



Universidade Federal da Bahia  
Instituto de Ciências da Saúde



**PMBqBM**  
**Programa Multicêntrico de Pós-Graduação**  
**em Bioquímica e Biologia Molecular**

**PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DINÂMICO DO LEITE  
MATERNO MADURO E OS IMPACTOS BIOQUÍMICOS  
NO DESENVOLVIMENTO INFANTIL:  
UMA ANÁLISE *IN SILICO***

Salvador  
2025

ALESSANDRA SANTANA NÓBREGA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR



ALESSANDRA SANTANA NÓBREGA

PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DINÂMICO DO LEITE MATERNO MADURO  
E OS IMPACTOS BIOQUÍMICOS NO DESENVOLVIMENTO INFANTIL:  
UMA ANÁLISE *IN SILICO*

Salvador  
2025

**ALESSANDRA SANTANA NÓBREGA**

**PERFIL TRANSCRIPTÔMICO DINÂMICO DO LEITE MATERNO MADURO  
E OS IMPACTOS BIOQUÍMICOS NO DESENVOLVIMENTO INFANTIL:  
UMA ANÁLISE *IN SILICO***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBqBM, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal da Bahia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Garcia Macambira.

Tutor: MSc. Victor de Barros Serrano Neves.

**Salvador  
2025**

N754 Nóbrega, Alessandra Santana

Perfil transcriptômico dinâmico do leite materno maduro e os impactos bioquímicos no desenvolvimento infantil: uma análise *in silico*/Alessandra Santana Nóbrega. – Salvador, 2025.

111 f.: il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Garcia Macambira.; Coorientador: Prof. MSc. Victor de Barros Serrano Neves.

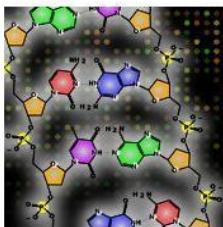
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2025.

Inclui referências e anexos.

1. Leite materno maduro. 2. RNA-seq. 3. Transcriptoma. I. Macambira, Simone Garcia. II. Neves, Victor Barros Serrano. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 613.287-053.2

Responsável técnica Maria de Fátima Mendes Martinelli – CRB/5-551  
Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA-SIBI



Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq

Universidade Federal da Bahia – UFBA

Instituto de Ciências da Saúde – ICS

**PMBqBM**

Programa Multicêntrico de  
Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular



## TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

**ALESSANDRA SANTANA NÓBREGA**

**“Perfil Transcriptômico Dinâmico do Leite Materno Maduro e os Impactos Bioquímicos no Desenvolvimento Infantil: Uma análise *in silico*”.**

11 de março de 2025.

COMISSÃO EXAMINADORA:

*Simone Garcia Macambira*

Profa. Dra. Simone Garcia Macambira (UFBA) / Presidente

*Ravena Pereira do Nascimento*

Profa. Dra. Ravena Pereira do Nascimento- (UFBA) / (Membro Titular Interno)

*Sara Nunes de Oliveira Araujo*

Profa. Dra. Sara Nunes de Oliveira Araujo - (Fiocruz-BA) / (Membro Titular Externo)

Dedico este trabalho a minha filha Marina, que mesmo pequena, é a minha grande força, razão e fonte infinita de amor e inspiração nessa jornada da vida. É por você eu busco ser melhor todos os dias.

Dedico também a todas as mães que incansavelmente buscam ser melhores por e para seus filhos, incluindo a minha.

## **AGRADECIMENTOS**

Uma das poucas certezas que tenho na vida é a de que ninguém constrói nada sozinho. Portanto, gostaria de deixar registrado minha gratidão.

Agradeço primeiramente a Deus, por não me fazer perder a fé em nenhum momento desta caminhada e por ter me dado força e saúde para superar todas as dificuldades.

Agradeço à minha família, por representarem tudo para mim e por serem a minha base e meu alicerce em todos os momentos. Dedico especialmente à minha irmã Bruna, que me acolheu quando mais eu precisei;

Agradeço a minha filha Marina, pela paciência em tolerar minha ausência e por ter sido a razão da escolha deste tema;

Agradeço também, à minha orientadora Simone e tutor Victor, por terem aceito essa missão e por terem me fornecido todo suporte, empenho, dedicação e críticas pertinentes investidos na construção e desenvolvimento deste trabalho. Obrigada também por me guiarem de forma humana, amorosa e gentil nesta caminhada. Vocês são únicos e especiais!

Por fim, mas não menos importante, a todos os colegas, professores, doutores e mestres, que direta ou indiretamente fizeram parte e contribuíram para o meu crescimento, amadurecimento e aprimoramento profissional, o meu muito obrigada!

*“Quando pensar em desistir, lembre-se do que lhe fez  
começar.”*

MARIO ANDRETTI

## RESUMO

O leite materno se apresenta como um produto oriundo das glândulas mamárias de elevada complexidade e especificidade, com impacto direto no desenvolvimento dos seres humanos. No entanto, apesar de seu expressivo papel, ele ainda possui informações limitadas principalmente ao se tratar do leite maduro, onde pouco se tem abordado acerca de sua composição no transcorrer dos anos. Dentre os diversos componentes presentes no leite, estudos emergentes identificaram que a presença de RNAs se configura como um elemento importante a ser avaliado. Portanto, este trabalho realizou uma análise, com base nos bancos de dados públicos disponíveis, dos RNAs presentes nas amostras do leite materno maduro em distintos períodos do tempo a fim de definir suas possíveis variações e funções bioquímicas ao longo do tempo. A hipótese é de que o leite materno maduro possui potencialidades específicas, de acordo com seu grau de maturação que justificam o aleitamento materno continuado. **METODOLOGIA:** Dados públicos de transcriptomas do GEODATASET, com código de acesso de GSE192543 e GSE75726 foram analisados. As amostras disponíveis foram examinadas por meio de ferramentas de bioinformática através da plataforma Galaxy. Posteriormente, foi realizada uma filtragem com base na razão entre o nível de expressão pelo Log FoldChange e o p-valor < 0,05, a fim de identificar os RNAs diferencialmente expressos entre as amostras de leite materno maduro de 01, 02, 04 e 06 meses. **RESULTADOS:** Após o processamento dos dados, foi possível encontrar uma regulação gênica dinâmica dos transcritos: sendo predominantemente negativa nos primeiros meses, mas, positiva a partir do sexto mês de lactação; indicando que o leite maduro é heterogêneo. A presença destes genes, proteínas, enzimas e elementos celulares no leite materno maduro, possibilitam a promoção de um suporte adicional ao desenvolvimento neural, metabólico e imunológico do organismo infantil ainda imaturo; e elucidam as estatísticas correlacionais dos estados de saúde e doença com a prática positiva da amamentação. **CONCLUSÕES:** Os componentes encontrados nas amostras de leite materno maduro se modificam com o intuito de subsidiar as diversas necessidades biológicas do lactente proporcionando um ambiente celular responsável de crescente complexidade. Mais estudos se tornam necessários com objetivo de dar continuidade a análise do dinamismo lácteo materno e suas propriedades posteriores aos 06 meses para que possamos estabelecer seu comportamento a longo prazo.

Palavras-chave: Leite materno maduro, RNA-seq, Transcriptoma.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Breast milk is a mammary glands product of high complexity and specificity, that has a direct impact on the development of human beings. However, despite its significant role, there is still limited information available, especially when it comes to mature milk where little has been discussed about its composition over the years. Among various components present in milk, emerging studies demonstrate that the presence of RNAs in milk is a key component to be evaluated. Therefore, this study performed an analysis based on available public databases of the RNA present in mature milk samples at different periods of time, to define its profile and its variations over time. The hypothesis is that mature breast milk has specific potentialities, according to the degree of maturation that justifies continued breastfeeding. **METHODOLOGY:** Public transcriptome data from GEODATASET, with accession codes GSE192543 and GSE75726, were analyzed. Available samples were examined using bioinformatics tools through the Galaxy platform. Subsequently, filtering was performed based on the ratio between expression level by Log Fold Change and the p-value  $<0.05$ , to identify differentially expressed RNAs between the mature breast milk samples of 01, 02, 04 and 06 months. **RESULTS:** After data processing, it was possible to find a dynamic gene regulation of the transcripts: being negative in the first months, but positive from the sixth month of lactation; indicating that mature milk is heterogeneous. The presence of these genes, proteins, enzymes and cellular elements in mature breast milk allows the promotion of additional support to the neural, metabolic and immunological development of the still immature infant organism; and elucidates the correlational statistics of health and disease states with the positive practice of breastfeeding. **CONCLUSIONS:** The components found in mature breast milk samples change to support the diverse biological needs of the infant, providing a responsive cellular environment of increasing complexity. Further studies are necessary to continue the analysis of maternal milk dynamics and its properties after 6 months so that we can establish its long-term behavior.

Keywords: Mature Breast Milk, RNA-seq, Transcriptome.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	Fluxograma das etapas realizadas para a pesquisa <i>in silico</i> acerca do perfil e propriedades do leite materno maduro.....	35
<b>Figura 02</b>	Fluxograma com as Etapas realizadas na seleção dos bancos de dados incluídos na pesquisa <i>in silico</i> acerca do perfil e propriedades do leite materno.....	36
<b>Figura 03</b>	Comparativo entre os estudos A1 e A2 em relação aos resultados obtidos dos DEGs na análise <i>in silico</i> .....	44
<b>Figura 04</b>	Diferença de expressão gênica entre as amostras de leite materno, 2024.....	46
<b>Figura 05</b>	Distribuição dos valores de significância estatística (p-valor) nas amostras de leite materno, 2024.....	47
<b>Figura 06</b>	Dispersão das amostras de leite materno com base no perfil de expressão gênica, 2024.....	49
<b>Figura 07</b>	Analise de Componentes Principais (PCA) das amostras de leite materno com base no perfil de expressão gênica, 2024.....	51
<b>Figura 08</b>	Perfil de expressão gênica nas amostras de leite materno de 0 - 01 e 01 - 04 meses, representado por mapa de calor, 2024...	52
<b>Figura 09</b>	Perfil de expressão gênica nas amostras de leite materno de 02 – 04 e 04 -06 meses, representado por mapa de calor, 2024.....	53
<b>Figura 10</b>	Transcritos diferencialmente expressos compartilhados e exclusivos entre as amostras de leite materno de 0-1 , 1-4, 02-04 e 04-06 meses, 2024.....	55
<b>Figura 11</b>	Análise de interações dos transcritos diferencialmente expressos no leite materno de 02 – 04 meses de lactação, 2024.....	63
<b>Figura 12</b>	Análise de interações dos transcritos diferencialmente expressos no leite materno de 04 – 06 meses de lactação, 2024.....	66
<b>Figura 13</b>	Análise de interações dos transcritos diferencialmente expressos no leite materno de 01 – 04 meses de lactação, 2024.....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b>	Descrição dos Bancos de dados incluídos na pesquisa <i>in silico</i> acerca do perfil e propriedades do leite materno.....	41
<b>Tabela 02</b>	A1 - Transcritos regulados positiva e negativamente de 0 - 4 meses de lactação pela análise <i>in silico</i> , 2024.....	85
<b>Tabela 03</b>	A2 - Transcritos regulados positiva e negativamente de 02 - 06 meses de lactação pela análise <i>in silico</i> , 2024.....	110
<b>Tabela 04</b>	Transcritos regulados positivamente e categorizados por função nos meses de 01-04, 02-04 e 04-06 de lactação pela análise <i>in silico</i> , 2024.....	60
<b>Tabela 05</b>	Transcritos regulados positivamente e categorizados por outras funções nos meses de 01-04, 02-04 e 04-06 de lactação pela análise <i>in silico</i> 2024.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABCA5** – Membro 5 da Subfamília A da Cassete de Ligação ao ATP
- ABCB6** – Membro 6 da Subfamília B da Cassete de Ligação ao ATP
- ACSL4** - Membro 4 da Família de Sintetasas de Acil-CoA de Cadeia Longa
- AME** – Aleitamento Materno Exclusivo
- APCs** - Células Apresentadoras de Antígenos
- Arginase-2** - Enzima arginase-2
- ATP** – Adenosina Trifosfato
- BCR** - Receptores de Células B
- BIM** – Proteína BCL2-Like 11
- CCP4** - Progressão do Ciclo Celular 4
- CDC14** - Fosfatase 14 Reguladora do Ciclo Celular
- CD4+** - Linfócitos T auxiliares
- CD8+** - Linfócitos T citotóxicos
- CD45** - Linfócitos T de memória
- CDs** – Células Dendríticas
- CECs** - Células Eritróides Imaturas
- CHTOP** - Alvo Cromatínico de PRMT1
- CSPP1** - Proteína Associada ao Centrómero e ao Polo do Fuso
- CSTB** - Inibidor da Cisteína Protease (Cistatina B)
- cDNA** - DNA Complementar
- COX1** - Ciclooxygenase 1
- DAMPs** - Padrões Moleculares Associados a Danos
- DIAPH3** - Formina Relacionada a Diáfano 3
- DNA** - Ácido Desoxirribonucleico
- DNAJC13** - Membro C13 da Família de Proteínas DNAJ
- EEF1B2** - Fator de Elongação de Tradução Eucariótico 1 Beta 2
- ERI3** - Exorribonuclease Relacionada 3
- FcγR** - Receptores Fc para a Fração Constante das Imunoglobulinas G
- FcRn** - Receptor Neonatal da Fração Constante de Imunoglobulina
- Flow cell** - Célula de Fluxo (dispositivo de sequenciamento)
- DEGs** - Genes Diferencialmente Expressos
- GC** - Guanilil Ciclase

**GNA1** - Proteína Ligadora de Nucleotídeos de Guanina Alpha Inibitória 1

**GTPase** - Enzima GTPase (Hidrolisadora de GTP)

**HBV** - Vírus da Hepatite B

**HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana

**IFI44L** - Proteína Induzida por Interferon 44-Like

**IgA** - Imunoglobulina A

**IgAS** - Imunoglobulina A Secretória

**IgD** - Imunoglobulina D

**IgE** - Imunoglobulina E

**IgG** - Imunoglobulina G

**IgM** - Imunoglobulina M

**IL-1** - Interleucina-1

**IL-6** - Interleucina-6

**IL65** - Interleucina 65

**IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**KEGG** - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

**KIAA0753** - Gene Relacionado ao Controle da Morfologia Celular

**KLHL42** - Membro 42 da Família de Domínios Kelch

**KCNIP1** - Proteína Interagente com Canais de Potássio 1

**KRT78** - Queratina 78

**KXD1** - Proteína Contendo Domínio KxDL

**LC12A2** - Transportador de Sólido Membro 12A2

**LARGE1** - Glicosiltransferase Similar 1

**LM** - Leite Materno

**LOC1249** - Gene LOC124902766

**Log2FC** - Logaritmo Base 2 da Mudança de Expressão

**LTBP4** - Proteína Latente de Ligação ao Fator de Crescimento Transformador Beta 4

**MAPRE3** - Microtúbulo-Associado à Família RP/EB 3

**MDSCs** - Células Supressoras Derivadas de Mieloides

**MHC** - Complexo de Histocompatibilidade

**MIR126** - MicroRNA 126

**MIR1271** - MicroRNA 1271

**MIR146B** - MicroRNA 146B

**MIR150** - MicroRNA 150

**MIR654** - MicroRNA 654

**MRPL42** - Proteína Ribossomal Mitocondrial L42

**MTRNR2L12** - Similar à Mitocôndria RNA Ribossomal 2L12

**NADSYN1** - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Sintase 1

**NCBI** - Centro Nacional de Informações em Biotecnologia

**NCBP1** - Subunidade 1 do Complexo de Cap-Binding Nuclear

**NFS1** - NFS1 Desulfurase de Cisteína

**NGS** - Sequenciadores de Nova Geração

**NIP7** - Proteína Associada ao Processamento de rRNA

**NK** - Natural Killers (Células Assassinas Naturais)

**NLN** – Neurolisina

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**PAMPs** - Padrões Moleculares Associados a Patógenos

**pIgR** - Receptores de Imunoglobulinas Poliméricas

**POLR2H** - Subunidade H da RNA Polimerase II

**PPL** - Periplaquina

**PRMT1** - Metiltransferase de Arginina PRMT1

**PRR** - Receptores de Reconhecimento Padrão

**Região Fc** - Fração Constante das Imunoglobulinas

**Rho** - Família de Proteínas GTPase Rho

**RNA** - Ácido Ribonucleico

**RNA-seq** - Sequenciamento de RNA

**RNA5S1** - RNA Ribossomal 5S 1

**RNA5S2** - RNA Ribossomal 5S 2

**RNA5S3** - RNA Ribossomal 5S 3

**RNAr** – RNA Ribossomal

**ROS** - Espécies Reativas de Oxigênio

**SLC12A2** - Transportador de Sólido Membro 12A2

**SIDT1** - Membro 1 da Família Transmembranar SID1

**SIVA1** - Fator Indutor de Apoptose SIVA 1

**SLIT3** - Ligante de Orientação Slit 3

**SNORD44** - RNA Não Codificante SNORD44

**SNORD75** - RNA Não Codificante SNORD75

**TCR** - Receptores de Células T

**TGF-β** - Fator de Crescimento Transformador Beta

**TIMM23** - Translocase da Membrana Interna Mitocondrial 23

**TLRs** - Receptores Tipo Toll

**TNF** - Fator de Necrose Tumoral

**TNC** - Tenascina-C

**TOPORS** - Ligase Ubiquitina TOPORS

**TRIM13** - Motivo Tripartido Contendo 13

**TRK-TTT2-1** - Quimera de Receptor de Tirosina TRK-TTT2-1

**TRK-TTT4** - Quimera de Receptor de Tirosina TRK-TTT4

**TRK-TTT6-1** - Quimera de Receptor de Tirosina TRK-TTT6-1

**Treg** - Células T Reguladoras

**TSP1** - Trombospondina-1

**TUBA1C** - Tubulina Alfa-1C

**UNICEF** - Fundo das Nações Unidas para a Infância

**VPS13D** - Homólogo D da Classificação Vacuolar de Proteínas 13

**ZIP12** - Transportador de Zinco ZIP12

**ZN347** - Proteína de Dedos de Zinco 347

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1	Objetivo geral.....	18
2.2	Objetivos Específicos.....	18
<b>3.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>19</b>
3.1	O Aleitamento Materno no Brasil e no Mundo.....	19
3.2	Produção e Composição do Leite Materno Humano.....	21
3.3	Desenvolvimento Infantil.....	24
3.4	Mecanismos de suporte ao desenvolvimento infantil no período Pós-gestacional. ....	25
3.5	Perfil Transcricional do Leite Materno .....	30
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>35</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
5.1	Descrição dos Bancos de Dados.....	39
5.2	Análise e Comparação dos Bancos de Dados.....	42
5.3	Análise Estatística das Amostras.....	44
5.4	Análise Qualitativa das Amostras.....	54
5.5	Análise de Interações entre as amostras .....	62
<b>6.</b>	<b>LIMITAÇÕES.....</b>	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>85</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O ato de amamentar é um ato biológico e naturalmente esperado de qualquer fêmea pertencente à classe *Mammalia*, que se destacam e possuem essa denominação justamente devido à presença de glândulas mamárias capazes de produzir leite (Alvarez, 2016). Amamentar é, portanto, a via de ação natural dos mamíferos, que possui como um de seus integrantes, o ser humano. O leite materno é, portanto, o primeiro alimento de todo ser humano desde os primórdios da humanidade (Vinagre, 2001).

No Brasil, os povos originários possuíam o hábito biológico do aleitamento materno continuado até 02 anos ou mais (Vinagre, 2001). No entanto, esta prática foi atravessada e impactada pela colonização portuguesa que não possuía tal cultura. Como efeito desta colonização, a amamentação deixou de ser uma função essencialmente biológica, e passou a ser influenciada por diversas variáveis culturais, sociais, psicológicas, políticas e econômicas (Vinagre, 2001). Um número expressivo de mulheres não praticava o aleitamento materno, e até meados do século 18, as que desejavam tal prática, contratavam uma “ama de leite” para delegar tal função (Gutierrez, 2013; Carula, 2012). Segundo os autores, as amas de leite eram mulheres negras, escravas que eram comercializadas publicamente em jornais da época após terem seus próprios filhos para que alimentassem não apenas seu filho, como também os filhos de famílias abastadas. A escravidão do corpo se estendeu também para a escravidão do peito, e esta prática apenas se encerrou com a abolição da escravidão pela lei Áurea em 1888. Como resultado do colonialismo português, nos séculos 17 e 18, o Brasil conviveu com altas taxas de mortalidade infantil. Segundo Gutierrez (2013), os bebês eram normalmente alimentados com leite *in natura* acrescido de carboidratos em mamadeiras de vidro, e cerca de 20-30% deles não sobreviviam mais do que um ano de vida.

No século XX, principalmente por influência da industrialização e o advento de técnicas como a refrigeração, pasteurização; e da entrada da mulher no mercado de trabalho, houve a implementação da cultura da mamadeira e da fórmula, tornando-se inclusive uma norma a ser seguida em alguns países industrializados (Papalia, 2006; Neri, 2022). Como resultado, o aleitamento materno apresentou declínio exponencial até à década de 1970, seguido do aumento concomitante da

mortalidade, adoecimento e hospitalização infantil (Savier, 2008). Após pesquisas demonstrarem a causalidade destes dois acontecimentos e com o intuito de reverter este quadro, uma série de avanços e ganhos políticos, com destaque para: a garantia da licença maternidade em 1988; a instalação de bancos de Leite Humano; a formação da Norma de Comercialização de Alimentos para Lactente (NBCAL); seguida da Lei de garantia ao aleitamento materno para crianças em 1990 e demais fomentos promovidos pela Organização Mundial de Saúde e a Unicef foram implementados (Neri, 2022). Complementarmente, desde 2006, ocorre a publicação ampla e periódica do Guia Alimentar para Crianças Menores de Dois Anos, com informações e orientações constantemente atualizadas que servem de instrumento na promoção do direito humano à alimentação adequada através do acesso à informação (Ministério da Saúde, 2019).

Portanto, o incentivo ao aleitamento materno é um eixo estratégico que compõe a Política Nacional de Atenção Integral à Saúde da Criança no Brasil (PNAISC), ao exercer influência positiva na saúde e qualidade de vida; além de impactar diretamente os índices de mortalidade infantil de uma população (Ministério da Saúde, 2019). O aleitamento materno tem sido relacionado a diminuição da incidência e severidade das infecções respiratórias, gastrointestinais e outras doenças crônicas como: obesidade, câncer e diabetes tipo 1 e 2 (Hetinga *et al*, 2011; Costa *et al*, 2013) que também sobrecarregam e oneram o sistema de saúde a curto, médio e longo prazo (de Magalhaes *et al.*, 2016). Pereira e col. (2010) endossam que nenhuma outra estratégia é tão segura, eficiente e interfere tanto nos índices de morte e internamento de crianças menores de 5 anos, do que a amamentação isoladamente. Por este motivo, com o intuito de fortalecer o eixo estratégico do aleitamento materno oriundos da Política Nacional de Atenção Básica e atingir as metas propostas pela OMS para o ano de 2030 em relação a amamentação, mais estudos devem ser feitos sob a ótica das novas ferramentas atualmente disponíveis para a caracterização precisa do leite materno e suas propriedades. Estas análises permitirão, a partir de novas tecnologias emergentes, elucidar e aprofundar o conhecimento acerca das exatas funcionalidades e potencialidades do leite materno. Principalmente após o segundo ano de vida da criança, onde se encontra um declínio expressivo do aleitamento (Ministério da Saúde, 2019). A hipótese deste estudo é de que o leite materno maduro continua

sendo de suma importância para a qualidade de vida e desenvolvimento infantil a partir de sua modulação intrínseca que acompanha as necessidades fisiológicas pueris. Para tal, faz-se necessário que suas propriedades sejam definidas, permitindo orientar de forma efetiva as recomendações para o aleitamento continuado. Proporcionar uma infância adequada e saudável é fundamental para o desenvolvimento integral e pleno do ser humano (Neri, 2022). Assim como seu oposto, baseado em desinformação e má-nutrição são críticos e geram consequências negativas não só para o indivíduo, como para toda a sociedade do qual ele está inserido (Pereira *et al.*, 2010).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Identificar as características e funcionalidades dos RNAs presentes no leite materno nos diferentes estágios de lactação, com destaque para o leite materno maduro.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar os genes diferencialmente expressos (DEGs) em conjunto de dados públicos de transcriptomas do leite materno em diferentes estágios de lactação.
- b) Diferenciar os estágios de lactação com base na expressão de DEGs.
- c) Identificar diferenças biológicas entre o leite materno maduro ao longo do tempo, a partir da ontologia de genes e o enriquecimento de vias dos DEGs.
- d) Fornecer dados sobre a função do leite materno maduro para o desenvolvimento infantil.
- e) Contribuir para as pesquisas acerca do aleitamento materno continuado e para o enriquecimento de fórmulas infantis.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 ALEITAMENTO MATERNO NO BRASIL E NO MUNDO

Atualmente, a Organização Mundial da Saúdeativamente recomenda e incentiva o aleitamento materno exclusivo até os primeiros 06 meses de idade e a amamentação continuada até pelo menos 02 anos ou mais, de forma complementar a introdução de alimentos sólidos (OMS, 2001). O último Guia Alimentar para Crianças menores Dois Anos acrescenta ainda: que a amamentação deve se iniciar já na primeira hora de vida do lactente, sob livre demanda; e que as crianças devem ser protegidas da influência da publicidade maciça de mamadeiras, chupetas e alimentos (NBCAL) que prejudicam a manutenção desta prática a longo prazo (Ministério da saúde, 2019).

Essas recomendações se baseiam na capacidade do leite materno em suprir de forma singular as demandas do bebê, englobando aspectos nutricionais, emocionais e imunológicos que garantem a sobrevivência da espécie e seu desenvolvimento (Costa *et al*, 2013). No entanto, apesar das diversas iniciativas de promoção do aleitamento materno, dados do Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (2019), indicam uma queda acentuada na prevalência do Aleitamento Materno Exclusivo (AME) no Brasil, que passa de 72,1% no primeiro mês de vida para 46,9% aos três meses e apenas 1,3% aos seis meses. Essa redução de 98,26% na taxa de AME entre o nascimento e os seis meses de idade evidencia a introdução precoce e disseminada de alimentos sólidos. Tal prática está fortemente associada ao aumento da incidência de infecções alimentares e episódios de diarreia em lactentes (Hetinga *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2013). Em relação a amamentação complementar continuada, os valores desta pesquisa apresentam um declínio semelhante em função da idade. A prevalência do aleitamento materno em crianças reduz de 93,4% ao nascer para: 56,8%, 27,4%, 10,7%, 6,1% e 0,6% aos 1, 2, 3, 4 e 5 anos de idade (ENANI, 2019). Com base nestes dados, durante a idade pré-escolar e escolar (02 e 04 anos), 72,6% e 93,0 % das crianças não são amamentadas; período este, de maior exposição infantil aos patógenos através do contato e compartilhamento de objetos (Costa *et al*,

2013). A meta-análise conduzida por Victora et al. (2016) demonstrou que a prática da amamentação poderia prevenir aproximadamente 50% dos episódios e 72% das hospitalizações por diarreia, além de cerca de 33% das infecções e 72% das internações por doenças respiratórias. Esses dados reforçam o papel fundamental da amamentação como estratégia eficaz na redução da morbimortalidade infantil, especialmente em crianças menores de cinco anos (OMS, 2019).

A prática do aleitamento materno é apontada, portanto, como um dos elementos chaves para redução da mortalidade infantil, que se caracteriza como um indicador social das condições de vida e saúde de uma população (Ministério Da Saúde, 2021). De acordo com o Censo do IBGE de 2020, mesmo com os avanços alcançados nos últimos anos, Salvador ainda possui o 4º lugar no Brasil dentre as maiores taxas de mortalidade infantil (TMI) para menores de 1 ano. O Nordeste e a Bahia também endossam estes dados ao apresentar superiores taxas comparadas com o Sul e Sudeste do país, com média de 15,3 e 16,6 óbitos para cada mil nascidos vivos (IBGE, 2019). Em relação às causas de morte mais frequentes no período pós-neonatal, possuem destaque as doenças infecciosas, parasitárias e do aparelho respiratório (De Carvalho et al., 1991; IBGE, 2008; BRASIL, 2016). Segundo o relatório mais recente da Fiocruz (2022), a incidência de doenças infecciosas respiratórias se acentua durante os meses de menor temperatura, acometendo principalmente as crianças entre 0 e 4 anos, que refletem um aumento acentuado de até 110% nos números de casos positivos, e representam cerca de 43% dos casos no Brasil para este período. A saúde infantil se configura, portanto, como um problema de saúde pública de impacto sazonal relevante no sistema de saúde e atua ainda como um preditor da qualidade de saúde das populações futuras (Belini et al., 2021).

No mundo, podemos observar que também existe um distanciamento entre as recomendações de aleitamento materno e as taxas reais de amamentação. A UNICEF (2016) relata que a falta do aleitamento pode estar relacionada com o falecimento de cerca de 800.000 mil crianças ao redor do mundo por ano. As taxas de amamentação mundiais contam com menos da metade dos bebês (48%) sendo amamentados na sua primeira hora de vida após o nascimento; 65% nos dois primeiros dias de vida e apenas 42% possuem amamentação exclusiva

(UNICEF, 2021). No entanto, este já é um avanço histórico se forem contabilizados os dados dos anos anteriores para aleitamento materno exclusivo até os 06 meses, de 2005 (35%), 2018 (42%) e de 2020 (44%) que indicam um crescimento contínuo. A expectativa da UNICEF é que as taxas alcancem o marco de 50% em 2025 e 70% em 2030; e que incluam principalmente os três países com as menores taxas mundiais de AME: os Estados Unidos (AME de 24,9%); o Reino Unido (AME de 1%), e a Noruega (AME de 11,1%) (UNICEF, 2021).

Dhawan, (2023) identifica que os principais fatores responsáveis pelas baixas taxas de AM estão relacionadas: a normas culturais, sociais, dificuldades físicas, ausência de suporte no ambiente de trabalho e vulnerabilidades socioeconômicas. Para reduzir o desmame precoce, é necessário fortalecer intervenções, como: o atendimento especializado e adequado frente às dificuldades mamárias; capacitação pré-natal para o manejo da AM e adaptação dos locais de trabalho para ordenha e armazenamento adequado do leite humano (Dhawan, 2023; Tesgara, 2023). Além disso, é essencial promover a divulgação de informações baseadas em evidências acerca dos benefícios do leite materno em todos os seus estágios, combatendo mitos e desinformação (Tesgara, 2023).

### **3.2 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE MATERNO HUMANO**

Do ponto de vista biológico, a preparação para secreção do leite materno se inicia durante a gestação com o desenvolvimento mamário e início da Lactogênese I (Santiago, 2013). Os hormônios advindos da placenta como o estrógeno, progesterona e prolactina, atuam sob as células epiteliais alveolares mamárias e estimulam a hipertrofia e hiperplasia dos seus ductos com aumento da vascularização e consequente elevação da circulação dos substratos na região (Santiago, 2013; Jones & Spencer, 2007). Mas, é apenas após o parto, com a expulsão da placenta e declínio da progesterona, estrógeno e lactogênio, junto ao estímulo da presença neonatal; que irá ocorrer uma liberação superior de prolactina pela hipófise anterior (Jones & Spencer, 2007). A prolactina elevada será o principal responsável pela ejeção e descida inicial do leite materno,

chamado de colostro (Jones & Spencer, 2007).

Em seguida, mantidos os níveis de prolactina altos de 30 a 40 horas após o parto, há liberação da alfa-lacto albumina, que estimula a galactosil transferase no complexo de Golgi e expande a produção e secreção láctica (Vasconcelos, 2011). Este processo secundário é conhecido como a Lactogênese II, e é definido como a produção de leite em maior abundância acarretando em mudanças em sua composição a partir do maior acúmulo de lactose (Neville, 2001). Após a lactogênese II, o controle da produção passa de endócrino para autócrino, sendo regido nesse momento, pelo reflexo mecânico de sucção do bebê durante a amamentação e o esvaziamento mamário (Vasconcelos, 2011). A sucção feita pelo lactente, estimula por si só os receptores neuro sensíveis mamários e retroalimentam positivamente a produção de prolactina e ocitocina da hipófise (Jones & Spencer, 2007; Neville, 2011). A ocitocina liberada através da sucção, ou até mesmo do contato, cheiro ou memória do bebê, atuam estimulando ainda mais a ejeção pulsátil do leite a partir de sua interação com as células mioepiteliais e consequente contração alveolar (Neville, 2011). Por fim, o período de Lactogênese III ou Galactopoiese é o último estágio, responsável pela manutenção da produção de leite a longo prazo através da conservação da atividade das células alveolares em ausência de interrupção do estímulo (Carvalho, 2014).

