



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

CLÁUDIA MOREIRA FERNANDES

***O contributo da involução mamária e lactação para o risco e
prognóstico de cancro da mama após a gestação***

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE GINECOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROFESSORA DOUTORA MARIA MARGARIDA DE OLIVEIRA FIGUEIRDO DIAS

MESTRE ANA SOFIA FERNANDES PAIS

FEVEREIRO/2022

Índice

1. Resumo.....	1
2. <i>Abstract</i>	2
3. Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos.....	3
4. Introdução.....	5
5. Metodologia.....	7
6. Discussão.....	8
6.1 Alterações da glândula mamária: o ciclo proliferação-lactação-involução.....	8
6.1.1. Gravidez, proliferação e diferenciação celular.....	8
6.1.2. Alterações inerentes à lactação.....	9
6.1.3. Involução pós-parto.....	10
6.2 Ações da amamentação no recém-nascido e na lactante.....	14
6.2.1 Efeitos sobre o recém-nascido.....	14
6.2.2 Benefícios maternos.....	15
6.3 Cancro da mama no pós-parto.....	16
6.3.1 Definição.....	16
6.3.2 Contextualização epidemiológica.....	17
6.3.3 Mecanismos etiopatogénicos subjacentes ao mau prognóstico.....	17
6.3.3.1 Perfil molecular.....	17
6.3.3.2 Involução da glândula mamária no pós-parto.....	18
6.3.3.2.1 Microambiente Inflamatório.....	18
6.3.3.2.2 Linfangiogénese.....	19
6.4 Amamentação e cancro da mama após uma gestação.....	21
6.4.1 Estudos epidemiológicos.....	21
6.4.2 Hipóteses etiopatogénicas.....	25
6.4.2.1 Involução abrupta e involução gradual.....	25
6.4.2.2 Prolactina.....	26
6.4.2.3 Inativação de oncogenes.....	27
7. Conclusão.....	29
8. Agradecimentos.....	31
9. Referências bibliográficas.....	32

1. Resumo

O cancro da mama é uma entidade complexa, assumindo-se como a neoplasia mais frequente a nível mundial e uma importante causa de morbimortalidade. Em mulheres jovens, estima-se que 35% a 55% do total de neoplasias da mama seja diagnosticado após uma gestação. De facto, o diagnóstico desta patologia no período após o parto está associado a um prognóstico mais reservado, uma vez que tem maior risco de metastização e menor taxa de sobrevivência global, quando comparado com mulheres nulíparas na mesma faixa etária.

O objetivo deste trabalho é realizar uma revisão da literatura sobre os fatores que conferem pior prognóstico ao cancro da mama diagnosticado após uma gestação e sobre o impacto da amamentação no risco e prognóstico desta patologia.

Para a sua elaboração, foi realizada uma pesquisa da literatura disponível na base de dados *PubMed*, sendo selecionados artigos publicados nos últimos 10 anos.

De acordo com a evidência atual, a involução, processo que ocorre na ausência ou cessação da lactação, é considerada um dos principais mecanismos subjacentes ao mau prognóstico dos tumores malignos da mama detetados após uma gestação. O seu microambiente rico em citocinas pró-inflamatórias, a maior ativação de fibroblastos e deposição de colagénio fibrilar consequentes à remodelação do estroma, e o aumento da densidade dos vasos linfáticos criam condições propícias à proliferação de células com potencial maligno. Para além disso, uma elevada percentagem destes tumores apresenta um perfil bastante agressivo, com negatividade para recetores hormonais e HER2. A involução gradual, subjacente à amamentação, está associada a alterações na resposta imunológica, nas vias de sinalização ativadas e em mecanismos epigenéticos, e a uma maior inativação de oncogenes, o que demonstra conferir menor capacidade de progressão tumoral; também está associada a um nível mais elevado de recetores de prolactina, fator apontado, em estudos recentes, como preditor de melhor prognóstico de neoplasias da mama.

Não existem, atualmente, estudos suficientes que permitam um consenso a nível internacional do benefício da amamentação na diminuição do risco e na melhoria do prognóstico do cancro da mama diagnosticado após uma gestação. No entanto, é consensual que a amamentação tem um impacto positivo na redução da incidência de tumores triplos negativos, característicos desta patologia.

Palavras-chave

Neoplasia da Mama; Lactação; Fatores de Risco; Glândula Mamária Humana; Período Pós-parto.

2. Abstract

Breast cancer is a complex disease that is now the leading cause of global cancer incidence, with an important morbimortality associated. It is estimated that 35% to 55% of all cases of breast cancer in young women are diagnosed after childbearing. In fact, postpartum diagnosis of breast cancer is associated with a worse prognosis, since it has increased risk of metastasis and death when compared with nulliparous women.

The aim of this study is to review the available literature about the mechanisms underlying the worst prognosis of postpartum breast cancer and the impact of breastfeeding on the risk and prognosis of this disease.

Bibliographic research was carried out on Pubmed database and articles from the last 10 years were selected.

According to current scientific evidence, involution, a physiological process that occurs in the absence or cessation of lactation, is a key mediator of the worst prognosis of postpartum breast cancer. The microenvironment of involution is characterized by upregulation of pro-inflammatory cytokines, fibroblasts activation and increased fibrillar collagen deposition during stromal remodelling, and increased density of lymphatic network. These events promote tumour growth. Furthermore, a significant part of these tumours present an aggressive behaviour, including negativity to hormone receptors and HER2. Gradual involution, underlying breastfeeding, is associated with changes in the immune response, activation of different signalling pathways, different epigenetic mechanisms, and higher oncogenes inactivation. It is also related with higher levels of prolactin receptor, recently associated with more favourable outcomes in breast cancer.

Thus far, there is no international consensus about breastfeeding impact on prognosis of postpartum breast cancer due to lack of scientific evidence. However, it is clear that breastfeeding promotes a reduction in the incidence of triple negative tumours.

Keywords

Breast Neoplasms; Lactation; Risk Factors; Mammary Glands, Human; Postpartum Period.

3. Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

AKT1 - *Protein kinase B*

BIM - *BH3-only protein*

CD - *Cluster of differentiation*

COX-2 - *Cyclooxygenase-2*

DNA - *Deoxyribonucleic acid*

DR4 - *Death receptor 4*

EGF - *Epidermal growth factor*

FASL - *Fas ligand*

HCG - *Human chorionic gonadotropin*

HER2 - *Human epidermal growth factor receptor 2*

IL- *Interleukin*

JAK2 - *Janus kinase 2*

Ki-67 - *Proliferating cell nuclear antigen*

LIF - *Leukemia inhibitory factor*

MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*

MESH - *Medical subject headings*

MMP- *Metalloproteinase*

MMR - *Macrophage mannose receptor*

MTOR - *Mammalian target of rapamycin*

NK - *Natural Killers*

N-SM - *Neutral sphingomyelinase*

P13K - *Phosphoinositide 3 kinase*

PIP - *Prolactin inducible protein*

PR - *Progesterone receptor*

PRLR - *Prolactin receptor*

RE - *Estrogen receptor*

SEMA7A - *Semaphorin 7A*

SPI2A - *Serine proteinase inhibitor 2a*

STAT - *Signal transducer and activator of transcription*

TGFβ3 - *Transforming growth factor β3*

TIMP-1 - *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1*

TNFα - *Tumor necrosis factor α*

TRAIL - *Tumor necrosis factor alpha-related apoptosis-inducing ligand*

UPA - *Proteinase urokinase-type plasminogen activator*

VEGF - *Vascular endothelial growth*

WAP - *Whey acidic protein*

4. Introdução

O cancro da mama é, atualmente, a neoplasia maligna mais diagnosticada a nível mundial, representando 11,7% de todas as neoplasias, e é responsável por 20% de todas as mortes por cancro. (1, 2) No sexo feminino é a neoplasia mais frequente, correspondendo a 25% dos tumores malignos, e é a principal causa de morte por cancro neste sexo. (1)

De acordo com o perfil molecular, são definidos 5 subtipos de cancro da mama: luminal A, luminal B, HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) positivo, *basal-like* e *normal-like*. (3) Esta classificação tem em consideração a expressão de recetores de estrogénio (RE), recetores de progesterona (RP), HER2 e Ki-67 (*proliferating cell nuclear antigen*), um marcador de proliferação das células tumorais. Os tumores luminal A são RE e/ou RP positivos, HER2 negativos e têm uma baixa percentagem de Ki67 (inferior a 14%). Os tumores luminal B têm um pior prognóstico do que os luminal A (4) e subdividem-se em 2 grupos: HER2 positivo e HER2 negativo. Os tumores luminal B HER2 positivos são RE e HER2 positivos, independentemente do *status* dos RP e do Ki67; já os tumores luminal B HER2 negativos são RE positivos, HER2 negativo, e pelo menos um dos seguintes: Ki-67 elevado (ou seja, superior a 14%) ou RP negativo ou com baixa expressão. O subtipo tumoral HER2 positivo, que apresenta um fenótipo bastante agressivo, é caracterizado pela expressão de HER2 e ausência de RE e RP. (4, 5) Os tumores *basal-like*, que expressam marcadores mioepiteliais basais, (4) são tumores triplos negativos, ou seja, RE, RP e HER2 negativos. (3-5) Por último, o subtipo *normal-like* engloba tumores triplos negativos, mas que não cumprem os critérios de *basal-like*, por não apresentarem positividade para a citoqueratina 5. (4)

A gravidez apresenta um efeito dicotómico na incidência de cancro da mama. Apesar da primeira gravidez de termo em idade jovem e a multiparidade conferirem proteção ao reduzirem o risco de cancro da mama, (6) após cada parto existe um aumento transitório desse mesmo risco. (7)

De facto, estudos recentes apontam o cancro da mama no pós-parto como sendo uma entidade distinta do cancro da mama diagnosticado durante a gestação, com características biológicas próprias, que lhe conferem um pior prognóstico. (8-10) Desta forma, muitos autores defendem que o cancro da mama no pós-parto compreende as neoplasias malignas da mama diagnosticadas até 5 a 10 anos após uma gestação completa. (11, 12) Estima-se que represente entre 35% e 55% do número total de cancros da mama em mulheres jovens, com idade inferior a 45 anos. (13) Estudos demonstram que doentes com cancro da mama após o parto apresentam um risco 2,8 vezes superior de metastização e 2,7 vezes superior de morte, quando comparado com mulheres nulíparas. (7) Diversas hipóteses são apontadas para este pior prognóstico. Em primeiro lugar, pelas suas idades, uma elevada percentagem destas mulheres não é abrangida pelos programas de rastreio existentes, o que se reflete num atraso

no diagnóstico desta patologia, em que grande maioria é apenas diagnosticada por se apresentar sob a forma de massa palpável. (14, 15) Por outro lado, há um predomínio de tumores recetores negativos, cujo mau prognóstico se encontra bem estabelecido. (16) Por último, o microambiente inflamatório e a linfangiogénese presentes na involução fisiológica, que ocorre na ausência ou na cessação da lactação, têm sido apontados como possíveis mediadores deste pior prognóstico. (17)

Considerando todos estes aspetos mencionados, a prevenção do cancro da mama após uma gestação assume um papel fulcral, nomeadamente através da sua intervenção sobre fatores modificáveis. É neste contexto que surge o paradigma da amamentação e a necessidade emergente de aprofundar este tema com o intuito de estabelecer uniformidade e concordância. No entanto, muitos aspetos do papel da amamentação no cancro da mama no pós-parto não estão esclarecidos e a evidência científica atual no âmbito deste tema é limitada e muito pouco consensual.

