UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Lucas André Silva Bonela**

# Efeitos da L-arginina sobre o sistema oxidativo em células MCF-7 de câncer de mama.

VITÓRIA, ES

2020

**Lucas André Silva Bonela**

# Efeitos da L-arginina sobre o sistema oxidativo em células MCF-7 de câncer de mama.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Profª. Drª. Sonia Alves Gouvea

VITÓRIA, ES

2020

**Lucas André Silva Bonela**

# Efeitos da L-arginina sobre o sistema oxidativo em células MCF-7 de câncer de mama.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 26 de março de 2020.

**Profa. Dra. Sonia Alves Gouvea**
**Universidade Federal do Espírito Santo**
**Orientadora**

VITÓRIA, ES

2020

Dedico este trabalho a

Lorival Bonela (*in memoriam*), meu pai amado!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao Senhor pela oportunidade de cursar um mestrado. Agradeço por renovar as minhas forças todos os dias para me por de pé e correr atrás do crescimento pessoal e profissional.

Agradeço à minha esposa Sarah Martins Ferreira Bonela por todo apoio, carinho e compreensão durante esse período. Muitos dias de laboratório, noites sem dormir, e principalmente, me ouvir em todos os momentos.

Agradeço a minha mãe Carla Andressa G. S. Bonela e meu irmão Leonardo H. S. Bonela pelo incentivo e interesse no meu desenvolvimento.

Agradeço a professora Sonia Alves Gouvea por ser não só minha orientadora, mas alguém se preocupa com nosso crescimento e por proporcionar um ambiente de amizade, cumplicidade e trabalho em equipe no LOCE – Laboratório de Oncologia Clínica e Experimental.

Agradeço ao Dr. e amigo Vinícius Mengal por ser fundamental na realização deste projeto auxiliando nos experimentos, na escrita dessa dissertação e em todos os demais momentos.

Agradeço aos professores do PPG Biotecnologia por compartilharem os seus conhecimentos.

Agradeço aos professores Adriana Madeira e Marcelo Baldo pelo aceite para participar da minha banca examinadora.

Agradeço aos meus amigos do LOCE por tornarem essa caminhada cada vez melhor.

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de cursar um Mestrado em Biotecnologia com qualidade e conceituado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

BONELA, L. A. **Efeitos da L-arginina sobre o sistema oxidativo em células MCF-7 de câncer de mama.** 2020. 56f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.


## RESUMO

O uso da L-arginina (L-ARG) na suplementação dietética do paciente oncológico tem apresentado resultados positivos devido à sua relevância em diferentes sistemas do corpo, mas seu uso pode ter efeitos diretos sobre as células tumorais. As abordagens terapêuticas contra o câncer tem sido alvo de vários estudos, pois em muitos casos as formas de tratamentos são eficazes, porém as comorbidades são agravantes para o prognóstico e sobrevida, incluindo o câncer de mama. No entanto, in vitro, a associação da L-ARG com outras moléculas tem se mostrado eficaz na redução do crescimento de células tumorais, além da melhora na resposta imunológica de pacientes. Desta forma, o uso de células tumorais de mama da linhagem MCF-7 poderá mostrar quais os efeitos de diferentes doses de L-ARG sobre o sistema oxidativo celular. O tratamento consistiu na exposição as concentrações 800/1600/3200 µg/mL de L-ARG por 48h. O ensaio AlamarBlue® foi utilizado para medir a proliferação e avaliar a viabilidade da célula. Avaliação da expressão da catalase, da subunidade gp91phox, e CtIP, foi feita por Western blot e o software *ImageJ* foi utilizado para mensurar a quantidade de cada proteína. Os dados foram analisados no software *GraphPad Prism® 8.0.2* e utilizando o teste one-way ANOVA. As alterações nas células MCF-7 foram: aumento da quantidade da subunidade gp91phox, redução da catalase e aumento na quantidade de CtIP tempo dose dependente. O tratamento com L-ARG em células tumorais MCF-7 reduziu a expressão da CAT, aumentou a gp91phox e CtIP. Na dose 3200µg/mL houve uma redução da viabilidade celular. Esses resultados podem contribuir para associação da L-ARG às terapias convencionais no tratamento do câncer de mama.



**Palavras-chave:** Câncer de mama, MCF-7, tratamento, L-arginina, viabilidade celular.

**Therapeutic potentials of L-arginine on the oxidative system in breast cancer MCF-7 cells.**

BONELA, L. A. S **Effects of L-arginine on the oxidative system in breast cancer MCF-7 cells.** 2020. 56f. Dissertation (Master in Biotechnology) - Graduate Program in Biotechnology, UFES, Espirito Santo. Brazil.

## ABSTRACT

The use of L-arginine (L-ARG) in the dietary supplementation of cancer patients has shown positive results due to its relevance in different systems of the body, but its use can have direct effects on tumor cells. Therapeutic approaches against cancer have been the subject of several studies, as in many cases the forms of treatments are effective, but comorbidities are aggravating for prognosis and survival, including breast cancer. However, in vitro, the association of L-ARG with other molecules has been shown to be effective in reducing the growth of tumor cells, in addition to improving the immune response of patients. Thus, the use of MCF-7 breast tumor cells may show the effects of different doses of L-ARG on the cellular oxidative system. The treatment consisted of exposure to concentrations 800/1600/3200 µg / mL of L-ARG for 48 hours. The AlamarBlue® assay was used to measure proliferation and assess cell viability. Evaluation of the catalase expression, the gp91phox subunit, and CtIP, was performed by Western blot and the ImageJ software was used to measure the amount of each protein. The data were analyzed using the GraphPad Prism® 8.0.2 software and using the one-way ANOVA test. The changes in MCF-7 cells were: increased amount of the gp91phox subunit, reduced catalase and increased amount of CtIP time dependent dose. Treatment with L-ARG in MCF-7 tumor cells reduced CAT expression, increased gp91phox and CtIP. At the 3200µg / mL dose, there was a reduction in cell viability. These results may contribute to the association of L-ARG with conventional therapies in the treatment of breast cancer.

**Keywords:** Breast cancer, MCF-7, treatment, L-arginine, cell viability.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1-** Sobrevida dos pacientes com câncer de mama (CM) em cinco anos contados a partir do diagnóstico. Fonte: adaptado de Our World In Date. .....14
**Figura 2 -** Origem das células tumorais do CM segundo a hipótese stem cell câncer (CSC) (A) e a hipótese estocástica (B). .....18
**Figura 3 –** Atividade dos principais componentes do sistema antioxidante. Superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR) e catalase (CAT) são os principais sistemas de defesa enzimática endógena de todas as células aeróbias .....21
**Figura 4 -** Estrutura molecular da L-arginina. .....25
**Figura 5 -** L-arginina como precursor de várias moléculas no organismo. .....25
**Figura 6 -** Distribuição dos grupos por tratamento na placa de 96 poços. NT= não tratado. Os poços sem cores estão preenchidos apenas com meio, AlamarBlue e L-ARG. .....31
**Figura 7 -** A expressão de gp91phox e redução catalase (CAT). O tratamento com a L-ARG aumentou a quantidade da subunidade gp91phox. Valores expressos em média ± EPM entre a densidade das bandas de catalase e gp91phox. * p< 0,05 em relação ao grupo NT; # p<0,05 e em relação ao grupo 800 µg/mL. .....35
**Figura 8 -** A expressão de CAT foi reduzida em todos os grupos (800-1600-3200 µg/mL). Valores expressos em média ± EPM entre a densidade das bandas de catalase e gp91phox. * p< 0,05 em relação ao grupo NT; # p< 0,05 em relação ao grupo 800 µg/mL. .....36
**Figura 9 -** A expressão de CtIP após tratamento com L-ARG. Valores expressos em média ± EPM entre a densidade das bandas de CtIP. * p< .05 em relação ao grupo NT; # p< .05 em relação ao grupo 800 µg/mL. .....37
**Figura 10 -** Efeitos da L-arginina sobre a viabilidade de MCF-7. Após o tratamento contínuo com as diferentes concentrações de L-ARG, houve redução da viabilidade. NT: não tratado, * p< 0,05 em relação ao grupo NT. .....38

## Lista de Abreviaturas

bCSCs – célula tronco do câncer de mama (do inglês *breast cancer steam cells)*

BRCA1 – proteína de suscetibilidade ao câncer de mama tipo 1 (do inglês *Breast cancer type 1 susceptibility protein*)

BRCA2 – proteína de suscetibilidade ao câncer de mama tipo 2 (do inglês *Breast cancer type 2 susceptibility protein*)

CAT - catalase

CM – câncer de mama

CSC – célula tronco  cancerígena ( do inglês *cancer steam cells*)

CtIP – Proteína que Interage com CTBP (do inglês CTBP-Interacting Protein)

DNA – ácido desoxirribonucleico

DSB – quebra de fita dupla (do inglês *double strand break*)

ERNs – espécies reativas de nitrogênio

EROs – espécies reativas de oxigênio

G1/2 – gap 1/2

GPx - glutationa peroxidase,

GR - glutationa redutase

GSH - glutationa

GSSG - glutationa oxidada

H2O2 - peroxido de hidrogênio

HO– - radicais hidroxilas

HR – recombinação homóloga

mRNA - RNA mensageiro

NADPHoxidase – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase( do inglês nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase)

NHEJ – reparo por junção não homóloga ( do inglês *non-homologous end-joining*)

NO – óxido nítrico

ONOO– - peroxinitrito

PARP - Poli (ADP-ribose) polimerase-1

RBBP8 – Proteína 8 de ligação RB, Endonuclease (do inglês RB Binding Protein 8, Endonuclease)

RNA – ácido ribonucleico

SODs – superóxido dismutases

SSBs – quebra de fita simples ( do inglês *single strand base*)

TNBC – Câncer de mama triplo negativo (do inglês triple negative breast câncer)

TrxR - tiorredoxina redutase

# Sumário

**1. Introdução**.....13
**2. Objetivos**.....28
2.1 Objetivo Geral.....28
2.2 Objetivos específicos.....28
**3. Material e Métodos**.....29
3.1 Material para cultura de células.....29
3.2 Cultura de células.....29
3.3 Contagem das células.....29
**3.4 Proliferação e viabilidade celular**.....30
**3.1** Estudo de expressão proteica.....31
**3.1.1 Preparação dos tecidos e quantificação de proteínas**.....31
**3.1.2 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)**.....32
**3.1.3 Transferência das proteínas**.....33
**3.1.4 Incubação dos anticorpos**.....33
3.2 Análise estatística.....34
**4. Resultados**.....35
4.1 A expressão da enzima gp91phox.....35
4.2 A expressão da enzima CAT.....36
4.3 A expressão de CtIP.....36
4.4 Viabilidade e a capacidade proliferativa das células MCF-7.....37
**5. Discussão**.....38
**6. Conclusão**.....45
**7. Referências**.....46

## 1. Introdução

O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países. A incidência e a mortalidade por câncer vêm aumentando no mundo, em parte pelo envelhecimento e crescimento populacional, como também pela mudança na distribuição e na prevalência dos fatores de risco de câncer, especialmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico (BRAY et al., 2018).

Segundo estimativas mundiais, no ano de 2018, ocorreram 18 milhões de casos novos de câncer (17 milhões sem contar os casos de câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de óbitos (9,5 milhões excluindo os cânceres de pele não melanoma). O câncer de pulmão é o mais incidente no mundo (2,1 milhões) seguido pelo câncer de mama (CM) (2,1 milhões), cólon e reto (1,8 milhão) e próstata (1,3 milhão). A incidência em homens (9,5 milhões) representa 53% dos casos novos, sendo um pouco maior que nas mulheres, com 8,6 milhões (47%) de casos novos. Os tipos de cânceres mais frequentes nos homens foram o câncer de pulmão (14,5%), próstata (13,5%), cólon e reto (10,9%), estômago (7,2%) e fígado (6,3%). Nas mulheres, as maiores incidências foram CM (24,2%), cólon e reto (9,5%), pulmão (8,4%) e colo do útero (6,6%) (BRAY et al., 2018).

Segundo estimativas para o Brasil, cada ano no biênio 2018-2019 ocorreram 600 mil casos novos de câncer. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorreram 420 mil casos novos de câncer (INCA, 2017). Para o CM, no ano de 2019 ocorreram 59.700 casos novos, o que representa 29,5% dos cânceres em mulheres (INCA, 2019). Para cada ano do triênio 2020-2022 ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2019b).

No Espírito Santo, são esperados, para 2020, 10.880 casos novos de câncer (3.690 de pele não melanoma), sendo os mais frequentes os de mama (790) e próstata (1.380). Quando comparamos as taxas Estado vs. Capital, observamos que o CM é mais frequente na capital (Vitória) com 39,57 (INCA, 2019b).

Apesar do aumento no número de casos, o câncer de mama é o que possui a melhor sobrevida entre todos os tipos de cânceres. O Brasil está entre os 17 países em que a sobrevida em cinco anos ultrapassa os 85% dos casos. As estimativas de sobrevida em cinco anos foram de 76,9% (75,5 - 78) para o período de 2005 a 2009 e de 75,2% (73,9 - 76,5) para o período de 2010 a 2014. No ranking, especificamente com 87,4%, está à frente de países como os Estado Unidos (88,6%), Canadá (85,8%), Austrália (86,2%), China (80,9%), e, na América do Sul, Argentina (76,6%)(figura 1) (ROSER; RITCHIE, 2019). Porém, fatores relacionados ao conhecimento da doença e às dificuldades de acesso das mulheres aos métodos diagnósticos e ao tratamento adequado e oportuno resultam na chegada das pacientes em estágios mais avançados do câncer de mama, piorando o prognóstico (INCA, 2019).