Do ponto de vista nutricional, apenas o leite materno é suficiente para atender as necessidades fisiológicas, imunológicas e metabólicas neonatais no que tange a proteínas, vitaminas, minerais, componentes bioativos, fatores tróficos e moduladores de crescimento (Lewis-Jones, 1985). Além de proporcionar ainda, maior sensação de proteção e estreitamento do vínculo afetivo entre a mãe e seu bebê (Victoria *et al*, 2016). A composição do leite materno pode variar de acordo diversos fatores endógenos e exógenos como: o período gestacional, duração da mamada, características maternas, fisiologia circadiana e com o estágio de lactação encontrado (Victoria *et al*, 2016).

O estágio de lactação correlaciona-se diretamente com as três grandes fases do leite materno: o colostro (< 6 dias após o parto); o leite de transição (6 - 14<sup>a</sup> dia após o parto) e o leite maduro (> 14 dias após o parto) (OMS, 2008;

Anvisa 2008). Cada fase é caracterizada por um leite com composições específicas em relação às suas concentrações de macro e micronutrientes; fatores de crescimento; além de aglomerados singulares de células maternas vivas e agentes imunológicos (Gleeson *et al.*, 2022; França *et al.*, 2010; German *et al.*, 2002).

O colostrum é o primeiro fluido biológico secretado em pequenas quantidades pelo seio materno e que possui características específicas distintas, como cor amarelada, consistência cremosa, conteúdo proteico ( $\sim 2\text{g}/100\text{ml}$ ) e lipídico elevado ( $\sim 2,6\text{g}/100\text{ml}$ ); fonte rica de carboidratos ( $\sim 6,7\text{g}/100\text{ml}$ ); presença abundante de componentes imunológicos (imunoglobulinas); e fatores de crescimento para suprir as demandas iniciais do recém-nascido (Mariano, 2012; Neville, 2001). Dentre os carboidratos, encontram-se a lactose, como o principal componente, além da presença de glicolipídios, nucleotídeos, glicoproteínas e oligossacarídeos (Neville, 2001). Segundo a Tabela de Composição de Alimentos (TACO), o colostrum possui cerca de 55 kcal em 100ml e é o leite mais rico em: sódio, vitamina A, C, zinco e imunoglobulinas; que se encontrarão menos concentradas nas próximas fases (TBCA, 2004).

A segunda fase é chamada de leite de transição, que se inicia através da apojadura do leite com o aumento do seu volume, conteúdo lipídico ( $\sim 3,9\text{g}/100\text{ml}$ ); manutenção na concentração de carboidratos ( $\sim 5,4\text{g}/100\text{ml}$ ) e de potássio (Neville, 2001; Neville, 1991). Mas, com diminuição das quantidades de minerais e proteínas ( $\sim 0,9\text{g}/100\text{ml}$ ), o que resulta na formulação de um líquido mais fluido, mais calórico ( $\sim 67\text{kcal}/100\text{ml}$ ) e menos amarelado que o colostrum (Neville, 1991). Por fim, o leite maduro tem aspecto viscoso e cor esbranquiçada, com boas concentrações de minerais e vitaminas lipossolúveis (A, E); além de concentrações de proteínas ( $\sim 1,3\text{ g}/100\text{ml}$ ) e carboidratos intermediárias ( $\sim 6,1\text{ g}/100\text{ml}$ ) e com as maiores concentrações lipídicas ( $\sim 4,2\text{g}/100\text{ml}$ ) entre as fases (Falcao, 2003).

Deste modo, o leite materno humano é de modo geral, rico em vitaminas (A, C, D, E) e minerais (cálcio, fero, zinco) essenciais para o crescimento ósseo, fortalecimento do sistema imune e atuação como cofatores enzimáticos (TBCA, 2004; Falcao, 2003; Neville, 2001). As proteínas presentes são de fácil digestão e adequadas ao sistema digestivo imaturo do recém-nascido (Gomes, 2015). Os

carboidratos, além de fornecerem energia, auxiliam na absorção de cálcio e ferro (Lamounier et al., 2001). Já os lipídeos são fundamentais para o desenvolvimento neuronal e para a absorção das vitaminas lipossolúveis (K, A, D, E) (Gomes, 2015; Lamounier et al., 2001).

Em comparação ao leite de outras espécies, como o leite bovino, o leite materno apresenta maior biodisponibilidade e digestibilidade de seus nutrientes (Maia et al., 2006). Além de conter diversos fatores bioativos com atividade antimicrobiana, antiinflamatória, hormonal e fatores de crescimento (Bauer J. E Gerss J., 2011; Maia et al., 2006). Adicionalmente, o consumo de leite de vaca, por conter maiores concentrações de caseína e gordura saturada do que de lactoalbumina e ácidos graxos insaturados, pode induzir a problemas digestivos na primeira infância (Maia et al., 2006).

Estes achados potencializam a importância e relevância dos Bancos de Leite Humano para subsidiar os casos onde não é possível uma amamentação direta. Também reafirmam o papel do leite materno na garantia de uma nutrição adequada durante o período crítico do desenvolvimento humano, como veremos a seguir.

### **3.3 DESENVOLVIMENTO INFANTIL NO PERÍODO GESTACIONAL**

A propagação da espécie humana inicia-se com a concepção e formação zigótica. Na fase pré-embrionária ocorre intensa divisão mitótica de acentuada complexidade e diferenciação celular (Schoenwolf et al., 2009). Essa etapa dá lugar à fase embrionária, de caráter morfogênica e organogênica, responsável pela formação das principais estruturas, órgãos e sistemas corporais (Nazari e Muller, 2011). Por fim, a fase fetal será o último estágio antes do nascimento, caracterizada pela maturação funcional dos sistemas e exponencial crescimento corporal regido pelo princípio céfalocaudal, que confere características morfológicas progressivamente distintas ao longo da gestação (Schoenwolf et al., 2009; Nazari e Muller, 2011).

A gestação humana completa dura, cronologicamente, uma média de 38 semanas e abrange as 03 principais fases citadas acima (OMS, 2010). Na

ausência de comorbidades prévias ou adquirias durante a gestação, espera-se o nascimento de um feto com aproximadamente 3,4 kg e 51 cm, contendo todos os sistemas básicos instaurados e em funcionamento (Papalia, 2006). No entanto, fatores como: idade materna; prematuridade; herança genética; sexo fetal; hábitos; estado nutricional; condição socioeconômica e exposição a teratógenos podem interferir nesse processo e gerar variações no desenvolvimento fetal (Papalia, 2006; Nazari e Muller, 2011).

Após o nascimento, o recém-nascido continuará ainda no meio extrauterino com um intenso ritmo de desenvolvimento, caracterizado pelo aumento de sua complexidade física, motora, mental (Papalia, 2006) e amadurecimento dos sistemas nervoso, digestivo, respiratório e reprodutor (Nazari e Muller, 2011; Catala, 2003). Os três primeiros meses de vida extrauterina são particularmente críticos e decisivos. Segundo as estimativas da Organização Mundial de Saúde, um bebê nascido a termo tende a dobrar sua estatura e triplicar seu peso dentro dos seus 100 primeiros dias de vida (OMS, 2012). Devido a este fator de destaque, Karp (2004) propõe o conceito de “extero-gestação” ou a presença de um quarto semestre que compreende os três primeiros meses após o parto. Para o autor, essa fase é determinada não só por necessidades nutricionais significativas; como também de atenção especial ao sono e necessidade de proximidade física contínua entre o bebê e seus cuidadores, a fim de garantir seu desenvolvimento adequado (Karp, 2004).

### **3.4 MECANISMOS DE SUPORTE AO DESENVOLVIMENTO INFANTIL NO PERÍODO PÓS-GESTACIONAL**

É inegável que um dos fatores determinantes para que o bebê continue se desenvolvendo plenamente após o parto, derive não só do fato de possuir suas necessidades básicas atendidas, como também da sua capacidade biológica de responder adequadamente à patógenos e substâncias externas estranhas que entrarem em contato com seu organismo e ameaçarem sua homeostase (Abbas *et al.*, 2019).

Durante uma gestação saudável, o feto permanece em um ambiente protegido e minimamente exposto a substâncias e agentes estranhos (Elahi, 2013). Embora essa proteção seja essencial, ela também limita o preparo do sistema imune adaptativo fetal para potenciais interações após e durante o nascimento (Brandtzaeg, 2003). Uma vez que a resposta imune adaptativa possui como pré-requisito o prévio contato dos agentes invasores com as células especializadas apresentadoras de抗ígenos (APCs), e necessita ainda, da diferenciação e maturação celular para desencadear uma resposta humoral específica (Elahi, 2013; Brandtzaeg, 2003). Assim, a resposta imune inata é a principal responsável pela defesa imunológica inicial do bebê através da ação de suas barreiras físicas e seus componentes celulares como os macrófagos, neutrófilos e CDs (Palmeira, 2016).

O sistema imune adaptativo neonatal apesar de conter células B produtoras de IgM e IgG, apresenta limitações na produção de IgA na mucosal intestinal (Brandtzaeg, 2003; Palmeira, 2016). Além disso, neonatos possuem recursos biológicos e capacidades limitadas para produção de anticorpos, células imunes protetoras, citocinas inflamatórias e apresentam baixa diferenciação de linfócitos T (Elahi, 2013). Assim, a imunidade neonatal é composta por uma imunidade inata, herdada e lapidada pelos fatores sociais, nutricionais e culturais; em conjunto com uma imunidade adaptativa ainda em desenvolvimento e maturação (Elahi, 2013; Brandtzaeg, 2003).

A jornada de exposição microrganismo - hospedeiro na construção da resposta imune adaptativa efetiva, se inicia através da via de parto (Silva, 2020). Durante o parto, naturalmente ocorre uma exposição maciça a milhões de bactérias; e por este motivo, desencadeia sua ativação, maturação e diferenciação (Brandtzaeg, 2003; Silva, 2020). No entanto, o grau de responsividade desta resposta irá depender de diversos fatores como: a via de parto escolhida; presença de amamentação; grau de exposição ambiental a patógenos (Elahi, 2013); e fatores de risco gestacionais como prematuridade, baixo peso, estado socioeconômico, imunodeficiências e condições genéticas pré-existentes (Silva, 2020; Elahi, 2013).

O sistema imunológico neonatal adaptativo se desenvolve de forma

adequada à medida que gradativamente entra em contato com抗ígenos microbianos externos e promove sua adaptação (Abbas, 2019). Além de maturar seu sistema imune em velocidade e severidade compatível à sua capacidade de resposta, é necessário que o organismo do recém-nascido desenvolva discernimento adequado na diferenciação de抗ígenos ofensivos e inofensivos (Kollmann, 2012; Abbas, 2019). Esta habilidade é facilitada pelas células B e T especializadas, visando o desenvolvimento do que se intitula de tolerância imunológica; a fim de evitar respostas exacerbadas e dificultar o aparecimento de alergias alimentares, doenças autoimunes e distúrbios intestinais por exemplo (Abbas, 2019; Machado, 2004). Estes desfechos desfavoráveis podem ocorrer quando há uma falha na manutenção desta tolerância através de desregulações genéticas das células APCs ou devido a causas ambientais, em resposta a quadros de infecções e exposições dietéticas precoces ou de forma errônea (Volpini, 1996).

Neste contexto, um recém-nascido que possui um sistema imune adaptativo imaturo e incapaz de produzir sua própria imunidade de forma efetiva, complementando seu desenvolvimento apenas no primeiro ano de vida; e que possuirá linfócitos T com maturação significativa apenas durante o segundo ano de vida; assim como sua produção de anticorpos de forma específica e variada alcançarão a maturidade plena apenas na idade escolar e na adolescência; podemos inferir que serão os subprodutos do organismo materno que suportarão o desenvolvimento e maturação da resposta imunológica adaptativa do neonato, ao garantir a sua proteção passiva natural através da transferência direta de anticorpos produzidos pelo seu maquinário biológico via comunicação placentária e posteriormente, via leite materno (Silva, 2020; Volpini, 1996; Machado, 2004).

Durante a gestação, o único anticorpo capaz de atravessar a placenta é o tipo IgG em todas as suas subclasses (IgG1, 2, 3 e 4), através de receptores específicos FcRn que o blindam do catabolismo digestório fetal (Brandtzaeg, 2003). O IgG é um anticorpo monomérico simples, de cadeias pesadas do tipo G, que dão origem a sua nomenclatura (Abbas, 2019). Entre suas características principais, destacam-se sua abundância e relevância, correspondendo a 80% das imunoglobulinas de um organismo adulto e sendo o principal responsável pela ativação da resposta imune adaptativa (De Silva & Mota 2003). Mota e Silva

(2003) citam que o IgG está igualmente distribuído nos compartimentos extracelulares e é capaz de se ligar na região Fc, ativando o sistema complemento e auxiliando na fagocitose, geração de quimiotaxia neutrofílica e permeabilidade vascular com acentuação da resposta inflamatória em casos de agentes estranhos (De Silva & Mota 2003).

O leite materno também transfere anticorpos do tipo IgG e IgA a partir do ato de amamentar (Silva, 2020). Isto acontece porque durante a digestão deste fluido, o neonato consegue incorporar estes anticorpos por meio da transcitose no seu epitélio intestinal (Abbas, 2019; Silva, 2020). O IgA se apresenta na sua forma monomérica e tem ação crucial na atividade imune destas mesmas membranas e mucosas, estando presente no lúmen intestinal em quantidade acentuadas e em secreções de membranas e mucosas como a saliva, lágrima e trato respiratório e geniturinário (Fagarasan, 2003). No sangue, a IgA circulante sérica interage com os receptores Fc (CD89), estimulando a inflamação, citotoxicidade mediada por células (ADCC) e fagocitose; e a IgA secretora se adere as mucosas através de receptores de imunoglobulina poliméricas (plgR), atuando na proteção destas regiões de uma invasão viral ou bacteriana antes delas se difundirem no organismo por meio da ligação e impedimento estérico ou por exclusão imune ao aglutinar seus agentes na mucosa e promover sua exclusão peristalticamente (Brandtzaeg, 2004; Silva, 2020). Por estes motivos por exemplo, que comparado aos leites industrializados e fórmulas, somente o leite humano produzido pela mãe, é capaz de suprir não só a correta nutrição de seu filho; mas também, a proteção imunológica adequada até pelo menos os seus 06 primeiros meses de vida (Boccolini et al, 2017; YIM, 2006).

A diáde mãe-neonato se torna imprescindível na garantia da neutralização dos organismos patogênicos presentes no meio externo e que irão entrar em contato com o sistema imunológico neonatal ainda em construção, a partir da diminuição direta de sua capacidade de multiplicação, principalmente, no meio digestório e sanguíneo; e impactam objetivamente, a quantidade e severidade das infecções nos primeiros meses de vida (Yim, 2006; Boccolini et al, 2017). Os fatores imunológicos do leite materno se configuram de suma importância na manutenção da saúde, modulação e sustento da maturação do sistema imunológico infantil a longo prazo (Codino-Neto, 2014; Davis-Paturet, 2019;

Neville, 1991).

Anteriormente, acreditava-se que a incompletude e imaturidade do sistema imune do neonato, era uma característica predominantemente negativa. Contudo, estudos emergentes sugerem que a imunidade neonatal é fortemente regulada e dinâmica para a garantia da sua sobrevivência e crescimento contínuo a partir de recursos limitados; e que ela pode ser benéfica em alguns casos (Elahi, 2013; Elahi, 2020). Como por exemplo, na prevenção de reações imunológicas excessivas à patógenos com evolução para sepse neonatal (Yu *et al*, 2018); e em infecções virais distintas, como na varicela zoster, rinovirus, hepatite C, B (HBV) e o HIV (Yim *et al*, 2006; Nader, 1995). Nas infecções virais da varicela zoster, rinovírus, CMV e EBV, as pesquisas demonstraram que em 75 - 80 % dos casos não ocorre manifestação clínica da doença e o neonato elimina o vírus naturalmente por possuir ainda, incapacidade biológica de sustentar uma replicação viral em larga escala (Esposito *et al*. 2013; Yim *et al*, 2006). De forma oposta, um quadro de infecção viral similar em adultos pode tornar a mesma doença potencialmente fatal em decorrência do hospedeiro possuir um sistema imunológico mais maduro e responsável (Vogt *et al*, 1999). As crianças e os bebês também não se classificaram como um grupo de risco para contrair a Covid-19, e apresentaram, durante a pandemia, ausência de sintomas ou sintomas mais amenos da doença comparados com os adultos e idosos (Lee, 2020). Esta capacidade limitada de atuação com responsividade molecular maciça restrita, está possivelmente relacionada às funções efetoras limitadas das células APCs e T e assim, competência de ação imunológica diminuída onde irá predominar a atuação da resposta imune inata (macrófagos e neutrófilos) na eliminação de抗ígenos (Yim *et al*, 2006; Esposito *et al*. 2013; Nader, 1995).

Além da atenuação das doenças infecciosas e controle de uma resposta pró- inflamatória desenfreada, a resposta imune neonatal limitada permite que sejam evitados maiores danos colaterais e teciduais decorrentes da própria reação imunológica na redução do custo biológico de seu organismo (Read, 2008). Read et al (2008) e Elahi et. al (2020) concordam que a seleção do tipo de resposta imune nos neonatos deve ser biológica e energeticamente menos custosa, minimizando danos teciduais; considerada a elevada necessidade energética para o crescimento que ocorre naturalmente nesta fase (Read, 2008;

Elahi et. Al, 2020).

Adicionalmente, fatores imunorregulatórios foram identificados no cordão umbilical humano, como células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs); e células eritróides imaturas (CECs) (Shabbaz, 2018; Gervassi, 2014). As células encontradas, apesar de imaturas, possuem potenciais imunossupressores, principalmente relacionadas aos micro-organismos intestinais comensais; secretores, de fatores solúveis, como TGF-B, arginase-2, ROS; e indutores de células T reguladoras (Tregs) que irão atuar com ação protetora e reguladores precisos do sistema imunológico neonatal (Gant, 2014; Gervassi, 2014).

Dessa forma, os fatores imunorregulatórios do leite humano representam pilares importantes na proteção e desenvolvimento imunológico infantil a curto, médio e longo prazo (CODINO-NETO, 2014; DAVISSE-PATURET, 2019; NEVILLE, 1991).

### **3.5 PERFIL TRANSCRICIONAL DO LEITE MATERNO**

O transcriptoma corresponde ao conjunto completo de transcritos de uma amostra, refletindo diretamente a expressão gênica por meio de dados quantitativos e qualitativos (Mutz et al., 2013). Dentre as tecnologias disponíveis, o sequenciamento do RNA ou RNA-seq emergiu junto com os sequenciadores de nova geração (NGS), e tornou-se o padrão ouro para a definição precisa do transcriptoma celular (Haas et al, 2010). O RNA é capaz de ligar-se reversivelmente com outros tipos de RNA ou ao DNA por complementaridade, atuando como o elo de comunicação biológico entre o DNA e as proteínas na transferência de informações biológicas (Costa et al., 2010; Abbas, 2019).

Dentre suas vantagens, podemos destacar sua rapidez, acessibilidade financeira, eficácia; capacidade de identificar as alterações genéticas dos fluidos biológicos de forma dinâmica em seus diferentes contextos; e não necessita de prévio conhecimento acerca do objeto estudado (Espindola, 2019; Haas et al, 2010). Esta técnica já demonstrou resultados positivos na melhora do rendimento do sequenciamento a partir de um sequenciamento massivo e paralelo de

fragmentos de DNA, com destaque para a plataforma *Illumina* (Haas et al, 2010). A *Illumina* foi desenvolvida pela Solexa, com capacidade de leitura de comprimento entre 30 a 100 pb. No entanto, tanto ela quanto as principais plataformas existentes, convergem e possuem fluxograma de atuação semelhantes em relação a produção e análise dos dados obtidos (Mutz et al., 2013; Haas et al, 2010).

Segundo Kapranov et al. (2007), os RNAs são isolados da amostra e fracionados em sequências curtas, menores que 500pb, compatíveis com o sequenciamento. Depois, podem ser utilizados desta forma ou enriquecidos com caudas 3' poliadeniladas (PoliA), objetivando incluir apenas mRNA eucarióticos na exclusão de RNA ribossômico (rRNA) (Kapranov et al., 2007). Após esta etapa, devem ser sintetizados DNAs complementares (cDNA) pela transcrição reversa das sequências curtas para maior estabilidade durante a amplificação (Mutz et al., 2013). Portanto, o Rna-seq opera através da conversão de uma população de RNA em uma biblioteca de fragmentos de cDNA ligados a adaptadores, que irão ser sequenciados e apresentados no formato de leituras (Reads) (Mutz et al., 2013; Haas et al, 2010; Kapranov et al., 2007).

Por consequência, sob a ótica destas novas tecnologias e ferramentas, se tornou possível avaliar de forma específica o leite materno em relação à presença e definição de suas células vivas (Gleeson et al., 2022). Achados promissores já foram observados, como a descoberta de células-tronco na concentração de ~ 5%, além de macrófagos, microvesículas de exossomos contendo RNAs (Lemay et al., 2013; Donovan, 2017), células T e populações de leucócitos distintos, possibilitando observações e interpretações novas acerca de seu potencial e funcionalidade (Gleeson et al., 2022).

Apenas a presença de RNAs (3 - 8% dos glóbulos de gordura) no leite materno, já se configura como uma possibilidade inovadora de análise da expressão gênica das células epiteliais mamárias durante a lactação, com a vantagem de se descartar a desagradável necessidade de práticas teciduais invasivas (Raymond et al., 2021). Raymond e colaboradores (2021) citam que os miRNAs, RNAs curtos e não codificantes de 18 – 25 nucleotídeos de comprimento identificados nas amostras de leite materno, se mostraram capazes de sobreviver a digestão a partir da capacidade protetora dos exossomos e assim, alcançam as

células intestinais do bebê para serem absorvidos e distribuídos na corrente sanguínea (Raymond *et al.*, 2021; Melnik *et. Al*, 2017). Possuindo, portanto, importante função na regulação da expressão gênica infantil ao controlar mais de 80% do seu genoma codificador de proteínas e abranger atividades que permeiam desde a diferenciação celular até a sua proliferação e morte (Raymond *et al.*, 2021). Alsaweed *et. al* (2015) e Melnik *et. al* (2017), estimam que cerca de 1400 miRNAs são sintetizados nas glândulas mamárias e transferidos através do leite materno humano, e que cada RNA possui individualmente a capacidade de regular a expressão de múltiplos genes, promovendo efeitos em cascata significativos (Alsaweed *et. Al*, 2015; Melnik *et. Al*, 2017).

Estudos transcrpcionais recentes identificaram componentes do sistema imune adaptativo e inato presentes no leite materno, transferidos dinamicamente para a prole para suprir sua deficiência na produção de imunoglobulinas endógenas na prevenção e resposta adequada a infecções (Mosconi *et al*, 2010; Lonnerdal, 2009). Em destaque, um estudo de 2020 apontou em sua análise que a Imunoglobulina A secretória (IgAS) inicialmente possui elevadas concentrações no colostro; atingindo um declínio seguido de uma estabilidade no leite de transição; e apresentando uma elevação novamente após 11 meses, com suas concentrações máximas verificadas apenas após o segundo ano de lactação (Czosnykowska, 2020). Concomitantemente, também foram encontrados altos índices de IgG no colostro, com sua diminuição e estabilidade no leite transicional e maduro (Czosnykowska, 2020; Czosnykowska, 2018). Além de possuir distinta capacidade imunológica, o leite maduro é descrito como o mais calórico durante toda a lactação, possuidor de excelentes concentrações de gordura, proteína e compostos energéticos (Czosnykowska, 2018). O estudo de Czosnykowska-Łukacka e col. (2020) foi pioneiro na avaliação da composição do leite materno até os 04 anos de amamentação continuada e demonstrou que o leite maduro possui variações significativas ao decorrer dos anos, com eminente potencial ainda não explorado para atuar no reforço do sistema imunológico de crianças em idade pré-escolar e escolar; e como um leite superior para ser utilizado pelos bancos de leite humano e pesquisadores no desenvolvimento de tecnologias para a otimização da saúde e desenvolvimento infantil (Czosnykowska-Łukacka e col., 2020). Desse modo, o leite materno mostra-se como um suplemento altamente

específico, capaz de modular a expressão gênica infantil a longo prazo, mesmo após cessada a amamentação (Victora *et al.*, 2016; Czosnykowska-Łukacka e col., 2020).

Complementarmente, a bioinformática desenvolvida inicialmente por Hogewe em 1979 para estudar os conhecimentos da informática no campo da biologia molecular, tornou-se essencial na era pós-sequenciamento do genoma humano (Haas et al, 2010; Espindola, 2019). Devido ao fato de que, atualmente, em um cenário onde o genoma humano está sequenciado e disponibilizado por completo; e as novas tecnologias de sequenciamento (NGS) se encontram mais acessíveis e disponíveis, com potencial de produzir diariamente grandes volumes de dados biológicos; ela se configura como indispensável para sua interpretação e análise (Mutz et al., 2013; Haas et al, 2010). Métodos tradicionais de análise, apesar de trazerem relevantes conhecimentos, não possibilitam o tratamento adequado do extenso banco de dados transcriptômicos obtidos a partir das emergentes tecnologias, como o RNA-seq (Haas et al, 2010). Desse modo, a bioinformática é fundamental para acompanhar a velocidade de produção de dados e possibilitar a sua conversão em conhecimento (Espindola, 2019).

A união do sequenciamento de RNA de nova geração (RNA-Seq) com a bioinformática, possuidora de uma capacidade de análise extensa e eficientes dos bancos massivos de dados biológicos produzidos; possibilitou caracterizar pela primeira vez de forma precisa a expressão gênica das células produtoras de leite (LEMAY et al., 2013; RAYMOND et al., 2021). Os perfis transcripcionais obtidos permitem mapear detalhadamente todas as fases da lactação humana, revelando como nutrientes e bioativos influenciam o desenvolvimento infantil (Lemay *et al*, 2013). Lemay et al. (2013), defendem ainda, que essa linha de pesquisa possui potencial para identificar como os nutrientes essenciais e os bioativos não nutricionais apoiam o desenvolvimento ideal no início da vida, fornecendo um novo olhar e novas perspectivas sobre a dinâmica e composição do leite materno humano (Raymond *et al.*, 2021; Lemay *et al*, 2013).

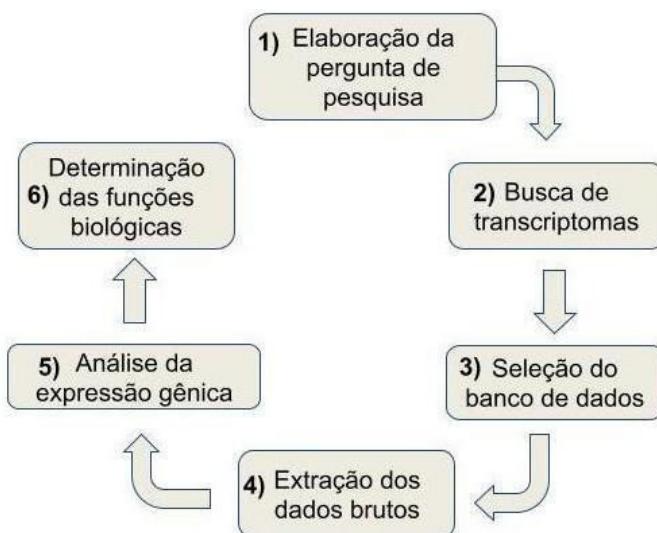
O conhecimento aprofundado dos transcritos do leite materno humano, obtidos através das novas tecnologias de sequencimaneto e de sua análise, representam uma avanço na compreensão do papel e função da amamentação

no desenvolvimento e na saúde infantil; e uma oportunidade para inovações promissoras no âmbito da nutrição materno-infantil e da medicina personalizada (Czosnykowska-Łukacka e col., 2020).

#### 4. METODOLOGIA

Este foi um estudo transversal, *in silico*, utilizando-se das ferramentas de bioinformática disponíveis para tratamento dos dados previamente obtidos a partir do sequenciamento de RNA (RNA-seq) em amostras de leite materno nos diferentes estágios de lactação. O fluxograma das etapas que foram realizadas está apresentado na Figura 01.

**Figura 01:** Fluxograma das etapas realizadas para a pesquisa *in silico* acerca do perfil e propriedades do leite materno maduro.



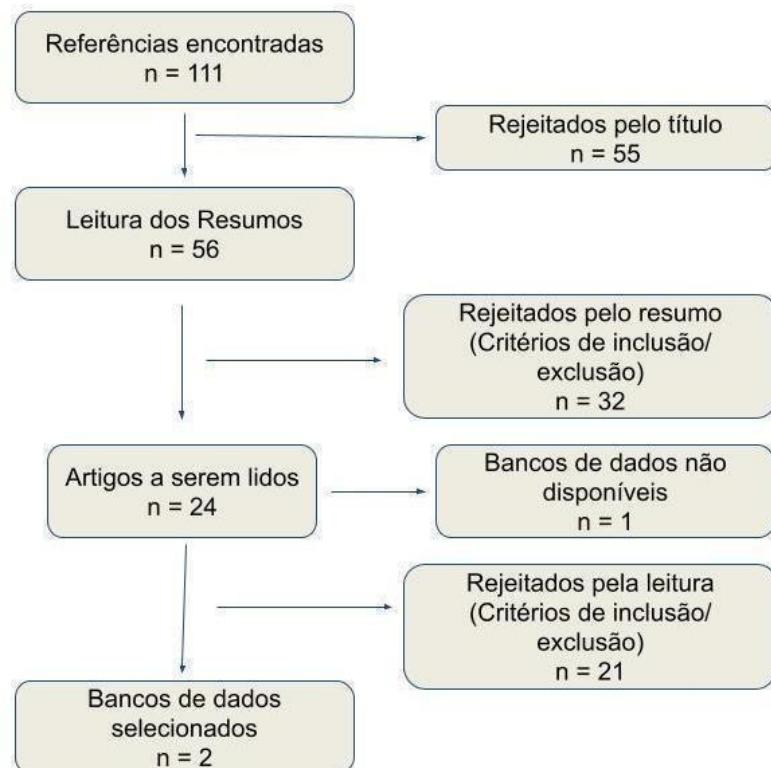
Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

As buscas de transcriptomomas totais disponíveis oriundos de técnicas do RNA-seq foram realizadas no repositório público do NCBI, GEO dataset (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) retrospectivamente do ano de 2024 até o ano de 2013. A busca incluiu ocorrências no título, resumo e assunto, conforme as palavras chaves: “*Homo sapiens*”, “*Human breast milk*”, “*RNA sequencing*” e o operador booleano “*and*”. Ao finalizar a pesquisa, as referências duplicadas foram excluídas. Foram incluídas todos os bancos de dados originais indexados neste período com delineamento experimental, realizados em mulheres adultas que utilizaram plataforma de sequenciamento semelhante de suas amostras para fins comparativos e que discriminasse o estágio de lactação das

amostras encontradas. Os critérios de exclusão foram os bancos de dados sem os dados brutos disponíveis, com ausência da técnica de RNA-seq e discriminação do estágio de lactação; presença de comorbidades prévias, doenças crônicas, prematuridade, contaminantes ambientais, a fim de garantir que apenas fontes de evidências primárias de alto nível fossem incluídas. Foram considerados eletivos os transcriptomas de leite materno em diferentes estágios de lactação, oriundos de mulheres que tiveram uma gestação saudável a termo.

A busca no repositório de dados eletrônico, GEO Dataset, resultou em 111 bancos de dados, dos quais passaram inicialmente pela análise de título da pesquisa, seguidas pela análise de resumo e leitura de seu artigo publicado na íntegra, conforme a Figura 02 abaixo.