O objetivo deste trabalho é elaborar uma revisão narrativa com base na literatura disponível sobre o contributo da involução mamária e da amamentação para o risco e prognóstico de cancro da mama diagnosticado no período após uma gestação.

5. Metodologia

Para a realização desta revisão da literatura foi feita uma pesquisa dos artigos publicados na base de dados *Pubmed*, utilizando a fórmula de pesquisa “(Lactation OR Breastfeeding) AND (Postpartum Breast Cancer)”. Adicionalmente, foi realizada uma pesquisa utilizando os seguintes termos *Medical Subject Headings* (MESH): “Breast Neoplasms”, “Lactation”, “Risk Factors”, “Mammary Glands, Human” e “Postpartum Period”. De forma a restringir os resultados, aplicaram-se os filtros “last 10 years” e “english”.

Com os termos anteriormente descritos e até à data da última pesquisa (07-11-2021), obtiveram-se 347 artigos. A seleção inicial foi baseada no título e no resumo, tendo sido excluídos artigos cujos objetivos e conclusão do estudo não se relacionaram com o objetivo desta revisão. Para além destes artigos, foram ainda eliminados artigos duplicados ou sem texto completo disponível. Foram, portanto, selecionados 89 artigos com base nestes critérios que incluíram meta-análises, revisões sistemáticas, estudos de coorte, estudos caso-controlo, estudos caso-caso, *pooled analysis* e revisões narrativas.

A este total de referências bibliográficas (89) foram acrescentados mais 18 artigos referenciados pelos artigos selecionados primariamente pela sua relevância para este trabalho, inclusive 3 publicados previamente ao intervalo de tempo mencionado. Foi também consultado um livro de medicina materno-fetal.

6. Discussão

6.1 Alterações da glândula mamária: o ciclo proliferação-lactação-involução

6.1.1. Gravidez, proliferação e diferenciação celular

O desenvolvimento da glândula mamária inicia-se na 6.ª semana de embriogénese e culmina na gravidez e lactação.

Durante a gravidez, a glândula mamária é sede de numerosas modificações de carácter estrutural e funcional, como consequência de alterações hormonais, com o intuito de atingir um estado de maturação funcional: a lactação. (18) Inicialmente, a partir da 2.ª semana de gestação, a produção de estrogénio e progesterona é assegurada pelo corpo lúteo (19) enquanto que a placenta só assume esta função entre a 8.ª e 10.ª semana. (20) A gonadotrofina coriónica humana (HCG), produzida pelas células do trofoblasto, para além de prevenir a degradação do corpo lúteo, estimula-o a continuar a produzir estrogénio e progesterona. (19)

O primeiro trimestre é caracterizado por um aumento dos níveis destas duas hormonas ovárias. O estrogénio é responsável pela proliferação celular de células estaminais da mama que resulta na formação de novas unidades ductais terminais; estimulação da atividade mitótica e consequente expansão e ramificação do sistema ductal no sistema adiposo; (18, 19) e pela diminuição da quantidade de tecido adiposo existente, consequente à gradual proliferação ductal. Outro efeito do aumento de estrogénios prende-se na proliferação das células lactotróficas da hipófise anterior, responsáveis pela produção de prolactina. (19) A progesterona promove também a extensão da ramificação ductal e é o principal promotor da alveologénese. Em conjunto com a prolactina estimulam a diferenciação dos alvéolos, estruturas que produzem e secretam leite durante a lactação. Durante este período há ainda um aumento da vascularização glandular de forma que cada alvéolo fique rodeado por uma rede capilar sanguínea. (21)

O segundo trimestre é marcado pela formação dos lactócitos, que resultam da diferenciação das células epiteliais da camada luminal em consequência do aumento dos níveis de prolactina. Este processo associado à diferenciação alveolar compreende a fase I da lactogénese, também denominada de iniciação secretora. (18, 22) Desta forma, a glândula mamária encontra-se suficientemente capacitada para produzir leite; no entanto, a quiescência glandular é mantida pelos elevados níveis séricos de estrogénio e progesterona. (19)

6.1.2. Alterações inerentes à lactação

No momento em que ocorre o parto, há uma diminuição acentuada dos níveis de estrogênio e progesterona e, desta forma, o estímulo inibitório sobre a prolactina desaparece, aumentando consequentemente a sua concentração plasmática. (23)

A prolactina desempenha um papel fulcral na lactogênese II, a fase de ativação secretora. (22, 24) Ao ligar-se ao seu recetor PRLR (*Prolactin receptor*) promove a ativação de diversas vias de sinalização, sendo a principal a via Jak2 (*Janus kinase 2*) / STAT5 (*Signal transducer and activator of transcription 5*). A interação da prolactina com o seu recetor induz a dimerização e ativação do Jak2 que, por sua vez, fosforila o fator de transcrição STAT5, permitindo a sua translocação para o núcleo (figura 1), onde se liga a promotores de genes específicos à síntese dos componentes do leite, (23) nomeadamente das proteínas WAP (*Whey acidic protein*), β - lactoglobulina e β -caseína. (24) Para além desta, a prolactina promove a ativação de outras vias que participam na síntese dos constituintes do leite, como a MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), P13K (*Phosphoinositide 3 kinase*) / AKT1 (*Protein kinase B*) e mTOR (*Mammalian target of rapamycin*), (24, 25) implicadas na proliferação do epitélio da glândula mamária; (25) transporte de glicose, síntese de lactose e lípidos; (24) e regulação da síntese proteica, (25) respetivamente.

Em conjunto com a prolactina, outras hormonas metabólicas participam no processo de síntese de nutrientes básicos. A insulina e os glucocorticoides regulam a formação *de tight*

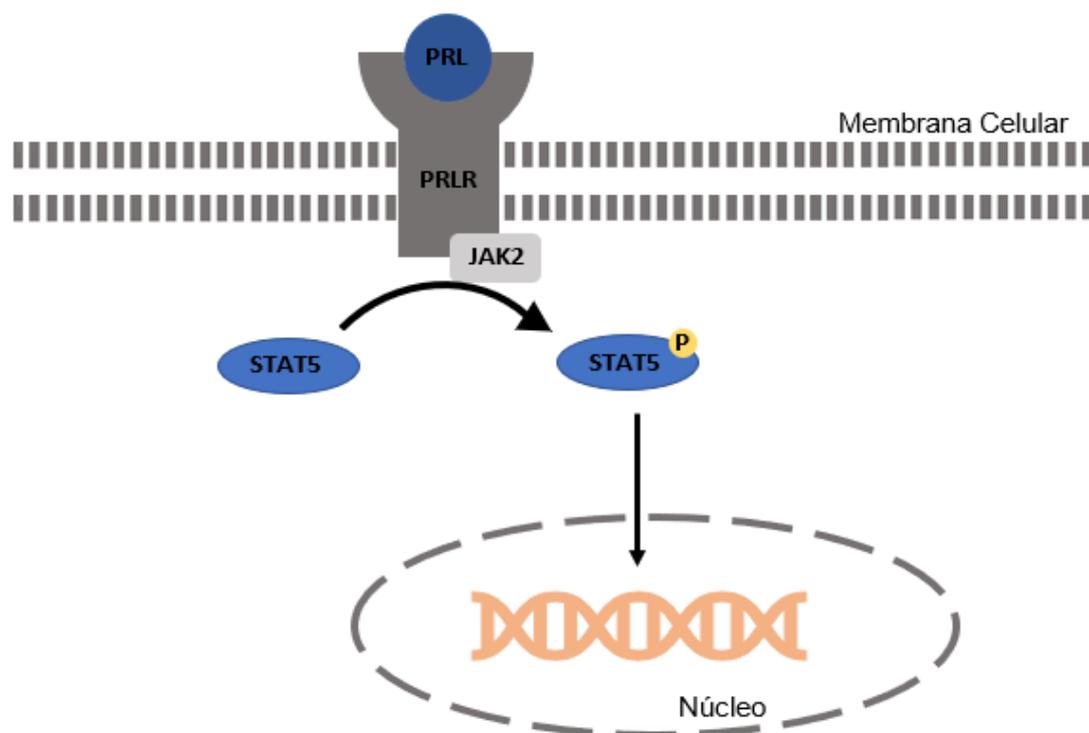


Figura 1- Ativação do recetor da prolactina e de fatores de transcrição associados.

junctions, estimulam a diferenciação celular e a expressão de proteínas. (23) Os glucocorticoides e a prolactina têm a capacidade de ativar o PIP (*Prolactin-inducible protein*), uma glicoproteína com efeito anti-apoptótico na glândula mamária. (24) A hormona do crescimento promove a proliferação celular e aumenta a expressão do fator de transcrição STAT5. As hormonas tiroideias mantêm prioritária a atividade metabólica do epitélio glandular durante a lactação. (23)

A ocitocina é uma hormona peptídica produzida no hipotálamo, e armazenada na hipófise posterior, em resposta a estímulos sensoriais, e encontra-se envolvida no reflexo neuroendócrino que permite a ejeção de leite. Durante a sucção, há uma pressão mecânica negativa sobre o quarto nervo intercostal que, associada à estimulação do mamilo e da aréola, sinaliza a libertação de ocitocina. (26) Esta vai exercer a sua ação nas células mioepiteliais e, ao promover a sua contração, impulsiona o movimento do leite para o lúmen alveolar. (23)

O colostro é o leite produzido nos primeiros 3 a 5 dias após o parto. Tem uma composição muito distinta, com a principal função de assegurar proteção imunológica e suporte nutricional ao recém-nascido. (18) É constituído por componentes do sistema imunológico em elevadas concentrações, como a imunoglobulina A (IgA), a lactoferrina e leucócitos; e por fatores que promovem a proliferação celular no trato gastrointestinal e a hematopoiese, como por exemplo o EGF (*Epidermal growth factor*). A baixa concentração de lactose neste fluido justifica o seu baixo volume. Depois do colostro, é produzido um leite de transição, fase marcada por um aumento gradual da concentração de lactose, refletindo-se na produção de um volume mais elevado. No final do primeiro mês, o leite materno é considerado maturo. Este é constituído por lactose; hidratos de carbono; lípidos; oligossacarídeos; proteínas bioativas como a α -lactoalbumina, IgA, lactoferrina e lisozima; micronutrientes, nomeadamente vitaminas A, E, B1, B2, B6, B12 e D, colina, selénio, iódina, cálcio, ferro, potássio, cobre, zinco e folato; fatores de crescimento; hormonas; citocinas e leucócitos. (23, 27)

A manutenção da lactação, fase III lactogénese, é assegurada pela prolactina, cuja concentração aumenta em resposta ao esvaziamento alveolar; e pela ocitocina, que promove a secreção pulsátil das células mioepiteliais necessária à ejeção do leite. (23)

6.1.3. Involução pós-parto

Após a cessação da lactação, a glândula mamária retoma a sua arquitetura prévia à gravidez através de um processo denominado de involução. (28, 29) Esta alteração engloba uma fase inicial, reversível, de intensa morte celular programada, seguida de um estágio irreversível caracterizado pela remodelação da estrutura glandular. (21)

A inexistência de sucção e de estimulação do mamilo e da aréola despoleta a primeira fase da involução pós-lactacional. Há acumulação e estase de leite no lúmen alveolar com desprendimento e extravasamento das células epiteliais secretoras para o seu interior, promovendo a expressão e regulação de inúmeros intervenientes responsáveis pela ativação de mecanismos apoptóticos. (30)

Ocorre um aumento da expressão da LIF (*Leukemia inhibitory factor*), uma glicoproteína praticamente indetetável durante a lactação, e de IL-6 (*Interleucina-6*), que têm a capacidade de fosforilar o fator de transcrição STAT3, considerado o principal regulador deste processo. A estase do leite induz também uma elevação do TNF α (*Tumor necrosis factor α*), IL-10, TGF β 3 (*Transforming growth factor β 3*), TIMP-1 (*Tissue inhibitor of metalloproteinases-1*) e FasL (*Fas ligand*). (31)