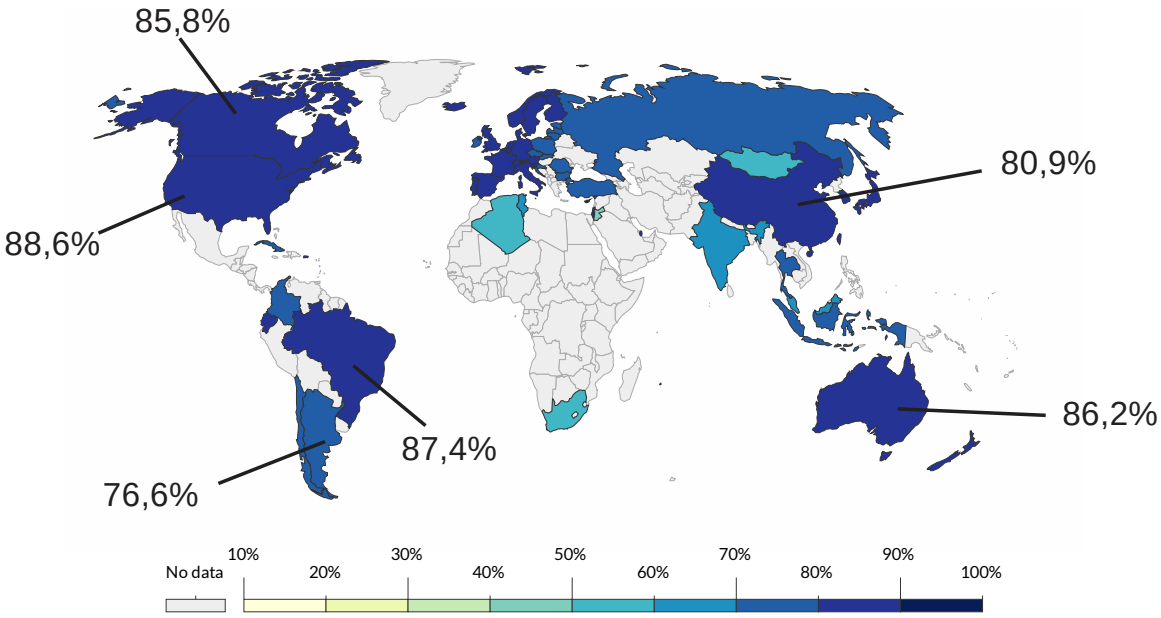


**Figura 1-** Sobrevida dos pacientes com câncer de mama (CM) em cinco anos contados a partir do diagnóstico. Fonte: adaptado de Our World In Date.

A etiologia do câncer de mama é complexa, multifatorial, e possui fatores de risco de natureza genética e não-genética que interagem entre si, contribuindo para a carcinogênese e progressão do câncer de mama (ANTOGNELLI et al., 2009; DA FONTE DE AMORIM et al., 2002).

Pesquisas epidemiológicas identificaram condições individuais, de estilo de vida e ambientais que aumentam a probabilidade de desenvolvimento do câncer de mama. Alguns fatores de risco, como os hereditários, hormonais e reprodutivos, certos

tipos de doença benigna da mama, idade e raça, não podem ser alterados (APOSTOLOU; FOSTIRA, 2013; LEVY-LAHAD; FRIEDMAN, 2007; LORI JARDINES, MD, SHARAD GOYAL, MD, PAUL FISHER, MD, JEFFREY WEITZEL, MD, MELANIE ROYCE, MD, PHD, SHARI B. GOLDFARB, 2015; SINGLETARY, 2003; WORSHAM et al., 2007). Porém, fatores ambientais ou comportamentais, tais como reposição hormonal, ingestão de bebidas alcoólicas, excesso de gordura corporal, radiação ionizante em tórax e uso de tabaco podem ser reduzidos (AL-DELAIMY et al., 2004; LORI JARDINES, MD, SHARAD GOYAL, MD, PAUL FISHER, MD, JEFFREY WEITZEL, MD, MELANIE ROYCE, MD, PHD, SHARI B. GOLDFARB, 2015; LUO et al., 2011; SINGLETARY, 2003; VAN DEN BRANDT et al., 2000). A prática regular de atividade física e a amamentação também são formas de se proteger do câncer de mama (KYU et al., 2016). Alguns desses fatores afetam o risco de desenvolver câncer de mama mais do que outros e podem mudar ao longo do tempo, como o envelhecimento populacional ou as mudanças culturais em estilos de vida (INCA, 2019a).

A idade é um dos mais importantes fatores de risco, pois está relacionado a diversas alterações fisiológicas que determinam alterações moleculares que combinadas a fatores mitogênicos e associados à insuficiência e desregulação do sistema imunológico favorecem a proliferação celular (DA SILVA; DA SILVA, 2005). A incidência de CM está relacionada ao aumento da idade, sendo que a maior taxa de morte acontece entre 40 (99,3%) e 60 (71,2%) anos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

Fatores reprodutivos como menarca precoce, menopausa tardia, idade tardia na primeira gestação e baixa paridade podem aumentar o risco de câncer de mama (KEY; VERKASALO; BANKS, 2001). A cada um ano de atraso na menarca ou parto adicional o risco de desenvolvimento do CM é reduzido em 5% e 10%, respectivamente. O redução do risco por nascimento é maior para nascimentos em idades jovens do que em idades mais avançadas, esse é 30% menor do que em mulheres com um primeiro nascimento após os 35 anos (WASHBROOK, 2006).

Em relação ao estrogênio, tanto exógeno quanto o endógeno, estão associados com um aumento do risco de CM. O estrogênio é responsável pelo desenvolvimento feminino, com multiplicação celular sistemática e organizada. Quando a proliferação

celular, estimulada por vias hormonais, ocorre de forma descontrolada, isso pode ser um dos fatores contribuintes para o aparecimento de cânceres, em especial o CM (MARINHEIRO et al., 2003). Dados epidemiológicos recentes mostraram que a exposição precoce (menarca jovem) tem um efeito mais significativo sobre o risco de câncer do que a menopausa tardia. Em apoio a isso, também é sabido que a exposição hormonal aberrante antes da puberdade também pode aumentar o risco de CM (DALL; BRITT, 2017).

O consumo de álcool foi associado positivamente ao risco de CM receptor de estrogênio positivo/negativo (ER+/-) (JUNG et al., 2016). Uma meta-análise baseada em 53 estudos epidemiológicos indicou que uma ingestão de 35-44 gramas de álcool por dia pode aumentar o risco de CM em 32%, com um aumento de 7,1% no risco relativo (RR) para cada 10 gramas adicionais de álcool por dia (HAMAJIMA et al., 2002). O tabagismo, fator estudado ao longo dos anos com resultados contraditórios, é atualmente reconhecido pela International Agency for Research on Cancer (IARC) como agente carcinogênico com limitada evidência de aumento do risco de CM em humanos(WILD CP, WEIDERPASS E, 2020).

O histórico familiar é o segundo fator que mais contribui sendo que aproximadamente um quarto de todos os casos de CM está relacionado à história familiar e, normalmente associado à presença de mutações em determinados genes, especialmente BRCA1 e BRCA2 (ADAMI; HUNTER; TRICHOPOULOS, 2008). Um estudo de coorte com mais de 113.000 mulheres no Reino Unido demonstrou que mulheres com um parente de primeiro grau com CM tinham um risco 1,75 vezes maior de desenvolver essa doença do que mulheres sem parentes relacionados. Além do aumento no risco em 2,5 vezes ou mais em mulheres com dois ou mais parentes de primeiro grau com CM (BREWER et al., 2017).

Apesar do fator genético exercer um importante papel na carcinogênese, são raros os casos de câncer que se devem exclusivamente a fatores hereditários, familiares e étnicos. Existem ainda alguns fatores genéticos que tornam determinadas pessoas mais suscetíveis à ação dos agentes cancerígenos ambientais. Isso parece explicar porque algumas mulheres desenvolvem câncer e outras não, quando expostas a um mesmo carcinógeno(INCA, 2018)(INCA, 2018). Os fatores podem

interagir de diversas formas, dando início à carcinogênese, porém entre 80% e 90% dos casos de câncer estão associados a causas externas (INCA, 2018).

O estudo de Hanahan e Weinberg (2011) forneceram uma estrutura lógica para compreender o processo de várias etapas da patogênese tumoral em que as alterações no funcionamento da célula levam à aquisição da capacidade de sustentar a sinalização proliferativa, evitar a supressão do crescimento, evitar a destruição imune, permitir a imortalidade replicativa, resistir à apoptose, desregular a energia celular, induzir a angiogênese e ativar invasão e metástase. Também, foi dada ênfase adicional à interação das células tumorais e das células mesenquimais que formam o estroma associado ao tumor ou o microambiente do tumor, sendo dessa forma considerado uma patologia de origem multifatorial.

Apesar da etiologia da carcinogênese ser extremamente complicada e envolver muitos níveis diferentes de regulação, sabe-se que em geral se dá lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível. Esse processo passa por vários estágios antes de chegar ao tumor. O primeiro deles são alterações genéticas que podem acontecer em genes especiais, denominados protoncogenes, que a princípio são inativos em células normais. Quando ativados, os protoncogenes tornam-se oncogenes, responsáveis por transformar as células normais em células cancerosas (INCA, 2018).

A carcinogênese é determinada pela exposição a agentes químicos, físicos e biológicos que podem ativar os protoncogenes, em uma dada frequência e em dado período de tempo, e pela interação com vias moleculares endógenas que também podem causar mutações nesses genes críticos através da produção de espécies reativas de oxigênio que danificam as macromoléculas celulares, incluindo o DNA. Devem ser consideradas, no entanto, as características individuais, que facilitam ou dificultam a instalação do dano celular (PETERS; GONZALEZ, 2018). Esse processo é composto por três estágios: iniciação, promoção, progressão.

Existem duas hipóteses para a iniciação e progressão do CM: a hipótese das células-tronco cancerígenas (câncer steam cells-CSC) e a hipótese estocástica (SGROI, 2010).

A hipótese CSC sugere que todos os subtipos de tumores são derivados das mesmas células-tronco ou células progenitoras. Mutações genéticas, epigenéticas, e exposição a fatores de risco, adquiridas em células-tronco ou células progenitoras levariam a diferentes fenótipos tumorais (Figura 2A). A hipótese estocástica é que cada subtipo de tumor é iniciado a partir de um único tipo de célula (célula-tronco, célula progenitora ou célula diferenciada) (Figura 2B). Mutações aleatórias podem se acumular gradualmente em qualquer célula da mama, levando à sua transformação em células tumorais quando mutações adequadas se acumularem. Embora ambas as hipóteses sejam apoiadas por muitos dados, nenhuma delas pode explicar completamente a origem do CM humano (SUN et al., 2017).

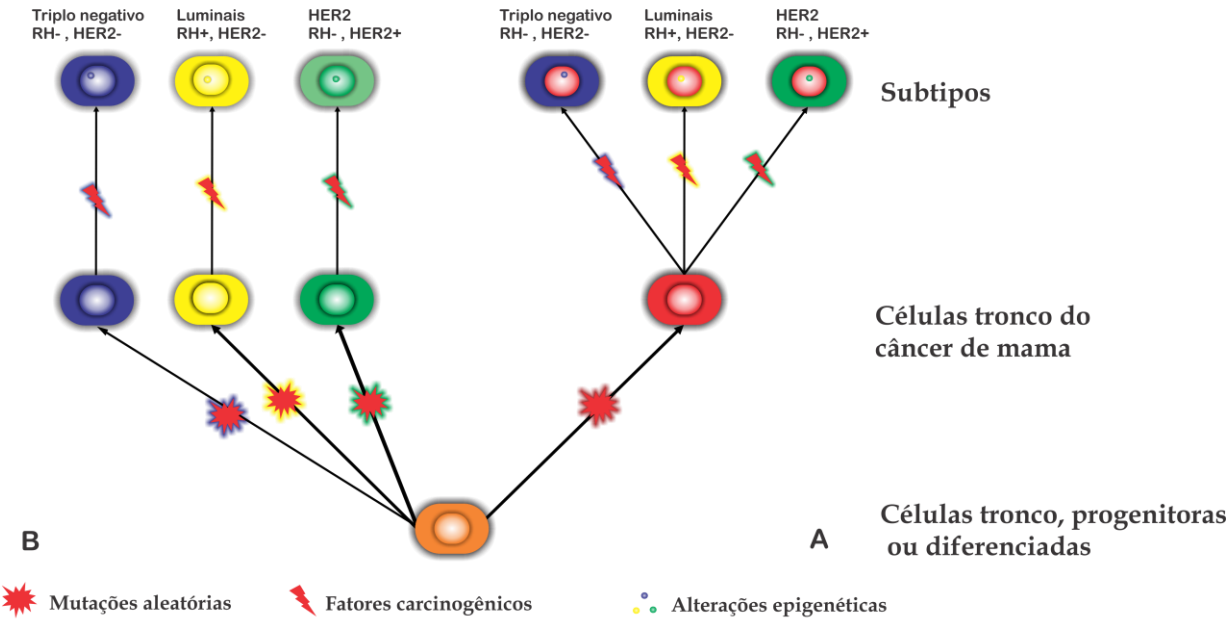


**Figura 2-** Origem das células tumorais do CM segundo a hipótese stem cell câncer (CSC) (A) e a hipótese estocástica (B).