**Figura 02:** Fluxograma com as Etapas realizadas na seleção dos bancos de dados incluídos na pesquisa in silico acerca do perfil e propriedades do leite materno.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Após a leitura das 111 pesquisas e de seus respectivos artigos publicados, com a aplicação dos critérios de elegibilidade, foram rejeitadas 55 bases de dados

através da leitura do título, 32 a partir do resumo e 22 com a aplicação dos critérios de elegibilidade. Os artigos e bancos excluídos foram considerados inelegíveis por não serem compatíveis com os critérios de inclusão da pesquisa, possuindo em sua amostra indivíduos com as seguintes condições: gestantes portadoras de diabetes prévio (Alberg, 2023; Shah, 2022; Carli, 2019), prematuridade (Carney *et al*, 2017) e sob a influência de poluentes ambientais em seu cotidiano (Kupsco I, 2022). Além disso, as amostras de leite analisadas não possuíam a descrição temporal do estágio de lactação ou não inseriram o leite maduro (Velez, 2022; Rubio, 2018; Munch, 2013) na realização de apenas uma coleta pontual (Chandran, 2023; Smyczynska, 2020). Os sequenciamentos destes dados também utilizaram outros métodos distintos ao RNA-seq (Shiff, 2019; Leiferman, 2019; Czosnykowska, 2018; Floris, 2015) ou não disponibilizaram publicamente o banco de dados brutos extraídos (Holzhausen *et al*, 2024). Portanto, após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, seguindo a sequência: leituras de título, leitura de resumo e análise do banco de dados, restaram dois bancos de dados disponíveis no GEO dataset (GSE192543 e GSE75726).

As sondas oriundas dos dados brutos foram enviados ao Galaxy através do *SRA Run Selector* presente no GEO dataset após seleção temporal das amostras. Na plataforma Galaxy, programa web gratuito (disponível em: [usegalaxy.org](http://usegalaxy.org)), estes foram em sequência: (i) submetidos à análise de qualidade de todas as amostras pelo FASTQC e, posteriormente, submetidos à retirada dos adaptadores de sequenciamento e frações identificadas com qualidade baixa pelo TrimGalore; (ii) alinhados ao genoma de referência humano (GRc38) no HISAT2 para análise da expressão gênica; (iii) contabilizados ignorando duplicatas pelo Feature Counts e (iv) identificados os genes diferencialmente expressos pela ferramenta DESeq2, que analisa a expressão comparativa entre os grupos. Foram eliminadas leituras com o valor de p maior que 0,05 por não apresentarem diferença significativa entre as amostras e Log2FC entre 0,9 e - 0,9 que não indicariam claramente uma regulação positiva ou negativa, retendo assim, as leituras com Log2FC entre + 1,0 e - 1,0 e valor de p < 0,05. Por último, a expressão comparativa entre grupos foi expressa em “Fold Change” (FC) através do programa DESeq2. Todos os programas mencionados encontram-se dentro da

plataforma Galaxy. A diferenciação das amostras com base na expressão gênica foi realizada através do programa “String” e posteriormente do programa “Cytoscape” para produção de um mapa de calor e determinação das funções biológicas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 DESCRIÇÃO DOS BANCOS DE DADOS

O primeiro banco de dados, de Steven D. Hicks e colaboradores (GSE192543) foi publicado nos Estados Unidos em 2021, com sua última atualização e deposição de dados em 2023. Os autores buscam descrever as mudanças dos níveis de miRNAs ao longo do tempo e sua relação com a saúde materna e infantil a partir de um estudo longitudinal de cohorte contendo 192 lactentes desde o nascimento até completar 01 ano de idade. Este é o banco com o maior número de amostras obtido, contendo 102 amostras de leite após o parto, 115 amostras com 01 mês e 94 amostras com 04 meses de lactação; o que totalizaram no final 311 amostras. Ainda não foram depositadas as amostras referentes aos meses seguintes até o lactente completar 12 meses de vida, que abrangem o objetivo final da pesquisa, o que sugere que ela ainda pode estar em andamento. O estudo destas amostras possibilitaram aos autores, a correlação de seus dados com algumas variáveis (Hicks et al., 2021; Hicks et al., 2023; Chandran et al., 2023). Os artigos publicados correlacionaram o perfil transcripcional obtido com fatores como a dieta materna (Hicks et al., 2021), presença e severidade de episódios de cólicas no lactente (Chandran et al., 2023) e o volume de produção mamário (Hicks et al., 2023). Na tabela 01, pode-se observar as características gerais dos estudos analisados. No estudo de Hicks e colaboradores (2021), a amostra populacional foi de 192 mulheres adultas entre 19 e 41 anos; brancas que tiveram seu filho a termo, acima de 35 semanas de gestação e que pretendiam amamentar seus filhos. Foram excluídas as mulheres portadoras de co-morbidades, que desejavam se mudar de cidade nos próximos 12 meses ou que tiveram filhos com necessidades específicas que interferiam diretamente na prática da amamentação, como a presença de lábio leporino, doenças metabólicas ou dificuldades respiratórias. Até o momento, foram disponibilizadas as amostras coletadas 04, 39 e 128 dias após o parto; correspondendo aos marcos de 0, 01 e 04 meses. A parte lipídica do leite utilizada para a extração do RNA foi priorizada e sustentada cientificamente por

achados laboratoriais anteriores (Alsaweed et al., 2016; Carney et al., 2017; Munch et al, 2013 e Zhou et al., 2012) que demonstraram maior concentração do conteúdo genético nesta fração do leite. Adicionalmente, o processador Illumina NextSeq500 utilizado possui configuração de profundidade de 10 bases por milhão e leituras de via única, single-end. Com o intuito de minimizar variantes, foi sugerido pelos pesquisadores que as lactantes utilizassem sempre o mesmo lado da mama na extração, e que o leite fosse ordenhado no mesmo horário, antes de amamentar seus filhos, para evitar variações em sua composição decorrentes do ciclo circadiano e duração da mamada.

O segundo banco de dados foi depositado por Alsaweed e colaboradores (GSE75726) na Austrália em 2015, recebendo sua última atualização em 2019. Esta pesquisa, possui um número diminuído de amostras depositadas, contendo 45 delas no total, conforme descrito na tabela 1. No entanto, os pesquisadores analisaram o leite materno de duas formas distintas aqui: através do seu conteúdo celular total e a partir da sua fração lipídica, contendo 30 amostras e 15 amostras respectivamente. Para que fosse possível correlacionar os achados com o primeiro banco de dados, foram selecionadas as

15 amostras da fração lipídica para análise e comparação. O estudo foi de carácter longitudinal e objetivou identificar a expressão de miRNAs nas diversas fases de lactação, sendo aqui descritas como equivalentes a 02, 04 e 06 meses após o parto. De acordo com o artigo, as mulheres deste estudo possuíam entre 24 e 36 anos, etnia branca e não foi discriminando o IMC e nem experiência de amamentação anterior. Ademais, as amostras de leite obtidas foram coletadas no período da manhã após a AM, no intervalo de tempo descrito por 0, 2 e 4 meses após o parto. Não foram indicados os critérios de elegibilidade maternas e os determinantes de inclusão ou exclusão no projeto de pesquisa, o que se caracteriza como um viés da pesquisa. Além disso, o processador utilizado foi o Illumina HiSeq 2000, o que diverge com o banco de dados número 01 em relação a versão do Illumina utilizado.

**Tabela 01:** Descrição dos Bancos de dados incluídos na pesquisa *in silico* acerca do perfil e propriedades do leite materno.

BANCO DE DADOS	NÚMERO DE PARTICIPANTES	IDADE MATERNA	NÚMERO DE AMOSTRAS	CARACTERÍSTICAS DA COLETA	ESTÁGIO DE LACTAÇÃO	PROCESSADOR
1.Hicks et al., 2021 (GSE192543).	192	~30 anos	N = 311	Pré-lactação Matutina (48%) + Vespertina (43%)	0 mth (4 d.) 1 mth (39 d) 4 mth (128 d.)	Illumina NextSeq 500
2.Alsaweed et al., 2015 (GSE75726).	10	~32 anos	N = 15	Pós-lactação Matutina	2 mth 4 mth 6 mth	Illumina HiSeq200

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Portanto, apesar de todos os critérios de inclusão aplicados na seleção dos bancos de dados, pode-se notar que os bancos divergem em alguns pontos em relação a sua população estudada, com destaque para: a etnia branca unânime entre as participantes dos estudos; o período de coleta em momentos distintos do dia (matutino e vespertino); maturidade do leite (1,2,4,6 meses) e fração coletada (pré-lactação e pós-lactação). Logo, deve ser considerado a possibilidade destas características naturais e de coleta se traduzirem em informações genéticas distintas nestes indivíduos geográfica e culturalmente separados. Por exemplo, Cristina (2015) sinaliza que a cronobiologia afeta o metabolismo materno e por consequência, a composição do leite que será obtido pela criança, com maiores concentrações de IgA, IgG e IgM no período diurno no leite de transição e o maduro. Adicionalmente a proteína C3, componente principal do sistema complemento, e a concentração lipídica também foram encontradas mais elevadas durante a manhã; e o leite anterior e posterior, relativos ao leite do início e do fim da mamada também possuem alterações nas concentrações de seus macros e micronutrientes. Além de outros fatores previamente citados como a duração da gestação, paridade e dieta materna que também impactam em certo nível a composição do leite humano produzido (Picciano, 2011).

No processamento dos dados, ambos utilizaram o processador Illumina com profundidade de ~10M, apesar de gerações diferentes (Nextseq 500 e Hiseq200), e foram selecionadas a porção lipídica do leite. Hicks et al (2021) defendem terem encontrado achados mais significativos do ponto de vista imunológico na porção lipídica, corroborando com Alsaweed et al (2016) que apontam para esta porção como a detentora de uma quantidade superior de

miRNAs conhecidos. No entanto, os referidos autores destacam que na porção do leite que engloba as células totais encontra-se novos miRNAs em quantidade superior nesta porção comparada a parte lipídica em seu estudo. Por fim, ambos divergiram quanto as ferramentas de Bioinformática utilizadas para interpretação dos dados extraídos. Alsaweed et al (2016) utilizaram o alinhamento através da ferramenta Bowtie2 e a quantificação pelo mirBase v22 e Ensemble; e Hicks et al (2021), utilizaram o programa SOAP e, posterior, quantificação pelo mirBase 21, podendo resultar em achados distintos uma vez que o Bowtie2 já é uma ferramenta obsoleta atualmente. Não há informações sobre o tipo de flow cell utilizado e os dados obtidos demonstram que eles não foram capturados através da polyA.

No entanto, a análise aqui apresentada foi realizada de forma uniforme, utilizando- se os dados brutos disponibilizados e as mesmas ferramentas de Bioinformática para viabilizar uma análise comparativa. Destaca-se, portanto, que com estes dois bancos de dados pode-se ter uma visão transcriptômica das variações de miRNAs das amostras do leite materno nos marcos de: 0, 01, 02 e 04 meses. Visto que o leite maduro é o estágio de lactação que se inicia a partir do vigésimo quinto (25º) dia após o parto, mantendo-se enquanto perdurar a amamentação que pode ser até 02, 03, 04 anos ou mais. Considerando-se um período tão extenso de amamentação, faz-se necessário uma análise descritiva e minuciosa a fim de distinguir e identificar se existe uma variação significativa na expressão de miRNAs no decorrer do tempo.

## 5.2 ANÁLISES E COMPARAÇÃO DOS BANCOS DE DADOS

Como resultado da Análise 01 (A1), referente ao mês 0 e o primeiro mês de lactação, foram identificados 20.631 transcritos diferencialmente expressos, que após aplicação dos limites de p valor ( $p < 0,05$ ) e Log2fC (+1,0 e -1,0), limitaram-se a 2.506 e 1.473 respectivamente ao corte utilizado. Destes, 918 apresentaram Log FC positivos e 150 negativos, sinalizando um processo de mudança de composição a partir do primeiro mês de lactação, no qual o leite se transforma do colostro para o leite maduro inicial, como demonstrado na Tabela 02 dos resultados na íntegra em anexo.

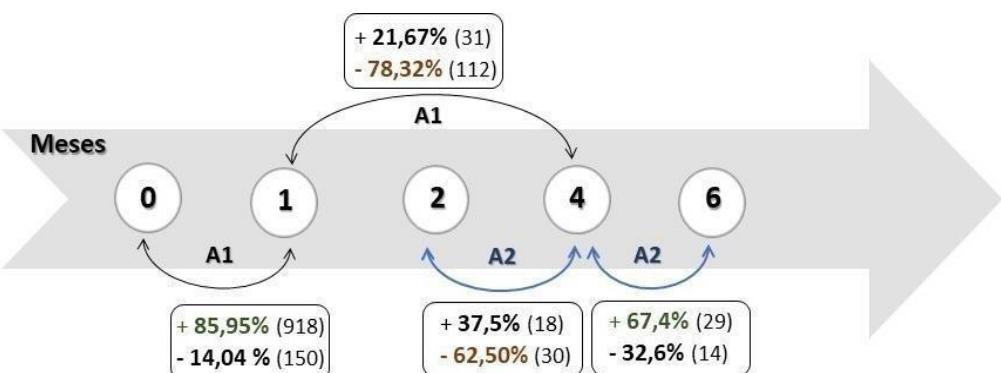
No segundo período das amostras deste mesmo estudo (A1), correspondente à marca temporal de 01 até os 04 primeiros meses de lactação, foi identificada uma redução de 21,79% de transcritos diferencialmente expressos em comparação ao primeiro marco, totalizando 16.135 transcritos diferencialmente expressos. Após a aplicação dos pontos de corte de *p*-valor reduziu-se para 3.207 transcritos significativos, e de Log FC, para 1.815 transcritos. Destes, apenas uma fração específica de 31 transcritos apresentaram Log FC positivos, enquanto 112 foram negativos; representando uma inibição de 10,55% e super expressão de 2,83% dos transcritos totais. Isso significa que manteve-se 86,62% da expressão gênica no leite materno maduro de 01, 04 meses, quando comparada com o marco 0 do mesmo estudo.

A análise 02 (A2), do segundo banco de dados, referente aos marcos de 02 até 04 meses de lactação, foi identificado 11.460 transcritos diferencialmente expressos; dos quais, após aplicação dos pontos de corte do *p*-valor e Log FC, restaram 48 conforme a Tabela 03 dos resultados na íntegra em anexo. Dentre os 48 transcritos significativos, 18 possuíram Log FC positivos, e 30 negativos. Aqui podemos observar uma expressão inibitória dos transcritos (62,50 %) superior, em relação a regulação positiva (37,5 %). Neste banco de dados (A2), temos um marco temporal adicional comparado ao estudo 01, que equivalem às amostras de leite de 04 e 06 meses. Nos meses 04 e 06 de lactação, ainda se tratando do leite maduro, esta análise demonstrou 11.448 genes diferencialmente expressos, sendo estes reduzidos para 43 ao aplicar os valores de corte de *p*-valor e Log FC. Neste período temporal, já houve maior expressão estimulatória do que inibitória dos transcritos totais, resultando em 29 regulações positivas (67,4%) e 14 negativas (32,6%).

Correlacionando-se os resultados dos bancos de dados dos estudos A1 e A2, podemos observar que entre os genes diferencialmente expressos, existe uma variação de expressão predominantemente positiva (+85,95%) entre a mudança do leite inicial (colostro) até o leite maduro no primeiro mês de lactação. Seguido de uma inversão, ao identificar uma regulação negativa dos transcritos totais superior, entre os meses de 01 e o mês 04 (-78,32%); o que se confirma em ambos os estudos (A1 e A2) para este mesmo período temporal do leite materno. No segundo estudo (A2) também ocorreu uma regulação negativa (-

62,50%) de genes diferencialmente expressos entre o segundo mês e o quarto mês maior que a modulação positiva. No entanto, como está exemplificado na Figura 03, comparando-se o mês 04 e o mês 06, este perfil reverte novamente sua tendência negativa, para uma regulação predominantemente positiva (+67,4%) no sexto mês de lactação. Importante salientar que estes são valores estatísticos globais, mas que existe ainda uma diferença considerável em relação a quantidade total de transcritos diferencialmente expressos entre os meses 0 e 01 de lactação (1.068 transcritos), para do primeiro ao quarto mês (143 transcritos); o que pode refletir em uma variação de 13,39 % entre as fases do leite materno maduro, comparado a transição do leite inicial até o leite maduro. Fato este que podemos observar com mais clareza nos gráficos de *Log Fold Change* obtidos dos dados do DESeq2 e expressos na figura 04.

**Figura 03: Comparativo entre os estudos A1 e A2 em relação aos resultados obtidos dos DEGs na análise *in silico*.**



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

### 5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS AMOSTRAS

A ferramenta de bioinformática DESeq2 analisou comparativamente as amostras de leite materno maduro, entitulados de A), B), C) ou D) de acordo com o seu respectivo marco temporal nos gráficos abaixo. Na Figura 04, o eixo X do gráfico se refere a média das contagens normalizadas em relação a sua abundância de expressão gênica em uma escala logarítmica que varia de 1 e-02 até 1e+04. Já o eixo Y, representa o valor de Log Fold Change (LFC) obtido, representando as mudanças logarítmicas de expressão gênica entre as duas

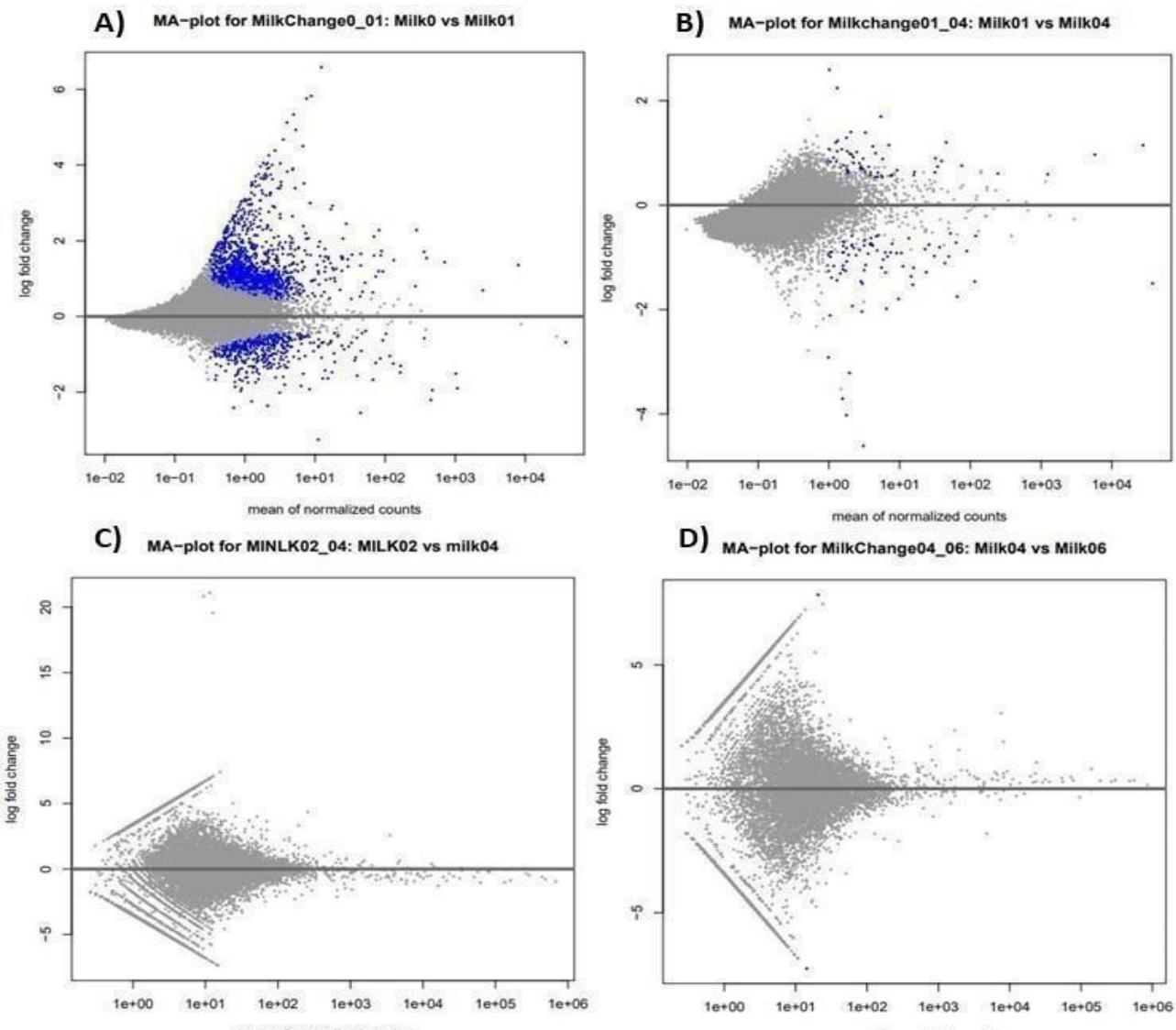
condições temporais. Caso o valor de LFC seja positivo, indicaria expressão positiva maior no grupo 01 e sendo negativo, uma expressão maior no grupo comparativo. Considerando que cada ponto é um transscrito, no gráfico A) podemos ver que estão em sua maioria, distribuídos nos marcos de 0 até 01 mês e próximos do eixo horizontal ( $LFC = 0$ ); o que indica pouca variação gênica entre as amostras. No entanto, os transcritos que variaram e estão representados pelos pontos azuis, são os elementos diferencialmente expressos estatisticamente significativos com tendência predominantemente positiva; já que estão em sua maioria, acima do eixo X. No gráfico B) de 01 até 04 meses, ocorre tendência similar em relação à concentração superior ao redor do eixo horizontal, indicando mudança sutil entre as amostras. Aqui também podemos observar transcritos em azul, diferencialmente expressos de forma significativa, em menor quantidade e mais dispersos que no gráfico A). Adicionalmente, a escala de LFC foi ampliada no gráfico B) para até - 4, apresentando transcritos expressos em um grau de inibição maior do que no gráfico A).

No gráfico C) podemos observar também que a maioria dos pontos estão concentrados perto da linha horizontal no valor 0 do eixo Y, não apresentando diferença significativa de expressão; comportamento semelhante dos marcos de 02 e 04 meses de lactação. No entanto, os pontos que divergem, estão mais dispersos que nos gráficos anteriores e são os que estão mais distantes da linha horizontal. Esse comportamento indica uma diferença de expressão superior de certos transcritos entre as duas amostras, tanto de forma positiva com LFC próximo de 10; como negativa com LFC próximos de - 5 (amostras de 04 meses). Do mesmo modo que o gráfico B), o eixo Y também sofreu por este motivo, um aumento de amplitude não apresentado anteriormente. Por fim, no gráfico D), que compara os leites de 04 e 06 meses, a distribuição dos pontos sugere que a maioria dos transcritos não apresentaram diferença significativa na expressão, porém, indicam a existência de transcritos pontuais com comportamento distinto.

A partir da Figura 04, foi possível comparar as variações da expressão gênica entre as diferentes amostras de leite, com mudanças mais pronunciadas e significativas entre os meses 0 e 01 e 01 e 04, do que entre 02 e 04 e 04 e 06 meses de lactação. Alguns subgrupos apresentam alterações significativas, e identificá-los é de suma importância para possibilitar o estudo aprofundado de seu

potencial funcional dentro da investigação biológica dos mecanismos de ação do leite materno sob o lactente.

**Figura 04: Diferença de expressão gênica entre as amostras de leite materno, 2024.**

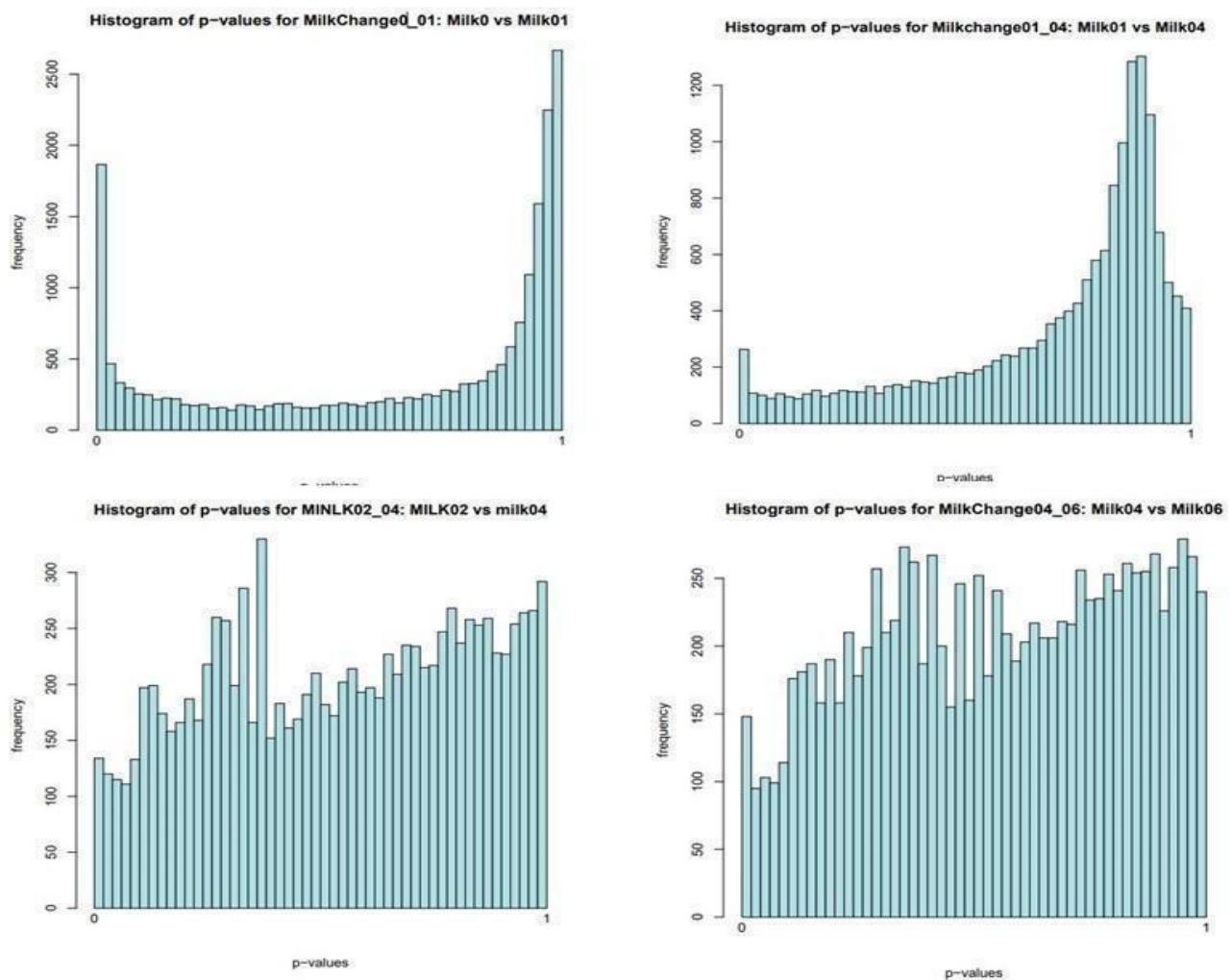


Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Adicionalmente, com o intuito de avaliar o valor de significância entre as variações e que foram representadas em azul na figura 04, temos dados de p - valor na Figura 05 abaixo. Nesta figura, podemos observar os quatro histogramas de valores de p entre os diversos marcos temporais. No gráfico A) observamos um grande pico próximo ao valor 0 e próximo de 01, indicando que entre o leite do mês 0 e o primeiro mês, possuem volume expressivo tanto para genes com diferença significativa como sem significância, respectivamente. No gráfico B),

referente ao leite dos meses 01 e 04, houve uma redução quase que pela metade da extensibilidade do eixo Y, o que reflete a diminuição da quantidade de genes diferencialmente expressos entre as amostras. Nesse gráfico, há novamente um grande pico próximo do valor 1, indicando muitos genes com valores de p altos e assim, sem significância estatística. Mas há também um pico menor próximo do valor 0, sugerindo algumas comparações significativas, com p valores baixos. Já nos gráficos C) e D) referentes ao leite materno maduro, ocorre uma distribuição uniforme ao longo dos valores de p, seguida de uma nova redução de magnitude do eixo Y. Portanto, entre as amostras de leite de 02 e 04 e de 04 e 06, ocorre uma mistura mais equilibrada entre comparações amostrais temporais significativas e não significativas.

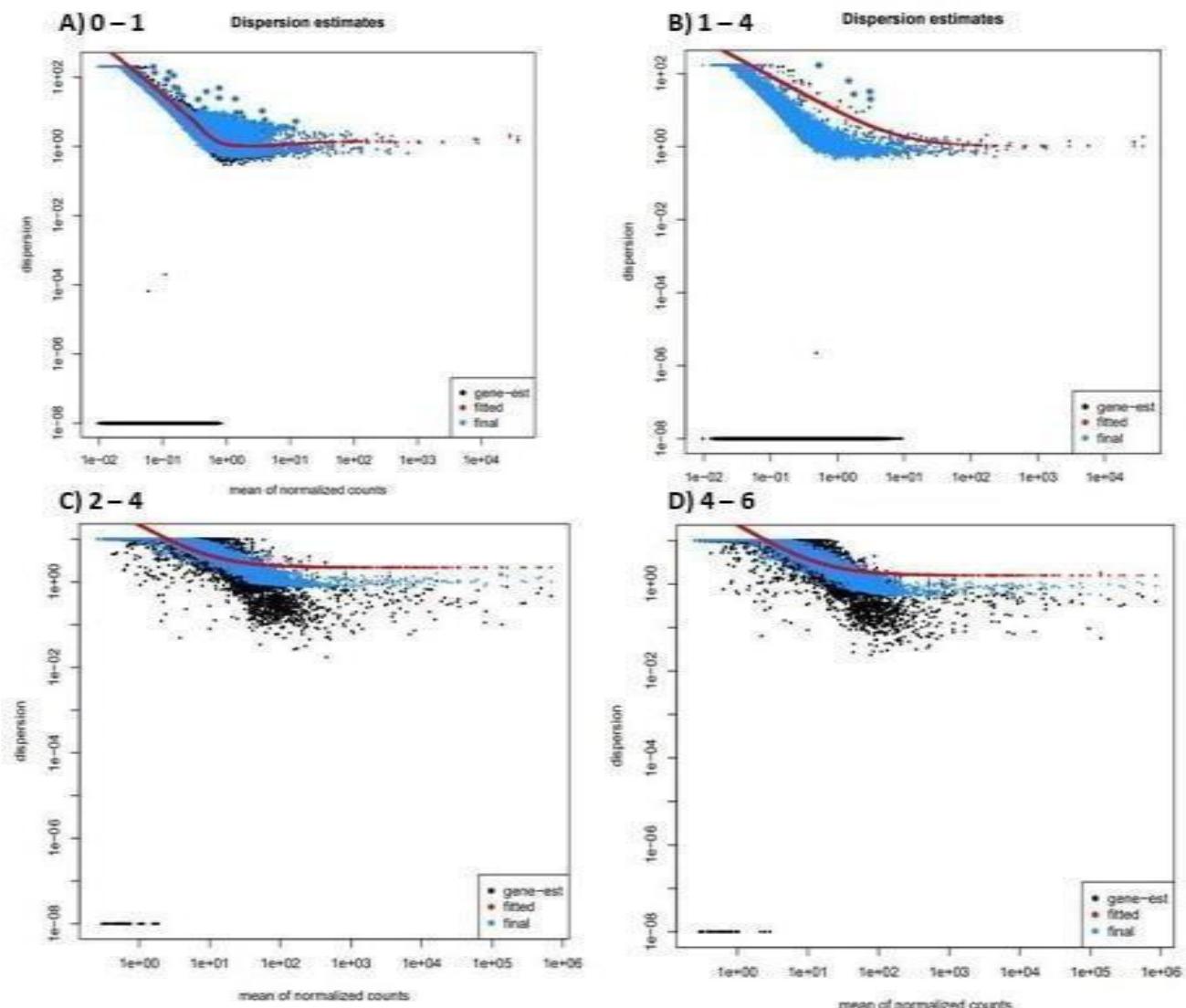
**Figura 05: Distribuição dos valores de significância estatística (p-valor) nas amostras de leite materno, 2024.**



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

A seguir na Figura 06, temos o gráfico de estimativa de dispersão para os genes analisados como medida de variabilidade dos dados obtidos em relação aos níveis de expressão. No eixo X dos gráficos teremos representada a média das contagens normalizadas dos genes; no eixo Y a dispersão; os pontos pretos (gene-est) indicam as estimativas individuais de dispersão de cada gene e os pontos azuis são as estimativas de dispersão já ajustadas, levando em consideração a linha de ajuste. Por fim, a linha vermelha (fitted) é a linha de ajuste para as estimativas de dispersão finais, auxiliando na correlação entre a média das contagens normalizadas e a dispersão ajustando as estimativas iniciais representadas pelos pontos pretos. Nos gráficos A) e B) teremos comportamentos semelhantes de dispersão, onde os genes entre as condições de 0 e 1 mês, e de 1 mês e 04 meses, possuem dispersão geral diminuída à medida que a média das contagens normalizadas aumentam. Nos dois cenários, ocorre uma tendência geral de dispersão maior para genes com contagens mais baixas e dispersão menor para genes com contagens mais altas. De forma semelhante o gráfico C) e D) apresentam o mesmo comportamento, apesar de possuir uma amplitude diminuída. Logo, em todos os cenários a dispersão é maior para genes com contagens de expressão baixa e menor para genes com expressão maior, sendo inversamente proporcionais. Esses gráficos são úteis para que possamos entender a relação e variabilidades dos dados obtidos da expressão gênica com o intuito de ajustar as dispersões de maneira que modelos estatísticos mais precisos possam ser aplicados em análises futuras.