A STAT 3 atua no p50 α e no p53 α , duas subunidades inibitórias do PI3K, restringindo a sua atividade; e promove a expressão de proteases lisossomais, como a catepsina B e a catepsina L, ao reprimir o seu inibidor Spi2a (*Serine proteinase inhibitor 2a*). (21, 31)

A IL-10, por sua vez, induz a ativação do TRAIL (*Tumor necrosis factor alpha-related apoptosis-inducing ligand*) e do DR4 (*Death receptor 4*), componentes importantes da apoptose. (30)

O TGF β 3 é responsável pela diminuição dos níveis circulantes das hormonas lactogénicas, nomeadamente da prolactina e dos glucocorticoides. (31)

O mecanismo de morte celular programada preponderante nesta fase inicial é mediado por lisossomas (figura 2). O TNF α ativa a N-SM (*Neutral sphingomyelinase*) que leva à produção da esfingosina, que por sua vez induz a permeabilização da membrana lisossomal; esta permeabilização é promovida também pela caspase 8, uma protease ativada pelos TRAIL, FasL e TNF α ; e pela inibição do PI3K pelo STAT3. Desta forma, as catepsinas são libertadas para o citosol, resultando numa degradação eficiente do material englobado. (30, 31) As células epiteliais remanescentes, que expressam recetores como o CD36 (*Cluster of differentiation 36*), CD91 e calreticulina, desempenham a função de fagócitos amadores e reabsorvem as células apoptóticas luminais. (30)

A diminuição gradual da concentração de prolactina incita a transição para o segundo estágio da involução, que se sucede por norma ao fim de 48 horas e onde ocorrem alterações não passíveis de reversibilidade com a retoma da sucção. (31) Caracteriza-se por dramáticas alterações na arquitetura glandular, com rutura da membrana basal, colapso alveolar e rediferenciação adipocitária. (21)

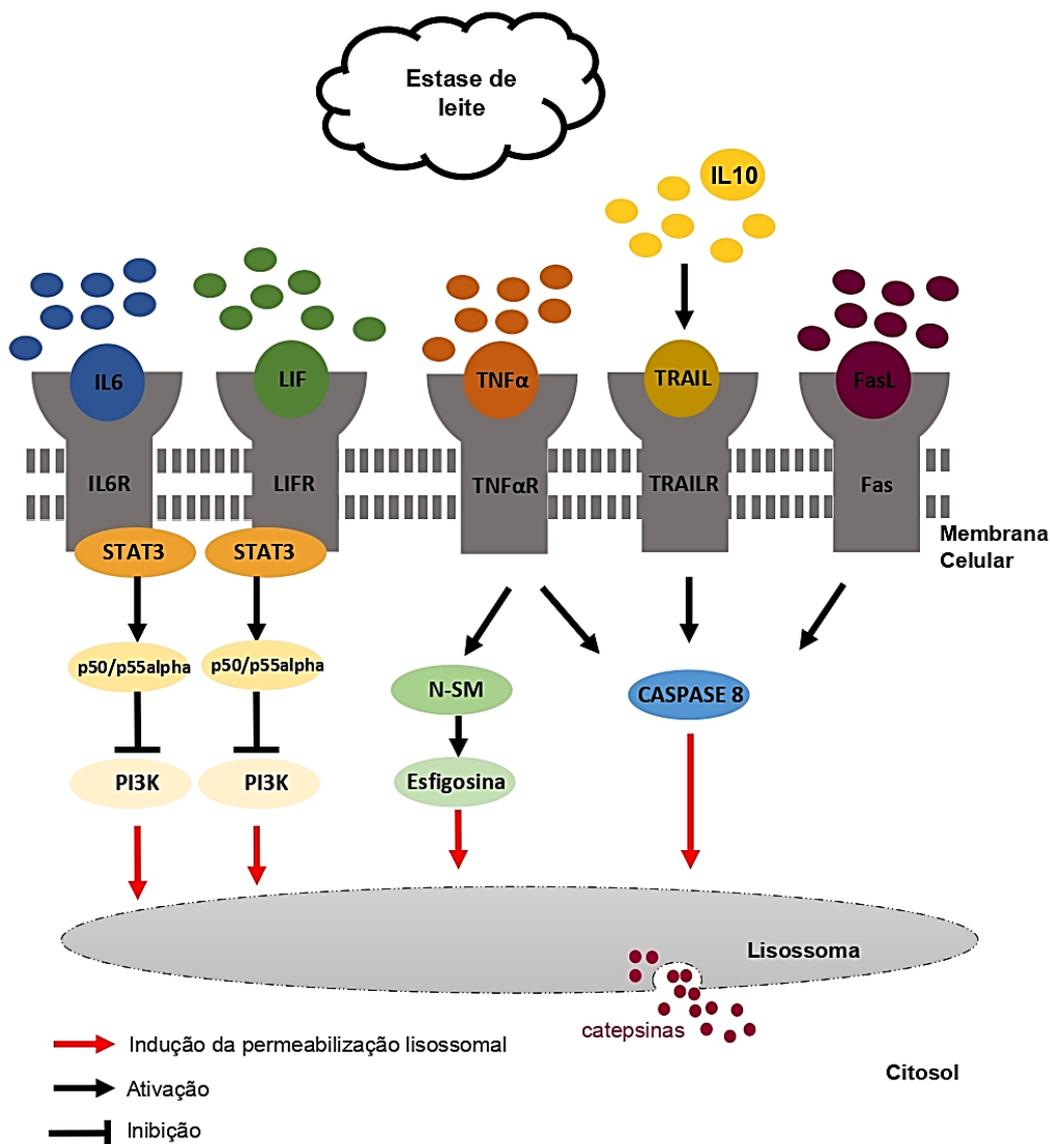


Figura 2- Indução do mecanismo de morte celular mediado por lisossomas. Adaptado de Watson CJ, Kreuzaler PA. *Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution.* *Int J Dev Biol.* 2011;55(7-9):757-62.

As metaloproteínases, especificamente a MMP2 (*Metalloproteinase 2*), MMP3 e a MMP9, são desacopladas do seu inibidor TIMP e, juntamente com a plasmina, ativada pela proteinase uPA (*Proteinase urokinase-type plasminogen activator*) a partir do plasminogénio, degradam a membrana basal. (21, 32) As metaloproteínases ao clivarem substratos como E-caderina e o colagénio tipo IV, facilitam a perda de conexão celular à matriz extracelular, mecanismo de apoptose denominado anoiquia.(30) No entanto, é a morte celular mitocondrial que predomina, promovida pela diminuição do fator de transcrição STAT5, o que induz o aumento da expressão da BIM (*BH3-only protein*), proteína implicada na apoptose

mitocondrial. Simultaneamente, há um aumento do transporte de zinco, nutriente que também ativa a morte celular mitocondrial. (31)

O sistema imune inato também participa neste processo. A ativação do STAT3 promove um influxo de neutrófilos nas primeiras 24 horas, a que se segue a presença de macrófagos, linfócitos B, eosinófilos (30, 31) e linfócitos T, num momento mais avançado. (33)

Num estudo realizado por Jindal *et al.*, foi observado que a glândula mamária de mulheres 18 meses após o parto apresentava uma composição e conteúdo lobular indistinguível da glândula mamária de mulheres nulíparas, sugerindo, desta forma, que o processo de involução se encontra concluído 18 meses após o parto. (28)

6.2 Ações da amamentação no recém-nascido e na lactante

6.2.1 Efeitos sobre o recém-nascido

A influência da amamentação, quer a curto como a longo prazo, para a mãe e para o filho, tem sido alvo de bastante investigação, estando comprovado que esta traduz inúmeros benefícios para ambos. (34) De facto, a Organização Mundial de Saúde e o Fundo das Nações Unidas para a Infância estabeleceram diretrizes que recomendam que a amamentação seja iniciada nas primeiras horas após o parto, devendo ser mantida como a forma de alimentação exclusiva durante os primeiros 6 meses de vida da criança, momento a partir do qual a alimentação complementar deve ser gradualmente introduzida. Está preconizado que a amamentação deve ser promovida até a criança atingir pelo menos 2 anos de idade. (35, 36)

Evidências relativas à comparação entre o aleitamento materno exclusivo e o artificial apontam, com clareza, para o primeiro como um determinante fulcral na intervenção em saúde pública, uma vez que está associado a uma importante redução da mortalidade global na infância. (35) Numa meta-análise conduzida por Sankar *et al.*, os resultados obtidos apontam para que crianças amamentadas exclusivamente tenham um risco 14 vezes inferior de mortalidade. (37) Para além do impacto na mortalidade global, é consistente a diminuição do risco da síndrome da morte súbita do lactente em crianças alimentadas com leite materno, teoria consolidada por Hauck *et al.* ao concluir que, quando comparado com crianças nutridas com fórmula, crianças com amamentação exclusiva apresentaram uma redução de 73 % do risco desta síndrome. (38)

O sistema imune do recém-nascido é caracterizado por um estado de imaturidade e, apesar de durante a gestação ter sido exposto à flora microbiana materna, nos primeiros tempos de vida está sujeito a uma elevada suscetibilidade a infeções. (39) Neste sentido, o leite materno demonstra ter um papel fulcral na atenuação do risco de infeções agudas como a gastroenterite e infeções do trato respiratório inferior, (27) causas comuns de mortalidade em idades inferiores a 5 anos. (35) Inclusive, crianças amamentadas exclusivamente com leite materno exibiram uma redução de 72% de admissões hospitalares e de 77% de mortalidade por diarreia. Relativamente a infeções respiratórias, aproximadamente metade das hospitalizações e cerca de dois terços das mortes poderiam ter sido prevenidas com a amamentação. (40) Esta proteção deve-se, por um lado, à presença no leite materno de constituintes com papel imunológico, como imunoglobulinas, lactoferrina, lisozima, citocinas e leucócitos. (39) Por outro lado, o microbioma intestinal de uma criança amamentada com leite materno apresenta uma maior quantidade de bifidobactérias, microrganismos importantes na modulação do sistema imunológico, e uma menor proporção de bactérias patogénicas, como *Veillonella*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Clostridioides*. (41) Em recém-nascidos prematuros, o leite materno está implicado na redução de complicações características da

prematuridade, nomeadamente de enterocolite necrotizante, retinopatia da prematuridade, sépsis tardia e displasia broncopulmonar. (27) Para além disso, nestas crianças a amamentação tem um impacto positivo no seu desenvolvimento neurocognitivo. (42) No que respeita a crianças com um parto de termo, também se verificam melhores resultados em testes de inteligência em crianças amamentadas com leite materno. (43)

Não se restringindo apenas aos benefícios a curto prazo, a amamentação está associada à atenuação do risco de síndrome metabólica e de algumas neoplasias. Recém-nascidos sob aleitamento materno apresentam uma redução de 22% do risco de obesidade na infância (44) e de 13% do risco de excesso de peso ou obesidade na idade adulta. (43) No que diz respeito ao impacto no risco cardiovascular, Horta *et al.* (45) observou uma redução de 33% no risco de diabetes *mellitus* tipo 2 em adultos que foram amamentados durante a sua infância. (45) Relativamente às neoplasias pediátricas, numa meta-análise conduzida por Su *et al.*, envolvendo 475 579 participantes com diversos tipos de tumores, foi evidente uma forte ligação entre alimentação com aleitamento materno e diminuição em 33% e 41% do risco de leucemia e neuroblastoma, respetivamente. (46)

6.2.2 Benefícios maternos

O aleitamento materno associa-se a diversos benefícios para a saúde da mulher. No imediato e a curto prazo, está implicado no vínculo afetivo entre a mãe e o filho; (34) estimula a libertação de ocitocina, hormona responsável pelo aumento das contrações uterinas e consequentemente promoção da involução uterina e redução do risco de hemorragia pós-parto; induz um estado de amenorreia ao inibir a ovulação, atuando como um método de contraceção natural; e permite uma perda de peso mais acentuada no pós-parto, com um retorno ao estado pré-gravídico mais precoce. Para além disso, ao reduzir os níveis de cortisol e de hormona adenocorticotrófica, a lactação reduz os níveis de stress e ansiedade no pós-parto. (47)

Quando analisadas as implicações a longo prazo, o impacto no risco cardiovascular e nas doenças metabólicas é notório. Em comparação com não lactantes, mulheres que amamentam têm uma redução de 32% do risco de desenvolver diabetes *mellitus* tipo 2, (48) bem como apresentam menor tendência para hipertensão arterial (49) e doença arterial coronária. (50) Para além disso, a amamentação confere ainda menor risco de artrite reumatoide, doença de Alzheimer e esclerose múltipla. (47) Relativamente ao contributo no risco de carcinoma do ovário, a lactação está apontada como fator protetor, com uma possível redução em 24% da probabilidade de ocorrência desta neoplasia. (51)

6.3 Cancro da mama no pós-parto

6.3.1 Definição

De acordo com a literatura revista, o cancro da mama no pós-parto está englobado, na grande maioria, numa entidade mais abrangente, o cancro da mama na mulher grávida. A definição do cancro da mama na mulher grávida não é consensual, uma vez que tanto engloba as neoplasias malignas da mama diagnosticadas apenas na gestação, como engloba as detetadas durante a gestação e durante o período do pós-parto. (52) É inconsistente também o limite temporal do período do pós-parto; no entanto, é comumente estabelecido como 1 a 2 anos após o momento do parto. (9, 52, 53)

Diversos autores têm estudado, por um lado, o prognóstico de cancro da mama na mulher grávida e, por outro lado, se este se reflete de igual forma nas neoplasias diagnosticadas durante a gravidez e nas detetadas no período do pós-parto. Numa meta-análise que analisou 30 estudos, Azim *et al.* concluiu que o cancro da mama associado à mulher grávida tem pior prognóstico quando comparado com o cancro da mama em mulheres nulíparas. (9) Corroborando este resultado, numa meta-análise mais recente que incluiu 41 estudos, Hartman *et al.* concluiu que quando a neoplasia é diagnosticada durante a gravidez e/ou no período pós-parto, o prognóstico é pior, comparativamente à deteção fora desse período. (54) Todavia, estes mesmos autores isolaram os casos de cancro da mama apenas no pós-parto e evidenciaram que este grupo de mulheres apresentou um pior prognóstico, com uma sobrevivência global inferior, maior risco de progressão ou recorrência da doença, quando comparado aos diagnosticados durante a gestação. (9, 54) Estas novas evidências suportam a possibilidade de que o cancro da mama diagnosticado durante a gravidez possa ser uma entidade distinta do cancro da mama detetado no período do pós-parto, (52) exigindo uma definição mais rigorosa do cancro da mama associado à mulher grávida. (7)

A definição da duração do período do pós-parto que está associado a pior prognóstico é controversa, com inúmeros autores a defenderem que esta janela temporal se estende para além de 1 ano. Neste sentido, num estudo retrospectivo realizado por Callihan *et al.* evidenciou-se que em neoplasias diagnosticadas até 5 anos após o parto a probabilidade de sobrevivência global foi de 65,8%, enquanto que em mulheres nulíparas foi de 98%, sugerindo, portanto, que este pior prognóstico se prolonga pelo menos até 5 anos após o parto. (7) Por sua vez, Shao *et al.*, numa meta-análise que incluiu 76 estudos, comparou a sobrevivência global em diferentes intervalos de tempo do diagnóstico de cancro da mama no pós-parto. Após análise dos resultados, concluiu que existiu um risco 60% superior de morte em mulheres com neoplasia detetada até 2 anos após o parto quando comparado com mulheres nulíparas. Verificou também que este risco deixou de ser considerado estatisticamente significativo 70 meses após o parto, ou seja, 6 anos. (55) Outro estudo

avaliou a probabilidade de metastização do cancro da mama nos 5 anos, entre 5 e 10 anos, e 10 ou mais após o parto. Dentro das categorias de menos de 5 anos e entre 5 e 10 anos, o risco de desenvolverem metástases foi 2 vezes superior ao risco em mulheres nulíparas. Quando superior ou igual a 10 anos, o risco deixou de ser estatisticamente significativo. (56)

Sistematizando, diversos autores defendem a necessidade de o cancro da mama no pós-parto ser considerado uma entidade diferente do cancro da mama durante a gestação e de se expandir o período do pós-parto, que categoriza esta patologia, para pelo menos 5 a 10 anos. (7, 52, 55, 56)

6.3.2 Contextualização epidemiológica

Apesar de ser relativamente raro, o cancro da mama na mulher grávida é uma das neoplasias mais frequentemente diagnosticadas durante a gravidez, estimando-se afetar entre 15 e 35 mulheres por cada 100 000 nascimentos. (55, 57) O número de novos casos detetados anualmente é substancialmente maior no período do pós-parto do que durante a gestação. (58) A sua incidência encontra-se numa fase ascendente, resultado do protelamento da maternidade para idades cada vez mais avançadas, nas quais o risco de cancro da mama é maior. Esta maior frequência deve-se ainda à perda de fatores protetores para esta neoplasia em mulheres que adiam a maternidade, como a idade jovem numa gravidez de termo e a multiparidade. (6, 53, 59) Tem sido ainda descrito como biologicamente mais agressivo e detetado em fases clínicas mais avançadas, associado, portanto, a um pior prognóstico, com maior risco de metastização. (60, 61)

6.3.3 Mecanismos etiopatogénicos subjacentes ao mau prognóstico

6.3.3.1 Perfil molecular

Diversos autores debruçaram-se em caracterizar e classificar o cancro da mama no pós-parto de acordo com o perfil imunohistoquímico. Bae *et al.* (62), Johansson *et al.* (63) e Wang *et al.* (14) mostraram que o subtipo molecular de cancro da mama mais frequente na mulher grávida foi o triplo negativo. Outros autores, nomeadamente Han *et al.* (64) e Madaras *et al.*, (65) observaram uma maior percentagem de tumores triplo negativo e luminal B em mulheres com cancro da mama durante a gravidez ou até 1 ano após o parto, quando comparadas com mulheres diagnosticadas fora desse período. Com o intuito de perceber se a maior frequência de tumores triplos negativos se verificava quando isolado o período de pós-parto, Pilewskie *et al.*, realizou um estudo onde observou que 34,2% das mulheres com diagnóstico de cancro da mama até 2 anos após o parto apresentaram um tumor triplo negativo, percentagem bastante superior ao grupo controlo constituído por mulheres

nulíparas, em que apenas 11,5% tinham um tumor triplo negativo. (16) Corroborando este resultado, Alsaker *et al.* observou que mulheres com neoplasia da mama pouco tempo após uma gestação demonstravam doença mais avançada e com uma maior proporção de tumores com RE negativos; (66) e Asztalos *et al.* concluiu que nos 10 anos que se seguem ao parto, o cancro da mama apresenta um padrão de expressão de genes diferente do padrão apresentado em mulheres nulíparas, com maior frequência de tumores triplos negativos. (67)

6.3.3.2 Involução da glândula mamária no pós-parto

Os mecanismos moleculares subjacentes à involução que conferem um maior risco de metastização e menor sobrevivência global não se encontram totalmente esclarecidos. (13, 53) Como descrito anteriormente, durante a gravidez a glândula mamária é sujeita a complexos processos de proliferação e diferenciação epitelial, com o intuito de preparar a lactação. (21) Na ausência de lactação, inicia-se o processo de involução marcado pela existência de mecanismos de morte celular controlada, que permitem a eliminação das células epiteliais secretoras. (29, 30) Para além da apoptose celular, a involução é marcada por um microambiente inflamatório, caracterizado por uma maior expressão de citocinas (68) e um influxo de neutrófilos, macrófagos e metaloproteinases. (69) Estudos recentes demonstram que esta infiltração por células do sistema imunitário no microambiente glandular, a ativação de fibroblastos, a deposição de colagénio fibrilar e o aumento da vasculatura linfática durante a involução parecem ser essenciais para a maior agressividade desta patologia. (17)

6.3.3.2.1 Microambiente Inflamatório

O papel das alterações inflamatórias no desenvolvimento tumoral é amplamente conhecido. (70) Durante a involução, o estroma da glândula mamária apresenta frequentemente níveis aumentados de macrófagos ativados, células com capacidade fagocítica. O'Brien *et al.* evidenciou que estes macrófagos expressam MMR (*Macrophage mannose receptor*) e IL-13, marcadores de um subgrupo de macrófagos com fenótipo M2. (71) Os macrófagos M2 libertam metaloproteinases e citocinas pró-inflamatórias, levando nomeadamente a concentrações aumentadas de IL-10 e TGF β . Evidências sugerem que estas, por sua vez, promovem o desenvolvimento tumoral através da promoção do crescimento tumoral, invasão e metastização. (72) Estes macrófagos têm ainda a capacidade de secretar VEGF-C (*Vascular endothelial growth factor C*) e VEGF-D, fatores importantes na promoção da linfangiogénese. (73)

A IL-10 é uma citocina com capacidade tanto anti-tumoral como pró-tumoral. No entanto, concentrações séricas elevadas de IL-10 são frequentemente detetadas em

pacientes com cancro da mama, indicando que a sua capacidade de promover disfunção de células dendríticas e de estimular a angiogénese prevalece. (74)

O TGF β , quando ativo, estimula o aumento da transcrição de genes envolvidos na ativação de fibroblastos, células mesenquimais responsáveis por secretar componentes da matriz extracelular, (75) e que durante a involução expressam fatores de crescimento do endotélio linfático. (76) Para além disso, promove a progressão tumoral ao permitir a sobrevivência das células tumorais. (72)

Ainda na fase involutória, há um aumento da expressão de COX-2 (*Cyclooxygenase-2*), uma enzima responsável pela produção da prostaglandina E2. Estas duas enzimas estão implicadas na formação de vasos linfáticos de novo, (77) iniciação, invasão, sobrevivência tumoral e resistência a fármacos. A COX-2 promove ainda o aumento do colagénio fibrilar, que por sua vez está implicado na progressão tumoral. (72)

Paralelamente, a expressão de SEMA7A (*Semaphorin 7A*) durante a involução também aparenta predispor ao pior prognóstico de neoplasias da mama durante o pós-parto. Esta proteína transmembranar é expressa durante a fase irreversível, sendo a sua principal função o recrutamento de fibroblastos. No entanto, também possui a faculdade de promover a expressão marcadores endoteliais nos macrófagos existentes, facilitando a sua migração e adesão aos vasos linfáticos. (72, 78)

Resumindo, reações inflamatórias características da involução estão na base da libertação de citocinas pró-inflamatórias que, por sua vez, criam um microambiente inflamatório semelhante ao microambiente característico dos tumores, promovendo a progressão de células tumorais pré-existentes. (72)

6.3.3.2.2 Linfangiogénese

O envolvimento de gânglios linfáticos axilares na doença metastática de um carcinoma da mama primário é um fator preponderante tanto no estadiamento como na determinação do prognóstico desta patologia, (5) desempenhando a invasão linfovascular um papel chave no envolvimento de gânglios linfáticos por células tumorais. (79) Num estudo de Jerzak *et al.* foi observado que neoplasias da mama diagnosticadas até 2 anos após o parto apresentam uma maior incidência de gânglios linfáticos invadidos por células tumorais e, conseqüentemente, pior prognóstico associado. (53) Num outro estudo, Borges *et al.* também observou um aumento significativo de metastização linfática em mulheres com cancro da mama até 2 anos após o parto, quando comparado com nulíparas; concluiu ainda que tumores da mama diagnosticados até 3 anos após o parto apresentaram um aumento significativo de densidade dos vasos linfáticos em relação a nulíparas ou quando o diagnóstico é estabelecido após mais

de 3 anos desde o parto. (77) De acordo com estes resultados, os autores sugerem que a linfangiogénese associada ao cancro da mama no pós-parto facilita a metastização do gânglio linfático, contribuindo para o seu pior prognóstico. (53, 77)

Como referido anteriormente, diversos componentes do microambiente presente na involução promovem a linfangiogénese, necessária à eliminação de células epiteliais apoptóticas. (73) O VEGF-D promove a hiperplasia e dilatação dos vasos linfáticos pré-existentes, processo importante à intrusão de células tumorais na vasculatura linfática e consequente migração para gânglios linfáticos regionais. (77) Esta hiperplasia aumenta a área das células do endotélio linfático, células estas que possuem a capacidade de suprimir células dendríticas maduras e promovem a secreção de citocinas supressoras. Por sua vez, o VEGF-C estimula sinergicamente as células endoteliais linfáticas. (80) Os macrófagos M2, para além de secretarem estes fatores endoteliais, atuam diretamente em vasos linfáticos pré-existentes e promovem a sua hiperplasia. (73)

Sintetizando, a involução da glândula mamária no pós-parto está associada a um aumento da densidade de vasos linfáticos, o que, na presença de células tumorais, predispõe a uma maior frequência de metastização de gânglios linfáticos e consequentemente um prognóstico mais reservado. (77)

6.4 Amamentação e cancro da mama após uma gestação

6.4.1 Estudos epidemiológicos

O papel da amamentação como fator de risco no cancro da mama tem sido ampla e vastamente estudado. Numa meta-análise que analisou um total de 47 estudos epidemiológicos onde foram incluídas 50 302 mulheres com neoplasias da mama invasivas, foi observado que a amamentação prolongada estava associada a uma diminuição do risco de cancro da mama. Neste estudo, por cada 12 meses de amamentação houve uma redução do risco relativo em 4,3% desta patologia. Os autores concluíram ainda que uma extensão do período de amamentação para pelo menos 12 meses por cada filho poderia levar à redução da incidência de 6.3 para 2.7 casos por cada 100 mulheres. (81)

No entanto, quando averiguado o contributo da amamentação no risco e prognóstico de cancro da mama no pós-parto a literatura é mais escassa, não existindo ainda estudos suficientes para que se estabeleça um consenso sobre este tema. A tabela 1 apresenta uma sistematização dos estudos acerca da amamentação e a sua relação com o risco e prognóstico de cancro da mama, na sua maioria em particular com o risco de tumores triplos negativos.

Num estudo retrospectivo conduzido por Lefrère *et al.*, foram analisadas as características clinicopatológicas de 1 180 mulheres com cancro da mama invasivo primário diagnosticado nos 2 anos após o parto, durante a gravidez ou em mulheres nulíparas. Observou-se que quando esta patologia foi diagnosticada neste período do pós-parto, a ausência de amamentação acarretava um pior prognóstico, com um risco até 5 vezes superior de metastização e morte, em comparação com o risco em mulheres que amamentaram. (82) Contrariamente, Peterson *et al.* (83) e Nichols *et al.* (84) não associam a amamentação a um menor risco ou melhor prognóstico de cancro da mama no pós-parto. O primeiro, através de um estudo caso-controlo com 3 464 mulheres, das quais 1 706 tinham sido diagnosticadas com tumor maligno da mama, encontrou uma ligeira atenuação do risco, mas que não demonstrou ser estatisticamente significativa. (83) O segundo autor, por sua vez, numa interpretação do resultado de 12 estudos de coorte prospetivos que aferiram a história de amamentação e o diagnóstico de cancro da mama das mulheres em seguimento, concluiu que, globalmente, a amamentação não modificou o panorama do cancro da mama nos 5 anos após o parto. No entanto, quando restringindo a análise a subtipos moleculares, houve uma redução estatisticamente significativa apenas do risco de tumores triplos negativos em mulheres que amamentaram. (84)

Um dos fatores de pior prognóstico do cancro da mama no pós-parto prende-se na elevada percentagem de tumores triplos negativos associados a esta patologia. (16) Com o intuito de apurar as evidências atuais relativamente à modificação deste paradigma com a

amamentação, foram selecionados os estudos disponíveis na literatura em que esta relação foi avaliada. Desta forma, foram identificados 12 estudos que avaliaram de que forma a amamentação atua sobre o risco destes tumores agressivos. (84-95) Entre todos, apenas 1 estudo conduzido por Lee *et al.* não mostrou associação entre a amamentação e risco de neoplasias da mama com perfil molecular triplo negativo. (95) Os restantes concluíram que mulheres que amamentam têm menor risco deste subtipo tumoral, variando esta redução entre 15% (86) e 49%. (92) Uma das possíveis variáveis que poderá ter contribuído para esta janela percentual alargada foi a duração da amamentação. Nos estudos que discriminaram o tempo de amamentação, verificou-se que um período de lactação de 6 meses, (94) 7 meses (89) e 36 meses (92) correspondeu a uma diminuição da possibilidade de tumores da mama triplos negativos de 24%, 31% e 49%, respetivamente. Extrapolando estes resultados, é possível que um maior tempo de amamentação contribua para uma redução mais acentuada, estando, porém, por estabelecer qual será o tempo ideal. Por outro lado, a idade poderá ser também uma variável importante de analisar; todavia, não é discriminado nestes estudos se os resultados variam consoante a faixa etária, havendo, portanto, necessidade de detalhar este aspeto em estudos futuros.

Em suma, apesar dos estudos sobre o papel da amamentação no risco e prognóstico de cancro da mama no pós-parto serem escassos e pouco consensuais, a literatura encontrada sobre o impacto da amamentação especificamente nos tumores da mama com perfil triplo negativo apresenta resultados concordantes entre si. Uma vez que estes tumores agressivos são apontados como um dos fatores que contribui para o pior prognóstico do cancro da mama diagnosticado no período após uma gravidez, é possível que a amamentação possa mitigar este mau prognóstico ao diminuir o risco de tumores triplos negativos.

Tabela 1- Sistematização dos estudos da relação entre amamentação e cancro da mama no pós-parto

Autores	Ano	Tipo de estudo	Amostra	Resultados
Lefrère <i>et al.</i> (82)	2021	Estudo de coorte retrospectivo	1 180 mulheres com cancro da mama invasivo primário diagnosticado nos 2 anos após o parto	A ausência de amamentação acarretou um risco até 5 vezes superior de metastização e morte por cancro da mama no pós-parto comparativamente a mulheres que amamentaram
Peterson <i>et al.</i> (83)	2008	Estudo caso-controlo	3 464 mulheres (1 706 casos de neoplasia primária da mama e 1 758 controlos)	Ligeira atenuação do risco de cancro da mama em mulheres que amamentaram, mas sem significado estatístico
Nichols <i>et al.</i> (84)	2019	<i>Pooled analysis</i>	12 estudos de coorte prospetivos	Globalmente, a amamentação não modificou o risco de cancro da mama nos 5 anos após o parto. Houve, no entanto, uma redução estatisticamente significativa do risco de tumores triplos negativos em mulheres que amamentaram
Islami <i>et al.</i> (85)	2015	Revisão sistemática e meta-análise	27 estudos (12 com referência a tumores triplo negativo)	Amamentação mostrou estar associada a uma redução de 20% do risco de neoplasias da mama com um perfil molecular triplo negativo
Sangaramoorthy <i>et al.</i> (86)	2019	<i>Pooled Analysis</i>	2 703 casos 2 3254 controlos de mulheres hispânicas	Mulheres que amamentaram apresentaram uma redução de 15% do risco de cancro da mama, sendo este valor de 23% quando específico a tumores triplos negativos
Ma <i>et al.</i> (87)	2017	<i>Pooled Analysis</i>	2 658 mulheres com cancro da mama (554 tumores triplo negativo) e 2 448 controlos	A amamentação por um período de pelo menos 1 ano mostrou estar associada a um risco 31% inferior de neoplasias triplo negativo, quando comparado com mulheres que não amamentaram

John <i>et al.</i> (88)	2018	<i>Pooled Analysis</i>	558 casos de tumores triplos negativos e 5 111 controlos	Em mulheres que não amamentaram foi observado um risco 2 vezes superior de cancro da mama triplo negativo, quando comparado com o mesmo risco em nulíparas
Fortner <i>et al.</i> (89)	2019	Estudo de coorte prospetivo	12 542 mulheres com cancro da mama	Foi observada uma redução de 35% do risco de neoplasias malignas da mama quando o período de amamentação foi igual ou superior a 7 meses, em comparação com a ausência de amamentação
Wang <i>et al.</i> (90)	2020	Caso controlo	3 792 casos (449 tumores triplos negativos) e 4 182 controlos	Mulheres que amamentaram durante ou mais de 12 meses mostraram ter um risco de tumores malignos da mama luminal B e triplo negativo inferior relativamente a mulheres sem história de amamentação
Li <i>et al.</i> (91)	2013	Caso controlo	180 casos de tumores triplos negativos e 941 controlos	A existência de amamentação foi associada a uma diminuição do risco de tumores triplos negativos
Chen <i>et al.</i> (92)	2016	Estudo de caso	2 710 casos de cancro da mama (1 299 triplos negativos)	Amamentação por um período igual ou superior a 36 meses mostrou estar relacionada com uma redução de 49% da probabilidade de cancro da mama triplo negativo
Work <i>et al.</i> (93)	2014	Caso controlo	4 011 casos de neoplasia da mama (139 triplos negativos) e 2 997 controlos	Concluíram que mulheres com história de 3 ou mais gestações apresentavam um risco superior de tumores triplo negativo. No entanto, esse aumento de risco não se verificou em mulheres que amamentaram
Gaudet <i>et al.</i> (94)	2011	Caso controlo	890 casos de cancro da mama (246 triplos negativos) e 3 432 controlos	Em mulheres cuja lactação durou pelo menos 6 meses, houve uma diminuição do risco de cancro da mama com um subtipo triplo negativo de cerca 24%
Lee <i>et al.</i> (95)	2014	Estudo retrospectivo	23 882 mulheres com diagnóstico de cancro da mama	Observaram que a amamentação não teve qualquer impacto na sobrevida global de neoplasias malignas da mama, inclusive no subtipo triplo negativo

6.4.2 Hipóteses etiopatogénicas

Os mecanismos etiopatogénicos subjacentes ao contributo da amamentação no cancro da mama, especificamente diagnosticado no período após uma gestação, encontram-se por esclarecer. No entanto, é proposto que a involução gradual própria das glândulas mamárias de mulheres que amamentam possa estar associada a alterações específicas que contribuam para reduzir o risco desta patologia. Para além disso, a evidência mais recente aponta a prolactina como um fator anti-tumoral. É ainda referido na literatura que a amamentação está associada a uma menor ativação de oncogenes.