As células-tronco do CM (bCSCs) foram identificadas pela primeira vez por Ai Hajj e até 100 bCSCs poderiam formar novos tumores em camundongos imunocomprometidos (AL-HAJJ et al., 2003). É mais provável que as CSCs se originem de progenitores epiteliais luminais e não de células-tronco basais (MOLYNEUX et al., 2010). As vias de sinalização, incluindo Wnt, Notch, Hedgehog, p53, PI3K e HIF, estão envolvidas na auto renovação, proliferação e invasão de CSCs (BOLLATI et al., 2009; VALENTI et al., 2017).

Vale ressaltar que, em ambas as hipóteses, os fatores ambientais são cruciais para o desenvolvimento das células tumorais. Porém, no processo de iniciação, genes que regulam o ciclo celular também sofrem mutações por vias endógenas (por exemplo, espécies reativas de oxigênio e/ou falta de reparo do DNA) (PETERS; GONZALEZ, 2018).

A aparência, o desenvolvimento e a progressão do câncer são caracterizados por um acúmulo progressivo de mutações genéticas que abolem as restrições naturais da divisão celular em organismos pluricelulares. Enquanto nas células normais as mutações acontecem lentamente devido à existência de múltiplos mecanismos que as impedem, nas células pré-cancerosas e cancerígenas as mutações se acumulam de maneira acelerada, um fenômeno conhecido como instabilidade genômica (NEGRINI; GORGOULIS; HALAZONETIS, 2010).

Essa instabilidade possibilita as capacidades funcionais essenciais das células cancerosas para sobreviver, proliferar e disseminar, além da resposta inflamatória mediada pelas células imunes recrutadas pelo estroma de células malignas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A fidelidade e integridade da sequência genômica, particularmente nas células aeróbias, é continuamente desafiada devido à instabilidade inerente do DNA, reações químicas espontâneas, exposição a espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) endógenos e outras moléculas pró-oxidantes reativas. Essas espécies reativas produzem múltiplos danos oxidativos ao DNA em organismos aeróbicos, incluindo bases de DNA oxidadas, fragmentos de açúcar oxidado, sítios abásicos e quebras de fita simples (*single strand base* - SSBs), quando SSB acontece durante a replicação, surgem as quebras de dupla fita (*double strand break*-DSB) (HEGDE; IZUMI; MITRA, 2012). Embora as DSBs não reparadas sejam letais, as lesões de base oxidada podem ser mutagênicas, citotóxicas ou ambas. Assim, as células precisam de um sistema eficaz de reparo do material genético. O reparo de DSBs, o tipo de lesão que pode causar a inviabilidade celular, pode ser realizado por duas vias principais: reparo por recombinação homóloga (HR) e reparo por junção não homóloga (NHEJ, non-homologous end-joining) (HARTLERODE; SCULLY, 2009).

As células tumorais estão comumente expostas a condições de estresse, como hipóxia (baixos níveis de oxigênio), perda de adesão célula-célula e célula-matriz

extracelular, desbalanço no metabolismo oxidativo e diversos fatores ambientais (DHILLON et al., 2007). Vários modelos in vitro e in vivo mostram que sinais oncogênicos como Ras e Bcr-Abl promovem a geração de EROs, contribuindo para o estresse oxidativo nas células cancerígenas. A supressão da eliminação de EROs ao eliminar as o sistema antioxidante inerente, ou parte dele, também causa estresse oxidativo, levando a um aumento no risco de câncer (LU; OGASAWARA; HUANG, 2007).

O aumento da produção de EROs tem sido observado em câncer, doenças degenerativas e outras condições patológicas. As EROs podem estimular a proliferação celular, promover instabilidade genética e induzir respostas adaptativas que permitem que as células cancerosas mantenham seus fenótipos malignos. No entanto, quando o equilíbrio redox celular é gravemente perturbado, altos níveis de EROs podem causar vários danos, levando à morte celular(LU; OGASAWARA; HUANG, 2007). A perda do equilíbrio entre produção e eliminação de EROs e/ou ERNs (como óxido nítrico, NO), é chamado de estresse oxidativo. Isso pode resultar em danos ao DNA, RNA, lipídios e proteínas. Além de fragmentação do DNA, as ERO podem causar o mal funcionamento do sistema de reparo do genoma, contribuindo para o desenvolvimento do câncer (SOSA et al., 2013).

Uma vez estando biodisponíveis no meio, as EROs podem interagir com diferentes substâncias, propiciando danos a macromoléculas (ex.: proteínas, lipídeos e DNA) e perturbando os processos de sinalização dependentes de oxirredução na parede vascular (PISOSCHI; POP, 2015).

A NADPH oxidase é uma das principais fontes de EROs. Está presente em macrófagos e neutrófilos, sendo um complexo proteico multimérico com componentes na membrana celular e no citoplasma. O componente associado à membrana é o citocromo b558-oxidase, formado por uma subunidade maior, a gp91phox (o termo “phox” deriva de “phagocytic oxidase”) (LASSÈGUE; CLEMPUS, 2003), e uma menor, p22phox. Além dessas, a enzima compreende três subunidades citoplasmáticas (p47phox, p67phox e p40phox) e uma proteína G regulatória (Rac2). A ativação da NADPH oxidase inicia-se pela fosforilação (em serina) da subunidade citoplasmática p47phox, desencadeando sua migração para a membrana, onde, juntamente com a Rac, associa-se ao citocromo b558, iniciando a atividade catalítica da enzima (CAI; GRIENDLING; HARRISON, 2003).

O aumento da produção de EROs tem sido observado em câncer, doenças degenerativas e outras condições patológicas. As EROs podem estimular a proliferação celular, promover instabilidade genética e induzir respostas adaptativas que permitem que as células cancerosas mantenham seus fenótipos malignos. No entanto, quando o equilíbrio redox é gravemente perturbado, altos níveis de EROs podem causar vários danos ativando a sinalização antitumorigênica, levando à morte celular (LU; OGASAWARA; HUANG, 2007; MOLONEY; COTTER, 2018). O sistema antioxidante é responsável pelo controle das EROs que, em coordenação, transformam estas moléculas em substratos menos nocivos ou inócuos. Dentre as principais enzimas antioxidantes temos: Superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR) e catalase (CAT) (TOUYZ; SCHIFFRIN, 2004) (figura 3).

A SOD converte superóxido($O_2^-$) em $H_2O_2$. O $H_2O_2$ pode então passar pela química de Fenton com $Fe^{2+}$ para formar $OH^-$, que é extremamente reativo, causando danos ao DNA, proteínas e lipídios. O $H_2O_2$ pode ser reduzido e convertido em $H_2O$ por peroxirredoxinas (PRX), glutationa peroxidases (GPX) e catalase. O $H_2O_2$ é uma molécula de sinalização envolvida no câncer, resultando no desenvolvimento e progressão da doença.

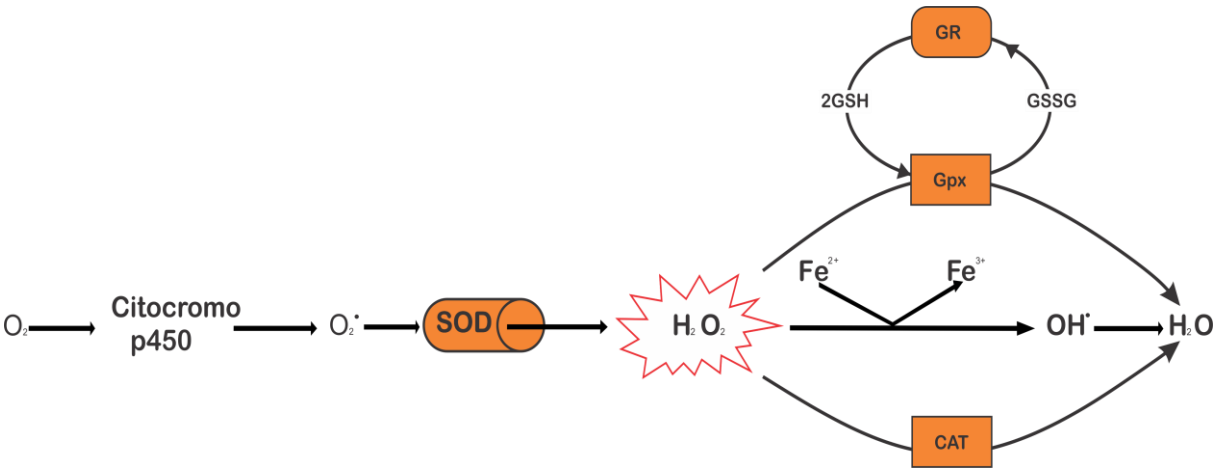


**Figura 3 –** Atividade dos principais componentes do sistema antioxidante. Superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR) e catalase (CAT) são os principais sistemas de defesa enzimática endógena de todas as células aeróbias. Eles protegem diretamente os radicais superóxido e o peróxido de hidrogênio, convertendo-os em espécies menos reativas. O SOD catalisa a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot}$) em peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$). Embora o $H_2O_2$ não seja um radical, ele é rapidamente

convertido pela reação de fenton no radical OH·, que é muito reativo. O GPx neutraliza o peróxido de hidrogênio, tomando hidrogênios de duas moléculas de GSH, resultando em duas $H_2O$ e uma GSSG. O GR regenera então o GSH do GSSG. CAT, a parte importante da defesa enzimática, neutraliza o $H_2O_2$ em $H_2O$.

Além dos conhecidos genes BRCA1 e BRCA2, defeitos hereditários nos genes necessários para o reparo do DNA por recombinação homóloga, como PALB2/FANCN(RAHMAN et al., 2007), BACH1/BRIP1/FANCJ (CANTOR et al., 2001; LITMAN et al., 2005), ATM (RENWICK et al., 2006), NBS1(STEFFEN et al., 2004), RAD50 (HEIKKINEN, et al., 2006) e RAD51C (MEINDL et al., 2010), foram implicados na suscetibilidade ao CM.

Várias enzimas estão envolvidas no processo de reparo do DNA. Dentre elas, podemos destacar a endonuclease CtIP codificada pelo gene RBBP8. CtIP está envolvida em vários processos, incluindo transcrição, replicação e reparo do DNA, além de checkpoints do ciclo celular em G1 e G2. A CtIP desempenha um papel importante no reparo por recombinação homologa, pois interage com a proteína supressora de tumor BRCA1(WANG et al., 2016) que coopera com o complexo MRE11-RAD50-NBN (MRN) na ressecção da extremidade do DNA (SORIA-BRETONES et al., 2013)

Sabe-se que CtIP, é frequentemente regulada negativamente no CM, bem como em outros tipos de câncer. Wang e colaboradores, 2016, mostraram que as células de CM com defeitos na função CtIP são hipersensíveis aos inibidores de PARP (Poli (ADP-ribose) polimerase-1) olaparibe e veliparibe. Neste mesmo estudo, mostraram que os pacientes, cujos tumores eram do tipo TNBC, com baixa expressão de CtIP tiveram uma sobrevida global significativamente menor quando comparada àqueles com alta CtIP.

O CM possui alta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica. Com o desenvolvimento de técnicas genômicas, foram descritos os subtipos moleculares de CM, que são: Luminal A, Luminal B, superexpressão de HER2, basal-like e triplo-negativo (tabela 1) (VUONG et al., 2014).

Os luminais são assim chamados pela similaridade que as células neoplásicas desses grupos possuem com as células mamárias normais, sendo que estas ficam

em contato direto com o lúmen dos ductos mamários (SOTIRIOU et al., 2003). Esses tumores com características histológicas e clínicas semelhantes podem apresentar diferença no prognóstico e na resposta terapêutica (CIANFROCCA; GRADISHAR, 2009). O subtipo luminal A (60% dos casos) possui um melhor prognóstico quando comparado com os outros subtipos (CIRQUEIRA et al., 2011).

**Tabela 1 -** Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunoistoquímica dos tumores de mama.HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona.

| Subtipo molecular | Classificação |
|---|---|
| **Luminal A** | RE+ e/ou RP+, HER2- |
| **Luminal B** | RE+ e/ou RP+, HER2-<br>RE+ e/ou RP+, HER2+ (luminal HER2) |
| **Superexpressão de HER2** | RE-, RP- e HER2+ |
| **Triplo-negativo (TNBC)** | RE-, RP-, HER2- |

Fonte: CIRQUEIRA et al., 2011.

A célula MCF-7, luminal A, é uma linhagem de CM que foi isolada em 1970 de uma mulher caucasiana de 69 anos de idade (SOULE et al., 1973). O termo MCF-7 é o acrônimo de *Michigan Cancer Foundation-7*, referindo-se ao instituto em Detroit, onde a linhagem foi criada em 1973 por Herbert Soule e colaboradores.

As células MCF-7 são de interesse porque mantêm uma série de características semelhantes ao epitélio mamário. A linhagem celular possui uma morfologia do tipo epitelial e as monocamadas formam estruturas de cúpula devido ao acúmulo de fluido entre o prato de cultura e a monocamada celular. É um dos poucos cânceres de mama que expressam o receptor alfa de estrogênio (ER-α) (BROOKS; LOCKE; SOULE, 1973; HORWITZ; COSTLOW; MCGUIRE, 1975). As células também expressam receptores de andrógenos, progesterona e glicocorticóides, tornando-os ferramentas valiosas na pesquisa médica. O tratamento de MCF-7 com estrogênios demonstrou ter um efeito anti-apoptótico (HUANG et al., 1997; PERILLO et al., 2000) enquanto o tratamento com drogas quimioterápicas anti-estrogênio (por exemplo, tamoxifeno)

pode reduzir o crescimento de culturas inibindo a proliferação e induzindo a apoptose(KALLIO et al., 2005; ZHENG; KALLIO; HÄRKÖNEN, 2007).