**Figura 06: Dispersão das amostras de leite materno com base no perfil de expressão gênica, 2024**



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

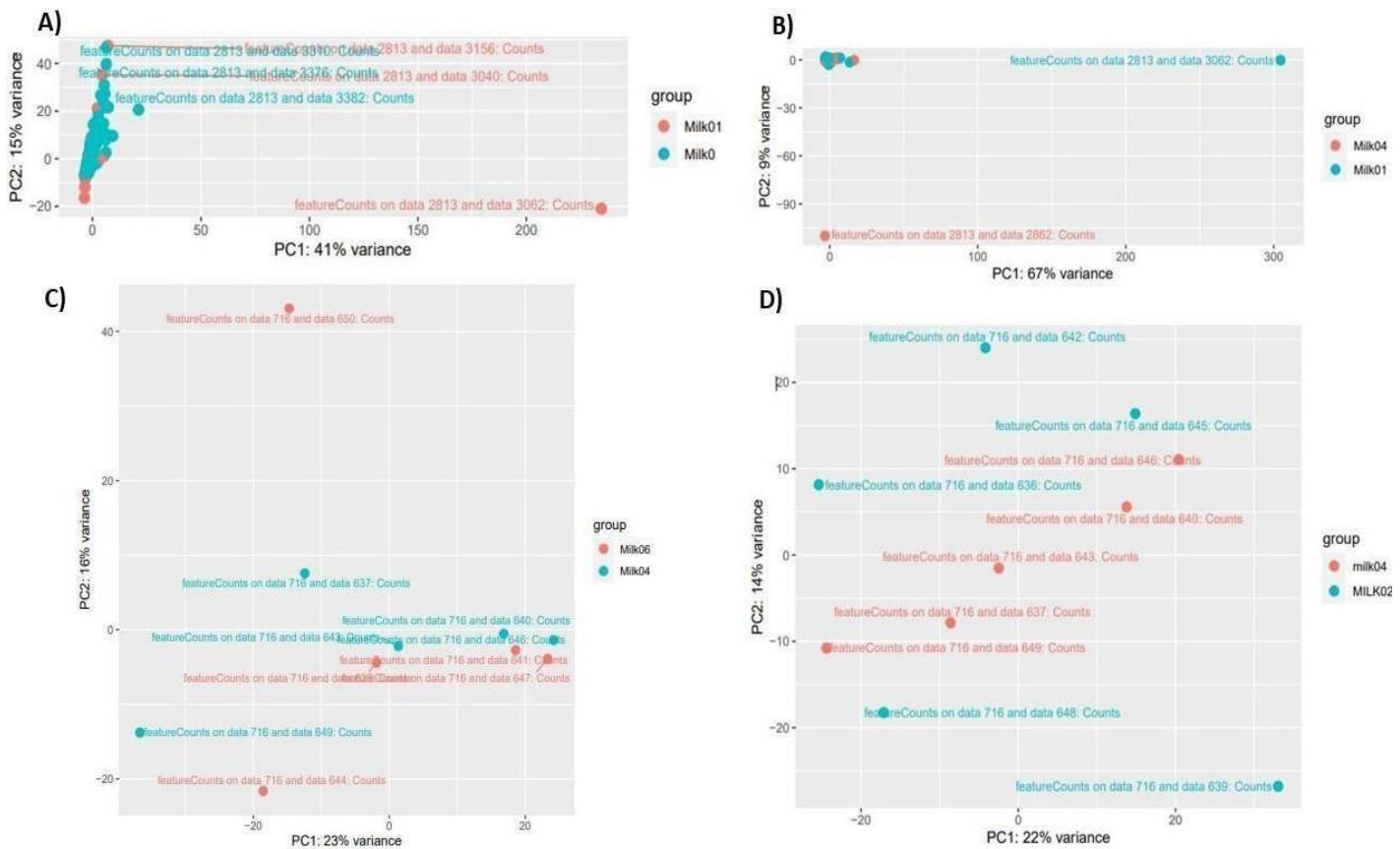
Dando continuidade à análise estatística dos dados, o DESeq2 calcula ainda o *size factors*, utilizando uma abordagem baseada na mediana das razões das contagens observadas para cada gene em relação a mediana do gene em todas as amostras para que as diferenças sejam justas entre as comparações, não sendo influenciadas por diferenças de rendimento ou profundidade de cobertura do sequenciamento utilizado. A partir do *size factors* e normalizado as contagens de leituras brutas de cada amostra, ele realiza a análise de componentes principais (PCA) para avaliar a variância entre os grupos de amostras. No gráfico de variância o PC1 (primeiro componente principal) é definido como a soma

ponderada das variáveis originais dos dados utilizados a partir do *size factors* gerados. Cada ponto aqui representa não um gene, mas uma mostra individual com coloração distinta entre os grupos comparados.

Como podemos observar na Figura 07, obtivemos porcentagens maiores de PC1 no estudo 01 (0 - 1 e 1-4), correspondendo a 41% e 67% respectivamente, o que se correlaciona com a maior quantidade de amostras analisadas e uma clara diferença significativa entre os grupos de amostras. A maior parte da variância é explicada pelo PC1, com o PC2 contribuindo com uma variação menor. No entanto, dentro deste mesmo estudo, a separação ao longo do eixo PC1 é mais evidente no gráfico B) do que no A). Portanto, indicam uma diferença maior (67%) entre os grupos de amostra de 01 e 04 meses que correspondem ao leite maduro, do que o leite inicial do período de 0 e 01 mês. O gráfico C) e D) trazem variações de menor magnitude entre os meses de 02 e 04 (22%) e de 04 e 06 meses (23%).

Por este modo, a clara separação ao longo do eixo principal (PC1) nos gráficos A e B sugerem que há diferenças significativas entre os grupos comparados, o que não ocorre nos gráficos C e D, com separação menos pronunciada e diferenças menores. A maior parte da variância é explicada pelo PC1 em todos os gráficos, o que é comum em análises de PCA, onde o primeiro componente principal geralmente captura a maior parte da variação nos dados. As diferenças observadas podem refletir mudanças de expressão gênica ou outras características biológicas relevantes entre as diferentes amostras de leite materno.

**Figura 07: Analise de Componentes Principais (PCA) das amostras de leite materno com base no perfil de expressão gênica, 2024.**

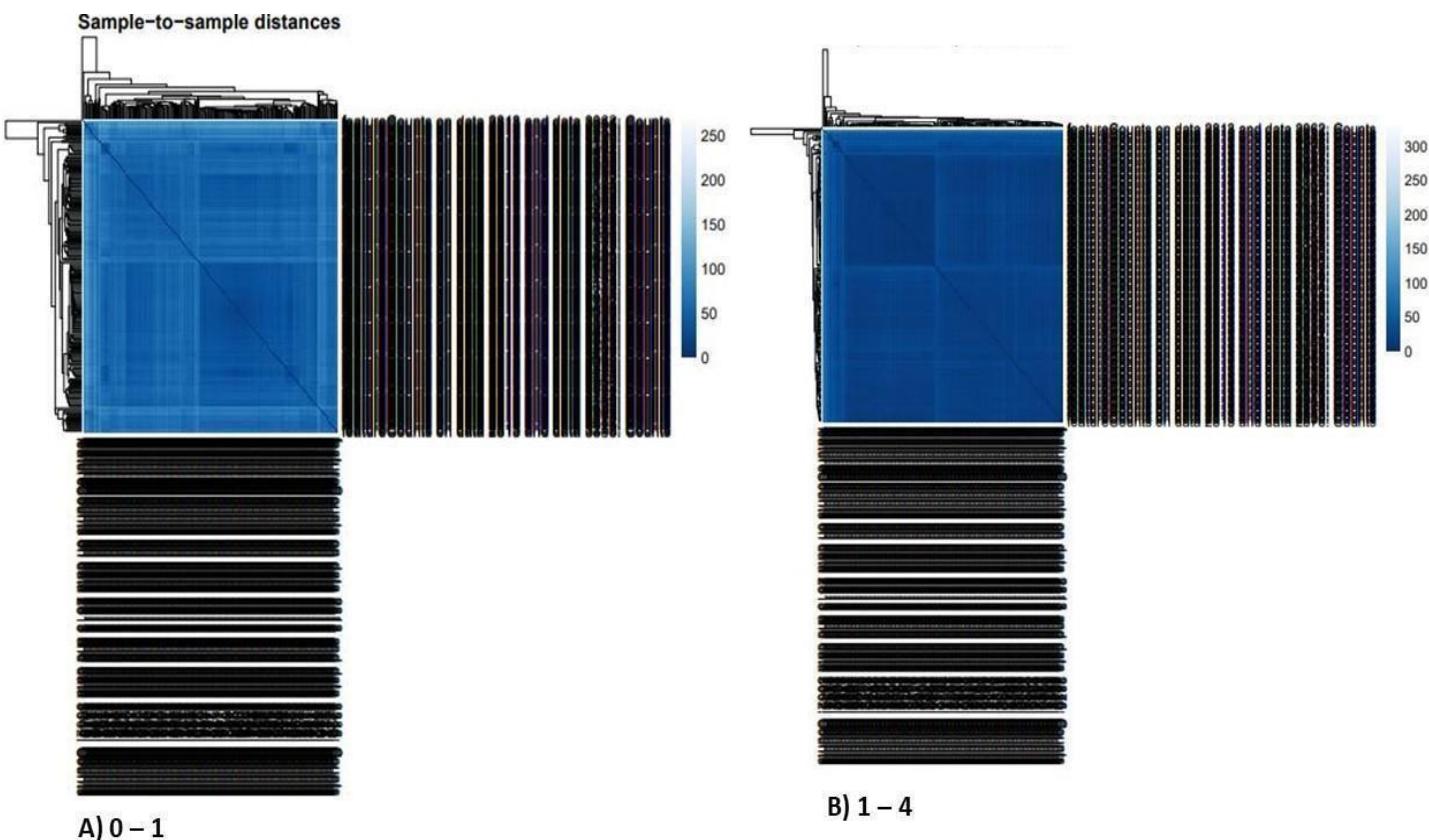


Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Por fim, o *heatmap* ou mapa de calor objetiva visualizar graficamente o comportamento dos dados e presença de *clusters* nas amostras do estudo. No gráfico 08, representado pela figura A e os meses de 0 e 01, e no gráfico B referente aos meses de 01 e 04 foram observados comportamento similares; onde o mapa de calor exibiu um *cluster* principal representado pela coloração azul claro no canto superior esquerdo, o qual indica que há um grupo de amostras equivalentes entre si com distâncias variando de 0 a 1. Já as áreas pretas e linhas verticais e horizontais escuras apresentadas, indicam distâncias maiores entre as amostras do *cluster* principal e do *cluster* secundário. Esses padrões de linhas pretas sugerem a presença de subgrupos ou amostras individuais que são significativamente diferentes das amostras do *cluster* principal. Adicionalmente, o gráfico B diverge ligeiramente do gráfico B em relação a intensidade desse comportamento, sendo esta intensificada entre as amostras do leite materno de 01 e 04 meses. Portanto, ambos os gráficos A e B apresentam padrões de

similaridade superiores fora do cluster principal, indicando que há grande similaridade com ressalva para a presença de subgrupos ou amostras individuais divergentes do cluster principal.

**Figura 08: Perfil de expressão gênica nas amostras de leite materno de 0 – 01 e 01 – 04 meses, representado por mapa de calor, 2024.**



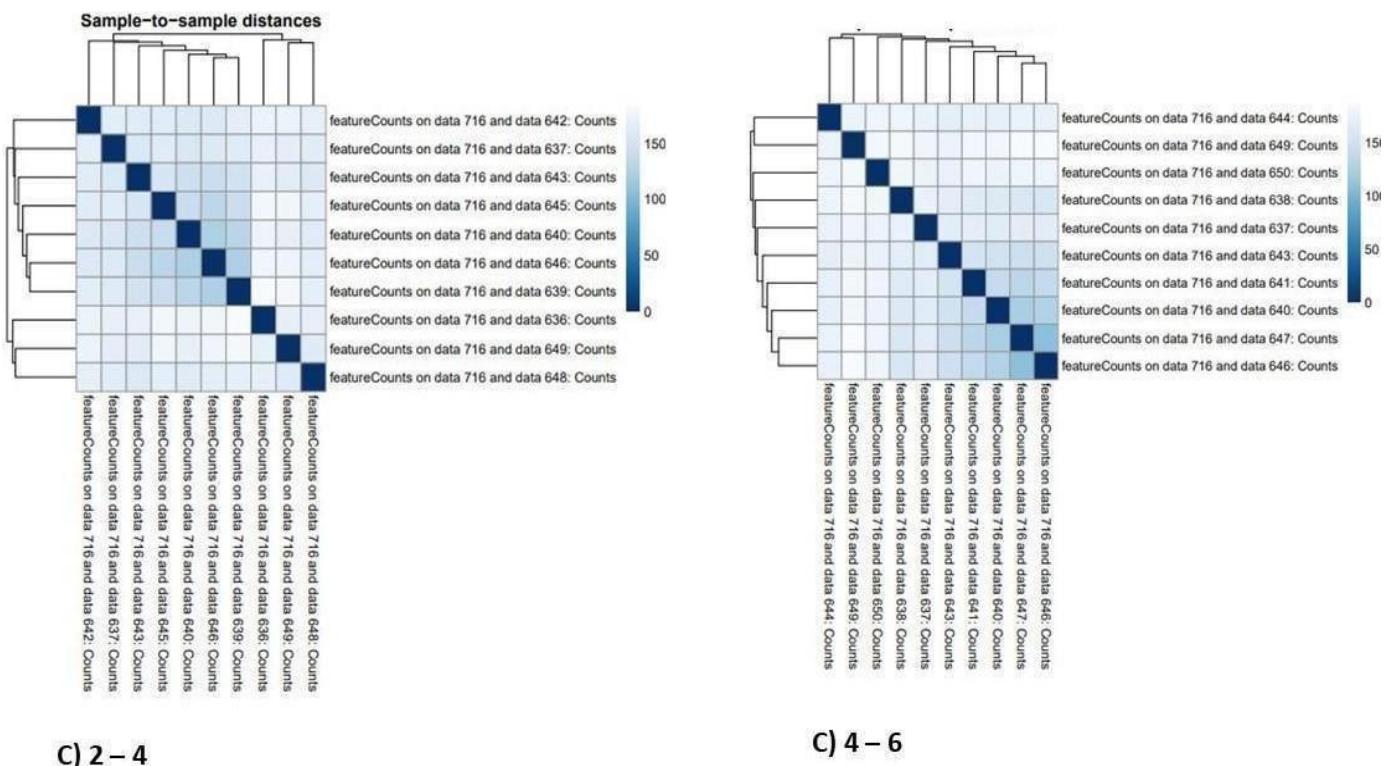
Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Na figura 09, os gráficos C e D também representam matrizes de distâncias entre amostras, desta vez em intervalos de distância e escala menores que os gráficos A e B. No gráfico C, que representa as amostras de leite de 02 e 04 meses, as células próximas da diagonal principal possuem coloração azul anil, indicando a presença de distâncias menores entre as amostras. A diagonal principal escura sugere distância de uma amostra em relação a si mesmo, que é 0. As células fora da diagonal são mais escuras do que as próximas da diagonal, apontando que as distâncias entre as amostras aqui representadas são maiores. Do mesmo modo, as dendrogramas nas bordas do gráfico indicam a presença de grupos hierárquicos de amostras com base na similaridade de suas distâncias,

com maior similaridade entre as amostras mais próximas.

No gráfico D, referente a 04 e 06 meses, as células próximas da diagonal principal são mais escuras comparadas às do gráfico C, indicando distâncias maiores, mas ainda relativamente pequenas. Assim como no gráfico C, a diagonal principal é azul escuro (distância 0), mas, as células fora da diagonal são mais escuras que o gráfico C, indicando distâncias maiores e menor similaridade entre as amostras de 04 e 06 meses. Logo, esse gráfico sugere menor similaridade entre as amostras de 04 e 06 meses do que entre as de 02 e 04 meses apresentados.

**Figura 09: Perfil de expressão gênica nas amostras de leite materno de 02 – 04 e 04 – 06 meses, representado por mapa de calor, 2024.**



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Sumarizando, os gráficos até aqui apresentados, foram ilustrados uma diferença significativa de expressão entre o leite inicial e o leite maduro definido pelo mês 0 e 01, em relação aos outros meses. No entanto, uma expressão de menor intensidade é também encontrada no leite maduro de 01 e o de 04 meses

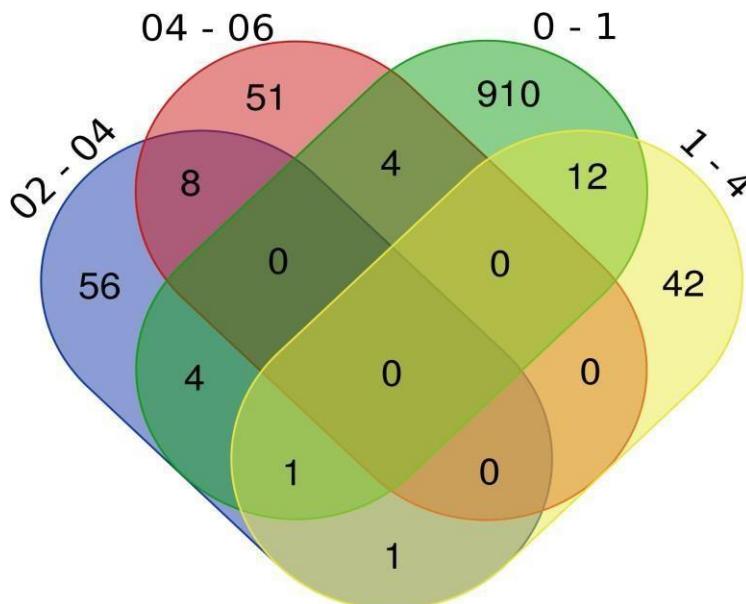
a partir das observações feitas com os resultados de log FoldChange, p-valor e o gráfico de PCA. Destaca-se que nos demais períodos do leite materno maduro de 02 e 06 meses, foram observados uma variação pontual da expressão, evidenciados pelo gráfico de dispersão superior nos genes de menor contagem e presença de padrões e subgrupos no *heatmap*, o que indica a necessidade de identificação destes genes a fim de caracterizar sua função e relevância no organismo do lactente.

#### 5.4 ANÁLISE QUALITATIVA DAS AMOSTRAS

No programa *String*, (disponível em: <https://string-db.org/>) foram copiados os dados dos genes diferencialmente obtidos nesta análise para busca de informações na literatura sobre as interações proteicas existentes direta e indiretamente, para predição de sua funcionalidade no organismo humano no programa *Cytoscape* (disponível em: <https://cytoscape.org/>), versão 3.10.1; e para elaboração do diagrama de Venn (disponível em: <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Nas figuras a seguir, tem-se os resultados obtidos a partir da aplicação destas ferramentas, apresentando a comparação entre as diversas fases do leite materno.

O diagrama de Venn objetiva visualizar de forma figurativa a relação entre os conjuntos de dados e as possíveis interseções entre as amostras. Na figura 10, pode-se ver cada cor do diagrama representando a comparação entre estágios específicos: verde (0 – 1 mês), amarelo (1- 4 meses), azul (02 – 04 meses) e rosa (04 - 06 meses).

**Figura 10: Transcritos diferencialmente expressos compartilhados e exclusivos entre as amostras de leite materno de 0 - 1 , 1 - 4, 02 – 04 e 04-06 meses, 2024.**



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

De forma exclusiva pode-se perceber que entre os meses de 0 e 01, referentes ao estágio de transição do leite inicial para o maduro, temos o maior número de elementos únicos (910), o que reitera o impacto superior observado nas outras análises. Em relação ao impacto destas proteínas temos um destaque para: (i)proteínas Ribossômicas, como pro exemploS11, L19, S5, L35, entre outras. que irão compor os ribossomos e atuar na síntese proteica das células, impactando diretamente no crescimento celular; (ii) proteínas da biossíntese e modificação de lipídios e glicanos (squalene monooxygenase, alpha- lactalbumin, cholinephosphotransferase 1, delta(24)-sterol reductase), componentes essenciais das membranas e da sinalização celular; (iii) enzimas metabólicas (COX1, IGFBP2, haptocorrina, alpha1-antitripsina, lipase estimulada por sais biliares, 6- fosfrutocinase, citrato sintase) que participam do metabolismo energético do bebê; (iv) proteínas de sinalização e regulação (Protocaderina Fat3, EIF4EBP1, MAP3K4, Proteina quinase C, E3 ubiquitina-proteina ligase RNF25) das diversas vias de sinalização celular; (v) proteínas envolvidas na regulação genética (dedo de zinco, Histona H2A); (vi) proteínas de transporte intramembranar para manutenção do equilíbrio eletrolítico, absorção de nutrientes e pH (cotransportador de sódio/mio-inositol 2, KIF2C); (vii) proteínas estruturais (LRP5, colágeno alpha-1, laminina subunidade alfa-2,

Navegador neuronal 2) e (viii) proteínas do sistema imune e de defesa (Antígeno CD81, TLR4, beta-2- microglobulina, lactoperoxidase, lactoferrina, lisozima, IGA secretora, interleucina-8, fator acelerador de decaimento complementar) que ajudam a proteger o lactente contra infecções, fornecendo imunidade passiva complementar ao sistema imunológico ainda em desenvolvimento (Olsen et al, 2018; Severo et al, 2023; Blohm et al, 2022; Rodrigues et al, 2021). Portanto, este leite inicial se caracteriza como de suma importância para suportar a nutrição e desenvolvimento intenso de um bebê em formação; o metabolismo energético e nutricional; sua resposta imunológica; sua regulação gênica, garantindo a formação adequada dos tecidos e órgãos, como por exemplo, do sistema nervoso permitindo o desenvolvimento cognitivo adequado (Blohm et al, 2022; Rodrigues et al, 2021; Casado, 2009).

Este subgrupo verde (0 – 1mês), compartilha apenas 12 elementos em comum com o grupo de 1 – 04 meses (verde), sendo três proteínas específicas envolvidas no crescimento e desenvolvimento celular (Tenascina, ErbB-4 e Plexin-D1); duas, envolvidas na absorção dos nutrientes e no metabolismo (Cubilina, Galactoquinase); três, atuantes no processo de integridade estrutural e funcional das células (Manosil-oligosacarideo glucosidase, Periplakin e MTMR14); duas, que impactam a regulação pepitídica e homeostase corporal renal e cardiovascular (Glutamil aminopeptidase e Enzima conversora de peptídeo natriurético atrial) e 01, envolta no processo de regulação da expressão gênica (ERI1) (Kaseda et al, 2011; Aquino, 2021; Bianchi et al, 2007; Brandtzaeg, 2003). Sendo que muitas das proteínas encontradas não estão tradicionalmente associadas ao leite materno ou não possuem funções completamente compreendidas (Brandtzaeg, 2003; Sanz, 2007).

Ademais, com o grupo de 02 – 04 meses (azul), o leite inicial compartilha 04 elementos: NAD(+) sintetase dependente de glutamina, na produção energética; Fator de alongamento beta-1, para síntese proteica; Xilosil e glucuronil transferase I, na glicolização e Histona-lisina N-methyltransferase, na regulação gênica. Da mesma forma, compartilha com o grupo de 04 – 06 meses (vermelho): a Citoesina-1, proteína de transdução de sinal; CRABP1 – proteína de transporte do ácido retinóico (vitamina A); ZC3H7B, proteína de regulação pós-transcricional e TSP1, Trombospondina-1, atuante na angiogênese e regulador da inflamação (Costa, 2010; Aquino, 2021).

A segunda esfera, amarela, demonstra possuir 42 elementos exclusivos para os estágios de 01 e 04 meses que não estão presentes nos outros estágios. Entre eles podemos citar elementos significativos para o desenvolvimento imunológico continuado do lactente para as respostas antivirais e infecciosas (Proteína 44 induzida por interferon; calcipressina-3, FGFBP1, BIM); para o metabolismo energético e síntese lipídica (GPAT3, ACSL4, VPS13D); sinalização e desenvolvimento do citoesqueleto celular (RCN1, DIAPH3, ARHGAP26 – Proteína ativadora da Rho GTPase, CCP4 e RAPGEF5); regulação gênica e processamento de RNA (SRF1, CPSF1); transporte e homeostase de íons (kcnip1, LC12A2 e AE2); e desenvolvimento neural e formação tecidual (NRG3, SLIT3 e TSHZ2) (Aquino, 2021; Blohm et al, 2022; Brandtzaeg, 2003; Maracci, 2016; Etienne-maneville et al, 2002) . Comparando com a esfera anterior (0 -1 mês) pode-se perceber a manutenção das funções proteicas no organismo do lactente, sendo aqui utilizadas outras proteínas mas com objetivo final semelhante.

O grupo amarelo (01 – 04) compartilha apenas 01 elemento exclusivamente com o leite materno maduro de outras etapas como o 0,1; 2 - 4 e 1-4, que é o elemento GC, proteína de membrana integral de Golgi 4. Esta proteína de membrana integral do complexo de Golgi desempenha um papel crucial na modificação, classificação de proteínas, papel na glicosilação e transporte vesicular de anticorpos, enzimas e fatores bioativos dentro da célula para dar continuidade ao suporte do sistema imunológico e desenvolvimento e crescimento do lactente (Polishchuk et al, 2004; Anantharaman et al, 2002). Sendo apenas ausente o GC no grupo 04 – 06.

Da mesma forma, este subgrupo amarelo (01 – 04) compartilha também apenas o elemento ALR15, Proteína semelhante ao fator de ribosilação ADP, com o grupo (02 – 04).

Esta é uma proteína pertencente à família das proteínas ARF (fator de ADP de ribosilação), que são pequenas proteínas GTPases envolvidas em diversas funções celulares, incluindo a regulação do tráfego vesicular e na organização do citoesqueleto de actina para uma correta morfologia, migração, e divisão celular (Maracci, 2016).

O grupo azul (02 – 04), representante do leite materno maduro, apresenta

56 elementos exclusivos deste período, sendo apenas 08 compartilhados com o grupo 04 e 06 (vermelho). Os elementos em comum são os: Proteína de dedo de zinco 347 e Alvo de cromatina da proteína PRMT1, atuantes na expressão gênica e estrutura da cromatina na regulação gênica e epigenética; o Centrosomo e a proteína associada ao pólo do fuso 1, envolvidos na divisão celular e garantia de crescimento e regeneração tecidual adequados; Sinaptogirina-2, envolvida na sinalização e plasticidade sináptica no desenvolvimento neural e cognitivo do bebê; Subfamília A do cassete de ligação ao ATP, Proteína de membrana integral pequena , envolvida no transporte de nutrientes e por fim, o Domínio oxigenasse dependente de 2-oxoglutarato e ferro e homólogo do Dnaj da subfamília C, auxiliares na modificação de proteínas e lipídeos e dobramento correto no estresse celular (Cassandri, 2017; Thiebaut, 2021; Wickner et al, 1991).

Os elementos exclusivos (56) do grupo azul (02 – 04) meses estão envolvidas nos processos de: desenvolvimento e crescimento celular (proteínas ribossomais, Galactoquinase e Fosfatidilinositol 3-quinase); função imune perante infecções (Interleucina-6 receptor e ativador de NADPH oxidase 1); desenvolvimento neurológico (Proteína relacionada a regeneração neuronal); homeostase e metabolismo (Galactoquinase e Fosfatidilinositol 3-quinase, Transportador de fosfato dependente de sódio 1 Esterol 26-hidroxilase); regulação da expressão gênica (Proteínas de dedo de zinco e desmetilase específica de lisina); integridade estrutural das células (proteínas transmembra e semelhantes a Kelch) e proteção celular (epóxido hidrolase 1) (Cassandri, 2017; Shi et al, 2019; Simpson, 1997).

Dando continuidade ao leite materno maduro, o grupo vermelho (04 – 06), possui 51 elementos exclusivos. Estas proteínas são responsáveis por todos os benefícios listados acima: desenvolvimento e crescimento celular (Proteína beta de ligação ao fator de crescimento transformador latente 4, proteína ativadora da Rho GTPase 39); função imune perante infecções (Proteína do corpo nuclear Sp110 e domínio de ubiquitina contendo 2); desenvolvimento neurológico (Neurolisina e Panexina-1); homeostase e metabolismo (Domínio glicose-frutose oxidorredutase ,transportadores de zinco e ferro - Golgin RAB6, Copine-2, transportador de zinco ZIP12); regulação da expressão gênica (fatores de transcrição – proteínas de dedo de zinco 669 e splicing) integridade estrutural das

células (proteínas transmembrana e semelhantes a Kelch) e proteção celular (reparo de DNA – Sbunidade C do complexo SOSS, uracil-DNA glicosilase) (Cassandri, 2017; Maracci, 2016; Polishchuk et al, 2004; Anantharaman et al, 2002; Shi et al, 2019).

Curiosamente, no meio, na interseção de todos os grupos, não há nenhum elemento que está em todas as amostras de leite materno, assim como não há elemento em comum entre as amostras do leite de 04 e 06 meses com os demais estágios, com exceção dos meses de 0 e 1 e 02 e 04 de forma separada.

Portanto, este diagrama demonstra visualmente como os perfis de transcritos se modificam no leite materno ao longo do tempo, com a maioria dos elementos sendo específicos para certas idades e alguns específicos sendo compartilhados entre as diferentes fases. Contudo, apesar de primariamente possuírem elementos distintos, as ações destes elementos no leite materno maduro, dão continuidade ao fornecimento de um suporte multifacetado e sinérgico que objetiva o crescimento, desenvolvimento, diferenciação, absorção de nutrientes, manutenção da integridade celular, regulação da expressão gênica e de processos metabólicos e homeostáticos adequados. Reforçando os achados de que o leite materno maduro não contém apenas nutrientes, mas também fatores bioativos que podem modular processos importantes de forma isolada e sinérgica; proporcionando um ambiente celular mais robusto e responsivo, essencial para o crescimento e desenvolvimento do bebê durante os primeiros meses de vida, quando ele se encontra em uma fase crítica de crescimento e desenvolvimento.

**Tabela 04: Transcritos regulados positivamente e categorizados por função nos meses de 01-04, 02- 04 e 04-06 de lactação pela análise *in silico* , 2024.**

CATEGORIAS / PERÍODO	01 - 04	02 - 04	04 - 06
<b>Metabolismo</b>	DIAPH3, PLEKHA8P1, RN7SK, RMRP, VPS13D, GMPR, NUDCD1, ANKRD50, CORIN, ACSL4, SRSF1, LOC105374510, RCAN3.	DNAJC13, ASB8, NIP7, SNORD7S, SYNE3, RNF19A, PCIF1, HPS6, NADSYN1, GC, RPL10A	KXD1, SNORD44, DDA1, NLN, TMTC4, OGFOD2, MAP2K4P1, DTD1, FIS1, UBTD2, GFOD1
<b>Imunidade</b>	TNC, MIR150, SLIT3, IFI44L, BCL2L11, MIR146B, NUDCD1, PADI2	RNF19A, IL6R	MIR126, PANX1, THBS1, ZMAT3, MIR942, MIR215
<b>Desenvolvimento Neuronal</b>	DIAPH3, TSHZ2, SLIT3, ARHGAP26, KCNIP1, VSTM2B- DT, GPR158, NRG3, PADI2, RCAN3	LGR6, MAPRE3, SYNGR2, ZDHHC14	MIR1271, ZNF347, CLIP1, PANX1, CSPP1, MIR6875, ARHGAP39, CRABP1, MIR3620, MTA3, MAP2K4P1, MIR100
<b>Desenvolvimento Ósseo</b>	TNC, KAZN, CORIN	LGR6, LARGE1, SYNE3, GC	MIR126, THBS1, LTBP4
<b>Outras Funções</b>	LOC124902766 (desconhecida)		LOC124901926 (função desconhecida)

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Adicionalmente, pode-se observar na tabela 04 que com o tempo, os elementos fornecidos vão aumentando de complexidade. Por exemplo, em relação ao perfil metabólico o leite de 0-1 mês é rico em elementos metabólicos básicos e gerais (DIAPH3, VP13D, NUDCD1); com 02 – 04 meses começam a aparecer genes e metabólitos mais especializados (NADSYN1, GC) que indicam consonância com os processos energéticos e nutrientes; e com 04-06 meses, aparecem genes com funções celulares mais complexos (KXD1 e GFOD1) refletindo o suporte adequado a necessidade metabólica crescente da criança (Lin, 2021). O mesmo comportamento ocorre no quesito imunidade, onde com 0-1 mês estão em destaque os genes relacionados a imunidade inata (TNC, IFI44L, MIR146B); com 02-04 meses incluem elementos como a IL6R que reforçam a resposta inflamatória e por fim com 04 – 06 meses, elementos como MIR123 e THBS1 que indicam uma transição para funções imunológicas adaptativas (Gillis et al 2007; Simpson, 1997). De forma similar, o desenvolvimento neuronal inicia com a presença de elementos que irão suportar o desenvolvimento inicial do

sistema nervoso e as sinapses (NRG3, GPR158, KCNIP1); segue com elementos de fortalecimento estrutural e funcional (LGR6, CCDC88A, SYNE3) e no último grupo apresenta elementos com funções mais refinadas relacionadas as conexões neurais e plasticidade sináptica, importantes para o aprendizado e adaptação coerentes com o período de 04 - 06 meses de uma criança (MIR1271, ARHGAP39, ZMAT3) (Wang et al, 2018; Polishchuk et al, 2004; Anantharaman et al, 2002; Lin, 2021; Yao et al, 2023). A função óssea, atua da mesma forma, com elementos envolvidos no suporte inicial do desenvolvimento esquelético (TNC e KAZN), seguido do fortalecimento ósseo (GC – metabolismo de vitamina D) e suporte ao crescimento e remodelação (LTBP4) (Gillis et al 2007).

