu infecção do trato urinário e pré-eclâmpsia.

O círculo destacado em magenta, presente no painel de IFN- $\gamma$  (359,2 pg/mL), representa uma paciente de 23 anos, com IMC pré-gestacional de 21, classificado como adequado, estado nutricional classificado como baixo peso pós-gestação, sem comorbidades, que completou o ensino médio e atualmente é garçõete. Teve parto normal do seu primeiro

filho, com o RN pesando 3,350 kg e idade gestacional de 38 semanas. Sem complicações durante a gestação.

O círculo destacado em rosa claro, presente no painel de proteína total (44,5 mg/mL), representa uma paciente de 20 anos, com IMC pré-gestacional de 24, classificado como adequado, estado nutricional classificado como sobrepeso pós-gestação, sem comorbidades, que completou o ensino médio e atualmente é atendente. Teve parto cesárea do seu primeiro filho, com o RN pesando 3,450 kg e idade gestacional de 38 semanas. Durante a gestação a paciente não teve complicações.

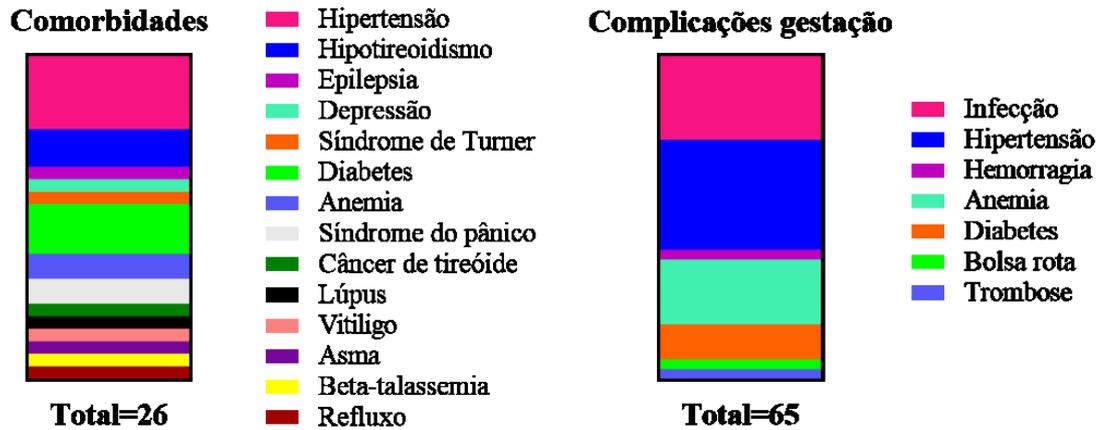
O círculo destacado em lilás, presente no painel de proteína total (48,5 mg/mL), representa uma paciente de 29 anos, com IMC pré-gestacional de 23,8, classificado como adequado, estado nutricional classificado como sobrepeso pós-gestação, sem comorbidades, que completou o ensino fundamental e atualmente é doméstica. Teve parto normal do seu quinto filho, com o RN pesando 2,885 kg e idade gestacional de 39 semanas. Durante a gestação a paciente não teve complicações.

O círculo destacado em marrom, presente no painel de ácido graxo (133263,3 mmol/L), representa uma paciente de 22 anos, com IMC pré-gestacional de 25,3, classificado como sobrepeso, estado nutricional classificado como sobrepeso pós-gestação, sem comorbidades, que completou o ensino fundamental e atualmente é dona de casa. Teve parto normal do seu quarto filho, com o RN pesando 2,875 kg e idade gestacional de 40 semanas. Durante a gestação a paciente não teve complicações.

O círculo destacado em verde claro, presente no gráfico de porcentagem de gordura (9,59589%) e Kcal (978), representa uma paciente de 19 anos, com IMC pré-gestacional de 37,8, classificado como obesidade, estado nutricional considerado como obesidade pós-gestação, sem comorbidades, que completou o ensino médio e atualmente é atendente. Teve parto normal do seu primeiro filho, com o RN pesando 3,460 kg e idade gestacional de 40 semanas. Durante a gestação a paciente desenvolveu anemia.

Também, foram analisadas quais as comorbidades e as complicações na gestação que as participantes deste estudo desenvolveram. Esses dados estão representados na Figura 28.

Figura 28 – Comorbidades e complicações apresentadas antes e durante a gestação.



Fonte: a autora

Há uma variedade de comorbidades e complicações que as participantes desenvolveram durante a gestação, sendo a hipertensão, hipotireoidismo e diabetes as comorbidades mais comuns encontradas antes da gestação e infecção, hipertensão, anemia e diabetes as complicações mais comuns durante a gestação. No entanto, de maneira geral, essas comorbidades e complicações estavam presentes em menos da metade das participantes deste estudo.

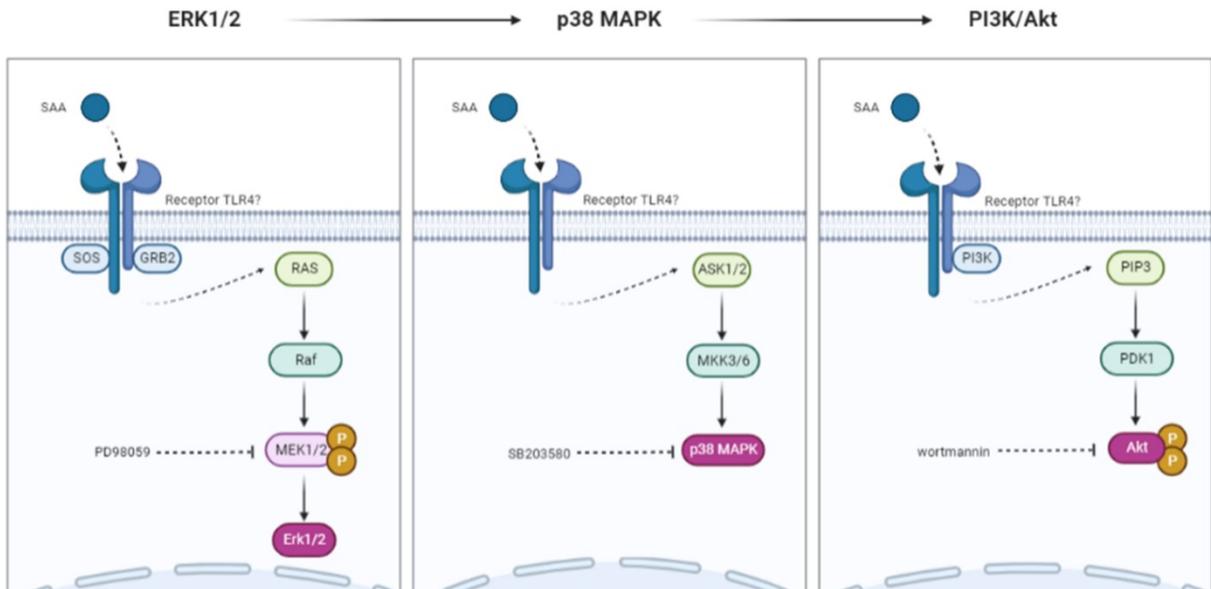
Portanto, nesta parte do estudo, observou-se que a composição do leite se manteve estável nas diferentes situações analisadas e os fatores que fizeram com que as concentrações dos parâmetros avaliados aumentassem aparentemente não tem relação com as características analisadas das participantes.

## 5.2 ESTUDO *IN VITRO*

### 5.2.1 Hipótese

Considerando que o tecido adiposo e a glândula mamária são tecidos adjacentes e que os adipócitos se transdiferenciam em células secretoras de leite durante a lactação, demonstrando a ligação entre esses dois tecidos, foi proposto que a sinalização de SAA nas células da mama ocorresse nas vias da ERK1/2, p38 MAPK e PI3K/Akt, da mesma forma que nos adipócitos (Figura 29).

Figura 29 – Hipótese de vias de sinalização da SAA na mama.



SAA, proteína sérica amiloide A. Fonte: a autora. Desenvolvido com BioRender

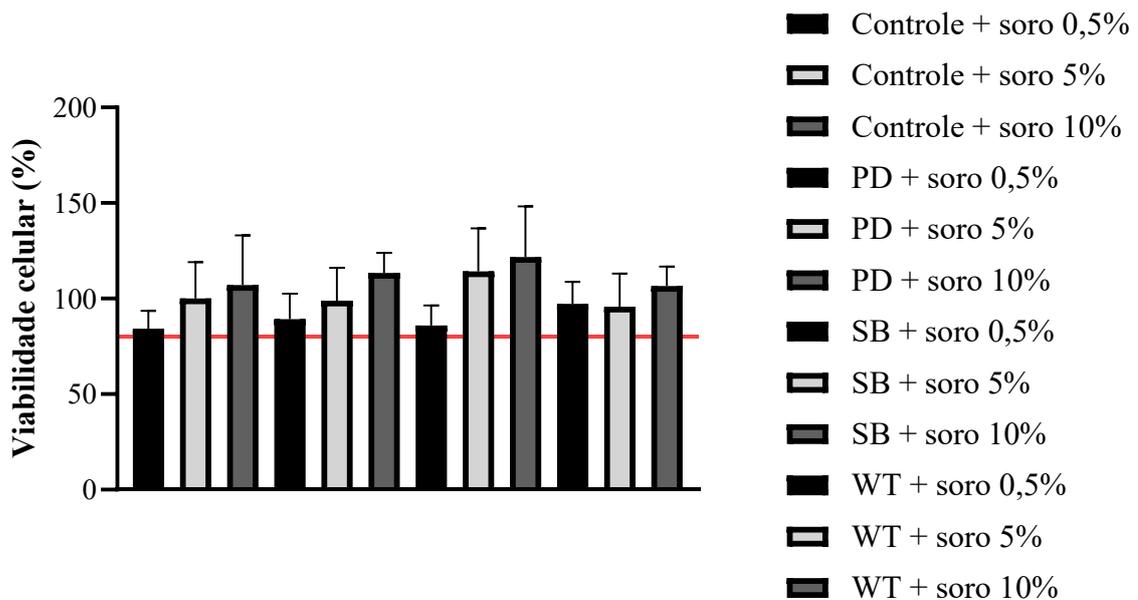
Na via da ERK1/2, ao ocorrer a ligação da SAA nos receptores de membrana, possivelmente o TLR4 (SANDRI *et al.*, 2008), ocorreria o recrutamento de proteínas como a GRB2 e fatores de troca de nucleotídeos como o SOS, que ativariam a RAS, que por sua vez ativariam as proteínas quinases Rafs, que forforilariam MEK1/2 e ativariam seus substratos ERK1/2. Nesse caso, o inibidor utilizado PD98059 inibiria a forforilação da MEK1/2, impedindo assim a ativação de ERK1/2. Na via da p38 MAPK, a hipótese era de que ao ser ativada por SAA, os receptores de membrana ativariam MAPKKs específicas como ASK1/2, que ativariam quinases secundárias como MKK3/6, que por sua vez ativariam p38. O inibidor específico desta via, o SB203580, atuaria inibindo a ativação de p38 MAPK. A última via proposta, a da PI3K/Akt seria também ativada pela ligação da SAA com seu receptor, que através da PI3K induziria a produção de PIP3 e consequentemente de PDK1, que fosforila e ativa a Akt. Nesta via, o inibidor wortmannin iria inibir a ativação de Akt. Todas as três vias podem atuar na proliferação celular, por isso, foi o primeiro teste a ser realizado.

### 5.2.2 Viabilidade celular

Para avaliar a citotoxicidade dos inibidores e também a viabilidade celular em diferentes concentrações de soro de cavalo, foi realizado o ensaio de MTT (Figura 30). Após a

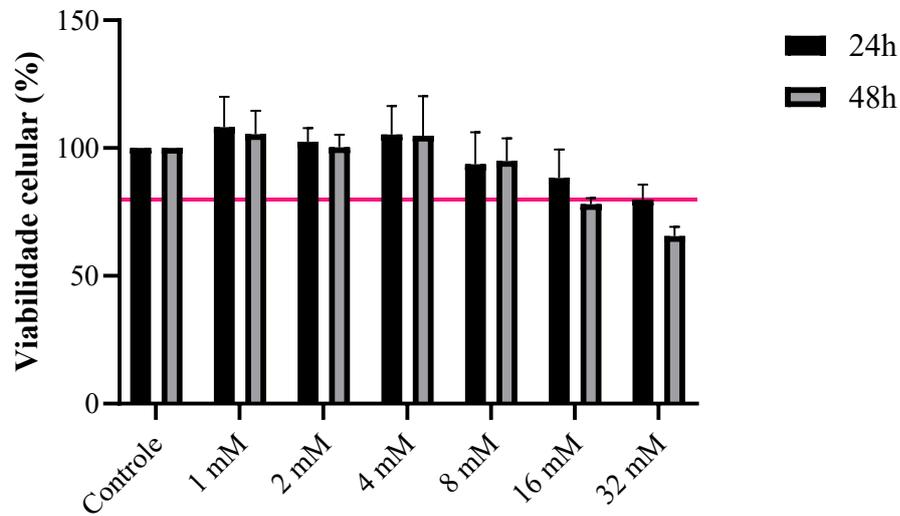
análise de viabilidade celular, viu-se que todas as células apresentaram viabilidade acima de 80%, independente do tratamento ou concentração de soro, portanto, os inibidores foram considerados não citotóxicos nas concentrações testadas (MARDASHEV; NIKOLAEV YA.; SOKOLOV, 2009). Portanto os inibidores puderam ser utilizados e também foi escolhida a concentração de soro de cavalo de 0,5% para os experimentos subsequentes. Também, foi realizado o ensaio de MTT para avaliar a citotoxicidade da metformina em diferentes concentrações (Figura 31). Após o ensaio, optou-se por utilizar a concentração de 8 mM, uma vez que as concentrações maiores (16 e 32 mM) apresentaram viabilidade abaixo de 80% após 48h de tratamento.

Figura 30 – Citotoxicidade dos inibidores.



Resultados expressos em média e desvio padrão. A linha vermelha indica viabilidade celular de 80%. Controle – meio de cultura sem tratamento; PD – tratamento com o inibidor PD98059 (50  $\mu$ M); SB - tratamento com o inibidor SB203580 (10  $\mu$ M); WT – tratamento com o inibidor wortmannin (100 nM). As porcentagens indicam a concentração de soro de cavalo utilizada em cada teste. N = 9. Fonte: a autora

Figura 31 – Citotoxicidade da metformina.

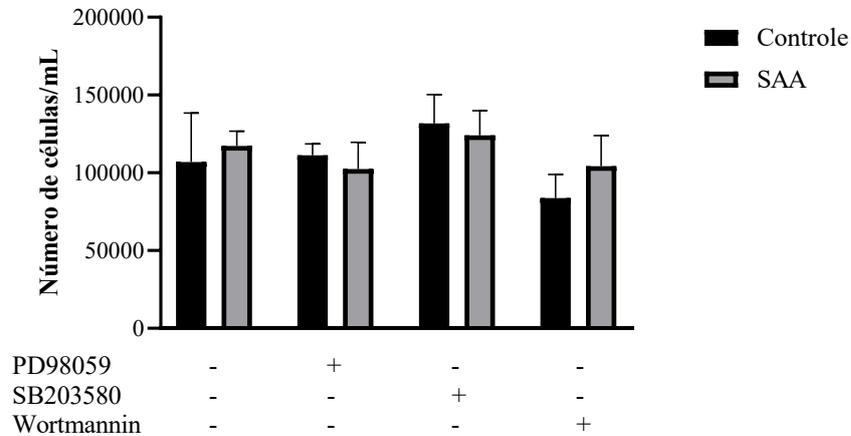


Resultados expressos em média e desvio padrão. A linha vermelha indica viabilidade celular de 80%. Controle – meio de cultura sem tratamento. N = 9. Fonte: a autora

### 5.2.3 Proliferação celular

O ensaio de proliferação celular foi realizado com o intuito de avaliar se os inibidores, na presença de SAA, poderiam diminuir a proliferação da célula mamária, indicando assim que a SAA possivelmente atuaria na via que estava sendo inibida. No entanto, foi visto que não houve diminuição significativa da proliferação em nenhuma das vias testadas (Figura 32), sugerindo que a SAA não atue diretamente em nenhuma das três vias (ERK1/2, p38 MAPK e PI3K).

Figura 32 – Contagem de células tratadas com SAA e inibidores específicos.

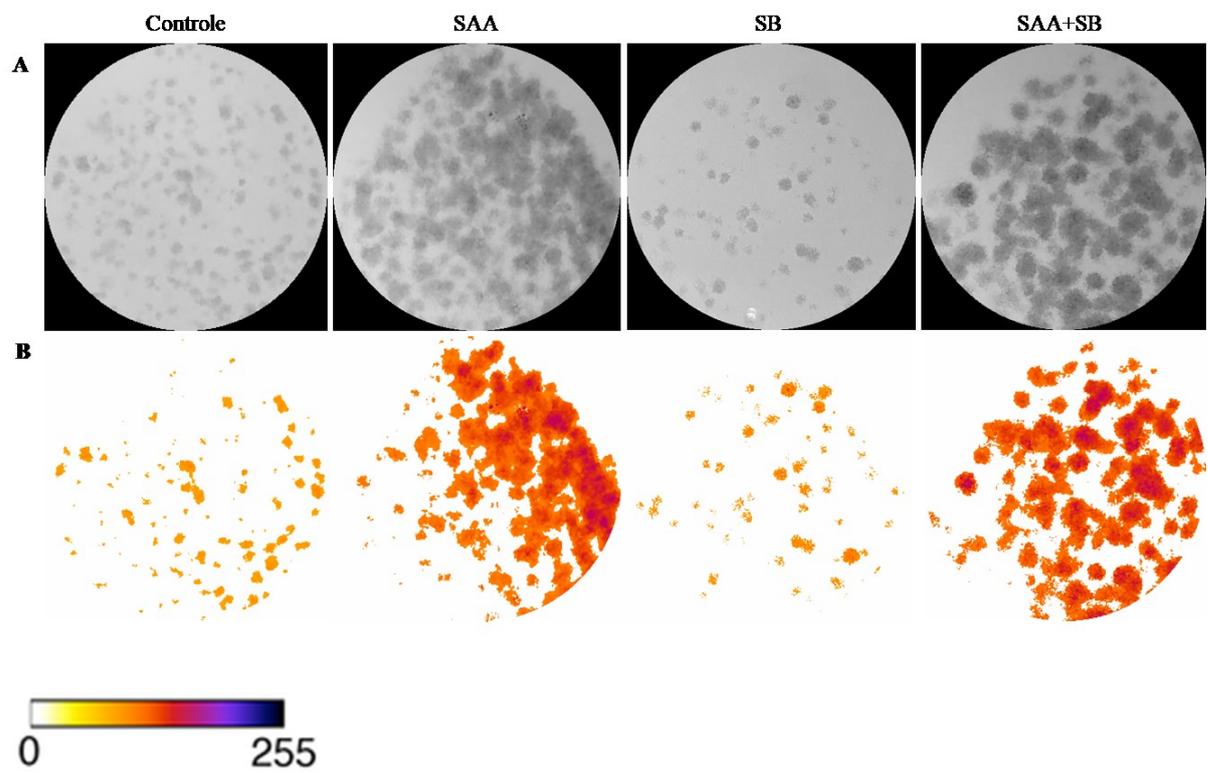
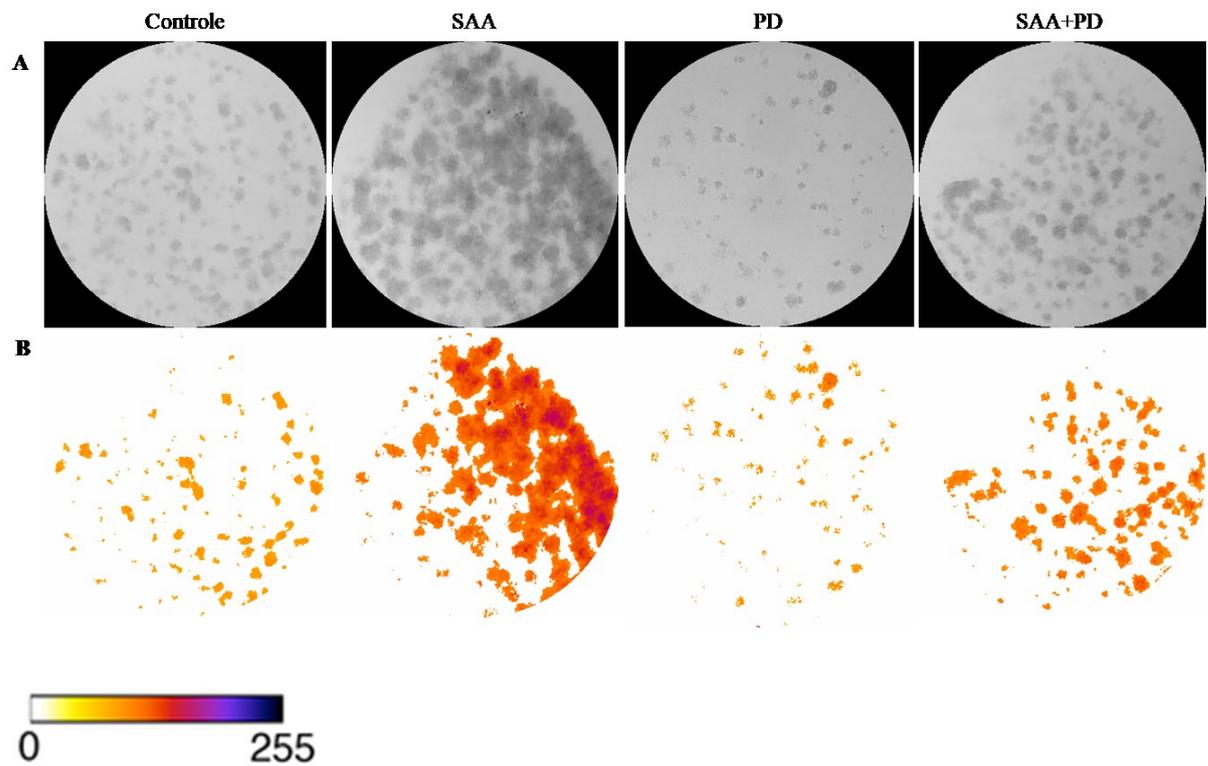


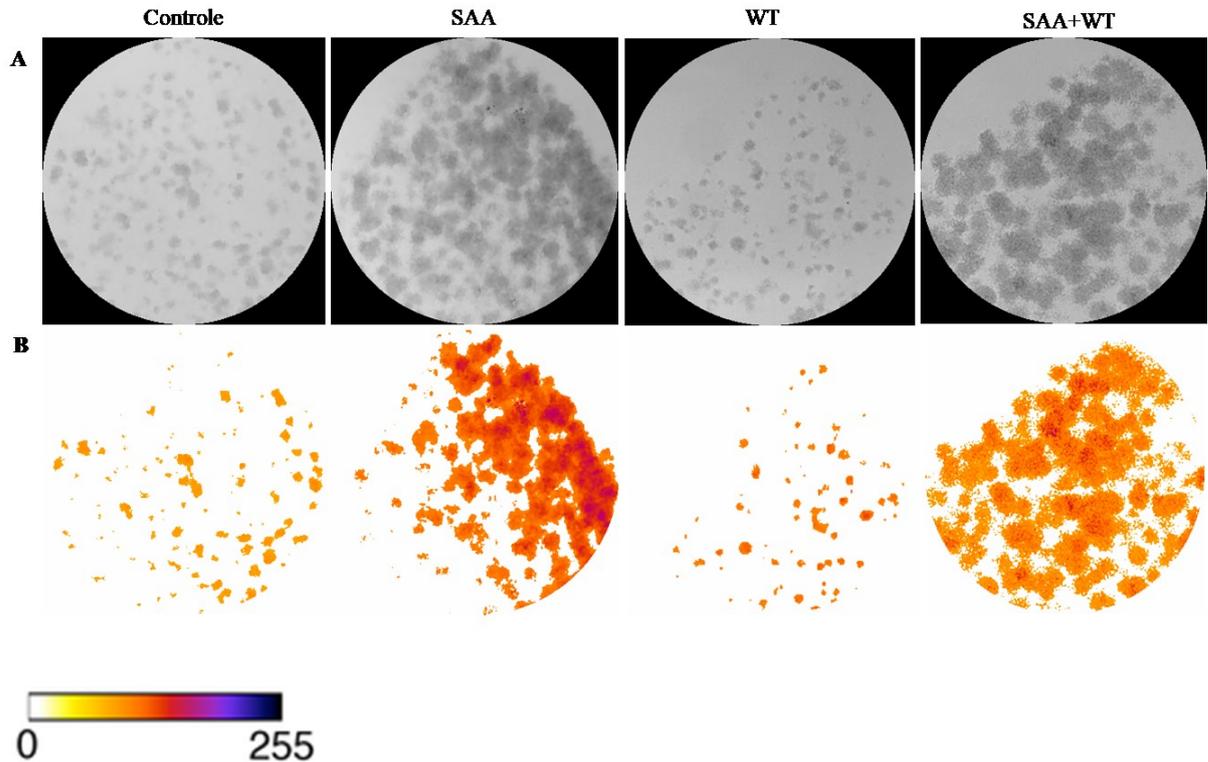
Resultados expressos em média e desvio padrão. PD98059 - 50  $\mu$ M, SB203580 - 10  $\mu$ M e wortmannin - 100 nM ou em associação com 5  $\mu$ g/mL de SAA. Controle – meio de cultura sem tratamento; SAA, proteína sérica amiloide A. *One way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni. N = 9. Fonte: a autora

#### 5.2.4 Ensaio clonogênico

Para confirmar o resultado obtido no ensaio de proliferação celular, foi realizado o ensaio clonogênico, em que se avaliou a capacidade das células tratadas ou não com os inibidores de sobreviverem e crescerem, produzindo colônias. As imagens feitas a partir de cada poço foram analisadas no software ImageJ em relação a intensidade de cor (Figura 33) e porcentagem da área do poço ocupada pela colônia (Figura 34).

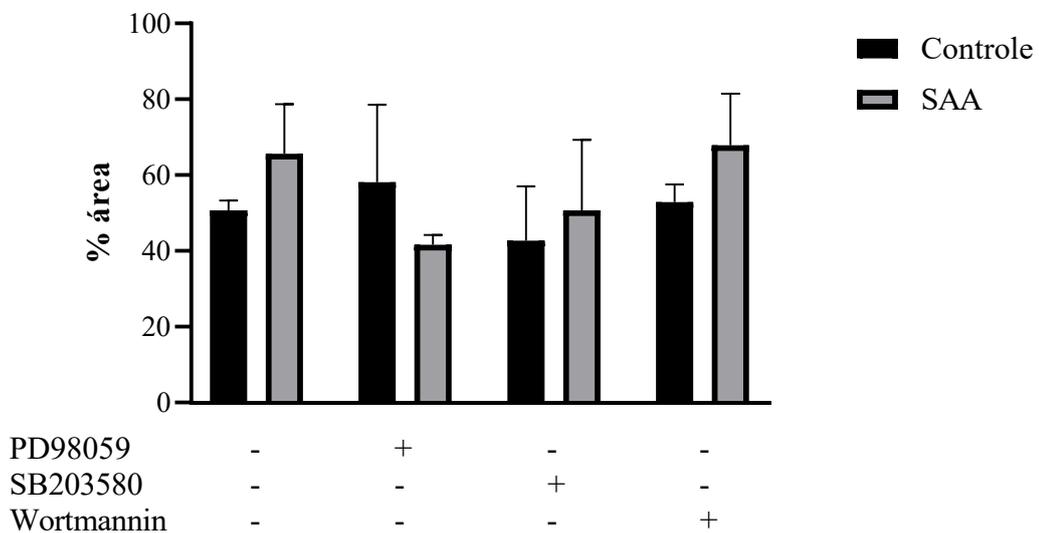
Figura 33 – Ensaio clonogênico.





Imagens obtidas utilizando-se o software ImageJ. (A) Imagens em escala de cinza de 8 bits de poços individuais demonstrando diferentes intensidades de formação de colônias de acordo com cada tratamento. (B) Mesmos poços individuais após limiarização e remoção do fundo pela macro “Colony\_thresholder”. Controle – meio de cultura sem tratamento; SAA – tratamento com a proteína SAA (5 µg/mL); PD – tratamento com o inibidor PD98059 (50 µM); SAA+PD – tratamento com a SAA (5 µg/mL) e com o inibidor PD98059 (50 µM); SB - tratamento com o inibidor SB203580 (10 µM); SAA+SB - tratamento com a SAA (5 µg/mL) e com o inibidor SB203580 (10 µM); WT – tratamento com o inibidor wortmannin (100 nM); SAA+WT - tratamento com a SAA (5 µg/mL) e com o inibidor wortmannin (100 nM). A barra de cores representa a escala de intensidade exibida nos poços com limiar. A intensidade zero (branco) corresponde às áreas onde não foram identificadas células (fundo). N = 9. Fonte: a autora

Figura 34 - Porcentagem da área total do poço ocupada pela colônia.



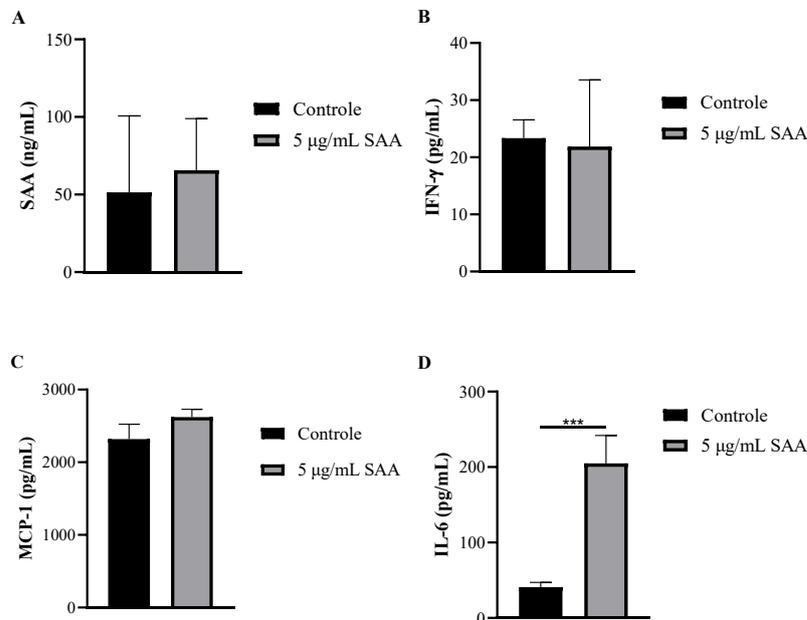
Resultados expressos em porcentagem média de área ocupada e desvio padrão. As amostras controle referem-se às amostras sem tratamento e SAA (proteína sérica amiloide A) refere-se às amostras tratadas com SAA 5 µg/mL. As células também foram tratadas com os inibidores farmacológicos específicos de ERK1/2 (PD98059 50 µM), p38MAPK (SB203580 10 µM) e PI3K (wortmannin 100 nM). *One way ANOVA* com pós-teste de Bonferroni. N = 9. Fonte: a autora

Corroborando com os resultados encontrados a partir do ensaio de proliferação celular, não houve diferença significativa entre os tratamentos, demonstrando que não houve diferença na capacidade da célula de produzir colônias mesmo quando tratadas com a SAA e os inibidores.

### 5.2.5 Dosagem de marcadores inflamatórios pelo método de ELISA

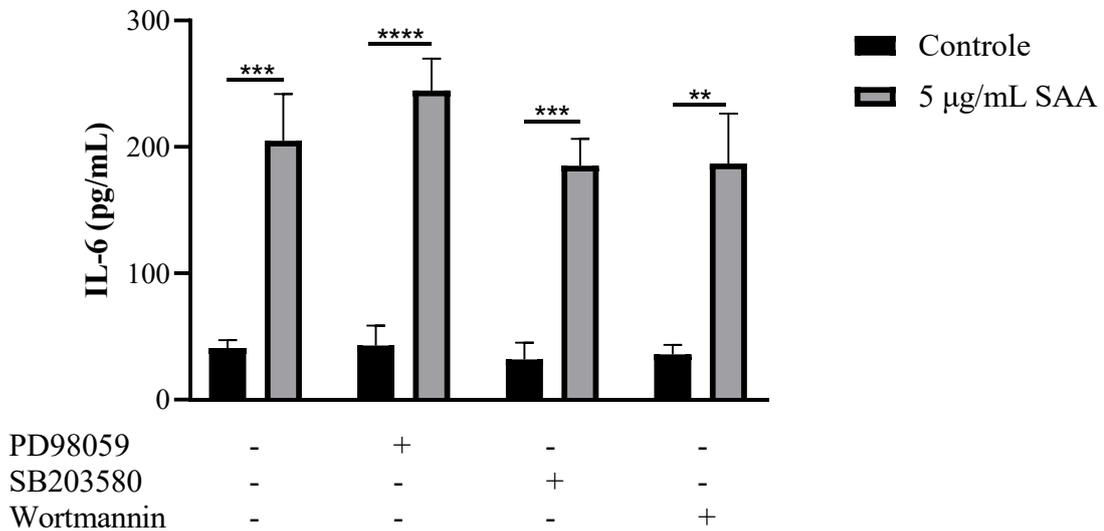
Utilizando o sobrenadante da cultura celular, foram avaliadas as concentrações de marcadores inflamatórios após o estímulo da SAA utilizando-se o método de ELISA (Figura 35). Também foi avaliada a concentração de IL-6 após o estímulo da SAA e também dos inibidores PD98059, SB203580 e wortmannin (Figura 36).

Figura 35 – Concentração de marcadores inflamatórios no sobrenadante celular.



Concentração da (A) SAA, (B), IFN-γ, (C) MCP-1 e (D) IL-6 no sobrenadante celular. Resultados expressos em média e desvio padrão. SAA, proteína sérica amiloide A; IFN-γ, interferon gamma; MCP-1, proteína quimioatraente de monócitos 1. N = 9. Fonte: a autora

Figura 36 – Concentração IL-6 no sobrenadante celular.



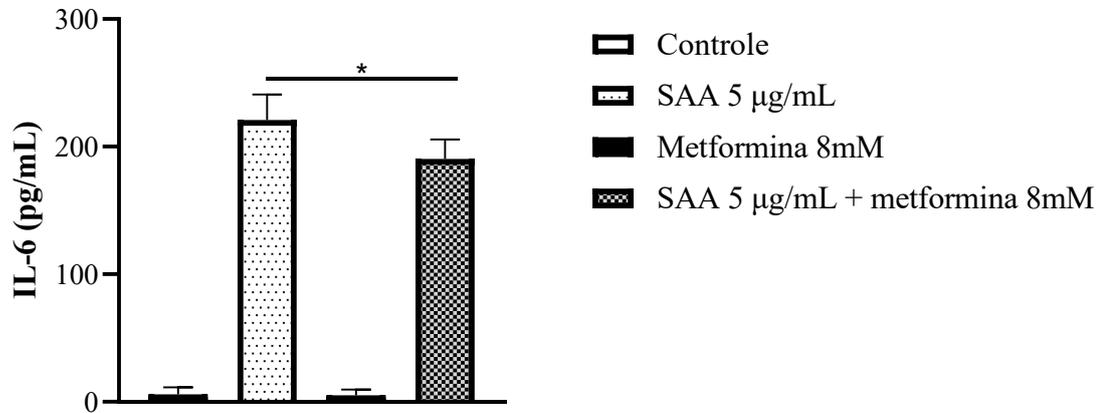
Resultados expressos em média e desvio padrão. As amostras controle referem-se às amostras mantidas em meio de cultura sem tratamento e SAA (proteína sérica amiloide A) refere-se às amostras tratadas com SAA 5 µg/mL. As células também foram tratadas com os inibidores farmacológicos específicos de ERK1/2 (PD98059 50 µM), p38MAPK (SB203580 10 µM) e PI3K (wortmannin 100 nM). *One way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

\*P<0,05; \*\*P<0,001; \*\*\*P<0,0005; \*\*\*\*P<0,0001. N = 9. Fonte: a autora

Através deste ensaio, viu-se que as células de mama expressam a SAA mesmo quando não estimuladas. Outro achado importante foi de que todas as células tratadas com SAA apresentaram maiores concentrações de IL-6 no sobrenadante em relação às não tratadas.

Além da análise de IL-6 como resposta aos inibidores, também foi realizado o ensaio de ELISA para dosagem de IL-6 no sobrenadante celular após tratamento com SAA e/ou metformina (Figura 37). Após o ensaio, viu-se que o tratamento com metformina diminuiu a expressão de IL-6 em células também tratadas com SAA (P=0,0144).

Figura 37 – Concentração IL-6 no sobrenadante celular após tratamento com metformina.

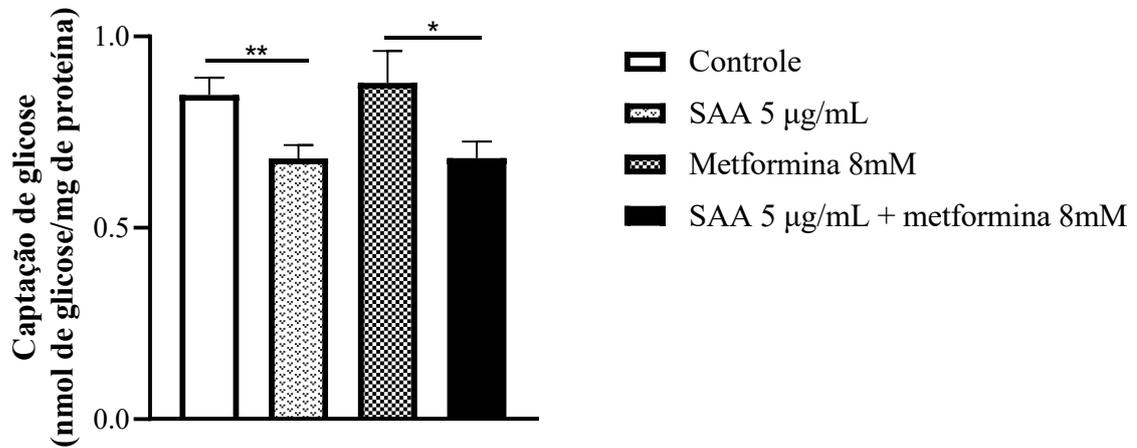


Resultados expressos em média e desvio padrão. As amostras controle referem-se às amostras mantidas em meio de cultura sem tratamento e SAA (proteína sérica amiloide A) refere-se às amostras tratadas com SAA 5 µg/mL. As células também foram tratadas apenas com metformina 8 mM e SAA 5 µg/mL com metformina 8 mM. Teste t de Student para amostras independentes. \*P=0,0144. N = 9. Fonte: a autora

### 5.2.6 Ensaio de captação de glicose

Para avaliar a capacidade de captação de glicose celular após diferentes tratamentos, foi realizado o ensaio de captação de glicose nas células de mama tratadas com SAA 5 µg/mL e/ou metformina 8 mM (Figura 38). Como resultado, as células tratadas com SAA apresentaram uma diminuição da capacidade de captação de glicose, independente do estímulo com metformina.