As linhagens MCF-7, T-47D e MDA-MB-231, outras duas linhagens de células de CM, representam a maior parte dos estudos sobre linhagens de CM. Até o ano de 2015, foram publicados cerca de 25.000 relatórios sobre esta linha celular, rivalizados apenas pelas quase 80000 publicações que utilizavam a linha celular HeLa. A popularidade das linhas de células MCF-7 para a pesquisa do CM reflete sua fidelidade a muitos aspectos do CM no ambiente clínico, particularmente no manejo de mulheres na pós-menopausa com CM positivo para receptores hormonais (LEE; OESTERREICH; DAVIDSON, 2015).

A escolha da terapia é determinada por achados biológicos do tumor, embora a diversidade genética dos pacientes e fatores associados ao tumor determinam uma variabilidade específica na resposta ao tratamento (ARGALÁCSOVÁ et al., 2015).

No tratamento locorregional do CM, a cirurgia e a radioterapia são os mais utilizados, enquanto que para o tratamento sistêmico utilizam-se quimioterapia, a hormonioterapia e a imunoterapia, sendo a quimioterapia a principal (ALLEMANI et al., 2015; SILVA; RIUL, 2011). Embora tenham sua eficácia comprovada, a resistência terapêutica é um dos principais obstáculo para o êxito no combate à essas células cancerosas (JAHANI et al., 2017). Esses tratamentos possuem como objetivo destruir as células tumorais, ou reduzir o seu tamanho para posterior remoção cirúrgica. Em circunstâncias ideais, as células cancerígenas seriam eliminadas sem danos aos tecidos normais. No entanto, nenhum agente disponível hoje é completamente desprovido de toxicidade (BADAWOUD et al., 2017).

Tanto células normais quanto as tumorais necessitam de aminoácidos (AA) para a produção de proteínas. Dentre estes, existem os essenciais, semi-essenciais e não essenciais. A L-arginina (L-ARG), que é o ácido (L)-2-amino-5-guanidinovalérico, se enquadra no grupo dos semi-essenciais (SOARES; CÂMARA, 1993) (figura 4).

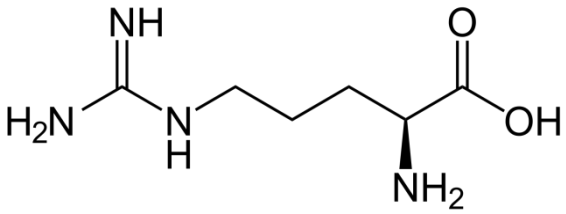


**Figura 4 -** Estrutura molecular da L-arginina.

Nas células, a L-ARG é precursora de nitritos, nitratos, óxido nítrico (NO), poliaminas, ornitina e citrulina. O NO é produzido pela reação com o oxigênio, catalisada pela NO sintase, como demonstrado na figura 5.

A L-ARG é predominantemente encontrada em sítios ativos de muitas proteínas. Sua estrutura é favorável à ligação do ânion fosfato e, portanto, catalisa reações de fosforilação (FUHRMANN et al., 2009). É um aminoácido produzido no organismo, entretanto em quantidades abaixo do necessário, pois todas as células utilizam arginina no citoplasma e na biossíntese proteica nuclear. Além de utilizado no ciclo da ureia, a arginina é utilizada na síntese de creatina e fornece ornitina para a síntese de poliaminas (HEYLAND et al., 2001; WAITZBERG, 2009).

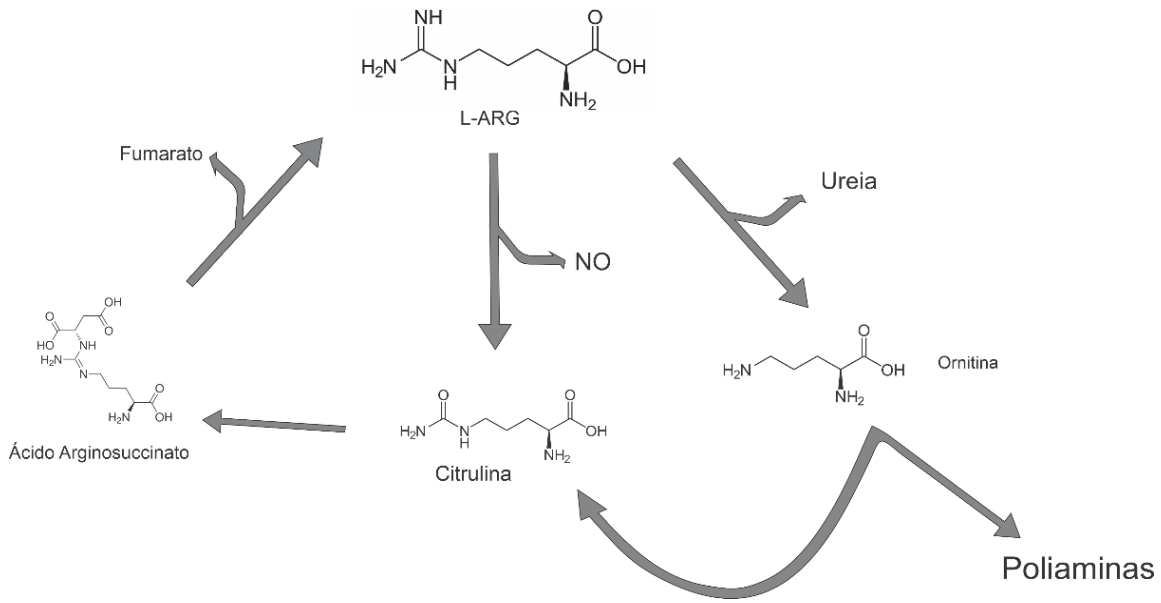


**Figura 5 -** L-arginina como precursor de várias moléculas no organismo.

A L-ARG pode ser encontrada no chocolate, germe de trigo, granola, derivados do leite (queijo cottage, ricota, iogurte), castanhas (coco, nozes, amêndoas,

amendoim), sementes (abóbora, girassol), carnes (frango, boi, porco e peru), frutos do mar (lagosta, salmão, camarão, atum) e soja cozida(BARBUL et al., 1990).

Revisões publicadas na década de 2000 já nos diziam que a dieta no Ocidente continha, aproximadamente, 5g/dia de L-ARG. Essa quantidade provinha principalmente da carne vermelha, do peixe, aves domésticas e também da síntese endógena a partir da L-citrulina (NOVAES; DE MELO PANTALEÃO, 2012).

SEIFTER et al., 1978, demonstraram que o conteúdo de 0,3 a 0,6 % de L-arginina, com relação ao volume final, encontrado na maioria das soluções de aminoácidos pode não ser suficiente para exercer efeito terapêutico em condições especiais, tais como câncer, trauma e sepse. Dados obtidos em experimentos com ratos sugerem que ao menos 1% de L-arginina do valor calórico total é requerido para exercer efeito farmacológico em animais com câncer(BARBUL et al., 1983; DE LUIS et al., 2003; SANGIOVANNI, 2002).

A L-ARG é um biomarcador para certos tumores auxotróficos, uma vez que estes tumores requerem arginina como um componente único para o crescimento. O melanoma e o carcinoma hepatocelular não expressam a enzima argininosuccinato sintase (ASS) e, portanto, são incapazes de sintetizar arginina (ENSOR et al., 2002). As células tumorais necessitam de mais arginina para gerar NO, promovendo, assim, a angiogênese tumoral (MORBIDELLI; DONNINI; ZICHE, 2004; WHEATLEY, 2004).

Em alguns modelos experimentais de tumores de mama a L-ARG aumenta o período de latência e a taxa de sobrevivência; reduz o tamanho e a incidência do tumor; encurta o tempo de regressão do tumor e inibe o crescimento do tumor em comparação com outras interferências alimentares ou sem suplementação dietética (REYNOLDS et al., 1990). A suplementação dietética com L-ARG em pacientes com CM aumenta significativamente as defesas do hospedeiro (BRITTENDEN et al., 1994) e, portanto, pode ter um papel terapêutico benéfico.

Num estudo de coorte, a suplementação de L-arginina por via enteral em pacientes portadores de trauma operatório, câncer ou queimados aumentou a ativação dos linfócitos-T e melhorou a imunidade celular. *In vitro*, o AMP-cíclico dibutil e a L-arginina inibem o crescimento de tumores mamários, sugerindo que esses

componentes têm um potencial terapêutico para o tratamento do CM em humanos (CHO-CHUNG et al., 1980).

Além disso, dados clínicos mostram que a suplementação enteral de L-arginina também pode estar associada à diminuição do tempo de hospitalização de pacientes, no pós- operatório de intervenções cirúrgicas de grande porte por câncer (HEYS et al., 1998).

Estudos com a L-ARG e 5-fluorouracil (5-FU) demonstraram que houve aumento do efeito anticancerígeno do 5-FU nas linhagens celulares BT-20 e MCF-7. Em ambas as linhagens, a combinação de L-ARG com 5-FU resultou na redução de viabilidade, aumento de apoptose e produção de NO (JAHANI et al., 2017)

A suplementação de L-ARG na terapia nutricional tem propiciado o aumento da imunidade nos portadores de câncer através de diversos mecanismos, tais como: liberação do hormônio de crescimento, estímulo na produção do óxido nítrico, hidroxiprolina, citocinas e poliaminas. A elucidação dos mecanismos regulatórios do metabolismo desse aminoácido em tecidos tumorais é de fundamental importância para a avaliação de elementos terapêuticos que efetivamente previnam a tumorigênese (NOVAES; BEAL, 2004).

Desta forma, a investigação dos efeitos causados pelo tratamento de células tumorais MCF-7 com L-ARG constitui-se de fundamental importância para elucidar seus efeitos sobre a viabilidade celular e seu sistema antioxidante.

# 2. Objetivos

## 2.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos do tratamento com L-arginina na linhagem tumoral MCF-7 e as modificações na expressão de enzimas antioxidantes.

## 2.2 Objetivos específicos

- Quantificar um parâmetro antioxidante, pela expressão de Catalase e, pela expressão de gp91phox após tratamento com L-ARG.
- Quantificar a expressão proteica de CtIP após tratamento com L-ARG.
- Verificar a participação do tratamento com L-ARG sobre a viabilidade celular.

# 3. Material e Métodos

## 3.1 Material para cultura de células

Meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM 1x + GlutaMAX$^{TM}$) e DMEM, high glucose, no glutamine, no phenol red (Gibco, Estados Unidos da América), penicilina, estreptomicina, anfotericina B e L-arginina foram preparados por Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Alemanha). Soro Fetal Bovino (SFB) e tripsina 0,25% (1X) em HBSS, sem cálcio, sem magnésio, sem bicarbonato de sódio foram adquiridos da LGC Biotecnologia (Parque Industrial San José, Cotia, SP, Brasil),.

## 3.2 Cultura de células

A linhagem MCF-7 (luminal A) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram incubadas a 37°C em uma incubadora umidificada sob uma atmosfera de 95% de ar e 5% de $CO_2$. A linhagem foi tratada com as seguintes concentrações de L-ARG: 800µg/mL, 1600µg/mL e 3200µg/mL por um período de 48h.

Após o descongelamento e posterior retirada da solução de congelamento, as células foram transferidas para frascos de cultura com área de 25cm$^2$ contendo meio de cultura DMEM com *phenol red* suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina e estreptomicina, e 0,5% de anfotericina B.

As células arranjadas em monocamada foram submetidas a uma dissociação enzimática com uma solução de tripsina 0,25%. Após a neutralização da atividade desta enzima utilizando volume equivalente do mesmo meio de cultura, o pool de células foi transferido para novas garrafas.

## 3.3 Contagem das células

Para determinar o número de células obtidas durante a cultura, foi realizada a contagem utilizando a câmara de Neubauer. Das células em suspensão foram transferidas com esterilidade 0,1 mL para um pequeno tubo de ensaio e adicionado 0,3mL de corante azul de tripan (0,2%) ao tubo, obtendo assim uma diluição ¼. Desse total foi retirado 0,4mL e adicionado à câmara de Neubauer. As células sedimentaram por 2min e a contagem foi feita nos 4 quadrantes e calculada a média. Como a

suspensão foi inicialmente diluída a ¼, o número de células contadas será igual à média multiplicada pelo fator de diluição, no caso, 4. O número de células/mL foi obtido utilizando a seguinte equação:

$$NC = \frac{Nt}{Nq}\ X\ FD\ X\ 10^4$$, sendo:

**NC:** número de células /mL

**Nt:** número total de células contados (média)

**Nq:** número de quadrantes;

**FD:** fator de diluição;

### 3.4 Proliferação e viabilidade celular

O ensaio AlamarBlue® (alamarBlue™ Cell Viability Assay Reagent, ThermoFischer) foi utilizado para medir a proliferação celular e avaliar a viabilidade da linhagem MCF-7 tratada com L-ARG. O teste foi realizado em placas de 96 poços (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ). Do total de 96 poços, foi utiliza um total de 10 poços pois testes prévios demonstraram maior eficácia durante a análise. Os demais poços sem células continham apenas o preparado com meio de cultura e AlamarBlue, esses foram utilizados para descontar o background (fluorescência natural do meio e AlamarBlue). Cada um dos dez poços continham 200.000 células a serem testadas com meio de cultura. O total de 200µl de solução AlamarBlue foram adicionados ao preparado com meio de cultura DMEM sem *phenol red* e distribuído nos poços (184µl) de acordo com a distribuição mostrada na figura 6. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de $CO_2$ por um período de duas horas para cada leitura. A fluorescência do processo de redução da resazurina em resorufina foi medida usando o Leitor Multidetecção Híbrido Synergy H1(Biotek®) com os comprimentos de onda de excitação/emissão definidos em 531/560 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de atividade (%AE). Experimentos e análises envolvendo análise de proliferação e viabilidade e celular foram realizados no Laboratório de análises Biomoleculares (LABIOM) da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, Brasil (http://labiom.ufes.br).

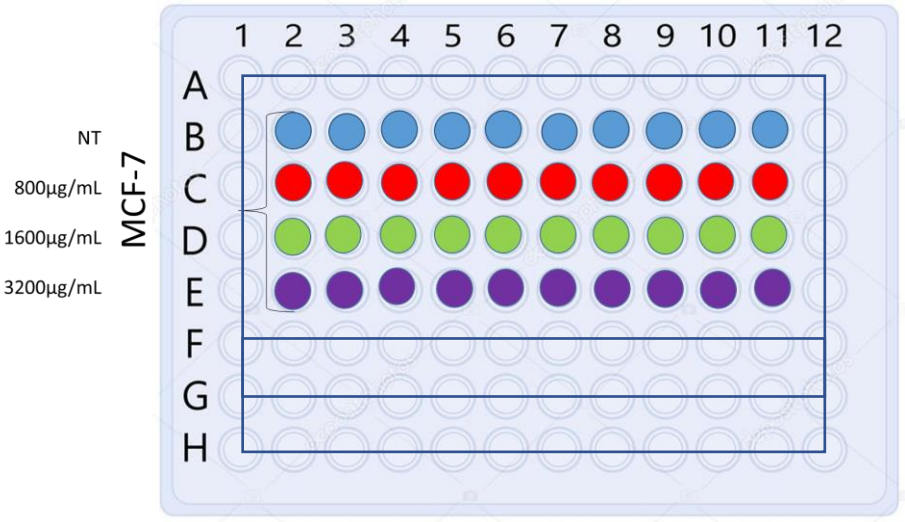


**Figura 6 -** Distribuição dos grupos por tratamento na placa de 96 poços. NT= não tratado. Os poços sobrepostos pela linha azul foram preenchidos apenas com meio, AlamarBlue e L-ARG.

## 3.1 Estudo de expressão proteica

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência do tratamento com L-arginina em células MCF-7 sobre a expressão proteica da subunidade gp91phox, catalase, CtIP nos grupos NT, 800 µg/mL, 1600 µg/mL e 3200 µg/mL.

### 3.1.1 Preparação dos tecidos e quantificação de proteínas

As amostras foram preparadas utilizando células tratadas de todos os grupos. Os pellets de células foram mantidos a -80°C até o momento da extração proteica, que foi realizada em 4000 µL de tampão de lise (10mM Tris – HCl pH 7,4, 1mM NaVO3, 1% SDS, 0,5mM DTT, 5mM EDTA, 1mM PMSF), ao qual se adicionou 10µg/mL coquetel inibidor de proteases. A homogeneização foi realizada com auxílio de sonicador ultrassônico, sendo seguida de centrifugação a 6000 rpm, 4°C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, aliquotados e armazenados a -80 °C. Este extrato total foi utilizado para avaliação da expressão da subunidade gp91phox, catalase, CtIP e Laminina.

A determinação do conteúdo de proteína total das células MCF7 foi feita utilizando-se o método de Lowry (Lowry, 1951). Preparou-se o reagente A (48:1:1 – carbonato de sódio 3% com 0,1 M de NaOH, tartarato de sódio/potássio 4% e sulfato de cobre 2%, respectivamente) e o reagente B (reagente de Folin-fenol Ciocalteu – 1:3 em água). A solução padrão foi obtida a partir de diluições de albumina bovina (BSA) em água destilada com concentração estoque final de 1mg/mL. Essa solução foi diluída para a obtenção da curva padrão, em que as diluições continham 15µg de proteína. Alíquotas dos sobrenadantes dos homogenatos de células (5 µL) foram utilizadas para as dosagens. Todos os tubos de ensaio foram completados para um volume final de 250 µL, sendo posteriormente adicionados 2,5 mL da solução A. Após 10 minutos, se adicionou 0,25 mL da solução B. A absorbância foi medida a 660nm depois de 10 minutos. Todas as dosagens foram feitas em triplicata.

Posteriormente, foi calculado o volume necessário para uma carga de 50 µg de proteína, sendo este volume de amostra misturada, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizados foram diluídas em solução de Laemmli 2X (0,5 mM de ureia, 0,17mM de SDS, 39µM de ditiodiol, 0,01 M de Tris e azul de bromofenol 0,5%). As amostras depois de preparadas eram aquecidas a $95^0$C durante 4 minutos.

### 3.1.2 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 10% para gp91phox, catalase, CtIP e Laminina (1,5 M Tris Hcl pH: 8.8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em um tampão para eletroforese (25mM de Tris HCl, 190mM de glicina e 0,1% de SDS). Antes da sua aplicação no gel as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 5 min. A eletroforese foi conduzida com o tampão (25mM de tris-HCl pH 8,3, 192mM de glicina e 0,1% de SDS), a 80 volts por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (PowerPacTM HC, BioRad, Singapura).

### 3.1.3 Transferência das proteínas

Depois de separadas, as proteínas das amostras para avaliar a expressão da gp91phox, catalase, CtIP e Laminina foram transferidas para uma membrana de PVDF utilizando uma cuba molhada (BioRad), por 2:00hs, 60 volts a 4°C, com tampão de transferência constituído de 25mM de tris-HCl pH 8,3, 192mM de glicina e 20% (v/v) de metanol.

### 3.1.4 Incubação dos anticorpos

Após a transferência, as membranas de PVDF foram incubadas por 2:30 horas em uma solução constituída de leite em pó desnatado (5%) em tampão TBS-tween 0,1% (20mM de tris-HCl pH 7,4 e 150 mM de NaCl), à temperatura ambiente sob agitação leve, para evitar ligações inespecíficas com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas por 4 horas a temperatura ambiente, sob agitação, em TBS-T adicionado mais os seguintes anticorpos primários: gp91phox, catalase, CtIP (1: 1000, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) e para Laminina (1:1500, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Após este período, as membranas foram lavadas em tampão TBS-tween 0,1%, sob agitação leve em temperatura ambiente e incubadas com o anticorpo secundário (IgG, anti-mouse conjugado para fosfatase alcalina - 1:3000, Abcam Inc.) por 1:30 hora, à temperatura ambiente, sob agitação suave, seguida de lavagem com tampão TBS-tween 0,1%, e posteriormente com tampão TBS.

Os imunocomplexos foram detectados por reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5min a um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham$^{TM}$, GE Healthcare, UK). As membranas, então, foram expostas a autorradiografia (Medical Film, Konica Minolta Medical Imaging, Wayne, EUA/Hyperfilm, Amersham$^{TM}$, UK), sendo as bandas impregnadas e posteriormente reveladas. O programa ImageJ foi utilizado para quantificação da área e da densidade das bandas.

### 3.2 Análise estatística

Para a expressão de proteínas, os dados foram expressos como a razão entre as densidades de imunotransferência correspondente à proteína de interesse e Laminina. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism® 8.0.2* (Prism versão 8.0.2 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA). A significância estatística de todos os dados experimentais foi determinada usando a análise de variância de uma via (ANOVA) e também o teste de Bonferroni. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Cada ponto ou coluna representa a média ± EPM. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

## 4. Resultados

### 4.1 A expressão da enzima gp91phox.

Em nosso estudo, observamos que houve aumento significativo na quantidade de gp91phox após o tratamento com 1600 µg/mL e 3200 µg/mL de L-ARG quando comparados a NT e 800µg/mL (1600 µg/mL:0,905±0,057 e 3200 µg/mL: 1,10±0,062 CtIP/Laminina, respectivamente, vs. NT: 1,22±0,083 CtIP/Laminina e 800µg/mL: 0,609±0,083 )(figura 7).

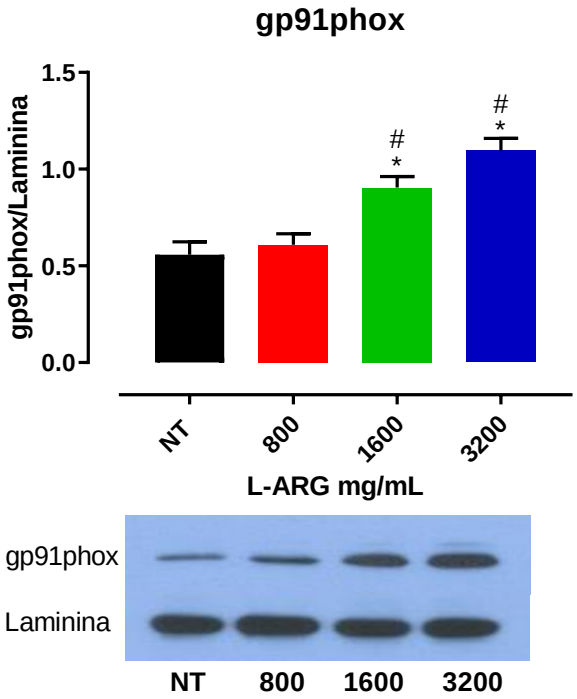


**Figura 7 -** A expressão de gp91phox e redução catalase (CAT). O tratamento com a L-ARG aumentou a quantidade da subunidade gp91phox. Valores expressos em média ± EPM entre a densidade das bandas de catalase e gp91phox. * p< 0,05 em relação ao grupo NT; # p<0,05 e em relação ao grupo 800 µg/mL.

### 4.2 A expressão da enzima CAT.

Nossos resultados demonstraram que após tratamento com L-ARG houve redução significativa a expressão de CAT nas células MCF-7 quando comparadas com o grupo NT (800µg/mL:0,838±0,051, 1600µg/mL:0,833±0,067 e 3200µg/mL:0,715±0,052 CtIP/Laminina, respectivamente, vs. NT:1,22±0,034 CtIP/Laminina) (figura 8).

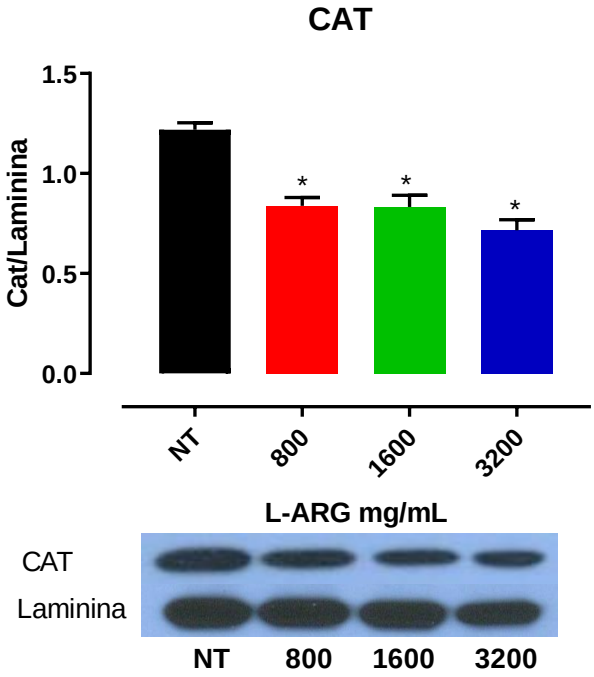


**Figura 8 -** A expressão de CAT foi reduzida em todos os grupos (800-1600-3200 µg/mL). Valores expressos em média ± EPM entre a densidade das bandas de catalase e gp91phox. * p< 0,05 em relação ao grupo NT; # p< 0,05 em relação ao grupo 800 µg/mL.

### 4.3 A expressão de CtIP.

Nossos resultados mostraram que em células MCF-7 a expressão da proteína CtIP foi aumentada após os tratamentos com L-ARG quando comparados ao NT (800 µg/mL: 0,663±0,059; 1600 µg/mL: 0.767±0,034; 3200 µg/mL: 0,904±0,023 CtIP/Laminina, respectivamente, vs. NT: 0,468±0,034 CtIP/Laminina). Foi observado também diferença significativa entre a dose 800µg/mL e 3200µg/mL (figura 9).

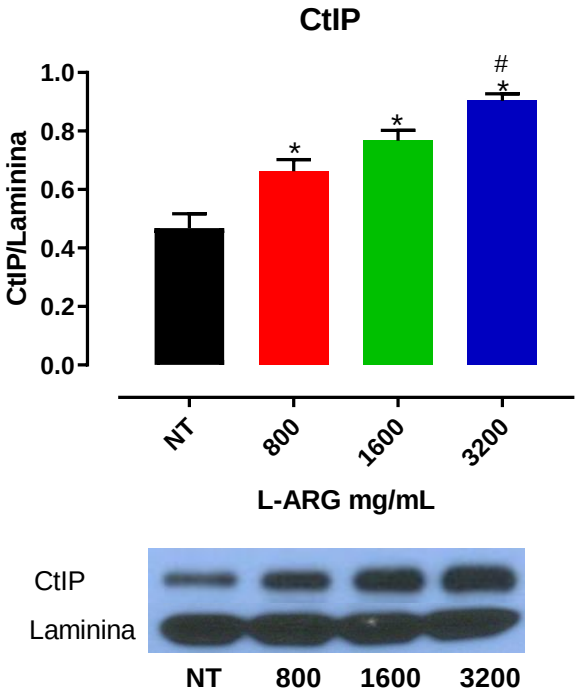


**Figura 9 -** A expressão de CtIP após tratamento com L-ARG. Valores expressos em média ± EPM entre a densidade das bandas de CtIP. * p< .05 em relação ao grupo NT; # p< .05 em relação ao grupo 800 µg/mL.

### 4.4 Viabilidade e a capacidade proliferativa das células MCF-7.

Para avaliar os efeitos da exposição à L-arginina ao longo do tempo, foi utilizado o teste de viabilidade AlamarBlue com exposição as diferentes concentrações por um período de doze dias. A leitura da viabilidade foi realizada a cada dois dias.

Nossos resultados mostraram uma influência dependente do tempo e da dose na viabilidade celular (figura 10). Nesse sentido, o efeito sobre a viabilidade celular de MCF-7 foi significativamente menor quando tratadas com 3200 µg/mL (0,455±0,03) de L-ARG quando comparado com o grupo NT (0,762±0,099).

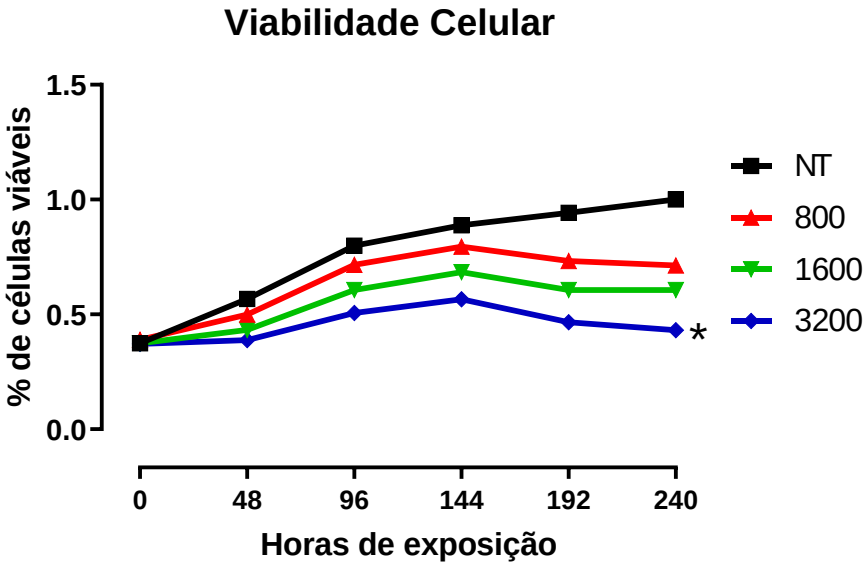


**Figura 10 -** Efeitos da L-arginina sobre a viabilidade de MCF-7. Após o tratamento contínuo com as diferentes concentrações de L-ARG, houve redução da viabilidade. NT: não tratado, * p< 0,05 em relação ao grupo NT.

## 5. Discussão

Apesar de notórios avanços em pesquisas oncológicas, prognósticos, diagnósticos e tratamentos do CM, no último século, as taxas de mortalidade no Brasil e no mundo continuam elevadas. Atenta-se quanto à possibilidade dessas altas taxas se darem pela doença ser, em sua maioria, diagnosticada em estágios avançados e mecanismos ainda não muito bem elucidados sobre seu aparecimento, diagnóstico e tratamento. Assim, compreendendo o grande impacto na qualidade de vida do indivíduo diagnosticado com CM, faz-se necessário um melhor entendimento dos diferentes mecanismos envolvidos com o câncer, de modo a prover novos achados sobre a patogênese e, consequentemente do diagnóstico e prognóstico, possibilitando uma aplicabilidade terapêutica mais eficaz e resolutiva.

Desta forma, os principais achados desse estudo foram: a expressão da enzima CAT foi reduzida pelo tratamento com L-ARG em todas as concentrações estipuladas (I); a expressão de gp91phox foi aumentada (II); o tratamento com L-ARG foi capaz de aumentar a expressão de CtIP (III) e reduzir a viabilidade das células (IV).

Em células normais, a homeostase de EROs é necessária para a transdução de sinais, ativação enzimática, expressão gênica, formação das ligações dissulfeto durante o dobramento de novas proteínas no retículo endoplasmático, e o controle da atividade da caspase que é ativada durante o mecanismo apoptótico. Porém, células tumorais, que exibem elevado metabolismo, exigem altas concentrações de EROs para manter sua alta taxa de proliferação (SOSA et al., 2013).

As EROs, e consequentemente, o estresse oxidativo, interagem durante os três estágios do processo de carcinogênese. Na iniciação podem estar envolvidos no desenvolvimento de mutações genéticas e estruturais no DNA. Na promoção, contribuem para expressão gênica anormal, bloqueando a comunicação entre as células, aumentando assim a proliferação e diminuição da apoptose como mecanismo de proteção e eliminação de células com mutação gênica. E no estágio de progressão, adicionando a essas células alterações continuas no processo de reparo em seu DNA(KLAUNIG JE, XU Y, ISENBERG JS, BACHOWSKI S, KOLAJA KL, JIANG J, STEVENSON DE, 1998).

A catalase é uma enzima antioxidante que transforma o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (LOEW, 1900). Além de sua atividade clássica, a catalase pode decompor o peroxinitrito (GEBICKA; DIDIK, 2009; KONO et al., 1998), oxidar o óxido nítrico em dióxido de nitrogênio (BRUNELLI; YERMILOV; BECKMAN, 2001) e exibir peroxidase (JOHANSSON; HÅKAN BORG, 1988), além de atividade da oxidase (VETRANO et al., 2005).

As células tumorais expressam atividade antioxidante aumentada para remover as EROs excessivas, mantendo a sinalização pró-tumorigênica. Porém, se os níveis de EROs aumentam drasticamente para concentrações tóxicas de EROs, por exemplo, por agentes indutores de EROs, como quimioterapia, o estresse oxidativo resulta em danos irreparáveis à célula, adaptações inadequadas e, eventualmente, morte de células tumorais(MOLONEY; COTTER, 2018).

No processo apoptótico, o dano inicial induzido pelo estresse oxidativo não mata as células diretamente, mas desencadeia um programa de sinalização apoptótica que leva à morte celular (GABAI et al., 1998). A apoptose pode ser iniciada por uma variedade de estímulos, incluindo hipertermia, retirada do fator de crescimento ou hormônio, glicocorticóides, oxidantes, radiação ionizante e múltiplas

classes de agentes quimioterápicos (HOCKENBERY et al., 1993). Após iniciado o processo apoptótico, as células sustentam a peroxidação lipídica progressiva. Assim, EROs e dano oxidativo têm sido implicados na indução de apoptose (TAMARIT; CABISCOL; ROS, 1998).

Em células MCF-7 os níveis de CAT, que é parte fundamental no combate ao estresse oxidativo, são reduzidos (GLORIEUX et al., 2014, 2016), estando correlacionados com uma alta concentração de $H_2O_2$ no plasma celular que, em células cancerígenas, está envolvida na ativação de vias de sinalização para induzir proliferação, migração e invasão (SEN; KAWAHARA; CHAUDHURI, 2012; WU; YOTNDA, 2011; WU, 2006). Entretanto, em níveis muito elevados, EROs causam danos excessivos ao DNA nuclear, ao DNA mitocondrial, proteínas e lipídios, levando a danos irreversíveis nas organelas (LU; OGASAWARA; HUANG, 2007).

Esse aumento desproporcional das EROs pode ser alcançado com quimioterapia, geração elevada de EROs por células imunes ou por depleção de proteínas antioxidantes nas células (LIOU; STORZ, 2010). O que é demonstrado por nossos resultados com o aumento na expressão de gp91phox, uma das maiores fontes de EROs endógenas. Esse quadro pode estar relacionado à redução da viabilidade celular encontrada em nas células MCF-7 após a exposição à L-ARG.

Como já descrito a L-ARG é o precursor de moléculas importantes como o NO (WU et al., 2009). Para as células tumorais, a demanda por L-ARG é maior, pois é necessária para gerar óxido nítrico, promovendo assim a angiogênese tumoral (MORBIDELLI; DONNINI; ZICHE, 2004; WHEATLEY et al., 2000), que leva à redução sérica e dependência da L-ARG.

O NO, um transdutor de sinal e mensageiro celular na homeostase e na defesa do hospedeiro, é um dos importantes derivados da L-ARG. Juntamente com o $H_2O_2$, contribui para o estresse oxidativo, pois as reações com radicais livres o produzem peroxinitrito ($ONOO^-$), que causa diretamente necrose celular (BECKMAN; KOPPENOL, 1996) e sua principal propriedade em altas concentrações é a citotoxicidade resultante da condensação dos grupos tiol e/ou amino, dano ao DNA, parada do ciclo celular e respiração via proteína p53 (GUIX et al., 2005).

Estudo realizado por Vissers et. al (2005) demonstrou que em pacientes com CM, cólon e pâncreas, as concentrações plasmáticas de L-ARG foram menores do que nos controles pareados por idade e sexo. A concentração relatada de L-ARG plasmática nos cânceres de mama e cólon foi de 80±3μM/L, no câncer de pâncreas 76±5μM/L, e no câncer de esôfago 41,9±13,4μM/L, em comparação com um nível normal de 90-150μM/L. Esse mesmo estudo mostrou que as concentrações plasmáticas de ornitina, um derivado da L-ARG, são maiores em pacientes com CM (52±2). Nas células MCF-7 tratadas com estradiol, genes associados ao metabolismo anabólico da serina e metionina e os genes associados ao metabolismo catabólico da tirosina, fenilalanina e arginina foram aumentados (WANG et al., 2020).

A superexpressão da indoleamina-2,3-dioxigenase e arginase esgota o triptofano e a arginina, respectivamente, dentro do microambiente tumoral. O nível reduzido de triptofano e arginina suprime a proliferação de células T citotóxicas no tumor (BOROUGHS; DEBERARDINIS, 2015; OMAR; TOLBA; SABER-AYAD, 2014), o que nos faz entender o efeito benéfico da L-ARG como terapêutica complementar.

O gene RBBP8, conhecido por codificar a endonuclease CtIP (YU; BAER, 2000), tem sido proposto como um novo gene de suscetibilidade ao câncer (CHINNADURAI, 2006) cuja perda funcional aumenta a sensibilidade à inibição da PARP1 (GAYMES et al., 2013; LIN et al., 2014) semelhante à inativação do BRCA1, como, por exemplo, recentemente demonstrado em um modelo de xenoenxerto de camundongo de CM (WANG et al., 2016). Possui importante papel na detecção, sinalização e reparo de danos no DNA (WONG et al., 1998). Pode desempenhar papel importante na restauração da quebra da fita dupla de DNA (HOA et al., 2015; MAKHARASHVILI et al., 2014; SARTORI et al., 2007), assim como importante papel no processo de reparo do DNA, sendo que, quando sua expressão está comprometida pode ocasionar instabilidade genômica (BENNARDO et al., 2008; GU; CHEN, 2009). Mecanicamente, o RBBP8 codifica uma proteína localizada nuclearmente que é conservada entre os vertebrados, interage com supressores de tumores como BRCA1 e os membros da família pRb através de locais de ligação que são frequentemente mutados em cânceres humanos (CHINNADURAI, 2006). O CM dispõe de uma ligação forte com a RBBP8/CtIP, no entanto alguns estudos tem demonstrado uma interação depende de BRCA1, assim como outros estudos começam a apontar para esse gene

como importante ferramenta isolada no reparo do DNA (EID et al., 2010; WONG et al., 1998).

Alguns tumores apresentam os níveis de proteína CtIP/RBBP8 aumentados, porém a sugestão é que sua contribuição para o desenvolvimento do câncer se deve principalmente à sua perda. A proteína CtIP/RBBP8 e a expressão de mRNA são rigidamente controladas em muitos níveis diferentes, incluindo transcrição de genes e degradação de proteínas durante o ciclo celular(SORIA-BRETONES et al., 2013)

O baixo nível de expressão de CtIP/RBBP8 está associado a um mau prognóstico no CM. De acordo com Minhao Wu e colaboradores (2008), em células MCF-7 resistentes ao tamoxifeno, a expressão de CtIP é reduzida. No mesmo estudo foi demonstrado que as células tumorais RE- não expressam CtIP e que a reexpressão dessa proteína torna as células tumorais sensíveis aos efeitos do tamoxifeno. Essa baixa de CtIP foi associada também com características moleculares da célula como: mutação em p53, o subtipo molecular (RP-); além do tamanho tumoral, acometimento de linfonodo e uma diminuição estatisticamente significativa da expressão de CtIP em associação com carcinomas metastáticos da mama.

Estudos realizados por Mijnes et al., (2018) demonstraram que 39 genes de reparo do DNA apresentaram hipermetilação em cânceres humanos. O mais frequentemente metilado (37%) foi o câncer de bexiga primário. Nesse câncer, a hipermetilação do RBBP8 previu maior sobrevida global, mas não em linhagens celulares de câncer de entidades de outra origem, como a mama. A metilação do RBBP8 foi inversamente correlacionada com o mRNA do RBBP8 e a expressão da proteína nuclear, enquanto o RBBP8 foi reexpresso após desmetilação in vitro, demonstrando o controle epigenético da expressão gênica. Esse mesmo estudo, mostrou que em células MCF-7 não houve metilação da região promotora, o que pode favorecer o aumento da expressão por fatores externos, como o nosso tratamento com L-ARG.

Um estudo retrospectivo das relações entre os níveis de expressão de CtIP/ RBBP8, prognóstico e recidiva do câncer usando biópsias de CM embebidas em parafina de uma coorte de 384 pacientes sugere uma forte relação entre nenhuma ou baixa expressão de CtIP/RBBP8 e mau prognóstico do CM. O CtIP/RBBP8 é um marcador fraco para prever a resposta geral ao tratamento e o câncer e a sobrevida

livre de doença. Nos tumores luminais a diminuição, mas não a ausência, dos níveis de CtIP/RBBP8 se correlacionam com o aumento da sobrevida livre de doença quando tratados com uma combinação de terapias hormonais, de rádio e quimioterapia (SORIA-BRETONES et al., 2013).