Na tabela 05, que abrange outras funções exercidas pelos elementos presentes no leite materno que se encontram regulados positivamente, indica o mesmo comportamento entre os grupos. No 01 - 04 meses, há predominância de genes relacionados ao estabelecimento inicial de redes de comunicação celular e desenvolvimento tecidual (TNC, SLIT3); presença de miRNAs envolvidos na modulação epigenética (MIR150, MIR146B, RN7SK) e genes associados a angiogênese e remodelação vascular (CORIN, THBS1) que podem fornecer subsídio ao desenvolvimento vascular inicial (Smith et al, 2015; Gillis et al 2007; Dong et al, 2020). Nos meses seguintes (02 - 04, 04 - 06), aparecem elementos que darão continuidade ao suporte de interação celular (SYNE3, LGR6); começa a incluir genes e RNAs adicionais (MTA3, MIR215 para regulação epigenética; elementos relacionados a processos metabólicos homeostáticos otimizados (NADSYN1); elementos adicionais que atuarão no sistema nervoso (ARHGAP39) e se mantêm a resposta ao estresse (RNF19A) (Deng et al, 2014; Lin, 2021; Yao et al, 2023; Gong et al, 2012).

**Tabela 05: Transcritos regulados positivamente e categorizados por outras funções nos meses de 01-04, 02-04 e 04-06 de lactação pela análise in silico , 2024.**

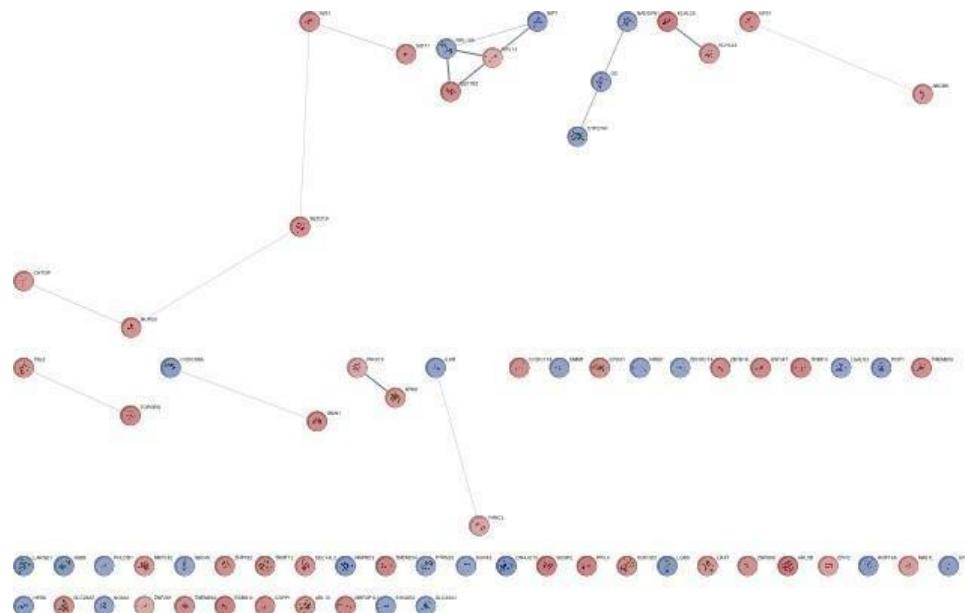
OUTRAS CATEGORIAS / PERÍODO	01 – 04	02 – 04	04 – 06
Comunicação Celular	TNC, SLIT3, GPR158, NRG3	LGR6, SYNE3, SYNGR2	PANX1, THBS1, LGR6
Regulação Epigenética	MIR150, MIR146B, RN7SK	NIP7 (via processamento de RNA, com influência epigenética indireta), PCIF1	MTA3, MIR215, MIR100
Homeostase Energética	GMPR, ACSL4, NUDT3, VPS13D	NADSYN1, RNF19A, ASB8	FIS1, GFOD1, OGFOD2
Angiogênese e Desenvolvimento Vascular	TNC, SLIT3, CORIN	IL6R, LGR6	MIR126, THBS1
Resposta ao Estresse Celular	IFI44L, RCAN3	RNF19A, PCIF1	ZMAT3, MIR215
Diferenciação e Proliferação Celular	DIAPH3, TSHZ2, PADI2	LARGE1, CCDC88A, MAPRE3	DDA1, CSPP1, CLIP1
Transporte e Modificação de Nutrientes	SLC12A2, ACSL4	GC (transporte de vitamina D), NADSYN1	GC, CRABP1
Plasticidade Sináptica	NRG3, GPR158, KCNIP1	SYNGR2, ZDHHC14	ARHGAP39, SYNGR2
Proteostase (Degradção e Reciclagem de Proteínas)	VPS13D, PLEKHA8P1	RNF19A, ASB8	ASB8, RNF19A

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

## 5.5 ANÁLISE DE INTERAÇÕES ENTRE AS AMOSTRAS

Nas figuras 11, 12 e 13 abaixo, tem-se os resultados obtidos do programa Cytoscape que objetiva visualizar e analisar as redes moleculares, como as interações proteína-proteína, redes metabólicas e redes de expressão gênica; para integrar os dados obtidos e entender melhor as interações e funções biológicas dos genes e proteínas. Dando ênfase ao leite materno maduro, que se refere aos resultados comparativos de 01 – 04 meses, 02 - 04 meses, e os dados de 04 - 06 meses; foram avaliadas a expressão e a modulação positiva e negativa dos genes em relação a duas amostras por vez. Não foi possível dar prosseguimento da análise com o enriquecimento funcional através da Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), devido ao tamanho insuficiente das amostras e ausência de interações diretas e robusta entre os elementos encontrados.

**Figura 11: Análise de interações dos transcritos diferencialmente expressos no leite materno de 02 – 04 meses de lactação, 2024.**



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Na figura 11, representados os meses de 02 e 04 meses, pode-se observar que existem 09 interações entre genes, sendo dois clusters mais significativos envolvendo 04 e 05 genes cada respectivamente. Adicionalmente, 47 elementos não interagem entre si e estão dispostos separadamente abaixo da imagem em linha reta.

Em duas destas interações existe uma relação inversa (entre o CCDC88A e GNAI1, e o IL65 e FANCL), onde o primeiro aumenta sua expressão enquanto o outro a diminui. Na primeira, o CCDC88A aumentado é a Coiled-coil domain-containing protein 88A, também conhecido como Girdin; uma proteína presente na regulação do citoesqueleto, motilidade celular, sinalização para migração, formação de sinapses e na neurogênese adequada do bebê (Nahorski et al, 2016). Já a GNAI1, Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1 diminuída, está inserida na sinalização celular e produção mais elevada de cAMP (adenosina monofosfato cíclico), que instigam a proliferação e diferenciação celular (Bonkowski et al, 2024). A combinação destas duas interações pode promover um ambiente equilibrado em relação aos processos de sinalização celular, garantindo que as células respondam adequadamente aos estímulos de crescimento e desenvolvimento na formação de um ambiente favorável para o desenvolvimento neurológico, cognitivo e motor adequados (Bonkowski et al, 2024; Nahorski et al, 2016). Na segunda dupla, o aumento da ILR6, receptor de

interleucina 6, responsável pela regulação da resposta imune; provavelmente fortalece o sistema imunológico do bebê, promovendo uma resposta imune eficaz e regulada (Simpson, 1997). De forma adicional, a diminuição do FANCL ou FANCI-associated Nuclease, gene responsável pelo reparo de DNA tem impacto limitado nesta fase (02 – 04 meses) (Casado, 2009). Uma vez que a maioria das funções de reparo já são autônomas, a oferta destes elementos promoveria um suporte adicional, mas não crítico.

As quatro outras interações ocorrem em duplas que diminuem sua expressão ao serem diminuídas, a saber: PIK3C3 e MTM1, KLHL25 e KLHL42, NFS1 e ABCB6 e TBL2 e TOPORS. A PIK3C3, codifica a subunidade catalítica da fosfatidilinositol 3-quinase classe III (PI3K) e está envolvida em várias funções celulares, incluindo a autofagia; e a MTM1, codifica a miotubularina, atuante no processo de manutenção da integridade muscular. Já a KLHL25 e a KLHL42, são membros das proteínas de Kelch, envolvidas em processos de ubiquitinização e degradação de proteínas (Shi et al, 2019; Yang, 2021). A NFS1, está envolvida na biogênese de clusters de ferro-enxofre; a ABCB6, é uma transportadora de membrana envolvida na homeostase do ferro e síntese de porfirinas; e por fim, a TBL2 está envolvida na regulação do metabolismo lipídico e a TOPORS na ubiquitinização de proteínas (Tsukumo et al, 2014). Embora a expressão diminuída desses genes e proteínas no leite materno de 02 e 04 meses possam ter alguns impactos teóricos nos processos biológicos e proteínas no bebê, é importante lembrar que o leite materno fornece diminuição de suas respectivas expressões; mas, que continua fornecendo estes e outros fatores bioativos diversos que, em conjunto, suportam o crescimento e o desenvolvimento saudável do bebê por outras vias (Donavan, 2008). Adicionalmente, o impacto direto desses elementos específicos diminuídos pode ser mitigado pela regulação interna e pelos mecanismos homeostáticos já existentes no bebê, que realizar sua própria regulação autófágica, muscular, ubiquitinização e metabolismo do ferro intracelularmente (Cook, 2005; Casado, 2009).

Após as interações duplas, temos uma interação positiva de um trio, formado pelo GC, CYP27A1 e NADSYN1. A GC, globulina ligadora de corticosteróides, atua na regulação hormonal ao disponibilizar hormônios na

corrente sanguínea; a CYP27A1, é uma enzima envolvida na síntese de ácidos biliares e da vitamina D; e a NADSYN1, é a enzima responsável pela síntese de NAD+, com impacto no metabolismo energético (Lin, 2021). A expressão aumentada destes elementos, podem desencadear uma melhor regulação hormonal, metabólica, saúde óssea e desenvolvimento esquelético no suporte do desenvolvimento geral e saudável do bebê (Bonkowski et al, 2024; Simpson, 1997).

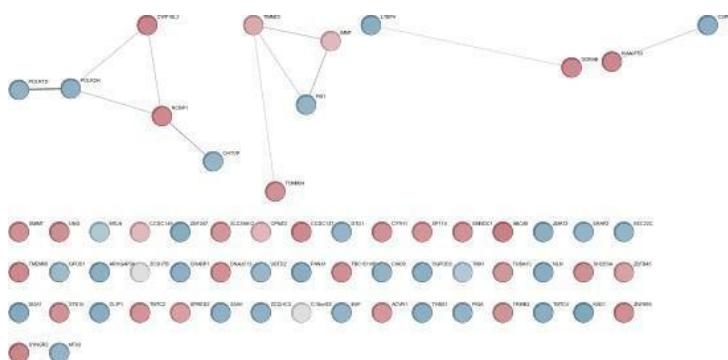
Agora as duas interações que possuem um número maior de elementos envolvidos são a interação negativa entre o IWS1, SIDT1, NUP50 e CHTOP; e a interação mista onde o RPL14 diminuído, diminui EEF1BS, que aumenta NIP7 e RPL10A (Morello et al, 2011). A primeira interação negativa, está intimamente relacionada a diminuição de elementos reguladores dos processos de transcrição e regulação gênica de RNAs (Izumikawa et al, 2018). Por fim, a RPL14, é uma proteína ribossomal; que ao ser diminuída no leite junto a EEF1BS, Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Beta 2, diminuem os reguladores de síntese proteica fornecidos (Huang et al, 2006). Já o aumento da expressão de NIP7, proteína nucleolar envolvida na biogênese ribossomal e o aumento da RPL10A, componente ribossômico; atuam mantendo a produção ribossômica e de tradução proteica em contraparte (Huang et al, 2006; Morello et al, 2011).

De forma geral, neste mesmo marco temporal de 02 – 04 meses, com base na tabela 03 em anexo, 19 elementos possuem expressão aumentada e 30 possuem expressão diminuída no total, com base nos valores encontrados de Log2Fc. Os elementos que aumentam sua expressão, possuem log variando de ~7,39 até ~6,32 e encontram-se em seu top 03: o DNAJC13 (+ 7.39), LGR6 (+7.086) e ASB8 (+ 7.081), envolvidos no tráfego de proteínas e na resposta ao estresse celular, na sinalização e no desenvolvimento celular e na regulação da degradação de proteínas respectivamente (Wickner et al, 1991; Gong et al, 2012). Outros elementos também irão dar suportes ao demais processos celulares como a MAPRE3, perante a dinâmica dos microtúbulos e transporte intracelular; a LARGE1, na modificação de proteínas; a CCDC88A na migração e organização cito esquelética junto com a SYNE3 e a SNORD75, na modificação e processamento de rRNA, por exemplo (Nahorski et al, 2016; Walimbe, 2020).

Estes elementos irão contribuir no crescimento e desenvolvimento saudável do bebê.

Em relação a diminuição da expressão dos elementos, em geral temos 30 itens que apresentaram log negativo de  $\sim 7,3$  e  $\sim 5,7$ . Entre os 03 primeiros estão o MIR654 (- 7, 347), ARL5B (- 7.361) e o KLHL25 (- 7.385), envolvidos na regulação da expressão gênica, tráfego intracelular e regulação proteica, respectivamente (Shi et al, 2019; Simpson, 1997). Outros elementos também que estariam inseridos nos processos celulares de síntese proteica (SENP2, PPIL4, TRIM13); na regulação da expressão gênica (SETD1A, Topoisomerase I Binding, Zinc Finger Protein 347, G Protein Subunit Alpha I1); no metabolismo do ferro (NFS1) e na eficiência metabólica (MRPL42, EEF1B2 e NFS1) estarão nesta amostra temporal do leite, sendo transferidos em menor quantidade que nos meses anteriores (Huang et al, 2006; Shi et al, 2019).

**Figura 12: Análise de interações dos transcritos diferencialmente expressos no leite materno de 04 –06 meses de lactação, 2024.**



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Na figura 12, que representa os meses de 04 e 06 meses, podemos observar que existem 04 interações entre os elementos, sendo dois clusters mais significativos envolvendo 06 e 04 genes cada; e duas interações entre duplas. Sendo que aqui temos 50 elementos na linha de baixo que não interagem entre si e estão dispostos separadamente abaixo na imagem. Mas que ao serem analisados pelo programa, 05 elementos (THBS1, ZMAT3, SIVA1 aumentados e

GORAB diminuído puderam enriquecer a via da P53 de sinalização, crucial para a regulação do ciclo celular, reparo de DA e apoptose na melhora da resposta ao estresse e promoção da integridade genômica (Agarwal, 1998).

O primeiro cluster, envolve os 05 elementos: CWF19L2 e NCBP1 que estão diminuídos, POLR2H que está aumentado e secundariamente, POLR2H e CHTOP que também se encontram aumentados. Este grupo está relacionado com os processos de regulação da expressão gênica através dos elementos NCBP1e POLR2H, responsáveis pelo processamento de mRNA e parte integrante da RNA polimerase II; reparo e manutenção da estabilidade genômica através do CWF19L2 e o CHTOP através da modificação de cromatina (Izumikawa et al, 2018). O único aumento de expressão está no Chromatin target of PRMT1, CHTOP, que poderá influenciar a expressão genética e assim a disponibilidade proteica para as diversas funções celulares (Thiebaut, 2021; Izumikawa et al, 2018).

O cluster do meio, envolve os 04 elementos: TIMM23 diminuido, FIS1 aumentado, TOMM34 e IMMT diminuídos; onde o TIMM23 é o elo principal entre os demais itens. O TIMM23, Translocase of the Inner Membrane 23 é a parte do complexo de translocação que auxilia na importação de proteínas para dentro da mitocôndria; já o FIS1, Fission 1, é envolvido na divisão mitocondrial; o TOMM34, Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 34, auxilia na importação de proteínas e o IMMT, Inner Membrane Mitochondrial Protein, auxilia na estrutura e função interna mitocondrial (Casado, 2009; Oliveira, 2021). A diminuição de expressão dos elementos mitocondriais (TIMM23, TOMM34, IMMT) indica menor transferência destes elementos de suporte mitocondrial, ao mesmo tempo em que se aumenta a expressão do elemento FIS1, sugerindo uma maior transferência do elemento funcional para fissão mitocondrial celular (Oliveira, 2021). No entanto, espera-se que a saúde mitocondrial seja garantida através da própria maturação natural destes elementos internos nesta fase de vida do bebê, de 04 a 06 meses; já que as mitocôndrias são essenciais para a produção de energia, sinalização celular, apoptose e metabolismo dos nutrientes com impacto direto no desenvolvimento do lactente (Cook et al, 2005).

Por fim, as duas duplas de interação presentes estão entre os elementos:

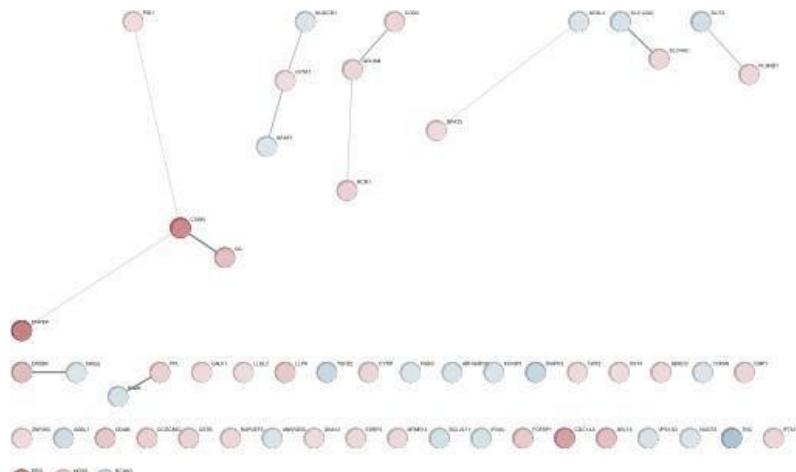
LTBP4 e, CSPP1 e KIAA0753; onde o primeiro ao ser mais expresso diminui a expressão do segundo. O LTBP4 aumentado, proteína envolvida na regulação da sinalização do TGF- $\beta$  (transforming growth factor-beta) no reparo e desenvolvimento tecidual; junto ao CSPP1, envolvida na organização do citoesqueleto e na formação do fuso mitótico durante a divisão celular; diminuição de expressão do GORAB, proteína associada ao aparelho de Golgi; e de KIAA0753 ou C2CD3, proteína envolvida na ciliogênese irão trazer elementos importantes para o desenvolvimento de tecidos e órgãos (LTBP4) e na divisão e função celular do lactente (CSPP1) (Polishchuk et al, 2004; Anantharaman et al, 2002).

De forma geral, neste mesmo marco temporal de 04 – 06 meses, com base na tabela 03 em anexo, 29 elementos possuem expressão aumentada e 14 possuem expressão diminuída no total, com base nos valores encontrados de Log2Fc. Os elementos que aumentam sua expressão, possuem log variando de  $\sim 7,8$  até  $\sim 3,0$  e encontram-se em seu top 03: o MIR1271 (+ 7.82), MIR126 (+7.45) e KXD1 (+ 7.23). Os dois primeiros são miRNAs responsáveis pela regulação da angiogênese e diversos processos celulares incluindo apoptose, ciclo celular e diferenciação; e o terceiro participa nos processos de modificação de RNA, ubiquitinização e regulação do ciclo celular junto a outros elementos também positivos como o SNORD44, LOC1249 E DDA1 (Wang et al, 2018). Os elementos que também estão positivamente expressos no leite materno de 04 – 06 meses, atuam na regulação do citoesqueleto (CSPP1, CLIP1, ZN347), processamento de peptídeos (NLN, Neurolysin), formação de canais de comunicação (PANX1) e regulação da resposta mediada por estresse (ZMAT3) (Checler et al, 2018; Macvicar, 2010).

Dentre os 14 elementos que diminuem sua expressão, possuem log variando de  $\sim 7,25$  até  $\sim 3,8$  e encontram-se em seu top 03: o ABCA5 (- 7.25), SYNGR2 (- 6.85) e CWF19L2 (- 6.84), responsável pelo transporte lipídico, regulação da transcrição gênica e reparo do DNA respectivamente (Ray et al, 2020). Outros elementos terão ação nos processos celulares de ciliogênese e organização cito esquelética (CCDC149, CCDC127, KIAA0753, TUBA1C), transdução de sinais (CPNE2), sinalização sináptica (ZBTB45, SYNGR2) e resposta imune (SP110),

transporte de zinco (SLC39A12) (Cassandri, 2017; Nahorski et al, 2016; Ray et al, 2020). Ambas as expressões positivas e negativas trarão perdas e ganhos nos processos de desenvolvimento e crescimento celular, função mitocondrial e metabólica e de resposta ao estresse e imunidade.

**Figura 13: Análise de interações dos transcritos diferencialmente expressos no leite materno de 01 –04 meses de lactação, 2024.**



Fonte: Elaborado pelas autora, 2024

De acordo com a figura 13 acima e a tabela 02 presente no anexo, estão representadas as interações dos elementos presentes no leite materno de 01 e 04 meses do estudo 02; que apresentam 08 interações no total. Sendo estas, 05 duplas, dois trios e um quarteto.

A maior interação representada pelo quarteto, envolve a influência do CUBIN que ao ter sua expressão reduzida, diminui também a expressão do ENPEP, GC e PID1. A CUBIN, Culinin atua na absorção de vitamina B12 pelos rins e intestino; a GC, é uma proteína de ligação da vitamina D responsável pelo seu transporte; a ENEP, Glutamyl aminopeptidase, é uma enzima envolvida na regulação da pressão arterial e renal através do sistema renina-angiotensina e a PID1, Phosphotyrosine Interaction Domain containing 1, é um gene associado a regulacão do metabolismo lipídico e glicêmico (Kaseda et al, 2011; Sanz, 2007).

O trio interativo, é composto pelas CPSF1 que ao ser diminuída sua expressão, aumentam a expressão de NUDCD1 e SRSF1. A *cpsf1*, Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 1, é uma proteína envolvida no processamento do mRNA; a NUDCD1, está relacionado com a regulação citoesquelética e a SRSF1 é um fator de splicing que regula a edição do RNA (Elkon, 2013).

As demais interações são relacionadas a diminuição dos elementos presente nas funções do complexo de golgi (GOLIM4, Golgi Integral Membrane Protein 4 e GOG3, Golgi Complex Subunit 3) e resíduos de caseína (RCN1); o aumento da expressão de co- transportadores (SLC12A2, Solute Carrier Family 12 Member 2) de íons (sódio, potássio cloro) e consequente diminuição dos antiportadores de cloreto e bicarbonato (SLC4A2, Solute Carrier Family 4 Member 2); o aumento também (SLIT3, Slit Guidance Ligand 3) de proteínas envolvidas na sinalização axonal e angiogênese e diminuição dos receptores (PLXND1, Plexin D1) de semaforinas que auxiliam na orientação axonal; a diminuição de receptores de tirosina (ERBB4, Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4), com consequente aumento do ligante (NRG3, Neuregulin 3) que interage com estes receptores; a diminuição de proteínas (PPL, Periplakin) associadas à formação dos desmossomos e da integridade da barreira epitelial com aumento de elementos envolvidos na adesão celular e formação dos desmossomos (KAZN, Kazrin) e por fim, a diminuição de enzima (GPAT3, Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase 3) atuante na biossíntese de triglicerídeos com aumento de outra enzima envolvida (ACSL4, Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 4) na ativação de ácidos graxos de cadeia longa (Polishchuk et al, 2004; Anantharaman et al, 2002; Talmage, 2008). Portanto, pode-se perceber que em geral há uma troca e um equilíbrio entre a diminuição da expressão de alguns elementos e o aumento de outros que estão envolvidos com o objetivo semelhante.

De acordo com a tabela 02 no anexo, em geral, temos 31 expressões positivas e 112 negativas de acordo com os valores de log fold change. As expressões positivas possuem log que variam de  $\sim + 2,59$  e  $\sim + 1,002$  possuindo como os três primeiros: TNC (+ 2,59), MIR150 (+2,242) e DIAPH3 (+1,694), responsáveis pelo processo de cicatrização e modulação da resposta imune, regulação da expressão gênica e formação do citoesqueleto, respectivamente (Gillis et al 2007). Outros componentes também poderão auxiliar na maturação do sistema imunológico (miRNAs, IFI44L e MIR146B), desenvolvimento neural (SLIT3 e NRG3), regulação celular e crescimento (BCL2L11), metabolismo (ACSL4 e GMPR) e equilíbrio eletrolítico (SLC12A2) (Smith et al, 2015; Elahi, 2019; Talmage, 2008).

As 112 expressões negativas possuem log que variam de  $\sim$  - 4,613 e  $\sim$  - 1,008., possuindo como os três primeiros: RNA5S2 (- 4,613), ENPEP ( -4,025) e CUBIN (-3,706), responsáveis por compor ribossomos, auxiliar no metabolismo de peptídeos e pressão arterial e absorção de vitamina B12 respectivamente (Kaseda et al, 2011; Zhou et al, 2015). Outros elementos de expressão reduzida, englobam genes ribossomais (RNA5S3, RNA5S1, RNA5S2), transcritos não codificantes (TRK-TTT6-1, TRK-TTT2-1, TRK-TTT4-1), proteínas estruturantes (KRT78), fosfatas (CDC14), exoribonucleases (ERI3), inibidores de protease (CSTB), dentre outros que irão influenciar em menor magnitude os processos celulares gerais de sinalização celular, metabolismo proteico e lipídico, regulação gênica, função imune e desenvolvimento neurológico (Zhou et al, 2015; Tingo et al, 2021). Do ponto de vista imunológico, a expressão negativa de genes relacionados à apoptose (MTRNR2L12) pode indicar uma menor predisposição a respostas imunes descontroladas (Huth et al, 2024). Adicionalmente, a expressão positiva de VPS13D (autofagia) e a negativa de MTRNR2L12 (proteção contra apoptose induzida pelo estresse) indicam um balanço entre a renovação celular e a proteção contra estresses celulares (Huth et al, 2024).

A expressão desses genes, proteínas, enzimas e elementos celulares no leite materno podem oferecer um ambiente bioquímico rico que apoia o desenvolvimento imune, neural e metabólico do bebê. A presença dessas proteínas e RNAs em menor ou maior magnitude podem influenciar diretamente processos celulares críticos, garantindo que o bebê tenha os componentes necessários para um crescimento saudável e um desenvolvimento adequado.

## 6. LIMITAÇÕES

Dentre as limitações do estudo é importante salientar que não foi possível fazer a análise do leite materno maduro até o primeiro ou segundo ano de vida por indisponibilidade dos dados brutos nos bancos de dados disponíveis, o que limitou a pesquisa até o marco temporal de 06 meses. Em relação aos bancos de dados disponíveis, observou-se que a amostra era oriunda de lactentes predominantemente brancas que não refletem a genética da população Baiana.

Os estudos anteriores que abordaram este tema também utilizaram ferramentas que estão obsoletas atualmente e, portanto, alteram os resultados e inviabilizam a comparação direta com o que foi encontrado. Reforça-se que a bioinformática é um campo de estudo que está em constante atualização, o que torna possível que esta limitação seja encontrada, mas também, que intensifica a necessidade de atualização constante.

## 7. CONCLUSÕES

O leite materno é conhecido como o primeiro alimento de todo ser humano. No entanto, as novas tecnologias permitiram que fosse possível ampliar sua aplicabilidade para além do seu fator nutricional já bem estabelecido. A partir dos achados encontrados com a análise da expressão gênica até então, se torna possível afirmar que o leite materno fornece não só carboidratos, proteínas e lipídeos como também carreia uma série de compostos bioativos e RNAs que anteriormente não eram relacionados ao leite, mas hoje sabe-se que estão presentes para serem igualmente ingeridos pelo lactante.

Portanto, a presença desses genes, proteínas, enzimas e elementos celulares no leite materno possibilitam a promoção de um suporte adicional ao desenvolvimento infantil, neural, metabólico e imunológico do organismo ainda imaturo; e elucidam as estatísticas correlacionais dos estados de saúde e doença infantis com a prática positiva da amamentação. Apesar de algumas proteínas encontradas ainda não possuírem suas funções completamente compreendidas, é possível que as proteínas e miRNAs conhecidos influenciem em processos celulares críticos e garantam assim, que o bebê os obtenham de forma passiva, proporcionando um ambiente celular mais robusto e responsivo, essencial para o crescimento e desenvolvimento infantil durante os primeiros meses de vida, quando ele se encontra em uma fase crítica de crescimento e desenvolvimento.

O leite materno maduro se configura como um leite com um perfil genético diferente do leite inicial, mas que demonstra manter a transferência destes elementos reguladores de forma dinâmica e continuamente refinada e especializada de acordo com a complexidade do desenvolvimento infantil. Ao longo dos meses, foram observadas variações entre seus elementos, mas que possuíam semelhante função regulatória de superior complexidade. A diminuição ou regulação negativa de alguns componentes não se traduz como negativa, uma vez que o lactente se torna cada vez mais independente e maduro em suas funções intrínsecas e biológicas ao passar do tempo. Portanto, as ações dos transcritos específicos transferidas a partir do leite materno maduro dão continuidade ao fornecimento de um suporte multifacetado e sinérgico que objetiva o crescimento, desenvolvimento, diferenciação, absorção de nutrientes,

manutenção da integridade celular, regulação da expressão gênica e de processos metabólicos e homeostáticos de forma específica que acompanham a complexidade de crescimento crescente.

Não foi possível analisar seu comportamento a longo prazo devido a não disponibilidade dos dados brutos. Mas enfatiza-se a necessidade de mais estudos padronizados e bem delimitados para que seja possível definir o seu comportamento e perfil ao longo dos anos e assim orientar as práticas de amamentação continuada no Brasil e no mundo. Assim como, contribuir com o enriquecimento de fórmulas infantis para os bebês impossibilitados desta prática.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul. **Imunologia básica**. Elsevier Brasil, 2014.
- ALMEIDA RM, Santana LSG, Reis RB & Lopes THCR (2020). Child mortality in the state of Bahia: conditioners and spatial analysis. *Research, Society and Development*, 9(7): 1-17, e726974660.
- ALSAWEED M, Lai CT, Hartmann PE, Geddes DT, Kakulas F. Human Milk Cells and Lipids Conserve Numerous Known and Novel miRNAs, Some of Which Are Differentially Expressed During Lactation. *PloS One* (2016) 11(4):e0152610. doi: 10.1371/journal.pone.0152610.
- ALSAWEED, M.; HARTMANN, P.E.; GEDDES, D.T.; KAKULAS, F. MiRNAs in Breastmilk and the Lactating Breast: Potential Immunoprotectors and Developmental Regulators for the Infant and the Mother. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2015, 12, 13981–14020.
- ANANTHARAMAN, Vivek; ARAVIND, L. The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. **Genome biology**, v. 3, p. 1-7, 2002.
- AQUINO, Maria Eduarda et al. Resposta imune inata e inflamação. 2021.
- ATALA, M. Embriologia: desenvolvimento humano inicial. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan, 2003. 188 p.
- BAUER, Jacqueline; GERSS, Joachim. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clinical nutrition*, v. 30, n. 2, p. 215-220, 2011.
- BAUMGARTH, Nicole. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 1, p. 34-46, 2011.
- BECHARA, G.H., SUDO, L.S., RIBEIRO DOS SANTOS, R., GARCIA LEME, J. Modulation by lymphocytes of the vascular effects caused by inflammatory mediators and carrageenin in the rat. *Br. J. exp. Path.*, 57:497-504, 1976.
- BELINI, Gabriela Fagan et al. Incidência de infecções respiratórias em crianças até 4 anos: relação com o cumprimento do calendário vacinal. **Rev Ciênc Saúde**, v. 6, n. 1, p. 18-23, 2021.
- BIANCHI, Marco E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 81, n. 1, p. 1-5, 2007.
- BONKOWSKI, Emily; FATHI, Esmat; MEFFORD, Heather C. GNAI1-Related Neurodevelopmental Disorder. **GeneReviews®**, 2024.