Figura 38 – Ensaio de captação de glicose.



Resultados expressos em média e desvio padrão. As amostras controle referem-se às amostras mantidas em meio de cultura sem tratamento e SAA (proteína sérica amiloide A) refere-se às amostras tratadas com SAA 5 µg/mL.

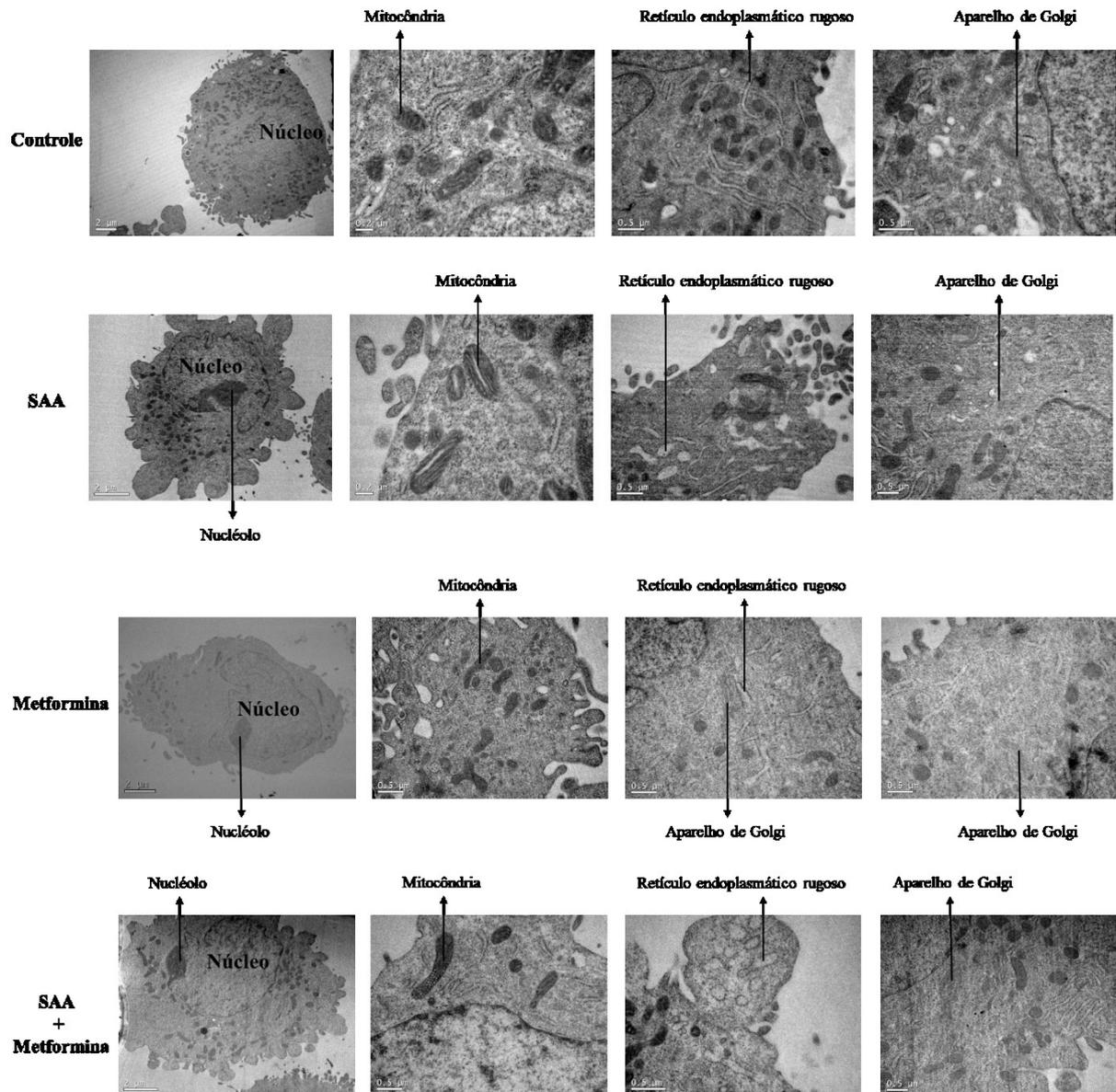
As células também foram tratadas com metformina 8 mM ou SAA 5 µg/mL e metformina 8 mM. Teste t.

\*P=0,039; \*\*P=0,0071. N = 9. Fonte: a autora

### 5.2.7 Análise morfológica por microscopia eletrônica de transmissão

A Figura 39 apresenta os principais achados do ensaio de microscopia eletrônica de transmissão.

Figura 39 – Análise por microscopia eletrônica de transmissão.



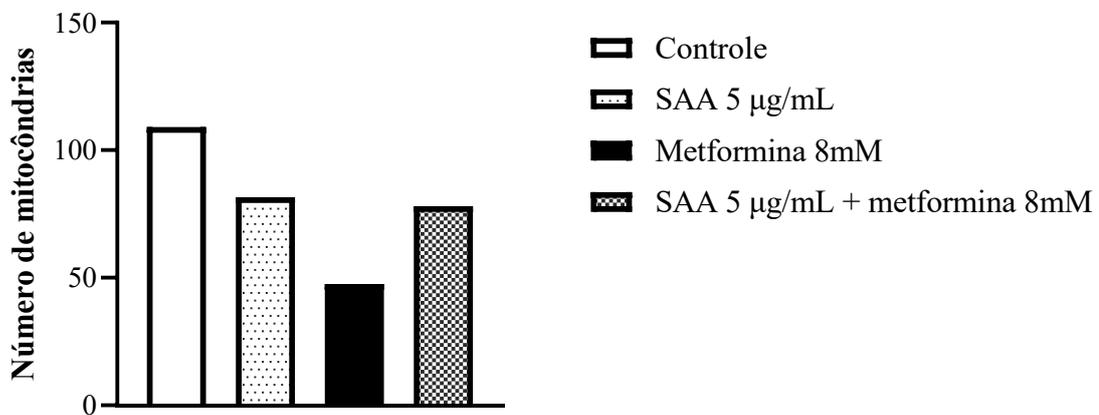
Fotomicrografias representativas dos cortes ultrafinos. Microscopia eletrônica de células MCF-10A. As amostras controle referem-se às amostras mantidas em meio de cultura sem tratamento; SAA (proteína sérica amiloide A) refere-se às amostras tratadas com SAA 5 µg/mL; metformina refere-se às amostras tratadas com metformina 8 mM; ou SAA + metformina refere-se às amostras tratadas com SAA 5 µg/mL e metformina 8 mM. N = 4. Fonte:

a autora

Por meio da análise das células por microscopia eletrônica de transmissão, percebeu-se uma ampla distribuição de mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso com morfologias dentro da normalidade nas células controle mantidas em meio de cultura sem tratamento. Já quando tratadas com SAA, as mitocôndrias apresentavam uma morfologia alterada, exibindo

um lúmen central; o retículo endoplasmático rugoso também apresentou lúmen aumentado em relação às células controle. Quando tratadas com metformina, notou-se uma diminuição do número de mitocôndrias. A Figura 40 representa a contagem do número de mitocôndrias em cinco células diferentes para cada situação analisada. Ao tratar com SAA em conjunto com metformina, o retículo endoplasmático rugoso apresentou-se novamente com um lúmen aumentado e as mitocôndrias também sofreram uma alteração estrutural, apresentando estruturas vesiculares em seu interior.

Figura 40 – Avaliação do número de mitocôndrias



Resultado da contagem de mitocôndrias por tratamento. Foram avaliadas cinco células por tratamento e os resultados expressos em média. As amostras controle referem-se às amostras mantidas em meio de cultura sem tratamento; SAA (proteína sérica amiloide A) refere-se às amostras tratadas com SAA 5 µg/mL; metformina refere-se às amostras tratadas com metformina 8 mM; ou SAA + metformina refere-se às amostras tratadas com SAA 5 µg/mL e metformina 8 mM. N = 4. Fonte: a autora

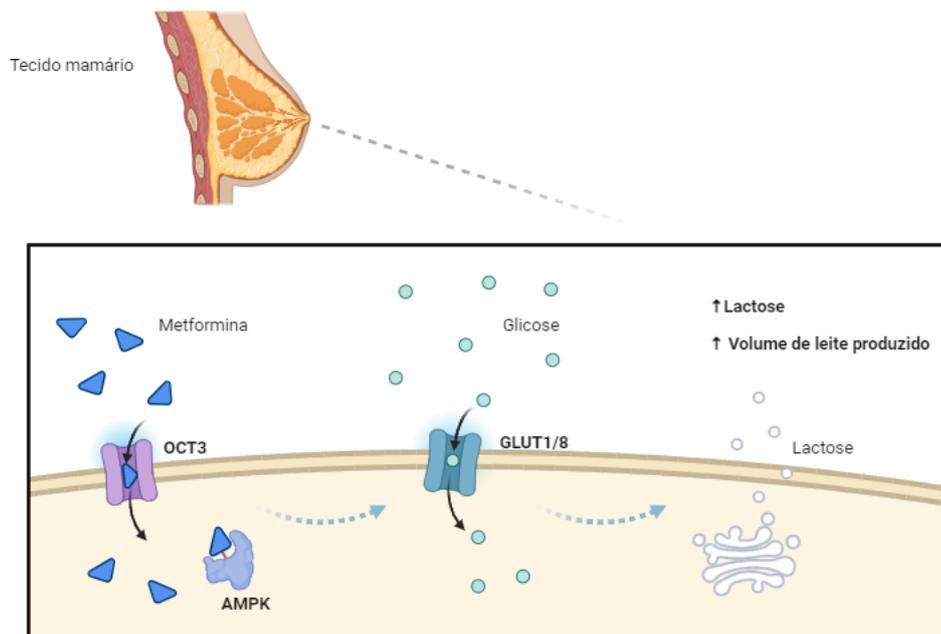
A partir destes resultados, percebeu-se que tanto a SAA quanto a metformina podem interferir nos processos fisiológicos da célula de mama humana utilizada, o que poderia ficar ainda mais exacerbado se tratadas por um período de tempo mais longo.

### 5.3 ESTUDO *IN SILICO*

#### 5.3.1 Hipótese

A hipótese deste estudo que explicaria a possível função da metformina como um galactagogo é de que a metformina entraria na célula mamária através do transportador OCT3, se ligando à proteína AMPK, promovendo a entrada de glicose na célula através do transportador GLUT1 ou GLUT8, aumentando a síntese de lactose a partir do complexo de Golgi e, conseqüentemente, o volume de leite produzido pela mama (Figura 41).

Figura 41 – Hipótese de mecanismo de ação da metformina como galactagogo.



Fonte: a autora. Desenvolvido com BioRender

### 5.3.2 Análise do transportador de metformina

Os transportadores da metformina OCT1, OCT2, OCT3, MATE1, MATE2, PMAT e OCTN1 são codificados pelos genes *SLC22A1*, *SLC22A2*, *SLC22A3*, *SLC47A1*, *SLC47A2*, *SLC29A4* e *SLC22A4*, respectivamente (LIANG; GIACOMINI, 2017). Após a análise de cada um deles na plataforma GTEx, obteve-se o número de transcritos por milhão (TPM) de cada um no tecido mamário e no tecido que havia maior expressão do gene (Tabela 7).

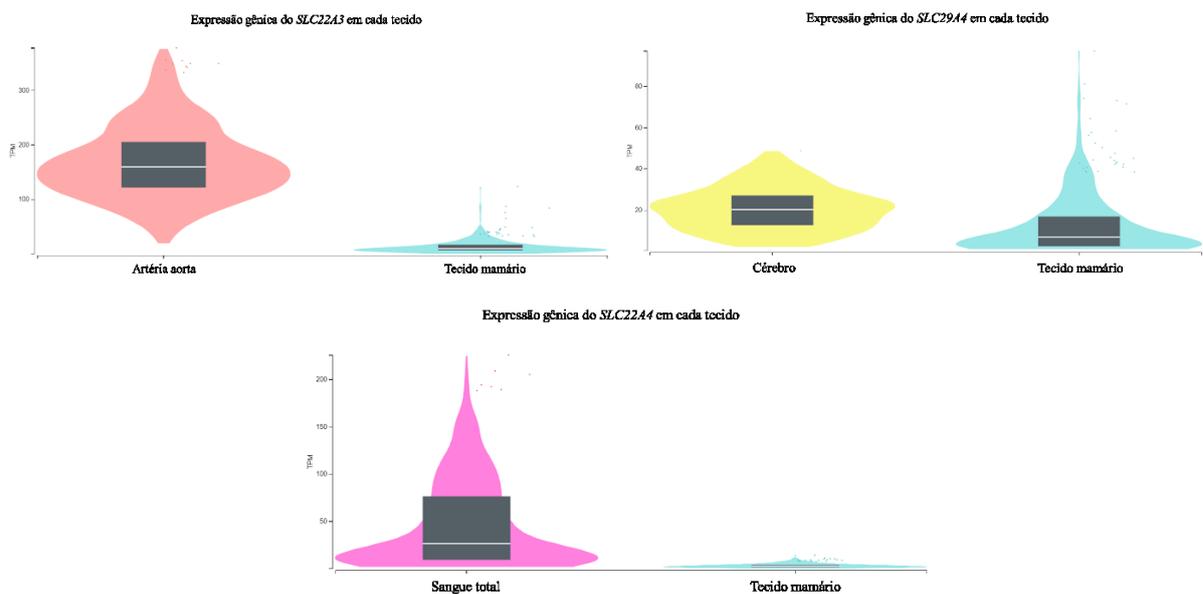
Tabela 7 – Expressão dos genes em diferentes tecidos.

Gene	TPM no tecido com maior expressão	TPM no tecido mamário
<i>SLC22A1</i>	Fígado	0,6910
<i>SLC22A2</i>	Rim	0,0064
<i>SLC22A3</i>	Artéria aorta	9,7760
<i>SLC47A1</i>	Glândula adrenal	1,7680
<i>SLC47A2</i>	Rim	0,1547
<i>SLC29A4</i>	Cérebro	6,7400
<i>SLC22A4</i>	Sangue total	2,4400

Dados obtidos da base de dados de transcriptoma Gtex. Valores expressam TPM, transcritos por milhão nos diferentes tecidos. Fonte: a autora

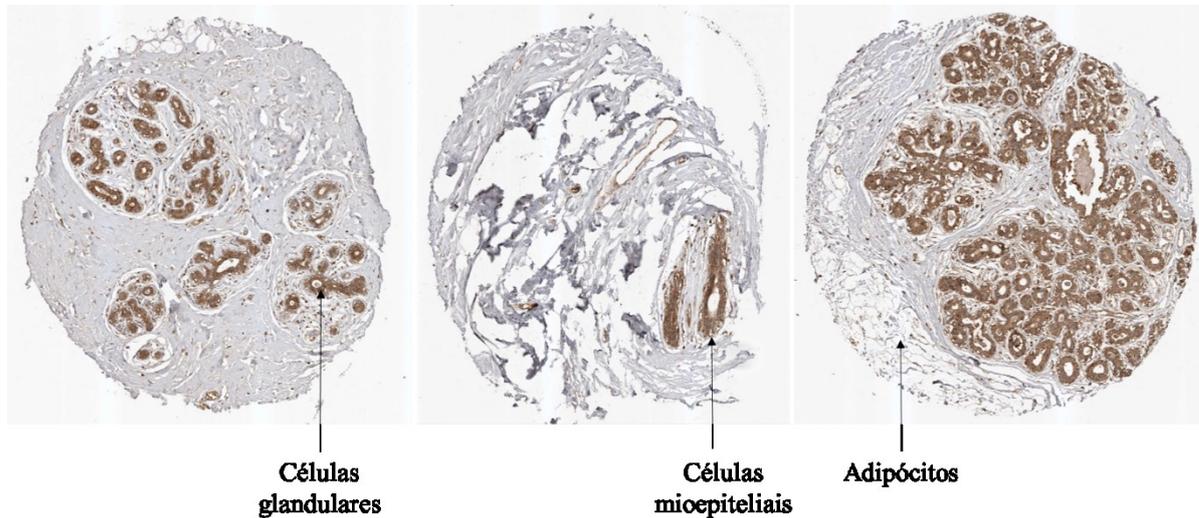
A partir da análise inicial, os genes *SLC22A3*, *SLC29A4* e *SLC22A4* foram escolhidos por apresentarem maior expressão no tecido mamário (Figura 42). Após, esses genes foram mapeados na plataforma *The Human Protein Atlas*. Ao final da análise, o gene *SLC22A3* foi selecionado por apresentar a maior expressão na mama, manifestando média expressão nos adipócitos e alta expressão nas células glandulares e mioepiteliais (Figura 43).

Figura 42 – Expressão dos genes selecionados em diferentes tecidos.



Dados obtidos da base de dados de transcriptoma Gtex. Valores expressam TPM, transcritos por milhão nos diferentes tecidos. Fonte: a autora

Figura 43 – Expressão de *SLC22A3* nas células mamárias.



Expressão do anticorpo anti-*SLC22A3* (HPA029750) em tecido mamário. Coloração imunohistoquímica utilizando o cromógeno diaminobenzidina e contrastada com hematoxilina. Fonte: The Human Protein Atlas, 2023

O gene *SLC22A3* (Gene ID: 6581) com localização 6q25.3 codifica a proteína transportadora *solute carrier family 22 member* também chamada *organic cation transporter 3* (OCT3), um transportador de cátions orgânicos de alta capacidade e baixa afinidade. O OCT3 desempenha um papel importante na absorção e eliminação da metformina, sendo assim, este transportador é um determinante crítico da biodisponibilidade e ação farmacológica da metformina (CHEN, E. C. *et al.*, 2015).

Após a inserção do gene *SLC22A3* na plataforma dbSNP e aplicação dos filtros “*missense*”, “Global MAF”, com uma variação de 0,000 a 0,3, foram obtidas 29 mutações e, em cada uma destas mutações, diferentes trocas de aminoácidos ocorreram. Com a informação das trocas de aminoácidos, essas mutações foram analisadas na plataforma PredictSNP, que recuperou 16 resíduos mutantes deletérios. Já na plataforma HOPE, foram encontrados nove resíduos mutantes deletérios, que condiziam com os resultados encontrados na plataforma PredictSNP e que eram referentes às seguintes mutações: rs199688797, rs187750009, rs202096123, rs183669984, rs373788380, rs577437871 e rs199817918, restando um total de

sete mutações. As informações referentes às mutações estão apresentadas na Tabela 8. As informações de frequência alélica foram acessadas na plataforma gnomAD.

Tabela 8 – Informações referentes às mutações.

<b>Identificação</b>	<b>Posição</b>	<b>Troca de aminoácido</b>	<b>Frequência alélica</b>
rs199688797	212	Arginina – Histidina	XX - 0,00002331 XY - 0,00001968
rs187750009	229	Isoleucina – Treonina	XX - 0,00009527 XY - 0,00005157
rs202096123	240	Arginina – Histidina	XX - 0,00002599 XY - 0,00001474
rs202096123	371	Arginina – Leucina	XX - 0,00002599 XY - 0,00001474
rs183669984	310	Arginina – Cisteína	XX - 0,00008512 XY - 0,00007187
rs373788380	361	Serina – Arginina	XX - 0,000 XY - 0,000007375
rs577437871	405	Glicina – Alanina	XX - 0,000008665 XY - 0,000
rs577437871	405	Glicina – Ácido Aspartático	XX - 0,000008665 XY - 0,000
rs199817918	464	Treonina - Arginina	XX - 0,00002600 XY - 0,000007368

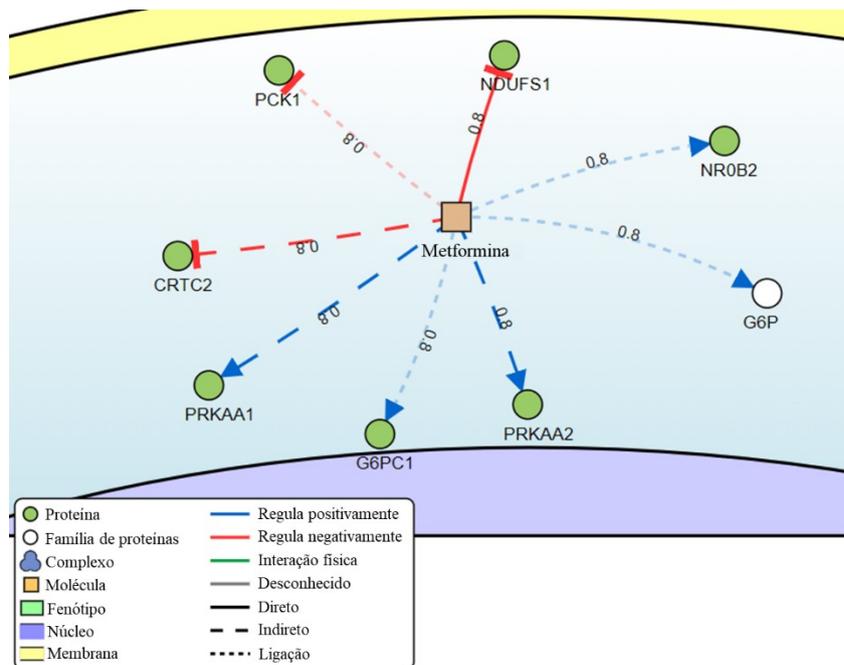
Fonte: PredictSNP e gnomAD

Salienta-se que os resíduos mutantes deletérios correspondem às trocas de aminoácidos presentes em cada mutação, ou seja, cada mutação pode apresentar mais de um resíduo mutante deletério, conseqüentemente, mais de uma troca pode ocorrer em determinado aminoácido daquela mutação. Posteriormente, foi avaliado se havia alguma interação entre o transportador OCT3 e a metformina através de ensaio de *docking* molecular. Os resultados estão representados no item 4.3.6.2.

### 5.3.3 Interações fisiológicas

Mesmo que o exato mecanismo de ação da metformina ainda seja incerto, há relatos na literatura que mostram que a metformina atue promovendo a ativação de AMPK em hepatócitos, inibindo a produção de glicose, bem como no músculo esquelético, induzindo a captação de glicose (ZHOU, G. *et al.*, 2001). No entanto, até onde se sabe, ainda não há relatos na literatura que mostrem a ação da metformina sobre a proteína AMPK no tecido mamário para estimular a produção de leite materno. Para tanto, primeiramente, buscou-se na plataforma Signor 3.0 os alvos da metformina disponíveis nesta base de dados (Figura 44).

Figura 44 – Alvos da metformina encontrados na base de dados Signor 3.0.



Fonte: Adaptado de Signor 3.0, 2023

A seleção da estrutura da proteína do tipo AMPK, denominada 4ZHX, foi realizada como detalhado no item 3.4.2. A análise da expressão desta proteína no tecido mamário apresentou uma faixa de expressão entre 3 a 7 TPM, através das plataformas Expression Atlas e *The Human Protein Atlas*. Confirmada a sua expressão na mama humana, posteriormente foi definido qual a subunidade da proteína a ser estudada. Tendo como base o único artigo que caracterizou estruturalmente esta proteína, produzido por Langendorf e colaboradores (2016),

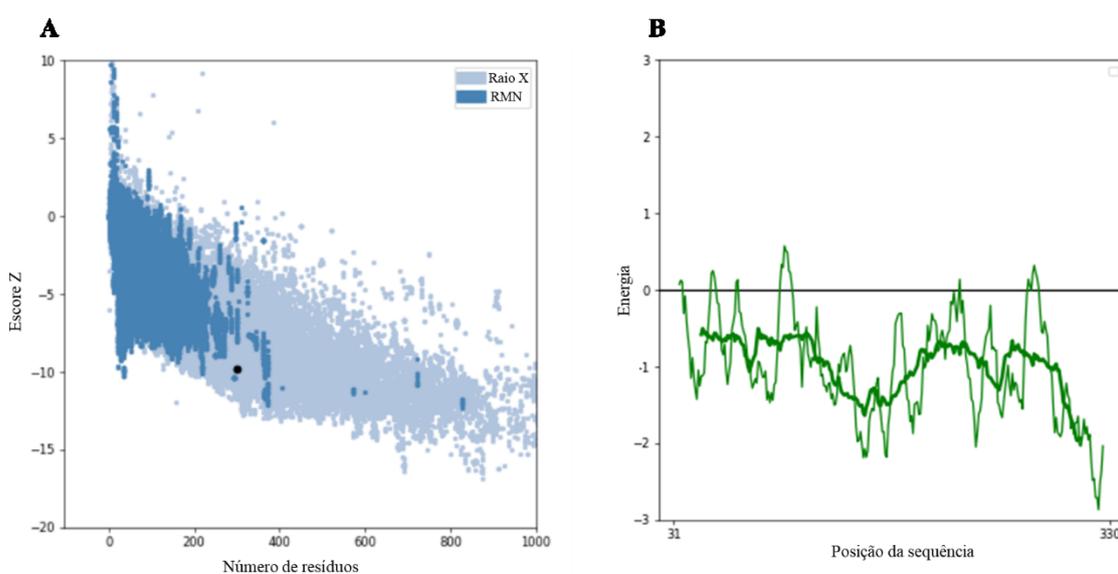
optou-se por utilizar a subunidade  $\gamma$ , uma vez que era o sítio de ligação da adenosina monofosfato (AMP) e também do ligante C2Z estudado neste mesmo artigo, que atuam como ativadores da proteína.

### 5.3.4 Qualidade dos modelos gerados

#### 5.3.4.1 Proteína 4ZHX

A pontuação Z (-9.81) predita pelo servidor ProSA-web garantiu a qualidade do modelo gerado para a proteína 4ZHX. Essa pontuação indica a qualidade geral do modelo e com esse gráfico foi possível verificar que a pontuação Z da estrutura modelo está dentro da faixa de pontuações encontrada para proteínas nativas de tamanho semelhante e resolvidas empregando-se o método de Raio X. Também utilizando o mesmo servidor, a qualidade do modelo foi verificada por meio de um segundo gráfico, em que valores positivos correspondem a partes problemáticas da estrutura. Considerando que a maior parte da estrutura se manteve dentro dos valores de energia negativos, foi possível confirmar novamente a qualidade do modelo gerado (Figura 45).

Figura 45 – Qualidade do modelo gerado.

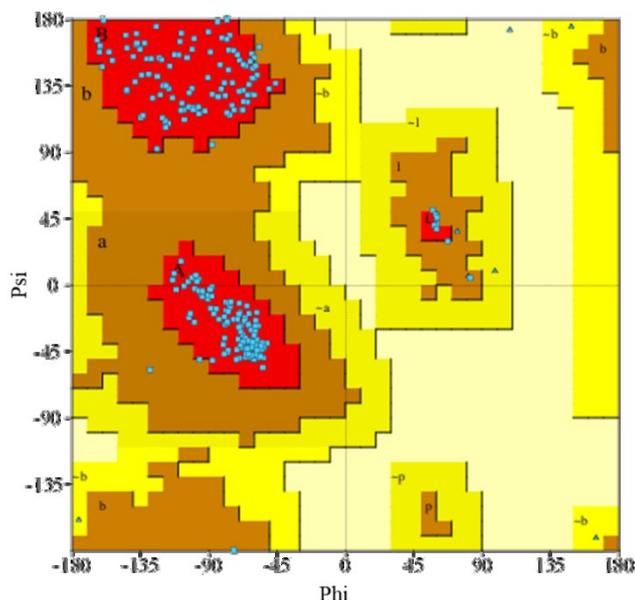


Avaliação da qualidade do modelo gerado a partir de (A) gráfico de escore Z e (B) gráfico de energia. Fonte:

ProSA-web, 2023

Também a fim de avaliar a qualidade do modelo gerado, foi realizado o PROCHECK do modelo a partir da plataforma PDBSum. O PROCHECK serve para verificar a qualidade estereoquímica de uma estrutura proteica, produzindo gráficos que permitem analisar sua geometria geral, a partir de todos os resíduos da proteína (Figura 46). A partir dessa avaliação observou-se que 95,7% dos resíduos encontravam-se em regiões mais favorecidas (em vermelho) e 4,3% em regiões adicionais permitidas (em marrom). Espera-se que um modelo de boa qualidade tenha mais de 90% nas regiões mais favorecidas, sendo assim, novamente foi possível confirmar a qualidade e permitir a validação do modelo gerado, sendo possível então iniciar a preparação para o *docking*.

Figura 46 – PROCHECK do modelo gerado.

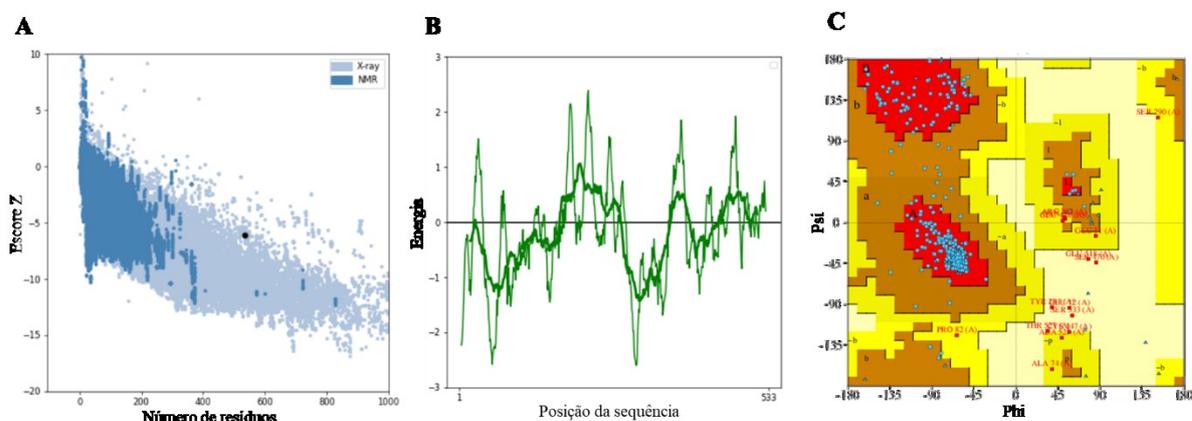


Vermelho – regiões mais favoráveis; marrom – regiões adicionais permitidas; amarelo – regiões generosamente permitidas; bege – regiões não permitidas. Os eixos Phi e Psi correspondem aos ângulos de torção de cada resíduo de aminoácido. Fonte: PDBSum, 2023

#### 5.3.4.2 Transportador OCT3

A análise da qualidade do modelo gerado pela plataforma *SwissModel* para o transportador OCT3 foi também realizado através das plataformas ProSA-web e PDBSum (Figura 47).

Figura 47 – Qualidade do modelo gerado.



Avaliação da qualidade do modelo gerado a partir de (A) gráfico de escore Z, a partir do ProSA-web, (B) gráfico de energia, a partir do ProSA-web e (C) PROCHECK do modelo, a partir do PDBSum. Vermelho – regiões mais favoráveis; marrom – regiões adicionais permitidas; amarelo – regiões generosamente permitidas; bege – regiões não permitidas. Os eixos Phi e Psi correspondem aos ângulos de torção de cada resíduo de aminoácido. Fonte:

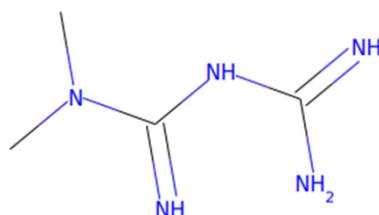
ProSA-web e PDBSum, 2023

O gráfico de escore Z obtido (-6.09) indica que a estrutura do modelo está dentro da faixa de pontuações encontrada para proteínas nativas de tamanho semelhante e resolvidas empregando-se o método de Raio X (Figura 47, painel A). No entanto, o gráfico de energias obtido através da mesma plataforma nos indica que o modelo apresentou algumas problemáticas (valores positivos) (Figura 47, painel B). Os dados do PROCHECK nos confirmam essa informação, uma vez que 1,3% dos resíduos encontraram-se em regiões não permitidas. No entanto, 90,4% dos resíduos encontraram-se em regiões mais favoráveis, sendo possível prosseguir para o ensaio do *docking* (Figura 47, painel C).

### 5.3.5 Predições do perfil ADMET

Como mencionado no item 3.4.4, a estrutura do ligante selecionada para este estudo foi obtida no Zinc15 (SMILES: [H]N=C(N)NC(=N[H])N(C)C), uma vez que esta estrutura, após análise de qualidade, não apresentou erros de ligação ou estruturais (Figura 48).

Figura 48 – Estrutura química da metformina.



Fonte: Zinc15, 2023

Sendo assim, utilizando-se os SMILES foi possível avaliar o perfil ADMET da metformina, utilizando as plataformas SwissADME e AdmetLab (Tabela 9).

Tabela 9 – Perfil ADMET da metformina.

<b>Perfil ADMET</b>		
<b>Propriedades físico-químicas</b>		<b>Servidor</b>
Peso molecular (g/mol)	129,16	SwissADME
Número de átomos pesados	9	SwissADME
Número de ligações rotativas	3	SwissADME
Número de aceptores de ligações H	2	SwissADME
Número de doadores de ligações H	4	SwissADME
TPSA (Å²)	88,99	SwissADME
<b>Solubilidade em água</b>		
Log S (ESOL)	Altamente solúvel	SwissADME
Log S	Muito solúvel	SwissADME
Log S (SILICOS-IT)	Solúvel	SwissADME
<b>Lipofilicidade</b>		
Log Po/w (iLOGP)	0,77	SwissADME
Log Po/w (XLOGP3)	-1,06	SwissADME
Log Po/w (WLOGP)	-1,03	SwissADME
Log Po/w (MLOGP)	-0,56	SwissADME
Log Po/w	-1,85	SwissADME
Consenso Log Po/w	-0,75	SwissADME
LogP	-2,492	AdmetLab

<b>Farmacocinética</b>		
Absorção gastrointestinal	Alta	SwissADME
Permeabilidade barreira hemato-encefálica	Não	SwissADME
P-gp inibidor	---	AdmetLab
CYP1A2 inibidor	Não	SwissADME
CYP3A4 inibidor	Não	SwissADME
CYP2C9 inibidor	Não	SwissADME
CYP2C19 inibidor	Não	SwissADME
CYP2D6 inibidor	Não	SwissADME
<b>Toxicidade</b>		
AMES (mutagenicidade)	--	AdmetLab
SkinSen (permeação cutânea)	-	AdmetLab
DILI	---	AdmetLab

TPSA – Área de superfície polar topológica; ESOL – solubilidade estimada; SILICOS-IT – solubilidade em água calculada pelo programa FILTER-IT; iLOGP – Log P implícito; XLOGP3 – lipofilicidade calculada pelo programa XLOG; WLOGP – lipofilicidade aparente; MLOGP – lipofilicidade calculada pelo método de Moriguchi; P-gp – glicoproteína P; DILI - lesão hepática induzida por drogas. Fonte: SwissADME e AdmetLab

Pelo estudo do perfil ADMET, pode-se constatar que a metformina é um fármaco solúvel em água, com alta absorção gastrointestinal, também confirmado pelo valor de TPSA, que serve como um descritor que mostra a correlação com o transporte molecular passivo através de membranas. Seus baixos valores de Log P também indicam baixa lipofilicidade, indicando uma baixa penetração pela membrana celular e, conseqüentemente, não permeia a barreira hemato-encefálica. Em relação à toxicidade, a metformina mostrou-se não tóxica nos três parâmetros avaliados.

### 5.3.6 *Docking* e dinâmica molecular

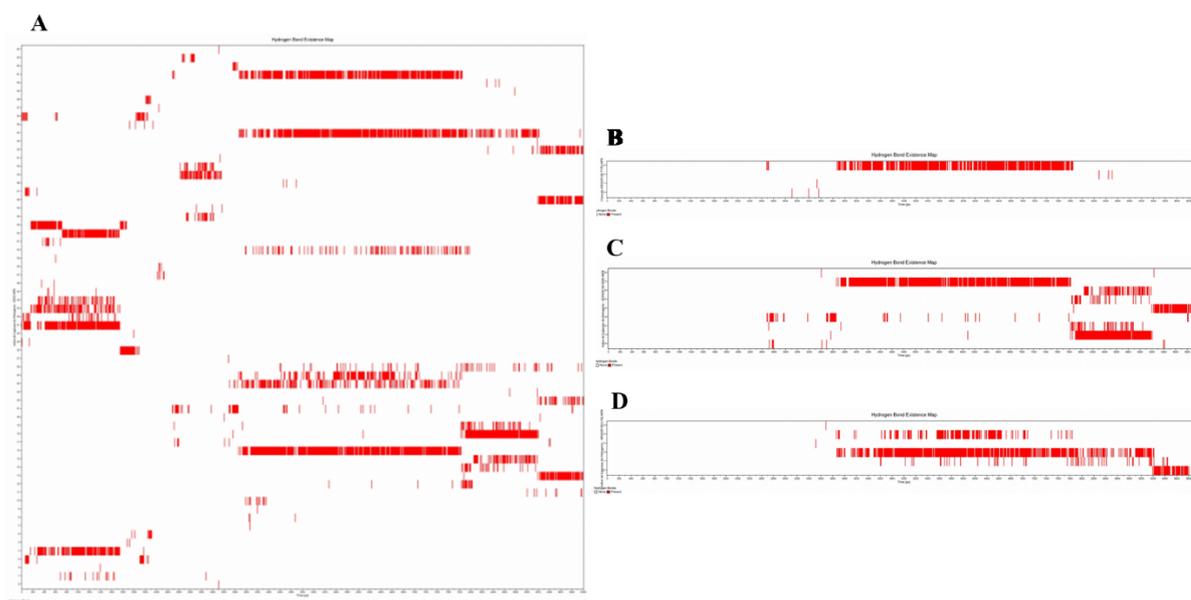
#### 5.3.6.1 Complexo proteína 4ZHX e metformina

Durante as simulações de *docking* molecular, foram geradas nove poses com seus respectivos valores de energia de afinidade de ligação entre proteína e ligante bem como seus respectivos valores de RMSD. As coordenadas da pose 1 foram então utilizadas para a dinâmica

molecular, por apresentar menor energia e maior quantidade de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

Após a simulação de dinâmica molecular de 10 ns, foi selecionado o *frame* com maior quantidade de ligações de hidrogênio entre a proteína e o ligante para análises adicionais de interações entre os resíduos de aminoácidos e o ligante. Para isso, foram selecionados os três resíduos com maiores taxas de ocupação durante a simulação, que foram a 126TYR (tirosina 126), com 33,5% de ocupação; a 130SER (serina 130), com 36,1% de ocupação; e a 132LYS (lisina 132), com 40,6% de ocupação. A Figura 49 mostra o mapa geral de ligações de hidrogênio bem como dos três resíduos separadamente, as linhas vermelhas simbolizam as ligações de hidrogênio formadas entre proteína e ligante. Foi selecionado então o *frame* de 5.200 ps, uma vez que foi o momento que apresentou maior quantidade de ligações de hidrogênio.

Figura 49 – Taxa de ocupação de ligações de hidrogênio.

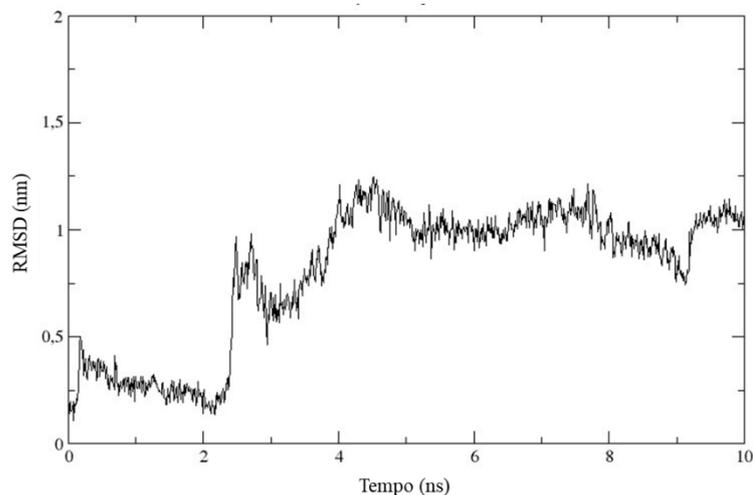


Imagens representativas da (A) taxa de ocupação geral de ligações de hidrogênio, (B) taxa de ocupação de ligações de hidrogênio com o resíduo 126Tyr, (C) taxa de ocupação de ligações de hidrogênio com o resíduo 130Ser e (D) taxa de ocupação de ligações de hidrogênio com o resíduo 132Lys. Fonte: GROMACS, 2023

Também, por meio do gráfico de RMSD, foi possível perceber que houve uma pequena variação a partir dos 2 ns, reflexo das ligações de hidrogênio formadas neste complexo e

indicando que o ligante apresentou uma forte interação com os resíduos de aminoácidos da proteína (Figura 50).

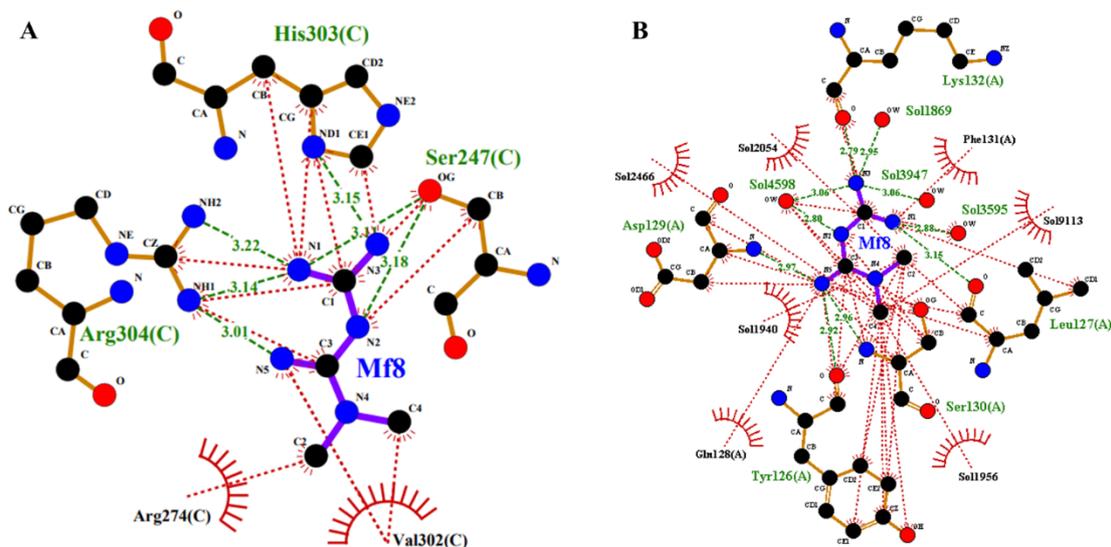
Figura 50 – Gráfico de RMSD.



RMSD - Root Mean Square Deviation. Fonte: GROMACS, 2023

A fim de comparação, buscou-se avaliar também as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas entre proteína e ligante na pose 1 do *docking* como também no *frame* selecionado da dinâmica molecular (Figura 51).

Figura 51 – Representação das interações entre ligante e proteína.



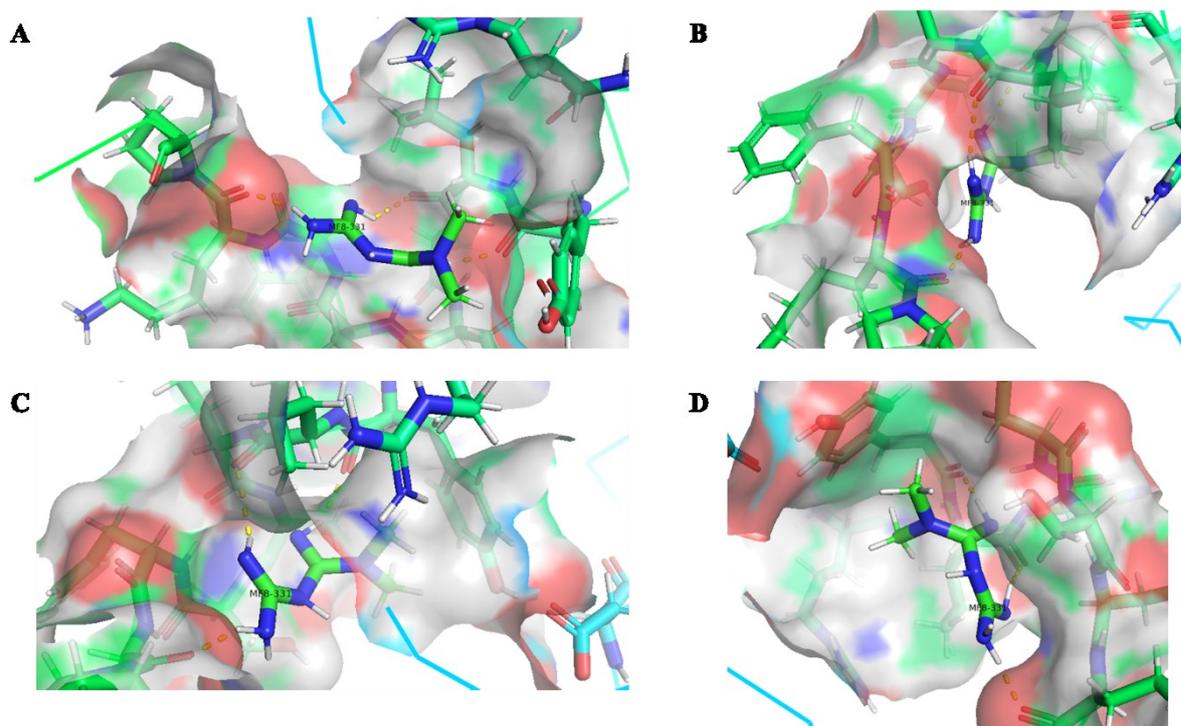
As ligações de hidrogênio estão destacadas pelas linhas tracejadas verdes e as interações hidrofóbicas estão destacadas pelas linhas pontilhadas vermelhas. (A) representação das interações entre o ligante e a proteína

dockada na pose 1, (B) representação das interações entre o ligante e a proteína no *frame* selecionado da dinâmica molecular. Mf8 – metformina. Fonte: Ligplot, 2023

Com essa análise, pode-se perceber que as interações entre o ligante e os resíduos de aminoácidos da proteína não são os mesmos, isso demonstra a movimentação do ligante enquanto interage com a proteína, permitindo a interação com diferentes resíduos.

Por último, a fim de representação, a Figura 52 mostra a cavidade onde o ligante metformina se encontra no *frame* selecionado após a simulação da dinâmica molecular.

Figura 52 – Representação das cavidades da proteína.



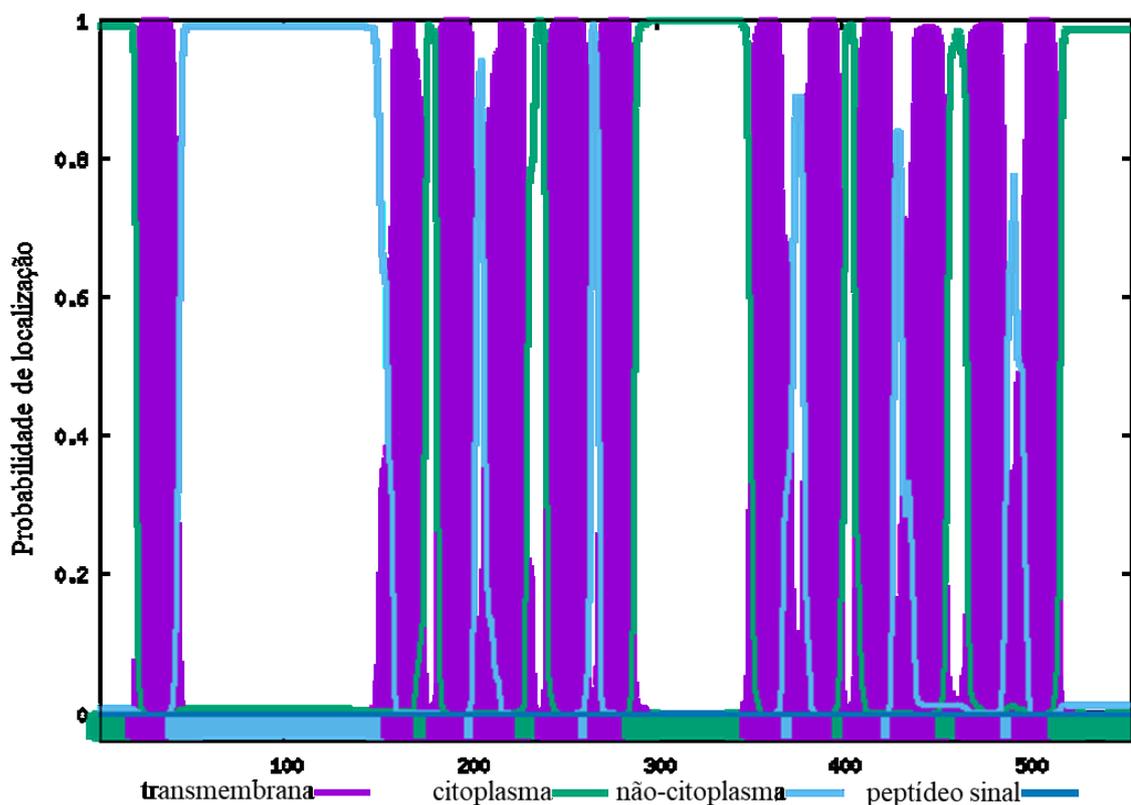
Diferentes ângulos da cavidade onde o ligante se encontra no *frame* selecionado após a dinâmica molecular. O ligante encontra-se destacado na imagem. Fonte: Pymol, 2023

### 5.3.6.2 Complexo transportador OCT3 e metformina

A fim de demonstrar a localização do transportador OCT3 na membrana, foi utilizada a ferramenta Phobius (Figura 53). Na imagem, há uma predição da localização do transportador, onde vemos em roxo as regiões transmembrana, em verde a região citoplasmática, em azul claro

a região não citoplasmática e a linha azul escuro representa a probabilidade de a região apresentar a função de peptídeo sinal.

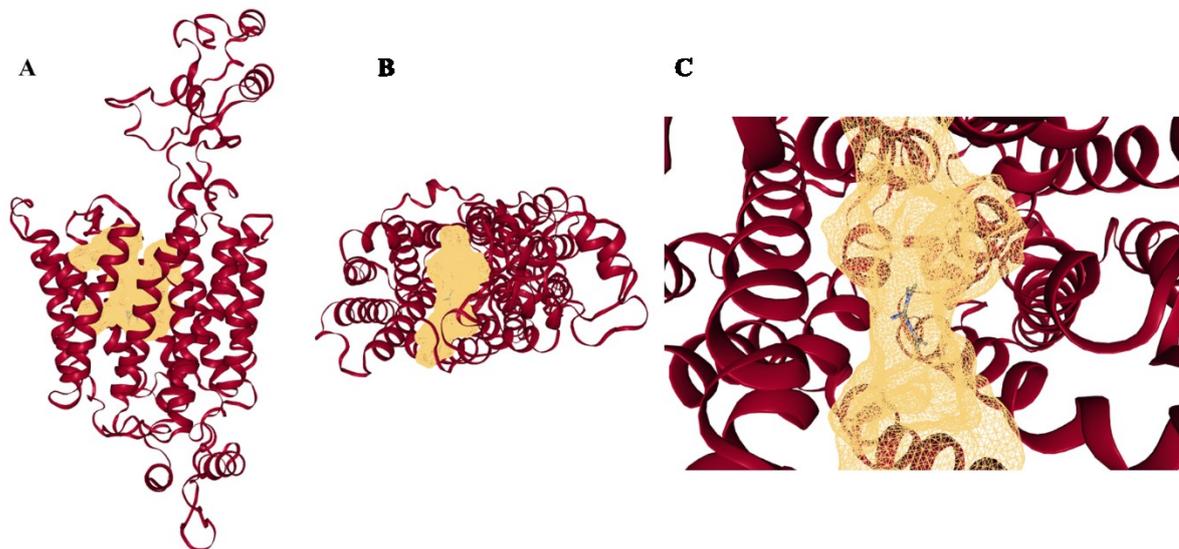
Figura 53 – Predição da localização do OCT3.



Fonte: Phobius, 2023

Após simulação de *docking* molecular entre o transportador OCT3 e o ligante metformina, viu-se que o ligante teve interação com a proteína na região do canal. A Figura 54 representa diferentes ângulos do *pocket* onde o ligante interagiu com o transportador, através da plataforma Proteins.plus.

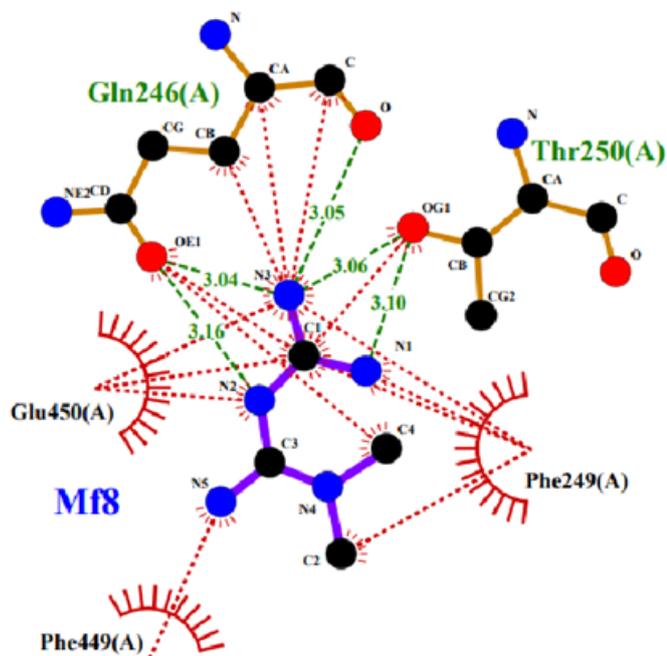
Figura 54 – *Pocket* de interação entre proteína e ligante.



Imagens representativas do *pocket* de interação entre ligante e transportador. (A) visão lateral do complexo, (B) vista de cima do complexo, sendo possível perceber o canal do transportador e (C) aumento da vista de cima do complexo com enfoque no ligante. Fonte: Proteins.plus, 2023

Também foi possível avaliar, utilizando-se o Ligplot, as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas que estavam ocorrendo entre o transportador e o ligante após a simulação do *docking* (Figura 55).

Figura 55 –Interação entre proteína e ligante.



Representação das interações entre o ligante e a proteína dockada na pose 1. As ligações de hidrogênio estão destacadas pelas linhas tracejadas verdes e as interações hidrofóbicas estão destacadas pelas linhas pontilhadas vermelhas. Mf8 – metformina. Fonte: Ligplot, 2023

Com as análises de bioinformática, foi possível prever que a metformina faz ligações tanto com a proteína 4ZHX quanto com o transportador OCT3 selecionados. Além disso, com a simulação da dinâmica molecular, viu-se que a metformina, ao se ligar no seu sítio da proteína, se mantém ligada até o final dos 10 ns, podendo ser tempo o suficiente para realizar a sua função. Também, as mutações encontradas para o transportador OCT3 podem alterar a estrutura do transportador e, por consequência, dificultar a entrada da metformina na célula, prejudicando a sua função.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliadas as concentrações de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e MCP-1) no soro de mães atendidas em maternidade pública terciária. Essas citocinas séricas e os hormônios (prolactina e progesterona) foram associados aos desfechos da amamentação. Um estudo anterior demonstrou que as citocinas IL-6 e MCP-1 foram maiores no momento do parto e diminuíram ao longo da lactação (GILA-DIAZ *et al.*, 2019). A MCP-1, conhecida como proteína quimioatraente de monócitos-1, é uma citocina conhecidamente responsável pelo recrutamento de macrófagos durante a inflamação. Entre vários fatores secretados que atraem células imunes para diferentes tecidos, a MCP-1 demonstrou desempenhar um papel crucial na infiltração de macrófagos no tecido adiposo (DOMMEL; BLÜHER, 2021). Briana e colaboradores (BRIANA *et al.*, 2007) coletaram amostras de plasma sanguíneo de mães durante o primeiro estágio do trabalho de parto e analisaram as concentrações de MCP-1. Em mães saudáveis, a concentração média de MCP-1 foi próxima a 500 pg/mL, semelhante ao encontrado neste estudo.

A IL-6, uma citocina pró-inflamatória, tem sido implicada na regulação do peso corporal e do conteúdo de tecido adiposo. Embora concentrações elevadas de IL-6 estejam geralmente associados à redução da ingestão alimentar e à perda de peso, a obesidade desencadeia um aumento destes marcadores devido à sua produção no tecido adiposo. Consequentemente, o impacto dos inibidores da sinalização da IL-6 no peso corporal e tecido adiposo permanece incerto (PATSALOS; DALTON; HIMMERICH, 2020). No estudo de Lv e colaboradores, foi encontrada uma concentração média de 6,3 pg/mL de IL-6 no plasma sanguíneo de gestantes no terceiro trimestre de gestação, resultado semelhante ao do presente trabalho, encontrado nas amostras de soro de mães coletados entre 24 e 48 horas após o parto (LV *et al.*, 2019).

Neste estudo, encontrou-se uma correlação positiva entre as concentrações séricas de MCP-1 e IL-6 circulantes. A proteína plasmática A associada à gravidez é secretada na circulação materna e participa do desenvolvimento e crescimento fetal. Estudos relataram que essa proteína induziu a expressão de algumas citocinas como MCP-1 e IL-6 (LI, Q. *et al.*, 2020), podendo justificar a correlação entre elas encontrada neste estudo.

Em relação às análises de leite materno, no presente trabalho, encontrou-se concentrações detectáveis de SAA no colostro humano, demonstrando que os recém-nascidos

amamentados foram expostos à essa proteína pela ingestão do leite materno, corroborando os resultados vistos por Sack e colaboradores (SACK *et al.*, 2018). Além disso, viu-se uma correlação positiva entre as concentrações de SAA e leptina e SAA e PCR no leite, ou seja, quanto maior a concentração de SAA, maiores eram também as concentrações de leptina e PCR no leite materno.

Já é bem descrito na literatura o papel da leptina na regulação da homeostase energética, função neuroendócrina e metabolismo. Por ser produzida principalmente no tecido adiposo branco e sua concentração estar diretamente relacionada com a porcentagem de gordura corporal, viu-se que sua principal função é controlar o apetite, sendo que altas concentrações de leptina diminuem a fome, enquanto baixas aumentam (OBRADOVIC *et al.*, 2021). No leite materno, a sua função ainda não é bem elucidada, no entanto, estudos têm demonstrado associação positiva entre a concentração de leptina no leite materno e o ganho de peso do neonato (SAVINO *et al.*, 2008). Uma das hipóteses é de que a absorção da leptina intacta é facilitada durante os primeiros estágios da lactação, visto que a mucosa gástrica do recém-nascido ainda está imatura, podendo então influenciar no ganho de peso infantil do primeiro ao segundo ano de vida, sugerindo uma relevância clínica da leptina durante o início da vida (SCHUSTER *et al.*, 2011). Em estudos em animais, viu-se também que uma deficiência na sinalização de leptina altera o desenvolvimento ductal e do tecido adiposo mamário (THORN *et al.*, 2010), além disso, o estrogênio, um dos responsáveis pelo desenvolvimento e ramificação dos ductos mamários, tendeu a aumentar a expressão de leptina no tecido adiposo mamário (THORN, S. R. *et al.*, 2007).

Em relação a PCR, esta proteína desempenha uma variedade de papéis no organismo, tanto fisiológicos quanto patológicos. Ela é considerada um biomarcador útil de infecção, lesão tecidual e inflamação, sendo um preditor de eventos cardiovasculares, contudo, ressalta-se que ela está fisiologicamente aumentada em indivíduos mais velhos (BONCLER; WU; WATALA, 2019). Um estudo demonstrou que o aleitamento materno está relacionado a concentrações mais baixas de PCR na vida adulta e, conseqüentemente, menor risco cardiovascular à longo prazo (WILLIAMS; WILLIAMS; POULTON, 2006). Também foi visto uma associação entre alto IMC pré-gestacional e ganho de peso durante a gestação com concentrações elevadas de PCR no leite materno, podendo levar a implicações importantes na saúde da prole, no entanto, essas implicações ainda são desconhecidas (KALKHORAN *et al.*, 2018).

As citocinas exógenas adquiridas através do leite materno são fundamentais para o desenvolvimento neonatal. Eles regulam a inflamação, auxiliam na cicatrização de feridas, protegem contra alergias e sepse, estimulam a hematopoiese, reforçam o desenvolvimento intestinal e a imunidade, ao mesmo tempo que aumentam os níveis de enterócitos (KIELBASA; GADZALA-KOPCIUCH; BUSZEWSKI, 2021). A citocina anti-inflamatória IL-10 dificulta o desenvolvimento de determinadas células do sistema imunológico ao mesmo tempo que promove outras, auxiliando na síntese de imunoglobulinas. Também exerce efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios no trato gastrointestinal do recém-nascido (HAWKES; BRYAN; GIBSON, 2002). Citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como MCP-1 e IL-8, ativam o sistema imunológico do recém-nascido e protegem contra infecções e traumas (HASHIRA; OKITSU-NEGISHI; YOSHINO, 2002; SASO *et al.*, 2019). Esses fatores desempenham um papel crucial na modulação do sistema imunológico neonatal e na maturação do trato gastrointestinal (DAWOD; MARSHALL, 2019). Para equilibrar a defesa imunológica e mitigar o dano tecidual, as citocinas anti-inflamatórias modulam as respostas pró-inflamatórias (MEKI *et al.*, 2003). Em nosso estudo, a análise das razões de citocinas revelou predomínio de citocinas pró-inflamatórias, possivelmente indicativo da necessidade do neonato de maturação do sistema imunológico e do trato gastrointestinal nos primeiros dias de vida.

Apesar de avaliar múltiplos fatores que potencialmente influenciam a composição de citocinas e macronutrientes no colostro, nossos resultados indicam estabilidade na composição do leite materno, indicando que ele sempre se modula para atender às necessidades do recém-nascido.

A obesidade materna atingiu proporções epidêmicas globais, com implicações em resultados cardiometabólicos e neurológicos adversos em recém-nascidos. Filhos de mães obesas, criados em ambiente intrauterino de excesso de peso, estão predispostos ao maior peso e conseqüente obesidade (NERI *et al.*, 2016), corroborado em nossa pesquisa onde filhos de mães com sobrepeso apresentaram peso significativamente maior em comparação com aqueles de mães com peso saudável pós-gestacional.

Além disso, mulheres com obesidade são menos propensas a amamentar e são mais propensas a parar de amamentar mais cedo do que mulheres com IMC < 25 Kg/m<sup>2</sup>, apesar das intenções semelhantes de amamentar (WOJCICKI, 2011). Dor mamária, baixa produção de leite, dificuldade em segurar o recém-nascido e menor confiança materna em sua capacidade de amamentar pela duração pretendida predispõem ao desmame precoce em mulheres com

sobrepeso e obesidade (STUEBE *et al.*, 2014). Além disso, problemas precoces relacionados à oferta insuficiente de leite podem explicar parcialmente a associação entre obesidade e os desfechos negativos do aleitamento materno exclusivo (HAUFF; LEONARD; RASMUSSEN, 2014).

Neste estudo, observou-se que o estado nutricional da mãe estava diretamente associado aos piores desfechos do estado de amamentação. Mulheres com obesidade, especialmente aquelas que relatam problemas de amamentação devido a leite insuficiente no período pós-parto inicial, podem se beneficiar de apoio adicional à amamentação (WIMLEY, 2017). No hospital onde foram realizadas as coletas de amostras para o presente trabalho, encontra-se o CIAM, um programa de incentivo ao aleitamento materno que auxilia na correta pega da mama e na sucção correta do recém-nascido enquanto a mãe está amamentando. Observou-se que quase 75% das mães mantiveram o aleitamento materno exclusivo após os seis meses, podendo se dar pela eficácia da equipe de incentivo ao aleitamento materno. No entanto, o fator fisiológico da obesidade ainda se sobrepõe ao incentivo ao aleitamento materno e ao apoio que as mães recebiam, pois, mães com sobrepeso e obesidade eram menos propensas a continuar com o aleitamento materno exclusivo em relação às mães com peso adequado ao longo dos 6 meses recomendados pela OMS.

Além da detecção de SAA no leite materno, também foi possível detectar a presença de SAA em células epiteliais mamárias, entretanto, há ainda uma lacuna na literatura a respeito do seu mecanismo e função nesse tecido, por isso, tentou-se elucidar qual era o seu papel e via de sinalização. Com base na literatura investigada, acredita-se que este é o primeiro estudo que tenta demonstrar qual o papel da SAA na mama. Visto que a glândula mamária possui uma estreita associação com o depósito de tecido adiposo mamário e que os adipócitos são importantes reguladores locais do crescimento das células epiteliais mamárias e considerando também a sua função durante a lactação (HOVEY; AIMO, 2010), foi proposto que a SAA atuasse nas mamas nas mesmas vias de sinalização que atua no tecido adiposo (ERK1/2, p38 MAPK e PI3K/Akt). Além disso, a leptina, como anteriormente citado, está relacionada com as concentrações de SAA no leite materno e também possui sua sinalização mediada pelas vias da PI3K, da MAPK e da ERK (OBRADOVIC *et al.*, 2021). Outra informação relevante para essa teoria é de que as citocinas regulam a proliferação celular e a inflamação na mama pelas vias MAPK e PI3K (BRENMOEHL *et al.*, 2018). Por isso, neste estudo, testou-se a capacidade de proliferação de células epiteliais mamárias após a inibição de três possíveis vias de

sinalização da SAA na mama, a via da ERK1/2, da p38 MAPK e da PI3K/Akt, bem como a expressão da SAA em resposta à inibição de suas vias.

Primeiramente, os inibidores foram testados quanto à sua citotoxicidade, para tanto, foi realizado o ensaio de viabilidade celular. Juntamente com essa avaliação, foi avaliado se a privação de soro levaria à morte celular. De acordo com o estudo de Kues e colaboradores, a privação de soro tem efeitos sobre o ciclo celular, permitindo uma sincronização do ciclo, de forma que a maior parte das células se encontrem no estágio G0/G1 (KUES *et al.*, 2000). Ao final deste experimento, observou-se uma viabilidade celular superior à 80%, independentemente do tratamento utilizado, portanto, seguiu-se para o experimento de proliferação celular utilizando-se concentrações pré-estabelecidas dos inibidores e da SAA, bem como a menor concentração de soro testada (0,5%). Tanto no ensaio de proliferação celular, através da contagem de células viáveis, quanto no ensaio clonogênico, em que foi possível avaliar a capacidade das células tratadas de formar colônias, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, sendo assim, a SAA, possivelmente, não atue na sinalização pró-proliferação de nenhuma das três vias investigadas.

No entanto, ao avaliar a expressão de citocinas no sobrenadante celular nos diferentes tratamentos, viu-se que, ao tratar as células com SAA houve uma maior expressão de IL-6. O IL-6 possui uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo modulação da resposta imune (HILTON; GOUGH, 1991), inflamação (TANIGAWA *et al.*, 2022), hematopoiese e oncogênese (PENNICA *et al.*, 1995), regulação do crescimento, sobrevivência e diferenciação celular (ABE *et al.*, 1991). Na mama, Zhao, Melenhorst e Hennighausen demonstraram que a IL-6 contribuiu para a indução da remodelação controlada do tecido mamário durante a fase de involução, em parte pela via MAPK. Eles também demonstraram que a expressão de IL-6 é induzida no tecido mamário em estágios iniciais da involução, sugerindo que ela é um indutor da remodelação mamária, e que essa involução é mediada por Stat3 (ZHAO; MELENHORST; HENNIGHAUSEN, 2002). O fator de transcrição Stat3 é ativado no tecido mamário após o desmame, conseqüentemente, uma inativação de Stat3 no epitélio alveolar resulta em retardo na remodelação tecidual durante a involução (CHAPMAN *et al.*, 2006). Em algumas doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide, viu-se que algumas citocinas como a IL-6 estimulam a expressão de SAA pela Stat3 (HAGIHARA *et al.*, 2005). Sendo assim, a SAA não necessariamente estaria relacionada ao desenvolvimento e proliferação de células mamárias, mas, talvez, no remodelamento delas, através da ativação por IL-6.

Além disso, buscou-se compreender também através dos experimentos *in vitro*, de que forma a metformina atua na mama humana. Até onde se sabe, este é o primeiro estudo que avaliou o seu papel em células mamárias humanas. Através da análise do sobrenadante, foi possível observar que a metformina diminuiu a expressão de IL-6 nas células de mama tratadas com SAA. Outros estudos demonstraram a relação entre metformina e expressão de IL-6. Zhao e colaboradores demonstraram que a metformina poderia inibir a transição epitelial-mesenquimal no adenocarcinoma pulmonar induzida por IL-6, possivelmente através do bloqueio da fosforilação de STAT3 (ZHAO, Z. *et al.*, 2014). Em outro estudo, desenvolvido por Nath e colaboradores, a metformina inibiu a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como a IL-6, em macrófagos de camundongos (NATH *et al.*, 2010). Também, Isoda e colaboradores observaram uma inibição da expressão de IL-6 em células vasculares tratadas com metformina através da inibição de NF- $\kappa$ B (ISODA *et al.*, 2006). Xu e colaboradores concluíram que as concentrações séricas de IL-6 em pacientes com SOP podem ser influenciadas pela metformina, uma vez que a utilização da terapia pode aliviar a inflamação crônica causada pela doença (XU, X. *et al.*, 2014).

Além da análise da concentração de IL-6 no sobrenadante celular, buscou-se avaliar a capacidade da SAA e metformina, em conjunto ou isoladamente, de captar glicose nas células mamárias. Como resultado, a SAA foi capaz de inibir a captação de glicose nas células, independente do tratamento com metformina. Os estudos de Oliveira e colaboradores e Monteiro e colaboradores demonstraram o efeito de inibição de captação de glicose induzida pela SAA em adipócitos através da diminuição de GLUT4, conseqüentemente, diminuindo o transporte de glicose (OLIVEIRA *et al.*, 2016; FILIPPIN-MONTEIRO *et al.*, 2011). No presente estudo não foi possível avaliar a expressão de GLUTs para identificar por qual mecanismo ocorre essa inibição, no entanto, acredita-se que possivelmente seja pela diminuição de GLUT1 e/ou GLUT8, uma vez que ambos realizam o transporte de glicose na mama (ZHAO *et al.*, 2014). Neste estudo, a metformina não aumentou a captação de glicose pela célula mamária como esperado, no entanto, alguns fatores devem ser considerados. A célula utilizada expressa SAA naturalmente, como visto no resultado do item 4.2.5, portanto, acredita-se que seja possível que a expressão fisiológica de SAA possa atenuar a possível captação de glicose promovida pela metformina. Bem como, também não foi possível realizar o ensaio de captação de glicose utilizando uma curva de tempo-dose-resposta, conseqüentemente, ainda não se pode concluir que a metformina não aumenta a captação de glicose nessa célula.

Por último, foram avaliadas as possíveis alterações morfológicas causadas nas células mamárias pós tratamento com SAA e/ou metformina através do ensaio de microscopia eletrônica. As imagens obtidas através do ensaio para as amostras controle foram similares aos descritos por Underwood e colaboradores. As células apresentavam abundantes mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso, este último necessário para a produção de leite durante a lactação. Também, invaginação do núcleo e escassos retículos endoplasmáticos lisos e aparelho de golgi (UNDERWOOD *et al.*, 2006).

Quando tratadas com SAA, as células apresentaram alguns sinais de estresse celular, como descontinuação das cristas mitocondriais e lúmens aumentados no retículo endoplasmático rugoso. Mitocôndrias de células de ratos tratadas com cetamina, que possui potencial neurotóxico, apresentaram estruturas semelhantes quando comparadas as células deste estudo tratadas com SAA (EUSTAQUIO *et al.*, 2018). Em outro estudo realizado por Kosta e colaboradores, a estrutura das cristas mitocondriais também se apresentou remodelada após privação de nutrientes em células de cepas de *Dictyostelium discoideum*, mesmo sem morte celular (KOSTA *et al.*, 2019). Em relação ao retículo endoplasmático, alguns estudos relataram a mesma variação da morfologia em diferentes situações e tipos celulares, como morte celular lipotóxica em células ovarianas (BORRADAILE *et al.*, 2006), hipóxia em cérebros de camundongos (CHAVEZ-VALDEZ *et al.*, 2017) e isquemia em cérebros de ratos (JIN *et al.*, 2018).

Quando tratadas com metformina, as células apresentaram uma diminuição do número de mitocôndrias. Alguns estudos mostraram que a metformina pode causar disfunção mitocondrial, como o de Yang e colaboradores, que demonstrou que o fármaco pode aumentar a captação de glicose através da inibição da função mitocondrial (YANG *et al.*, 2021). Também, Feng e colaboradores mostraram que a metformina, após entrar nas células através de OCTs, podem atingir as mitocôndrias e inibir seletivamente o complexo mitocondrial 1, bloqueando a respiração celular, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio e diminuindo os níveis de ATP. Por consequência, a AMPK seria ativada, promovendo a captação de glicose celular (FENG, J. *et al.*, 2022).

Ao tratar as células com metformina e SAA, foi possível perceber os mesmos sinais de estresse celular das células tratadas apenas com SAA, indicando que o estresse celular causado pela SAA não foi minimizado pelo tratamento com metformina.

Através deste ensaio também se percebeu que algumas células não apresentavam as características relatadas, portanto, aumentando o tempo em que se mantiveram em tratamento, possivelmente este efeito alcançaria mais células. Isso também pode explicar o motivo de não terem apresentado aumento de captação de glicose quando tratadas com metformina.

Outro foco deste estudo foi avaliar, por meio de abordagem *in silico*, o possível papel da metformina como um galactagogo no tecido mamário. Apenas um estudo avaliou o papel da metformina no aumento da produção de leite em lactantes com baixa produção de leite e sinais de resistência à insulina, permanecendo assim incerto o seu papel, não obstante, acredita-se que seja pelo seu efeito de sensibilização à insulina (NOMMSEN-RIVERS *et al.*, 2019). Até onde sabe-se, nenhum outro estudo avaliou o papel da metformina na mama por abordagem *in silico*.

Visto a importância da glicose para a produção do leite materno e também o papel da metformina para o tratamento da resistência à insulina, acreditou-se que esse seria um fármaco promissor a ser utilizado como galactagogo. Para isso, pesquisou-se os transportadores de metformina e seus respectivos genes codificantes, sendo eles OCT1, OCT2, OCT3, MATE1, MATE2, PMAT e OCTN1 e seus genes codificantes *SLC22A1*, *SLC22A2*, *SLC22A3*, *SLC47A1*, *SLC47A2*, *SLC29A4* e *SLC22A4*, respectivamente (LIANG; GIACOMINI, 2017).

Para descobrir se esses genes eram expressos na mama, utilizou-se a plataforma GTEX. A plataforma oferecida pelo NIH *Common Fund* visa estabelecer um banco de dados de recursos e banco de tecidos associados para permitir o estudo de relação entre variação genética e expressão gênica, além de outros fenótipos moleculares em diversos tecidos de referência (LONSDALE *et al.*, 2013). A partir dos resultados encontrados nesta plataforma, selecionou-se os três genes mais expressos no tecido mamário, que foram o *SLC22A3*, *SLC29A4* e *SLC22A4*. Após essa seleção, esses genes foram avaliados na plataforma *The Human Protein Atlas*, que é uma ferramenta útil para avaliar a localização e a expressão de proteínas em tecidos e células humanas por meio do mapeamento do proteoma humano por imuno-histoquímica e imunocitoquímica (THUL; LINDSKOG, 2018).

Após as avaliações de triagem, selecionou-se o gene *SLC22A3* que codifica o transportador OCT3, que foi o mais expresso no tecido de interesse, e avaliou-se quais as mutações já descritas desse gene estavam registradas na plataforma dbSNP. Esta plataforma fornece uma ampla gama de informações, incluindo mutações clínicas, variações de nucleotídeos, frequência populacional, consequência molecular e informações do mapeamento genômico (SMIGIELSKI *et al.*, 2000). Com esses dados, pode-se avaliar se essas mutações

eram ou não deletérias a partir das plataformas PredictSNP e HOPE. A plataforma PredictSNP fornece um resultado a partir do conjunto de dados de oito ferramentas: MAPP, nsSNPAnalyzer, PANTHER, PhD-SNP, PolyPhen-1, PolyPhen-2, SIFT e SNAP (BENDL *et al.*, 2014). Tanto a plataforma PredictSNP quanto a HOPE podem prever o efeito de substituição de aminoácidos e prever mutações relacionadas a doenças. A partir da análise dessas plataformas, sete mutações foram consideradas deletérias: rs199688797, rs187750009, rs202096123, rs183669984, rs373788380, rs577437871 e rs199817918. Ressalta-se que essas mutações, por serem consideradas deletérias, não necessariamente estão relacionadas a doenças.

As análises de *docking* molecular realizadas com o complexo metformina e OCT3 indicou que há uma interação entre a proteína e o ligante e ela ocorre no túnel central do transportador, local aonde a metformina também estaria sendo transportada. Também, as simulações de *docking* e dinâmica molecular entre a metformina e a proteína do tipo AMPK, 4ZHX, também demonstraram interação entre proteína e ligante, que se manteve ligado durante os 10 ns da simulação da dinâmica molecular, possivelmente promovendo a atividade da proteína.

Esses métodos computacionais vêm complementando a análise experimental. O *docking* molecular é um método *in silico* capaz de prever ligações entre moléculas e também prever as suas interações, no entanto, o nível da sua confiabilidade ainda é incerta. A associação com a técnica de dinâmica molecular, além de proporcionar um resultado mais preciso, também o complementa, uma vez que pode calcular energias de interação mais detalhadas, bem como fornecer informações sobre o mecanismo de ligação do complexo (SANTOS *et al.*, 2019).

Como um panorama geral do estudo, pode-se perceber que a composição do leite materno se mantém estável em diferentes situações, indicando que ele se modela para atender às necessidades do recém-nascido. No entanto, o fator estado nutricional pode interferir na continuação da amamentação. Também, as concentrações mais altas de citocinas pró-inflamatórias no colostro podem indicar uma necessidade do recém-nascido de receber essas citocinas para o desenvolvimento do seu sistema imunológico e gastrointestinal. Em relação à mama, a SAA pode estimular a expressão de IL-6 e inibir a captação de glicose, sendo assim, poderia estar relacionada com a diminuição precoce da amamentação devido à redução da produção de leite materno, bem como à involução mamária. A metformina pode apresentar um potencial de aumentar a produção de leite nesses casos, que não pôde ser confirmado com os

ensaios *in vitro*, provavelmente devido ao pouco tempo de tratamento, no entanto, os resultados da dinâmica molecular se mostraram promissores. Sugere-se, então, que sejam realizados os ensaios de captação de glicose realizando uma curva dose-tempo-resposta, utilizando tempos de tratamento mais longos.

## 7 CONCLUSÃO

- A composição do colostro se manteve estável nas diferentes situações estudadas, que foram estado nutricional e idade materna, bem como o tipo de parto;
- O estado nutricional da mãe pode interferir na continuação da amamentação;
- Foram encontradas concentrações mais altas de citocinas pró-inflamatórias no colostro em relação a citocina anti-inflamatória;
- A SAA pode estimular a expressão de IL-6 e inibir a captação de glicose em células de mama humana, bem como causar estresse celular;
- A metformina pode causar uma diminuição do número de mitocôndrias em células da mama humana;
- As predições *in silico* mostraram que ocorre interação entre os complexos metformina-OCT3 e metformina-4ZHX, possivelmente permitindo a captação de glicose pelas células.

## 8 PERSPECTIVAS

- Repetir os ensaios do estudo *in vitro* utilizando juntamente com a SAA, o inibidor da JNK;
- Realizar ensaio de RT-PCR para avaliar se a inibição de captação de glicose pela SAA é via GLUT1 ou GLUT8 (para este ensaio, já foi realizada a extração de RNA das amostras);
- Realizar o ensaio de captação de glicose com estímulo de SAA e metformina, porém, através de curva tempo-dose-resposta;
- Estimular as células de mama com prolactina e repetir os ensaios do estudo, de forma a aproximar-se de um ambiente mamário em lactogênese;

## 9 IMPACTO SOCIAL

Os impactos dos dados obtidos neste estudo na sociedade englobam o conhecimento de que fatores como estado nutricional materno, idade materna e o tipo de parto não afetam os componentes do leite materno avaliados neste trabalho. Esses resultados também podem amenizar as inseguranças maternas em relação a qualidade do próprio leite. Além disso, a busca por medicamentos galactagogos é essencial para aumentar a frequência e duração do aleitamento materno, sendo assim, o estudo de medicamentos seguros para gestantes e lactantes com o intuito de auxiliar a amamentação se faz necessário.

## **CAPÍTULO II**

### **Câncer de mama e p53: como superar as atuais barreiras no tratamento do câncer de mama**

Orientadora: Profa. Fabíola Branco Filippin Monteiro,  
Dra.

Coorientadora: Profa. Ana Carolina Rabello de Moraes,  
Dra.

Orientadora no exterior: Profa. Kelly Avery-Kiejda, Dra.

Florianópolis

2023

## RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais prevalente no mundo e a doença maligna mais comum entre as mulheres. Ele atinge mulheres de todos os países do mundo e em qualquer idade após a puberdade, mas com taxas crescentes na vida adulta. É uma doença heterogênea biologicamente e clinicamente falando, com variados aspectos histológicos e subtipos moleculares que apresentam diferentes etiologias, perfis de fatores de risco, respostas a tratamentos e prognósticos. O objetivo primário das estratégias de tratamento do câncer é promover a morte celular tumoral, portanto, as questões centrais na determinação da eficácia terapêutica são os fatores que afetam a morte celular e os mecanismos subjacentes. Atualmente, o supressor de tumor, a proteína p53 foi classificada como o "guardião do genoma", devido à sua capacidade de coordenar várias vias de sinalização envolvidas na resposta a danos no DNA, incluindo a indução da parada do ciclo celular e reparo de DNA ou apoptose. Sabe-se que as vias de sinalização de ER $\alpha$  e p53 estão interligadas no câncer de mama e que podem afetar a expressão e a atividade transcricional um do outro, impactando diretamente no crescimento do câncer. Apesar de as isoformas de p53 já serem conhecidas há mais de uma década, a sua relação com o câncer ainda não é totalmente elucidada. Desta maneira, têm-se tentado demonstrar que a isoforma  $\Delta 40p53$  pode desempenhar um papel crítico na modulação do eixo p53/ER $\alpha$  no câncer de mama através de linhagens de câncer de mama ER $\alpha$  positivas. Portanto, o objetivo do trabalho foi compreender a relação entre  $\Delta 40p53$ , p53 e sinalização de estrogênio em resposta ao tratamento com tamoxifeno no câncer de mama. Para isso, diferentes linhagens de câncer de mama que expressavam o receptor de estrogênio foram avaliadas, frente ao estímulo com tamoxifeno e/ou estradiol, como também após a superexpressão ou o knockdown de p53 e a sua isoforma  $\Delta 40p53$ . Com este estudo, viu-se que em células MCF-7, a superexpressão de  $\Delta 40p53$  resultou em diminuição da expressão de ER $\alpha$ , demonstrando a relação da isoforma com a sua sinalização. As células MCF-7 resistentes à tamoxifeno regulam a sinalização de ER $\alpha$  diferentemente da linhagem parental. O knockdown de p53 e  $\Delta 40p53$  atenuaram a resistência ao tamoxifeno em células MCF-7 resistentes, além disso as respostas celulares frente ao knockdown e à diferentes tratamentos é dependente da linhagem celular.

**Palavras-chave:** Câncer de mama. P53.  $\Delta 40p53$ . ER $\alpha$ .

## BREAST CANCER AND P53: HOW TO OVERCOME CURRENT BARRIERS IN BREAST CANCER TREATMENT

Breast cancer is the most prevalent type of cancer in the world and the most common malignancy among women. It affects women in every country in the world and at any age after puberty, but with increasing rates in adulthood. It is a biologically and clinically heterogeneous disease, with varied histological aspects and molecular subtypes that present different etiologies, risk factor profiles, responses to treatments and prognoses. The primary objective of cancer treatment strategies is to promote tumor cell death, therefore, the central questions in determining therapeutic efficacy are the factors that affect cell death and the underlying mechanisms. Currently, the tumor suppressor protein p53 has been classified as the "guardian of the genome" due to its ability to coordinate multiple signaling pathways involved in the response to DNA damage, including the induction of cell cycle arrest and DNA repair or apoptosis. It is known that the ER $\alpha$  and p53 signaling pathways are interconnected in breast cancer and that they can affect each other's expression and transcriptional activity, directly impacting cancer growth. Although p53 isoforms have been known for more than a decade, their relationship with cancer has not yet been fully elucidated. In this way, attempts have been made to demonstrate that the  $\Delta$ 40p53 isoform can play a critical role in modulating the p53/ER $\alpha$  axis in breast cancer through ER $\alpha$ -positive breast cancer lines. Therefore, the objective of the work was to understand the relationship between  $\Delta$ 40p53, p53 and estrogen signaling in response to tamoxifen treatment in breast cancer. For this, different breast cancer lines that expressed the estrogen receptor were evaluated, after stimulation with tamoxifen and/or estradiol, as well as after overexpression or knockdown of p53 and its isoform  $\Delta$ 40p53. With this study, it was seen that in MCF-7 cells, overexpression of  $\Delta$ 40p53 resulted in a decrease in ER $\alpha$  expression, demonstrating the relationship between the isoform and its signaling. Tamoxifen-resistant MCF-7 cells regulate ER $\alpha$  signaling differently than the parental cell line. Knockdown of p53 and  $\Delta$ 40p53 attenuated resistance to tamoxifen in resistant MCF-7 cells, in addition, cellular responses to knockdown and different treatments are dependent on the cell line.

**Keywords:** Breast cancer. P53.  $\Delta$ 40p53. ER $\alpha$ .

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma das principais preocupações de saúde entre as mulheres devido à sua alta incidência e mortalidade, sendo a taxa de sobrevivência em cinco anos no câncer de mama metastático inferior a 30% mesmo com quimioterapia adjuvante (RIGGIO; VARLEY; WELM, 2021). É o tipo de câncer mais prevalente no mundo e a doença maligna mais comum entre mulheres, atingindo mulheres de todos os países do mundo em qualquer idade após a puberdade, mas com taxas crescentes na vida adulta (WHO, 2021a).

Os dados mais recentes da GLOBOCAN (Global Cancer Observatory) 2018 produzidos pela IARC (International Agency for Research on Cancer) a partir da pesquisa realizada em 185 países relataram um aumento em 2,3 milhões de casos (11,7%) de câncer de mama e uma taxa de mortalidade de 6,9% e ainda há a previsão de que essa situação piore (BRAY *et al.*, 2018). A IARC estima que até 2040 a incidência de câncer de mama será maior que 3 milhões de novos casos por ano e a mortalidade irá aumentar em mais de 50%, resultando em mais de 1 milhão de mortes por ano (IARC, 2021).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020, haviam 2,3 milhões de mulheres com diagnóstico de câncer de mama e 685.000 mortes em todo o mundo. Ao final de 2020, haviam 7,8 milhões de mulheres vivas com diagnóstico de câncer de mama nos últimos 5 anos (WHO, 2021a). No Brasil, a situação se assemelha ao resto do mundo. Segundo os dados do INCA (Instituto Nacional de Câncer), excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente em mulheres de todas as regiões, com enfoque nas regiões Sul e Sudeste. A estimativa para o ano de 2023 é que sejam diagnosticados 73.610 novos casos, representando uma taxa de 41,89 casos a cada 100.000 mulheres. Além disso o câncer de mama é também a primeira causa de morte por câncer na população feminina no Brasil, apresentando uma taxa de mortalidade de 11,84 óbitos a cada 100.000 mulheres (INCA, 2022).

## 1.2 FATORES DE RISCO

Fator de risco se refere à qualquer circunstância que afete a chance individual de adquirir determinada doença, neste caso, o câncer de mama (FENG, Y. *et al.*, 2018). Alguns fatores de risco importantes para o câncer de mama são inerentes ao indivíduo, como por exemplo, o gênero, uma vez que as mulheres têm 100 vezes mais chances de adquirir a doença em relações aos homens. Outros fatores incluem também envelhecimento, uma vez que a maioria dos cânceres de mama são diagnosticados em mulheres com 55 anos ou mais, bem como parentesco de primeiro grau (mãe, irmã ou filha) diagnosticados com câncer de mama (COLDITZ *et al.*, 2012). Destacam-se também alguns outros fatores não genéticos, como etnia (mulheres caucasianas são mais suscetíveis) (SUN *et al.*, 2017), condições benignas da mama (mamas densas e fibrose) (DEGNIM *et al.*, 2005), lesões proliferativas (OZSOY *et al.*, 2017), radioterapia torácica (SUN *et al.*, 2017), exposição ao dietilestilbestrol (KAMIŃSKA *et al.*, 2015), contraceptivos e terapias de reposição hormonal (VOGEL, 2008), consumo excessivo de álcool (COLLINS *et al.*, 2006), sobrepeso e obesidade, falta de atividade física, nuliparidade entre outros (OZSOY *et al.*, 2017).

Além dos fatores de risco citados anteriormente, há também causas ligadas a mutações genéticas hereditárias que compreendem 5 a 10% dos casos, como a mutação no gene BRCA1 ou BRCA2 (ALLISON, 2012). Mulheres com mutação no gene BRCA1 têm um risco de 55 a 65% de desenvolver câncer de mama ao longo da vida, bem como mulheres com mutação no gene BRCA2 tem um risco de 45%. Num panorama geral, mulheres com uma das duas mutações tem 70% de chances de adquirir câncer de mama até os 80 anos (COLDITZ *et al.*, 2012). Mutações em outros genes também podem levar ao aumento do risco de câncer de mama, como mutação em ATM ou TP53 (pode também causar a síndrome de Li-Fraumeni) (COLDITZ *et al.*, 2012), CHECK2, PTEN, CDH1 (POLYAK, 2007), STK11, CDH1 e PALB2 (ALLISON, 2012).

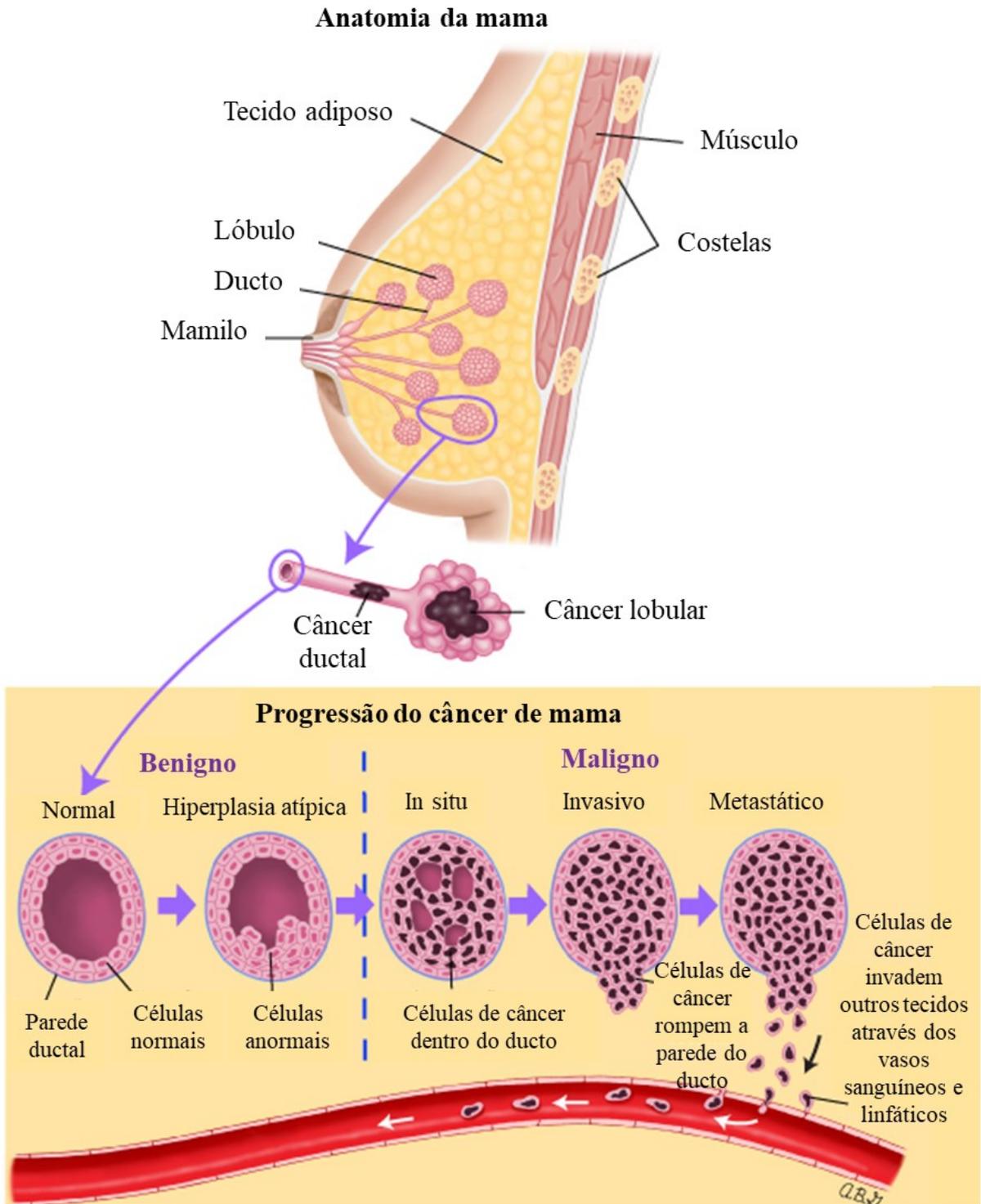
## 1.3 FISIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O desenvolvimento da glândula mamária humana é um processo progressivo que se inicia durante a vida embrionária (FENG, Y. *et al.*, 2018). O tecido mamário é formado por células-tronco mamárias que podem dar origem tanto às linhagens epiteliais luminais quanto

basais (KOREN; BENTIREN-ALJ, 2015). Essas células-tronco respondem à diferentes estímulos como estrogênio, TGF- $\beta$  e vias de sinalização de Notch, por exemplo (KHAN *et al.*, 2021). As mudanças fisiológicas na glândula mamária observadas durante a puberdade, vida adulta, gestação e lactação se dão devido à adequada comunicação e resposta das células-tronco mamárias, no entanto, essas células também podem adquirir mutações que levam à diferenciação inadequada e consequente tumorigênese (THARMAPALAN *et al.*, 2019). Essas células mutadas dão origem a uma subpopulação tumoral exibindo características de células-tronco mamária desreguladas, que possui a capacidade de auto-renovação e diferenciação completa dentro do tumor (OWENS; NAYLOR, 2020).

A maior parte dos cânceres de mama se iniciam nos lóbulos ou ductos mamários e, em alguns casos, o tumor pode também infiltrar a pele ou músculos peitorais (FENG, Y. *et al.*, 2018). Inicialmente, enquanto as células tumorais permanecem dentro do tecido onde se formaram, o câncer é denominado *in situ*, no entanto, à medida que essas células invadem outros tecidos adjacentes, já são considerados cânceres localmente invasivos. São considerados cânceres metastáticos quando essas células invadem tecidos não-mamários através dos vasos sanguíneos e linfáticos (Figura 56) (TOWER; RUPPERT; BRITT, 2019).

Figura 56 – Fisiologia do câncer de mama



Fonte: Adaptado de UpToDate® (2023).

O câncer de mama é uma doença heterogênea biologicamente e clinicamente falando, com variados aspectos histológicos e subtipos moleculares que apresentam diferentes

etiologias, perfis de fatores de risco, respostas a tratamentos e prognósticos (PASHAYAN *et al.*, 2020). Ele é classificado em três subtipos principais, com base na presença ou ausência de marcadores moleculares para receptores hormonais (HR) e de fator de crescimento, que são: receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (ERBB2; também chamado de HER2). A expressão desses três marcadores moleculares orienta a terapia e está correlacionada com o prognóstico. Dos cânceres de mama com receptor positivo, os cânceres ERBB2 positivo são os mais agressivos, mas respondem bem à terapia direcionada ao ERBB2. Os fenótipos ER ou PR positivos estão associados a cânceres menos agressivos e melhores resultados de sobrevida. Dentre os três subtipos, o câncer de mama triplo-negativo tem maior probabilidade de recorrência do que os outros 2 subtipos (JANUŠKEVIČIENĖ; PETRIKAITĖ, 2019).

#### 1.4 TRATAMENTO

Para o tratamento do câncer de mama não metastático, a terapia objetiva eliminar o tumor da mama e dos gânglios linfáticos adjacentes e prevenir a recorrência metastática. O tratamento local consiste na ressecção cirúrgica do tumor, bem como a remoção ou amostragem dos linfonodos axilares, com radioterapia pós-operatória (WAKS; WINER, 2019). A terapia sistêmica consiste em terapia endócrina para todos os tumores HR+, com uso de fármacos como tamoxifeno, letrozol, anastrozol, exemestano ou fulvestranto; terapia com anticorpos direcionados a ERBB2 à base de trastuzumabe juntamente com a quimioterapia para tumores ERBB2+ e quimioterapia isolada para câncer de mama triplo-negativo, sendo frequentemente utilizados os fármacos paclitaxel, doxorrubicina, ciclofosfamida, docetaxel ou carboplatina (JOSHI; PRESS, 2018).

Para o câncer de mama metastático, os objetivos terapêuticos são prolongar a sobrevida do paciente e atenuar os sintomas. Atualmente, o câncer de mama metastático permanece incurável em praticamente todos os pacientes afetados. A mesma terapia sistêmica é usada no câncer de mama metastático e as terapias locais (cirurgia e radioterapia) são normalmente usadas como tratamento paliativo na doença metastática (CARDOSO *et al.*, 2009). Um dos maiores desafios encontrados atualmente no tratamento do câncer de mama é o surgimento de resistência à terapia, metástase e recidiva da doença. A resistência inata e, mais importante, a resistência adquirida a intervenções quimio e radioterapêuticas é um dos

principais contribuintes para a recidiva tumoral e um aumento na mortalidade entre pacientes com câncer (WANG, X.; ZHANG; CHEN, 2019).

O objetivo primário das estratégias de tratamento do câncer é promover a morte celular tumoral, portanto, as questões centrais na determinação da eficácia terapêutica são os fatores que afetam a morte celular e os mecanismos subjacentes (XU, J.; PATEL; GEWIRTZ, 2020). Atualmente, o supressor de tumor, a proteína p53 foi classificada como o "guardião do genoma", devido ao seu papel na resposta a vários estresses externos ou internos, como danos ao DNA, incluindo a indução da parada do ciclo celular e reparo de DNA ou apoptose, ativação de oncogenes, privação de nutrientes e hipóxia (BOUTELLE; ATTARDI, 2021). Como supressor de tumor, a p53 é capaz de atenuar a inflamação através de vários diferentes mecanismos, incluindo a supressão da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e a inibição do Fator Nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (BARABUTIS; SCHALLY; SIEJKA, 2018).

Cerca de 70% dos cânceres de mama expressam receptor de estrogênio e são classificados como receptor de estrogênio positivo (ER+) e terapias antiestrogênio, como tamoxifeno, são comumente utilizadas para o tratamento nesses casos (BERGER, C.; QIAN; CHEN, 2013). Sendo a p53 um importante mediador no tratamento de câncer, compreender a ligação entre p53 e a sinalização de receptores de estrogênio pode fornecer respostas importantes para melhorar as atuais estratégias para tratamento de câncer de mama.

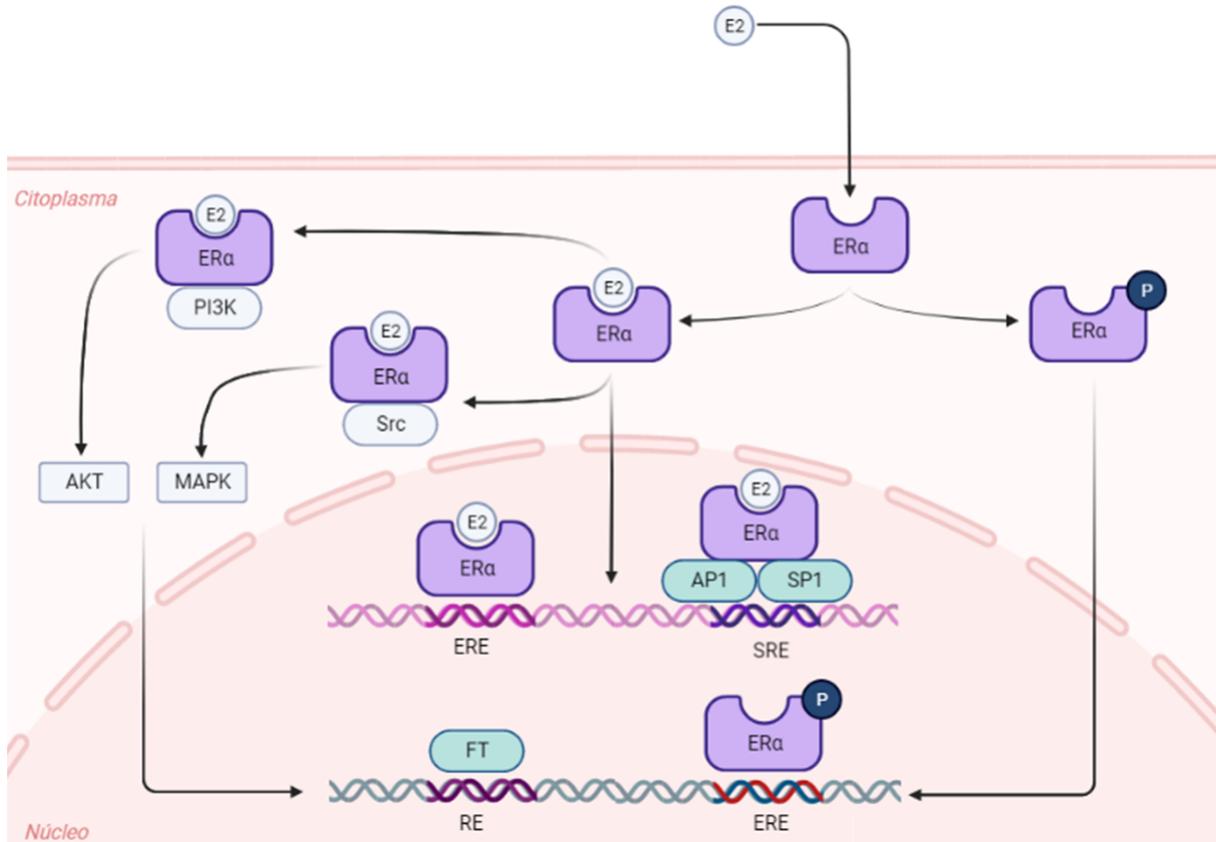
## 1.5 SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO

Os receptores de estrogênio encontram-se em duas diferentes isoformas: ER $\alpha$  e ER $\beta$  e eles intercedem as ações do estrogênio regulando a sua expressão gênica (ARNAL *et al.*, 2017). No entanto, a isoforma ER $\alpha$  vem sendo muito mais extensamente pesquisada. Sabe-se que a atividade de ER $\alpha$  é essencial para o desenvolvimento do sistema reprodutor e também que sua expressão encontra-se aumentada na maioria dos cânceres de mama, o que levou a uma intensa pesquisa para compreender o seu papel como regulador do tumor (CLUSAN *et al.*, 2021).

O ER $\alpha$  pode exercer a sua atividade através de duas vias, então, após a sua ligação ao estrogênio ou após a sua fosforilação, o ER $\alpha$  se transloca para o núcleo da célula onde se liga ao DNA por mecanismos diretos, através de elementos responsivos a estrogênio (EREs) ou indiretos, por meio de interações proteína/proteína com outros fatores de transcrição como AP1 ou SP1, que se ligam ao DNA por meio de elementos responsivos ao soro (SREs). A outra via

se dá pela interação de ER $\alpha$  com quinases, como por exemplo a PI3K e Src, levando à estimulação da via de sinalização de AKT ou MAPK, resultando na ativação do fator de transcrição (FT) (STENDER *et al.*, 2010) (Figura 57).

Figura 57 – Sinalização de ER $\alpha$



Fonte: a autora. Desenvolvido com BioRender.

Em linhagens celulares de adenocarcinoma mamário, como MCF-7, foram identificados os elementos reguladores de ER $\alpha$  através de técnicas de sequenciamento e todos esses modos de ação do receptor levam à regulação do destino celular, resultando em um equilíbrio entre proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (ARNAL *et al.*, 2017).

## 1.6 PAPEL DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO NO CÂNCER DE MAMA

O receptor de estrogênio desempenha um papel importante no câncer de mama e sua desregulação pode ocasionar em proliferação celular aberrante e, conseqüentemente,

desenvolvimento do tumor (KERDIVEL; FLOURIOT; PAKDEL, 2013). Essa desregulação da função de ER $\alpha$  pode ser desencadeada por diversos fenômenos, resultando num desequilíbrio de cofatores em favor de coativadores e a superexpressão de fatores de crescimento, resultando na alteração da expressão de ER $\alpha$  (MANAVATHI *et al.*, 2013).

Mutação do ER $\alpha$  adquiridas após terapias de privação de estrogênio pode ser um possível mecanismo de resistência tumoral às terapias endócrinas para promover a proliferação celular por meio da ativação independente de ligante de ER $\alpha$ , escapando do controle hormonal (BARONE; BRUSCO; FUQUA, 2010). As células do câncer de mama adquiriram resistência à algumas terapias endócrinas através de vários diferentes mecanismos, como perda de expressão de ER $\alpha$  (HOSKINS; CAREY; MCLEOD, 2009), expressão de isoformas truncadas dos receptores de estrogênio (SHI *et al.*, 2009), modificações pós-traducionais de ER $\alpha$  (RIGGINS *et al.*, 2007), aumento da atividade transcricional de AP1 e NF- $\kappa$ B (ZHOU, Y. *et al.*, 2007), ativação de vias de sinalização celular aberrantes que inibem os efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos do tamoxifeno (FARIDI *et al.*, 2003).

## 1.7 INTERAÇÃO ENTRE RECEPTOR DE ESTROGÊNIO E P53

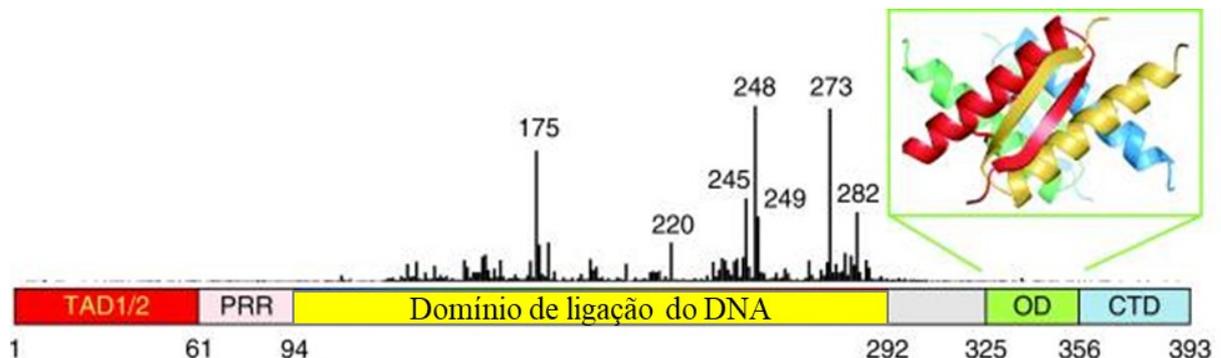
Alguns estudos demonstraram a relação entre estrogênio e p53, como o estudo de Hurd e colaboradores, que ao cultivar as células de carcinoma ductal mamário ER-positivo, T-47D, com meio livre de estrogênio, obteve uma redução de 10% da expressão de p53 mutante (LI94F) em até 5 dias. No entanto, a expressão de p53 foi restaurada após 24h de tratamento com estradiol (HURD *et al.*, 1995). Consistentemente, a linhagem celular de câncer de mama MCF-7 respondeu ao tratamento com estrogênio com um aumento nos níveis de p53 (FERNANDEZ-CUESTA *et al.*, 2010). Além disso, o tratamento de células MCF-7 com doxorubicina, fármaco que induz dano ao DNA e ativação de p53, resultou em um número menor de células em apoptose quando tratadas com meio livre de estrogênio em comparação com as células tratadas com meio contendo estrogênio (FERNÁNDEZ-CUESTA *et al.*, 2011). Também viu-se que o *knockdown* de ER $\alpha$  dessensibiliza, enquanto a superexpressão de ER $\alpha$  sensibiliza as células MCF-7 à supressão do crescimento induzida por danos de DNA de uma maneira dependente de p53 (BERGER, C. E. *et al.*, 2012). Juntos, estes estudos sugerem que a via do receptor de estrogênio está relacionada com a regulação de p53, bem como na ativação de p53 induzida por dano ao DNA.

ER $\alpha$  e p53 se ligam diretamente e embora ER $\alpha$  se ligue a p53 numa região importante para a interação entre p53 e MDM2, um importante inibidor de p53, quando MDM2 se ligasse nesse complexo p53-ER $\alpha$ , tem menor capacidade de regular negativamente p53 na presença de ER $\alpha$ , sugerindo que ER $\alpha$  tem efeito protetor sobre p53 (LIU; SCHWARTZ; BROOKS, 2000). Sendo assim, ER $\alpha$  pode bloquear a inibição de p53 induzida por MDM2, ativando o supressor de tumor e promovendo a apoptose das células de câncer (BERGER, C.; QIAN; CHEN, 2013). No câncer de mama, observou-se uma relação entre p53 e ER $\alpha$ , onde o câncer de mama ER-positivo apresentava p53 do tipo selvagem, enquanto o câncer de mama ER-negativo apresentava mais p53 do tipo mutante (LØNNING *et al.*, 2007).

## 1.8 SINALIZAÇÃO DE P53

A p53 é formada por 393 aminoácidos e contém 7 domínios funcionais (HAYMAN *et al.*, 2019). Um domínio de transativação amino-terminal (TAD) que pode ser subdividido em TAD1 e TAD2, responsáveis pela ativação da transcrição gênica (CHANG *et al.*, 1995). Seguido por uma região rica em prolina (PRR), que contribui para a apoptose mediada por p53 (ZHU *et al.*, 2000). Além disso, também é formada pelo domínio de ligação do DNA, que desempenha um papel fundamental na ligação a sequências específicas de DNA (PAVLETICH; CHAMBERS; PABO, 1993) e pelo domínio de tetramerização (OD), envolvido na formação do tetrâmero p53 (FRIEDMAN *et al.*, 1993). Estes são conectados por uma região de ligação flexível, seguido pelo domínio regulatório no terminal carboxila (CTD) (JOERGER; FERSHT, 2010) (Figura 58).

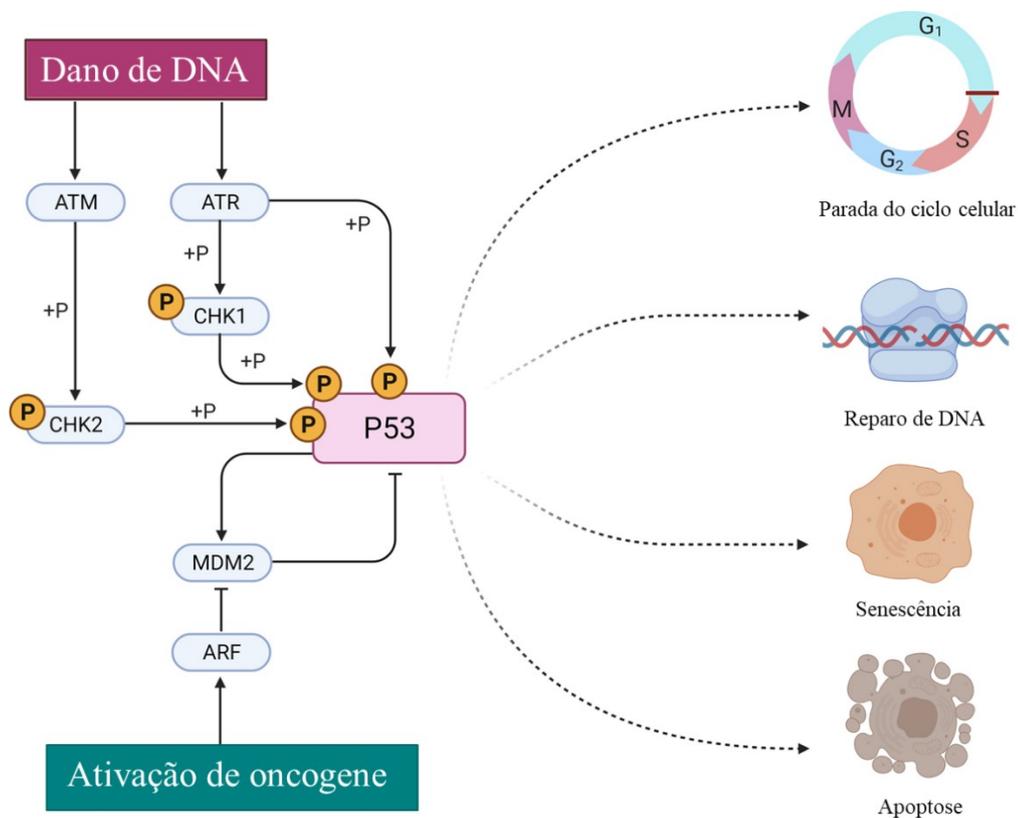
Figura 58 – Estrutura da proteína p53



Fonte: Adaptado de Joerger e Fersht (2010). As barras verticais representam as frequências relativas das mutações do tipo missense no câncer humano, disponíveis no banco de dados de mutações de TP53 da IARC, demonstrando que a maior parte das mutações estão localizadas no domínio de ligação do DNA.

Como resposta do dano no DNA, o WTp53 impede a replicação celular até que o dano seja reparado, evitando assim a proliferação de células mutadas e aquisição de um fenótipo de câncer (MAREI *et al.*, 2021). As proteínas ataxia-telangiectasia mutada (ATM) e ataxia telangiectasia Rad-3 relacionada (ATR) fosforilam alguns substratos, como a caseína quinase (CHK1) e checkpoint quinase 2 (CHK2) e p53 para aumentar a estabilidade de p53 e regular a viabilidade de células cancerígenas, regulando vias bioquímicas que levam à parada do ciclo celular, reparo de DNA, senescência e morte (DAHL; AIRD, 2017). Já em condições onde não ocorre dano no DNA, a p53 é expressa em níveis mais baixos e mantida em um estado estacionário por reguladores negativos como a proteína MDM2, que atua em um ciclo de feedback negativo com a p53 para manter os seus níveis baixos em condições normais (FUKUDA *et al.*, 2017) (Figura 59).

Figura 59 – Sinalização de p53



Fonte: Adaptado de Marei *et al.* (2021).

## 1.9 MUTAÇÕES DE P53

O TP53 é o gene mais frequentemente mutado nos cânceres humanos (KOBOLDT *et al.*, 2012) e suas mutações ocorrem principalmente no domínio de ligação a DNA, tornando a proteína p53 mutante inativa e, conseqüentemente, não responsiva ao estresse. Sendo assim, a atividade de p53 do tipo selvagem (WTp53) geralmente confere um prognóstico favorável ao paciente (KASTENHUBER; LOWE, 2017).

No entanto, considerando que a mutação de TP53 ocorre em mais da metade de todos os cânceres humanos e que a maioria dos tratamentos citotóxicos utilizados são através da ativação da via de p53, ativar esta via provavelmente não será eficaz, uma vez que ela estará disfuncional ou não estará funcionando corretamente (REINHARDT *et al.*, 2020).

No câncer de mama, o TP53 é o gene mutado com mais frequência, somando quase 30% de todos os casos (KOBOLDT *et al.*, 2012), no entanto, considerando que a p53 é uma proteína fundamental para a manutenção da integridade genômica, essa porcentagem é inferior ao esperado. Isso sugere que existem outros mecanismos que desencadeiam a interrupção da via de TP53 e definir esses mecanismos poderá identificar novos alvos terapêuticos que podem aumentar a eficácia de terapias que ativam essa via (AVERY-KIEJDA *et al.*, 2014).

As mutações somáticas do TP53 ocorrem em quase todos os tipos de câncer e são mais frequentes em estágio avançado ou em subtipos de câncer com comportamento agressivo (como câncer de mama triplo negativo (LANGEROD *et al.*, 2007)). As mutações germinativas foram associadas com a síndrome de Li-Fraumeni, síndrome rara que torna o indivíduo mais suscetível ao desenvolvimento de câncer durante a vida e de início precoce, incluindo o câncer de mama (GONZALEZ *et al.*, 2009). Além disso, mais de 80 polimorfismos de TP53 foram identificados e validados em populações humanas, sendo que 90% destes estão localizados em íntrons, fora dos locais de splicing ou em éxons não codificantes (OLIVIER; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010).

## 1.10 REATIVAÇÃO DE P53

Em estudo realizado em camundongos, viu-se que na ausência de p53, os tumores se desenvolvem, bem como a perda da sua função é necessária para a manutenção dos tumores (MARTINS; BROWN-SWIGART; EVAN, 2006). Em contrapartida, outro estudo demonstrou

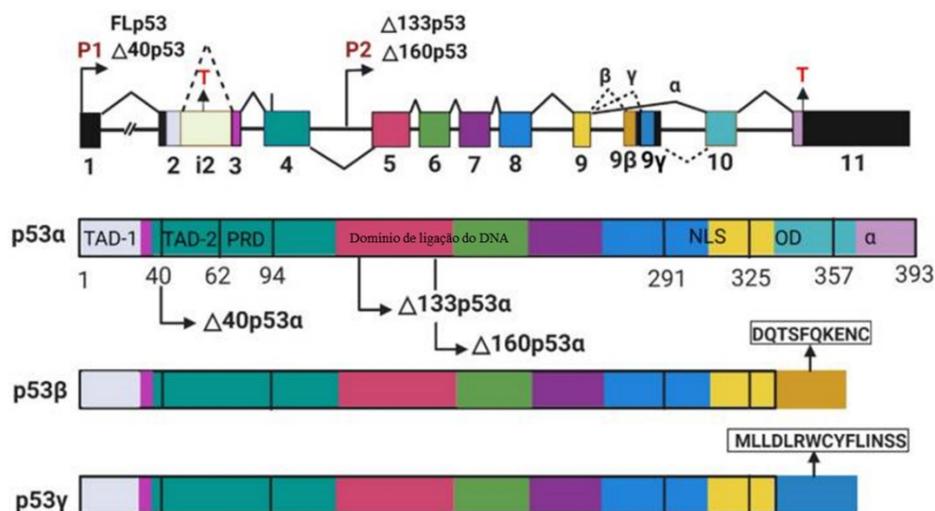
que a reconstituição de p53 resulta na regressão do tumor, sendo assim, a restauração da função de p53 em tumores pode ser uma estratégia para o tratamento do câncer (XUE *et al.*, 2007).

A introdução de adenovírus recombinante contendo p53 demonstrou ser uma estratégia terapêutica eficaz para o tratamento de câncer em pacientes, como a exemplo dos fármacos Advexin e Gencidine (LI, Y. *et al.*, 2021). Têm-se ainda estudado outras formas de reativação da função de p53, uma delas é inibindo a função de MDM2, que é o principal regulador negativo de p53 (HOE; VERMA; LANE, 2014). Alguns compostos têm sido avaliados com o objetivo de inibir a função de MDM2, dentre eles, encontra-se a Nutlin-3, que é um antagonista de MDM2 (YEE-LIN; POOI-FONG; SOO-BENG, 2017), MI-219, inibidor seletivo e oralmente ativo da interação MDM2-p53 (SHANGARY *et al.*, 2008) e MI-319, outro inibidor da interação MDM2-p53 que apresenta uma maior afinidade de ligação à MDM2 que o MI-219 (MOHAMMAD *et al.*, 2009).

### 1.11 ISOFORMAS DE P53

Até o momento, foram encontradas 13 isoformas da p53: p53 $\alpha$  (também denominado p53 de comprimento total ou FLp53), p53 $\beta$ , p53 $\gamma$ , p53 $\Psi$ ,  $\Delta$ 40p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 40p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 40p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 133p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 133p53 $\beta$ ,  $\Delta$ 133p53 $\gamma$ ,  $\Delta$ 160p53 $\alpha$ ,  $\Delta$ 160p53 $\beta$  e  $\Delta$ 160p53 $\gamma$ . A expressão destas isoformas mostrou-se alterada em vários cânceres humanos (Figura 60) (JORUIZ; BOURDON, 2015).

Figura 60 – Isoformas de p53



Fonte: Adaptado de Zhao e Sanyal (2022). Imagem representativa da constituição de TP53 humano e suas isoformas. Os éxons marcados com números 1 a 11 compõem o gene TP53. Este gene possui duas regiões promotoras, P1 e P2, que produzem transcritos de diferentes comprimentos para expressão de diferentes isoformas de p53. Esses transcritos são gerados por splicing alternativo dos íntrons (representado por i2) e iniciação alternativa da tradução. Os códons de parada presentes em i2 e no éxon 11 são representados por T. As isoformas de p53 também estão representadas na figura. A isoforma p53 $\alpha$  possui sete componentes estruturais: dois domínios de transativação (TAD-1 e TAD-2), um domínio rico em prolina (PRD), um domínio de ligação do DNA, uma região de sinalização de localização nuclear (NSL), um domínio de oligomerização (OD) e um domínio de regulação negativa ( $\alpha$ ). As isoformas  $\Delta 40p53$ ,  $\Delta 133p53$  e  $\Delta 160p53$  possuem estrutura semelhante à p53 $\alpha$ , no entanto, possuem uma deleção nos aminoácidos 40, 133 e 160, respectivamente. Seus códons iniciais estão representados pelas setas. As isoformas p53 $\beta$  e p53 $\gamma$  não possuem os domínios OD e  $\alpha$ , em vez disso, possuem extensões DQTSFQKENC e MLLDLRWYFLINSS, respectivamente.

As principais isoformas de p53 são truncadas na região N-terminal ou na região C-terminal com alguma alteração de sequência. Por exemplo a isoforma  $\Delta 40p53$ , por não possuir os primeiros 40 aminoácidos, não possui o domínio TAD-1, porém mantém o domínio TAD-2, o que possivelmente permite que se ligue a elementos responsivos tanto típicos quanto atípicos (VIELER; SANYAL, 2018). Já as isoformas  $\Delta 133p53$  e  $\Delta 160p53$ , por não possuírem os primeiros 133 e 160 aminoácidos respectivamente, não possuem os domínios TAD-1 e TAD-2, bem como uma parte do domínio de ligação do DNA (HAYMAN *et al.*, 2019). Além dessas isoformas truncadas na região N-terminal, a p53 possui duas outras isoformas encurtadas na região C-terminal (p53 $\beta$  e p53 $\gamma$ ). Nessas isoformas, o domínio de oligomerização é substituído por um trecho de 10 e 15 aminoácidos respectivamente (MARCEL *et al.*, 2011). Considerando que essas isoformas possuem estruturas diferentes de FLp53, supõe-se que elas exibam funções alteradas em relação à supressão tumoral (ANBARASAN; BOURDON, 2019).

Primeiramente, foi relatado que um desequilíbrio da razão p53 $\beta$ : $\Delta 133p53\alpha$  impulsionou a evolução de adenoma colorretal para carcinoma (FUJITA *et al.*, 2010). Também, a alta expressão de p53 $\beta$  foi positivamente associada à sobrevida livre de recorrência e à sobrevida global em pacientes com carcinoma de células renais (ZHANG, H. *et al.*, 2018). Da mesma forma, altos níveis de expressão de  $\Delta 133p53$  foram correlacionados com melhor sobrevida global em pacientes com câncer de ovário (BISCHOF *et al.*, 2019). Viu-se que uma baixa razão  $\Delta 40p53$ :p53 está também associada ao aumento da sobrevida livre de doença no câncer de mama (ZHANG, X. *et al.*, 2022), por outro lado, a superexpressão de  $\Delta 40p53$  exerce atividade supressora do tumor, aumentando a expressão de genes alvo de p53 no carcinoma

hepatocelular (OTA *et al.*, 2017). Portanto, as isoformas p53, especialmente as com truncamento N-terminal ( $\Delta 40p53$ ,  $\Delta 133p53$  e  $\Delta 160p53$ ) desempenham um papel crítico na tumorigênese e podem ser potenciais biomarcadores de alvos terapêuticos (VIELER; SANYAL, 2018).

### 1.11.1 Isoforma $\Delta 40p53$

As isoformas de p53 truncadas na região N-terminal, como a  $\Delta 40p53$ , não possuem o domínio TAD de forma parcial ou total e, portanto, podem escapar da degradação proteica induzida por MDM2 (HAFSI *et al.*, 2013). Um estudo demonstrou que a isoforma  $\Delta 40p53$  pode interferir a ligação p53-MDM2, e conseqüentemente proteger a p53 da degradação mediada por MDM2 (REINHARDT *et al.*, 2020). No câncer de ovário mucinoso, viu-se que a alta expressão de  $\Delta 40p53$  pode ser um marcador prognóstico para sobrevida livre de recorrência (HOFSTETTER *et al.*, 2012), bem como no carcinoma hepatocelular, a alta expressão de  $\Delta 40p53$  inibe o crescimento de células tumorais e a senescência celular (OTA *et al.*, 2017).

No entanto,  $\Delta 40p53$  também pode alterar a expressão de p53 de maneira negativa, promovendo a progressão do câncer. No carcinoma endometrial, a isoforma  $\Delta 40p53$  foi identificada como fator importante na modificação das propriedades de agregação da p53, que foi associada com a progressão tumoral (DOS SANTOS *et al.*, 2019). Também, a alta expressão de  $\Delta 40p53$  foi associada com melanoma metastático e câncer de mama triplo-negativo (AVERY-KIEJDA *et al.*, 2008, 2014).

Além dos níveis de expressão dessa isoforma, a proporção adequada entre  $\Delta 40p53$ -p53 pode ser importante para suprimir o câncer (REINHARDT *et al.*, 2020). No câncer de mama, uma alta razão  $\Delta 40p53:p53$  está associada a piores desfechos, bem como pior sobrevida livre de doença. Além disso, a isoforma  $\Delta 40p53$  foi a mais altamente expressa neste tipo de câncer (AVERY-KIEJDA *et al.*, 2014; MORTEN *et al.*, 2016). Outro estudo também demonstrou que essa isoforma foi a mais abundantemente expressa em todos os tipos de câncer analisados, enquanto as outras isoformas encontravam-se em níveis muito menores, demonstrando o seu importante papel no desenvolvimento e progressão do câncer (MEHTA *et al.*, 2016).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Compreender a relação entre  $\Delta 40p53$ , p53 e sinalização de estrogênio em resposta ao tratamento com tamoxifeno no câncer de mama.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- Analisar o efeito da superexpressão de  $\Delta 40p53$  no tratamento com tamoxifeno em células de câncer de mama;
- Investigar o efeito do *knockdown* de  $\Delta 40p53$  e p53 $\alpha$  em resposta ao tratamento com estrogênio e/ou tamoxifeno em células de câncer de mama.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 CULTURA CELULAR

Para este capítulo do estudo, foi utilizada a linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano MCF7 (HTB-22, ATCC). A MCF7 é uma linhagem de células epiteliais de adenocarcinoma mamário humano que foi isolada da glândula mamária de uma mulher branca de 69 anos e expressa o receptor de estrogênio. Essa linhagem celular parental foi gentilmente cedida pela Professora Christine Clarke (Westmead Millennium, Universidade de Sydney, Austrália). A sublinhagem MCF7 resistente à tamoxifeno (TAMR) foi gentilmente cedida pela Professora Liz Caldon (Universidade de Nova Gales do Sul, Austrália). A sublinhagem MCF7 resistente à fulvestranto e em privação de estrogênio a longo prazo (LTED) foi gentilmente cedida pela Doutora Julia Gee (Universidade de Cardiff, Reino Unido).

Também foi utilizada a linhagem celular de carcinoma ductal mamário humano ZR-75-1 (CRL-1500, ATCC). A ZR-75-1 é uma linhagem celular epitelial que foi isolada do tecido da glândula mamária de uma paciente branca de 63 anos com carcinoma ductal e também expressa receptor de estrogênio. Essa linhagem celular foi gentilmente cedida pela Doutora Judith Weidenhofer (Universidade de Newcastle, Austrália).

##### 3.1.1 Meio de cultura

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em garrafas plásticas para cultura celular e mantidas em estufa umidificada a 37°C, em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

A linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano MCF7 parental foi cultivada em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) livre de fenol, suplementada com 2 mM de L-glutamina, 5% de *charcoal stripped fetal bovine serum* (csFBS) e 10 nM de 17β-Estradiol (E2). No meio de cultura da sublinhagem MCF7 TAMR foi acrescentado 500 nM de 4-OH-tamoxifeno (TAM). A sublinhagem MCF7 LTED foi cultivada em meio RPMI livre de fenol, suplementada com 5% de csFBS inativado, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Para as linhagens MCF7 pós *knockdown* de Δ40p53 a p53, o meio foi suplementado com 1 µg/mL de puromicina.

A linhagem celular de carcinoma ductal mamário humano ZR-75-1 *knockdown* de  $\Delta 40p53$  a p53 e a linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano MCF7 superexpressando  $\Delta 40p53$  foram cultivadas em meio DMEM livre de fenol, acrescido de 2mM de L-glutamina, 10% de FBS, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de insulina e 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de puromicina.

### 3.2 SUPEREXPRESSÃO DE $\Delta 40P53$

As células MCF-7 que superexpressam de forma estável  $\Delta 40p53$  foram previamente geradas através de um vetor lentiviral (LeGO) contendo  $\Delta 40p53$ , bem como um controle com vetor vazio, como descrito por Zhang e colaboradores (ZHANG, X. *et al.*, 2022).

### 3.3 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para visualizar a expressão de proteínas através de anticorpos marcados com fluorescência, foi realizado o ensaio de imunofluorescência. Ao atingir a confluência, as células MCF7 superexpressando  $\Delta 40p53$  e a MCF7 LeGO (com o vetor vazio, utilizada como controle) foram contadas utilizando o contador de células automatizado Countess II FL (Thermo Fisher Scientific, North Ryde, NSW, Austrália) e Trypan Blue (Sigma-Aldrich, Castle Hill, NSW, Australia) e plaqueadas numa densidade de 10.000 células por poço em placa de 96 poços e mantidas em incubadora para posterior tratamento. Após 24h do plaqueamento, as células foram tratadas apenas com meio de cultura contendo 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  puromicina (controle) ou meio de cultura contendo 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  puromicina e 1  $\mu\text{M}$  de TAM. Após 24h do tratamento, as células foram fixadas utilizando solução a 3,7% de paraformaldeído. Para realizar a análise, as células fixadas foram lisadas utilizando Triton X-100 e então adicionada a solução de bloqueio por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado o corante DAPI nos poços e após a lavagem foram adicionados os respectivos anticorpos em cada poço. Foram utilizados os anticorpos anti-ER, p21, pS2 e Ki67, bem como anticorpos anti-rabbit e anti-mouse. A luminescência foi lida utilizando o equipamento Biotek Cytation 3. O ensaio foi realizado em triplicata em 3 dias consecutivos.

### 3.4 KNOCKDOWN DE $\Delta 40P53$ E P53

Os short-hairpin RNAs (shRNAs) foram previamente gerados para modificar a expressão das isoformas  $\Delta 40p53\alpha/\beta/\gamma$  (sh1) e de todas as outras isoformas de p53 (sh3) na linhagem celular ZR-75-1. Durante este trabalho, também foram geradas as sublinhagens com expressão de  $\Delta 40p53$  e p53 modificadas de MCF7 resistentes à tamoxifeno e ao fulvestranto. As células *knockdown* estáveis foram desenvolvidas a partir do desenvolvimento de shRNAs que atingissem  $\Delta 40p53$  e p53 e posteriormente a inserção dessas sequências em vetores pLKO.1-puro-CMV-tGFP (MISSION® Lentiviral Transduction Particles, Sigma-Aldrich). As sequências estão descritas na Tabela 10. Além disso, um controle não-alvo disponível comercialmente também foi transduzido como controle negativo.

Tabela 10. Sequências de shRNAs

<b>Sublinhagem</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>
sh1 (knockdown de $\Delta 40p53$ )	AGACCTGTGGGAAGCGAAA
sh3 (knockdown de p53)	GAAACTACTTCCTGAAAAC
shNT (controle não-alvo)	

Fonte: a autora.

Para isso, as células foram cultivadas em uma densidade de 150.000 células por poço em placas de 6 poços até atingirem cerca de 50% de confluência. Após, foi adicionado meio de cultura contendo concentrações otimizadas das partículas lentivirais transdutoras e acrescido de 8  $\mu\text{g/mL}$  de Hexadimetrina (Sigma-Aldrich, H9268), responsável por aumentar a eficiência da transdução, por 24 a 48h enquanto era realizada a avaliação das partículas de fluorescência verde (GFP). Quando as células se encontraram positivas para GFP, o meio de cultura foi trocado e suplementado com 1  $\mu\text{g/mL}$  de puomicina para selecionar as células transduzidas. As células foram mantidas nesse meio, realizando a troca de meio a cada 48h até que cerca de 80% das células fossem positivas para GFP. Ao atingir a confluência, as células foram tripsinizadas e mantidas em garrafas plásticas para cultura celular. Ao atingirem a confluência, foram novamente plaqueadas em placas de 6 poços para validação da transdução a partir da análise de proteínas por Western blot (WB) e de genes por PCR em tempo real semiquantitativo (RT-PCR).

### 3.5 ENSAIO DE CONFLUÊNCIA

Para avaliar o crescimento celular frente à diferentes tratamentos, foi realizado o ensaio de confluência. Ao atingir a confluência, as células foram contadas utilizando o contador de células automatizado Countess II FL (Thermo Fisher Scientific, North Ryde, NSW, Austrália) e Trypan Blue (Sigma-Aldrich, Castle Hill, NSW, Australia) e plaqueadas numa densidade de 20.000 células por poço em placa de 96 poços e mantidas em incubadora para posterior tratamento. Após 24h do plaqueamento, a linhagem celular MCF7 resistente à tamoxifeno e a parental foram primeiramente tratadas para checar a resistência ao fármaco. Para isso, foi utilizado meio de cultura contendo 5% de csFBS e 10 nM de E2 como controle e acrescido de 1  $\mu$ M de TAM como tratamento. Após o tratamento, as placas foram armazenadas no gerador de imagens de células IncuCyte™ ZOOM (Essen Bioscience, Ann Arbor, MI, USA) durante 4 dias onde foram geradas imagens e dados de porcentagem de confluência a cada 6h.

Da mesma forma, as células MCF7 parental e resistentes à tamoxifeno foram plaqueadas e tratadas em diferentes condições, sendo a condição 1 com meio de cultura contendo 5% de csFBS e 10 nM de E2 como controle (para a sublinhagem parental) e 5% de csFBS, 10 nM de E2 e 500 nM de TAM como controle (para a sublinhagem resistente à tamoxifeno), a condição 2 com meio de cultura contendo 5% de csFBS e 1  $\mu$ M de TAM, a condição 3 com meio de cultura contendo 5% de csFBS (para a sublinhagem parental) e 5% de csFBS e 500 nM de TAM (para a sublinhagem resistente à tamoxifeno) e a condição 4 meio de cultura contendo 5% de csFBS, 10 pM de E2 e 1  $\mu$ M de TAM.

Para a linhagem ZR-75-1 também foi realizado o ensaio de confluência seguindo o mesmo protocolo, com os seguintes tratamentos: tratamento 1 contendo o meio de cultura previamente descrito para esta linhagem como controle, tratamento 2 contendo meio de cultura suplementado com csFBS, tratamento 3 contendo meio de cultura suplementado com csFBS e 10 pM de E2, tratamento 4 contendo meio de cultura acrescido de 0,1  $\mu$ M de TAM, tratamento 5 contendo meio de cultura acrescido de 0,5  $\mu$ M de TAM e tratamento 6 contendo meio de cultura acrescido de 1  $\mu$ M de TAM.

Seguindo o mesmo protocolo utilizado para as outras células, foi realizado o ensaio de confluência com as células MCF7 TAMR e LTED *knockdown* de  $\Delta$ 40p53 e p53, após a sua transdução. Para isso foram utilizadas as seguintes condições: condição 1 contendo o meio de cultura previamente descrito para esta linhagem como controle, condição 2 contendo meio de

cultura suplementado com csFBS, condição 3 contendo meio de cultura suplementado com csFBS e 10 pM de E2, condição 4 contendo meio de cultura acrescido de 1  $\mu$ M de TAM, condição 5 contendo meio de cultura acrescido de 10  $\mu$ M de Nutlin-3 + 1  $\mu$ M de TAM e condição 6 contendo meio de cultura acrescido de 100 nM de Fulvestranto. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em 3 dias consecutivos.

### 3.6 ENSAIO DE VIABILIDADE

Para avaliar a viabilidade celular frente ao tratamento com tamoxifeno, foi realizado o ensaio de viabilidade. Para isso, utilizou-se as placas contendo células ZR-75-1 tratadas com diferentes concentrações de TAM após os 4 dias de ensaio de confluência. Foi também realizado ensaio de viabilidade com as células MCF7 TAMR e LTED transduzidas, após os 4 dias de ensaio de confluência. Para isso, foi utilizado o reagente Cell Titer Glo® 2.0 (Promega, G9241) e o experimento foi conduzido seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente, esperou-se que a placa e o reagente atingissem a temperatura ambiente e todo o experimento foi realizado no escuro devido à fotossensibilidade do reagente. Foi adicionado 100  $\mu$ L do reagente em cada poço contendo 100  $\mu$ L de meio e a placa foi agitada por 2 minutos no shaker. Após, manteve-se a placa durante 10 minutos em temperatura ambiente e a luminescência foi lida utilizando o equipamento BioTek Cytation 3. O ensaio foi realizado em triplicata em 3 dias consecutivos.

### 3.7 WESTERN BLOT

Para análise de expressão de proteínas, foi utilizado o ensaio de Western blot. Para isso, a linhagem celular MCF7 e a ZR-75-1 foram plaqueadas em placas de 6 poços numa densidade de 500.000 células por poço. Após 24h do plaqueamento, as células MCF7 parental e resistentes à tamoxifeno foram tratadas com meio de cultura contendo 5% de csFBS e 10nM de E2 como controle e acrescidos de 1  $\mu$ M TAM ou 1  $\mu$ M doxorrubicina (DOX) como tratamento. A doxorrubicina foi utilizada com o intuito de visualizar melhor as bandas, uma vez que o tratamento com doxorrubicina tende a aumentar a expressão de p53. Também foi realizado o ensaio de Western blot para confirmar se o *knockdown* de  $\Delta$ 40p53 e p53 das células MCF7 TAMR e LTED foi efetivo. Para isso, as células foram plaqueadas da mesma maneira

descrita anteriormente e 24h após plaqueamento, as células foram tratadas com meio de cultura normal ou 1  $\mu\text{M}$  de DOX. O ensaio foi realizado conforme descrito anteriormente (ZHANG, X. D. *et al.*, 2001). Resumidamente, 40  $\mu\text{g}$  de extrato de proteínas das amostras bem como o Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ foram adicionados em géis SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose. Após, as membranas foram bloqueadas utilizando Odyssey-PBS Blocking Buffer (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EUA) e então foi adicionado o anticorpo policlonal primário CM-1 (Rabbit anti-Human) para detectar p53 e suas isoformas e posteriormente o anticorpo secundário (Goat anti-Rabbit IgG). Como controle endógeno foi utilizado o anticorpo primário GAPDH (Mouse anti-Human) e o anticorpo secundário (Donkey anti-Mouse IgG). Os blots foram então visualizados utilizando o gerador de imagem fluorescente Odyssey CLx (LI-COR Biosciences) e quantificados usando o software Image Studio Lite v4.0 (LI-COR Biosciences).

### 3.8 RT-PCR

#### 3.8.1 Extração e quantificação de RNA

Primeiramente as células MCF7 TAMR e LTED já transduzidas foram plaqueadas em placas de 6 poços numa densidade de  $5 \times 10^5$  células/mL. Após 24h, as células foram tratadas com meio adequado e 24h após o tratamento, o meio foi removido para realizar a extração de RNA. Para isso, foram adicionados 600  $\mu\text{L}$  de TRIzol (Life Technologies) e a solução foi incubada durante 5 minutos para permitir a completa dissociação do complexo de nucleoproteínas. Posteriormente, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio e a solução foi incubada e centrifugada para permitir a separação de 3 fases: uma inferior vermelha de fenol vermelho e clorofórmio, uma interfase branca e a fase aquosa superior incolor. A fase aquosa foi então transferida para outro eppendorf e acrescida de 450  $\mu\text{L}$  de isopropanol, incubada e centrifugada novamente. Após, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA manteve-se como um pellet branco no fundo do tubo. O pellet foi ressuscitado em 750  $\mu\text{L}$  de etanol 75% e centrifugado. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet foi mantido no eppendorf aberto dentro da capela até completa evaporação do etanol. Após, o pellet foi novamente ressuscitado em 40  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase e incubado a 55°C por 10 minutos. O RNA foi então quantificado utilizando o kit Qubit RNA de amplo intervalo (Life

Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Este ensaio permite determinar a concentração de RNA em uma amostra pois utiliza corantes fluorescentes que se ligam seletivamente ao RNA e emitem um sinal lido pelo fluorômetro. O rendimento do RNA foi então quantificado utilizando o Fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies).

### 3.8.2 Transcrição reversa

Para análise da expressão gênica, o RNA previamente isolado foi transcrito reversamente em DNA complementar (cDNA). Para isso, foi utilizado o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade com inibidor de RNase (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante e também dois controles, um que não continha RNA e outro que não continha MultiScribe® Transcriptase Reversa. A amostra com menor concentração de RNA foi utilizada para determinar o volume de entrada de RNA para transcrição reversa. Para isso, utilizou-se 10 µL da amostra de concentração mais baixa de RNA.

Os restantes das amostras foram diluídas em água livre de nuclease para atingir esta mesma concentração e um volume final total de 10µL utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Volume da amostra} = \frac{\text{Concentração mais baixa} \times 10}{\text{Concentração da amostra}}$$

A transcrição reversa foi realizada em um termociclador GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems).

### 3.8.3 RT-PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real quantitativa foi realizada para avaliar o sucesso da transdução a nível de mRNA nas células MCF7 TAMR e LTED através da análise da expressão de  $\Delta 40p53$  e p53.

Após a transcrição reversa do RNA, a análise de RT-PCR foi realizada em triplicata utilizando TaqMan® Universal PCR mix (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante e o resultado foi quantificado pelo equipamento QuantStudio 7 Pro RT-PCR (Applied Biosystems™). Os *primers* utilizados foram  $\Delta 40p53$ , previamente descrito por Avery-Kiejda e colaboradores (AVERY-KIEJDA *et al.*, 2014), TP53 (Hs01034249\_m1) e a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Hs02786624\_g1) foi utilizada como controle

endógeno, visto que sua expressão nas células é relativamente estável em resposta a tratamento e/ou fatores externos. A expressão relativa foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 3.9 CULTURA TRIDIMENSIONAL

Culturas de células tridimensionais (3D) são amplamente utilizadas em investigações de células cancerígenas, interações intracelulares e diferenciação celular, avaliação de toxicidade de substâncias e eficácia de fármacos e, portanto, mostram-se promissoras em preencher a lacuna entre cultura 2D e experimentos *in vivo* (BIAŁKOWSKA *et al.*, 2020). Portanto, os ensaios realizados na linhagem celular ZR75-1 foram posteriormente confirmados com a cultura 3D. Para isso, as células ZR75-1 controle não-alvo (shNT), *knockdown* de  $\Delta 40p53$  (sh1) e *knockdown* de p53 (sh3) foram plaqueadas numa densidade de  $4 \times 10^4$  células/mL em placas de 96 poços de ultrabaixa adesão, permitindo que as células cresçam sem se fixar às laterais dos poços e a formação dos esferóides. Previamente à contagem celular, as células foram filtradas em filtro de 40  $\mu\text{m}$  para produzir uma suspensão de células únicas. As placas foram então centrifugadas a 125 rpm durante 5 minutos e colocadas na incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Após 48 horas foram obtidas imagens dos esferóides utilizando o leitor de microplacas multimodo Cytation 3 (BioTek, Winooski, VT, USA) e o tamanho dos esferóides foi quantificado através do software Gen5™.

#### 3.9.1 Tamanho dos esferóides

Após a geração de imagens, os esferóides foram tratados da seguinte maneira: tratamento 1 contendo o meio de cultura previamente descrito para esta linhagem como controle, tratamento 2 contendo meio de cultura suplementado com csFBS, tratamento 3 contendo meio de cultura suplementado com csFBS e 10 pM de E2, tratamento 4 contendo meio de cultura acrescido de 0,1  $\mu\text{M}$  de TAM, tratamento 5 contendo meio de cultura acrescido de 0,5  $\mu\text{M}$  de TAM e tratamento 6 contendo meio de cultura acrescido de 1  $\mu\text{M}$  de TAM. As placas foram então armazenadas na incubadora e após 7 dias foram novamente obtidas imagens, quantificado o tamanho dos esferóides e tratadas novamente da mesma maneira. Após 14 dias foram apenas obtidas imagens, quantificado o tamanho dos esferóides e realizado o ensaio de viabilidade. Os ensaios foram realizados em triplicata em 3 dias consecutivos.

### 3.9.2 Viabilidade dos esferoides

Para avaliar a viabilidade dos esferoides após os tratamentos com estradiol e tamoxifeno, utilizaram-se as placas contendo os esferoides de ZR75-1 após os 14 dias de tratamento. Para isso, foi utilizado o reagente CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay (Promega, G9681) e o experimento foi conduzido seguindo as instruções do fabricante. Previamente à análise, a placa e o reagente foram mantidos à temperatura ambiente e o experimento foi realizado no escuro devido à fotossensibilidade do reagente. Foram então adicionados 100 µL do reagente em cada poço contendo 100 µL de meio de cultura com os respectivos tratamentos. A placa foi mantida durante 5 minutos no *shaker* e posteriormente durante 25 minutos em temperatura ambiente. A luminescência foi lida utilizando o equipamento BioTek Cytation 3 e o ensaio foi realizado em triplicata em 3 dias consecutivos.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

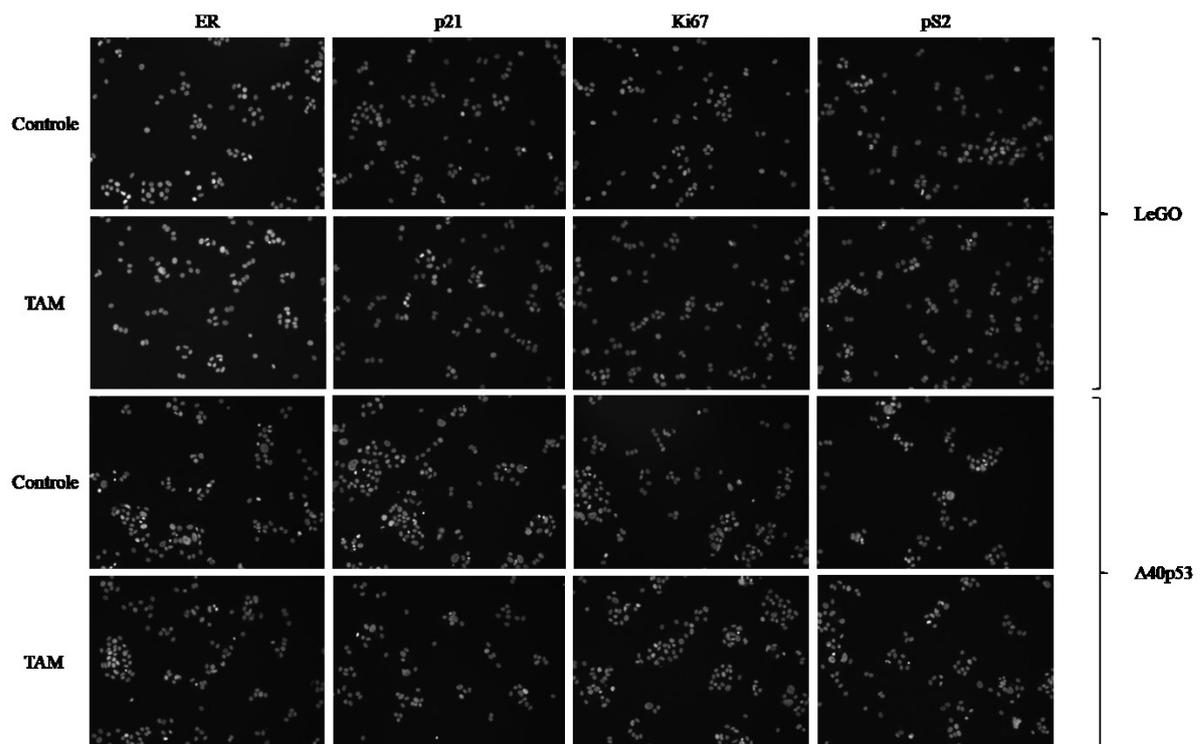
Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A simetria dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e as diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste T ou ANOVA de duas vias seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Quando três ou mais variáveis, as diferenças entre os grupos foram avaliadas utilizando o teste ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em  $P \leq 0,05$  para todas as análises, onde \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para avaliar o efeito da superexpressão de  $\Delta 40p53$  no tratamento com tamoxifeno, as células MCF-7 foram previamente transduzidas de forma estável para superexpressar  $\Delta 40p53$ . A expressão do receptor de estrogênio (ER), proteína p21, Ki67 e da proteína parasporina 2 (PS2) foram avaliadas através de imunofluorescência após tratamento com tamoxifeno das células MCF-7 LeGO e superexpressando  $\Delta 40p53$  (Figura 61).

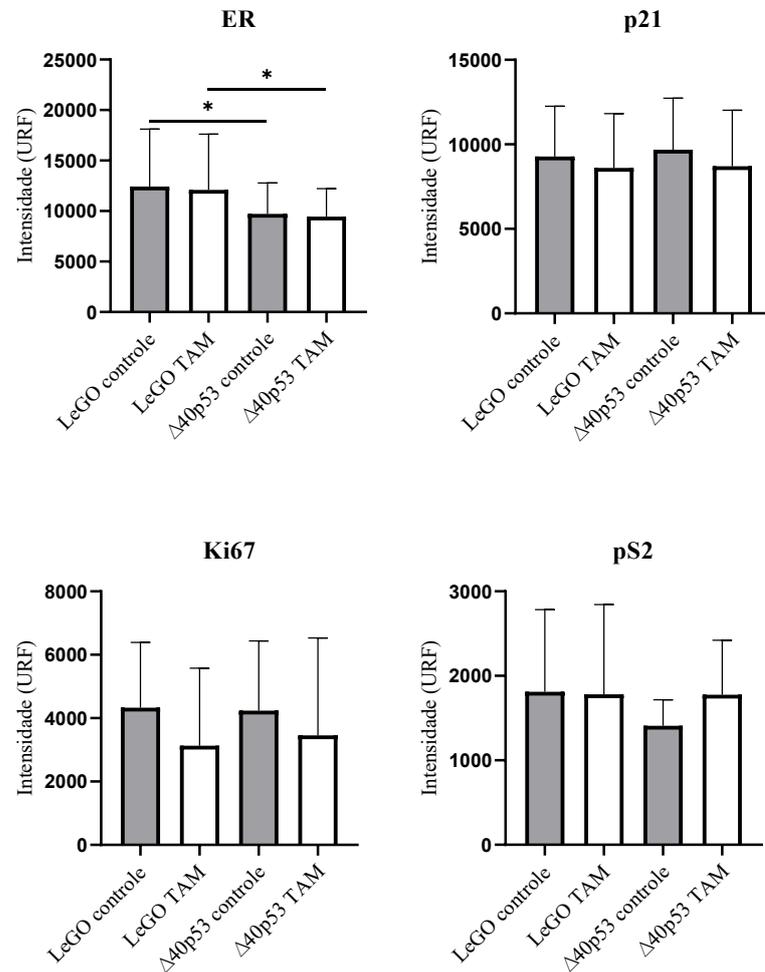
Figura 61 – Expressão de proteínas por imunofluorescência



Fonte: a autora.

Após análise da expressão das proteínas pela intensidade da fluorescência, viu-se que houve uma diminuição estatisticamente significativa da expressão de ER nas células superexpressando  $\Delta 40p53$ , tanto nas células controle quanto nas células tratadas com tamoxifeno, enquanto os outros marcadores mantiveram expressão similar em ambas as linhagens (Figura 62).

Figura 62 – Expressão relativa das proteínas.

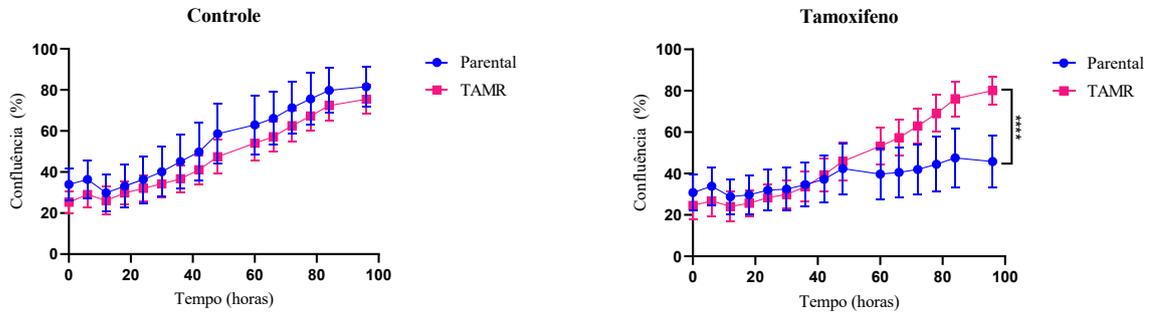


URF – unidade relativa de fluorescência. Resultados expressos em média e desvio padrão. ANOVA de duas vias seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. N = 9. \*P<0.05. Fonte: a autora

## 4.2 CONFIRMANDO RESISTÊNCIA AO TAMOXIFENO

Previamente às análises utilizando a linhagem celular MCF-7 resistente à tamoxifeno (TAMR), foi realizado ensaio de confluência para confirmar a resistência ao tamoxifeno. Para isso, as células MCF-7 parental e as células MCF-7 TAMR foram tratadas com 1 $\mu$ M de tamoxifeno. Após quatro dias, viu-se que as células MCF-7 parental tratadas com tamoxifeno apresentaram menor crescimento celular em comparação com as células MCF-7 TAMR, confirmando resistência dessa linhagem ao tamoxifeno (Figura 63).

Figura 63 - Análise confirmatória de resistência ao tamoxifeno.

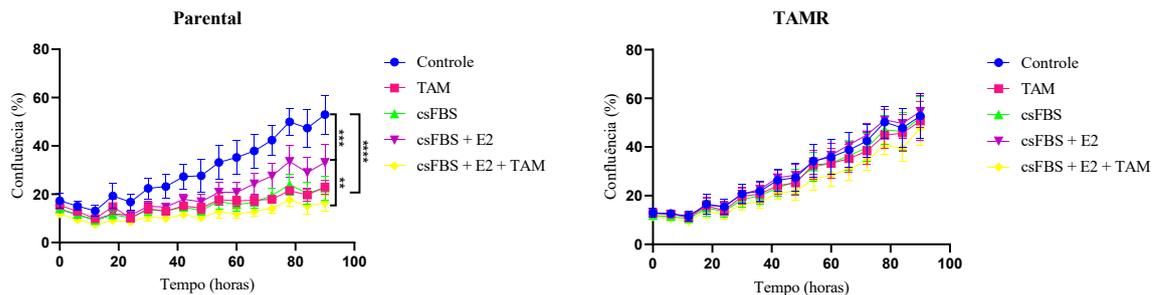


Resultados expressos em média e desvio padrão. Teste T. N = 9. \*\*\*\*P<0.0001. Fonte: a autora.

#### 4.3 AVALIANDO RESPOSTA AO ESTROGÊNIO

Para avaliar resposta da linhagem MCF-7 parental e da linhagem MCF-7 TAMR frente à estímulo com estradiol, utilizou-se o ensaio de confluência com diferentes tratamentos. Após os quatro dias do ensaio, viu-se que a linhagem celular MCF-7 TAMR manteve o mesmo padrão de crescimento independente dos tratamentos, enquanto a linhagem parental apresentou menor crescimento celular quando tratada com estrogênio e/ou tamoxifeno (Figura 64).

Figura 64 – Resposta ao estradiol



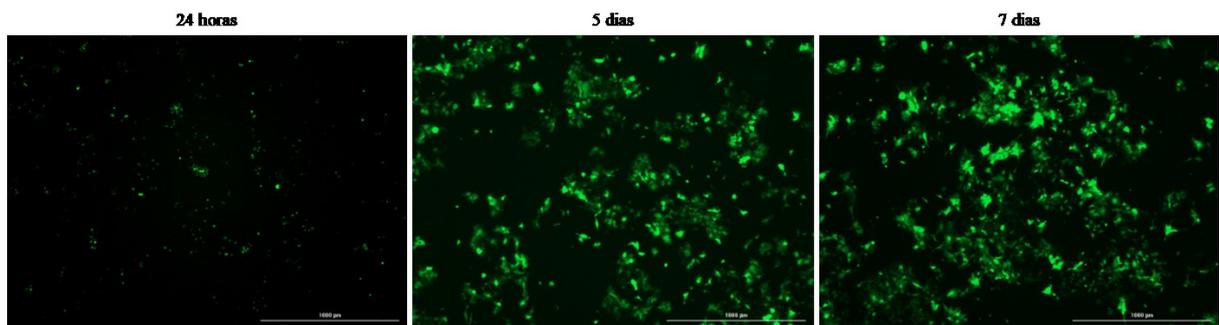
Resultados expressos em média e desvio padrão. ANOVA de duas vias seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. N = 9. \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001. Fonte: a autora

#### 4.4 TRANSDUÇÃO

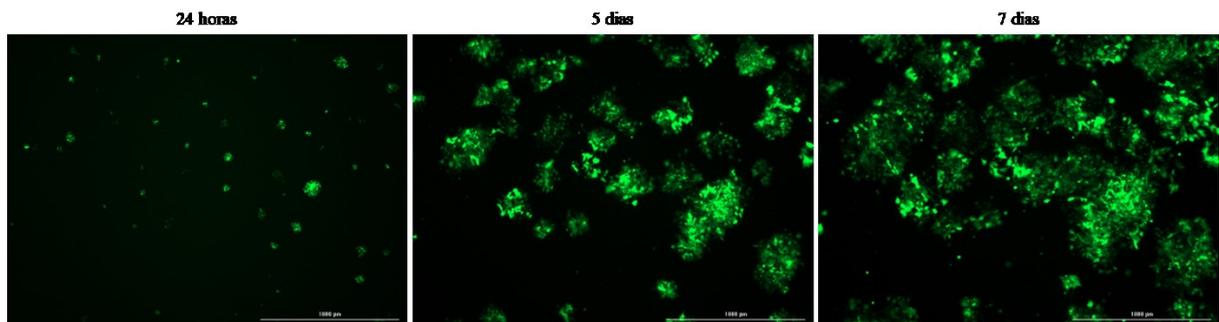
Após a realização do protocolo de transdução das células MCF-7 TAMR e LTED, foram obtidas imagens para avaliação do GFP 24 horas, 5 dias e 7 dias após transdução (Figura 65).

Figura 65 – GFP após transdução.

A



B

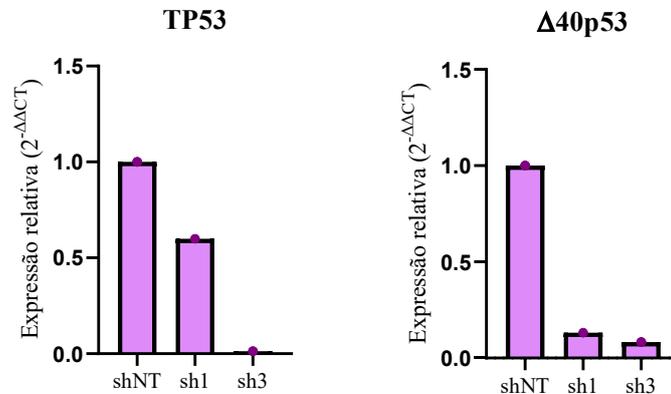


A – Linhagem celular MCF-7 TAMR; B – linhagem celular MCF-7 LTED. Fonte: a autora.

##### 4.4.1 RT-qPCR

Para confirmar o sucesso da transdução, foi realizado o ensaio de PCR, a fim de avaliar a expressão de  $\Delta 40p53$  e TP53 a nível de mRNA. Após o ensaio, viu-se que na linhagem MCF-7 TAMR, a expressão de TP53 na linhagem *knockdown* de p53 (sh3) encontrava-se muito inferior em relação ao controle (shNT). Da mesma forma a expressão de  $\Delta 40p53$  na linhagem *knockdown* de  $\Delta 40p53$  (sh1) também se apresentou inferior em relação ao controle (Figura 66).

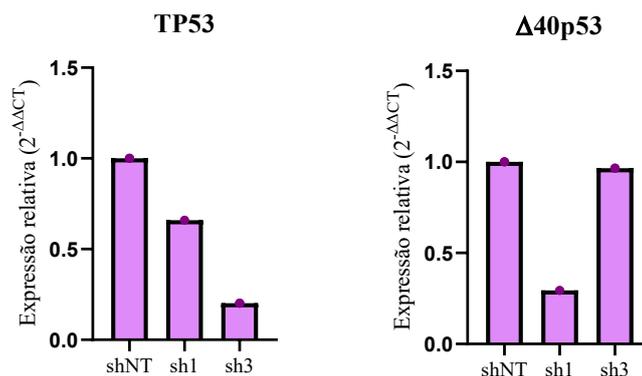
Figura 66 – Expressão gênica após transdução da célula MCF-7 TAMR.



shNT – controle não-alvo; sh1 – knockdown de  $\Delta 40p53$ ; sh3 – knockdown de p53. ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. N = 9. Fonte: a autora.

Da mesma forma, a expressão de TP53 e de  $\Delta 40p53$  também foi avaliada após transdução da linhagem MCF-7 LTED. Viu-se que a expressão de TP53 encontrava-se inferior ao controle na linhagem *knockdown* de p53, bem como a expressão de  $\Delta 40p53$  encontrava-se inferior ao controle na linhagem *knockdown* de  $\Delta 40p53$  (Figura 67).

Figura 67 – Expressão gênica após transdução da célula MCF-7 LTED.

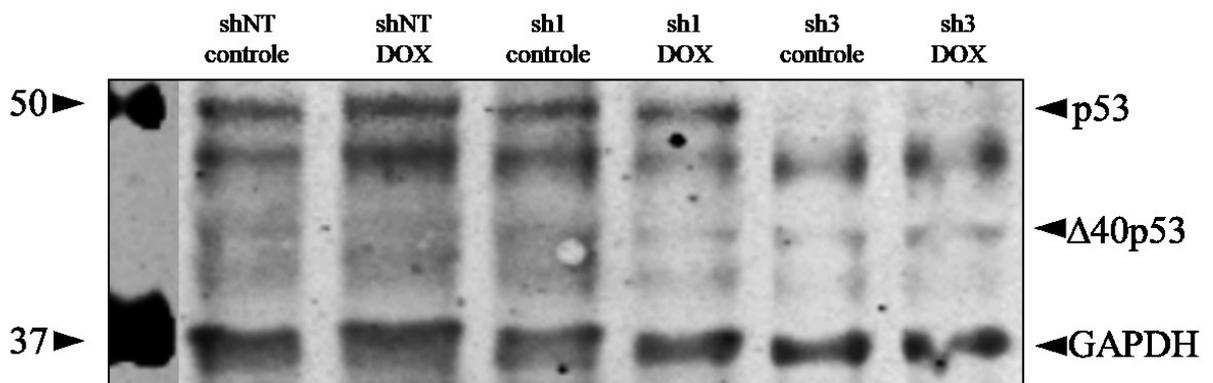


shNT – controle não-alvo; sh1 – knockdown de  $\Delta 40p53$ ; sh3 – knockdown de p53. ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. N = 9. Fonte: a autora.

#### 4.4.2 Western Blot

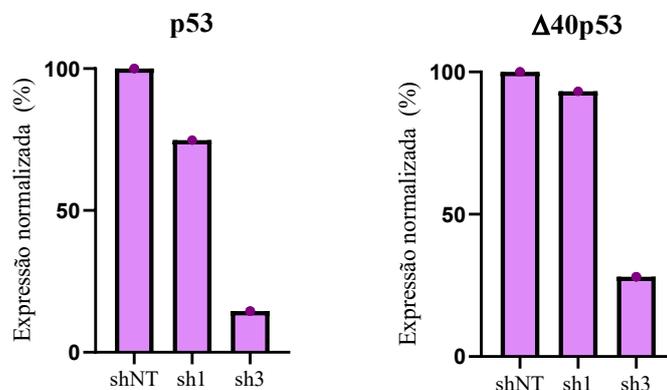
Também como confirmação do sucesso da transdução, foi realizado o ensaio de western blot, para avaliar a expressão de p53 e  $\Delta 40p53$  a nível proteico após o nocaute. Foi possível visualizar as bandas da p53 em aproximadamente 51-53kDa, da  $\Delta 40p53$  em aproximadamente 45kDa e do controle endógeno GAPDH em aproximadamente 36kDa (Figura 68). Após a transdução das células MCF-7 TAMR, viu-se que a expressão de p53 nas células sh3 foi muito inferior em relação ao controle, no entanto, a expressão de  $\Delta 40p53$  se manteve aumentada nas células sh1 mesmo após o nocaute (Figura 69).

Figura 68 – Western blot após transdução da célula MCF-7 TAMR.



shNT – controle não-alvo; sh1 – knockdown de  $\Delta 40p53$ ; sh3 – knockdown de p53. DOX - 1  $\mu$ M de doxorrubicina. N = 9. Fonte: a autora.

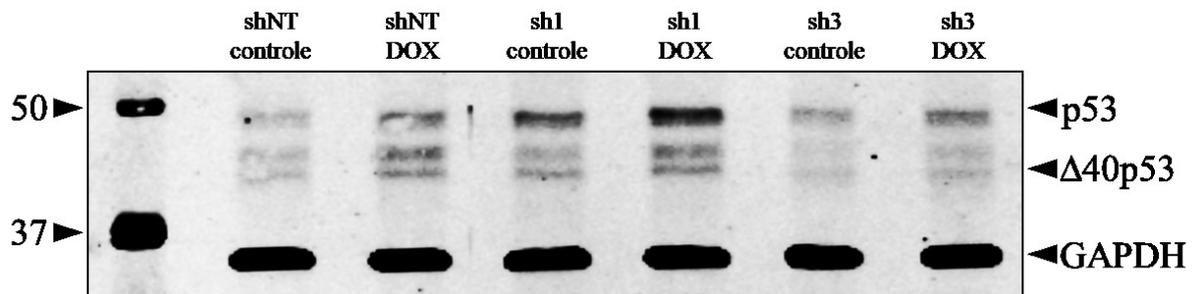
Figura 69 – Expressão proteica após transdução da célula MCF-7 TAMR.



shNT – controle não-alvo; sh1 – knockdown de  $\Delta 40p53$ ; sh3 – knockdown de p53. ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. N = 9. Fonte: a autora.

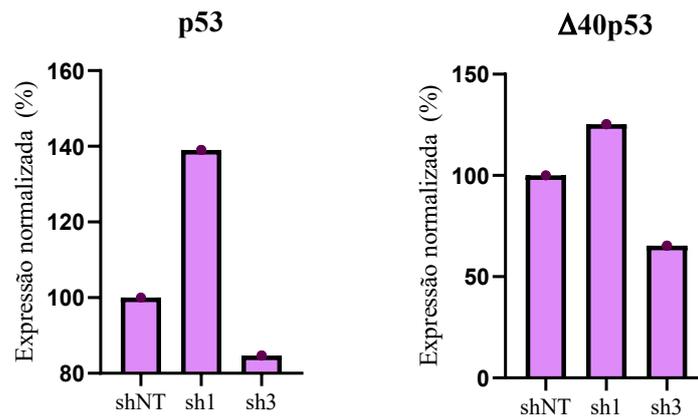
Da mesma forma, a expressão proteica de p53 e  $\Delta 40p53$  na célula MCF-7 LTED também foi avaliada (Figura 70), resultando em expressão diminuída de p53 nas células sh3, no entanto, nas células *knockdown* de  $\Delta 40p53$ , a expressão da proteína se manteve aumentada (Figura 71).

Figura 70 – Western blot após transdução da célula MCF-7 LTED



shNT – controle não-alvo; sh1 – knockdown de  $\Delta 40p53$ ; sh3 – knockdown de p53. DOX - 1  $\mu$ M de doxorubicina. N = 9. Fonte: a autora.

Figura 71 - Expressão proteica após transdução da célula MCF-7 LTED



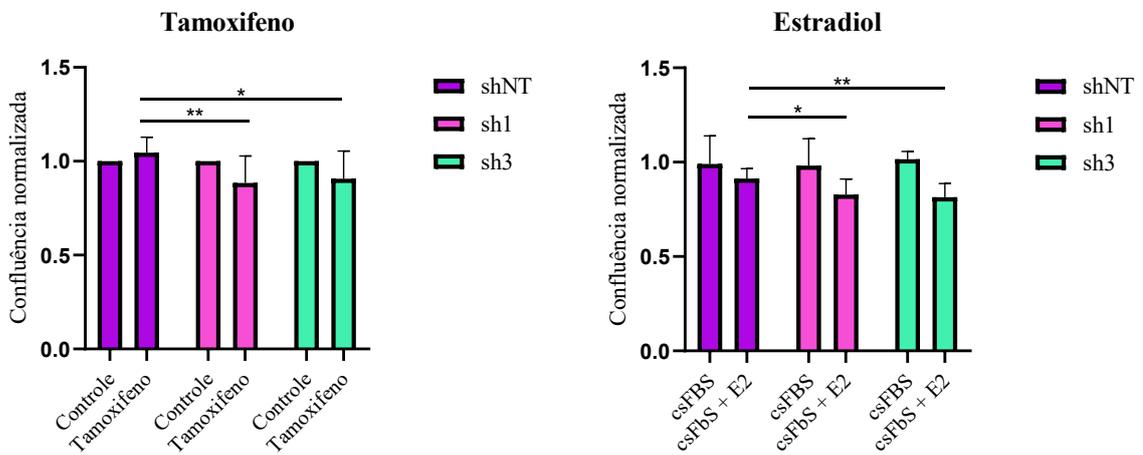
shNT – controle não-alvo; sh1 – knockdown de  $\Delta 40p53$ ; sh3 – knockdown de p53. ANOVA de uma via seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. N = 9. Fonte: a autora.

#### 4.4.3 Avaliando resposta das células transduzidas

Para avaliar a resposta das novas células MCF-7 TAMR e LTED transduzidas frente à diferentes tratamentos, foi realizado o ensaio de confluência, seguido de ensaio de viabilidade.

As células MCF-7 TAMR transduzidas apresentaram uma diminuição da confluência quando tratadas com tamoxifeno ou estradiol, tanto para as células knockdown de p53 quanto para as células knockdown de  $\Delta 40p53$  (Figura 72).

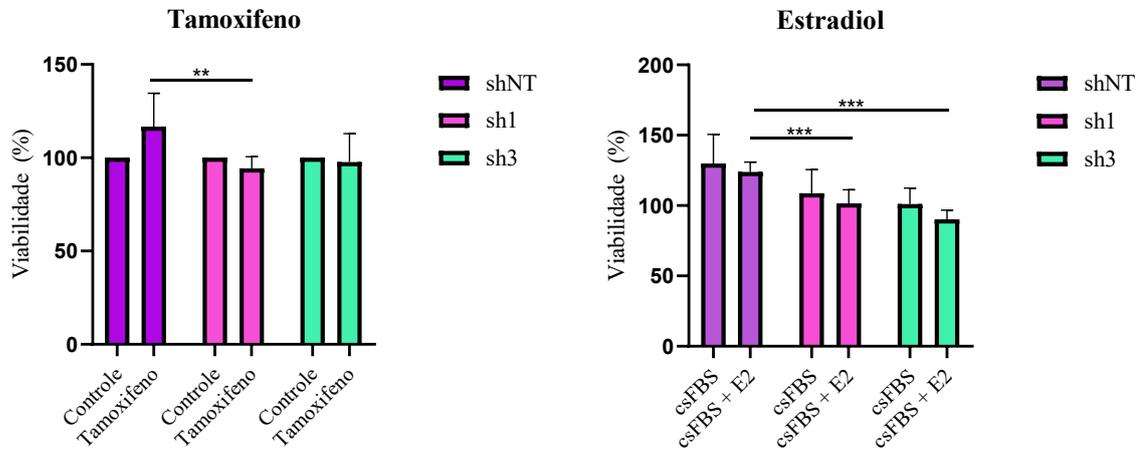
Figura 72 - Confluência após transdução da célula MCF-7 TAMR.



shNT – controle não-alvo; sh1 – knockdown de  $\Delta 40p53$ ; sh3 – knockdown de p53. Teste T. N = 9. Fonte: a autora.

Da mesma forma, a viabilidade das células MCF-7 TAMR sh1 diminuiu em relação ao controle não alvo quando tratada com tamoxifeno, bem como a viabilidade das células sh1 e sh3 quando tratadas com estradiol (Figura 73).

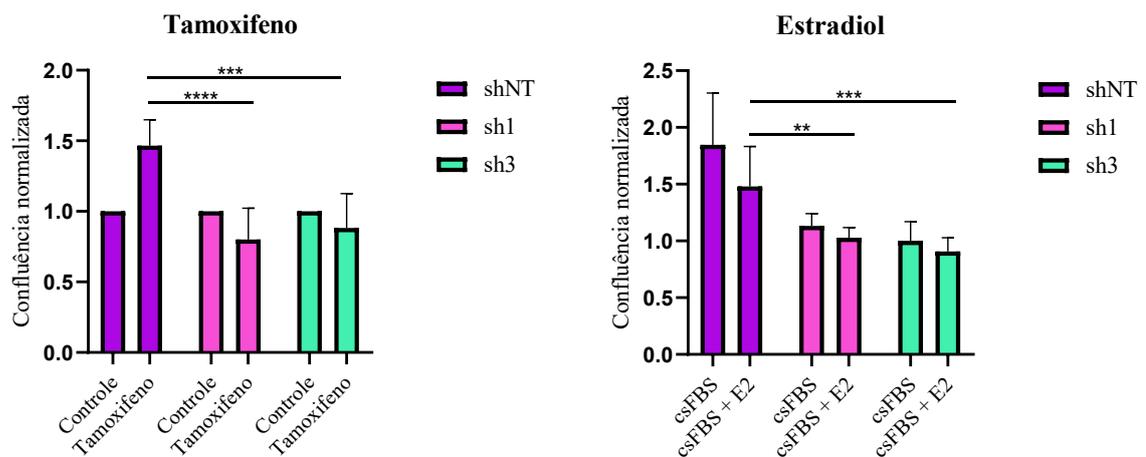
Figura 73 - Viabilidade após transdução da célula MCF-7 TAMR.



shNT – controle não-alvo; sh1 – knockdown de  $\Delta 40p53$ ; sh3 – knockdown de p53. Teste T. N = 9. Fonte: a autora.

Da mesma maneira, as células MCF-7 LTED apresentaram uma diminuição da confluência quando tratadas com tamoxifeno ou estradiol, tanto para as células *knockdown* de p53 quanto para as células knockdown de  $\Delta 40p53$  (Figura 74).

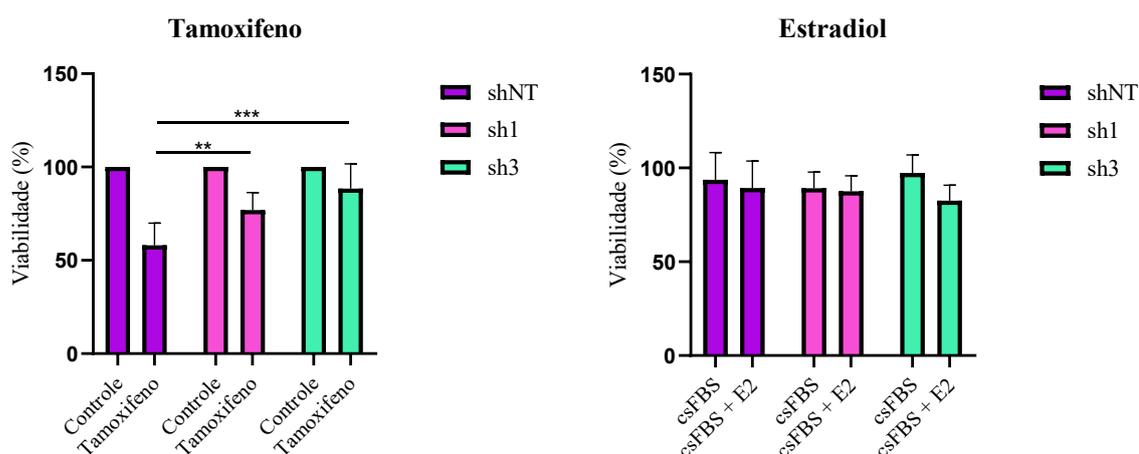
Figura 74 - Confluência após transdução da célula MCF-7 LTED.



shNT – controle não-alvo; sh1 – knockdown de  $\Delta 40p53$ ; sh3 – knockdown de p53. Teste T. N = 9. Fonte: a autora.

No entanto, o ensaio de viabilidade apresentou um diferente resultado, onde as células sh1 e sh3 tratadas com tamoxifeno apresentaram maior viabilidade quando comparadas ao controle não alvo. Entre as células tratadas com estradiol, não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 75).

Figura 75 - Viabilidade após transdução da célula MCF-7 LTED.



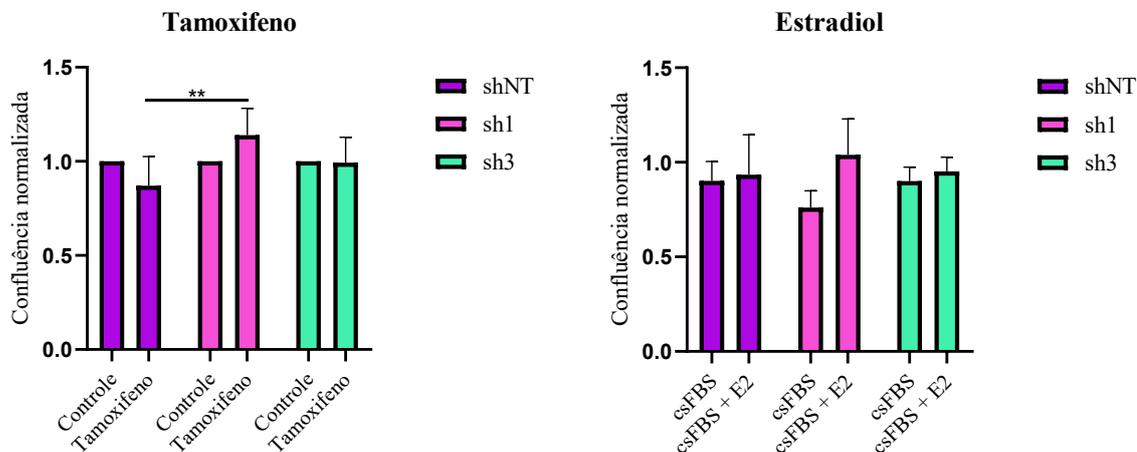
shNT – controle não-alvo; sh1 – knockdown de  $\Delta 40p53$ ; sh3 – knockdown de p53. Teste T. N = 9. Fonte: a autora.

#### 4.5 AVALIANDO RESPOSTA AO TAMOXIFENO E ESTROGÊNIO

Para avaliar a resposta das células ZR75-1 frente à diferentes tratamentos, foi realizado o ensaio de confluência, seguido de ensaio de viabilidade.

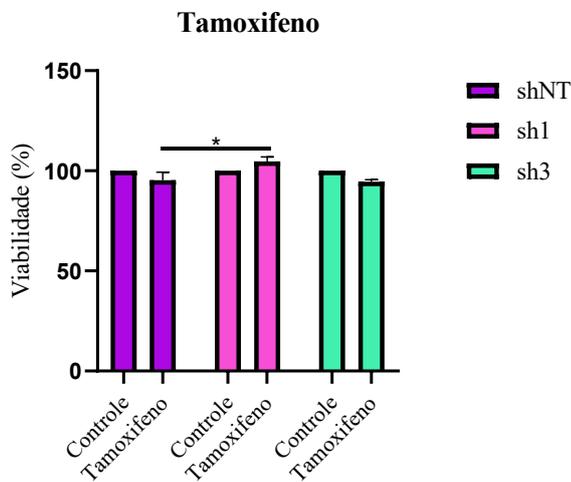
As células ZR75-1 shNT, sh1 e sh3 apresentaram pouca variação tanto no ensaio de confluência (Figura 76) quanto no de viabilidade (Figura 77) tratadas com tamoxifeno e estradiol. Sendo a única diferença estatisticamente significativa, o aumento de confluência e de viabilidade das células sh1 tratadas com tamoxifeno.

Figura 76 – Ensaio de confluência ZR75-1.



shNT – controle não-alvo; sh1 – knockdown de  $\Delta 40p53$ ; sh3 – knockdown de p53. Teste T. N = 9. Fonte: a autora.

Figura 77 – Ensaio de viabilidade ZR75-1.



shNT – controle não-alvo; sh1 – knockdown de  $\Delta 40p53$ ; sh3 – knockdown de p53. Teste T. N = 9. Fonte: a autora.

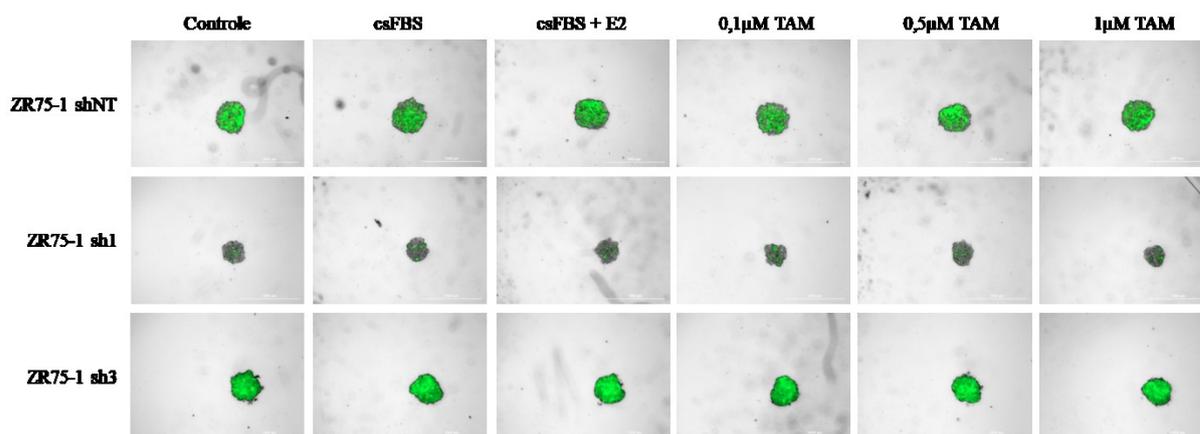
#### 4.5.1 Esferóides

Como forma de confirmar os resultados obtidos com a cultura 2D das células ZR75-1, foram realizados ensaios utilizando os mesmos tratamentos com a cultura 3D. Foram obtidas

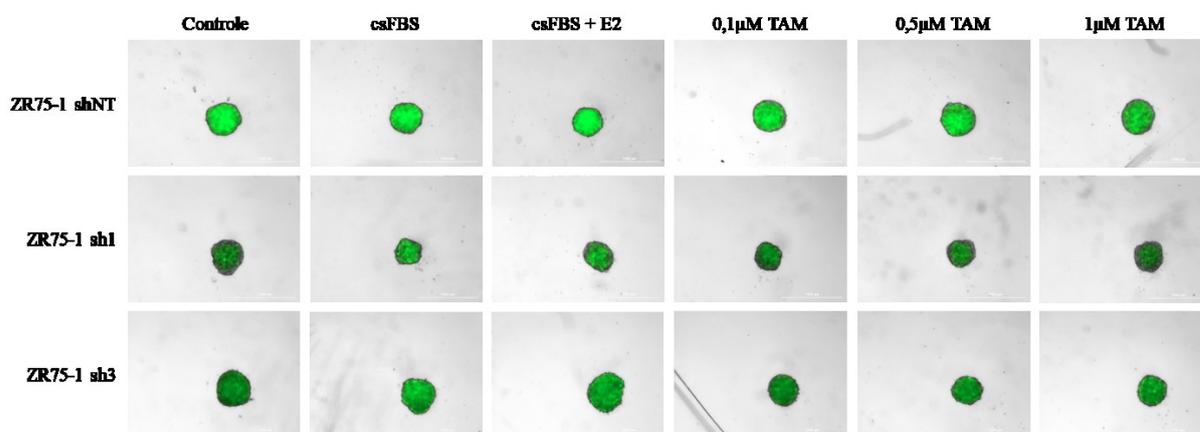
imagens nos dias 0 (sem tratamento), dia 7 (7 dias após o tratamento) e dia 14 (14 dias após o tratamento) (Figura 78).

Figura 78 – Cultura 3D ZR75-1.

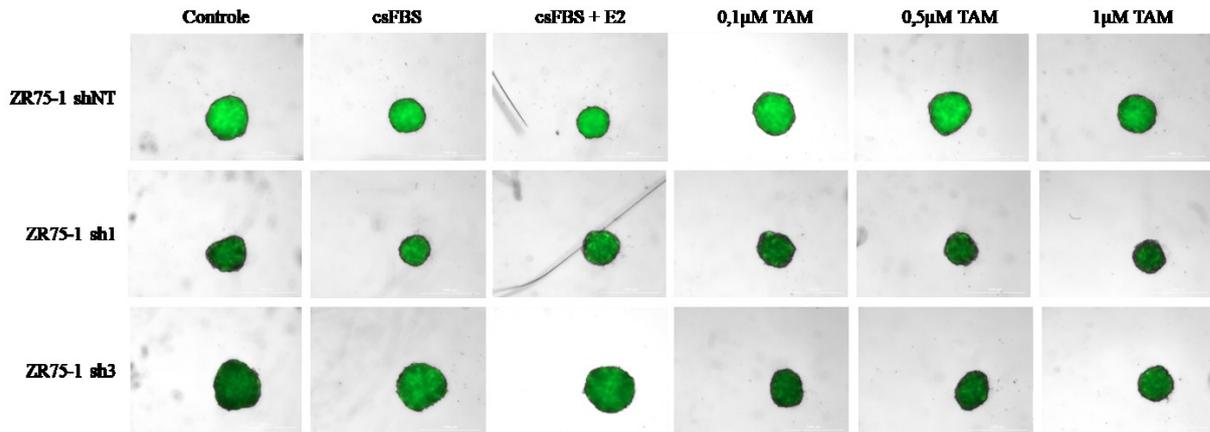
Dia 0



Dia 7



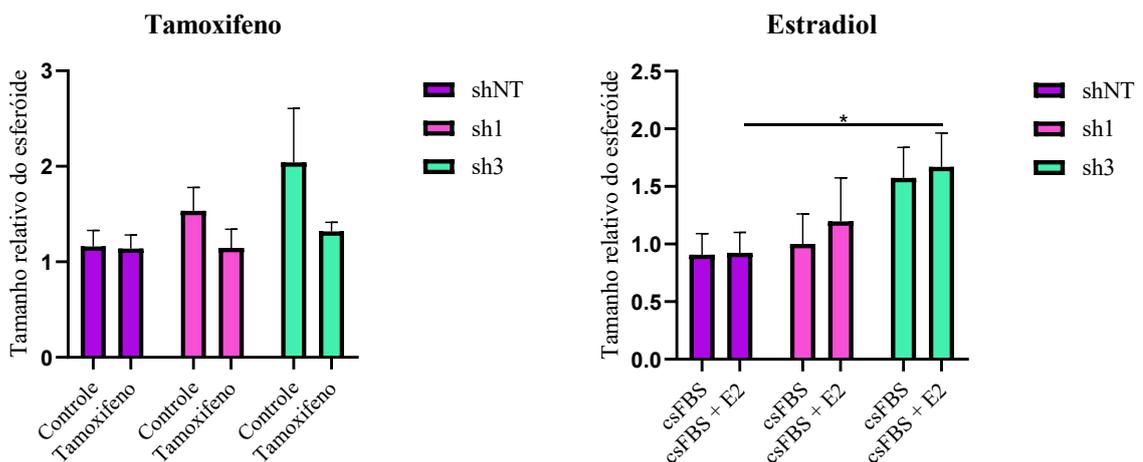
Dia 14



shNT – controle não-alvo; sh1 – knockdown de  $\Delta 40p53$ ; sh3 – knockdown de p53. N = 9. Fonte: a autora.

Após os 14 dias de tratamento dos esferoides, foi avaliado o tamanho dos esferoides frente aos tratamentos com tamoxifeno e estradiol em relação ao controle não alvo (Figura 79). Observou-se um aumento no tamanho dos esferoides *knockdown* de p53 (sh3) tratados com estradiol quando comparados ao controle não alvo (shNT).

Figura 79 – Tamanho dos esferoides ZR75-1.

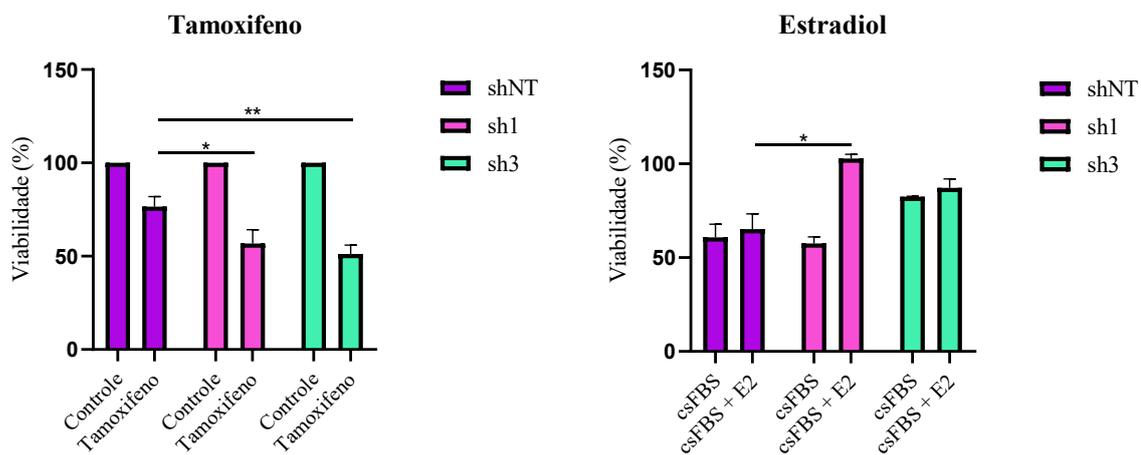


shNT – controle não-alvo; sh1 – knockdown de  $\Delta 40p53$ ; sh3 – knockdown de p53. Teste T. N = 9. Fonte: a autora.

Também, avaliou-se a viabilidade dos esferoides após os 14 dias de tratamento (Figura 80). Observou-se uma diminuição da viabilidade dos esferoides sh1 e sh3 quando tratados com

tamoxifeno em relação ao controle não alvo, bem como aumento da viabilidade nos esferoides *knockdown* de  $\Delta 40p53$  quando tratados com estradiol em relação ao controle não alvo.

Figura 80 – Viabilidade dos esferoides ZR75-1



shNT – controle não-alvo; sh1 – knockdown de  $\Delta 40p53$ ; sh3 – knockdown de p53. Teste T. N = 9. Fonte: a autora.

## 5 DISCUSSÃO

Sabe-se que as vias de sinalização de ER $\alpha$  e p53 estão interligadas no câncer de mama e que podem afetar a expressão e a atividade transcricional um do outro, impactando diretamente no crescimento do câncer. Apesar de as isoformas de p53 já serem conhecidas há mais de uma década, a sua relação com o câncer ainda não é totalmente elucidada. Desta maneira, têm-se tentado demonstrar que a isoforma  $\Delta$ 40p53 pode desempenhar um papel crítico na modulação do eixo p53/ER $\alpha$  no câncer de mama através de linhagens de câncer de mama ER $\alpha$  positivas.

Resultados prévios ao presente trabalho, realizados pelo grupo de pesquisa da Dra. Kelly, demonstraram que há uma correlação entre a expressão de  $\Delta$ 40p53 e ER $\alpha$ , seus genes-alvo e o marcador de proliferação Ki67 em tumores de mama ER $\alpha$ -positivos, o que levou a se pensar que a isoforma  $\Delta$ 40p53 poderia modular a expressão e sinalização de ER $\alpha$ . Quando foi realizado o nocaute de  $\Delta$ 40p53 em células MCF-7, observou-se um aumento da expressão basal de ER $\alpha$  e seus genes alvo PR e pS2 e, após tratamento com estradiol, a expressão desses genes diminuiu. No entanto, esses efeitos eram dependentes da linhagem celular, visto que ao utilizar a linhagem ZR75-1, não foi observada a mesma diferença (MORTEN, 2016).

Também se levantou a hipótese de que  $\Delta$ 40p53 interfere na sinalização do ER $\alpha$  mediada por p53, promovendo resistência a terapias anti-hormonais. As células MCF-7 tratadas com tamoxifeno tiveram uma expressão da proteína p53 diminuída em relação ao controle, no entanto, a expressão da proteína  $\Delta$ 40p53 manteve-se inalterada, sugerindo que essa isoforma poderia estar envolvida na sinalização desregulada de p53-ER $\alpha$  em células de câncer de mama MCF-7. A nível de gene, células MCF-7 que superexpressavam  $\Delta$ 40p53 tiveram uma expressão de ER $\alpha$  menor em relação ao controle, no entanto esse resultado não mudou mesmo após o tratamento com tamoxifeno. Considerando que ER $\alpha$  é um alvo para o crescimento induzido por estrogênio no câncer de mama ER+, as células que superexpressam  $\Delta$ 40p53 também não proliferavam mais em resposta ao estradiol, pode-se pressupor então que a alta expressão de  $\Delta$ 40p53 causa perda da função de p53, que é um mediador crítico da expressão de ER $\alpha$ , causando negatividade de ER $\alpha$ . Essa expressão diminuída de ER $\alpha$  pode ser responsável pela sensibilidade reduzida ao tamoxifeno em células de câncer de mama ER+ (GREER, 2022).

Neste trabalho, viu-se que a nível de proteína, através do ensaio de imunofluorescência, também há uma diminuição da expressão de ER $\alpha$  em relação ao controle

em células que superexpressam  $\Delta 40p53$ , corroborando com o resultado encontrado no trabalho feito por Greer e demonstrando mais uma vez a relação da isoforma  $\Delta 40p53$  com a sinalização de p53 e ER $\alpha$ .

Também se percebeu, neste estudo, que as células MCF-7 resistentes à tamoxifeno não respondiam ao tratamento com estradiol da mesma maneira que a célula MCF-7 parental. Uma análise proteômica das células MCF-7 resistentes ao tamoxifeno realizada por Zhou e colaboradores, demonstrou que 629 proteínas foram encontradas significativamente alteradas, sendo 364 reguladas para cima e 264 reguladas para baixo. Essas mudanças demonstraram um estado suprimido do ER $\alpha$  e seus genes reguladores (como o PGR e o pS2), ativação da sinalização e sobrevivência e aumento da capacidade migratória da linhagem celular resistente (ZHOU, C. *et al.*, 2012). Esses dados demonstraram que as mudanças adaptativas no proteoma das células MCF-7 resistentes à tamoxifeno são caracterizadas também por sinalização de ER $\alpha$  reguladas negativamente, o que poderia explicar a alta confluência das células resistentes independente do tratamento com ou sem estradiol.

Em outro estudo, viu-se que a manutenção da sinalização do ER $\alpha$  é crítica para o sucesso dos tratamentos endócrinos e o desenvolvimento de resistência à terapia está associado à perda da expressão ou mutações do ER $\alpha$ . Também, após o desenvolvimento de resistência ao tamoxifeno nas células MCF-7, observou-se uma perda da expressão do mRNA *ESR1* e também houve reprogramação dos sítios de ligação do ER em todo o genoma (ACHINGER-KAWECKA *et al.*, 2020).

As células MCF-7 resistentes à tamoxifeno e as células MCF-7 em deprivação de estrogênio também foram transduzidas durante o período deste estudo, com o intuito de silenciar os genes p53 e  $\Delta 40p53$ . É importante salientar que previamente ao silenciamento, deve ser feito um protocolo de otimização, onde se estipula a densidade ideal de células e também a concentração ideal do lentivírus e da hexadimetrina, bem como o tempo de incubação das células. No entanto, devido ao pouco tempo disponível, optou-se por seguir o mesmo protocolo utilizado para as células MCF-7 parental, já previamente otimizado pelo grupo de estudos. Essa limitação do estudo poderia explicar o por que a sublinhagem *knockdown* de  $\Delta 40p53$  não obteve sucesso a nível de proteína.

No entanto, ainda assim foi visto diferença entre os resultados de confluência e viabilidade entre as sublinhagens, quando tratadas com tamoxifeno ou estradiol. Os resultados encontrados por Greer realizados previamente pelo mesmo grupo de pesquisa, demonstraram

que nas células MCF-7 *knockdown* de  $\Delta 40p53$ , quando tratadas com estradiol, a confluência manteve-se similar ao controle, no entanto quando foram tratadas com meio sem estradiol, sua confluência diminuiu. Já as células *knockdown* de p53 apresentaram uma diminuição da confluência quando tratadas com estradiol e a confluência manteve-se similar ao controle quando tratadas com meio sem estradiol. Esses ensaios confirmaram a hipótese de que direcionar  $\Delta 40p53$  pode restaurar a sinalização de p53-ER $\alpha$ , uma vez que as células *knockdown* de  $\Delta 40p53$  foram sensíveis ao tratamento com estradiol e, portanto, restauraram a regulação de p53 na sinalização de ER $\alpha$ . Enquanto as células *knockdown* de p53 não eram sensíveis ao tratamento, apresentando então uma sinalização de p53-ER desregulada. Isso justifica os efeitos proliferativos opostos dessas duas sublinhagens (GREER, 2022). Já neste trabalho, viu-se uma diminuição da confluência em ambas as linhagens transduzidas (MCF-7 TAMR e LTED) quando tratadas com estradiol, tanto da sublinhagem *knockdown* de p53 quanto de  $\Delta 40p53$ . As células MCF-7 TAMR inclusive apresentaram também uma diminuição da viabilidade. Nesse caso, o não sucesso da transdução de  $\Delta 40p53$  a nível de proteína pode justificar a mesma resposta em ambas as sublinhagens, bem como o estado suprimido que o ER $\alpha$  se encontra em células MCF-7 resistentes à tamoxifeno, como citado anteriormente.

Em relação ao tratamento com tamoxifeno, os resultados anteriores demonstram que nas células MCF-7 *knockdown* de  $\Delta 40p53$  houve uma diminuição da confluência quando as células foram tratadas com tamoxifeno, enquanto que nas células *knockdown* de p53 a confluência se manteve similar ao controle sem tratamento, confirmando a hipótese de que o direcionamento de  $\Delta 40p53$  também pode aumentar a sensibilidade do tamoxifeno em células de câncer de mama. Portanto, sugere-se que uma baixa razão  $\Delta 40p53:p53$  em células de câncer de mama pode sensibilizar as células às terapias anti-hormonais, do contrário, uma alta razão  $\Delta 40p53:p53$  poderia reduzir significativamente a sensibilidade ao tamoxifeno. Já as células MCF-7 resistentes à tamoxifeno, quando tratadas com tamoxifeno, apresentaram uma diminuição da confluência em ambas as sublinhagens, *knockdown* de  $\Delta 40p53$  e p53, quando comparadas à sublinhagem controle não alvo, sendo assim, o *knockdown* de p53 e sua isoforma atenuaram a resistência ao tamoxifeno.

Estes mesmos ensaios de confluência e viabilidade foram reproduzidos em outra linhagem celular de câncer de mama ER+, a ZR75-1, também com os mesmos tratamentos, para testar a resposta em diferentes linhagens. No entanto, essa linhagem possui uma característica de crescimento diferente, em que as células crescem em mais de uma camada, e

não formando uma monocamada de células como a linhagem MCF-7, por esse motivo, o ensaio de confluência não é o ideal para essa linhagem. No entanto, com o ensaio de viabilidade foi possível perceber um aumento da viabilidade celular das células ZR75-1 *knockdown* de  $\Delta 40p53$  quando tratadas com tamoxifeno, resultado oposto ao encontrado com as células MCF-7 TAMR, porém similar às células MCF-7 LTED, o que demonstra que a resposta ao *knockdown* de  $\Delta 40p53$  é dependente da linhagem celular utilizada.

Também utilizando a linhagem ZR75-1, foi realizada a cultura 3D, no entanto, devido ao viés de padrão de crescimento dessa linhagem, a análise de tamanho do esferoide pode ter sido prejudicada. Em estudo anterior utilizando a cultura 3D com as células MCF-7, houve uma diminuição do tamanho do esferoide quando tratado com estradiol na sublinhagem *knockdown* de  $\Delta 40p53$ , enquanto neste estudo observou-se um aumento do tamanho quando tratado com estradiol, na sublinhagem *knockdown* de p53. Esse ensaio fornece evidências de que o *knockdown* de  $\Delta 40p53$  pôde sensibilizar as células de câncer de mama ER+ ao estrogênio, portanto, células MCF-7 com baixa relação  $\Delta 40p53:p53$  respondem ao tratamento com estradiol. No entanto, novamente esse resultado foi dependente da linhagem celular, uma vez que a ZR75-1, também ER+, demonstrou um resultado diferente. Esse resultado não corrobora com o encontrado no ensaio de viabilidade da ZR75-1, que demonstrou um aumento da viabilidade do esferoide da sublinhagem *knockdown* de  $\Delta 40p53$  quando tratado com estradiol.

Ao tratar os esferoides com tamoxifeno, resultados anteriores utilizando a linhagem MCF-7 demonstraram uma diminuição do tamanho do esferoide da sublinhagem não alvo e do *knockdown* de  $\Delta 40p53$ , enquanto o *knockdown* de p53 não apresentou variação. Este resultado demonstra que uma alta relação  $\Delta 40p53:p53$  prejudica significativamente a sensibilidade ao tamoxifeno em células de câncer de mama ER+, sugerindo então que uma baixa relação  $\Delta 40p53:p53$  poderia sensibilizar as células a terapias anti-hormonais. Já neste estudo, o tamanho do esferoide não variou com o tratamento com tamoxifeno, no entanto a sua viabilidade diminuiu em relação ao controle não alvo com as duas sublinhagens.

Novamente é importante salientar que devido à característica de crescimento da linhagem ZR75-1, o ensaio de avaliação de tamanho do esferoide não é efetivo, por isso também se optou por complementar o com o teste de viabilidade, o que justifica também os diferentes resultados entre os testes.

As diferenças observadas entre linhagens celulares também são suportadas por estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa da Dra. Kelly, que mostraram funções específicas

da  $\Delta 40p53$  em diferentes linhagens. Essas diferenças podem ser explicadas pelas diferentes expressões de mRNA induzidas por estradiol e também por diferentes níveis de atividade transcricional de  $ER\alpha$  em diferentes linhagens, sendo assim, a  $\Delta 40p53$  pode exercer efeitos específicos da linhagem celular que podem ser dependentes do nível endógeno de  $ER\alpha$  (MORTEN, 2016).

Além disso, alguns estudos têm demonstrado um papel importante no eixo  $p53/ER\alpha$  para a reparação de danos no DNA induzidos por estradiol (CHEN, J. *et al.*, 2022), bem como na mediação de respostas transcricionais a quimioterápicos (LION *et al.*, 2013), ambos dependentes da interação entre  $p53$  e  $ER\alpha$ . Também, embora seja relatado que a expressão de  $ER\alpha$  suprime  $p53$ , em certas condições,  $p53$  também pode suprimir  $ER\alpha$  (BERGER, C.; QIAN; CHEN, 2013). Essa interação pode também resultar em regulação positiva mútua, sendo assim, a interação entre  $p53$  e  $ER\alpha$  ainda não é bem clara (FERNÁNDEZ-CUESTA *et al.*, 2011).

Em estudo anterior realizado pelo grupo de pesquisa da Dra. Kelly, foi relatado que a  $\Delta 40p53$  foi a isoforma mais altamente expressa em uma coorte de tumores de mama, demonstrando a sua importância (AVERY-KIEJDA *et al.*, 2014). No entanto, a função de  $\Delta 40p53$  é variável. Hafsi e colaboradores demonstraram que o efeito de  $\Delta 40p53$  sobre  $FLp53$  eram dependentes da linhagem celular e que a proporção  $\Delta 40p53:p53$  era importante para o controle da resposta de  $p53$ . Quando  $\Delta 40p53$  era altamente expresso, apresentava função inibitória, no entanto, em níveis inferiores ou iguais a  $FLp53$ , apresentou efeito tanto inibitório quanto de ativação, variando de acordo com o contexto celular (HAFSI *et al.*, 2013). Em relação ao câncer, Morten e colaboradores relataram uma associação entre a diminuição da sobrevivência livre de metástase e uma alta relação  $\Delta 40p53:p53$  (MORTEN *et al.*, 2016). Sendo assim, aumentar a razão  $\Delta 40p53:p53$  pode ser um benefício terapêutico em cânceres onde a expressão aumentada de  $\Delta 40p53$  foi associada a um melhor prognóstico (HOFSTETTER *et al.*, 2012) ou em situações em que o aumento da sua expressão promove a apoptose (TAKAHASHI *et al.*, 2014). No entanto, em estudo murino, essa abordagem apresentou expectativa de vida e regeneração tecidual reduzidos, bem como declínio cognitivo como possíveis prejuízos da superexpressão de  $\Delta 40p53$ , sendo assim, deve ser limitada à células neoplásicas (PEHAR *et al.*, 2010).

Em geral, o estrogênio promove proliferação celular, no entanto, em células onde os níveis de  $p53$  e  $ER\alpha$  estão desregulados, o equilíbrio entre o crescimento estimulado por estrogênio via  $ER\alpha$  e a supressão do crescimento mediada por  $p53$  é interrompido, levando ao

crescimento descontrolado do tumor, mesmo quando há níveis elevados de p53 (BERGER, C.; QIAN; CHEN, 2013).

## 6 CONCLUSÃO

- Em células MCF-7, a superexpressão de  $\Delta 40p53$  resultou em diminuição da expressão de ER $\alpha$ , demonstrando a relação da isoforma com a sua sinalização;
- Células MCF-7 resistentes à tamoxifeno regulam a sinalização de ER $\alpha$  diferentemente da linhagem parental;
- O *knockdown* de p53 e  $\Delta 40p53$  atenuaram a resistência ao tamoxifeno em células MCF-7 resistentes;
- As respostas celulares frente ao *knockdown* e à diferentes tratamentos é dependente da linhagem celular;

## 7 IMPACTO SOCIAL

Considerando a alta prevalência e letalidade do câncer de mama no Brasil, bem como a resistência ao tratamento atualmente disponível, os resultados dessa pesquisa podem, além de contribuir para o entendimento fisiopatológico da doença, promover estratégias terapêuticas para a diminuição da quimiorresistência e consequente letalidade. Ainda, considerando que os recursos para a saúde são limitados e que o elevado custo dos tratamentos quimioterápicos e intervenções de alta complexidade podem afetar o acesso equânime ao SUS, a elaboração de novos enfoques para promover a saúde e tratar o câncer de mama, baseados em estratégias mais eficazes, efetivas, personalizadas e equitativas se fazem necessárias.

## REFERÊNCIAS

ABE, Tsutomu *et al.* “Differentiation Induction” culture of human leukemic myeloid cells stimulates high production of macrophage differentiation inducing factor. **Cytotechnology**, [s. l.], v. 5, n. 2 Supplement, p. 75–93, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00573881>

ACHINGER-KAWECKA, Joanna *et al.* Epigenetic reprogramming at estrogen-receptor binding sites alters 3D chromatin landscape in endocrine-resistant breast cancer. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14098-x>

ADAMS, Clifford A; GUTIÉRREZ, Bettina; GUTIÉRREZ, Bettina. The benefits of human milk oligosaccharides (HMOs) in infant nutrition. **Neonatal Intensive Care**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 17–19, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.17470/NF-018-1021-4>

ADASME, Melissa F *et al.* PLIP 2021 : expanding the scope of the protein – ligand interaction profiler to DNA and RNA. [s. l.], v. 49, n. May, p. 530–534, 2021.

AHERN, Grace J. *et al.* Advances in Infant Formula Science. **Annual Review of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 10, p. 75–102, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-081318-104308>

ALLISON, Kimberly H. Molecular pathology of breast cancer: What a pathologist needs to know. **American Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 138, n. 6, p. 770–780, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1309/AJCPIV9IQ1MRQMOO>

AMAEFULE, Chiamaka Esther *et al.* Effectiveness and acceptability of metformin in preventing the onset of type 2 diabetes after gestational diabetes in postnatal women: A protocol for a randomised, placebo-controlled, double-blind feasibility trial Optimising health outcomes with Metformin. **BMJ Open**, [s. l.], v. 10, n. 5, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-036198>

ANBARASAN, Thineskrishna; BOURDON, Jean Christophe. The emerging landscape of p53 isoforms in physiology, cancer and degenerative diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 24, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20246257>

ANDERSON, Steven M. *et al.* Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: It’s not just about milk protein synthesis! **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–14, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/bcr1653>

AREND, William P. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 13, n. 4–5, p. 323–340, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(02\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00020-5)

ARNAL, Jean Francois *et al.* Membrane and nuclear estrogen receptor alpha actions: From tissue specificity to medical implications. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 1045–1087, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2016>

AVERY-KIEJDA, Kelly A. *et al.* Small molecular weight variants of p53 are expressed in human melanoma cells and are induced by the DNA-damaging agent cisplatin. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 1659–1668, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1422>

AVERY-KIEJDA, Kelly A. *et al.* The relative mRNA expression of p53 isoforms in breast cancer is associated with clinical features and outcome. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 586–596, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt411>

BARABUTIS, Nektarios; SCHALLY, Andrew V.; SIEJKA, Agnieszka. P53, GHRH,

inflammation and cancer. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 37, p. 557–562, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.10.034>

BARONE, Ines; BRUSCO, Lauren; FUQUA, Suzanne A.W. Estrogen receptor mutations and changes in downstream gene expression and signaling. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 2702–2708, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1753>

BECK, Kristen L. *et al.* Comparative proteomics of human and macaque milk reveals species-specific nutrition during postnatal development. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 2143–2157, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/pr501243m>

BENDL, Jaroslav *et al.* PredictSNP: Robust and Accurate Consensus Classifier for Prediction of Disease-Related Mutations. **PLoS Computational Biology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–11, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003440>

BERGER, Crystal E. *et al.* p53, a target of estrogen receptor (ER)  $\alpha$ , modulates DNA damage-induced growth suppression in ER-positive breast cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 287, n. 36, p. 30117–30127, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.367326>

BERGER, C.; QIAN, Y.; CHEN, X. The p53-Estrogen Receptor Loop in Cancer. **Current Molecular Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1229–1240, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/15665240113139990065>

BERMAN, Helen M *et al.* The Protein Data Bank. [s. l.], v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.

BIAŁKOWSKA, Kamila *et al.* Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 17, p. 1–17, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21176225>

BISCHOF, Katharina *et al.* Influence of p53 Isoform Expression on Survival in High-Grade Serous Ovarian Cancers. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41706-z>

BONCLER, Magdalena; WU, Yi; WATALA, Cezary. Protein — Physiological and Pathophysiological. [s. l.], p. 1–18, 2019.

BORRADAILE, Nica M *et al.* Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. **Journal Lipid Research**, [s. l.], v. 47, n. 12, p. 2726–2737, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1194/jlr.M600299-JLR200>

BOURNE, Roger. ImageJ. **Fundamentals of Digital Imaging in Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 185–188, 2010. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-84882-087-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-84882-087-6_9)

BOUTELLE, Anthony M.; ATTARDI, Laura D. p53 and Tumor Suppression: It Takes a Network. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 298–310, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.12.011>

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

BRENMOEHL, Julia *et al.* Cytokines in milk and the role of TGF-beta. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 47–56, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.01.006>

BRIANA, Despina D. *et al.* Perinatal plasma monocyte chemotactic protein-1 concentrations in intrauterine growth restriction. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2007, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2007/65032>

BROWN, Judith E. Nutrition Through the Life Cycle. [s. l.], n. 519, p. 1–22, 2021.

BUCK, Mieke *et al.* Structure and Expression of Different Serum Amyloid A (SAA) Variants and their Concentration-Dependent Functions During Host Insults. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 23, n. 17, p. 1725–1755, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/0929867323666160418114600>

BYROM, Anna. Breastfeeding management for the clinician: Using the evidence (2nd edn). **Maternal & Child Nutrition**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 419–420, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1740-8709.2010.00285.x>

C., Neri; A.G., Edlow. Effects of maternal obesity on fetal programming: Molecular approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 1–21, 2016. Disponível em: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L608058111%0Ahttp://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a026591>

CADÉE, Jenny A. *et al.* Bovine Casein Hydrolysate (C12 Peptide) Reduces Blood Pressure in Prehypertensive Subjects. **American Journal of Hypertension**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–5, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2006.06.005>

CARDOSO, Fatima *et al.* International guidelines for management of metastatic breast cancer: Combination vs sequential single-agent chemotherapy. **Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 101, n. 17, p. 1174–1181, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jnci/djp235>

CHANG, J. *et al.* Transactivation ability of p53 transcriptional activation domain is directly related to the binding affinity to TATA-binding protein. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 270, n. 42, p. 25014–25019, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.270.42.25014>

CHAVEZ-VALDEZ, Raul *et al.* Endoplasmic Reticulum pathology and stress response in neurons precede programmed necrosis after neonatal hypoxiaischemia. [s. l.], p. 58–70, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.11.007>

CHEN, Eugene C. *et al.* Targeted disruption of organic cation transporter 3 attenuates the pharmacologic response to metformin. **Molecular Pharmacology**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 75–83, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/mol.114.096776>

CHEN, Jiahao *et al.* Estrogen and BRCA1 deficiency synergistically induce breast cancer mutation-related DNA damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 613, p. 140–145, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.04.142>

CINTI, Saverio. Pink Adipocytes. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 651–666, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.05.007>

CLUSAN, Léa *et al.* A closer look at estrogen receptor mutations in breast cancer and their implications for estrogen and antiestrogen responses. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 1–16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22020756>

COLDITZ, Graham A. *et al.* Family history and risk of breast cancer: Nurses' health study. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 133, n. 3, p. 1097–1104, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10549-012-1985-9>

COLLINS, Laura G. *et al.* The influence of family history on breast cancer risk in women with biopsy-confirmed benign breast disease: Results from the nurses' health study. **Cancer**, [s. l.], v. 107, n. 6, p. 1240–1247, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/encr.22136>

CONSORTIUM, The Uniprot. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023 - Google Scholar. [s. l.], v. 51, n. November 2022, p. 523–531, 2023. Disponível em:

[https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as\\_sdt=0%2C5&q=UniProt%3A+the+Universal+Protein+Knowledgebase+in+2023&btnG=](https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=UniProt%3A+the+Universal+Protein+Knowledgebase+in+2023&btnG=)

CONTARINI, Giovanna; POVOLO, Milena. Phospholipids in milk fat: Composition, biological and technological significance, and analytical strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 2808–2831, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms14022808>

COUDERT, Elisabeth *et al.* Annotation of biologically relevant ligands in UniProtKB using ChEBI. [s. l.], v. 39, n. December 2022, 2023.

CUADRADO, Ana; NEBREDÁ, Angel R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 429, n. 3, p. 403–417, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BJ20100323>

CUENDA, Ana; ROUSSEAU, Simon. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1773, n. 8, p. 1358–1375, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.03.010>

DAHL, Erika S.; AIRD, Katherine M. Ataxia-telangiectasia mutated modulation of carbon metabolism in cancer. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 7, n. NOV, p. 0–1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00291>

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME : a free web tool to evaluate pharmacokinetics , drug- likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Nature Publishing Group**, [s. l.], n. October 2016, p. 1–13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep42717>

DALY, Anne *et al.* The impact of the use of glycomacropptide on satiety and dietary intake in phenylketonuria. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12092704>

DANIEL C KOBOLDT, ROBERT S FULTON, MICHAEL D MCLELLAN, HEATHER SCHMIDT, JOELLE KALICKI-VEIZER, JOSHUA F MCMICHAEL, LUCINDA L FULTON, DAVID J DOOLING, LI DING, ELAINE R MARDIS, RICHARD K WILSON, ADRIAN ALLY, MIRUNA BALASUNDARAM, YARON S N BUTTERFIELD, REBE, Jacqueline D Palchik. Comprehensive molecular portraits of human breast tumors The Cancer Genome Atlas Network. **Nature**, [s. l.], v. 490, n. 7418, p. 61–70, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature11412.Comprehensive>

DAWOD, Bassel; MARSHALL, Jean S. Cytokines and soluble receptors in breast milk as enhancers of oral tolerance development. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, n. JAN, p. 1–9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00016>

DE BUCK, Mieke *et al.* Serum amyloid A1 $\alpha$  induces paracrine IL-8/CXCL8 via TLR2 and directly synergizes with this chemokine via CXCR2 and formyl peptide receptor 2 to recruit neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 98, n. 6, p. 1049–1060, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1189/jlb.3a0315-085r>

DE OLIVEIRA, Edson M. *et al.* Serum amyloid A links endotoxaemia to weight gain and insulin resistance in mice. **Diabetologia**, [s. l.], v. 59, n. 8, p. 1760–1768, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3970-z>

DE OLIVEIRA, Edson M. *et al.* Serum amyloid a production is triggered by sleep deprivation in mice and humans: Is that the link between sleep loss and associated comorbidities? **Nutrients**, [s. l.], v. 9, n. 3, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu9030311>

DEGNIM, Amy C *et al.* Benign Breast Disease and the Risk of Breast Cancer. [s. l.], p. 229–237, 2005.

DEUGARTE, Catherine Marin *et al.* Prevalence of insulin resistance in the polycystic ovary syndrome using the homeostasis model assessment. [*s. l.*], v. 83, n. 5, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.070>

DOMMEL, Sebastian; BLÜHER, Matthias. Does C-C Motif Chemokine Ligand 2 (CCL2) Link Obesity to a Pro-Inflammatory State? **International Journal of Molecular Sciences**, [*s. l.*], v. 22, n. 3, p. 1500, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22031500>

DOS SANTOS, Nataly Melo *et al.* Loss of the p53 transactivation domain results in high amyloid aggregation of the  $\delta 40p53$  isoform in endometrial carcinoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, [*s. l.*], v. 294, n. 24, p. 9430–9439, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007566>

EHRMANN, David A *et al.* Prevalence and Predictors of the Metabolic Syndrome in Women with Polycystic Ovary Syndrome. [*s. l.*], v. 91, n. 1, p. 48–53, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1329>

EMILY M BRADFORD\*,#, STACY H RYU\*,†, Ajay Pal Singh\* *et al.* Epithelial TNF receptor signaling promotes mucosal repair in IBD. **Physiology & behavior**, [*s. l.*], v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601066>. Epithelial

EUSTAQUIO, Trisha *et al.* Electron microscopy techniques employed to explore mitochondrial defects in the developing rat brain following ketamine treatment. **Experimental Cell Research**, [*s. l.*], v. 373, n. 1–2, p. 164–170, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.10.009>

FANG, Weishan *et al.* Identification and activation of TLR4-mediated signalling pathways by alginate-derived guluronate oligosaccharide in RAW264.7 macrophages. **Scientific Reports**, [*s. l.*], v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01868-0>

FARIDI, Jesika *et al.* Expression of constitutively active Akt-3 in MCF-7 breast cancer cells reverses the estrogen and tamoxifen responsiveness of these cells in vivo. **Clinical Cancer Research**, [*s. l.*], v. 9, n. 8, p. 2933–2939, 2003.

FENG, Jin *et al.* Mitochondria as an important target of metformin : The mechanism of action , toxic and side effects , and new therapeutic applications. [*s. l.*], v. 177, n. December 2021, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106114>

FENG, Yixiao *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes and Diseases**, [*s. l.*], v. 5, n. 2, p. 77–106, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2018.05.001>

FERNANDEZ-CUESTA, Lynnette *et al.* P53 status influences response to tamoxifen but not to fulvestrant in breast cancer cell lines. **International Journal of Cancer**, [*s. l.*], v. 128, n. 8, p. 1813–1821, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.25512>

FERNÁNDEZ-CUESTA, Lynnette *et al.* Estrogen levels act as a rheostat on p53 levels and modulate p53-dependent responses in breast cancer cell lines. **Breast Cancer Research and Treatment**, [*s. l.*], v. 125, n. 1, p. 35–42, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0819-x>

FILIPPIN-MONTEIRO, F B *et al.* Serum amyloid A is a growth factor for 3T3-L1 adipocytes , inhibits differentiation and promotes insulin resistance. [*s. l.*], v. 36, n. 8, p. 1032–1039, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.193>

FOONG, Siew Cheng *et al.* Oral galactagogues (natural therapies or drugs) for increasing breast milk production in mothers of non-hospitalised term infants. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [*s. l.*], v. 2020, n. 5, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1002/14651858.CD011505.pub2>

FRIEDMAN, Paula N *et al.* The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA (tumor suppressor/chemical crosslinking/gel filtration/sucrose gradients/DNA-binding protein). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, [s. l.], v. 90, n. April, p. 3319–3323, 1993.

FU, Nai Yang *et al.* Stem cells and the differentiation hierarchy in mammary gland development. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 100, n. 2, p. 489–523, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2018>

FUJIMORI, Mahmi *et al.* Changes in the biochemical and immunological components of serum and colostrum of overweight and obese mothers. **BMC Pregnancy and Childbirth**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–8, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12884-015-0574-4>

FUJITA, Kaori *et al.* 2009 **【Nat. Cell Bio.】** p53 isoforms,  $\Delta 133p53$  and p53 $\beta$ , are endogenous regulators of replicative cellular senescence.pdf. [s. l.], v. 11, n. 9, p. 1135–1142, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncb1928.p53>

FUKUDA, Tomomi *et al.* CACUL1/CAC1 attenuates p53 activity through PML post-translational modification. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 482, n. 4, p. 863–869, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.125>

GILA-DIAZ, Andrea *et al.* A review of bioactive factors in human breastmilk: A focus on prematurity. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1–23, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11061307>

GIORDANO, Antonio *et al.* White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. [s. l.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/EJE-13-0945>

GIORDANO, Antonio; FRONTINI, Andrea; CINTI, Saverio. Convertible visceral fat as a therapeutic target to curb obesity. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 405–424, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.31>

GIRALT, Marta; VILLARROYA, Francesc. White, brown, beige/brite: Different adipose cells for different functions? **Endocrinology**, [s. l.], v. 154, n. 9, p. 2992–3000, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2013-1403>

GONZALEZ, Kelly D. *et al.* Beyond Li Fraumeni syndrome: Clinical characteristics of families with p53 germline mutations. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 1250–1256, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.6959>

GOUWY, Mieke *et al.* Serum amyloid A chemoattracts immature dendritic cells and indirectly provokes monocyte chemotaxis by induction of cooperating CC and CXC chemokines. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 101–112, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/eji.201444818>

GREER, Genevieve. **Overcoming Therapy Resistance in Breast Cancer by Modulating the P53 pathway**. 88 f. 2022. - University of Newcastle, [s. l.], 2022.

GRZESKOWIAK, Luke E.; WLODEK, Mary E.; GEDDES, Donna T. What evidence do we have for pharmaceutical galactagogues in the treatment of lactation insufficiency?—a narrative review. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1–21, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu11050974>

HAASE, Barbara *et al.* Domperidone for Treatment of Low Milk Supply in Breast Pump-Dependent Mothers of Hospitalized Premature Infants: A Clinical Protocol. **Journal of Human Lactation**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 373–381, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0890334416630539>

HAFSI, Hind *et al.* Effects of  $\Delta 40p53$ , an isoform of p53 lacking the N-terminus, on transactivation capacity of the tumor suppressor protein p53. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 13, 2013.

Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-134>

HAGIHARA, Keisuke *et al.* Essential role of STAT3 in cytokine-driven NF- $\kappa$ B-mediated serum amyloid A gene expression. **Genes to Cells**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 1051–1063, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00900.x>

HANWELL, Marcus D *et al.* Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. [s. l.], p. 1–17, 2012.

HARRISON, C. L. *et al.* Breastfeeding and obesity in PCOS. **Expert Review of Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 449–454, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17446651.2016.1239523>

HASCHKE, Ferdinand; HAIDEN, Nadja; THAKKAR, Sagar K. Nutritive and bioactive proteins in breastmilk. **Annals of Nutrition and Metabolism**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 17–26, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000452820>

HASHIRA, Shintaro; OKITSU-NEGISHI, Shoko; YOSHINO, Kazuya. Interleukin 8 in the human colostrum. **Biology of the Neonate**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 34–38, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000064150>

HAUFF, Laura E.; LEONARD, Stephanie A.; RASMUSSEN, Kathleen M. Associations of maternal obesity and psychosocial factors with breastfeeding intention, initiation, and duration. **American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 99, n. 3, p. 524–534, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071191>

HAWKES, Joanna S.; BRYAN, Dani Louise; GIBSON, Robert A. Cytokine production by human milk cells and peripheral blood mononuclear cells from the same mothers. **Journal of Clinical Immunology**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 338–344, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1020652215048>

HAYMAN, Liam *et al.* Expert Review of Molecular Diagnostics What is the potential of p53 isoforms as a predictive biomarker in the treatment of cancer? What is the potential of p53 isoforms as a predictive biomarker in the treatment of. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 149–159, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1563484>

HERS, Ingeborg; VINCENT, Emma E.; TAVARÉ, Jeremy M. Akt signalling in health and disease. **Cellular Signalling**, [s. l.], v. 23, n. 10, p. 1515–1527, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.004>

HILTON, Douglas J.; GOUGH, Nicholas M. Leukemia inhibitory factor: A biological perspective. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 21–26, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.240460105>

HOE, Khoo Kian; VERMA, Chandra S.; LANE, David P. Drugging the p53 pathway: Understanding the route to clinical efficacy. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 217–236, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd4236>

HOFSTETTER, Gerda *et al.* The N-terminally truncated p53 isoform  $\Delta 40p53$  influences prognosis in mucinous ovarian cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 372–379, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e31823ca031>

HOGVEEN, Marije *et al.* Umbilical choline and related methylamines betaine and dimethylglycine in relation to birth weight. **Pediatric Research**, [s. l.], v. 73, n. 6, p. 783–787, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/pr.2013.54>

HOSKINS, Janelle M.; CAREY, Lisa A.; MCLEOD, Howard L. CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 576–586, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc2683>

HOVEY, Russell C.; AIMO, Lucila. Diverse and active roles for adipocytes during

mammary gland growth and function. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 279–290, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9187-8>

HUMPHREY, William; DALKE, Andrew; SCHULTEN, Klaus. VMD: Visual Molecular Dynamics. [s. l.], v. 7855, n. October 1995, p. 33–38, 1996.

HURD, C. *et al.* Hormonal regulation of the p53 tumor suppressor protein in T47D human breast carcinoma cell line. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 270, n. 48, p. 28507–28510, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28507>

IARC. **Breast Cancer Awareness Month 2021**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/featured-news/breast-cancer-awareness-month-2021/#:~:text=IARC estimates that by 2040,1 million deaths per year.>

INCA. DADOS E NÚMEROS SOBRE CÂNCER DE MAMA - Relatório anual 2022. [s. l.], p. 0–33, 2022.

ISODA, Kikuo *et al.* Metformin Inhibits Proinflammatory Responses and Nuclear Factor- $\kappa$ B in Human Vascular Wall Cells. [s. l.], p. 611–617, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000201938.78044.75>

JANUŠKEVIČIENĖ, Indrė; PETRIKAITĖ, Vilma. Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. **Life Sciences**, [s. l.], v. 239, n. July, p. 117009, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117009>

JAVED, Asma; LTEIF, Aida. Development of the human breast. **Seminars in Plastic Surgery**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 5–12, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0033-1343989>

JEVITT, Cecilia; HERNANDEZ, Ivonne; GROËR, Maureen. Lactation Complicated by Overweight and Obesity: Supporting the Mother and Newborn. [s. l.], 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmwh.2007.04.006>

JIA, Lesley *et al.* Functional Roles of JNK and p38 MAPK Signaling in Nasopharyngeal Carcinoma. [s. l.], 2022.

JIN, Xuyan *et al.* Cellular and Subcellular Localization of Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78 Following Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 43, n. 7, p. 1348–1362, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2550-7>

JOERGER, Andreas C.; FERSHT, Alan R. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 1–20, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000919>

JORUIZ, Sebastien M; BOURDON, Jean-christophe. Cell Fate Decision. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 6, p. 1–20, 2015.

JOSHI, Himanshu; PRESS, Michael F. **Molecular oncology of breast cancer**. Fifth Edited. [S. l.]: Elsevier Inc., 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35955-9.00022-2>

KALKHORAN, SARA; BENOWITZ, NEAL L.; RIGOTTI, Nancy A. Associations of Maternal Weight Status Before, During, and After Pregnancy with Inflammatory Markers in Breast Milk. **Revista del colegio americano de Cardiologia**, [s. l.], v. 72, n. 23, p. 2964–2979, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/oby.22025>.Associations

KAMIŃSKA, Marzena *et al.* Breast cancer risk factors. **Przegląd Menopauzalny**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 196–202, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5114/pm.2015.54346>

KASS, Laura *et al.* Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 39, n. 11, p. 1987–1994, 2007. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.025>

KASTENHUBER, Edward R.; LOWE, Scott W. Putting p53 in Context. **Cell**, [s. l.], v. 170, n. 6, p. 1062–1078, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.028>

KENT, Jacqueline C.; PRIME, Danielle K.; GARBIN, Catherine P. Principles for Maintaining or Increasing Breast Milk Production. **JOGNN - Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 114–121, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1552-6909.2011.01313.x>

KERDIVEL, Gwenneg; FLOURIOT, Gilles; PAKDEL, Farzad. **Modulation of Estrogen Receptor Alpha Activity and Expression During Breast Cancer Progression**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2013. ISSN 00836729.v. 93 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416673-8.00004-6>

KHAN, Sabiha *et al.* Stem cell therapy: A paradigm shift in breast cancer treatment. **World Journal of Stem Cells**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 841–860, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i7.841>

KHANPPNAVAR, Basavraj *et al.* Structural basis of organic cation transporter-3 inhibition. [s. l.], n. May, p. 1–13, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34284-8>

KIELBASA, Anna; GADZALA-KOPCIUCH, Renata; BUSZEWSKI, Boguslaw. Cytokines-biogenesis and their role in human breast milk and determination. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22126238>

KLEIN, William L. Jorgensen; Jayaraman Chandrasekhar; Jeffry D. Madura; Roger W. Impey; Michael L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. [s. l.], n. December 1982, 1983. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1063/1.445869>

KNEE OLATEJUMOYE, GUPTA AASHISH, CURLEY ANNA, CHARNOCK-JONES STEPHEN, Smith Gordon C S. The acute-phase protein SAA3 is present in the preterm human colostrum and breast milk. **Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition**, [s. l.], v. 100, n. 4, p. F369, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/archdischild-2015-308164>

KÖHLER, Cristiano André. A consolidação da memória da tarefa de esquivia inibitória requer a atividade da p38MAPK na amígdala basolateral. [s. l.], 2012.

KOLETZKO, Berthold. Human milk lipids. **Annals of Nutrition and Metabolism**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 28–40, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000452819>

KOREN, Shany; BENTIREN-ALJ, Mohamed. Breast Tumor Heterogeneity: Source of Fitness, Hurdle for Therapy. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 60, n. 4, p. 537–546, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.10.031>

KOSTA, Artemis *et al.* Biochimica et Biophysica Acta Marked mitochondrial alterations upon starvation without cell death , caspases or Bcl-2 family members. [s. l.], v. 1783, n. 2008, p. 2013–2019, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.06.014>

KROGH, Anders; SONNHAMMER, Erik L L; KA, Lukas. A Combined Transmembrane Topology and Signal Peptide Prediction Method. [s. l.], p. 1027–1036, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.016>

KUES, W. A. *et al.* Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: Effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 412–419, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.2.412>

LAMOIA, Traci E.; SHULMAN, Gerald I. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 77–96, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa023>

LANGENDORF, Christopher G. *et al.* Structural basis of allosteric and synergistic activation of AMPK by furan-2-phosphonic derivative C2 binding. **Nature Communications**, [s. l.], v. 7, p. 1–8, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms10912>

LANGERØD, Anita *et al.* TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 1–16, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/bcr1675>

LARSON, Marilynn A. *et al.* Induction of human mammary-associated serum amyloid A3 expression by prolactin or lipopolysaccharide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 301, n. 4, p. 1030–1037, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00045-7)

LASKOWSKI, Roman A; THORNTON, Janet M. PDBsum : Structural summaries of PDB entries. [s. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.3289>

LAYMAN, Donald K.; LÖNNERDAL, Bo; FERNSTROM, John D. Applications for a-lactalbumin in human nutrition. **Nutrition Reviews**, [s. l.], v. 76, n. 6, p. 444–460, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy004>

LEMKUL, Justin A. From Proteins to Perturbed Hamiltonians : A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [ Article v1 . 0 ]. [s. l.], v. 1, n. August 2018, p. 1–53, 2019.

LEMKUL, Justin A; ALLEN, William J; BEVAN, David R. Practical Considerations for Building GROMOS-Compatible Small-Molecule Topologies. [s. l.], p. 2221–2235, 2010.

LI, Qun *et al.* Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. **The New England journal of medicine**, [s. l.], v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>

LI, Yi *et al.* Expert consensus on the clinical application of recombinant adenovirus human p53 for head and neck cancers. **International Journal of Oral Science**, [s. l.], v. 13, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41368-021-00145-1>

LIANG, Xiaomin; GIACOMINI, Kathleen M. Transporters Involved in Metformin Pharmacokinetics and Treatment Response. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 106, n. 9, p. 2245–2250, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.04.078>

LION, Mattia *et al.* Interaction between p53 and estradiol pathways in transcriptional responses to chemotherapeutics. **Cell Cycle**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 1211–1224, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/cc.24309>

LIU, Guozhen; SCHWARTZ, Janice A.; BROOKS, Sam C. Estrogen receptor protects p53 from deactivation by human double minute- 2. **Cancer Research**, [s. l.], v. 60, n. 7, p. 1810–1814, 2000.

LÖNNERDAL, Bo. Bioactive Proteins in Human Milk: Health, Nutrition, and Implications for Infant Formulas. **Journal of Pediatrics**, [s. l.], v. 173, p. S4–S9, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.02.070>

LØNNING, Per P. *et al.* Breast cancer prognostication and prediction in the postgenomic era. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1293–1306, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdm013>

LONSDALE, John *et al.* The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 580–585, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ng.2653>

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)

LV, Li Juan *et al.* Early-onset preeclampsia is associated with gut microbial alterations

in antepartum and postpartum women. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. JUN, p. 1–15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00224>

LYONS, Katriona E. *et al.* Breast milk, a source of beneficial microbes and associated benefits for infant health. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1–30, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12041039>

MAAS, Christoph *et al.* Choline and polyunsaturated fatty acids in preterm infants' maternal milk. **European Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 1733–1742, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1220-2>

MAHESHWARI, Akhil *et al.* Effects of interleukin-8 on the developing human intestine. **Cytokine**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 256–267, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/cyto.2002.1996>

MANAVATHI, Bramanandam *et al.* Derailed estrogen signaling and breast cancer: An authentic couple. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 1–32, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/er.2011-1057>

MANDAL, R; BECKER, S; STREBHARDT, K. Stamping out RAF and MEK1 / 2 to inhibit the ERK1 / 2 pathway : an emerging threat to anticancer therapy. [s. l.], n. July, p. 1–15, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2015.329>

MARASCO LA, West D. **Making More Milk: the breastfeeding guide to increasing your milk production**. [S. l.: s. n.], 2020.

MARCEL, V. *et al.* Biological functions of p53 isoforms through evolution: Lessons from animal and cellular models. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 18, n. 12, p. 1815–1824, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.120>

MARDASHEV, S. R.; NIKOLAEV YA., A.; SOKOLOV, N. N. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. **Biokhimiya**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 984–989, 2009.

MAREI, Hany E. *et al.* P53 Signaling in Cancer Progression and Therapy. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1–15, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02396-8>

MARMOR, Mina D.; SKARIA, Kochupurakkal Bose; YARDEN, Yosef. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 903–913, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.06.002>

MARTINS, Carla P.; BROWN-SWIGART, Lamorna; EVAN, Gerard I. Modeling the Therapeutic Efficacy of p53 Restoration in Tumors. **Cell**, [s. l.], v. 127, n. 7, p. 1323–1334, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.007>

MEHTA, Sunali *et al.* A study of TP53 RNA splicing illustrates pitfalls of RNA-seq methodology. **Cancer Research**, [s. l.], v. 76, n. 24, p. 7151–7159, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1624>

MEKI, Abdel Raheim M.A. *et al.* Interleukins -6, -8 and -10 and tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptor I in human milk at different periods of lactation. **Nutrition Research**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 845–855, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(03\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(03)00035-6)

MITTELSTADT, Paul R. *et al.* Activating p38 MAPK: New tricks for an old kinase. **Cell Cycle**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 1189–1192, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/cc.4.9.2043>

MOHAMMAD, Ramzi M. *et al.* An MDM2 antagonist (MI-319) restores p53 functions and increases the life span of orally treated follicular lymphoma bearing animals. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 8, p. 1–14, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1476->

4598-8-115

MOROZOV, Vasily *et al.* Human Milk Oligosaccharides as Promising Antivirals. **Molecular Nutrition and Food Research**, [s. l.], v. 62, n. 6, p. 1–14, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700679>

MORRONI, Manrico *et al.* Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 101, n. 48, p. 16801–16806, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0407647101>

MORTEN, Brianna C. *et al.* The presence of the intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 (rs17878362) in breast cancer is associated with a low  $\Delta 40p53:p53$  ratio and better outcome. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 81–86, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv164>

MORTEN, Brianna C. **The regulation, function and expression of  $\Delta 40p53$  in breast cancer**. 180 f. 2016. - University of Newcastle, [s. l.], 2016.

MS, Kramer; KAKUMA, R. Optimal duration of exclusive breastfeeding ( Review ). [s. l.], n. 4, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003517.pub2.www.cochranelibrary.com>

NATH, Narender *et al.* Metformin Attenuated the Autoimmune Disease of the Central Nervous System in Animal Models of Multiple Sclerosis. [s. l.], v. 182, n. 12, p. 8005–8014, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803563>. Metformin

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Summary for CID 4091, Metformin**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4091>

NEVILLE, Margaret C.; MORTON, Jane; UMEMURA, Shinobu. Lactogenesis: The transition from pregnancy to lactation. **Pediatric Clinics of North America**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 35–52, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(05\)70284-4](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(05)70284-4)

NILSSON, Åke. Role of Sphingolipids in Infant Gut Health and Immunity. **Journal of Pediatrics**, [s. l.], v. 173, p. S53–S59, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.02.076>

NOLAN, Lila S.; PARKS, Olivia B.; GOOD, Misty. A review of the immunomodulating components of maternal breast milk and protection against necrotizing enterocolitis. **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12010014>

NOMMSEN-RIVERS, Laurie *et al.* Feasibility and Acceptability of Metformin to Augment Low Milk Supply: A Pilot Randomized Controlled Trial. **Journal of Human Lactation**, [s. l.], v. 35, n. 2, p. 261–271, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0890334418819465>

NOVAK, Elizabeth M.; DYER, Roger A.; INNIS, Sheila M. High dietary  $\omega$ -6 fatty acids contribute to reduced docosahexaenoic acid in the developing brain and inhibit secondary neurite growth. **Brain Research**, [s. l.], v. 1237, p. 136–145, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.07.107>

OBRADOVIC, Milan *et al.* Leptin and Obesity: Role and Clinical Implication. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 12, n. May, p. 1–14, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.585887>

OLIVIER, Magali; HOLLSTEIN, Monica; HAINAUT, Pierre. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1–17, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001008>

OTA, Akinobu *et al.* **Δ40P53A Suppresses Tumor Cell Proliferation and Induces Cellular Senescence in Hepatocellular Carcinoma Cells.** [*S. l.: s. n.*], 2017. ISSN 14779137.v. 130 Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jcs.190736>

OWENS, Thomas W.; NAYLOR, Matthew J. Breast cancer stem cells. **Frontiers in Physiology**, [*s. l.*], v. 4 AUG, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00225>

OZSOY, Arzu *et al.* The Relationship Between Breast Cancer and Risk Factors: A Single-Center Study. **European Journal of Breast Health**, [*s. l.*], v. 13, n. 3, p. 145–149, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5152/tjbh.2017.3180>

PAINE, Ingrid S.; LEWIS, Michael T. The Terminal End Bud: the Little Engine that Could. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [*s. l.*], v. 22, n. 2, p. 93–108, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10911-017-9372-0>

PANG, Wei Wei; HARTMANN, Peter E. Initiation of human lactation: Secretory differentiation and secretory activation. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [*s. l.*], v. 12, n. 4, p. 211–221, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10911-007-9054-4>

PAPATHEODOROU, Irene *et al.* Expression Atlas: Gene and protein expression across multiple studies and organisms. **Nucleic Acids Research**, [*s. l.*], v. 46, n. D1, p. D246–D251, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1158>

PASHAYAN, Nora *et al.* Personalized early detection and prevention of breast cancer: ENVISION consensus statement. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [*s. l.*], v. 17, n. 11, p. 687–705, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0388-9>

PATSALOS, Olivia; DALTON, Bethan; HIMMERICH, Hubertus. Effects of IL-6 signaling pathway inhibition on weight and BMI: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, [*s. l.*], v. 21, n. 17, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21176290>

PAVLETICH, N. P.; CHAMBERS, K. A.; PABO, C. O. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. **Genes and Development**, [*s. l.*], v. 7, n. 12 B, p. 2556–2564, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gad.7.12b.2556>

PEHAR, Mariana *et al.* Altered longevity-assurance activity of p53:p44 in the mouse causes memory loss, neurodegeneration and premature death. **Ageing Cell**, [*s. l.*], v. 9, n. 2, p. 174–190, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00547.x>

PENNICA, D. *et al.* Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. **Journal of Biological Chemistry**, [*s. l.*], v. 270, n. 18, p. 10915–10922, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.270.18.10915>

PILLAY, JACKLIN; DAVIS, Tammy. Physiology, Lactation. *In: [S. l.: s. n.]*, 2022.

PIXU LIU, HAILING CHENG, THOMAS M. ROBERTS, and Jean J. Zhao. targeting the phosphoinositide 3-kinase (Pi. **Cancer**, [*s. l.*], v. 8, n. 8, p. 627–644, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd2926>. Targeting

POLYAK, Kornelia. Breast cancer: Origins and evolution. **Journal of Clinical Investigation**, [*s. l.*], v. 117, n. 11, p. 3155–3163, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI33295>

QUITADAMO, Pasqua Anna; COMEGNA, Laura; CRISTALLI, Pierpaolo. Anti-Infective, Anti-Inflammatory, and Immunomodulatory Properties of Breast Milk Factors for the Protection of Infants in the Pandemic From COVID-19. **Frontiers in Public Health**, [*s. l.*], v. 8, n. March, p. 1–29, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.589736>

R. A. LASKOWSKI, M. W. MACARTHUR, D. S. Moss and J. M. Thornton. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. [*s. l.*], n. C,

1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>

RACHEL S CHAPMAN, PAULA LOURENCO, ELIZABETH TONNER, DAVID FLINT, STEFAN SELBERT, KYOSHI TAKEDA, SHIZUO AKIRA, Alan R Clarke & Christine J Watson. **The Role of Stat3 in Apoptosis and Mammary Gland Involution**. [*s. l.*: *s. n.*], 2006. v. 1999

REGAN, J. L. *et al.* C-Kit is required for growth and survival of the cells of origin of Brcal-mutation-associated breast cancer. **Oncogene**, [*s. l.*], v. 31, n. 7, p. 869–883, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2011.289>

REINHARDT, Luiza Steffens *et al.* Good cop, bad cop: Defining the roles of  $\Delta 40p53$  in cancer and aging. **Cancers**, [*s. l.*], v. 12, n. 6, p. 1–22, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers12061659>

RIDDLE, Sarah W.; NOMMSEN-RIVERS, Laurie A. A Case Control Study of Diabetes during Pregnancy and Low Milk Supply. **Breastfeeding Medicine**, [*s. l.*], v. 11, n. 2, p. 80–85, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/bfm.2015.0120>

RIGGINS, Rebecca B. *et al.* Pathways to tamoxifen resistance. **Cancer Letters**, [*s. l.*], v. 256, n. 1, p. 1–24, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.03.016>

RIGGIO, Alessandra I.; VARLEY, Katherine E.; WELM, Alana L. The lingering mysteries of metastatic recurrence in breast cancer. **British Journal of Cancer**, [*s. l.*], v. 124, n. 1, p. 13–26, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01161-4>

ROSEN, J. M. On hormone action in the mammary gland. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [*s. l.*], v. 4, n. 2, p. 1–15, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013086>

RUSIDZÉ, Mariam *et al.* Estrogen receptor- $\alpha$  signaling in post-natal mammary development and breast cancers. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [*s. l.*], v. 78, n. 15, p. 5681–5705, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03860-4>

SACK, George H. *et al.* Serum amyloid A1 (SAA1) protein in human colostrum. **FEBS Open Bio**, [*s. l.*], v. 8, n. 3, p. 435–441, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12383>

SACK JR, George H. Serum amyloid A – a review. **Molecular Medicine**, [*s. l.*], v. 24, n. 46, p. 1–27, 2018.

SALOMON-FERRER, Romelia; CASE, David A; WALKER, Ross C. An overview of the Amber biomolecular simulation package. [*s. l.*], v. 3, n. April, p. 198–210, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/wcms.1121>

SAMUKAWA, Makoto *et al.* Risks of inappropriate secretion of antidiuretic hormone in multiple system atrophy. **Movement Disorders**, [*s. l.*], v. 26, n. 14, p. 2572–2573, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mds.23904>

SANDRI, Silvana *et al.* Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? **Journal of Leukocyte Biology**, [*s. l.*], v. 83, n. 5, p. 1174–1180, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1189/jlb.0407203>

SANDRI, Silvana *et al.* Serum amyloid a in the placenta and its role in trophoblast invasion. **PLoS ONE**, [*s. l.*], v. 9, n. 3, p. 1–9, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090881>

SANDSTRÖM, Olof *et al.* Effects of  $\alpha$ -lactalbumin-enriched formula containing different concentrations of glycomacropptide on infant nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, [*s. l.*], v. 87, n. 4, p. 921–928, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.4.921>

SANTOS LUCIANNA, FERREIRA RAFAELA, Caffarena Ernesto. Integrating Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. **Docking Screens for Drug**

**Discovery**, [s. l.], 2019.

SASO, Anja *et al.* Breast milk cytokines and early growth in Gambian infants. **Frontiers in Pediatrics**, [s. l.], v. 6, n. JAN, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00414>

SAÚDE, Ministério da. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: Síndrome de ovários policísticos. [s. l.], p. 1–3, 2019.

SAVINO, Francesco *et al.* Looking for a relation between serum leptin concentration and body composition parameters in healthy term infants in the first 6 months of life. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 348–351, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318159e6bf>

SCHUSTER, Susanne *et al.* Leptin in maternal serum and breast milk: Association with Infants' body weight gain in a longitudinal study over 6 months of lactation. **Pediatric Research**, [s. l.], v. 70, n. 6, p. 633–637, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31823214ea>

SELLERS, W R. Drug discovery approaches targeting the PI3K / Akt pathway in cancer. **Oncogene Nature**, [s. l.], p. 5511–5526, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2008.246>

SHANGARY, Sanjeev *et al.* Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 105, n. 10, p. 3933–3938, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0708917105>

SHI, Liang *et al.* Expression of ER- $\alpha$  36, a novel variant of estrogen receptor  $\alpha$ , and resistance to tamoxifen treatment in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 27, n. 21, p. 3423–3429, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.2254>

SIDOSSIS, Labros; KAJIMURA, Shingo. Brown and beige fat in humans: Thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 125, n. 2, p. 478–486, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI78362>

SMIGIELSKI, Elizabeth M. *et al.* dbSNP: A database of single nucleotide polymorphisms. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 352–355, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.352>

SMILOWITZ, Jennifer T. *et al.* The human milk metabolome reveals diverse oligosaccharide profiles. **Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 143, n. 11, p. 1709–1718, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/jn.113.178772>

SOOYEON LEE, Shannon L. Kelleher. **Biological underpinnings of breastfeeding challenges: the role of genetics, diet, and environment on lactation physiology**. [S. l.: s. n.], 2016.

SOUSA, Alan W; VRANKEN, Wim F. Open Access ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface. [s. l.], p. 1–8, 2012.

SPOEL, David V A N D E R *et al.* GROMACS: Fast, Flexible, and Free. [s. l.], 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>

STENDER, Joshua D. *et al.* Genome-Wide Analysis of Estrogen Receptor  $\alpha$  DNA Binding and Tethering Mechanisms Identifies Runx1 as a Novel Tethering Factor in Receptor-Mediated Transcriptional Activation. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 30, n. 16, p. 3943–3955, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mcb.00118-10>

STERNLICHT, Mark D. *et al.* Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. **Differentiation**, [s. l.], v. 74, n. 7, p. 365–381, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00105.x>

STUDER, Gabriel *et al.* Structural bioinformatics QMEANDisCo — distance constraints applied on model quality estimation. [*s. l.*], v. 36, n. November 2019, p. 1765–1771, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>

STUEBE, Alison M. *et al.* Prevalence and risk factors for early, undesired weaning attributed to lactation dysfunction. **Journal of Women's Health**, [*s. l.*], v. 23, n. 5, p. 404–412, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/jwh.2013.4506>

SUN, Yi Sheng *et al.* Risk factors and preventions of breast cancer. **International Journal of Biological Sciences**, [*s. l.*], v. 13, n. 11, p. 1387–1397, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>

SURDO, Prisca Lo *et al.* SIGNOR 3.0, the SIGnaling network open resource 3.0: 2022 update. **Nucleic Acids Research**, [*s. l.*], v. 51, n. 1, p. D631–D637, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac883>

TAKAHASHI, Rie *et al.* Dominant effects of  $\Delta 40p53$  on p53 function and melanoma cell fate. [*s. l.*], v. 134, n. 3, p. 791–800, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/jid.2013.391.Dominant>

TANIGAWA, Takahiko *et al.* The SCL Gene Product is Regulated by and Differentially Regulates Cytokine Responses During Myeloid Leukemic Cell Differentiation Source : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , Published by : National Academy of. [*s. l.*], 2022.

THARMAPALAN, Pirashaanthy *et al.* Mammary stem cells and progenitors: targeting the roots of breast cancer for prevention. **The EMBO Journal**, [*s. l.*], v. 38, n. 14, p. 1–19, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.15252/embj.2018100852>

THORN, S. R. *et al.* Effect of estrogen on leptin and expression of leptin receptor transcripts in prepubertal dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, [*s. l.*], v. 90, n. 8, p. 3742–3750, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0009>

THORN, Stephanie R. *et al.* Mammary ductal growth is impaired in mice lacking leptin-dependent signal transducer and activator of transcription 3 signaling. **Endocrinology**, [*s. l.*], v. 151, n. 8, p. 3985–3995, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2010-0029>

THUL, Peter J.; LINDSKOG, Cecilia. The human protein atlas: A spatial map of the human proteome. **Protein Science**, [*s. l.*], v. 27, n. 1, p. 233–244, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.3307>

THURL, Stephan *et al.* Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. **British Journal of Nutrition**, [*s. l.*], v. 104, n. 9, p. 1261–1271, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0007114510002072>

TOWER, Helen; RUPPERT, Megan; BRITT, Kara. The Immune Microenvironment of Cancer. **Cancers**, [*s. l.*], v. 11, n. 1375, p. 1–15, 2019.

TROTT, OLEG; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. [*s. l.*], v. 31, n. 2, p. 455–461, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334.AutoDock>

TRUCHET, Sandrine; HONVO-HOUËTO, Edith. Physiology of milk secretion. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, [*s. l.*], v. 31, n. 4, p. 367–384, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.008>

UNDERWOOD, Jean M *et al.* The Ultrastructure of MCF-10A Acini. [*s. l.*], Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.20639>

URIELI-SHOVAL, Simcha *et al.* Widespread expression of serum amyloida A in histologically normal human tissues: Predominant localization to the epithelium. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, [*s. l.*], v. 46, n. 12, p. 1377–1384, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/002215549804601206>

VAN VELDHUIZEN-STAAS, Caroline G.A. Overabundant milk supply: An alternative way to intervene by full drainage and block feeding. **International Breastfeeding Journal**, [s. l.], v. 2, p. 1–5, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1746-4358-2-11>

VANKY, E. *et al.* Breast size increment during pregnancy and breastfeeding in mothers with polycystic ovary syndrome: A follow-up study of a randomised controlled trial on metformin versus placebo. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, [s. l.], v. 119, n. 11, p. 1403–1409, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2012.03449.x>

VIELER, Maximilian; SANYAL, Suparna. P53 isoforms and their implications in cancer. **Cancers**, [s. l.], v. 10, n. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers10090288>

VOGEL, Victor G. Epidemiology, genetics, and risk evaluation of postmenopausal women at risk of breast cancer. **Menopause**, [s. l.], v. 15, n. SUPPL. 4, p. 782–789, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e3181788d88>

WAKS, Adrienne G.; WINER, Eric P. Breast Cancer Treatment: A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 321, n. 3, p. 288–300, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>

WANG, Xuan; ZHANG, Haiyun; CHEN, Xiaozhuo. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. **Cancer Drug Resistance**, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10>

WANG, Yi hua *et al.* Knockdown of c-Myc expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth in vitro and in vivo. **Breast cancer research : BCR**, [s. l.], v. 7, n. 2, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/bcr975>

WATERHOUSE, Andrew *et al.* SWISS-MODEL : homology modelling of protein structures and complexes. [s. l.], v. 46, n. May, p. 296–303, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>

WATSON, Christine J.; KHALED, Walid T. Mammary development in the embryo and adult: New insights into the journey of morphogenesis and commitment. **Development (Cambridge)**, [s. l.], v. 147, n. 22, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/dev.169862>

WATSON, Christine J.; KREUZALER, Peter A. Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. **International Journal of Developmental Biology**, [s. l.], v. 55, n. 7–9, p. 757–762, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1387/ijdb.113414cw>

WELLBROCK, Claudia; KARASARIDES, Maria; MARAIS, Richard. The RAF proteins take centre stage. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 875–885, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm1498>

WHO, UNICEF, USAID, et al. Indicators for Assessing Infant and Young Child Feeding Practices. **World Health Organization**, [s. l.], v. WHA55 A55/, p. 19, 2010. Disponível em:

[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44306/9789241599290\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44306/9789241599290_eng.pdf?sequence=1)  
[http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596664\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596664_eng.pdf)  
<http://www.unicef.org/programme/breastfeeding/innocenti.htm>  
<http://innocenti15.net/declaration>.

WHO. Breast cancer. [s. l.], 2021a. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>

WHO. Breastfeeding. [s. l.], 2021b. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/breastfeeding#tab=tab_1)

WIEDERSTEIN, Markus; SIPPL, Manfred J. ProSA-web : interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. [s. l.], v. 35, p. 407–410, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>

WILLIAMS, M. J.A.; WILLIAMS, S. M.; POULTON, R. Breast feeding is related to C reactive protein concentration in adult women. **Journal of Epidemiology and Community Health**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 146–148, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jech.2005.039222>

WIMLEY, William C. Early Breastfeeding Problems Mediate the Negative Association between Maternal Obesity and Exclusive Breastfeeding at 1 and 2 Months Postpartum. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 176, n. 10, p. 139–148, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3945/jn.115.214619>.Early

WOJCICKI, Janet M. Maternal prepregnancy body mass index and initiation and duration of breastfeeding: A review of the literature. **Journal of Women's Health**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 341–347, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/jwh.2010.2248>

WORTZEL, Inbal; SEGER, Rony. The ERK cascade: Distinct functions within various subcellular organelles. **Genes and Cancer**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 195–209, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1947601911407328>

XIONG, Guoli *et al.* ADMETlab 2 . 0 : an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties INTRODUCTION. [s. l.], v. 49, n. April, p. 5–14, 2021.

XU, Jingwen; PATEL, Nipa H.; GEWIRTZ, David A. Triangular relationship between p53, autophagy, and chemotherapy resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 23, p. 1–27, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21238991>

XU, Xinghua *et al.* Effect of metformin on serum interleukin-6 levels in polycystic ovary syndrome : a systematic review. [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–7, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6874-14-93>

XUE, Wen *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. **Nature**, [s. l.], v. 445, n. 7128, p. 656–660, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature05529>

YANG, Ming *et al.* Inhibition of mitochondrial function by metformin increases glucose uptake , glycolysis and GDF - 15 release from intestinal cells. **Scientific Reports**, [s. l.], p. 1–20, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81349-7>

YEE-LIN, Voon; POOI-FONG, Wong; SOO-BENG, Alan Khoo. Nutlin-3, A p53-Mdm2 Antagonist for Nasopharyngeal Carcinoma Treatment. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 173–183, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389557517666170717125821>

YU, Jack C. *et al.* Innate Immunity of Neonates and Infants. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, n. July, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01759>

ZHANG, Haiyang *et al.* p53 $\beta$ : A new prognostic marker for patients with clear-cell renal cell carcinoma from 5.3 years of median follow-up. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 368–374, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy001>

ZHANG, Xiajie *et al.* Effect of p53 and its N-terminally truncated isoform,  $\Delta$ 40p53, on breast cancer migration and invasion. **Molecular Oncology**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 447–465, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13118>

ZHANG, Xu Dong *et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of human melanoma is regulated by Smac/DIABLO release from mitochondria. **Cancer Research**, [s. l.], v. 61, n. 19, p. 7339–7348, 2001.

ZHAO, Feng Qi. Biology of glucose transport in the mammary gland. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 3–17, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10911-013-9310-8>

ZHAO, Ling; MELENHORST, J. Joseph; HENNIGHAUSEN, Lothar. Loss of interleukin 6 results in delayed mammary gland involution: A possible role for mitogen-activated protein kinase and not signal transducer and activator of transcription 3. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 2902–2912, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/me.2001-0330>

ZHAO, Yulan *et al.* Association between serum amyloid A and obesity: A meta-analysis and systematic review. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 59, n. 5, p. 323–334, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00011-010-0163-y>

ZHAO, Zhongquan *et al.* Metformin Inhibits the IL-6-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Lung Adenocarcinoma Growth and Metastasis. [s. l.], v. 9, n. 4, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095884>

ZHOU, Changhua *et al.* Proteomic analysis of acquired tamoxifen resistance in MCF-7 cells reveals expression signatures associated with enhanced migration. **Breast Cancer Research**, [s. l.], v. 14, n. 2, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/bcr3144>

ZHOU, Gaochao *et al.* Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. [s. l.], v. 108, n. 8, p. 1167–1174, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI200113505>. Introduction

ZHOU, Yamei *et al.* Enhanced NF $\kappa$ B and AP-1 transcriptional activity associated with antiestrogen resistant breast cancer. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 7, p. 1–15, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-59>

ZHU, Jianhui *et al.* Definition of the p53 functional domains necessary for inducing apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 275, n. 51, p. 39927–39934, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M005676200>

ZWICK, Rachel K. *et al.* Adipocyte hypertrophy and lipid dynamics underlie mammary gland remodeling after lactation. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05911-0>

## APÊNDICE A – TABELA DE AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

Tabela 1 – Avaliação do estado nutricional da gestante segundo Índice de Massa Corporal (IMC) por semana gestacional

Semana gestacional	Baixo peso IMC ≤	Adequado IMC entre	Sobrepeso IMC entre	Obesidade IMC ≥
6	19,9	20,0 – 24,9	25,0 – 30,0	30,1
8	20,1	20,2 – 25,0	25,1 – 30,1	30,2
10	20,2	20,3 – 25,2	25,3 – 30,2	30,3
11	20,3	20,4 – 25,3	25,4 – 30,3	30,4
12	20,4	20,5 – 25,4	25,5 – 30,3	30,4
13	20,6	20,7 – 25,6	25,7 – 30,4	30,5
14	20,7	20,8 – 25,7	25,8 – 30,5	30,6
15	20,8	20,9 – 25,8	25,9 – 30,6	30,7
16	21,0	21,1 – 25,9	26,0 – 30,7	30,8
17	21,1	21,2 – 26,0	26,1 – 30,8	30,9
18	21,2	21,3 – 26,1	26,2 – 30,9	31,0
19	21,4	21,5 – 26,2	26,3 – 30,9	31,0
20	21,5	21,6 – 26,3	26,4 – 31,0	31,1
21	21,7	21,8 – 26,4	26,5 – 31,1	31,2
22	21,8	21,9 – 26,6	26,7 – 31,2	31,3
23	22,0	22,1 – 26,8	26,9 – 31,3	31,4
24	22,2	22,3 – 26,9	27,0 – 31,5	31,6
25	22,4	22,5 – 27,0	27,1 – 31,6	31,7
26	22,6	22,7 – 27,2	27,3 – 31,7	31,8
27	22,7	22,8 – 27,3	27,4 – 31,8	31,9
28	22,9	23,0 – 27,5	27,6 – 31,9	32,0
29	23,1	23,2 – 27,6	27,7 – 32,0	32,1
30	23,3	23,4 – 27,8	27,9 – 32,1	32,2
31	23,4	23,5 – 27,9	28,0 – 32,2	32,3
32	23,6	23,7 – 28,0	28,1 – 32,3	32,4
33	23,8	23,9 – 28,1	28,2 – 32,4	32,5
34	23,9	24,0 – 28,3	28,4 – 32,5	32,6
35	24,1	24,2 – 28,4	28,5 – 32,6	32,7

36	24,2	24,3 – 28,5	28,6 – 32,7	32,8
37	24,4	24,5 – 28,7	28,8 – 32,8	32,9
38	24,5	24,6 – 28,8	28,9 – 32,9	33,0
39	24,7	24,8 – 28,9	29,0 – 33,0	33,1
40	24,9	25,0 – 29,1	29,2 – 33,1	33,2
41	25,0	25,1 – 29,2	29,3 – 33,2	33,3
42	25,0	25,1 – 29,2	29,3 – 33,2	33,3

Fonte: ATALAH et al. Revista Médica de Chile, 1997.

**ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Citocinas pró-inflamatórias no leite materno: associação com o estado metabólico da mãe

**Pesquisador:** Fabiola Branco Filippin Monteiro

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 68008317.4.0000.0121

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Catarina

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.081.185

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um projeto da pesquisadora do departamento de Análises Clínicas que pretende investigar, junto a mulheres que amamentam a presença de citocinas pró-inflamatórias no leite materno correlacionado a situação do peso antes e depois de parto. Serão acompanhadas as mulheres que forem atendidas no hospital universitário. estas serão acompanhadas até seis meses após o parto. Devem fazer parte 400 mulheres.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Determinar o perfil de citocinas pró-inflamatórias no leite materno e no soro de mães atendidas no HU-UFSC a fim de se estabelecer associações entre a lactogênese, o estado metabólico da mãe e as citocinas presentes no leite materno.

Objetivo Secundário:

- Determinar as concentrações séricas de marcadores de adiposidade (leptina, adiponectina), de inflamação (SAA e PCR), hormônios (prolactina e progesterona) e citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF-a, IL1-b e MCP-1) em mães atendidas no HU-UFSC por ocasião do parto;
- Determinar as concentrações de citocinas pró- inflamatórias (IL-6, TNF-a, IL1-b e MCP-1) no leite materno de mães atendidas no HU-UFSC por ocasião do parto;
- Determinar os constituintes do leite materno (%gordura, proteínas totais);

- Analisar dados clínicos da mãe e do RN e aspectos relacionados ao aleitamento materno (escore de amamentação) em até 6 meses após o parto.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:****Benefícios:**

As mães que aceitarem participar do estudo serão acompanhadas por 6 meses na tentativa de incentivo ao aleitamento materno exclusivo. Ainda, serão incentivadas e instruídas a comparecerem nas consultas mensais ao pediatra em sua Unidade Básica de Saúde ou pediatra de escolha na rede privada. As mães e acompanhantes serão acolhidos.

**Riscos:**

Existem os riscos de procedimentos de coleta de sangue, possíveis constrangimentos durante a entrevista e/ou quebra de confidencialidade dos dados coletados. No entanto, estes riscos serão potencialmente reduzidos pelos pesquisadores: A coleta de sangue será realizada em ambiente adequado e pela equipe da pesquisa que tomará todos os cuidados necessários para o mínimo de desconforto. Apesar disto, poderá haver a possibilidade de formação de hematoma e sensação dolorosa no local da coleta. Se isso acontecer, a equipe da pesquisa tomará as medidas necessárias para diminuir este desconforto. A coleta de leite materno será feita após a ordenha manual que acontece junto com as enfermeiras. O leite descartado será utilizado para a pesquisa. A entrevista para a coleta de algumas informações será realizada em ambiente tranquilo e discreto, sempre respeitando a individualidade e as necessidades de cada paciente. Será assegurado o direito a não responder a qualquer pergunta se achar que ela é muito pessoal ou se sentir desconfortável em falar. Os dados retirados do prontuário médico serão armazenados e manuseados com todo cuidado somente pelos pesquisadores para reduzir o risco de quebra de sigilo. Os dados telefônicos serão guardados em sigilo e somente os a equipe da pesquisa (01 professor e 01 aluno) terão acesso.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa encontra-se adequadamente fundamentada e documentada. Traz a documentação necessária para a tramitação. Apresenta um TCLE estruturado de acordo com as orientações da Resolução 466/2012.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

TCLE adequado às orientações da Resolução 466/2012. Contudo é necessário corrigir no endereço do CEPESH o prédio no qual este Comitê se localiza.

**Recomendações:**

corrigir o prédio de localização do CEPESH/UFSC no TCLE.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Conclusão: aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_878555.pdf	05/05/2017 17:43:24		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	05/05/2017 17:42:54	Fabiola Branco Filippin Monteiro	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_assinada.pdf	05/05/2017 12:14:48	Fabiola Branco Filippin Monteiro	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_leite_materno.pdf	05/05/2017 12:12:51	Fabiola Branco Filippin Monteiro	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Leite_materno.pdf	05/05/2017 12:12:37	Fabiola Branco Filippin Monteiro	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FLORIANOPOLIS, 25 de Maio de 2017

---

Assinado por:

**Ylmar Correa Neto**

**(Coordenador)**

**ANEXO B – QUESTIONÁRIO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**  
**CAROLINA DUMKE DE SIQUEIRA**

**QUESTIONÁRIO**

Número prontuário: \_\_\_\_\_ Telefone/celular: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Peso pré gestacional: \_\_\_\_\_ Peso pós gestacional: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_

Comorbidades: \_\_\_\_\_

Nível escolar: \_\_\_\_\_ Ocupação: \_\_\_\_\_

Tipo de parto: \_\_\_\_\_ Tempo: \_\_\_\_\_ Capurro: \_\_\_\_\_

Número de filhos: \_\_\_\_\_ Peso do RN: \_\_\_\_\_

Amamentações anteriores:

\_\_\_\_\_

Complicações na gravidez: \_\_\_\_\_

Foi como planejou?

\_\_\_\_\_

Fez acompanhamento nutricional? Sim Não Tempo: \_\_\_\_\_

Houve mudança nos hábitos alimentares? Durante e após gestação?

\_\_\_\_\_

Praticava exercícios antes e durante gestação? Sim Não

\_\_\_\_\_

Pretende começar ou manter?

\_\_\_\_\_