Entretanto, cânceres de mama com baixos níveis de CtIP/RBBP8 apresentam resistência e pior resposta ao tratamento com tamoxifeno. Além disso, o status de expressão da proteína CtIP se correlaciona com a resposta clínica à terapia endócrina neoadjuvante, e pacientes com doença progressiva expressam proteína CtIP níveis significativamente mais baixos em seus carcinomas primários de mama do que aqueles que respondem (WU et al., 2008).

Estudos mostraram que o BRCA1 interage com a CtIP (LI et al., 1999; WONG et al., 1998; YARDEN; BRODY, 1999; YU et al., 1998). A CtIP interage com o repressor transcricional CtBP (proteína de ligação do terminal carboxil) e está intimamente associado na repressão da transcrição gênica (SCHAEPER et al., 1998). Um modelo proposto é que a fosforilação de BRCA1 e CtIP por ATM após danos no DNA resulta em um processo de regulação sobre o crescimento celular (LI et al., 2000).

Apesar de todos os resultados apoiarem o papel do BRCA1 na resposta ao estresse oxidativo, o mecanismo de detecção de EROs pelo BRCA1 ainda precisa ser determinado, inclusive a participação do CtIP nesse processo. Como o BRCA1 é extensivamente fosforilado em vários resíduos por várias cinases, incluindo ATM, ATR e AKT (NAROD; FOULKES, 2004; OUCHI, 2006; YOSHIDA; MIKI, 2004), é possível que essas múltiplas fosforilações possam ativar a função BRCA1 em resposta a EROs. Além disso, o estresse oxidativo desencadeia várias modificações pós-tradução de proteínas, como metilação, acetilação, nitrosilação, glutationilação e oxidação (JORGENSON; ZHONG; OBERLEY, 2013; MIKI; FUNATO, 2012; PAULSEN; CARROLL, 2013). Assim, é evidente que BRCA1 e sua associação com diferentes quinases seja ativado pelo estresse oxidativo e sua consequente atividade de supressão tumoral. Estudos futuros das modificações do BRCA1 pelo estresse oxidativo provavelmente ajudarão a uma melhor compreensão da função do BRCA1, principalmente sua relação com CtIP na resposta ao estresse oxidativo e na supressão de tumores.

Elevar os níveis de L-ARG induz alterações metabólicas globais, incluindo uma mudança da glicólise para a fosforilação oxidativa em células T ativadas e promove a geração de células do tipo memória central, dotadas de maior capacidade de sobrevivência e, em um modelo de camundongo, atividade antitumoral. Assim, as concentrações intracelulares de L-ARG afetam diretamente a aptidão metabólica e a capacidade de sobrevivência das células T, que são cruciais para as respostas antitumorais (GEIGER et al., 2016).

Yu Cao e colaboradores (2016) demonstraram que o tratamento com 1,5g/Kg de L-ARG durante 20 dias consecutivos inibiu o crescimento tumoral e prolongou o tempo de sobrevivência em camundongos com CM RE+. A frequência de células supressoras derivadas de mielóides (do inglês *myeloid-derived suppressor cells* - MDSCs) foi significativamente suprimida em camundongos tratados com L-Arg. Por outro lado, os números e a função dos macrófagos, células T CD4+ e células T CD8+ foram significativamente aumentados. Os níveis de IFN-γ, TNF-α, NO, bem como os níveis de iNOS, IFN-γ, mRNA da Granzyme B nos esplenócitos e blocos tumorais aumentaram significativamente, o que foi associado à melhora da resposta imune inata e adaptativa.

Nossos resultados sugerem que a suplementação com L-ARG pode representar uma terapia adjuvante eficaz a terapia do CM luminal A. Pois, aumentando a expressão de CtIP/RBBP8, que é proposto como um supressor tumoral (SORIA-BRETONES et al., 2013) com a L-ARG, inferimos que potencializaríamos os efeitos de fármacos inibidores de crescimento, reduzindo a viabilidade por EROs, além do reforço para superar a imunossupressão e alcançar melhores efeitos terapêuticos.

A L-ARG como terapêutica complementar aos tratamentos convencionais se provou eficaz, visto que as alterações na concentração de gp91phox, fonte de EROs, e no sistema antioxidante (CAT), além de restaurar os níveis de CtIP, configuram, numa visão holística, um quadro favorável à um bom prognóstico e sobrevida.

## 6. Conclusão

O tratamento com L-ARG em células tumorais MCF-7 reduziu a expressão da CAT, aumentou a gp91phox e CtIP. Na dose 3200µg/mL houve uma redução da viabilidade celular. Esses resultados podem contribuir para associação da L-ARG às terapias convencionais no tratamento do câncer de mama.

## 7. Referências

ADAMI, H. O.; HUNTER, D.; TRICHOPOULOS, D. **Textbook of Cancer Epidemiology**. [s.l.] Oxford University Press, 2008.

AL-DELAIMY, W. K. et al. A prospective study of smoking and risk of breast cancer in young adult women. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 13, n. 3, p. 398–404, mar. 2004.

AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 3983–3988, 1 abr. 2003.

ALLEMANI, C. et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: Analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). **The Lancet**, v. 385, n. 9972, p. 977–1010, 14 mar. 2015.

ANTOGNELLI, C. et al. CYP17, GSTP1, PON1 and GLO1 gene polymorphisms as risk factors for breast cancer: An Italian case-control study. **BMC Cancer**, 2009.

APOSTOLOU, P.; FOSTIRA, F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. **BioMed research international**, v. 2013, p. 747318, 2013.

ARGALÁCSOVÁ, S. et al. Contribution of ABCB1 and CYP2D6 genotypes to the outcome of tamoxifen adjuvant treatment in premenopausal women with breast cancer. **Physiological research**, v. 64 Suppl 4, p. S539-47, 2015.

BADAWOUD, M. H. et al. The possible protective effect of L-arginine against 5-fluorouracil-induced nephrotoxicity in male albino rats. **Via Medica**, v. 76, n. 4, p. 608–619, 2017.

BARBUL, A. et al. Wound healing and thymotropic effects of arginine: A pituitary mechanism of action. **American Journal of Clinical Nutrition**, 1983.

BARBUL, A. et al. **Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans**. Surgery. **Anais**...1990

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. **Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and the uglyAmerican Journal of Physiology - Cell Physiology**, nov. 1996.

BENNARDO, N. et al. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 6, jun. 2008.

BOLLATI, V. et al. Hedgehog signalling in breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 8, p. 1330–1335, 23 fev. 2009.

BOROUGHS, L. K.; DEBERARDINIS, R. J. **Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growthNature Cell Biology**Nature Publishing Group, , 30 abr. 2015.

BRAY, F. 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**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

BREWER, H. R. et al. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 165, n. 1, p. 193–200, 3 ago. 2017.

BRITTENDEN, J. et al. L-arginine stimulates host defenses in patients with breast cancer. **Surgery**, v. 115, n. 2, p. 205–212, fev. 1994.

BROOKS, S. C.; LOCKE, E. R.; SOULE, H. D. Estrogen receptor in a human cell line (MCF 7) from breast carcinoma. **Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 17, p. 6251–6253, 1973.

BRUNELLI, L.; YERMILOV, V.; BECKMAN, J. S. Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**, 2001.

CAI, H.; GRIENDLING, K. K.; HARRISON, D. G. **The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseasesTrends in Pharmacological Sciences**, set. 2003.

CANTOR, S. B. et al. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. **Cell**, v. 105, n. 1, p. 149–160, 6 abr. 2001.

CAO, Y. et al. L-Arginine supplementation inhibits the growth of breast cancer by enhancing innate and adaptive immune responses mediated by suppression of MDSCs in vivo. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 343, 1 dez. 2016.

CHINNADURAI, G. **CtIP, a candidate tumor susceptibility gene is a team player with luminariesBiochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, 2006.

CHO-CHUNG, Y. S. et al. Arrest of mammary tumor growth in vivo by L-arginine: stimulation of NAD-dependent activation of adenylate cyclase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 95, n. 3, p. 1306–13, 14 ago. 1980.

CIANFROCCA, M.; GRADISHAR, W. New Molecular Classifications of Breast Cancer. **CA: A**

**Cancer Journal for Clinicians**, v. 59, n. 5, p. 303–313, 2009.

CIRQUEIRA, M. B. et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Femina**, v. 39, p. 499–503, 2011.

DA FONTE DE AMORIM, L. M. et al. CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. **Cancer Letters**, 2002.

DA SILVA, M. M.; DA SILVA, V. H. Envelhecimento: importante fator de risco para o câncer. **Arquivos médicos do ABC**, v. 30, n. 1, 2005.

DALL, G. V.; BRITT, K. L. Estrogen effects on the mammary gland in early and late life and breast cancer risk. **Frontiers in Oncology**, v. 7, n. MAY, p. 110, 2017.

DE LUIS, D. A. et al. Effect of c-reactive protein and interleukins blood levels in postsurgery arginine-enhanced enteral nutrition in head and neck cancer patients. **European Journal of Clinical Nutrition**, 2003.

EID, W. et al. DNA end resection by CtIP and exonuclease 1 prevents genomic instability. **EMBO Reports**, 2010.

ENSOR, C. M. et al. Pegylated arginine deiminase (ADI-SS PEG20, 000 mw) inhibits human melanomas and hepatocellular carcinomas in vitro and in vivo. **Cancer research**, v. 62, n. 19, p. 5443–5450, 2002.

FUHRMANN, J. et al. McsB Is a Protein Arginine Kinase That Phosphorylates and Inhibits the Heat-Shock Regulator CtsR. **Science**, v. 324, n. 5932, p. 1323–1327, jun. 2009.

GABAI, V. L. et al. **Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: Implications in apoptosis and agingFEBS Letters**, 30 out. 1998.

GAYMES, T. J. et al. Microsatellite instability induced mutations in DNA repair genes CtIP and MRE11 confer hypersensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in myeloid malignancies. **Haematologica**, 2013.

GEBICKA, L.; DIDIK, J. Catalytic scavenging of peroxynitrite by catalase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 10, p. 1375–1379, out. 2009.

GEIGER, R. et al. L-Arginine Modulates T Cell Metabolism and Enhances Survival and Anti-tumor Activity. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 829- 842.e13, 20 out. 2016.

GLORIEUX, C. et al. Catalase expression in MCF-7 breast cancer cells is mainly controlled by PI3K/Akt/mTor signaling pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 87, p. 84–97, 2014.

GLORIEUX, C. et al. Chromatin remodeling regulates catalase expression during cancer cells adaptation to chronic oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, 2016.

GU, B.; CHEN, P.-L. Expression of PCNA-binding domain of CtIP, a motif required for CtIP localization at DNA replication foci, causes DNA damage and activation of DNA damage checkpoint. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 8, n. 9, p. 1409–20, 1 maio 2009.

GUIX, F. X. et al. **The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brainProgress in Neurobiology**, 2005.

HAMAJIMA, N. et al. Alcohol, tobacco and breast cancer – collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58 515 women with breast cancer and 95 067 women without the disease. **British Journal of Cancer**, v. 87, n. 11, p. 1234–1245, nov. 2002.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARTLERODE, A. J.; SCULLY, R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. **Biochemical Journal**, v. 423, n. 2, p. 157–168, out. 2009.

HEGDE, M. L.; IZUMI, T.; MITRA, S. Oxidized base damage and single-strand break repair in mammalian genomes: Role of disordered regions and posttranslational modifications in early enzymes. In: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l.] NIH Public Access, 2012. v. 110p. 123–153.

HEIKKINEN, K., RAPAKKO, K., KARPPINEN, S.M., ERKKO, H., KNUUTILA, S., LUND?AN, T., MANNERMAA, A., BØRRESEN-DALE, A.L., BORG, A., BARKARDOTTIR, R.B., PETRINI, J. & WINQVIST, R. RAD50 and NBS1 are breast cancer susceptibility genes associated with genomic instability. **Carcinogenesis**, v. 27, p. 1593–1599, 2006.

HEYLAND, D. K. et al. Should immunonutrition become routine in critically ill patients?: A systematic review of the evidence. **Jama**, v. 286, n. 8, p. 944–953, 2001.

HEYS, S. D. et al. Potentiation of the response to chemotherapy in patients with breast cancer by dietary supplementation with L-arginine: Results of a randomised controlled trial. **International Journal of Oncology**, v. 12, n. 1, p. 221–225, 1998.

HOA, N. N. et al. BRCA1 and CtIP are both required to recruit Dna2 at double-strand breaks in homologous recombination. **PLoS ONE**, 2015.

HOCKENBERY, D. M. et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 241–251, 22 out. 1993.

HORWITZ, K. B.; COSTLOW, M. E.; MCGUIRE, W. L. MCF-7: A human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. **Steroids**, v. 26, n. 6, p. 785–795, 1975.

HUANG, Y. et al. Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells. **Breast cancer research and treatment**, v. 42, n. 1, p. 73–81, jan. 1997.

INCA. **O que causa o câncer?** Disponível em: <https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-causa-cancer>. Acesso em: 25 fev. 2020.

INCA. **A situação do câncer de mama no Brasil : Síntese de dados dos sistemas**. Rio de Janeiro: INCA: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019a.

INCA, I. N. D. C. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: [s.n.]. v. 33

INCA, I. N. D. C. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: [s.n.].

JAHANI, M. et al. L-arginine alters the effect of 5-fluorouracil on breast cancer cells in favor of apoptosis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 88, p. 114–123, 2017.

JOHANSSON, L. H.; HÅKAN BORG, L. A. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. **Analytical Biochemistry**, 1988.

JORGENSON, T. C.; ZHONG, W.; OBERLEY, T. D. Redox imbalance and biochemical changes in cancer. **Cancer Research**, v. 73, n. 20, p. 6118–6123, 2013.

JUNG, S. et al. Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: In a pooled analysis of 20 studies. **International Journal of Epidemiology**, v. 45, n. 3, p. 916–928, 2016.

KALLIO, A. et al. Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. **Apoptosis : an international journal on programmed cell death**, v. 10, n. 6, p. 1395–410, dez. 2005.

KEY, T. J.; VERKASALO, P. K.; BANKS, E. **Epidemiology of breast cancerLancet Oncology**Elsevier, , 1 mar. 2001.

KLAUNIG JE, XU Y, ISENBERG JS, BACHOWSKI S, KOLAJA KL, JIANG J, STEVENSON DE, W. E. O papel do estresse oxidativo na carcinogénese química. **Environ Health Perspect**, v. 106(1), p. 289–295, 1998.

KONO, Y. et al. Catalase catalyzes of peroxynitrite-mediated phenolic nitration. **Bioscience,**

**biotechnology, and biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 448–52, mar. 1998.

KYU, H. H. et al. **Physical activity and risk of breast cancer, colon cancer, diabetes, ischemic heart disease, and ischemic stroke events: Systematic review and dose-response meta-analysis for the Global Burden of Disease Study 2013BMJ (Online)**BMJ Publishing Group, , 2016.

LASSÈGUE, B.; CLEMPUS, R. E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, n. 2, p. R277–R297, ago. 2003.

LEE, A. V.; OESTERREICH, S.; DAVIDSON, N. E. MCF-7 Cells--Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 7, p. djv073–djv073, mar. 2015.

LEVY-LAHAD, E.; FRIEDMAN, E. **Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriersBritish Journal of Cancer**, 15 jan. 2007.

LI, S. et al. Binding of CtIP to the BRCT repeats of BRCA1 involved in the transcription regulation of p21 is disrupted upon DNA damage. **Journal of Biological Chemistry**, 1999.

LI, S. et al. Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gone product in DNA damage response. **Nature**, 2000.

LIN, Z. P. et al. Triapine disrupts CtIP-mediated homologous recombination repair and sensitizes ovarian cancer cells to PARP and topoisomerase inhibitors. **Molecular Cancer Research**, 2014.

LIOU, G. Y.; STORZ, P. **Reactive oxygen species in cancerFree Radical Research**, 2010.

LITMAN, R. et al. BACH1 is critical for homologous recombination and appears to be the Fanconi anemia gene product FANCJ. **Cancer Cell**, v. 8, n. 3, p. 255–265, 1 set. 2005.

LOEW, O. A NEW ENZYME OF GENERAL OCCURRENCE IN ORGANISMIS. **Science**, v. 11, n. 279, p. 701–702, 4 maio 1900.

LORI JARDINES, MD, SHARAD GOYAL, MD, PAUL FISHER, MD, JEFFREY WEITZEL, MD, MELANIE ROYCE, MD, PHD, SHARI B. GOLDFARB, M. Breast Cancer Overview: Risk Factors, Screening, Genetic Testing, and Prevention. 2015.

LU, W.; OGASAWARA, M. A.; HUANG, P. **Models of reactive oxygen species in cancerDrug Discovery Today: Disease Models**NIH Public Access, , 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18591999>. Acesso em: 11 abr. 2019

LUO, J. et al. Association of active and passivesmoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: A prospective cohort study. **BMJ**, v. 342, n. 7796, p. 536, 5 mar. 2011.

MAKHARASHVILI, N. et al. Catalytic and Noncatalytic Roles of the CtIP Endonuclease in Double-Strand Break End Resection. **Molecular Cell**, 2014.

MARINHEIRO, L. P. F. et al. Expressão dos fatores de proliferação celular PCNA e Ki-67 e receptores de estrogênio e progesterona em tecido mamário normal de mulheres na pós-menopausa submetidas a dois esquemas de terapia de reposição hormonal. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 2003.

MEINDL, A. et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. **Nature Genetics**, v. 42, n. 5, p. 410–414, 2010.

MIJNES, J. et al. Promoter methylation of DNA damage repair (DDR) genes in human tumor entities: RBBP8/CtIP is almost exclusively methylated in bladder cancer. **Clinical Epigenetics**, v. 10, n. 1, p. 15, 2018.

MIKI, H.; FUNATO, Y. Regulation of intracellular signalling through cysteine oxidation by reactive oxygen species. **The Journal of Biochemistry**, v. 151, n. 3, p. 255–261, jan. 2012.

MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. **ROS signalling in the biology of cancerSeminars in Cell and Developmental Biology**Elsevier Ltd, , 1 ago. 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28587975>. Acesso em: 25 fev. 2020

MOLYNEUX, G. et al. BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 3, p. 403–417, 3 set. 2010.

MORBIDELLI, L.; DONNINI, S.; ZICHE, M. Role of nitric oxide in tumor angiogenesis. In: **Angiogenesis in Brain Tumors**. [s.l.] Springer, 2004. p. 155–167.

NAROD, S. A.; FOULKES, W. D. **BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyondNature Reviews Cancer**Nature Publishing Group, , set. 2004.

NEGRINI, S.; GORGOULIS, V. G.; HALAZONETIS, T. D. **Genomic instability an evolving hallmark of cancerNature Reviews Molecular Cell Biology**Nature Publishing Group, , mar. 2010.

NOVAES, M.; BEAL, F. Pharmacology of L-arginine in cancer patients. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 4, p. 321–325, 2004.

NOVAES, M. R. C. G.; DE MELO PANTALEÃO, C. Arginina: bioquímica, fisiologia e implicações terapêuticas em pacientes com câncer gastrointestinal. **Revista de Ciências Médicas**, v. 14, n. 1, 2012.

OMAR, H. A.; TOLBA, M. F.; SABER-AYAD, M. M. **Potential targets of energy restriction mimetic agents in cancer cellsFuture Oncology**Future Medicine Ltd., , 1 dez. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25531043>. Acesso em: 4 mar. 2020

OUCHI, T. **BRCA1 phosphorylation: Biological consequencesCancer Biology and Therapy**Landes Bioscience, , 2006.

PAULSEN, C. E.; CARROLL, K. S. Cysteine-Mediated Redox Signaling: Chemistry, Biology, and Tools for Discovery. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 7, p. 4633–4679, jul. 2013.

PERILLO, B. et al. 17beta -Estradiol Inhibits Apoptosis in MCF-7 Cells, Inducing bcl-2 Expression via Two Estrogen-Responsive Elements Present in the Coding Sequence. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 8, p. 2890–2901, 15 abr. 2000.

PETERS, J. M.; GONZALEZ, F. J. The Evolution of Carcinogenesis. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 165, n. 2, p. 272–276, 2018.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. **The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A reviewEuropean Journal of Medicinal Chemistry**Elsevier Masson SAS, , 21 abr. 2015.

RAHMAN, N. et al. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. **Nature Genetics**, v. 39, n. 2, p. 165–167, 2007.

RENWICK, A. et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. **Nature Genetics**, v. 38, n. 8, p. 873–875, 2006.

REYNOLDS, J. V et al. Immunologic effects of arginine supplementation in tumor-bearing and non-tumor-bearing hosts. **Annals of Surgery**, v. 211, n. 2, p. 202–210, 1990.

ROSER, M.; RITCHIE, H. **Cancer**. Disponível em: <https://ourworldindata.org/cancer>. Acesso em: 12 abr. 2019.

SANGIOVANNI, N. . S. . Synergism of nutrition, infection, and immunity : an overview. **The American journal of clinical nutrition**, 2002.

SARTORI, A. A. et al. Human CtIP promotes DNA end resection. **Nature**, 2007.

SCHAEPER, U. et al. Interaction between a cellular protein that binds to the C-terminal region of adenovirus E1A (CtBP) and a novel cellular protein is disrupted by E1A through a conserved PLDLS motif. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 15, p. 8549–8552, 10

abr. 1998.

SEN, S.; KAWAHARA, B.; CHAUDHURI, G. Maintenance of higher H2O2 levels, and its mechanism of action to induce growth in breast cancer cells: Important roles of bioactive catalase and PP2A. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 8, p. 1541–1551, out. 2012.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, jan. 2017.

SILVA, P. A. DA; RIUL, S. DA S. Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 64, n. 6, p. 1016–1021, dez. 2011.

SINGLETARY, S. E. **Rating the Risk Factors for Breast CancerAnnals of Surgery**Lippincott Williams and Wilkins, , abr. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12677142>. Acesso em: 18 mar. 2020

SOARES, E. C.; CÂMARA, R. **Imunomoduladores nutricionais em neoplasias.Revista do Hospital das Clinicas de Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo**, 1993.

SORIA-BRETONES, I. et al. Prognostic value of CtIP/RBBP8 expression in breast cancer. **Cancer Medicine**, v. 2, n. 6, p. 774–783, 2013.

SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376–390, jan. 2013.

SOTIRIOU, C. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 18, p. 10393–8, set. 2003.

SOULE, H. D. et al. A Human Cell Line From a Pleural Effusion Derived From a Breast Carcinoma 2. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 51, n. 5, p. 1409–1416, nov. 1973.

STEFFEN, J. et al. Increased cancer risk of heterozygotes withNBS1 germline mutations in poland. **International Journal of Cancer**, v. 111, n. 1, p. 67–71, 10 ago. 2004.

TAMARIT, J.; CABISCOL, E.; ROS, J. Identification of the major oxidatively damaged proteins in Escherichia coli cells exposed to oxidative stress. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 5, p. 3027–32, 30 jan. 1998.

TOUYZ, R. M.; SCHIFFRIN, E. L. **Reactive oxygen species in vascular biology:**

**Implications in hypertensionHistochemistry and Cell Biology**Springer, , 26 out. 2004.

VALENTI, G. et al. Cancer stem cells regulate cancer-associated fibroblasts via activation of hedgehog signaling in mammary gland tumors. **Cancer Research**, v. 77, n. 8, p. 2134–2147, 15 abr. 2017.

VAN DEN BRANDT, P. A. et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk. **American Journal of Epidemiology**, v. 152, n. 6, p. 514–527, 15 set. 2000.

VETRANO, A. M. et al. Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. **Journal of Biological Chemistry**, 2005.

VISSERS, Y. L. J. et al. Plasma arginine concentrations are reduced in cancer patients: evidence for arginine deficiency? **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 5, p. 1142–1146, 2005.

VUONG, D. et al. Molecular classification of breast cancer. **Virchows Archiv**, v. 465, n. 1, p. 1–14, 31 jul. 2014.

WAITZBERG, D. L. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica v. 1. In: **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica v. 1**. [s.l: s.n.]. p. 1289.

WANG, C.-Y. et al. Gene signatures and potential therapeutic targets of amino acid metabolism in estrogen receptor-positive breast cancer. **American journal of cancer research**, v. 10, n. 1, p. 95–113, 2020.

WANG, J. et al. Loss of CtIP disturbs homologous recombination repair and sensitizes breast cancer cells to PARP inhibitors. **Oncotarget**, v. 7, n. 7, p. 7701–14, 16 fev. 2016.

WASHBROOK, E. Risk factors and epidemiology of breast cancer. **Women's Health Medicine**, v. 3, n. 1, p. 8–14, 1 jan. 2006.

WHEATLEY, D. N. et al. Single amino acid (arginine) restriction: Growth and death of cultured HeLa and human diploid fibroblasts. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 10, n. 1–2, p. 37–55, 2000.

WHEATLEY, D. N. Controlling cancer by restricting arginine availability—arginine-catabolizing enzymes as anticancer agents. **Anti-cancer drugs**, v. 15, n. 9, p. 825–833, 2004.

WILD CP, WEIDERPASS E, S. B. EDITORS (2020). **World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention.** Lyon, France: International Agency for Research on

Cancer: [s.n.]. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/586.>.

WONG, A. K. C. et al. Characterization of a carboxy-terminal BRCA1 interacting protein. **Oncogene**, 1998.

WORSHAM, M. J. et al. Multiplicity of benign breast lesions is a risk factor for progression to breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 18, p. 5474–5479, 15 set. 2007.

WU, D.; YOTNDA, P. Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 57, nov. 2011.

WU, G. et al. **Arginine metabolism and nutrition in growth, health and diseaseAmino Acids**Springer, , 23 maio 2009.

WU, M. et al. CtIP Silencing as a Novel Mechanism of Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 5, n. 12, p. 1285–1295, 2008.

WU, W.-S. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. **Cancer metastasis reviews**, v. 25, n. 4, p. 695–705, dez. 2006.

YARDEN, R. I.; BRODY, L. C. BRCA1 interacts with components of the histone deacetylase complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1999.

YOSHIDA, K.; MIKI, Y. **Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damageCancer Science**John Wiley & Sons, Ltd, , 1 nov. 2004. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1349-7006.2004.tb02195.x>. Acesso em: 17 mar. 2020

YU, X. et al. The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vive with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression. **Journal of Biological Chemistry**, 1998.

YU, X.; BAER, R. Nuclear localization and cell cycle-specific expression of CtIP, a protein that associates with the BRCA1 tumor suppressor. **Journal of Biological Chemistry**, 2000.

ZHENG, A.; KALLIO, A.; HÄRKÖNEN, P. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. **Endocrinology**, v. 148, n. 6, p. 2764–77, jun. 2007.