BRANDTZAEG, P. (2003) Mucosal immunity: integration between mother and the breast- fed infant. *Vaccine* 21: 3382–3388.

BRANDTZAEG, Per; Pabst, Reinhard (novembro de 2004). «Let's go mucosal: communication on slippery ground». *Trends in Immunology* (em inglês) (11): 570–577. doi:10.1016/j.it.2004.09.005.

BRASIL. Guia alimentar para crianças brasileiras menores de 2 anos. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção Primária à Saúde. Departamento de Promoção da Saúde. — Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Banco de Leite Humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. Série Tecnologia em Serviços de Saúde. Brasília, 2008.

CARNEY MC, Tarasiuk A, DiAngelo SL, Silveyra P, Podany A, Birch LL, et al. Metabolism- Related miRNAs in Maternal Breast Milk Are Influenced by Premature Delivery. *Pediatr Res* (2017) 82(2):226–36. doi: 10.1038/pr.2017.54

CARULA, Karoline. Perigosas amas de leite: aleitamento materno, ciência e escravidão em A Mãe de Família. História, Ciências, Saúde-Manguinhos [online]. 2012, v. 19, suppl 1 Acessado 17 Julho 2024, pgs. 197-214.

CARVALHO, Marcos Renato; TAVARES, Luís Alberto. Amamentação: base científica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

CASADO, B; AFFOLTER, M; KUSSMANN, M. OMICS-rooted studies of milk proteins, oligosaccharides and lipids. *Journal of Proteomics*, v. 73, n.2, p. 196-208, 2009.

CHANDRAN D, Warren K, McKeone D, Hicks SD. The Association between Infant Colic and the Multi-Omic Composition of Human Milk. *Biomolecules* 2023 Mar 18;13(3). PMID: 36979494

CHECLER, Frédéric; FERRO, Emer S. Neurolysin: From initial detection to latest advances. *Neurochemical Research*, v. 43, p. 2017-2024, 2018.

CONDINO-NETO, Antonio. Susceptibility to infections: immunological immaturity or immunodeficiency?/Susceptibilidade a infecções: imaturidade imunológica ou imunodeficiência?. *Revista de Medicina*, v. 93, n. 2, p. 78-83, 2014.

COOK, Joan Littlefield; COOK, Greg. **Child development: Principles and perspectives**. Pearson Education New Zealand, 2005.

COSTA, Luhana Karoliny Oliveira et al. Importância do aleitamento materno exclusivo: uma revisão sistemática da literatura. *Revista de Ciências da Saúde*, 2013.

COSTA, Valerio et al. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, 2010.

CRISTINA, Adenilda. Aspectos cronobiológicos e citocinas do diabetes gestacional e do leite materno. *Revista Panorâmica online*, v. 19, 2015.

CZOSNYKOWSKA-ŁUKACKA, Królak-Olejnik B, Orczyk-Pawiłowicz M. Breast milk macronutrient components in prolonged lactation. *Nutrients*. (2018) 10:E1893. doi: 10.3390/nu10121893

CZOSNYKOWSKA-ŁUKACKA, Matylda et al. Changes in human milk immunoglobulin profile during prolonged lactation. *Frontiers in pediatrics*, v. 8, p. 428, 2020.

D.D. Dombrowicz, V. Julia, N. Glaichenhaus, and V. Verhasselt., "Breast milk immune complexes are potent inducers of oral tolerance in neonates and prevent asthma development" *Mucosal Immunology*, Vol.3, no 5, pp. 461-474, 2010.

DAVISSE-PATURET C, del-Patient K, Divaret-Chauveau A, Pierson J, Lioret S, Cheminat M, et al. Breastfeeding status and duration and infections, hospitalizations for infections, and antibiotic use in the first two years of life in the ELFE cohort. *Nutrients*. (2019) 11:1607. doi: 10.3390/nu11071607.

DE CARVALHO, Bruno Gil; COSTA, Maria da Conceição Nascimento. Mortalidade infantil e seus componentes em Salvador-BA, 1980-1991. 1998.

DE LIMA, Edilson Gomes (2014). Bionanotecnologia: a interface entre homens e átomos. São Paulo: Clube dos autores. p. 181.

DE MAGALHAES, Eugenio Fernandes et al. Analysis of respiratory virus prevalence in assisted children in a university hospital of southern of minas gerais. *Rev Med Minas Gerais*, v. 2017, n. 27, 1870. —Eugenio Fernandes de Magalhaes1, Claudine Leôncio.

DE SILVA, Wilmar Dias; MOTA, Ivan .Imunologia Básica e Aplicada, guanabara kooogan,2003.

DENG, Yujie et al. MiR-215 modulates gastric cancer cell proliferation by targeting RB1. **Cancer letters**, v. 342, n. 1, p. 27-35, 2014.

DIMOVA, Evgeniya G.; BRYANT, Peter E.; CHANKOVA, Stephka G. Adaptive response: some underlying mechanisms and open questions. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 396-408, 2008.

DONG, Ningzheng et al. Function and regulation of corin in physiology and disease. **Biochemical Society Transactions**, v. 48, n. 5, p. 1905-1916, 2020.

DONOVAN, Sharon M. et al. (Ed.). Human milk: composition, clinical benefits and future opportunities. Karger, 2019.

ELAHI, Shokrollah et al. Immunosuppressive CD71+ erythroid cells compromise neonatal host defence against infection. **Nature**, v. 504, n. 7478, p. 158-162, 2013.

ELKON, Ran; UGALDE, Alejandro P.; AGAMI, Reuven. Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 7, p. 496-506, 2013.

ESPINDULA, Eliandro, 2019. Metodologias para análise de experimentos de Dual RNA- seq: aplicação da melhor estratégia no estudo das interações entre Azospirillum brasiliense e milho durante a inibição da produção de Ácido Indol-3-Acético pela planta.

ESPOSITO, S., C. Daleno, G. Prunotto, A. Scala, C. Tagliabue, I. Borzani, E. Fossali, C. Pelucchi, and N. Principi. 2013. Impact of viral infections in children with community- acquired pneumonia: results of a study of 17 respiratory viruses. In *Influenza Other Respir. Viruses* 7: 18–26, 2013.

ETIENNE-MANNEVILLE, Sandrine; HALL, Alan. Rho GTPases in cell biology. **Nature**, v. 420, n. 6916, p. 629-635, 2002.

FAGARASAN, Sidonia; HONJO, Tasuku. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 1, p. 63-72, 2003.

FRANÇA L, Espinosa-Martos I, García-Carral C, Manzano S, McGuire MK, Meehan CL, et al. What's normal? Immune profiling of human milk from healthy women living in different geographical and socioeconomic settings. *Front Immunol.* (2017) 30:696. doi: 10.3389/fimmu.2017.00696.

GANTT, S., A. Gervassi, H. Jaspan, and H. Horton. 2014. The role of myeloid derived suppressor cells in immune ontogeny. *Front. Immunol.* 5: 387.

GERMAN, Goonatilleke E, Huang J, Xu G, Wu L, Smilowitz JT,, et al. Human milk proteins and their glycosylation exhibit quantitative dynamic variations during lactation. *J Nutr.* (2019) 149:1317–25. doi: 10.1093/jn/nxz086.

GERMAN, JB, Dillard CJ, Ward RE. Bioactive components in milk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2002;5(6):653–8.

GERVASSI, A., N. Lejarcegui, S. Dross, A. Jacobson, G. Itaya, E. Kidzeru, S. Gant, H. Jaspan, and H. Horton. 2014. Myeloid derived suppressor cells are present at high frequency in neonates and suppress in vitro T cell responses. *PLoS One* 9: e107816.

GILLIS, Todd E.; MARSHALL, Christian R.; TIBBITS, Glen F. Functional and evolutionary relationships of troponin C. **Physiological genomics**, v. 32, n. 1, p. 16-27, 2007.

GLEESON, John P. et al. Profiling of mature-stage human breast milk cells

identifies six unique lactocyte subpopulations. *Science Advances*, v. 8, n. 26, p. eabm6865, 2022.

GOMES, Cleodete Candida. Concentração de minerais em leite humano maduro de banco de leite. 2015.

GONATILEKE E, Huang J, Xu G, Wu L, Smilowitz JT, German JB, et al. Human milk proteins and their glycosylation exhibit quantitative dynamic variations during lactation. *J Nutr.* (2019) 149:1317–25. doi: 10.1093/jn/nxz086.

GONG, Xing et al. LGR6 is a high affinity receptor of R-spondins and potentially functions as a tumor suppressor. *PLoS one*, v. 7, n. 5, p. e37137, 2012.

GUTIERRES, Damiana Valente Guimarães Gutierrez. No colo da ama de leite: a prática cultural da amamentação e dos cuidados das crianças na Província do Grão-Pará no século XIX. 2013

H. MEISNER, AND J. HESS. 1999. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N. Engl. J. Med.* 341: 866–870.

HETTINGA, H.V Valenberg, V. de Sacco, S.Boeren, T. V Hooijdonk, J.V. Arendonk,,and J. Vervoort, “The Host Defense Proteome of Human and Bovine Milk”, *Plosone*, Vol. 6, pp.1- 8, 2011.

HICKS, Steven D. et al. Human Milk-Derived Levels of let-7g-5p May Serve as a Diagnostic and Prognostic Marker of Low Milk Supply in Breastfeeding Women. *Nutrients*, v. 15, n. 3, p. 567, 2023.

HICKS, Steven D. et al. Levels of breast milk microRNAs and other non-coding RNAs are impacted by milk maturity and maternal diet. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 785217, 2022.

HICKS, Steven D.; CONFAIR, Alexandra. Infant saliva levels of microRNA miR-151a-3p are associated with risk for neurodevelopmental delay. *International journal of molecular sciences*, v. 24, n. 2, p. 1476, 2023.

HUANG, Xiao-Ping et al. Alteration of RPL14 in squamous cell carcinomas and preneoplastic lesions of the esophagus. *Gene*, v. 366, n. 1, p. 161-168, 2006.

HUTH, Alina et al. Single cell transcriptomics of cerebrospinal fluid cells from patients with recent-onset narcolepsy. *Journal of Autoimmunity*, v. 146, p. 103234, 2024.

IBGE, Rio de Janeiro. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. (2020) Atlas de Desenvolvimento Humano do Brasil. Acesso em 13 de abril de 2024, <http://atlasbrasil.org.br/2013/>.

IZUMIKAWA, Keiichi et al. Modulating the expression of Chtop, a versatile regulator of gene-specific transcription and mRNA export. *RNA biology*, v. 15, n. 7, p. 849-855, 2018.

JONES, E.; SPENCER, S. A. The physiology of lactation. *Paediatrics and child*

**health**, v. 17, n. 6, p. 244-248, 2007.

KANTOR, Aaron B.; HERZENBERG, Leonore A. Origin of murine B cell lineages. **Annual review of immunology**, v. 11, p. 501-538, 1993.

KAPRANOV, Philipp; WILLINGHAM, Aarron T.; GINGERAS, Thomas R. Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 6, p. 413-423, 2007.

KARP, Harvey. The “fourth trimester”. **Contemporary Pediatrics**, v. 21, n. 2, p. 94-104, 2004.

KASEDA, Ryohei et al. Role of megalin and cubilin in the metabolism of vitamin D3. **Therapeutic Apheresis and Dialysis**, v. 15, p. 14-17, 2011.

KOLLMANN, Tobias R. et al. Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly. **Immunity**, v. 37, n. 5, p. 771-783, 2012.

KUROSAKI, Tomohiro; KOMETANI, Kohei; ISE, Wataru. Memory B cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 3, p. 149-159, 2015.

LAMOUNIER, Joel A.; VIEIRA, G. de O.; GOUVÊA, L. C. Composição do leite humano: fatores nutricionais. Rego JD. Aleitamento Materno. São Paulo: Atheneu, p. 47-58, 2001.

LANIER, Lewis L.; PHILLIPS, Joseph H. Inhibitory MHC class I receptors on NK cells and T cells. **Immunology today**, v. 17, n. 2, p. 86-91, 1996.

LEE, P. I., Y. L. Hu, P. Y. Chen, Y. C. Huang, and P. R. Hsueh. 2020. Are children less susceptible to COVID-19? *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 53: 371–372.

LEMAY, Danielle G. et al. RNA sequencing of the human milk fat layer transcriptome reveals distinct gene expression profiles at three stages of lactation. *PLoS one*, v. 8, n. 7, p. e67531, 2013.

LEWIS-JONES, D. I. et al. Sequential changes in the antimicrobial protein concentrations in human milk during lactation and its relevance to banked human milk. **Pediatric research**, v. 19, n. 6, p. 561-565, 1985.

LIN, Jiachen et al. Disruptive NADSYN1 variants implicated in congenital vertebral malformations. **Genes**, v. 12, n. 10, p. 1615, 2021.

MACHADO, Paulo RL et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, p. 647-662, 2004.

MACVICAR, Brian A.; THOMPSON, Roger J. Non-junction functions of pannexin-1 channels. **Trends in neurosciences**, v. 33, n. 2, p. 93-102, 2010.

MARACCI, Cristina; RODNINA, Marina V. translational GTPases. **Biopolymers**, v. 105, n. 8, p. 463-475, 2016.

MARACCI, Cristina; RODNINA, Marina V. translational GTPases. **Biopolymers**, v. 105, n. 8, p. 463-475, 2016.

MARIANO, Grasielly, Socorro, eu não sei amamentar. 2 ed. Nova Odessa: Napoleão; Jefte, 2012.

MELNIK, B.C.; SCHMITZ, G. MiRNAs: Milk's epigenetic regulators. *Best Pr. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2017, 31, 427–442.

MORELLO, Luis G. et al. The NIP7 protein is required for accurate pre-rRNA processing in human cells. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 2, p. 648-665, 2011.

MOSCONI, Eric et al. Breast milk immune complexes are potent inducers of oral tolerance in neonates and prevent asthma development. **Mucosal immunology**, v. 3, n. 5, p. 461-474, 2010.

MUNCH, Erika M. et al. Transcriptome profiling of microRNA by Next-Gen deep sequencing reveals known and novel miRNA species in the lipid fraction of human breast milk. **PLoS one**, v. 8, n. 2, p. e50564, 2013.

NADER, S., R. Bergen, M. Sharp, and A. M. Arvin. 1995. Age-related differences in cell- mediated immunity to varicella-zoster virus among children and adults immunized with live attenuated varicella vaccine. *J. Infect. Dis.* 171: 13–17. 32.

NAHORSKI, Michael S. et al. CCDC88A mutations cause PEHO-like syndrome in humans and mouse. **Brain**, v. 139, n. 4, p. 1036-1044, 2016.

NAZARRI, E. M. & Muller Y. M. Embriologia Humana. Santa Catarina - Florianopolis: 2011.

NERI, Daniela, 2022. Aleitamento materno no Brasil: práticas, determinantes, evidências da importância e ações de promoção. Núcleo de Pesquisas Epidemiológicas em Nutrição e Saúde. Universidade de São Paulo.

NEVILLE, Margaret C. Anatomy and physiology of lactation. **Pediatric Clinics of North America**, v. 48, n. 1, p. 13-34, 2001.

NEVILLE, Margaret C. et al. Studies in human lactation: milk volume and nutrient composition during weaning and lactogenesis. **The American journal of clinical nutrition**,

NEVILLE, Margaret C.; MORTON, Jane. Physiology and endocrine changes underlying human lactogenesis II. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 11, p. 3005S-3008S, 2001.

OLIVEIRA, Dhára Cavalcanti de. **Expressão heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* da translocase de membrana mitocondrial externa Tom20 de *Aspergillus fumigatus***. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PALMEIRA, Patricia; CARNEIRO-SAMPAIO, Magda. Imunologia do leite materno. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, p. 584-593, 2016.

PAPALIA, Diane E. Desenvolvimento Humano. 8<sup>a</sup> edição. Artmed, 2006.

PEREIRA, Genilse Oliveira Monteiro. Educação em saúde no pré-natal para o REVISTA COLETA CIENTÍFICA Ano V, Vol. V, n.9, jan.-jun., 2021 ISSN: 2763-6496 DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5117748>.

PICCIANO, Mary Frances. Nutrient composition of human milk. *Pediatric Clinics of North America*, v. 48, n. 1, p. 53-67, 200

POLISHCHUK, R. S.; MIRONOV, A. A. Structural aspects of Golgi function. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, p. 146-158, 2004.

RAY, Alepta Guha et al. Novel mechanism of cholesterol transport by ABCA5 in macrophages and its role in dyslipidemia. **Journal of Molecular Biology**, v. 432, n. 17, p. 4922-4941, 2020.

RAYMOND, Frederic et al. Longitudinal human milk miRNA composition over the first 3 month of lactation in a cohort of healthy mothers delivering term infants. *The Journal of Nutrition*, v. 152, n. 1, p. 94-106, 2022.

READ, Andrew F.; GRAHAM, Andrea L.; RÅBERG, Lars. Animal defenses against infectious agents: is damage control more important than pathogen control. **PLoS biology**, v. 6, n. 12, p. e1000004, 2008.

RIBEIRO, Lívia Carolina de Abreu. Modulação da resposta imune através do consumo de produto probiótico de soja durante o desenvolvimento de câncer de mama murino experimental. 2010.

SANTIAGO, L. B. Manual de Aleitamento Materno. Departamento Científico de Aleitamento Materno da Sociedade Brasileira de Pediatria. Rio de Janeiro: Manole. 1<sup>a</sup> ed. 2013.

SANZ, Yolanda. Aminopeptidases. **Industrial enzymes: Structure, function and applications**, p. 243-260, 2007.

SAVIER et al. Aleitamento materno no contexto atual, políticas práticas e bases científicas. São Paulo, 2008.

SCHOENWOLF, Gary et al. **Larsen. Embriología humana**, 6. Grupo Asís Biomedia SL, 2022.

SELLGE, Gernot; KUFER, Thomas A. PRR-signaling pathways: learning from microbial tactics. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2015. p. 75-84.

SHAHBAZ, S., N. Bozorgmehr, P. Koleva, A. Namdar, J. Jovel, R. A. Fava, and S. Elahi. 2018. CD71+VISTA+ erythroid cells promote the development and function of regulatory T cells through TGF- $\beta$ . *PLoS Biol.* 16: e2006649.

SHI, Xiaoxian et al. Kelch-like proteins: Physiological functions and relationships with diseases. **Pharmacological Research**, v. 148, p. 104404, 2019.

SILVA, Denysario Itamyra Soares et al. A importância do aleitamento materno na imunidade do recém-nascido. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e664974629-e664974629, 2020.

SIMPSON, Richard J. et al. Interleukin-6: Structure-function relationships. **Protein science**, v. 6, n. 5, p. 929-955, 1997.

SMITH, Norah L. et al. miR-150 regulates differentiation and cytolytic effector

function in CD8+ T cells. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 16399, 2015.

TALMAGE, David A. Mechanisms of neuregulin action. In: **Growth Factors and Psychiatric Disorders: Novartis Foundation Symposium 289**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2008. p. 74-86.

THIEBAUT, Charlène et al. Structure, activity, and function of PRMT1. **Life**, v. 11, n. 11, p. 1147, 2021.

TINGÖ, Lina et al. Non-coding RNAs in human breast milk: a systematic review. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 725323, 2021.

TSUKUMO, Yoshinori et al. TBL2 is a novel PERK-binding protein that modulates stress-signaling and cell survival during endoplasmic reticulum stress. **PLoS one**, v. 9, n. 11, p. e112761, 2014.

UNICEF. Optimal feeding practices are fundamental to a child's survival, growth and development, but too few children benefit [Internet]. 2021 Sep. Available v. 54, n. 1, p. 81-92, 1991.

VASCONCELOS, Maria Josemère. Nutrição clínica: obstetrícia e pediatria. Rio de Janeiro: MedBook, 2011.

VICTORA, Cesar G. et. al. Amamentação no século 21: epidemiologia, mecanismos, e efeitos ao longo da vida. *Rev. Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, 2016. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/ess/v25n1/Amamentacao1.pdf>. Acesso em: 13.03.2024.

VITOLO, Regina Marcia. Nutrição: da gestação a adolescência. Rio de Janeiro: Reichmann e autores editores, 2003.

VOLPINI, Walkyria MG; TAMBASCIA, Marcos A. e Auto-imunidade. **sore PN cnPq**, v. 40, n.1, p. 14, 1996.

WALIMBE, Ameya S. et al. POMK regulates dystroglycan function via LARGE1-mediated elongation of matriglycan. **Elife**, v. 9, p. e61388, 2020.

WANG, Miao et al. MiR-1271 inhibits cell growth in prostate cancer by targeting ERG. **Pathology & Oncology Research**, v. 24, p. 385-391, 2018.

WICKNER, Sue; HOSKINS, Joel; MCKENNEY, Keith. Function of DnaJ and DnaK as chaperones in origin-specific DNA binding by RepA. **Nature**, v. 350, n. 6314, p. 165-167, 1991.

YANG, Guan et al. Autophagy-related protein PIK3C3/VPS34 controls T cell metabolism and function: PIK3C3/VPS34 in T cell metabolism and function. **Autophagy**, v. 17, n. 5, p. 1193-1204, 2021.

YAO, Litong et al. ARHGAP39 is a prognostic biomarker involved in immune infiltration in breast cancer. **BMC cancer**, v. 23, n. 1, p. 440, 2023.

YIM, H. J., and A. S. F. Lok. 2006. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 43(Suppl. 1): S173–S181.

YU, J. C., H. Khodadadi, A. Malik, B. Davidson, E . D. S. L. Salles, J. Bhatia, V. L. Hale, and B. Baban. 2018. Innate immunity of neonates and infants. *Front. Immunol.* 9: 1759.

ZHOU Q, Li M, Wang X, Li Q, Wang T, Zhu Q, et al. Immune-Related miRNAs are Abundant in Breast Milk Exosomes. *Int J Biol Sci* (2012) 8(1):118–23. doi: 10.7150/ijbs.8.118.

ZHOU, Xiang et al. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. **Journal of molecular cell biology**, v. 7, n. 2, p. 92-104, 2015.

## ANEXOS

**Tabela 02: A1 - Transcriptos regulados positiva e negativamente de 0 - 4 meses de lactação pela análise *in silico*, 2024.**

0 - 1			1 - 4		
GENE ID	LOG2FC	P VALOR	GENE ID	LOG2FC	P VALOR
<b>1. CCDC136</b>	6.586542576	3.53E-37	<b>TNC</b>	2.590169579	6.53E-11
<b>2. ATPAF2</b>	5.823513565	9.44E-39	<b>MIR150</b>	2.242315469	1.44E-05
<b>3. TG</b>	5.759524085	9.03E-38	<b>DIAPH3</b>	1.694807435	4.45E-13
<b>4. ALAS2</b>	5.333621038	3.06E-29	<b>TSHZ2</b>	1.638827895	0.001344149
<b>5. DQX1</b>	5.121522254	2.91E-21	<b>AGBL1</b>	1.398493829	4.91E-06
<b>6. MTSS2</b>	4.927935265	1.05E-30	<b>PLEKHA8P1</b>	1.387648877	9.35E-08
<b>7. ELN</b>	4.674924108	8.49E-22	<b>SLIT3</b>	1.325006236	0.004206094
<b>8. LMOD3</b>	4.502598205	4.27E-26	<b>RN7SK</b>	1.287348621	0.000461811
<b>9. NCR2</b>	4.384085316	6.23E-18	<b>BCL2L11</b>	1.239597547	0.006470171
<b>10. GUCA2A</b>	4.254612504	2.23E-17	<b>SLC12A2</b>	1.231976102	9.73E-06
<b>11. TAC3</b>	4.054543401	4.24E-12	<b>IFI44L</b>	1.209570708	0.003324108
<b>12. SCGB3A1</b>	4.052465837	7.26E-28	<b>RMRP</b>	1.198752987	1.38E-05
<b>13. NME4</b>	4.043513242	1.26E-20	<b>KAZN</b>	1.197244228	0.000947235
<b>14. COL9A2</b>	4.015136826	7.95E-15	<b>LOC105374510</b>	1.163058544	0.047338097
<b>15. IMPDH1</b>	4.002897753	9.21E-21	<b>ARHGAP26</b>	1.146724047	3.64E-08
<b>16. G6PC1</b>	3.963618209	2.66E-09	<b>MIR146B</b>	1.145976423	5.11E-06
<b>17. NDST3</b>	3.929922446	2.63E-16	<b>VPS13D</b>	1.125431493	6.53E-11
<b>18. COASY</b>	3.903354194	2.03E-26	<b>GMPR</b>	1.108795736	1.44E-05
<b>19. PRICKLE2</b>	3.901287596	1.20E-16	<b>NUDCD1</b>	1.101496694	4.45E-13
<b>20. ARMC9</b>	3.878665842	7.56E-24	<b>KCNIP1</b>	1.090118933	0.001344149
<b>21. TMTC1</b>	3.826004566	2.37E-19	<b>ANKRD50</b>	1.087126399	4.91E-06
<b>22. NCKAP5L</b>	3.769313107	2.91E-19	<b>VSTM2B-DT</b>	1.074688044	9.35E-08
<b>23. FAP</b>	3.760514839	1.87E-13	<b>CORIN</b>	1.070615003	0.004206094
<b>24. CA12</b>	3.748627269	1.85E-14	<b>GPR158</b>	1.067544934	0.000461811
<b>25. CCDC34</b>	3.713441491	2.29E-17	<b>NRG3</b>	1.045631974	0.006470171
<b>26. IFT74</b>	3.709830363	5.70E-16	<b>SRSF1</b>	1.035158437	9.73E-06
<b>27. AMBN</b>	3.703425891	2.83E-08	<b>LOC124902766</b>	1.034661227	0.003324108
<b>28. ABCC8</b>	3.654329581	3.37E-15	<b>ACSL4</b>	1.031586226	1.38E-05
<b>29. KAT14</b>	3.642207816	2.62E-17	<b>NUDT3</b>	1.029505598	0.000947235
<b>30. TCIRG1</b>	3.63304739	7.25E-17	<b>PADI2</b>	1.016332725	0.047338097
<b>31. MGLL</b>	3.626612716	1.44E-15	<b>RCAN3</b>	1.002000493	3.64E-08
<b>32. FZD4</b>	3.567084715	4.66E-10			
<b>33. SETD1B</b>	3.555900706	3.46E-21			
<b>34. NR4A2</b>	3.542820745	1.42E-10			
<b>35. ASAH2</b>	3.511145181	2.05E-25			
<b>36. DUOX2</b>	3.479157846	3.44E-11			
<b>37. TCFL5</b>	3.46736104	5.28E-14			

38.	LIN7B	3.46268693	7.18E-09			
39.	MUC16	3.461826523	8.82E-22			
40.	CRYM-AS1	3.455067086	1.27E-11			
41.	SLC26A9	3.432299197	3.07E-12			
42.	DIAPH2	3.388839777	2.02E-23			
43.	MAN2B1	3.387593258	1.71E-16			
44.	TNKS1BP1	3.387438341	3.04E-22			
45.	ARHGAP4	3.330129133	9.71E-14			
46.	PIPOX	3.273485625	1.87E-12			
47.	KIF2C	3.269388511	5.31E-19			
48.	NADSYN1	3.266386682	7.80E-18			
49.	HSPA14	3.244311535	2.01E-19			
50.	CTU2	3.208068578	1.78E-11			
51.	TAF11	3.205972115	2.28E-17			
52.	DENND2B	3.197616288	8.43E-17			
53.	CD19	3.100965597	6.16E-07			
54.	ENGASE	3.096434963	3.25E-11			
55.	METTL25B	3.088418158	5.42E-10			
56.	TRPM8	3.069511192	7.16E-14			
57.	GTF2IRD2	3.067884278	9.63E-11			
58.	MNT	3.05854157	4.73E-22			
59.	COMP	3.051833454	6.12E-08			
60.	CDC45	3.039009798	1.09E-08			
61.	PRSS33	3.024601682	4.27E-06			
62.	LARGE1	2.996192009	7.70E-25			
63.	CEMIP	2.971904291	5.29E-12			
64.	ADAMTS8	2.963302175	4.02E-09			
65.	RASL10B	2.953981731	7.61E-12			
66.	ABCC10	2.95039078	2.21E-14			
67.	CRX	2.949814213	1.72E-06			
68.	CKAP5	2.92159427	5.84E-27			
69.	ABCA12	2.910094003	9.61E-13			
70.	CFAP46	2.882891445	3.87E-16			
71.	SAMD13	2.882538829	2.82E-08			
72.	MAP3K4	2.844703688	8.54E-18			
73.	COL3A1	2.840586761	2.90E-06			
74.	SNORD3A	2.831188013	7.01E-19			
75.	KL	2.805130235	2.36E-07			
76.	DZIP1L	2.792525915	3.15E-10			
77.	MYO7A	2.784602141	1.72E-12			
78.	RNF151	2.773024242	6.79E-07			
79.	SPTBN2	2.768066578	9.25E-13			
80.	LCP2	2.765705478	6.10E-12			
81.	HCN1	2.763233536	5.41E-15			
82.	DNAH8	2.714184875	6.09E-14			

83.	PHGDH	2.70319558	4.59E-14			
84.	PLEKHG6	2.697627362	3.97E-10			
85.	PELI2	2.694947939	2.46E-12			
86.	FZR1	2.691744231	4.76E-14			
87.	MALAT1	2.688396419	3.00E-07			
88.	HOXA13	2.662301907	1.09E-05			
89.	VSIG10	2.647547261	3.50E-08			
90.	SUSD2	2.645562149	3.24E-06			
91.	EPAS1	2.64511618	5.77E-21			
92.	SLC4A3	2.642716515	1.61E-05			
93.	PLCL1	2.634614522	3.61E-10			
94.	PIDD1	2.607775916	3.81E-07			
95.	XAB2	2.59948416	9.86E-17			
96.	LINC00269	2.590715467	5.29E-05			
97.	VN1R2	2.577806875	2.53E-09			
98.	CEP131	2.571668375	2.49E-08			
99.	PIK3CD	2.561317587	7.78E-09			
100.	KRT79	2.55893653	8.99E-05			
101.	KPNA3	2.553610811	8.85E-12			
102.	NAGA	2.535604912	1.04E-10			
103.	WDR73	2.522772222	7.42E-07			
104.	CABP4	2.504451139	8.34E-05			
105.	PRSS16	2.491091137	1.47E-08			
106.	LCT	2.491004461	8.35E-12			
107.	B3GNT3	2.487161843	3.13E-09			
108.	COL1A2	2.482949046	6.12E-07			
109.	ANK2	2.450505346	4.65E-11			
110.	ENDOV	2.450157299	1.65E-05			
111.	ND6	2.449285682	8.67E-22			
112.	C4orf54	2.447381827	1.81E-07			
113.	CYP4A11	2.444830531	1.08E-09			
114.	RP1L1	2.414878507	1.90E-11			
115.	BRI3BP	2.414471109	2.01E-08			
116.	CYP4F11	2.403264165	1.34E-09			
117.	CCDC103	2.400689377	3.08E-05			
118.	TRND	2.38791624	3.79E-09			
119.	MAP3K6	2.382495458	1.37E-09			
120.	TBX1	2.374552819	6.82E-09			
121.	MTATP6P1	2.373426081	1.27E-08			
122.	LTV1	2.369254479	4.90E-15			
123.	MS4A15	2.368171333	1.32E-08			
124.	DPP9	2.360171941	2.50E-11			
125.	LIME1	2.350837307	0.000222757			
126.	COL5A1	2.342153095	6.90E-10			
127.	COL18A1	2.33131746	2.98E-08			