6.4.2.1 Involução abrupta e involução gradual

De uma forma genérica, é pressuposto que a lactação, ao prolongar o tempo que decorre entre a gravidez e a involução, dois eventos com alterações consideradas promotoras de tumorigénese, poderá reduzir o risco de desenvolvimento de cancro da mama, ao diminuir a possibilidade de estes dois eventos atuarem de forma sinérgica na progressão de células neoplásicas pré-existentes. Durante a gravidez, há um aumento significativo da presença de células progenitoras e estaminais mamárias, bem como um aumento de estrogénio e de progesterona circulantes. Estas hormonas poderão, por sua vez, promover a proliferação de células pré-existentes no microambiente inflamatório da involução. (96)

Numa outra perspetiva, pensa-se que a involução abrupta predispõe à persistência de uma expressão aumentada de marcadores inflamatórios e à existência de uma remodelação do estroma da glândula mamária semelhante a um processo de cicatrização crónico. (97) Em oposição, a involução gradual parece estar associada a uma remodelação do tecido mamário mais ordenada, com uma resposta imunológica transitória, mais regulada. (97, 98) Em modelos animais, foi demonstrado que quando a glândula mamária é sujeita a um processo de involução abrupto, há maior deposição de colagénio tipo I, (97) fator associado a maior densidade do tecido mamário, maior influxo de mediadores inflamatórios e macrófagos, e maior risco de desenvolvimento de cancro da mama. (71) Para além disso, a involução abrupta mostrou estar associada a uma persistência da expressão de STAT3, a hiperplasia ductal e metaplasia escamosa, e a maior ativação de vias de sinalização Notch. Estes mesmos autores, com o intuito de verificar se as alterações nas expressões de genes observadas em animais correspondiam a alterações ocorridas em mulheres, analisaram o tecido mamário de 2 grupos de mulheres: o primeiro incluiu as que amamentaram durante 6 ou mais meses, e o segundo incluiu as que não amamentaram, ou que o fizeram por menos de 6 meses. Observaram uma forte positividade de vias de sinalização Notch e maior presença de células progenitoras luminiais no tecido mamário do segundo grupo. Concluíram, portanto, que a involução abrupta está associada a maior presença de células menos

diferenciadas e a uma diferente expressão de genes de importantes vias de sinalização. (97) Recentemente, foi identificada uma maior expressão e ativação aberrante de STAT3 em tumores triplos negativos. (99) Esta proteína, preponderante no processo de involução, quando ativada de forma persistente e errônea, está associada a promoção de iniciação, progressão, invasão e metastização tumoral. Um dos mecanismos do seu contributo pró-tumoral é através da ativação da via de sinalização Notch1, implicada na aquisição de um fenótipo célula estaminal-*like* pelas células neoplásicas. (100) Extrapolando as informações anteriores, a amamentação poderá contribuir para uma menor ativação de vias de sinalização com potencial carcinogénico, bem como impulsionar uma maior diferenciação de células progenitoras, implicadas na formação de neoplasias agressivas, nomeadamente de tumores recetores hormonais negativos.

É também conhecido que a metilação de DNA é um dos intervenientes críticos à diferenciação celular. Este mecanismo epigenético afeta genes importantes para as alterações da glândula mamária que acometem a gravidez, lactação e involução. Este processo, todavia, não é isento de eventuais erros, podendo neste sentido ser apontado como possível promotor do desenvolvimento de tumores triplos negativos. (101) Num estudo epidemiológico que incluiu amostras tumorais de 733 mulheres, foi observado que o gene FOXA1 estava hipermetilado e com menor expressão da proteína correspondente em tumores com RE negativos; e verificaram ainda que o maior grau de metilação do FOXA1 nestes tumores se associava de forma positiva com o aumento da paridade, e que esta relação era atenuada pela amamentação. Este gene é responsável por regular a expressão de genes que promovem o fenótipo luminal em células progenitoras luminais e que reprimem o fenótipo *basal-like* nessas mesmas. (102) Tem sido sugerido que a amamentação previne a metilação e conseqüente silenciamento deste gene. Por outro lado, se a involução abrupta está associada a um aumento dos parâmetros inflamatórios, o microambiente torna-se mais propício a fenómenos de metilação aberrante do DNA, levando a que estes erros ocorram no gene FOXA1 e que resulte no seu silenciamento e conseqüente menor diferenciação de células progenitoras luminais. (101)

6.4.2.2 Prolactina

O papel da prolactina no cancro da mama é controverso e tema de muitos estudos e debate. Inicialmente, esta hormona foi apontada como promotora tumoral. No entanto, evidências recentes de diferentes autores têm associado a prolactina como sendo uma hormona anti-tumoral. Numa análise realizada com o intuito de determinar os níveis de prolactina em 100 amostras de tumores da mama, verificaram uma pronunciada menor expressão de prolactina no tecido tumoral quando comparado com o tecido adjacente

saudável. Mostraram ainda que, pacientes com elevada ativação de genes de vias dependentes da prolactina, tinham tumores com maior grau de diferenciação e demonstraram ter um melhor prognóstico, com maior tempo livre de doença e melhor sobrevivência global. Concluíram, portanto, que a prolactina e as suas vias de sinalização poderão ser importantes em manter a diferenciação tumoral e conseqüentemente promover um melhor prognóstico. (103) Corroborando estes resultados, Hachim *et al.*, através de técnicas de *microarray* aplicadas em tecido de 102 casos de cancro da mama, observou que a expressão de prolactina na zona com tumor era muito inferior à expressão na zona de tecido benigno. Para além disso, a expressão de recetor de prolactina mostrou estar associada a ausência de células tumorais nos gânglios linfáticos e a tumores de baixo grau e bem diferenciados. Quando categorizados os tumores de acordo com o seu subtipo molecular, verificou-se que a expressão do PRLP era significativa em tumores luminal A, e praticamente indetetável nas neoplasias triplo negativo. Evidenciaram ainda que uma maior expressão do recetor de prolactina estava associada, de forma estatisticamente significativa, com menor existência de metástases à distância. Propuseram, assim, que a presença do recetor de prolactina poderá ser um preditor independente do prognóstico de cancro da mama. (104) Um outro autor analisou, também, o contributo da prolactina nos tumores triplo negativo em amostras de 580 pacientes, e identificaram um subgrupo caracterizado pela expressão de prolactina associado a melhor prognóstico e a maior sobrevivência livre de doença. (105)

O mecanismo subjacente à eventual ação protetora desta hormona no cancro da mama não se encontra elucidado. No entanto, é sugerido que, através da interação com o JAK2, suprime a transição epitélio-mesenquimal, reduzindo conseqüentemente a capacidade invasiva das células tumorais. Por outro lado, através da ativação da WAP e da α -caseína, promove a inibição da tumorigénese e da invasão celular. (105) Para além disso, o seu papel na diferenciação epitelial e luminal parece limitar a plasticidade e capacidade de sobrevivência de células neoplásicas. (106)

Sistematizando, a prolactina, conjuntamente com as vias de sinalização em que está implicada, parece ser um pilar importante em reduzir o risco e melhorar o prognóstico de cancro da mama.

6.4.2.3 Inativação de oncogenes

Durante a gravidez, ocorre proliferação de células estaminais e progenitoras mamárias. (18) Uns dos intervenientes neste processo são os oncogenes, cuja função é permitir que estas células se mantenham multipotentes e com conseqüente manutenção da capacidade regenerativa do epitélio da glândula mamária. (107) Na existência de uma amamentação prolongada, há um aumento da diferenciação terminal das células progenitoras

e estaminais, com conseqüente menor expressão de oncogenes. (108) Durante a involução, para além de ocorrerem processos de intensa apoptose, há uma marcada infiltração leucocitária e repopulação de adipócitos. Neste ambiente, células bem diferenciadas têm a capacidade de quimiotaxia de células apresentadoras de antígenos como os macrófagos, de linfócitos T citotóxicos e de células NK (*natural killers*). Estes agentes imunológicos são importantes na eliminação de possíveis células pouco diferenciadas que possam ter persistido. (69) Por outro lado, estas células mais diferenciadas são mais facilmente identificadas e eliminadas durante o processo apoptótico que ocorre na involução. (108) Na ausência de amamentação, há uma maior proporção de células não diferenciadas que, por um lado, expressam mais oncogenes, e por outro lado mais facilmente escapam aos mecanismos de morte celular que ocorrem durante a involução. (108) A resistência a mecanismos de morte celular programada desempenha um papel fulcral na tumorigênese, uma vez que resulta na proliferação de células potencialmente mutadas, com maior motilidade, permitindo o seu crescimento, multiplicação e invasão. (69) Estas células pouco diferenciadas, durante a involução, encontram-se envolvidas num microambiente inflamatório pró-tumorigénico (73), cenário propício à progressão tumoral e conseqüentemente ao desenvolvimento de tumores triplos negativos. (96, 108)

7. Conclusão

O cancro da mama no pós-parto encontra-se englobado numa entidade mais abrangente, o cancro da mama na mulher grávida. Todavia, à luz das evidências mais recentes, esta patologia apresenta características biológicas próprias, com um prognóstico mais reservado quando comparado com as neoplasias diagnosticadas durante a gestação, implicando a necessidade de uma definição mais rigorosa do cancro da mama diagnosticado no período que decorre após uma gestação.

Durante a gravidez, a glândula mamária é sede de um vasto conjunto de modificações particularmente importantes na aquisição de um estado funcional, com capacidade de lactação. Na ausência ou cessação da lactação a glândula é conduzida para um processo de involução, o que lhe permite retornar à sua arquitetura prévia. Este processo de involução tem sido apontado como pilar do maior risco de metastização e menor sobrevivência característico do cancro da mama no pós-parto. Apesar de os mecanismos não serem totalmente conhecidos, o microambiente inflamatório, as alterações que ocorrem na remodelação e regeneração do estroma glandular e o aumento da densidade da vasculatura linfática presentes nesta fase parecem ser essenciais ao contributo da involução para o pior prognóstico desta patologia. Neste âmbito, a literatura disponível que aborda de que forma uma involução mais gradual própria de mulheres que amamentam influencia este pior prognóstico é escassa e com poucos estudos realizados em mulheres. Tendo em conta que esta patologia tem grande impacto em mulheres sobretudo jovens, é emergente que mais pesquisa seja efetuada com o objetivo de perceber se a amamentação poderá diminuir este risco e estabelecer novos consensos.

Por outro lado, há uma elevada percentagem de tumores triplos negativos associados às neoplasias da mama diagnosticadas após o parto, subtipo bastante agressivo, uma vez que apresenta um baixo grau de diferenciação. Com base na literatura científica consultada, é relativamente consensual que a amamentação diminui o risco destes tumores de forma bastante significativa. Assim, é possível que a amamentação tenha impacto positivo no prognóstico de cancro da mama no pós-parto ao diminuir o risco de tumores mais agressivos e com menor sobrevida associada.

Recentemente, a prolactina tem sido apontada como uma hormona com um importante papel anti-tumoral. Diversos estudos epidemiológicos mostraram que a expressão dos seus recetores em tecidos tumorais está associada a tumores com maior grau de diferenciação e a menor taxa de metastização, podendo assim a amamentação contribuir, através da maior expressão de prolactina, para atenuar o mau prognóstico dos tumores da mama detetados após uma gravidez. Confirmar estes resultados e perceber os mecanismos associados ao papel da prolactina torna-se, portanto, prioritário.

A dificuldade na reprodutibilidade e possibilidade de conclusões pode prender-se pela escassez de estudos prospetivos e coexistência de outros fatores de risco que podem atuar como viés, nomeadamente a idade materna e história obstétrica, onde se salientam a idade da menarca e da menopausa ou o uso de contraceptivos orais.

Em suma, apesar do cancro da mama no pós-parto ser uma entidade complexa, é simultaneamente desafiante pelo desconhecimento na globalidade dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes. Por outro lado, aprofundar o conhecimento sobre a involução mamária, nomeadamente após a amamentação, e desenvolver novos estudos que permitam suportar conclusões relativamente ao impacto da amamentação no risco e prognóstico de cancro da mama torna-se fundamental para promover um aconselhamento rigoroso, fidedigno e adequado.

8. Agradecimentos

À Professora Doutora Margarida Figueiredo Dias, a minha orientadora, e à Dra. Ana Sofia Pais, a minha coorientadora, agradeço profundamente a disponibilidade em orientar o meu trabalho, o voto de confiança, todos os conselhos e esclarecimentos de dúvidas, e o inestimável contributo científico que prontamente me deram.

À minha família, que tem sido o meu pilar ao longo destes últimos seis anos, o meu muito obrigada por estarem sempre disponíveis para mim e por permitirem que este sonho esteja a ser realizado. À minha irmã, pelo apoio incondicional e incentivo que sempre me deu. Uma dedicação especial à minha mãe, o maior exemplo que tive de amor, força e resiliência.

Ao Francisco, pela paciência e apoio durante esta etapa e por me fazer acreditar que tenho capacidades para atingir os meus objetivos.

Aos meus amigos, que ao longo destes últimos 6 anos partilharam comigo momentos especiais e inúmeras conquistas, cujo apoio no meu percurso de Medicina, incluindo neste projeto, tem sido fundamental.

Por fim, a todos que, mesmo não estando individualmente nomeados, foram importantes para a realização deste trabalho.

9. Referências bibliográficas

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2019;11:151-64.
3. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, et al. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. *Am J Cancer Res.* 2015;5(10):2929-43.
4. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol.* 2014;5(3):412-24.
5. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol.* 2019;30(8):1194-220.
6. Katz TA. Potential Mechanisms underlying the Protective Effect of Pregnancy against Breast Cancer: A Focus on the IGF Pathway. *Front Oncol.* 2016;6:228.
7. Callihan EB, Gao D, Jindal S, Lyons TR, Manthey E, Edgerton S, et al. Postpartum diagnosis demonstrates a high risk for metastasis and merits an expanded definition of pregnancy-associated breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;138(2):549-59.
8. Lee GE, Mayer EL, Partridge A. Prognosis of pregnancy-associated breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;163(3):417-21.
9. Azim HA, Jr., Santoro L, Russell-Edu W, Pentheroudakis G, Pavlidis N, Peccatori FA. Prognosis of pregnancy-associated breast cancer: a meta-analysis of 30 studies. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(7):834-42.
10. Borges VF, Schedin PJ. Pregnancy-associated breast cancer: an entity needing refinement of the definition. *Cancer.* 2012;118(13):3226-8.
11. Jindal S, Narasimhan J, Borges VF, Schedin P. Characterization of weaning-induced breast involution in women: implications for young women's breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 2020;6:55.
12. Jindal S, Pennock ND, Sun D, Horton W, Ozaki MK, Narasimhan J, et al. Postpartum breast cancer has a distinct molecular profile that predicts poor outcomes. *Nat Commun.* 2021;12(1):6341.
13. Lefrère H, Floris G, Schmidt MK, Neven P, Warner E, Cardonick E, et al. Data describing the poor outcome associated with a breast cancer diagnosis in the post-weaning period. *Data Brief.* 2021;38:107354.

14. Wang B, Yang Y, Jiang Z, Zhao J, Mao Y, Liu J, et al. Clinicopathological characteristics, diagnosis, and prognosis of pregnancy-associated breast cancer. *Thorac Cancer*. 2019;10(5):1060-8.
15. Paluch-Shimon S, Cardoso F, Partridge AH, Abulkhair O, Azim HA, Jr., Bianchi-Micheli G, et al. ESO-ESMO 4th International Consensus Guidelines for Breast Cancer in Young Women (BCY4). *Ann Oncol*. 2020;31(6):674-96.
16. Pilewskie M, Gorodinsky P, Fought A, Hansen N, Bethke K, Jeruss J, et al. Association between recency of last pregnancy and biologic subtype of breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(4):1167-73.
17. Borges VF, Lyons TR, Germain D, Schedin P. Postpartum Involution and Cancer: An Opportunity for Targeted Breast Cancer Prevention and Treatments? *Cancer Res*. 2020;80(9):1790-8.
18. Hassiotou F, Geddes D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat*. 2013;26(1):29-48.
19. Alex A, Bhandary E, McGuire KP. Anatomy and Physiology of the Breast during Pregnancy and Lactation. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1252:3-7.
20. Graça, Mendes L. *Medicina Materno Fetal*. 5th ed: Lidel; 2017. p. 29-34
21. Macias H, Hinck L. Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2012;1(4):533-57.
22. Pillay J, Davis TJ. *Physiology, Lactation*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
23. Lee S, Kelleher SL. Biological underpinnings of breastfeeding challenges: the role of genetics, diet, and environment on lactation physiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;311(2):E405-22.
24. Canul-Medina G, Fernandez-Mejia C. Morphological, hormonal, and molecular changes in different maternal tissues during lactation and post-lactation. *J Physiol Sci*. 2019;69(6):825-35.
25. Radhakrishnan A, Raju R, Tuladhar N, Subbannayya T, Thomas JK, Goel R, et al. A pathway map of prolactin signaling. *J Cell Commun Signal*. 2012;6(3):169-73.
26. Sriraman NK. The Nuts and Bolts of Breastfeeding: Anatomy and Physiology of Lactation. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2017;47(12):305-10.
27. Mosca F, Gianni ML. Human milk: composition and health benefits. *Pediatr Med Chir*. 2017;39(2):155.

28. Jindal S, Gao D, Bell P, Albrektsen G, Edgerton SM, Ambrosone CB, et al. Postpartum breast involution reveals regression of secretory lobules mediated by tissue-remodeling. *Breast Cancer Res.* 2014;16(2):R31.
29. Zaragoza R, García-Trevijano ER, Lluch A, Ribas G, Viña JR. Involvement of Different networks in mammary gland involution after the pregnancy/lactation cycle: Implications in breast cancer. *IUBMB Life.* 2015;67(4):227-38.
30. Watson CJ, Kreuzaler PA. Remodeling mechanisms of the mammary gland during involution. *Int J Dev Biol.* 2011;55(7-9):757-62.
31. Jena MK, Jaswal S, Kumar S, Mohanty AK. Molecular mechanism of mammary gland involution: An update. *Dev Biol.* 2019;445(2):145-55.
32. Hughes K, Watson CJ. The Multifaceted Role of STAT3 in Mammary Gland Involution and Breast Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018;19(6).
33. Santucci-Pereira J, Zeleniuch-Jacquotte A, Afanasyeva Y, Zhong H, Slifker M, Peri S, et al. Genomic signature of parity in the breast of premenopausal women. *Breast Cancer Res.* 2019;21(1):46.
34. Dieterich CM, Felice JP, O'Sullivan E, Rasmussen KM. Breastfeeding and health outcomes for the mother-infant dyad. *Pediatr Clin North Am.* 2013;60(1):31-48.
35. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Guideline: Counselling of Women to Improve Breastfeeding Practices. Geneva: World Health Organization © World Health Organization 2018.; 2018.
36. Organization World Health. Infant and young child feeding [document on the internet]; 2021 [updated 2021 June 9]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infant-and-young-child-feeding>.
37. Sankar MJ, Sinha B, Chowdhury R, Bhandari N, Taneja S, Martines J, et al. Optimal breastfeeding practices and infant and child mortality: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr.* 2015;104(467):3-13.
38. Hauck FR, Thompson JM, Tanabe KO, Moon RY, Vennemann MM. Breastfeeding and reduced risk of sudden infant death syndrome: a meta-analysis. *Pediatrics.* 2011;128(1):103-10.
39. Hassiotou F, Geddes DT. Immune cell-mediated protection of the mammary gland and the infant during breastfeeding. *Adv Nutr.* 2015;6(3):267-75.
40. Horta BL, Victora CG. Short-term effects of breastfeeding: A systematic review on the benefits of breastfeeding on diarrhoea and pneumonia mortality. World Health Organization. 2013.

41. Ma J, Li Z, Zhang W, Zhang C, Zhang Y, Mei H, et al. Comparison of gut microbiota in exclusively breast-fed and formula-fed babies: a study of 91 term infants. *Sci Rep.* 2020;10(1):15792.
42. Lechner BE, Vohr BR. Neurodevelopmental Outcomes of Preterm Infants Fed Human Milk: A Systematic Review. *Clin Perinatol.* 2017;44(1):69-83.
43. Horta BL, Loret de Mola C, Victora CG. Breastfeeding and intelligence: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr.* 2015;104(467):14-9.
44. Yan J, Liu L, Zhu Y, Huang G, Wang PP. The association between breastfeeding and childhood obesity: a meta-analysis. *BMC Public Health.* 2014;14:1267.
45. Horta BL, de Lima NP. Breastfeeding and Type 2 Diabetes: Systematic Review and Meta-Analysis. *Curr Diab Rep.* 2019;19(1):1.
46. Su Q, Sun X, Zhu L, Yan Q, Zheng P, Mao Y, et al. Breastfeeding and the risk of childhood cancer: a systematic review and dose-response meta-analysis. *BMC Med.* 2021;19(1):90.
47. Del Ciampo LA, Del Ciampo IRL. Breastfeeding and the Benefits of Lactation for Women's Health. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2018;40(6):354-9.
48. Aune D, Norat T, Romundstad P, Vatten LJ. Breastfeeding and the maternal risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014;24(2):107-15.
49. Bonifacino E, Schwartz EB, Jun H, Wessel CB, Corbelli JA. Effect of Lactation on Maternal Hypertension: A Systematic Review. *Breastfeed Med.* 2018;13(9):578-88.
50. Rajaei S, Rigdon J, Crowe S, Tremmel J, Tsai S, Assimes TL. Breastfeeding Duration and the Risk of Coronary Artery Disease. *J Womens Health (Larchmt).* 2019;28(1):30-6.
51. Babic A, Sasamoto N, Rosner BA, Tworoger SS, Jordan SJ, Risch HA, et al. Association Between Breastfeeding and Ovarian Cancer Risk. *JAMA Oncol.* 2020;6(6):e200421.
52. Amant F, Lefrère H, Borges VF, Cardonick E, Lambertini M, Loibl S, et al. The definition of pregnancy-associated breast cancer is outdated and should no longer be used. *Lancet Oncol.* 2021;22(6):753-4.
53. Jerzak KJ, Lipton N, Nofech-Mozes S, Boles D, Slodkowska E, Pond GR, et al. Clinical outcomes and prognostic biomarkers among pregnant, post-partum and nulliparous women with breast cancer: a prospective cohort study. *Breast Cancer Res Treat.* 2021;189(3):797-806.

54. Hartman EK, Eslick GD. The prognosis of women diagnosed with breast cancer before, during and after pregnancy: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2016;160(2):347-60.
55. Shao C, Yu Z, Xiao J, Liu L, Hong F, Zhang Y, et al. Prognosis of pregnancy-associated breast cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer.* 2020;20(1):746.
56. Goddard ET, Bassale S, Schedin T, Jindal S, Johnston J, Cabral E, et al. Association Between Postpartum Breast Cancer Diagnosis and Metastasis and the Clinical Features Underlying Risk. *JAMA Netw Open.* 2019;2(1):e186997.
57. Ji YI, Kim KT. Gynecologic malignancy in pregnancy. *Obstet Gynecol Sci.* 2013;56(5):289-300.
58. Johansson ALV, Stensheim H. Epidemiology of Pregnancy-Associated Breast Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1252:75-9.
59. Gooch JC, Chun J, Kaplowitz E, Guth A, Axelrod D, Shapiro R, et al. Pregnancy-associated breast cancer in a contemporary cohort of newly diagnosed women. *Breast J.* 2020;26(4):668-71.
60. Muñoz-Montaña WR, Cabrera-Galeana P, De la Garza-Ramos C, Azim HA, Jr., Tabares A, Perez V, et al. Prognosis of breast cancer diagnosed during pregnancy and early postpartum according to immunohistochemical subtype: A matched case-control study. *Breast Cancer Res Treat.* 2021;188(2):489-500.
61. Suelmann BBM, van Dooijeweert C, van der Wall E, Linn S, van Diest PJ. Pregnancy-associated breast cancer: nationwide Dutch study confirms a discriminatory aggressive histopathologic profile. *Breast Cancer Res Treat.* 2021;186(3):699-704.
62. Bae SY, Kim SJ, Lee J, Lee ES, Kim EK, Park HY, et al. Clinical subtypes and prognosis of pregnancy-associated breast cancer: results from the Korean Breast Cancer Society Registry database. *Breast Cancer Res Treat.* 2018;172(1):113-21.
63. Johansson ALV, Andersson TM, Hsieh CC, Jirström K, Cnattingius S, Fredriksson I, et al. Tumor characteristics and prognosis in women with pregnancy-associated breast cancer. *Int J Cancer.* 2018;142(7):1343-54.
64. Han BY, Li XG, Zhao HY, Hu X, Ling H. Clinical features and survival of pregnancy-associated breast cancer: a retrospective study of 203 cases in China. *BMC Cancer.* 2020;20(1):244.
65. Madaras L, Kovács KA, Szász AM, Kenessey I, Tőkés AM, Székely B, et al. Clinicopathological features and prognosis of pregnancy associated breast cancer - a matched case control study. *Pathol Oncol Res.* 2014;20(3):581-90.

66. Alsaker MD, Opdahl S, Romundstad PR, Vatten LJ. Association of time since last birth, age at first birth and parity with breast cancer survival among parous women: a register-based study from Norway. *Int J Cancer*. 2013;132(1):174-81.
67. Asztalos S, Pham TN, Gann PH, Hayes MK, Deaton R, Wiley EL, et al. High incidence of triple negative breast cancers following pregnancy and an associated gene expression signature. *Springerplus*. 2015;4:710.
68. Farmaki E, Kaza V, Chatzistamou I, Kiaris H. CCL8 Promotes Postpartum Breast Cancer by Recruiting M2 Macrophages. *iScience*. 2020;23(6):101217.
69. Lefrère H, Lenaerts L, Borges VF, Schedin P, Neven P, Amant F. Postpartum breast cancer: mechanisms underlying its worse prognosis, treatment implications, and fertility preservation. *Int J Gynecol Cancer*. 2021;31(3):412-22.
70. Deshmukh SK, Srivastava SK, Poosarla T, Dyess DL, Holliday NP, Singh AP, et al. Inflammation, immunosuppressive microenvironment and breast cancer: opportunities for cancer prevention and therapy. *Ann Transl Med*. 2019;7(20):593.
71. O'Brien J, Lyons T, Monks J, Lucia MS, Wilson RS, Hines L, et al. Alternatively activated macrophages and collagen remodeling characterize the postpartum involuting mammary gland across species. *Am J Pathol*. 2010;176(3):1241-55.
72. Wallace TR, Tarullo SE, Crump LS, Lyons TR. Studies of postpartum mammary gland involution reveal novel pro-metastatic mechanisms. *J Cancer Metastasis Treat*. 2019;5.
73. Elder AM, Stoller AR, Black SA, Lyons TR. Macphatics and PoEMs in Postpartum Mammary Development and Tumor Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2020;25(2):103-13.
74. Hamidullah, Changkija B, Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133(1):11-21.
75. Guo Q, Betts C, Pennock N, Mitchell E, Schedin P. Mammary Gland Involution Provides a Unique Model to Study the TGF- β Cancer Paradox. *J Clin Med*. 2017;6(1).
76. Borges VF, Elder AM, Lyons TR. Deciphering Pro-Lymphangiogenic Programs during Mammary Involution and Postpartum Breast Cancer. *Front Oncol*. 2016;6:227.
77. Lyons TR, Borges VF, Betts CB, Guo Q, Kapoor P, Martinson HA, et al. Cyclooxygenase-2-dependent lymphangiogenesis promotes nodal metastasis of postpartum breast cancer. *J Clin Invest*. 2014;124(9):3901-12.
78. Elder AM, Tamburini BAJ, Crump LS, Black SA, Wessells VM, Schedin PJ, et al. Semaphorin 7A Promotes Macrophage-Mediated Lymphatic Remodeling during Postpartum Mammary Gland Involution and in Breast Cancer. *Cancer Res*. 2018;78(22):6473-85.

79. Kondov B, Kondov G, Spirovski Z, Milenkovic Z, Colanceski R, Petrusevska G, et al. Prognostic Factors on the Positivity for Metastases of the Axillary Lymph Nodes from Primary Breast Cancer. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)*. 2017;38(1):81-90.
80. Swartz MA. Inflammatory lymphangiogenesis in postpartum breast tissue remodeling. *J Clin Invest*. 2014;124(9):3704-7.
81. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet*. 2002;360(9328):187-95.
82. Lefrère H, Floris G, Schmidt MK, Neven P, Warner E, Cardonick E, et al. Breast cancer diagnosed in the post-weaning period is indicative for a poor outcome. *Eur J Cancer*. 2021;155:13-24.
83. Peterson NB, Huang Y, Newcomb PA, Titus-Ernstoff L, Trentham-Dietz A, Anic G, et al. Childbearing recency and modifiers of premenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(11):3284-7.
84. Nichols HB, Schoemaker MJ, Cai J, Xu J, Wright LB, Brook MN, et al. Breast Cancer Risk After Recent Childbirth: A Pooled Analysis of 15 Prospective Studies. *Ann Intern Med*. 2019;170(1):22-30.
85. Islami F, Liu Y, Jemal A, Zhou J, Weiderpass E, Colditz G, et al. Breastfeeding and breast cancer risk by receptor status--a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol*. 2015;26(12):2398-407.
86. Sangaramoorthy M, Hines LM, Torres-Mejía G, Phipps AI, Baumgartner KB, Wu AH, et al. A Pooled Analysis of Breastfeeding and Breast Cancer Risk by Hormone Receptor Status in Parous Hispanic Women. *Epidemiology*. 2019;30(3):449-57.
87. Ma H, Ursin G, Xu X, Lee E, Togawa K, Duan L, et al. Reproductive factors and the risk of triple-negative breast cancer in white women and African-American women: a pooled analysis. *Breast Cancer Res*. 2017;19(1):6.
88. John EM, Hines LM, Phipps AI, Koo J, Longacre TA, Ingles SA, et al. Reproductive history, breast-feeding and risk of triple negative breast cancer: The Breast Cancer Etiology in Minorities (BEM) study. *Int J Cancer*. 2018;142(11):2273-85.
89. Fortner RT, Sisti J, Chai B, Collins LC, Rosner B, Hankinson SE, et al. Parity, breastfeeding, and breast cancer risk by hormone receptor status and molecular phenotype: results from the Nurses' Health Studies. *Breast Cancer Res*. 2019;21(1):40.

90. Wang JM, Wang J, Zhao HG, Liu TT, Wang FY. Reproductive Risk Factors Associated with Breast Cancer Molecular Subtypes among Young Women in Northern China. *Biomed Res Int.* 2020;2020:5931529.
91. Li CI, Beaver EF, Tang MT, Porter PL, Daling JR, Malone KE. Reproductive factors and risk of estrogen receptor positive, triple-negative, and HER2-neu overexpressing breast cancer among women 20-44 years of age. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;137(2):579-87.
92. Chen L, Li CI, Tang MT, Porter P, Hill DA, Wiggins CL, et al. Reproductive Factors and Risk of Luminal, HER2-Overexpressing, and Triple-Negative Breast Cancer Among Multiethnic Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016;25(9):1297-304.
93. Work ME, John EM, Andrulis IL, Knight JA, Liao Y, Mulligan AM, et al. Reproductive risk factors and oestrogen/progesterone receptor-negative breast cancer in the Breast Cancer Family Registry. *Br J Cancer.* 2014;110(5):1367-77.
94. Gaudet MM, Press MF, Haile RW, Lynch CF, Glaser SL, Schildkraut J, et al. Risk factors by molecular subtypes of breast cancer across a population-based study of women 56 years or younger. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130(2):587-97.
95. Lee JS, Oh M. Reproductive factors and subtypes of breast cancer defined by estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2: a register-based study from Korea. *Clin Breast Cancer.* 2014;14(6):426-34.
96. Palmer JR, Boggs DA, Wise LA, Ambrosone CB, Adams-Campbell LL, Rosenberg L. Parity and lactation in relation to estrogen receptor negative breast cancer in African American women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(9):1883-91.
97. Basree MM, Shinde N, Koivisto C, Cuitino M, Kladney R, Zhang J, et al. Abrupt involution induces inflammation, estrogenic signaling, and hyperplasia linking lack of breastfeeding with increased risk of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2019;21(1):80.
98. Silanikove N. Natural and abrupt involution of the mammary gland affects differently the metabolic and health consequences of weaning. *Life Sci.* 2014;102(1):10-5.
99. Sirkisoon SR, Carpenter RL, Rimkus T, Anderson A, Harrison A, Lange AM, et al. Interaction between STAT3 and GLI1/tGLI1 oncogenic transcription factors promotes the aggressiveness of triple-negative breast cancers and HER2-enriched breast cancer. *Oncogene.* 2018;37(19):2502-14.
100. Haricharan S, Li Y. STAT signaling in mammary gland differentiation, cell survival and tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;382(1):560-9.

101. Ambrosone CB, Higgins MJ. Relationships between Breast Feeding and Breast Cancer Subtypes: Lessons Learned from Studies in Humans and in Mice. *Cancer Res.* 2020;80(22):4871-7.
102. Espinal AC, Buas MF, Wang D, Cheng DT, Sucheston-Campbell L, Hu Q, et al. FOXA1 hypermethylation: link between parity and ER-negative breast cancer in African American women? *Breast Cancer Res Treat.* 2017;166(2):559-68.
103. Hachim IY, Shams A, Lebrun JJ, Ali S. A favorable role of prolactin in human breast cancer reveals novel pathway-based gene signatures indicative of tumor differentiation and favorable patient outcome. *Hum Pathol.* 2016;53:142-52.
104. Hachim IY, Hachim MY, Lopez VM, Lebrun JJ, Ali S. Prolactin Receptor Expression is an Independent Favorable Prognostic Marker in Human Breast Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(4):238-45.
105. López-Ozuna VM, Hachim IY, Hachim MY, Lebrun JJ, Ali S. Prolactin Pro-Differentiation Pathway in Triple Negative Breast Cancer: Impact on Prognosis and Potential Therapy. *Sci Rep.* 2016;6:30934.
106. Shams A, Binothman N, Boudreault J, Wang N, Shams F, Hamam D, et al. Prolactin receptor-driven combined luminal and epithelial differentiation in breast cancer restricts plasticity, stemness, tumorigenesis and metastasis. *Oncogenesis.* 2021;10(1):10.
107. Moumen M, Chiche A, Deugnier MA, Petit V, Gandarillas A, Glukhova MA, et al. The proto-oncogene Myc is essential for mammary stem cell function. *Stem Cells.* 2012;30(6):1246-54.
108. ElShamy WM. The protective effect of longer duration of breastfeeding against pregnancy-associated triple negative breast cancer. *Oncotarget.* 2016;7(33):53941-50.