128.	GLTPD2	2.322440981	0.000222365			
129.	ECH1	2.321866448	4.59E-12			
130.	NPC1L1	2.31201083	0.0002484			
131.	RPS7	2.302311538	4.00E-11			
132.	ARAP3	2.296970864	7.65E-11			
133.	CRYBB3	2.291750423	0.000239185			
134.	NSD2	2.287938017	4.81E-12			
135.	WDR74	2.286034624	1.82E-07			
136.	RPL15P3	2.285219911	3.95E-14			
137.	RMRP	2.284206286	2.18E-16			
138.	RPS6	2.28055334	6.36E-21			
139.	PDPN	2.270954257	1.99E-06			
140.	COLGALT1	2.253056028	4.85E-09			
141.	SNCB	2.249235543	1.86E-05			
142.	FCRLB	2.248975198	0.000367503			
143.	FAAP20	2.222403303	6.44E-07			
144.	SLC22A12	2.21297818	7.04E-05			
145.	DNAJC9-AS1	2.212271023	1.11E-05			
146.	GAS5	2.197684869	4.19E-19			
147.	MMP9	2.191106968	0.00021684			
148.	PLAGL1	2.17800085	2.93E-11			
149.	ENPEP	2.17465344	0.039057684			
150.	COL9A3	2.169985629	3.19E-05			
151.	ARHGEF2	2.160578532	4.64E-09			
152.	PPL	2.159427659	1.83E-08			
153.	RBM19	2.152384128	1.67E-12			
154.	NOVA2	2.143637733	1.03E-06			
155.	RHOH	2.139477824	3.65E-06			
156.	IQCN	2.138824035	2.16E-07			
157.	HECTD3	2.138707138	3.06E-10			
158.	NCOA4	2.118908343	2.65E-16			
159.	SYNJ2	2.118833267	4.40E-16			
160.	RPPH1	2.106981672	2.49E-22			
161.	COLEC11	2.097297208	0.000546617			
162.	LRRK2	2.096943134	2.76E-06			
163.	RPL7	2.083207707	8.91E-13			
164.	IRF5	2.072891614	6.36E-05			
165.	TRPS1	2.066195963	3.54E-25			
166.	RACGAP1	2.061541924	2.77E-11			
167.	SUOX	2.058022472	9.52E-08			

168.	MACF1	2.056489919	1.85E-18			
169.	COLQ	2.056145369	9.86E-13			
170.	TNC	2.050715211	4.02E-16			
171.	MAOB	2.050446205	4.25E-12			
172.	KIAA0319	2.018436767	1.21E-08			
173.	SLC9A5	2.016056069	5.29E-05			
174.	SYTL4	1.983431485	4.51E-08			
175.	FBF1	1.981332987	1.69E-06			
176.	SLC5A7	1.975076407	0.000397701			
177.	RPL3	1.974063505	5.97E-18			
178.	NCCRP1	1.971249134	3.41E-05			
179.	ARHGAP33	1.970022869	9.65E-05			
180.	KRT15	1.967242721	5.74E-10			
181.	CRAMP1	1.962070709	1.87E-09			
182.	RPS19	1.96091226	1.73E-13			
183.	CYP27B1	1.960447749	6.05E-08			
184.	COL4A5	1.960186233	9.70E-07			
185.	EPS15L1	1.959964469	1.61E-09			
186.	LTBP2	1.959662022	1.66E-07			
187.	ZZEF1	1.953455476	1.25E-18			
188.	COL6A2	1.952390663	0.000469713			
189.	KCNK18	1.951021632	0.000220446			
190.	ZBTB16	1.950215278	7.93E-15			
191.	ATP8	1.949902565	3.37E-06			
192.	CFAP53	1.945836065	0.001758052			
193.	C19orf18	1.944842999	0.004603462			
194.	ADPRS	1.943182861	7.45E-06			
195.	MAP1S	1.942764824	7.98E-07			
196.	CXCL8	1.932467654	9.80E-05			
197.	FEM1A	1.93213633	1.63E-08			
198.	SYTL1	1.930931862	0.000105882			
199.	LRWD1	1.925607039	6.58E-05			
200.	SPIRE2	1.924784814	3.40E-05			
201.	MYH3	1.908114045	0.002174616			
202.	MECOM	1.903826491	1.14E-09			
203.	LOC105377331	1.901318089	8.29E-09			
204.	AP5Z1	1.899214923	6.41E-06			
205.	CTSE	1.895529442	0.000576282			
206.	FANCD2	1.895518537	0.000206945			
207.	DNHD1	1.888524585	1.34E-05			
208.	RFX7	1.884377494	8.24E-12			
209.	TGM1	1.882984476	0.000731365			
210.	ZMYND10	1.88038963	0.002993475			
211.	PIEZO2	1.879927105	3.08E-08			

212.	SPPL3	1.87588986	6.96E-11			
213.	ANKLE1	1.873537112	0.004948754			
214.	GLIS3	1.868455766	2.49E-07			
215.	TRNY	1.862568216	5.75E-09			
216.	PLCB3	1.86009086	1.24E-08			
217.	NACA2	1.858239728	9.57E-09			
218.	FLVCR2	1.853456028	1.09E-05			
219.	PLXND1	1.851847692	5.25E-08			
220.	ND4L	1.842452421	1.21E-06			
221.	DGKB	1.842432331	3.63E-07			
222.	YJU2	1.841507059	3.77E-06			
223.	LOC105370217	1.835657724	7.29E-05			
224.	SNHG29	1.834657709	1.07E-10			
225.	EPHA2	1.83419098	0.000196996			
226.	PLA2G15	1.832645451	3.42E-05			
227.	MRPL43	1.832515986	7.20E-07			
228.	GMPR	1.830630437	7.79E-09			
229.	NPAP1	1.830235446	0.001175683			
230.	PNISR	1.824894567	1.18E-08			
231.	DHX38	1.824109545	2.60E-09			
232.	COL1A1	1.823291995	3.80E-05			
233.	SRGN	1.81538459	1.40E-06			
234.	HAP1	1.809988555	0.001142798			
235.	COL9A1	1.809323246	2.12E-06			
236.	COL4A1	1.802135821	1.33E-10			
237.	PPM1M	1.801289818	0.000268541			
238.	RNF170	1.801250445	7.67E-08			
239.	GGT5	1.800139367	0.000562793			
240.	TRNG	1.799052864	1.55E-06			
241.	SLC22A9	1.796177288	0.011508218			
242.	ADAMTS9	1.787538543	6.30E-07			
243.	CHD3	1.785756063	8.67E-18			
244.	FTCDNL1	1.78457294	6.49E-11			
245.	ADAMTS7	1.782767909	0.021308711			
246.	THBS1	1.782230794	5.23E-10			
247.	PLEKHA8P1	1.781303361	1.99E-15			
248.	MFSD1	1.77184471	4.74E-12			
249.	ZFYVE26	1.766637455	2.32E-09			
250.	SDHA	1.765974625	1.43E-09			
251.	RPS3	1.760303148	7.07E-10			
252.	LOC101060042	1.758604279	1.87E-06			
253.	TEX36	1.757163376	0.000263198			
254.	GGT1	1.755568467	8.68E-06			
255.	AMER1	1.755140176	4.04E-05			

256.	SLC5A11	1.755135614	0.001368667			
257.	PWWP2B	1.753711486	1.01E-06			
258.	RBMY1F	1.751119145	0.002147117			
259.	ZKSCAN2	1.746826785	2.20E-07			
260.	ANK1	1.745940437	9.57E-10			
261.	ART1	1.741469338	9.25E-13			
262.	DNAI1	1.741178142	6.37E-05			
263.	CRB2	1.739186892	0.001743877			
264.	KLK14	1.732239434	0.005051303			
265.	ACVRL1	1.730628922	0.004100471			
266.	ND4	1.729930567	1.24E-08			
267.	SNRPA	1.719253686	3.55E-07			
268.	KIAA0586	1.715049969	9.93E-07			
269.	EPB41L2	1.714726018	3.33E-07			
270.	SART3	1.713499015	2.58E-09			
271.	NRROS	1.712578523	0.000313239			
272.	AHCTF1	1.705322986	5.83E-09			
273.	RNY5	1.704064619	5.92E-25			
274.	GPS2	1.702843168	2.05E-05			
275.	CADM3	1.69889429	3.83E-05			
276.	TRP-CGG2-1	1.695504006	6.72E-05			
277.	TNS3	1.693056728	3.55E-11			
278.	RYR1	1.686855616	1.15E-06			
279.	GYS1	1.686063779	3.26E-08			
280.	NT5DC2	1.683737369	0.000843606			
281.	USP13	1.681388258	9.70E-08			
282.	HHAT	1.674660524	5.00E-07			
283.	LIG3	1.664684149	1.56E-07			
284.	ARFGAP1	1.654411756	1.47E-06			
285.	TRNL1	1.6539739	4.09E-08			
286.	ARHGEF11	1.653566575	1.56E-06			
287.	NIPSNAP2	1.653265502	7.99E-07			
288.	AHNAK	1.650159414	9.88E-10			
289.	SLC25A6	1.64879592	3.07E-12			
290.	PCLO	1.648278832	3.56E-11			
291.	ATXN2	1.646017398	1.06E-11			
292.	TEDC1	1.645438203	0.000965132			
293.	TXNDC8	1.642091996	0.004782556			
294.	RPS4X	1.637988618	4.53E-15			
295.	CARMIL3	1.637660265	0.00692021			
296.	LOC107984676	1.63658048	0.000250081			
297.	HSPG2	1.635170687	5.95E-06			
298.	RPL27A	1.634233846	8.63E-06			
299.	SYNE1	1.632601675	1.04E-12			

300.	TRV-AAC1-4	1.631260077	0.000958092			
301.	TRNF	1.628889667	8.94E-08			
302.	SNRPD2	1.627942892	1.01E-07			
303.	SNORA50C	1.624648293	3.53E-06			
304.	MIR424	1.623453109	0.007234654			
305.	NOL8	1.620804951	3.43E-05			
306.	TRNM	1.620273456	1.80E-07			
307.	MROH1	1.613604955	1.44E-06			
308.	COX1	1.613106508	3.65E-08			
309.	PLD4	1.609651549	0.016706543			
310.	NFAT5	1.609499171	1.65E-11			
311.	ND5	1.609153662	4.14E-08			
312.	TRMT6	1.608415168	2.22E-05			
313.	VGLL1	1.599416123	0.006009185			
314.	EEF1B2	1.599037981	8.98E-09			
315.	BHLHE40-AS1	1.597135046	5.91E-05			
316.	ATP6	1.596914249	2.95E-06			
317.	USP31	1.596365886	4.77E-06			
318.	ITGA9	1.595069767	7.16E-06			
319.	FSHR	1.594949799	0.000318782			
320.	TRK-TTT4-1	1.593147893	0.000940467			
321.	RPS14	1.591564014	4.48E-10			
322.	CHIT1	1.591312081	0.001212476			
323.	CYTH3	1.590989117	7.87E-09			
324.	MYC	1.590151988	1.67E-05			
325.	COL19A1	1.584456866	9.82E-06			
326.	COX3	1.582202306	1.18E-06			
327.	CUBN	1.581814556	0.000323188			
328.	TRNI	1.581160415	1.11E-06			
329.	ND1	1.57982309	4.98E-07			
330.	UBAP1	1.574217327	2.46E-12			
331.	SHQ1	1.571985927	8.61E-05			
332.	NCSTN	1.567994996	2.17E-07			
333.	BEND4	1.56595051	0.000555767			
334.	CD82	1.558129263	7.93E-07			
335.	ADGRB1	1.556961311	5.34E-06			
336.	CPS1	1.556347991	2.50E-06			
337.	JAKMIP1	1.554818787	1.52E-07			
338.	AHR	1.550333042	0.000173822			
339.	GRAP2	1.548741872	6.71E-05			
340.	R3HDM2	1.548649195	6.65E-09			
341.	SLC35F1	1.545884056	1.29E-06			
342.	ST6GAL2	1.544268305	0.00076168			
343.	MTMR14	1.543290505	3.32E-05			

344.	TRNS2	1.541887661	8.53E-08			
345.	LAMA1	1.54106509	4.56E-07			
346.	PDPK1	1.538993793	1.04E-06			
347.	TRK-TTT6-1	1.538157705	0.001615871			
348.	RNY4	1.535459662	3.04E-08			
349.	PASD1	1.535384084	0.00039796			
350.	BBS5	1.535311985	0.006734054			
351.	PLK2	1.534513273	2.92E-05			
352.	SNPH	1.532045728	6.38E-05			
353.	EGR3	1.529637139	0.020034475			
354.	KIT	1.527592441	3.99E-07			
355.	HOOK2	1.523095451	6.28E-07			
356.	APLF	1.522439283	0.000241128			
357.	TFAP2C	1.516368574	1.41E-06			
358.	SLC5A2	1.516310847	0.018601465			
359.	ND2	1.514861148	7.00E-07			
360.	CCT3	1.514778655	4.25E-13			
361.	LOC105377043	1.51126547	0.001117622			
362.	TP53BP2	1.510592105	5.26E-07			
363.	TRNL2	1.509892032	3.22E-06			
364.	OBSL1	1.502149354	1.74E-06			
365.	EPHB3	1.501005789	0.000220921			
366.	FARS2	1.500933319	7.64E-06			
367.	NOD2	1.499436422	0.01995652			
368.	FRMD6	1.495956684	2.22E-05			
369.	PPP1R15A	1.492925118	2.70E-06			
370.	RPLP0	1.489507715	1.19E-08			
371.	PKHD1	1.489462474	7.98E-05			
372.	SRC	1.487888616	0.000158761			
373.	RNA5SP74	1.487343152	5.74E-14			
374.	LIN7C	1.485935971	3.01E-07			
375.	ADAMTS13	1.484174947	0.001309523			
376.	LYRM9	1.482906582	0.003934588			
377.	ADGRD1	1.479819408	0.00014776			
378.	GNPTG	1.476033606	5.99E-05			
379.	RPL18A	1.475967646	1.65E-05			
380.	KRI1	1.474971697	9.34E-05			
381.	TPX2	1.465508856	0.009390632			
382.	LINC02073	1.465106953	0.000215011			
383.	PREX1	1.464546953	9.84E-05			
384.	C1orf87	1.462837541	0.000166357			
385.	ALDOB	1.459826427	0.006276235			
386.	KCNT1	1.458744073	0.002286499			
387.	PITPNM3	1.458726364	0.001044681			

388.	TKT	1.458704107	7.49E-11			
389.	EEF1G	1.457769977	1.82E-11			
390.	DOK6	1.457545704	0.001341329			
391.	MTF2	1.456471155	0.000127418			
392.	SLC25A38	1.453907385	3.27E-08			
393.	KEAP1	1.4517924	7.21E-05			
394.	DYNC2I1	1.45168679	5.64E-06			
395.	GPR37L1	1.450514395	0.007999832			
396.	AHCY	1.449704771	8.50E-05			
397.	RPSA2	1.449645666	3.22E-05			
398.	LINC02678	1.449041096	0.000465196			
399.	CNGB1	1.447759358	0.000187729			
400.	ATP1A2	1.447727282	0.001896058			
401.	BICD2	1.447512397	2.11E-05			
402.	TRPM4	1.444560744	1.30E-05			
403.	TRPM2	1.441431836	0.00035625			
404.	EDF1	1.435938156	2.46E-12			
405.	RNY1	1.433052372	4.42E-18			
406.	SLC26A4	1.43249998	0.000392125			
407.	SELENBP1	1.430175462	1.25E-08			
408.	LOC107985372	1.42801252	0.000725952			
409.	PFKP	1.427104951	1.95E-05			
410.	MYLK	1.425909963	0.000125859			
411.	PRKAG2	1.423529211	9.53E-06			
412.	GALNT13	1.421780004	2.60E-07			
413.	PIK3R6	1.420761782	0.023290967			
414.	RPS28	1.420293862	0.001752923			
415.	BPTF	1.416728501	1.42E-11			
416.	GALK1	1.415112862	0.00010607			
417.	MYBPC2	1.414395932	0.000266354			
418.	OSBPL6	1.413520539	0.000898723			
419.	TRL-TAG2-1	1.412995156	1.74E-06			
420.	RCC1	1.412786301	0.00012806			
421.	ZNF316	1.410504071	0.0020141			
422.	TMEM45A	1.410404702	8.60E-06			
423.	RIMBP2	1.40957351	0.000133411			
424.	ND3	1.407896011	2.32E-05			
425.	BRD4	1.405234161	2.14E-09			
426.	DSE	1.404384014	0.000113191			
427.	TRV-CAC14-1	1.404304067	0.001107385			
428.	RSPH14	1.40200143	0.000934769			
429.	RPL3P4	1.39986277	6.05E-06			
430.	KRT80	1.39929427	0.000415876			
431.	BCAS2	1.396900496	9.51E-07			

432.	PRKD1	1.389867325	0.000125352			
433.	IPPK	1.388682806	0.001788174			
434.	HOXB8	1.386073415	0.007294827			
435.	PPIF	1.384567351	4.10E-06			
436.	POLR1B	1.384040687	4.64E-05			
437.	MTMR2	1.383687581	2.36E-07			
438.	ZNF772	1.383289034	0.005150288			
439.	ERRFI1-DT	1.38290218	0.00015993			
440.	CPOX	1.382666056	4.56E-05			
441.	DMXL1-DT	1.382596286	0.000140081			
442.	UNC5D	1.380957202	0.000313537			
443.	SOAT2	1.380374378	0.025430464			
444.	NPHP4	1.378837718	5.93E-05			
445.	KCNN3	1.377916281	0.001074172			
446.	BRME1	1.376300692	0.009243075			
447.	SHROOM4	1.374894295	7.01E-05			
448.	TRNR	1.373727193	0.00038306			
449.	OXNAD1	1.373540686	3.10E-05			
450.	FYCO1	1.369830283	2.61E-05			
451.	FLNA	1.364657825	0.000581514			
452.	SCARNA2	1.360416842	8.95E-08			
453.	GC	1.359289338	0.000247088			
454.	TRV-CAC2-1	1.357775383	2.66E-07			
455.	LOC107986789	1.354239897	0.002331959			
456.	RPL6	1.353865893	9.68E-05			
457.	MAGEL2	1.352634282	0.030490041			
458.	LOC401478	1.348321392	0.00049741			
459.	TRP-TGG1-1	1.347773368	2.06E-08			
460.	ADAMTS2	1.347583534	0.000126353			
461.	POLR3A	1.347304035	6.95E-05			
462.	CYTB	1.345710565	7.52E-06			
463.	KRBOX5	1.345241527	0.00040389			
464.	MHENCR	1.344089513	2.02E-05			
465.	APOB	1.342850893	0.003726773			
466.	LOC105370338	1.339795625	0.000995331			
467.	ZNF354C	1.339210352	0.014530494			
468.	BMPER	1.337367745	0.000200692			
469.	RPS5	1.337282225	1.12E-05			
470.	ATF5	1.33645382	0.000156666			
471.	GLI3	1.335244753	3.42E-05			
472.	VPS37B	1.335156273	0.000210062			
473.	FHDC1	1.333708377	0.001011423			
474.	MYO18A	1.332548474	1.30E-06			
475.	PHLDA1	1.332324439	5.93E-08			

476.	LINC01622	1.328873795	0.000592582			
477.	LAMA2	1.328045082	0.000651036			
478.	GRIN1	1.327245056	0.027275084			
479.	TEAD4	1.326486164	0.0004463			
480.	RPSA	1.326161192	0.001979586			
481.	ADGRG4	1.321543129	0.000307103			
482.	RPS12	1.320632044	2.22E-08			
483.	ELL	1.319565243	8.81E-05			
484.	PC	1.3182927	7.87E-06			
485.	COX2	1.317573088	2.77E-05			
486.	APAF1	1.316887044	7.21E-05			
487.	PIK3R2	1.315564225	3.19E-05			
488.	SLC41A2	1.314562132	0.000556462			
489.	RPL4	1.311260099	1.67E-08			
490.	ZNF512B	1.310994194	6.06E-05			
491.	NLGN3	1.310592584	0.048088847			
492.	IMPDH2	1.309369957	3.41E-08			
493.	TRX-CAT1-7	1.307999597	0.000746744			
494.	CACNA1D	1.307428391	0.000351019			
495.	ADGRL2	1.305384604	0.000437133			
496.	FBXO41	1.305364335	0.002100611			
497.	TRNA	1.304456812	0.000125001			
498.	INPP5A	1.303808892	8.79E-05			
499.	TRNV	1.299800491	1.98E-05			
500.	LGR5	1.299430207	0.000488823			
501.	RPL37AP5	1.299030284	0.001227211			
502.	NDUFV1	1.298983136	9.61E-05			
503.	FMN1	1.297840884	0.000140104			
504.	CDHR3	1.296962911	0.009890276			
505.	STOX2	1.296855801	0.000630107			
506.	NOX5	1.296157514	0.01389121			
507.	DESI1	1.292861609	2.16E-05			
508.	RNU5E-1	1.291322109	7.67E-05			
509.	DROSHA	1.288970111	2.90E-06			
510.	TRIM25	1.288146883	9.47E-05			
511.	SEMA4A	1.286557573	0.000466476			
512.	AAMP	1.284014239	1.41E-05			
513.	CYTH1	1.283017301	6.19E-05			
514.	PCTP	1.282970799	0.003252874			
515.	RPL37	1.282374691	1.82E-09			
516.	ANKRD27	1.281621655	2.26E-05			
517.	SERPINH1	1.280095334	0.000152539			
518.	ANKMY1	1.279685093	0.003981451			
519.	CCDC63	1.279259838	0.004868478			

520.	COL25A1	1.279194278	0.000788112			
521.	PICK1	1.278584278	0.000417973			
522.	AIP	1.278478283	0.000242928			
523.	CPLX2	1.276917625	0.002929756			
524.	CAPN2	1.276253969	1.93E-05			
525.	NHSL1	1.275765466	0.002477685			
526.	GGCX	1.275453829	0.000254285			
527.	SNTG2	1.272276662	0.000999144			
528.	KLF9-DT	1.268438842	0.00269857			
529.	COL4A4	1.268255354	0.000551119			
530.	TNS1	1.267793686	6.05E-05			
531.	SLIT2	1.267458566	0.000768556			
532.	KDM5C	1.267225143	7.51E-07			
533.	RNY3	1.265365806	2.67E-08			
534.	CRISPLD2	1.264819538	0.004506441			
535.	MYOM1	1.262410821	0.000214945			
536.	ELMO1	1.262325471	0.000822891			
537.	TCERG1L	1.262157693	0.003327717			
538.	MAFB	1.262125572	0.001705118			
539.	DGKQ	1.261765018	0.019970698			
540.	RPL19	1.261507155	4.80E-11			
541.	SVIL	1.257566921	0.001389535			
542.	SPTB	1.256259515	0.020220612			
543.	NAA10	1.254104378	2.50E-06			
544.	DHRS3	1.251945584	0.000528929			
545.	WDR33	1.251697515	1.67E-06			
546.	SETD1A	1.251136271	0.000780074			
547.	LOC102724465	1.249003785	0.008099228			
548.	UMPS	1.248320699	0.000789074			
549.	CAGE1	1.246384961	0.010739598			
550.	ACSBG1	1.24589022	0.031963715			
551.	LOC124906243	1.24582197	0.001971209			
552.	TBX10	1.24503677	0.01080051			
553.	SPRING1	1.243758048	0.000224488			
554.	POLB	1.242130341	0.00519016			
555.	BACH1	1.238578514	0.010581766			
556.	ZG16B	1.237716845	0.000670334			
557.	PFKFB3	1.236917671	0.000911868			
558.	LOC105373224	1.235438656	0.008307095			
559.	ERBB4	1.23514506	5.36E-05			
560.	PIP5K1B	1.234697035	4.80E-05			
561.	OCA2	1.234379474	0.003139739			
562.	CEP72	1.231668404	0.000305984			
563.	TALDO1	1.230633925	1.04E-07			

564.	ERC2	1.230053149	2.78E-05			
565.	ZCCHC14	1.228444606	0.000252182			
566.	TRNT	1.226496724	2.90E-05			
567.	PRR12	1.225419485	3.63E-05			
568.	SFMBT2	1.224875832	6.00E-05			
569.	RPS11	1.224295116	4.48E-08			
570.	CBLB	1.223108324	7.64E-06			
571.	ERI3	1.221799752	0.002673839			
572.	RPLP1P4	1.221258389	7.36E-05			
573.	MREG	1.221218456	0.000386524			
574.	ORC4	1.220124186	0.000930758			
575.	SERPINB12	1.218784255	0.008247543			
576.	SIX2	1.216877307	0.026004386			
577.	DPH6	1.215748565	0.003231826			
578.	CNTRL	1.21488942	0.00176154			
579.	ZNF3	1.213686264	0.001322579			
580.	GGA3	1.212287671	0.000724879			
581.	RPL32	1.212141415	5.43E-06			
582.	SIPA1	1.210529439	0.007566003			
583.	C3	1.208249131	3.05E-09			
584.	ZNF469	1.208056719	0.00209044			
585.	C8orf34-AS1	1.207971884	0.000318838			
586.	MTND2P28	1.207169	0.017280829			
587.	UBE2J1	1.206364888	3.98E-06			
588.	SYBU	1.205948964	0.026556935			
589.	CMYA5	1.205824412	0.000912873			
590.	RPL35	1.205635224	0.000240562			
591.	MAPKAP1	1.205032119	5.80E-05			
592.	ABL1	1.204584756	1.38E-06			
593.	CSNK1G1	1.201807114	0.000322678			
594.	CPXM2	1.200493525	0.021995197			
595.	ANO2	1.200026817	0.001105816			
596.	KIAA1671	1.199933493	0.000361414			
597.	COL5A3	1.199115883	0.001912229			
598.	MORC4	1.197660374	5.73E-05			
599.	RPL8	1.197253936	5.00E-10			
600.	SV2C	1.196428556	0.000226359			
601.	SLC22A15	1.196131866	0.014570789			
602.	KYNU	1.195796196	0.000195498			
603.	FAT3	1.195293834	0.000388803			
604.	TXNDC16	1.19481242	0.000178765			
605.	RPL37A	1.194778634	7.63E-07			
606.	C2CD6	1.193189519	0.013597642			
607.	KDM4A	1.192434348	7.24E-05			

608.	GLUL	1.192019617	2.13E-08			
609.	LIPE-AS1	1.191342783	0.011645934			
610.	LMNB2	1.191165496	0.00512279			
611.	VSTM2B-DT	1.190586355	0.000290003			
612.	OAS3	1.189444133	0.007355327			
613.	RNR1	1.189406848	3.56E-07			
614.	LOC124905135	1.18865621	0.000845642			
615.	USP36	1.188338249	4.79E-05			
616.	ZFPM2	1.187449909	0.000604995			
617.	DNAJC24	1.18568681	0.000231571			
618.	LOC105375849	1.185620816	0.004646972			
619.	LITAF	1.183437052	2.76E-05			
620.	CELSR1	1.183023578	0.006692436			
621.	RAP1GAP2	1.182656081	0.000680068			
622.	STRN4	1.182415166	5.20E-06			
623.	CHN2	1.181899012	0.003620169			
624.	FGF2	1.181810613	0.006196906			
625.	IL1R2	1.181570714	0.005020804			
626.	SMAP2	1.180460932	4.62E-05			
627.	ST6GALNAC3	1.179939388	0.004156792			
628.	RAD23B	1.179567763	1.66E-07			
629.	LOC101927066	1.179217352	0.001257323			
630.	ATP2A1	1.179053093	0.044877702			
631.	SOX4	1.176537352	0.003061232			
632.	LINC02691	1.175708737	0.000481363			
633.	HDDC2	1.175234287	0.000693765			
634.	APEX1	1.173534633	1.21E-05			
635.	TTC38	1.172737232	0.000269336			
636.	FHL1P1	1.170022881	0.00788154			
637.	TRAPPC11	1.169925977	0.000308577			
638.	ZSCAN2	1.169547029	0.001321378			
639.	IFI30	1.168901616	0.000395032			
640.	TAFA1	1.167063169	0.001038323			
641.	LOC100419642	1.166818403	0.024354444			
642.	PPP1R16B	1.164396284	0.00028243			
643.	CHD7	1.163859913	5.35E-07			
644.	HAUS7	1.163526695	0.005249439			
645.	MEGF10	1.161894169	0.001612891			
646.	ITGA7	1.160762721	0.021034377			
647.	RPS15A	1.160556013	0.00305156			
648.	LOC105374655	1.157207514	0.0005477			
649.	ZNF862	1.157113828	0.000878934			
650.	MAP4K4	1.156816892	0.000619749			
651.	ENG	1.156443523	0.001062318			

652.	RPL12	1.155860234	6.16E-06			
653.	LRP5	1.1554177	3.89E-05			
654.	CMKLR1	1.155229607	0.002266674			
655.	FRMD8	1.154864265	0.000972228			
656.	HIPK2	1.153925921	1.53E-06			
657.	AKT1S1	1.153832305	0.000176748			
658.	LOC101928516	1.1531289	0.002816632			
659.	DIP2B	1.150314787	0.000429286			
660.	SORCS1	1.149900243	0.002005186			
661.	USH2A	1.149227865	0.00231053			
662.	EXOC3	1.148900364	0.000350683			
663.	FZD6	1.147746612	0.004626552			
664.	LOC102467217	1.147593149	0.014226721			
665.	SLC6A6	1.147234898	0.002018833			
666.	ZNF589	1.145485435	0.018327365			
667.	FOXP1	1.144201159	0.000544906			
668.	CRACD	1.144055046	0.005933507			
669.	MOGS	1.143132362	0.000664658			
670.	FBXW8	1.139976031	0.001629439			
671.	CLTB	1.13905856	0.005987977			
672.	LRP1	1.138338268	0.000304223			
673.	TEX9	1.137610702	0.005428515			
674.	IGSF21	1.137559697	0.006757625			
675.	PDCD11	1.137370509	0.001743628			
676.	FGF23	1.135704914	0.026792254			
677.	FXYD3	1.135251136	5.05E-06			
678.	SLC45A4	1.134457472	0.022641487			
679.	CHD6	1.132738093	4.74E-06			
680.	EGILA	1.131963316	0.018826011			
681.	PSMB5	1.13139306	0.002094608			
682.	SMAD3	1.130038253	0.007167507			
683.	GADD45B	1.127782419	0.028434974			
684.	TECPR1	1.127155526	0.00036462			
685.	PALM2AKAP2	1.12573276	0.003184556			
686.	MTCYBP36	1.124993875	0.020478956			
687.	APOBR	1.124619856	1.22E-05			
688.	RBM33	1.124561668	0.000287674			
689.	HEATR6	1.124209205	0.018075903			
690.	ABCA2	1.123892733	0.009114428			
691.	EXT2	1.12303848	7.18E-06			
692.	EGFEM1P	1.123024426	0.012170279			
693.	FMN2	1.122587508	0.006565575			
694.	SLFN5	1.121025645	1.13E-07			
695.	SPPL2B	1.118298904	0.000138589			

696.	ADAMTS14	1.11711358	0.007677722			
697.	GRIK3	1.11677108	0.018479355			
698.	DST	1.116417467	2.87E-06			
699.	RNU12	1.116301171	5.82E-05			
700.	METTL16	1.115822497	0.000578585			
701.	TNIK	1.115465025	0.00041008			
702.	MGAT5	1.115128686	0.001180705			
703.	LOC100506444	1.114260923	0.026513795			
704.	PSME3	1.112118145	3.67E-05			
705.	ITPR3	1.110567576	0.00274455			
706.	ATXN7	1.110153891	0.000631021			
707.	SYT9	1.109687673	0.007296655			
708.	PKIB	1.107258892	0.000182996			
709.	EPG5	1.106631813	6.68E-05			
710.	CACNA1H	1.106104333	0.001968774			
711.	LOC101927314	1.105217209	0.005804535			
712.	CRABP1	1.104484231	0.001143344			
713.	LOC105377557	1.103258258	0.011822393			
714.	RGS9	1.103155118	0.011910577			
715.	CCT7	1.103012653	1.92E-06			
716.	RAD51B	1.102673243	0.000337188			
717.	DGKD	1.102001852	0.001988594			
718.	DOCK2	1.101259983	0.004592653			
719.	MRPL48	1.100837071	0.009896272			
720.	BLZF1	1.100733401	0.002349462			
721.	SLX4IP	1.100716965	0.013010432			
722.	PLCE1	1.100031743	0.001127294			
723.	DHFR	1.099637925	0.020031574			
724.	ST7	1.099420301	0.011381288			
725.	FAM184B	1.098576697	0.008789979			
726.	PTPRM	1.097999247	0.000510219			
727.	PDE6B	1.097177894	0.000356236			
728.	SCARA5	1.096307408	0.004183715			
729.	NEU3	1.096274155	0.011972337			
730.	FAM117B	1.0961894	0.000279181			
731.	COLEC12	1.093994887	0.000194364			
732.	RPL36	1.09381355	1.50E-05			
733.	CUL7	1.091909018	0.000333286			
734.	ADAMTSL3	1.091616798	0.000442277			
735.	LINC00393	1.09140684	0.00885158			
736.	ZMYM3	1.090686417	0.000586633			
737.	AOPEP	1.090601538	0.0051073			
738.	H2AC6	1.090078245	0.008344968			
739.	SH3GL2	1.089921498	0.011625154			

740.	GPR39	1.089222643	0.003208593			
741.	CDC25B	1.088775683	0.010624785			
742.	TENM1	1.088524891	0.002362303			
743.	LOC105376604	1.08833005	0.001239083			
744.	LURAP1L	1.088308881	0.001807362			
745.	GRIN2B	1.087101377	0.000143776			
746.	CPQ	1.08643797	0.002984928			
747.	PLS3	1.086124192	0.045553759			
748.	SLC9A9	1.085931737	0.001386938			
749.	KITLG	1.085671141	0.00817131			
750.	COL27A1	1.084644928	0.00372494			
751.	E4F1	1.083887953	0.032944299			
752.	RIMS2	1.082679121	0.000634005			
753.	CAMK1D	1.081881649	0.008656359			
754.	ZFAS1	1.081367191	0.000967298			
755.	RAP1GAP	1.081136836	0.007316622			
756.	PARP1	1.080650238	1.07E-06			
757.	TMEM132A	1.08006548	0.024407871			
758.	SPTBN1	1.079943182	0.00021942			
759.	MEGF8	1.07925296	0.011892061			
760.	OPHN1	1.079129011	0.005806373			
761.	ZNF34	1.078873057	0.047626586			
762.	DANCR	1.078597271	0.01382354			
763.	KSR2	1.078547921	0.002233696			
764.	SARNP	1.078507248	0.000118791			
765.	MIR4527HG	1.078255357	0.023226362			
766.	ELP1	1.077949038	0.000538481			
767.	UNC80	1.077589054	0.007710345			
768.	PTPRO	1.077175125	0.006824626			
769.	FRMPD3	1.075743337	0.012984462			
770.	SORCS3	1.075360702	0.002722959			
771.	KRT8	1.073750045	2.95E-05			
772.	BIN1	1.073508609	0.000554669			
773.	CLPP	1.073059499	0.011289054			
774.	AKAP9	1.072854185	0.000173675			
775.	NRXN1	1.072233259	0.002717953			
776.	SPAG7	1.072160381	0.002103686			
777.	COL6A5	1.071904319	0.012618973			
778.	IRS1	1.070817692	0.000446891			
779.	KDM2B	1.070282197	0.0008671			
780.	LINC01460	1.070224664	0.012024434			
781.	DEPTOR	1.069144448	0.002757344			
782.	MDFIC	1.068354369	0.017221888			
783.	SETBP1	1.06835011	0.001501707			

784.	RPL6P27	1.067941527	0.002940377			
785.	NSMAF	1.067592039	0.000478116			
786.	RAP2C-AS1	1.067416834	0.004811434			
787.	ACOT11	1.067218953	0.001396658			
788.	ZBTB7C	1.06720671	0.000901562			
789.	GLP1R	1.06670436	0.001382542			
790.	DLX6-AS1	1.066483126	0.032988165			
791.	UNC45A	1.064078813	0.000889004			
792.	GRB10	1.063372066	0.000808556			
793.	CD180	1.062779591	0.01025286			
794.	CNTN4	1.062075052	0.002005748			
795.	CNNM1	1.061208068	0.005359379			
796.	RNF25	1.060964629	0.039894224			
797.	KLHL21	1.060741516	0.008076378			
798.	TXNRD1	1.060581809	4.65E-07			
799.	LINC02465	1.060502525	0.014341249			
800.	CHCHD3	1.0605018	0.003077539			
801.	SYT16	1.060441179	0.00407212			
802.	WDR90	1.059211018	0.022507131			
803.	TARS1	1.058668547	3.68E-06			
804.	CEACAM5	1.057578051	0.015880107			
805.	PGM5P2	1.057311724	0.044646141			
806.	ATP8A1	1.056448243	0.001924048			
807.	RNY4P2	1.055751252	5.55E-07			
808.	CYB5RL	1.055494621	0.007069351			
809.	RARB	1.05514523	0.003029308			
810.	IGFBP-AS1	1.053990152	0.006119807			
811.	TRNP	1.053798552	7.61E-05			
812.	MSRA	1.053711499	0.001269458			
813.	MCM7	1.053292918	0.005837185			
814.	TDP1	1.050976229	0.00046451			
815.	ITGB2	1.050296228	0.042977285			
816.	KMT2B	1.049904167	0.002635533			
817.	B3GALNT2	1.04946833	0.002197422			
818.	RPS16	1.049261217	0.000159249			
819.	ZNF217	1.048909737	0.027266207			
820.	KCNH7	1.048356543	0.011288904			
821.	EIF3L	1.04829209	3.63E-06			
822.	TRK-TTT3-1	1.047867897	0.001178491			
823.	EIF3F	1.047117485	1.47E-06			
824.	CACNG2	1.045643951	0.016900565			
825.	GPC5	1.044612319	0.000845536			
826.	HPSE2	1.044547816	0.001424719			
827.	ENPP1	1.043911709	0.009554466			

828.	EIF4EBP1	1.043302885	0.00259995			
829.	HID1	1.043211895	0.006820146			
830.	RWDD1	1.042994322	0.000126055			
831.	C1orf232	1.042560108	0.010963776			
832.	CAND1.11	1.042199527	0.015547151			
833.	CHD2	1.041859449	1.10E-05			
834.	CIBAR1-DT	1.04046859	0.00384693			
835.	LINC01250	1.040203921	0.016044914			
836.	PLEKHM3	1.038951882	0.004405223			
837.	FAT1	1.038764817	0.007506281			
838.	CS	1.038744681	0.001248637			
839.	PPP2R2B	1.038282767	0.007534444			
840.	KANK2	1.038184595	0.015261353			
841.	PPFIA4	1.037803602	0.003476025			
842.	PAK1IP1	1.037292557	0.001836045			
843.	DOCK5	1.037124261	1.95E-05			
844.	NAV2	1.036279818	0.002716681			
845.	KLHL29	1.036243817	0.005513333			
846.	SH3GL1	1.035324792	0.000154641			
847.	MEIOSIN	1.034769466	0.010045224			
848.	FOXM1	1.033198346	0.00393277			
849.	PPP1R9A	1.032586292	0.008145649			
850.	PPFIBP1	1.032094875	0.000375175			
851.	MX1	1.031821648	0.008641223			
852.	LOC105374126	1.030281635	0.045558928			
853.	RPS29	1.029931324	0.001924175			
854.	EPB41L1	1.029551675	0.002054866			
855.	RPL18	1.029498777	0.001015511			
856.	TOP2A	1.029475297	0.004727459			
857.	LOC124900169	1.029246729	0.012960183			
858.	LOC107985698	1.028683861	0.012038339			
859.	POLR1A	1.028623477	0.000451673			
860.	KCTD1	1.027958587	0.013902961			
861.	JAK1	1.027366882	2.04E-06			
862.	SLC13A1	1.026546698	0.018327199			
863.	CLIC6	1.026424865	0.011226861			
864.	RSL24D1	1.026212737	0.002613277			
865.	NRG1	1.025819771	0.000600762			
866.	MCTP1	1.025411017	0.002043298			
867.	ASIC2	1.024999151	0.001549459			
868.	CDH23	1.024893768	0.022212988			
869.	LPAR1	1.024258135	0.016784426			
870.	ELAVL1	1.024183445	0.004460142			
871.	NACA4P	1.02411215	0.011182818			

872.	CSMD2	1.024048646	0.001771246			
873.	PRKCG	1.023917259	0.001160878			
874.	KDM1A	1.023906865	0.000230814			
875.	LINC03033	1.023707879	0.026833083			
876.	H2BC5	1.023661695	0.04275883			
877.	CPT1A	1.022874468	3.25E-05			
878.	XKR6	1.022093732	0.012191206			
879.	LOC100420587	1.02155283	0.019907798			
880.	ZNF569	1.021090267	0.026407481			
881.	MTSS1	1.020958354	0.001329945			
882.	ATN1	1.020844756	9.87E-06			
883.	NRG2	1.019808553	0.00542649			
884.	GOLIM4	1.019784875	0.003800944			
885.	RPL26	1.018827364	0.000241119			
886.	ELAVL2	1.018368719	0.006087833			
887.	RAB8A	1.018282779	0.001156879			
888.	SPRR4	1.018220456	0.04137101			
889.	LINC02281	1.016708625	0.003720056			
890.	HOMER1	1.015801949	0.006721067			
891.	RPS27A	1.01442027	2.06E-05			
892.	FGD3	1.014307797	0.008077064			
893.	ARHGAP17	1.013717626	0.001249107			
894.	ATP10B	1.013611459	0.014797084			
895.	KCNB2	1.012319824	0.03644691			
896.	SGCZ	1.012246756	0.01054776			
897.	MTOR	1.011232198	1.81E-06			
898.	KHSRP	1.011166605	0.000449918			
899.	PTK2	1.010601815	3.35E-07			
900.	LINC01317	1.010084482	0.018787684			
901.	TIAM1	1.010004542	0.006473306			
902.	WDFY2	1.009274365	0.013992384			
903.	CPN1	1.008865433	0.01481629			
904.	COPRS	1.008366369	0.006367486			
905.	FRAS1	1.00819079	0.011896354			
906.	PLXNA2	1.007788498	0.005097325			
907.	ANPEP	1.007395711	0.002122449			
908.	PTPRD	1.006862376	0.000391236			
909.	LOC401324	1.006757539	0.041093489			
910.	CDK14	1.00646907	0.004653435			
911.	LOC107986543	1.005337979	0.017571671			
912.	ZNF541	1.004892265	0.045759627			
913.	MGA	1.004857431	2.33E-05			
914.	ZKSCAN8	1.002691973	0.037725256			
915.	LRRIQ3	1.001966032	0.006703473			

916.	NCAPD2	1.001945591	0.002342091			
917.	EIF4B	1.001897946	1.22E-07			
918.	MSL2	1.00018377	0.001493522			
919.	VPS37A	-1.001459088	0.002674655	MTRNR2L12	-1.008793568	0.071071173
920.	PIGX	-1.005690728	0.004478719	CPSF1	-1.010107215	0.036454282
921.	SLC9A7	-1.012871761	9.20E-05	GNA12	-1.014018238	0.018065306
922.	SCAMP1	-1.013331825	0.001177542	OST4	-1.031995328	0.022815004
923.	NGB	-1.014786845	0.01694677	GPAT3	-1.03489882	0.000900522
924.	KCNK1	-1.014999919	0.011876143	GPR55	-1.042173673	0.299638234
925.	TNFSF10	-1.015268698	0.002003359	ZNF460	-1.042832536	0.026393111
926.	SELENOF	-1.01713331	1.51E-05	LINC03057	-1.043045096	0.088924588
927.	NPNT	-1.019073523	2.57E-05	LLGL2	-1.043729839	0.013068291
928.	STOM	-1.022963189	4.13E-05	PID1	-1.044710672	1.46E-05
929.	PCP4L1	-1.036089862	0.001507034	MOGS	-1.048016168	0.013246784
930.	TRK-CTT2-4	-1.036565449	0.015859054	CIMIP2C	-1.052276097	0.009346725
931.	L3MBTL3	-1.036779452	0.000108186	TRX-CAT1-7	-1.058212962	0.014947809
932.	ISOC1	-1.038201926	0.008415238	FGFR1OP2	-1.059052043	0.149984292
933.	CORIN	-1.038722461	0.000977625	GALK1	-1.06536306	0.012636151
934.	ACTR10	-1.040868534	0.000118917	PREB	-1.068764183	0.064995463
935.	TSPAN12	-1.041157303	0.000898346	TRI-TAT1-1	-1.079215345	0.073760715
936.	DPY19L4	-1.041880441	0.003116846	LINC00841	-1.080250078	0.002340595
937.	SLC39A8	-1.043647806	1.55E-06	MYOCOS	-1.082654497	0.05829322
938.	UBE4A	-1.045664594	4.71E-05	ABHD3	-1.083896484	0.021811847
939.	CSN1S1	-1.04648726	7.97E-08	ESRP2	-1.085428095	0.006412051
940.	DYNLT3	-1.048949156	0.002130372	TWF2	-1.089317056	0.012056477
941.	SEMA4B	-1.053373512	0.00185426	LINC02086	-1.095414357	0.029638067
942.	PCYOX1	-1.054801893	5.96E-05	LOC107987087	-1.101544987	0.013424595
943.	ATP5F1AP3	-1.057834149	0.007422649	CHMP1B2P	-1.106252561	0.288870173
944.	LOC124903672	-1.059270464	0.004406349	TRW-CCA2-1	-1.109765187	2.48E-07
945.	TLR4	-1.059283702	0.000849741	MTMR14	-1.113488332	0.029091668
946.	FADS2	-1.059717775	0.002500707	IRX2-DT	-1.120120112	0.001953625
947.	LMBRD1	-1.061525591	4.83E-05	RUBCNL	-1.136467931	0.307302322
948.	PTPRF	-1.06156058	2.15E-06	TRS-GCT5-1	-1.137994174	0.020350676
949.	NCR3LG1	-1.065229476	0.005444888	TRT-TGT5-1	-1.145997711	0.035102034
950.	TMBIM6	-1.066301	4.06E-07	TRNG	-1.147013587	0.003166697
951.	RAI14	-1.068656295	2.12E-07	PLXND1	-1.147190911	0.032748424
952.	HYCC1	-1.071466636	0.001678474	SLC4A2	-1.148333449	0.001672373
953.	IL7R	-1.078172722	7.27E-06	TRT-TGT2-1	-1.156031937	0.000220634
954.	DIPK1A	-1.078562229	0.001647551	RNA5SP267	-1.160110393	2.00E-05
955.	CD151	-1.079913795	0.001856617	IFT43	-1.165594557	0.000139051
956.	TPBG	-1.081257039	0.012437406	TRS-CGA1-1	-1.165732972	0.000634974
957.	MIR193A	-1.084825041	3.88E-07	LOC110467523	-1.171525695	0.053620961
958.	LNPEP	-1.093245811	1.29E-06	RAPGEF5	-1.173249817	8.21E-05
959.	EDEM3	-1.100355374	4.04E-05	TRM-CAT4-1	-1.186273916	0.089484679

960.	LGALS3BP	-1.100616251	4.43E-05	TRP-TGG3-4	-1.199044001	7.14E-06
961.	SLC39A6	-1.106035172	7.03E-05	TRT-TGT4-1	-1.203289693	1.32E-05
962.	LGR4	-1.107258137	0.000289892	GOLIM4	-1.208245401	0.002109708
963.	NAAA	-1.107661045	0.000451718	PARAL1	-1.209595846	0.032922422
964.	MIR29A	-1.111583743	6.51E-06	S100A10	-1.213354422	0.114822036
965.	TRL-CAG1-6	-1.112894855	0.001069943	LOC105371574	-1.220197226	0.003430878
966.	TACSTD2	-1.114482409	3.23E-07	EMP1	-1.222673895	0.012673294
967.	MIR196A2	-1.119532694	0.000360508	BTN2A2	-1.225809919	0.245190943
968.	ALG2	-1.124958164	2.93E-05	LOC110467522	-1.230747627	2.68E-05
969.	RAB14	-1.131796158	3.64E-06	COG3	-1.233185836	0.005682344
970.	VWA1	-1.136395044	0.000506517	CYTIP	-1.24027264	0.00252358
971.	CIDEA	-1.139761548	7.69E-05	TRG-GCC2-3	-1.247103744	1.14E-05
972.	ARHGAP18	-1.140771903	7.10E-09	TRV-TAC3-1	-1.259485754	0.000786703
973.	PRDX6	-1.14478351	5.90E-05	RNA5SP382	-1.26194715	5.99E-05
974.	RNA5-8SP	-1.146688815	0.000594416	CSTB	-1.264149459	0.001238444
975.	GNS	-1.147931207	3.00E-06	SCEL	-1.270839014	0.379779148
976.	CD81	-1.150043202	6.45E-05	TRK-TTT3-1	-1.281320366	0.000936083
977.	DHRS7	-1.150841535	0.000623041	TRT-TGT3-1	-1.285757074	7.46E-07
978.	SLCO4C1	-1.151466061	0.001546831	METTL24	-1.288918832	0.426783138
979.	TNFRSF1A	-1.1532245	2.35E-05	RNA28SP	-1.293055048	8.91E-06
980.	CCDC59	-1.153489939	2.94E-05	TRC-GCA4-1	-1.306940044	0.000154903
981.	CLDN8	-1.157405366	9.33E-05	RCN1	-1.321890127	0.000713644
982.	OFD1P6Y	-1.157583046	0.012749367	MAL	-1.328965305	0.447204857
983.	MIR30C2	-1.160136386	4.85E-05	TRT-AGT6-1	-1.36342792	2.26E-08
984.	YIPF4	-1.175199372	0.000201538	PPL	-1.365858787	0.042236018
985.	TSPAN6	-1.178518858	2.20E-06	RNA5SP507	-1.379252541	0.003716826
986.	FOLR1	-1.192631161	1.11E-05	LOC110467521	-1.39139771	0.002540063
987.	SORT1	-1.197204774	6.08E-09	CCDC85C	-1.39174335	0.001275965
988.	SLC1A1	-1.198520251	3.96E-05	TRG-CCC1-1	-1.420775248	0.005484093
989.	TRV-CAC1-4	-1.202045397	1.30E-08	S100A8	-1.432950342	0.16203561
990.	ERGIC2	-1.203254241	2.00E-05	LOC110467520	-1.442110738	6.94E-06
991.	TLR2	-1.206946545	0.000107847	LOC105373618	-1.449745028	0.000595659
992.	PRSS8	-1.212029595	1.42E-06	RNA18SP	-1.461034842	6.50E-08
993.	APOL1	-1.21699117	9.53E-05	TRP-TGG2-1	-1.463873838	1.39E-09
994.	COX6C	-1.21960223	6.44E-05	LOC105379168	-1.477207266	0.1529022
995.	B2M	-1.227718333	1.51E-05	SCML1	-1.478509547	0.06399403
996.	PRKAA2	-1.231812532	2.40E-05	SPRR3	-1.481581606	0.298815222
997.	SLC16A4	-1.239556767	1.64E-06	TRV-AAC2-1	-1.499818037	1.29E-06
998.	OSMR	-1.243982315	4.74E-07	TRV-CAC6-1	-1.505950871	6.49E-05
999.	EPCAM	-1.245819287	1.26E-08	TRW-CCA4-1	-1.525467926	5.59E-13
1000.	FASN	-1.246590268	3.13E-11	RNA5SP508	-1.538265251	0.00016046
1001.	ERLIN2	-1.256327303	6.86E-05	SPRR2A	-1.559847824	0.467095776
1002.	ENPP4	-1.257472657	0.000144931	LLPH	-1.597845219	0.004846298
1003.	STEAP4	-1.26321977	0.00090195	FGFBP1	-1.62224871	0.011643383

<b>1004.</b> LOC124905332	-1.264125611	1.50E-07	<b>ODAM</b>	-1.652939028	0.007935427
<b>1005.</b> SCARB2	-1.278288448	8.71E-09	<b>A2ML1</b>	-1.654156378	0.33470387
<b>1006.</b> HMGCS1	-1.299088855	4.84E-08	<b>TRV-AAC1-4</b>	-1.68174571	0.00035426
<b>1007.</b> SPP1	-1.307648565	1.12E-08	<b>TGM3</b>	-1.702033482	0.422447189
<b>1008.</b> SQLE	-1.313978191	0.000182116	<b>LINC02785</b>	-1.733113862	0.106933222
<b>1009.</b> TMCO1	-1.314538514	3.86E-07	<b>TRF-GAA1-4</b>	-1.751751499	3.44E-10
<b>1010.</b> ITM2B	-1.31637718	5.74E-07	<b>ECM1</b>	-1.792015015	0.215623737
<b>1011.</b> CHPT1	-1.322339019	4.74E-07	<b>TRT-CGT4-1</b>	-1.798780843	7.69E-11
<b>1012.</b> TMEM30A	-1.322380027	2.42E-07	<b>RNA5S6</b>	-1.847757246	0.048853054
<b>1013.</b> NEK7	-1.324036828	1.35E-08	<b>RNA5S4</b>	-1.852889693	0.071345626
<b>1014.</b> ABCG2	-1.32736083	1.55E-08	<b>GC</b>	-1.903541298	8.96E-05
<b>1015.</b> SMAD9	-1.331529149	7.36E-07	<b>KRT4</b>	-1.913607952	0.107897782
<b>1016.</b> FUCA1	-1.333388818	0.02985273	<b>ARL15</b>	-1.933393853	2.28E-05
<b>1017.</b> CD164	-1.348088202	2.65E-09	<b>TRT-CGT2-1</b>	-1.983963699	9.61E-12
<b>1018.</b> MIR96	-1.350106091	7.81E-07	<b>ERBB4</b>	-2.040102741	1.11E-05
<b>1019.</b> TMEM33	-1.355211042	1.84E-07	<b>LOC105372088</b>	-2.074162848	0.070211482
<b>1020.</b> ARMT1	-1.363621986	2.83E-07	<b>RNA5S3</b>	-2.108098423	0.17009378
<b>1021.</b> SERINC1	-1.367619047	5.65E-08	<b>TRK-TTT6-1</b>	-2.114168799	1.40E-06
<b>1022.</b> NDUFA5	-1.372664296	5.84E-06	<b>KRT78</b>	-2.139538677	0.183122533
<b>1023.</b> CAB39L	-1.374634933	2.54E-08	<b>TRK-TTT2-1</b>	-2.176588293	1.54E-06
<b>1024.</b> TSPAN3	-1.390740455	6.20E-08	<b>TRK-TTT4-1</b>	-2.326674137	4.87E-07
<b>1025.</b> CCNH	-1.396652721	2.45E-06	<b>LOC105379198</b>	-2.784956173	0.021665245
<b>1026.</b> MRC1	-1.428114462	1.78E-10	<b>CDC14A</b>	-2.91787961	0.000424577
<b>1027.</b> IGFBP2	-1.439381441	0.000104772	<b>ERI3</b>	-3.214512208	5.69E-06
<b>1028.</b> SAMD9L	-1.453283471	2.44E-06	<b>RNA5S1</b>	-3.522010031	0.053176267
<b>1029.</b> RETREG1	-1.463025259	6.10E-09	<b>CUBN</b>	-3.706277148	5.32E-06
<b>1030.</b> LYPD3	-1.466283138	8.31E-06	<b>ENPEP</b>	-4.02568816	0.000883655
<b>1031.</b> SORCS2	-1.4758063	4.86E-11	<b>RNA5S2</b>	-4.613409211	0.000426933
<b>1032.</b> SLC17A5	-1.478095712	1.10E-06			
<b>1033.</b> MIR183	-1.480625353	1.34E-09			
<b>1034.</b> MIR518E	-1.4819038	0.019541385			
<b>1035.</b> CD55	-1.487215012	8.65E-07			
<b>1036.</b> MUC1	-1.512452761	3.27E-11			
<b>1037.</b> MIR182	-1.512641813	3.91E-10			
<b>1038.</b> TMEM236	-1.517190084	1.78E-06			
<b>1039.</b> PDHB	-1.517617825	4.62E-07			
<b>1040.</b> TENT5A	-1.517804758	3.85E-08			
<b>1041.</b> TCN1	-1.560930247	0.002716964			
<b>1042.</b> LOC105375168	-1.562978281	1.57E-06			
<b>1043.</b> CSN3	-1.566136662	8.37E-15			
<b>1044.</b> ITGAV	-1.599353861	9.95E-12			
<b>1045.</b> SLC46A3	-1.608429488	3.30E-09			

<b>1046.</b> CMTM6	-1.612303947	2.11E-11			
<b>1047.</b> DHCR24	-1.617133629	1.26E-07			
<b>1048.</b> RNA5-8SP6	-1.635822952	1.24E-13			
<b>1049.</b> CEL	-1.637920345	1.06E-13			
<b>1050.</b> CD46	-1.659708217	1.25E-09			
<b>1051.</b> MIR519D	-1.661810296	0.004366524			
<b>1052.</b> MIR518C	-1.670588698	0.015737579			
<b>1053.</b> RET	-1.670648173	2.18E-07			
<b>1054.</b> CSN1S2AP	-1.672481205	2.25E-15			
<b>1055.</b> SH2D6	-1.700030447	1.87E-07			
<b>1056.</b> SC5D	-1.732622289	5.71E-07			
<b>1057.</b> SCD	-1.740204871	1.05E-09			
<b>1058.</b> LRRC26	-1.745108522	5.07E-08			
<b>1059.</b> HMGCR	-1.803244488	5.88E-11			
<b>1060.</b> LINC01235	-1.835490821	2.74E-15			
<b>1061.</b> CYP51A1	-1.862691609	3.36E-08			
<b>1062.</b> MIR375	-1.896768277	1.18E-16			
<b>1063.</b> ALDH1A1	-1.902180971	1.94E-09			
<b>1064.</b> TRT-AGT1-1	-1.92156554	3.34E-08			
<b>1065.</b> LALBA	-1.947974057	2.43E-21			
<b>1066.</b> PTHLH	-1.972274061	2.66E-11			
<b>1067.</b> MSMO1	-2.015748483	1.72E-12			
<b>1068.</b> CSN2	-2.209871069	5.11E-22			
<b>1069.</b> GPX3	-2.243791525	2.49E-14			

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

**Tabela 03: A2 - Transcritos regulados positiva e negativamente de 02 - 06 meses de lactação pela análise *in silico*, 2024.**

2 - 4			4 - 6		
GENE ID	LOG2FC	P VALOR	GENE ID	LOG2FC	P VALOR
<b>1070. DNAJC13</b>	7.395388152	9.19E-05	<b>MIR1271</b>	7.825231138	5.45E-07
<b>1071. LGR6</b>	7.086350899	0.00144402	<b>MIR126</b>	7.459244387	0.000358309
<b>1072. ASB8</b>	7.081524069	0.000323885	<b>KXD1</b>	7.231479494	0.00011283
<b>1073. LARGE1</b>	6.962037552	0.004776831	<b>SNORD44</b>	7.028901064	0.000207146
<b>1074. MAPRE3</b>	6.930906737	0.002161289	<b>LOC124901926</b>	6.926538667	0.001667782
<b>1075. CCDC88A</b>	6.920137469	0.000153003	<b>DDA1</b>	6.904067014	0.000277752
<b>1076. NIP7</b>	6.890866215	0.002446296	<b>ZNF347</b>	6.774046465	5.12E-05
<b>1077. SNORD75</b>	6.807887955	0.003024918	<b>CLIP1</b>	6.711899053	0.002482412
<b>1078. SYNE3</b>	6.741696051	0.002599647	<b>PANX1</b>	6.692655914	0.003251238
<b>1079. RNF19A</b>	6.737389035	0.00315793	<b>NLN</b>	6.638483681	0.001212335
<b>1080. PCIF1</b>	6.646402101	0.001146414	<b>CSPP1</b>	6.611483874	0.003356366
<b>1081. HPS6</b>	6.582485688	0.001246765	<b>THBS1</b>	6.598769742	0.003292958
<b>1082. IL6R</b>	6.532857792	0.003937324	<b>TMTC4</b>	6.562887135	0.001421637
<b>1083. SYNGR2</b>	6.501657461	0.002053671	<b>LTBP4</b>	6.55832392	0.003658534
<b>1084. SMIM7</b>	6.501577983	0.004493125	<b>MIR6875</b>	6.541907427	0.000923631
<b>1085. NADSYN1</b>	6.48320098	0.001402789	<b>ARHGAP39</b>	6.508471226	0.00466569
<b>1086. GC</b>	6.363330789	0.002468086	<b>ZMAT3</b>	6.477081819	0.003761374
<b>1087. RPL10A</b>	6.210997466	0.00102608	<b>OGFOD2</b>	6.440626807	0.001600773
<b>1088. ZDHHC14</b>	6.203302532	0.003918481	<b>CRABP1</b>	6.409173452	0.00453639
<b>1089.</b>			<b>MAP2K4P1</b>	6.324492372	0.001936122
<b>1090.</b>			<b>MIR942</b>	6.263113625	0.002852625
<b>1091.</b>			<b>MIR3620</b>	6.212396516	0.002792822
<b>1092.</b>			<b>MTA3</b>	6.114746306	0.004261991
<b>1093.</b>			<b>DTD1</b>	6.079524122	0.003531931
<b>1094.</b>			<b>FIS1</b>	6.033066442	0.003917022
<b>1095.</b>			<b>UBTD2</b>	5.803035512	0.002928131
<b>1096.</b>			<b>GFOD1</b>	5.498047449	0.001457495
<b>1097.</b>			<b>MIR215</b>	4.145142408	0.001059079
<b>1098.</b>			<b>MIR100</b>	3.056280115	0.001101427
<b>1099. MRPL42</b>	-5.706160306	0.002562823	<b>CCDC149</b>	-3.822516577	0.003348683
<b>1100. MTM1</b>	-5.795587085	0.002073844	<b>CPNE2</b>	-3.969557117	0.004916972
<b>1101. ARL15</b>	-6.087424154	0.004085072	<b>ZBTB45</b>	-5.191711376	0.003857348
<b>1102. TMEM39A</b>	-6.223689314	0.003315229	<b>TUBA1C</b>	-5.907956741	0.002334726
<b>1103. LINC02086</b>	-6.376442102	0.002094	<b>SLC39A12</b>	-5.96661458	0.001286981
<b>1104. ZNF792</b>	-6.434350344	0.001919842	<b>SP110</b>	-6.029215706	0.00391483
<b>1105. EPHX1</b>	-6.46219624	0.002130455	<b>TOMM34</b>	-6.169460214	0.00285053
<b>1106. OGFOD2</b>	-6.466588213	0.001976803	<b>NCBP1</b>	-6.663755743	0.000657348

<b>1107. SETD1A</b>	-6.478705701	0.001903629	<b>TMEM68</b>	-6.679697502	0.002140899
<b>1108. CCDC174</b>	-6.51569732	0.001359301	<b>CCDC127</b>	-6.686892045	0.002441575
<b>1109. TMEM209</b>	-6.522511574	0.004506724	<b>KIAA0753</b>	-6.827966071	0.00062167
<b>1110. IWS1</b>	-6.531854952	0.001499142	<b>CWF19L2</b>	-6.840006835	0.000491839
<b>1111. NFS1</b>	-6.582479209	0.001081186	<b>SYNGR2</b>	-6.851679428	0.000377033
<b>1112. ago/03</b>	-6.594456398	0.001108168	<b>ABCA5</b>	-7.25555652	6.45E-06
<b>1113. CSPP1</b>	-6.620441063	0.004058224			
<b>1114. ZBTB18</b>	-6.629730726	0.003748587			
<b>1115. EEF1B2</b>	-6.669156763	0.0010046			
<b>1116. GNAI1</b>	-6.696156188	0.001014442			
<b>1117. MRFAP1L1</b>	-6.742879317	0.002546982			
<b>1118. TRMT12</b>	-6.79567037	0.002711954			
<b>1119. ZNF347</b>	-6.805838679	9.25E-05			
<b>1120. TOPORS</b>	-6.868382925	0.000743727			
<b>1121. TRIM13</b>	-7.002818888	0.00034805			
<b>1122. RSBN1L</b>	-7.021717185	0.000448189			
<b>1123. TMEM254</b>	-7.134561395	0.000247463			
<b>1124. PPIL4</b>	-7.152655925	0.000233568			
<b>1125. SENP2</b>	-7.295993174	0.00019824			
<b>1126. MIR654</b>	-7.347276821	0.000217346			
<b>1127. ARL5B</b>	-7.3616253	0.000137446			
<b>1128. KLHL25</b>	-7.385188034	1.36E-05			

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.



Universidade Federal da Bahia  
Instituto de Ciências da Saúde

Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular  
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela CEP: 40110-100  
Salvador, Bahia, Brasil  
Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular