

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS*
DE FRANCISCO BELTRÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE,
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

JANAÍNA CARLA DA SILVA

**EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A PESTICIDAS AFETA RESPOSTAS
IMUNOLÓGICAS ANTITUMORAIS FUNDAMENTAIS EM MULHERES
COM CÂNCER DE MAMA ESTRATIFICADAS COMO RISCO
INTERMEDIÁRIO DE RECORRÊNCIA**

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(MARÇO/2022)

JANAÍNA CARLA DA SILVA

**EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A PESTICIDAS AFETA RESPOSTAS
IMUNOLÓGICAS ANTITUMORAIS FUNDAMENTAIS EM MULHERES
COM CÂNCER DE MAMA ESTRATIFICADAS COMO RISCO
INTERMEDIÁRIO DE RECORRÊNCIA**

DISSERTAÇÃO apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde, nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador(a): Dra. Carolina Panis

Co-orientador (a): Dr. Guilherme Ferreira

Silveira

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(MARÇO/2022)

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da
Unioeste.

da Silva, Janaína Carla

Exposição ocupacional a pesticidas afeta respostas
imunológicas antitumorais fundamentais em mulheres com câncer
de mama estratificadas como risco intermediário de
recorrência / Janaína Carla da Silva; orientadora Carolina
Panis; coorientador Guilherme Ferreira Silveira. --
Francisco Beltrão, 2022.

101 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Francisco
Beltrão) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro
de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Aplicadas à Saúde, 2022.

1. Câncer de mama. 2. Estratificação de risco de
recorrência e morte. 3. Agrotóxicos. 4. Resposta imunológica .
I. Panis, Carolina, orient. II. Ferreira Silveira,
Guilherme, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

JANAÍNA CARLA DA SILVA

**EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A PESTICIDAS AFETA RESPOSTAS
IMUNOLÓGICAS ANTITUMORAIS FUNDAMENTAIS EM MULHERES
COM CÂNCER DE MAMA ESTRATIFICADAS COMO RISCO
INTERMEDIÁRIO DE RECORRÊNCIA**

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e pela Banca Examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a): Profa. Dra. Carolina Panis
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ

Membro da banca: Profa. Dra. Sabrina Grassioli
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ

Membro da banca: Profa. Dra. Vanessa Jacob Victorino
INSTITUTO FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

FRANCISCO BELTRÃO, PR
Março/2022

AGRADECIMENTOS

A Deus, muito obrigada por tudo, por iluminar meu caminho, me presenteando todos os dias com todos os ensinamentos possíveis através da minha família, amigos e todas as pessoas que cruzaram meu caminho.

Agradeço imensamente a minha família, minha mãe Mariza Favaro da Silva e meu pai Abraão da Silva, os quais me apoiam em todos os momentos, sempre fazendo o possível e o impossível para viabilizar meus sonhos. A minha irmã, que sempre tem um momento para conversas e desabafos, muito obrigada pelo apoio de sempre. E a minha sobrinha, por me acordar para brincar com ela nos domingos, me fazer deixar de lado os estudos e por vezes acumular trabalho para brincar, mas me fazer rir sempre que está por perto, muito obrigada!

Agradeço aos amigos que o Laboratório de Biologia de Tumores me presenteou, Fernanda Mara Alves, Gêssica Teixeira, Stefania Tagliari de Oliveira, Matheus Garbim, Mariane Okamoto e Rodrigo Kern, por todo o apoio tanto dentro do laboratório, quanto nos momentos fora dele, com agradecimento especial para a amiga Thalita Basso Scandolara, primeira pessoa que conheci no laboratório, que me mostrou e ajudou com tudo desde os primórdios e se tornou uma amiga e inspiração na pesquisa. Estendo meus agradecimentos aos membros do DataLab, principalmente a Isadora Carneiro, a Eloiza Dias Ferreira e o Guilherme Soares, que se tornaram grandes amigos, e foram essenciais nesses 2 anos de mestrado. Agradeço a todos os professores que fizeram e fazem parte da construção das minhas escolhas profissionais, sejam estes através de disciplinas lecionadas no decorrer do ano letivo ou atividades extracurriculares.

A coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, Profa. Dra. Léia Carolina Lúcio e a Andréia Angela de Rosso, pela disponibilidade e rapidez em ajudar em tudo o que fosse possível durante esses dois anos.

Agradeço ao Sr. Antônio, por toda a ajuda dentro da Unioeste, fosse para poder apenas entrar na Universidade nesse período de pandemia, com horários diferenciados ou conseguir algum material de última hora. As técnicas Elaine e Katiana, também gostaria de agradecer a ajuda dentro da Universidade.

Deixo aqui também, meu muito obrigada ao Hospital do Câncer de Francisco Beltrão – CEONC, o qual está sempre de portas abertas a nós e possibilita esse trabalho, mas principalmente as pacientes que participam da pesquisa conosco. Agradeço a banca examinadora Professora Dra Sabrina Grassioli, e Professora Dra Vanessa Jacob, por aceitarem o convite feito com carinho, e por fazerem parte também dessa

construção profissional tanto dentro da sala de aula quanto fora dela. Faço meu agradecimento especial aos meus orientadores Professor Dr. Guilherme Ferreira Silveira, por ter aceitado a empreitada de me coorientar, assim como todas as mudanças ocorridas ao longo do caminho até aqui, e a Professora Dra. Carolina Panis, que abriu as portas do Laboratório de Biologia de Tumores para eu entrar, e oportunizou o início da minha caminhada na pesquisa, muito obrigada por acreditar em mim, por toda sua dedicação e paciência.

Dedicatória

Ao meu avô Dilo Favaro, falecido em 1999, minha primeira fonte de inspiração para a pesquisa oncológica.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismos de indução da carcinogênese através espécies reativas (RS)	27
Figura 2 – Desenho do estudo.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estratificação de risco de óbito e recidiva de pacientes diagnosticadas com câncer de mama segundo a Portaria Conjunta Nº4 do Ministério da Saúde (Goldhirsch et al., 2007).....	33
Tabela 2 – Condições das reações de imunofluorescência e especificações dos anticorpos.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INCA: Instituto Nacional de Câncer
CEONC: Hospital do Câncer de Francisco Beltrão
TNF- α : Fator de necrose tumoral – alfa
IL-4: Interleucina 4
IL-17 A: Interleucina 17 A
IL-12: Interleucina 12
TRAP: Capacidade antioxidante total plasmática
NOx: Metabólitos do óxido nítrico
CTLA-4: Proteína associada ao linfócito T citotóxico 4
TGF- β 1: Fator transformador de crescimento beta 1
T β RI: Receptor de TGF- β tipo I
T β RII: Receptor de TGF- β tipo II
p-Smad2: Mãe contra decapentaplégico homólogo 2 fosforilado
Smad 4: Mãe contra decapentaplégico homólogo 4
EMT: Transição epitelial-mesenquinal
iNOs: Enzima óxido nítrico sintase induzível
pT: Tamanho tumoral
RE: Receptor de estrogênio
RP: Receptor de progesterona
HER-2: Receptor de crescimento epidérmico humano - 2
RH: Receptores hormonais
IL-1 β : Interleucina 1beta
NK: Células *Natural Killer*
Th1: Células T auxiliares 1
Th2: Células T auxiliares 2
Th17: Células T auxiliares 17
PD-L1: Ligante de morte programada 1
IL-4R: Receptor da interleucina 4
IL-4R- α : Receptor da interleucina 4 – α
MAPK: Proteína-quinases ativadas por mitógenos
CD95/Fas: Antígeno de apoptose 1

APCs: Células apresentadoras de antígenos
IFN- γ : Interferon gama
CCR7: Receptor de quimiocina do tipo CC7
CD4: Linfócitos T CD4+
CD8: Linfócitos T CD8+
ADCC: Citotoxicidade celular dependente de anticorpos
Tregs: Células T reguladoras
ROS: Espécies reativas de oxigênio
RNS: Espécies reativas de nitrogênio
NO.: óxido nítrico
MDSCs: Células supressoras derivadas da linhagem mielóide
TILs: Linfócitos infiltrantes de tumor
QL: Quimioluminescência de alta sensibilidade
URL: Unidade relativas de luz
TRAP: Capacidade antioxidante total plasmática
ABAP: 2,2'-azobis (2-amidinopropano)
UA: Unidades arbitrárias
ZnSO₄: Sulfato de zinco
NaOH: Hidróxido de sódio
NEED: Naftiletildietilamida
FITC: Isotiocianato de fluoresceína
DAPI: 4,6 diamidinofenilindol
IMC: Índice de massa corporal
Ki67: Marcador de proliferação celular
A: Grupo de alto risco exposto e não exposto aos pesticidas
IE: Grupo de risco intermediário exposto aos pesticidas
INE: Grupo de risco intermediário não exposto aos pesticidas
E: Grupo exposto
NE: Grupo não exposto
ACP: Análise de componentes principais
Dim1: Cargas fatoriais do componente principal 1
Dim2: Cargas fatoriais do componente principal 2

Exposição ocupacional a pesticidas afeta respostas imunológicas antitumorais fundamentais em mulheres com câncer de mama estratificadas como risco intermediário de recorrência

Resumo

O câncer de mama é uma doença cujas características clinicopatológicas têm grande importância para prever o prognóstico e orientar intervenções clínicas. A estratificação de risco de óbito e recidiva consiste em uma estratégia para orientar as decisões terapêuticas, e é dividida em risco baixo, intermediário ou alto. Tanto o baixo quanto o alto risco baseiam-se em parâmetros clínicos bem definidos, enquanto o risco intermediário é um desafio para o clínico, pois possui muitas outras condicionais, que podem resultar em subtratamento, aumentando as chances de recorrência ou até mesmo de tratamento excessivo, o que pode levar a danos sistêmicos. Pouco se sabe sobre a influência de fatores ambientais, como a exposição ocupacional aos pesticidas, na estratificação de risco do câncer de mama, especialmente em relação ao estrato intermediário. Considerando-se que a maior parte das pacientes com câncer de mama atendidas na região Sudoeste do Paraná, apresentam risco intermediário, e que as mesmas apresentam significativa exposição ocupacional aos pesticidas, o presente estudo tem como objetivo analisar se a exposição ocupacional aos agrotóxicos em mulheres com câncer de mama pode alterar a estratificação de risco do estrato intermediário. Este estudo incluiu mulheres com diagnóstico de câncer de mama atendidas no Hospital do Câncer Francisco Beltrão (Ceonc), Francisco Beltrão, Paraná, Brasil. Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o estudo foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição sob o número 35524814.4.0000.0107. As pacientes foram estratificadas segundo recomendação do Ministério da Saúde (Portaria Conjunta Nº4) considerando-se os seguintes critérios: Linfonodos acometidos, tamanho tumoral, grau histológico, receptores de estrogênio e progesterona, subtipo molecular e idade ao diagnóstico.

Com base na estratificação de risco e nos dados de exposição a pesticidas, as pacientes foram categorizadas como risco intermediário/exposto aos pesticidas,

risco intermediário/não exposto a pesticidas, alto risco/exposto a pesticidas e alto risco/não exposto a pesticidas. Para investigação do perfil inflamatório, foram quantificados dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 4 (IL-4), interleucina 17A (IL-17A) e interleucina 12 (IL-12). Foram também analisados, o perfil de estresse oxidativo através da medida dos níveis de hidroperóxidos, a capacidade antioxidante total plasmática (TRAP), e os metabólitos do óxido nítrico (NOx). Avaliou-se ainda a expressão tumoral da proteína associada ao linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4), do fator transformador de crescimento beta 1 (TGF- β 1) e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), por imunofluorescência. O perfil clinicopatológico geral das pacientes demonstrou predominância de subtipos tumorais mais agressivos, dentre esses luminal B e triplo negativo, bem como tamanhos tumorais acima de 2cm. Os resultados referentes do perfil de estratificação de risco, demonstraram seguir o procedimento padrão atual de estratificação. As análises do perfil oxidativo e antioxidante, não mostraram diferenças significativas, enquanto isso observou-se redução significativa da IL-12 em pacientes em risco intermediário quando comparado ao grupo não exposto. Nas análises de marcadores teciduais foi observado um aumento da expressão de iNOS e TGF- β 1 no infiltrado imunológico. Já o CTLA-4, demonstrou aumento da expressão, no infiltrado e redução da expressão de CTLA-4 em células tumorais. Considerando a relevância da IL-12 nas respostas antitumorais, bem como dos marcadores teciduais aqui investigados (iNOS, TGF- β 1 e CTLA-4), nossos dados indicam que pacientes com câncer de mama classificadas como risco intermediário expostas a pesticidas podem se beneficiar de uma restratificação para alto risco.

Palavras-chave: Câncer de mama, estratificação de risco, pesticidas, citocinas, estresse oxidativo.

Occupational pesticide exposure affects pivotal antitumor immune responses in women with breast cancer stratified as intermediate risk of recurrence

Abstract

Breast cancer is a disease whose clinicopathological characteristics are of great importance to predict the prognosis and guide clinical interventions. Risk stratification of death and recurrence is a strategy to guide therapeutic decisions, and is divided into low, intermediate or high risk. Both low and high risk are based on well-defined clinical parameters, while intermediate risk is a challenge for the clinician as it has many other conditionals, which can result in undertreatment, increasing the chances of recurrence or even overtreatment, which can lead to systemic damage. Little is known about the influence of environmental factors, such as occupational exposure to pesticides, on breast cancer risk stratification, especially in relation to the intermediate stratum. Considering that most breast cancer patients treated in the Southwest region of Paraná present intermediate risk, and that they present significant occupational exposure to pesticides, the present study aims to analyze whether occupational exposure to pesticides in women with breast cancer may alter the risk stratification of the intermediate stratum. This study included women diagnosed with breast cancer treated at Hospital do Câncer Francisco Beltrão (Ceonc), Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. All patients signed an informed consent form and the study was authorized by the Institution's Research Ethics Committee under number 35524814.4.0000.0107. Patients were stratified as recommended by the Ministry of Health (Joint Ordinance N^o. 4) considering the following criteria: affected lymph nodes, tumor size, histological grade, estrogen and progesterone receptors, molecular subtype and age at diagnosis.

Based on risk stratification and pesticide exposure data, patients were categorized as intermediate risk/pesticide exposed, intermediate risk/non-pesticide exposed, high risk/pesticide exposed, and high risk/non-pesticide exposed. To investigate the inflammatory profile, the levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 4 (IL-4), interleukin 17A (IL-17A) and interleukin 12 (IL-12) were quantified using the enzyme immunoassay method. The oxidative stress profile was also evaluated by measuring the levels of hydroperoxides, the

plasma total antioxidant capacity (TRAP), and the nitric oxide metabolites (NOx). The tumor expression of cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) and inducible nitric oxide synthase enzyme (iNOS) were also evaluated by immunofluorescence. The general clinicopathological profile of the patients showed a predominance of more aggressive tumor subtypes, including luminal B and triple negative, as well as tumor sizes greater than 2 cm. The results referring to the risk stratification profile, demonstrated to follow the current standard procedure of stratification. The analysis of the oxidative and antioxidant profile did not show significant differences, while a significant reduction of IL-12 was observed in patients at intermediate risk when compared to the unexposed group. In the analysis of tissue markers, an increase in the expression of iNOS and TGF- β 1 was observed in the immunologic infiltrate. CTLA-4, on the other hand, showed an increase in expression in the infiltrate and a reduction of expression in tumor cells. Considering the relevance of IL-12 in antitumor responses, as well as the tissue markers investigated here (iNOS, TGF- β 1 and CTLA-4), our data indicate that breast cancer patients classified as intermediate risk exposed to pesticides may benefit from a re-stratification to high risk.

keywords: Breast cancer, risk stratification, pesticides, cytokines, oxidative stress.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 <i>Epidemiologia do câncer de mama e aspectos clinicopatológicos da doença</i>	20
1.2 <i>Exposição a pesticidas e câncer de mama</i>	22
1.3 <i>Resposta inflamatória no câncer de mama: papel das citocinas e dos mediadores redox</i>	23
1.4 <i>Microambiente tumoral e checkpoints imunológicos</i>	28
2. OBJETIVOS	31
2.1 <i>Gerais</i>	31
2.2 <i>Específicos</i>	31
3. METODOLOGIA	32
3.1 <i>Aspectos legais</i>	32
3.2 <i>Desenho do estudo</i>	32
3.3 <i>Coleta das amostras de plasma e obtenção do perfil inflamatório sistêmico</i>	34
3.4 <i>Avaliação da expressão tumoral de iNOS, TGF-β1 e CTLA-4 por imunofluorescência</i>	36
3.5 <i>Análises estatísticas</i>	38
4. REFERÊNCIAS	40
5. ARTIGO CIENTÍFICO 1	47
ANEXO I	
ANEXO II	
ANEXO III - NORMAS DA REVISTA	

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea e multifatorial, que resulta da complexa interação de vários fatores de risco genéticos e ambientais, além do estilo de vida (Sciaraffa et al. 2020). Além disso, a doença se caracteriza pela subdivisão em subtipos tumorais, que em conjunto com outras características clínico patológicas, são preditivos de desfechos clínicos, como sobrevida e resposta ao tratamento (Sparano et al. 2019; Li et al. 2021).

De acordo com a Portaria Conjunta Nº 4, De 23 de Janeiro de 2018 que aprova as as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama, o prognóstico e tratamento da doença são definidos por critérios como a localização do tumor, idade ao diagnóstico, estadiamento da doença, critérios histopatológicos, moleculares e genéticos, os quais foram sendo incorporados nos critérios de avaliação de prognóstico ao longo dos anos, concomitantemente ao desenvolvimento de pesquisas na área oncológica (Ministério da Saúde,2018).

De acordo com as categorias de risco definidas utilizando a classificação de St Gallen 2007, os critérios de risco de recorrência para o câncer de mama são classificado em baixo, intermediário e alto risco. Segundo Goldhirsch et al. (2011), a classificação de baixo risco inclui linfonodos negativos e todos os seguintes critérios: pT (tamanho tumoral) até 2 cm, grau histológico 1, RE (receptor de estrógeno) ou RP (receptor de progesterona) positivo, HER-2 (receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2) negativo, subtipo molecular luminal A e idade igual ou acima de 35 anos.

Já a classificação de risco intermediário compreende linfonodos negativos e pelo menos um dos seguintes critérios: pT maior que 2 cm, grau histológico 2 ou 3, RE ou RP negativos, subtipo molecular luminal B, HER-2 negativo, idade abaixo de 35 anos ou 1 a 3 linfonodos positivos se RH (receptores hormonais) positivos. A classificação de alto risco engloba 4 ou mais linfonodos positivos ou linfonodos negativos com RE e RP negativos, pT maior que 2 cm e HER-2 negativo, ou ainda, pT maior que 1cm e HER-2 positivo.

Dessa forma, o estadiamento do tumor afeta diretamente a taxa de sobrevida da paciente com câncer de mama, visto que tais características representam importantes indicadores do prognóstico da doença e decisão

terapêutica. Assim, é essencial observar que as pacientes estratificadas como risco intermediário, representam um desafio para o clínico, por apresentarem parâmetros menos definidos que nas demais categorias. Como consequência, existe nestas mulheres o potencial de sub-tratamento da doença, aumentando as chances de recorrência da mesma ou ainda de super-tratamento, podendo acarretar em dano sistêmico. Segundo a Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (2011), neste grupo de pacientes é onde a equipe médica vivencia as maiores frustrações, uma vez que não conseguem diferenciar com precisão as pacientes que tem doença micro-metastática e necessitam de tratamento daquelas que já estão curadas com tratamento local. Soma-se a esta complexidade o fato de fatores externos específicos poderem afetar o desfecho clínico das pacientes com câncer de mama. Neste contexto, pouco se sabe sobre a influência combinada de fatores clinicopatológicos clássicos e fatores de risco locoregionais como exposições ambientais, na determinação do prognóstico da doença.

Dentre os fatores observados como potencial complicador do câncer de mama estão os pesticidas. Embora existam evidências clínicas limitadas quanto ao impacto desta exposição, estudos em humanos e modelos animais demonstram efeitos potencialmente genotóxicos, dano cromossômico e indução de estresse oxidativo, todos intimamente ligados ao desenvolvimento e progressão tumoral (IARC, 2017; Weinberg, 2008).

Em populações ocupadas na agricultura familiar, conforme observado nos estados da região Sul do país, existe intensa participação da mulher em todas as etapas do preparo, diluição, aplicação e descontaminação dos utensílios utilizados na pulverização de pesticidas. Nosso grupo tem caracterizado o perfil de exposição ocupacional das mulheres do Sudoeste do Paraná, onde observa-se incidência de câncer de mama de elevada agressividade na população de mulheres ocupacionalmente expostas aos pesticidas. Um estudo epidemiológico piloto conduzido por Rech (2018) revelou que o perfil geral das pacientes atendidas pela 8ª Regional de Saúde do Paraná, que engloba 27 municípios do Sudoeste do estado, é caracterizado pelo predomínio de subtipos bastante proliferativos e de difícil tratamento, como o Luminal B (38,7% dos casos) e Triplo-negativo (19,4% dos casos). Neste mesmo estudo, observou-se que mais metade das mulheres atendidas nesta regional de saúde eram

ocupacionalmente expostas aos agrotóxicos, sugerindo que este poderia ser um fator de risco relevante a ser investigado nesta população.

Em 2020, Teixeira demonstrou que aquelas mulheres que apresentavam tumores de mama mais agressivos faziam parte do grupo ocupacionalmente exposto aos pesticidas, sendo esta exposição determinante para ocorrência de quimiorresistência ao tratamento. Em 2021, Gaboardi demonstrou que a contaminação por pesticidas nestas mulheres ocorre de forma severa e se dá, principalmente, no momento do preparo dos agrotóxicos para pulverização e na descontaminação de roupas e equipamentos de proteção individual que foram utilizados na sua aplicação. Desta forma, surgiu a necessidade de investigação dos mecanismos moleculares associados a esta exposição.

Para tanto, o estudo de análise toxicoproteômica conduzido por Pizzatti et al. (2020), revelou mecanismos associados à regulação negativa da biologia dos tumores de mama nas mulheres expostas aos pesticidas, especialmente aqueles ligados à resposta imunológica, com comprometimento dos níveis sistêmicos do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β), importantes citocinas antitumorais. Além disso, os processos e vias desreguladas pela exposição aos pesticidas identificados nestas pacientes se correlacionaram com características clínicopatológicas específicas como menopausa, índice de massa corporal e formação de coágulos intratumorais. Outro estudo, conduzido por Kawassaki (2019), demonstrou que esta exposição atua como importante desregulador endócrino dos eixos do estrogênio e do cortisol, e que se agrava nas mulheres em condições de sobrepeso e obesidade. Variações no perfil redox e de citocinas também foram reportadas pela autora como significativamente desreguladas pela exposição ocupacional aos agrotóxicos nesta população.

Assim, estes achados sugerem que a exposição ocupacional a pesticidas nestas mulheres é um possível fator de risco adicional a ser considerado na estimativa do prognóstico, que inclui a estratificação de risco. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o impacto da exposição ocupacional aos agrotóxicos na estratificação de risco de óbito e recidiva intermediária de mulheres com câncer de mama, bem como determinar sua influência no perfil de produção de mediadores redox e inflamatórios sistêmicos e tumorais.

1.1 Epidemiologia do câncer de mama e aspectos clinicopatológicos da doença

O câncer de mama é uma doença heterogênea que possui vários subtipos com diferentes dados clinicopatológicos que são preditivos de desfechos clínicos. Além disso, é o câncer mais incidente em mulheres em todo o mundo, representando aproximadamente 2,3 milhões de novos casos (11,7%) em 2020, sendo a quinta causa de morte por câncer em geral (685.000 mortes) e a causa mais frequente de morte por câncer em mulheres. Portanto, desempenha um papel importante no setor de saúde pública por apresentar elevada morbidade, prevalência e mortalidade, principalmente em países em desenvolvimento (Sung et al. 2021).

No Brasil, segundo a estimativa 2020-2022, do Instituto Nacional de Câncer (INCA), é o mais prevalente em todas as regiões (excluindo os tumores de pele não melanoma), sendo estimado 66.280 casos novos por ano do triênio, o que representa uma taxa de incidência de 61,61 casos novos por 100.000 mulheres. Ainda segundo a estimativa 2020-2022 do INCA, para o ano de 2020 a incidência da doença no estado do Paraná é de 59,26 casos para cada 100.000 mulheres, representando aproximadamente 3.470 novos casos. Na região sudoeste do Paraná, observou-se entre o período de 2015 à 2020 o registro de 93 casos a cada 100.000 mulheres (Teixeira, 2020), destacando a elevada incidência regional da doença.

Dentre os fatores de risco para a doença, se encontram, história reprodutiva, idade, fatores comportamentais e ambientais, onde destacam-se os agrotóxicos, que por ação direta ou indireta, podem causar danos ao DNA pela sua ação carcinogênica (Pertile et al. 2018). Dessa forma, o acúmulo de exposições ao longo da vida e as alterações biológicas causadas por esses fatores, entre outros, aumentam o risco de desenvolvimento da doença (Figura 1).

Por ser o câncer de mama uma doença complexa, os pesquisadores e a equipe clínica precisam acessar rapidamente todas as características relacionadas ao prognóstico e à agressividade da doença, com o objetivo de identificar novos padrões que possam ajudar a compreender o comportamento

da doença. Nesse contexto, a análise de dados clínicopatológicos consiste em uma rica fonte de dados que, quando corretamente cruzada, pode trazer resultados relevantes aplicados.

A consideração de critérios clínicopatológicos, parâmetros microambientais e marcadores imunohistoquímicos selecionados de indivíduos com diagnóstico de tumor de mama, bem como a inter-relação entre estas variáveis, se torna um conceito fundamental a ser considerado na oncologia (de Mascarel et al. 2015). Os avanços alcançados e o aumento da sobrevivência de pacientes com câncer de mama pode ser explicada pelo desenvolvimento e conhecimento em biologia de tumores (Kern et al. 2020). Conseqüentemente, as abordagens terapêuticas tornaram-se mais eficazes. No entanto, esforços contínuos devem persistir para a identificação de novos e eficientes biomarcadores para o câncer de mama (Kern et al. 2020; Waks and Winer 2019).

Desta forma, as características levadas em consideração para a estratificação de risco e sua significância são descritas a seguir: tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos e subtipo molecular são características clínico-patológicas essenciais a serem analisadas, pois todas implicam em maior probabilidade de metástase para órgãos distantes, estando relacionadas à desdiferenciação dos tumores. Metástases para órgãos distantes também são avaliadas, pois aumentam o risco de recorrência e diminuem a sobrevivência global. Outras características importantes são a expressão de receptores hormonais (receptor de estrogênio e de progesterona), que reflete melhor a diferenciação tumoral e pode ser um dos alvos para fins terapêuticos, proporcionando melhor sobrevivência livre de doença. Além disso, a amplificação do receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER-2), uma expressão gênica que confere maior capacidade de proliferação celular e invasão, permite o uso de anticorpos monoclonais como um tratamento viável neste subtipo molecular. A avaliação do grau histológico e da idade são consideradas características independentes, com idade inferior a 35 anos, sendo um fator desfavorável (Ministério da Saúde, 2018; SBOC, 2011).

Assim, as análises dos fatores intrínsecos do tumor, bem como do perfil epidemiológico, são essenciais para entender o comportamento dos tumores e planejar opções de tratamento mais específicas e direcionadas para atender demandas individuais e regionalizadas.

1.2 Exposição a pesticidas e câncer de mama

As células do corpo humano são constantemente expostas a ataques de natureza oxidativa, os quais podem ser tanto de natureza endógena como exógena (Figura. 1). As exógenas incluem fatores ambientais aos quais os seres humanos estão constantemente expostos, como a poluição, aditivos alimentares, medicamentos, poeira química e agrotóxicos.

Os impactos dos agrotóxicos na saúde, podem ser classificados como diretos e indiretos, sendo a toxicidade uma característica intrínseca destes agentes químicos. A International Agency for Research on Cancer (IARC) avaliou o potencial carcinogênico de alguns agrotóxicos, entre eles o glifosato, o herbicida mais utilizados na agricultura no Brasil e na região Sudoeste do Paraná, classificado como potencial carcinógeno para seres humanos (IARC, 2017). A exposição aos agrotóxicos tem sido apontada como uma importante causa de doença em populações expostas ao redor do mundo (Alavanja and Bonner 2012), incluindo câncer de mama. Estudos têm demonstrado que estas substâncias são carcinógenos por terem atividades genotóxicas e imunodesreguladoras, e capazes de atuar como promotores de tumor e desreguladores endócrinos através de mecanismos relacionados ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama (Kim et al. 2017; He et al. 2017).

Os efeitos carcinogênicos dos pesticidas, incluem sua ação como xenoestrógenos interação e interrupção da sinalização dos receptores de estrogênio, lesão do DNA do tecido mamário em indivíduos suscetíveis capaz de induzir malignidade, descritos em estudos *in vitro* e *in vivo* (Ferro et al. 2012).

Diversos estudos têm sido realizados ao redor do mundo, com objetivo de identificar se a exposição humana aos agrotóxicos está associada ao desenvolvimento de câncer de mama. Destes, destacam-se os estudos de exposição ocupacional de mulheres que trabalham ocupadas na atividade rural, já que esta ocorre de forma intensa e continuada.

É descrita associação entre o risco de câncer de mama e o tempo de exposição aos pesticidas, assim como a quantidade de produto (El-Zaemey et al. 2013).

Em estudo realizado com mulheres na Etiópia, os organoclorados e seus derivados demonstraram ser fatores preditivos independentes para o desenvolvimento da doença (Mekonen et al. 2021). Outro poluente orgânico persistente, o pesticida organoclorado dieldrin foi relacionado ao aumento do risco de câncer de mama estrogênio e progesterona positivos. A exposição a pesticidas ainda em uso, como os organofosfatos clorpirifós e terbufós, está associada ao risco aumentado para este câncer (Engel et al. 2017). Devido à sua elevada atividade esteroidogênica, o clorpirifós foi recomendado para avaliação de carcinogenicidade na próxima avaliação da IARC (Cardona and Rudel 2021).

1.3 Resposta inflamatória no câncer de mama: papel das citocinas e dos mediadores redox.

A inflamação é um hallmark do câncer. A natureza pró-inflamatória dos carcinomas humanos se caracteriza pela presença de resposta inflamatória sistêmica. A ativação da imunidade contra tumores desencadeia a produção de uma série de mediadores circulantes, incluindo fatores de crescimento e citocinas, que em conjunto coordenam a esta resposta (Kawaguchi et al. 2019). Neste contexto, as citocinas podem agir de forma dupla, inibindo o desenvolvimento do tumor ou contribuindo para a inflamação crônica que suporta o crescimento do mesmo, o que têm sido associado a prognósticos desfavoráveis em pacientes oncológicos (Kartikasari et al. 2021).

O avanço de estudos no campo da biologia tumoral ao longo dos anos tem demonstrado a estreita interação entre o sistema imunológico e as células, tanto normais quanto tumorais. Essas percepções estabeleceram a base para o conceito de imunovigilância, que consiste na capacidade do sistema imunológico em reconhecer e eliminar células malignas. Em contrapartida, a imunoeedição descreve a interação recíproca e a formação do sistema imunológico e das células cancerosas que pode culminar no desenvolvimento e progressão de tumores (Dunn et al. 2002, 2004).

A resistência à resposta imune antitumoral e a presença de inflamação como combustível da doença são dois pontos destacados na assinatura do câncer proposta por (Hanahan & Weinberg 2011), onde as citocinas produzidas

tanto pelas células do sistema imune como pelas células tumorais desempenham um papel chave.

Neste contexto, destaca-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória envolvida em uma infinidade de processos biológicos, com efeitos que vão desde a proliferação celular até a indução da apoptose. Esta citocina é secretada por diversos tipos celulares como monócitos, macrófagos, células *natural killer* (NK), linfócitos T, mastócitos e neutrófilos, (Mercogliano et al. 2021), além de células não-imunológicas como as células epiteliais, células estromais do microambiente tumoral e as próprias células cancerosas (Cruceiru et al. 2020). O TNF- α encontra-se aumentado em uma variedade de cânceres, incluindo o de mama, correlacionando-se com o aumento da proliferação de células tumorais, maior grau de malignidade, aumento da ocorrência de metástases e mau prognóstico (Mercogliano et al. 2020).

Outra citocina importante nesta resposta é a interleucina 17 (IL-17), secretada principalmente por células T auxiliares 17 (Th17) e linfócitos inatos (células T $\gamma\delta$, NK e células linfoides inatas) (Welte and Zhang 2015). Sua produção pode ser induzida pela IL-1 β a partir de células T $\gamma\delta$, resultando em expansão sistêmica dependente de fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF) e polarização de neutrófilos em tumores mamários de camundongos com capacidade de suprimir os linfócitos T CD8 citotóxicos (Coffelt et al. 2015). A IL-17 apresenta correlação com o mau prognóstico do câncer de mama, pois está intimamente relacionada ao ligante de morte programada 1 (PD-L1) em tumores estrogênio negativos (Ma et al. 2017; Shuai et al. 2020)

Em relação ao padrão Th2, destaca-se a interleucina 4 (IL-4), que atua sobre os linfócitos B, monócitos, células dendríticas e fibroblastos, com efeitos pró-tumorais (Fasoulakis et al. 2018). Gaggianesi et al. (2017), analisou o impacto do bloqueio de IL-4 com um antagonista do receptor IL4R- α , e observou a inibição da proliferação, invasão e crescimento de células cancerígenas, através da regulação negativa da atividade da via das proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Outros estudos já demonstraram que a IL-4 protege as células tumorais da apoptose induzida por CD95/Fas e quimioterapia através da regulação positiva de proteínas antiapoptóticas. Além disso, o seu receptor IL-4R, demonstrou ação direta no desenvolvimento de metástase do tumor mamário, e o bloqueio de IL-4 exibiu proteção contra a radiorresistência

mediada por macrófagos do câncer de mama inflamatório (Venmar and Fingleton 2014; Bankaitis and Fingleton 2015)

A principal interleucina que atua na resposta contra tumores é a IL-12, onde através de efeitos pleiotrópicos em diferentes células imunológicas que formam o microambiente tumoral, estabelece ligação entre a imunidade inata e adaptativa dependendo do tecido afetado (Tugues et al. 2015). A IL-12 é produzida por células apresentadoras de antígenos (APCs), tanto células dendríticas quanto macrófagos, e leva a subsequente ativação e proliferação de células natural killer (NK), e linfócitos T e B (Lasek et al. 2014). Esta citocina aumenta a produção de IFN- γ a partir de células NK e linfócitos TCD4+, e aumenta a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) contra células tumorais (Lasek et al. 2014; Croxford et al. 2014). Além disso, IL-12 polariza as células T em um fenótipo de célula T auxiliar tipo 1 (Th1), uma vez que esta inibe o desenvolvimento de células T auxiliares tipo 2 (Th2) e sua interferência na diferenciação de células T reguladoras (Tregs) e células Th17 induzidas por TGF- β 1 (Prochazkova et al. 2012). Por fim, a IL-12 é capaz de suprimir a tumorigênese e induzir a regressão de tumores estabelecidos, promovendo imunidade adaptativa relacionada a Th1 juntamente com resposta citotóxica.

Toda a cascata inflamatória desencadeia a ativação do NF- κ B, responsável não somente pela transcrição das citocinas, mas também pela ativação do braço radicalar da inflamação, gerador de estresse oxidativo. Esta condição é definida pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RS) que, quando não neutralizadas pelas defesas oxidantes, são capazes de atuar nas estruturas celulares como DNA, lipídeos e proteínas causando danos oxidativos importantes (Halliwell & Gutteridge, 2015). Além disso, as espécies reativas têm sido descritas como importantes moduladores da sinalização celular redox, com extensa participação documentada no câncer de mama e seus desfechos clínicos.

A ocorrência do estresse oxidativo durante a inflamação pode levar a transformação maligna das células (Marengo et al. 2016; Lee et al. 2017). E vários estudos demonstram que as espécies reativas estão envolvidas na etiologia e progressão do câncer de mama (Kryston et al. 2011).

Marcadores circulantes de estresse oxidativo, como hidroperóxidos, são importantes indicadores de oxidação lipídica frequentemente observados no sangue de pacientes com câncer de mama (Panis et al. 2012, 2016).

O aumento dos níveis de RS pode inibir o crescimento de células cancerosas, sendo este o principal mecanismo de ação quimioterápico e radioterápico pois o aumento adicional de estresse oxidativo pode superar as defesas antioxidantes das células cancerosas e levá-las à morte por apoptose (Marengo 2016). No entanto, algumas células escapam da apoptose induzida por quimioterapia ou radioterapia por meio da adaptação ao estresse oxidativo intrínseco, o que confere o fenótipo de quimioresistência (Rotblat et al. 2012; Barrera et al. 2021).

Outras espécies reativas, como o nítrico ($\text{NO}\cdot$) e seus metabólitos, constituem mediadores essenciais tanto para a invasão e progressão do tumor, como para sua supressão (Vannini et al. 2015). Evidências apontam para papéis importantes do eixo do $\text{NO}\cdot$ em vários estágios da carcinogênese, como dano ao DNA, ativação de oncogenes, inibição de enzimas de reparo de DNA e genes supressores de tumor e modulação de apoptose e metástase (González et al. 2018). Enquanto seus efeitos antitumorais estariam relacionados a seu papel funcional dentro do sistema imune, onde por exemplo, células imunes inatas, como macrófagos e células NK, aumentam a produção de $\text{NO}\cdot$ durante a invasão de células tumorais (Arora et al. 2018), estando essas ações relacionadas com sua concentração e o microambiente tumoral (Soni et al. 2020).

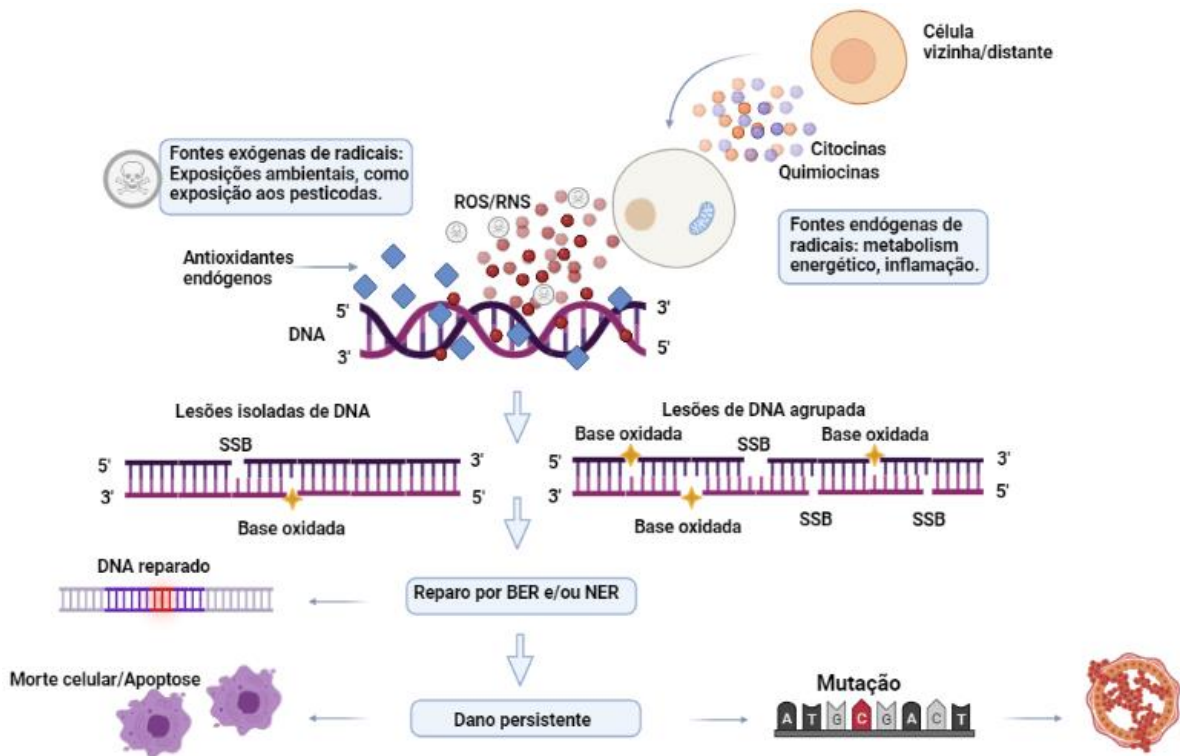


Figura1. Mecanismos de indução da carcinogênese através RS: O esquema exemplifica a associação entre a ocorrência de lesões persistentes de DNA e o desenvolvimento de câncer. As células são expostas diariamente a vários tipos de agentes oxidantes através de fontes exógenas, como os pesticidas, e fontes endógenas, como o metabolismo mitocondrial do oxigênio, respostas imunológicas e inflamação. Dessa forma, o resultado final destas exposições é a produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (RS), que podem reagir com o DNA e gerar mutações. O dano ao DNA pode ser induzido também em células vizinhas ou distantes por inflamação crônica. A primeira linha de defesa celular contra danos ao DNA consiste em agentes antioxidantes não-enzimáticos e enzimáticos, bem como as próprias vias de reparo de DNA. Os principais tipos de danos ao DNA conhecidos são as quebras de fita simples (SSBs) e lesões de oxidação em bases de forma agrupadas (OCDLs) ou de forma isolada. O reparo por excisão de base (BER) e o reparo de excisão de nucleotídeo (NER) são ativados. Lesões de DNA único são reparadas com mais eficiência do que os OCDLs, o que pode representar um grande desafio para o reparo celular. Em muitos casos, a célula desviará dos danos no DNA através de DNA polimerases específicas, gerando mutações e lesões cromossômicas. Alternativamente, a presença de lesões de DNA não reparadas pode induzir a morte celular através da via apoptótica. Entretanto, a exposição crônica a lesões de DNA pode levar a mutações e instabilidade genômica e, eventualmente, às transformações malignas. Criado com: Biorender: BioRender.com.

1.4 Microambiente tumoral e checkpoints imunológicos

Embora o papel do microambiente tumoral no comportamento do câncer de mama seja inegável, sua incorporação para avaliação do risco de recidiva e óbito, ainda é limitada.

Durante os estágios iniciais do desenvolvimento tumoral, os linfócitos relacionados à vigilância imunológica, tais quais as células T CD8 e CD4 tipo 1 (Th 1) e as NK, são capazes de reconhecer e eliminar células malignas, neutralizando a proliferação do câncer (Schreiber et al. 2011). No entanto, as células tumorais também passam por um processo de seleção, que progressivamente favorece a proliferação das células malignas que adquirem a capacidade de escapar do reconhecimento e eliminação imunológica através da adoção de várias estratégias biológicas, como a redução da expressão de antígenos tumorais nas superfícies celular. Além disso, as células tumorais tornam-se cada vez mais capazes de inibir diretamente a atividade de linfócitos relacionados à vigilância imunológica por superexpressão de moléculas de ponto de controle imunológico (checkpoints imunológicos), que também promovem a proliferação e sobrevivência de células imunossupressoras, como as Tregs, assim como células supressoras derivadas da linhagem mieloide (MDSCs), sendo este um efeito importante da fase de escape (Dunn et al. 2004; Mittal et al. 2014). Dessa forma, o subtipo, a densidade e a localização dos linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) desempenham um papel no prognóstico do câncer, uma vez que os linfócitos infiltrados levam a uma resposta antitumoral através dos linfócitos T citotóxicos CD8, e uma resposta imunossupressora, principalmente através das células Tregs (de la Cruz-Merino et al. 2013).

Vários estudos demonstraram o papel dos TILs no câncer de mama invasivo, com uma alta densidade de TILs associada a melhor resposta à terapia adjuvante ou neoadjuvante e desfecho favorável, especialmente nos subtipos triplo negativo e HER2-amplificado (Loi et al. 2013, 2014; Adams et al. 2014). Mattarollo et al. (2011), demonstraram que em pacientes portadoras do subtipo HER2, níveis mais elevados de TILs foram significativamente associados à melhora da sobrevida em pacientes que receberam maiores doses de antraciclina. Sabe-se ainda que a eficácia de algumas terapias contra o câncer

estão relacionadas à criação de um microambiente imunológico favorável (Ruffell et al. 2012).

Diversos marcadores da resposta inflamatória têm sido documentados no câncer de mama, devido ao seu papel antitumoral ou à sua participação no processo de evasão da resposta imunológica. A seguir, destacamos os mediadores que foram selecionados como alvos de interesse para o nosso estudo: iNOS, TGF- β 1 e CTLA-4.

A enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), conhecida como a terceira isoforma da enzima óxido nítrico sintase (NOS), e produz NO. de forma independente de cálcio. Em muitos tumores, a expressão de iNOS é aumentada, mas seu papel durante o desenvolvimento do tumor é complexo, com ações tanto de promoção como de inibição da tumorigênese (Vannini et al. 2015). Dentro do microambiente tumoral, a iNOS é a principal responsável pela produção de NO., principalmente por em macrófagos e células tumorais tornando-se um alvo importante para o futuro alvo terapêutico (Choudhari et al. 2013).

O fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1) é uma citocina crucial para a homeostase e tolerância imunológica. Perturbações em sua sinalização tem mostrado importância significativa no desenvolvimento e progressão tumoral, onde estudos recentes revelaram papéis na evasão imune do tumor e respostas precárias à imunoterapia contra o câncer (Battle and Massagué 2019).

Esta citocina faz parte do controle da imunidade adaptativa, uma vez que promove diretamente a expansão das células Treg e inibe a geração e função das células T efetoras, T CD8+ e TCD4+ tipo 1 (Th 1), e células dendríticas apresentadoras de antígeno. Além disso, também possui ações de controle no sistema imunológico inato inibindo células NK, regulando a polarização de macrófagos para um fenótipo pró-tumoral M2 e regula a ação de neutrófilos, formando uma rede regulatória imunológica negativa (Battle et al 2019).

A expressão de TGF- β 1 está correlacionada com a atividade oncogênica desta citocina. Panis et al. (2013) demonstraram a ocorrência de níveis diminuídos desta citocina em pacientes portadoras do subtipo tumoral triplo negativo, bem como naquelas portadoras de doença metastática submetidas à quimioterapia. Níveis elevados foram descritos em pacientes com doença

precoce e idade abaixo de 45 anos, e baixos níveis circulantes desta citocina sinalizaram uma possível sobrevida global reduzida quando comparados àqueles que apresentavam níveis mais elevados.

Alterações na sinalização de TGF- β 1 afetam uma variedade de aspectos do desenvolvimento e progressão do câncer de mama. Em estágios iniciais da doença, esta citocina inibe a progressão do ciclo celular epitelial e promover apoptose, apresentando efeitos supressores de tumor. Porém, em estágios mais avançados, TGF- β 1 está relacionado com a progressão do tumor, motilidade celular, capacidade de invasão do câncer e metástase (Zarzyńska 2014).

Recentemente, foi demonstrado que a transição epitelial-mesenquimal (EMT) induzida por TGF- β 1 promove a migração de células tumorais em direção às células endoteliais linfáticas por meio da ativação de CCR7 (Pang et al. 2016). de Kruijff et al. (2013), demonstraram que a combinação de biomarcadores de TGF- β 1, como T β RI, T β RII, p-Smad2 e Smad4, fornece informações prognósticas sobre pacientes com câncer de mama, podendo identificar pacientes com risco aumentado de recorrência da doença que, portanto, podem ser candidatos a tratamento adicional.

Outra molécula importante neste contexto de imunossupressão é a proteína CTLA-4. Consiste em um regulador de ponto de verificação imunológico ou checkpoint imunológico da ativação das células T, aumentando a auto-tolerância e prevenindo doenças autoimunes e reações exacerbadas (Pardoll 2012). Apesar de ser relatado predominantemente em células T citotóxicas e Tregs, também foi descrito em um repertório diversificado de células nas linhagens linfóide e mieloide, bem como na superfície de tumores (Oyewole-Said et al. 2020). Apesar do papel imunossupressor do CTLA-4 ser mais claro nos cânceres hematológicos, no câncer de mama, já se correlacionou sua expressão com mau prognóstico (Yu et al. 2015; Chen et al. 2017). Apesar da falta de estudos padronizados no câncer de mama, a literatura relata algumas associações entre a expressão de CTLA-4 no microambiente tumoral e piores resultados independentemente de seu subtipo molecular (Kern e Panis. 2021).

Assim, pouco se sabe sobre a influência dos pesticidas sobre a expressão das moléculas supracitadas. Embora o papel de mediadores redox e do sistema imune em tumores de mama seja explorado há algum tempo, a caracterização de seus níveis circulantes na estratificação de risco de pacientes com a doença

e expostas á pesticidas não é reportado. Assim, espera-se fornecer uma visão global sobre o impacto da exposição crônica e continuada aos pesticidas sobre os níveis circulantes de mediadores redox e citocinas, bem como componentes do microambiente tumoral, e os principais fatores já associados ao prognóstico da doença, para compreender a interação destes de acordo com a estratificação de risco das pacientes com câncer de mama de risco intermediário, de modo a prover dados que auxiliem na estratificação correta destas pacientes e otimização do seu tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Analisar o impacto da exposição aos pesticidas na estratificação de risco de óbito e recidiva intermediária de mulheres portadoras de câncer de mama, e investigar sua influência no perfil de mediadores inflamatórios e redox tumorais e sistêmicos.

2.2 Específicos

- Levantar dados clinicopatológicos, de estratificação de risco e de exposição ocupacional aos pesticidas de pacientes diagnosticadas com câncer de mama atendidas no Hospital do Câncer de Francisco Beltrão (Ceonc) no período de 2015 à 2021;
- Analisar o perfil de mediadores inflamatórios (IL-12, IL-4, IL-17A, TNF- α) e redox (perfil de hidroperóxidos, capacidade antioxidante total plasmática, níveis dos metabólitos do óxido nítrico) em amostras de sangue periférico das pacientes com câncer de mama dos grupos de risco intermediário expostas ou não ocupacionalmente aos pesticidas;
- Investigar a expressão de marcadores inflamatórios e checkpoint imunológico no tecidos tumoral por imunofluorescência (fator transformador de crescimento beta 1 - TGF- β 1, NO sintase induzível – iNOS e proteína T-linfócito-associada citotóxico 4 - CTLA-4) em biópsias de pacientes com câncer de mama dos grupos de risco

intermediário expostas ou não ocupacionalmente aos pesticidas.

- Realizar estudo estatístico para identificar o impacto da exposição aos pesticidas na estratificação de risco destas mulheres, bem como comparar se há diferença entre os perfis de mediadores moleculares entre os grupos de pacientes expostas e não expostas aos pesticidas.

3. METODOLOGIA

3.1 Aspectos legais

O presente trabalho é um estudo retrospectivo e prospectivo, com coleta de dados primários de mulheres atendidas no Hospital do Câncer de Francisco Beltrão – PR, entre os anos de 2015 e 2021. Durante este período foram triadas 664 pacientes, e 342 receberam o diagnóstico de câncer de mama. Deste total, 130 mulheres foram estratificadas como risco intermediário de recidiva e foram incluídas neste estudo.

Esta proposta encontra-se aprovada no Comitê de ética Institucional sob o número CAAE 35524814.4.0000.0107, parecer número 810.501. Foram consideradas apenas as pacientes que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). (Anexos I e II).

3.2 Desenho do estudo

Para a estratificação de risco das pacientes (Tabela 1), foi realizada coleta de dados referentes ao comportamento intrínseco do tumor presentes nos laudos histopatológicos das biópsias e nos prontuários médicos. Foram avaliadas as seguintes informações: expressão de receptores hormonais (receptor de estrogênio e progesterona), amplificação de HER2, grau histológico, presença de metástases em linfonodos axilares, tamanho do tumor, subtipo molecular do câncer de mama, idade ao diagnóstico, índice de massa corpóreo, status menopausal, ocorrência de recidiva, sítios de metástase e perfil de sobrevida. Para obtenção do perfil de exposição ocupacional aos pesticidas as pacientes foram entrevistadas.

Tabela1. Estratificação de risco de óbito e recidiva de pacientes diagnosticadas com câncer de mama segundo a Portaria Conjunta N°4 do Ministério da Saúde (Goldhirsch et al., 2007)

Baixo risco	<p>Linfonodos negativos e todos os seguintes critérios: pT até 2 cm; Grau 1; RE ou RP positivos; HER-2 negativo; Subtipo molecular luminal A; e Idade igual ou acima de 35 anos.</p>
Risco Intermediário	<p>Linfonodos negativos e pelo menos um dos seguintes critérios: pT maior que 2 cm; Grau 2 -3; RE ou RP negativos; Subtipo molecular luminal B (HER-2 negativo); Idade abaixo de 35 anos; ou 1 a 3 linfonodos positivos se RH positivo.</p>
Alto risco	<p>4 ou mais linfonodos positivos; ou Linfonodos negativos com RE, RP e HER-2 negativos, pT maior que 2 cm; ou Linfonodo negativo, pT maior que 1 cm e HER-2 positivo.</p>

pT: Tamanho tumoral; RE: Receptor de estrógeno; RP: Receptor de progesterona; HER-2: receptor de crescimento epidérmico humano 2.

Com base na estratificação de risco e nos dados de exposição aos pesticidas foram incluídas 130 pacientes, as quais foram categorizadas nos seguintes grupos (Figura 2): pacientes de risco intermediário expostas ocupacionalmente aos pesticidas (n = 77) e pacientes de risco intermediário não expostas ao pesticidas (n = 53),

O grupo de validação foi composto por pacientes de um banco de biópsias

da mesma coorte, e foi selecionado de modo aleatório por sorteio (n = 20 para cada marcador avaliado). Durante o estudo estatístico dos perfis das pacientes, foram adicionados, para fins de comparação, 93 pacientes do grupo de alto risco.

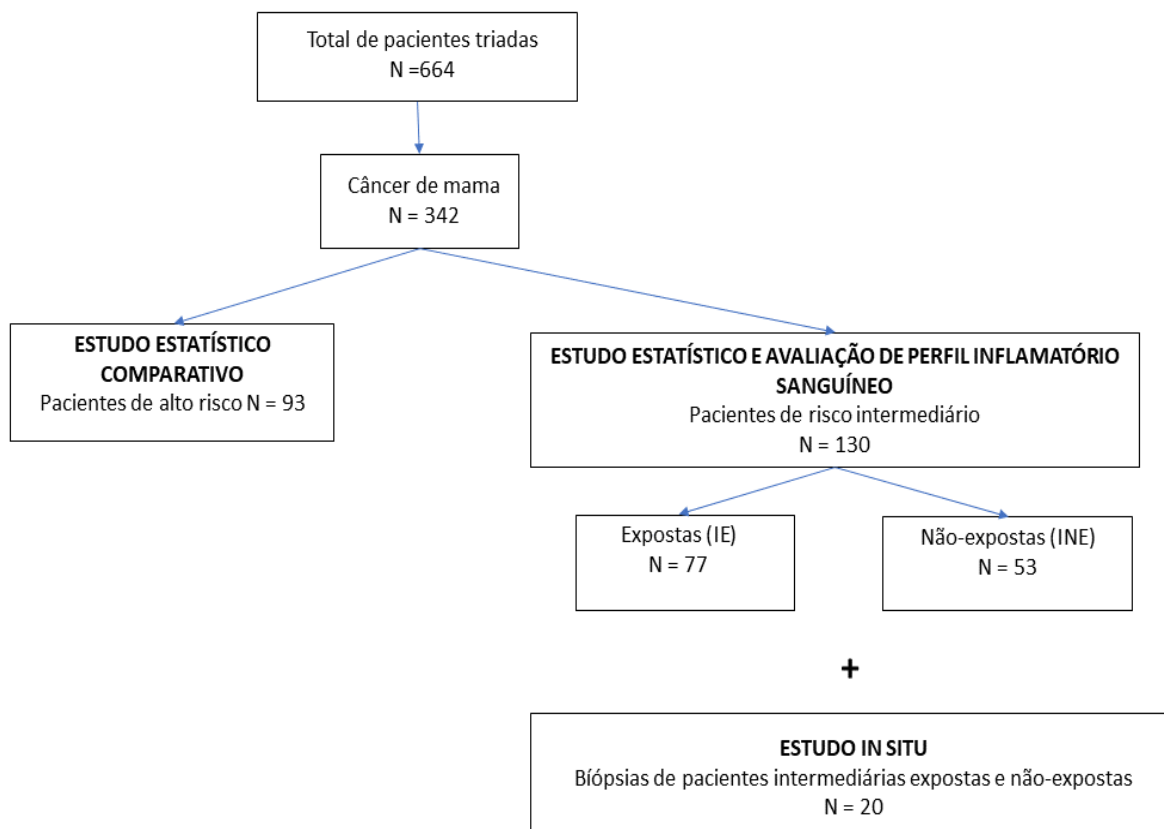


Figura 2- Desenho do estudo.

3.3 Coleta das amostras de plasma e obtenção do perfil inflamatório sistêmico

Para a obtenção do plasma, amostras de sangue heparinizado foram centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm com posterior armazenamento a -20° C, até o momento das análises.

A determinação dos níveis plasmáticos de hidroperóxidos foi realizada através de quimiluminescência de alta sensibilidade (QL), adaptado de Flecha

et al. (1991) e Panis et al. (2012), através de reação mediada por tert-butil. Alíquotas de 125 µL de plasma foram adicionadas a 855 µL de tampão fosfato monobásico (10 mM, pH 7,4). A reação foi iniciada pela adição de 20 µL de solução de tert-butil (3 mM) e monitorada em luminômetro Glomax 20/20 (Promega, USA), para avaliação do perfil de emissão de fótons. Os resultados obtidos pela integral da curva de emissão foram expressos em unidades relativas de luz (RLU).

A capacidade antioxidante total do plasma (TRAP) foi analisada por quimioluminescência de alta sensibilidade em luminômetro Glomax 20/20 (Promega, USA). Este método, descrito por Repetto et al. (1996), detecta os antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis na amostra. O meio de reação consistiu em 20 mM de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (ABAP) e 40 µM de luminol. O ABAP é uma fonte de radicais livres que degrada em temperaturas acima de 28°C e reage com o luminol presente no meio, produzindo fótons detectados por quimioluminescência. A adição de plasma diluído inibe a reação de degradação do ABAP por um período (tempo de indução) e é diretamente proporcional à concentração plasmática de antioxidantes (TRAP). Os resultados obtidos são comparados com uma curva padrão utilizando-se um análogo da vitamina E, o Trolox. Os resultados foram expressos em µM de Trolox.

O índice de oxidação foi obtido a partir da razão entre os níveis plasmáticos de hidroperóxidos e o TRAP, e expresso em unidades arbitrárias.

Para a mensuração dos níveis dos metabólitos do óxido nítrico (NOx), foi utilizado o método de conversão de nitrato a nitrito, pela reação de cádmio-cobre e detecção de nitrito total pelo método de Griess conforme descrito por Panis et al. 2012. Para desproteinização, alíquotas de 60 µL de plasma foram adicionados de 50 µL de sulfato de zinco (ZnSO₄, 75 mM), centrifugados a 10.000 rpm por 2 minutos, e em seguida misturados com 70 µL de hidróxido de sódio (NaOH 100 mM), com nova etapa de centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi recuperado, e adicionou-se 50 µL de tampão glicina-NaOH 45g/L pH 9,7. Os grânulos de cádmio, utilizados para a reação de conversão de nitrato à nitrito, foram ativados em solução de sulfato de cobre 5mM, por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas com os grânulos ativados por 10 minutos. Após adição de 50 µL de amostra em microplaca de 96 poços, adicionou-se 50 µL de reagente de Griess (Sulfanilamida 0,4 g em 20 mL de

ácido fosfórico 5% - protegido de luz; e naftiletildietilamida - NEED: 40 mg em 20 mL de H₂O destilada. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, a medida da absorbância a 550 nm foi realizada em leitora de microplacas (Polaris, Brasil) e os resultados expressos em µM de nitrito com base em uma curva padrão.

Para quantificar os níveis plasmáticos das citocinas IL-12, IL-4, IL-17A e TNF-α, utilizou-se o método de enzimaímmunoensaio (ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay) através de kit comercial (e-Biosciences, USA). Alíquotas de plasma foram incubadas em placa contendo anticorpo de captura específico para cada citocina, seguidas de sucessivas lavagens e incubação com anticorpo secundário marcado com estreptavidina. Para detecção da reação, foi adicionado substrato específico e a placa lida a 642 nm. Os resultados foram calculados em pg/mL a partir de dados de uma curva padrão para cada citocina. O limite de detecção do kit é de 2 pg/mL.

3.4 Avaliação da expressão tumoral de iNOS, TGF-β1 e CTLA-4 por imunofluorescência

Para as análises dos marcadores teciduais CTLA-4, iNOS e TGF-β1 por imunofluorescência, foram obtidos cortes de 3 µm de espessura utilizando-se micrótomo Leica RM 2045 (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha), dispostos em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxisilano. As lâminas foram mantidas por 24 horas em estufa a 65°. Posteriormente, realizou-se banho de desparafinização química, por 5 minutos em solução de xileno, etanol e água, consecutivamente. A recuperação antigênica foi realizada apenas para o CTLA-4, em calor úmido com imersão das lâminas em tampão citrato de sódio 1mM e pH 6.0, durante 15 minutos a 100° C. Os demais marcadores não necessitaram de recuperação antigênica por apresentarem excelente imunomarcção sem o uso deste processo. Todas as lâminas foram incubadas em solução de peróxido de hidrogênio 3% por 15 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Lavagens dos cortes foram realizadas entre cada etapa com solução salina (cloreto de sódio – NaCl 150mM e pH 7,6) e tween 20 1%. Também foi realizado o bloqueio de sítios de ligação inespecíficos com solução de leite em pó 5%, por

15 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário específico para cada citocina (eBiosciences, BD Biosciences, Thermo Fischer Scientific), nas diluições 1:300 (TGF- β 1), 1:500 (iNOS) e 1:1000 (CTLA-4), em câmara úmida fechada, conforme especificado na Tabela 2. Após, as lâminas foram lavadas e incubadas por 1 hora com anticorpo secundário (Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG, Thermo Fisher Scientific) 1:1000. Para marcação nuclear, os cortes foram tratados com 4,6 diamidinofenilindol (DAPI) (Sigma Aldrich), solução 5 mg/mL, por 30 minutos e montagem em glicerol.

Para observação das lâminas e registro de imagens, foi utilizado microscópio de fluorescência Motic BA410E, contendo câmera MOTICAM ProS5 Plus e software de aquisição e processamento de imagem Motic Images Plus 3.0ML.

A leitura das lâminas foi realizada utilizando-se filtro de excitação DAPI em aumento de 20X. Para digitalização das imagens, foram predefinidos os seguintes ajustes: exposição auto, ganho + 20 e offset zero. As imagens obtidas foram armazenadas em formato BMP, resolução 2048 x 1536 pixels.

As marcações positivas foram classificadas considerando a expressão dos marcadores em tecido tumoral, e em infiltrado imunológico, expressos na coloração verde.

Tabela 2. Condições das reações de imunofluorescência e especificações dos anticorpos.

Anticorpo	Clone	Reatividade	Titulação	Incubação
Anti-iNOS	Monoclonal antibody	mouse anti-human	1:500	2 horas, escuro, câmara úmida, temperatura ambiente
Alexa Fluor 488	Superclonal Recombinant Secondary Antibody	goat anti-mouse IgG	1:500	1 hora, escuro, câmara úmida, temperatura ambiente
Anti-TGF- β	Monoclonal antibody	mouse anti-human	1:300	2 horas, escuro, câmara úmida, temperatura ambiente
Alexa Fluor 488	Superclonal Recombinant Secondary Antibody	goat anti-mouse IgG	1:500	1 hora, escuro, câmara úmida, temperatura ambiente

Anti-CTLA-4	BNI3 monoclonal antibody	mouse anti-human CD152	1:1000	<i>overnight</i> , escuro, câmara úmida, 4°C
Alexa Fluor 488	Superclonal Recombinant Secondary Antibody	goat anti-mouse IgG	1:1000	1 hora, escuro, câmara úmida, temperatura ambiente

3.5 Análises estatísticas

O estudo estatístico teve como objetivo avaliar se existem diferenças entre o perfil de risco de óbito de recidiva entre pacientes expostas e não-expostas ocupacionalmente aos agrotóxicos. Também investigou-se se existe similaridade entre o grupo intermediário exposto com pacientes de perfil de alto risco de recidiva e óbito. Ainda, foram comparados os perfis dos marcadores avaliados entre os grupos de pacientes intermediárias expostas e não expostas.

O estudo contemplou as seguintes variáveis qualitativas: idade ao diagnóstico, menopausa ao diagnóstico, índice de massa corpóreo (IMC), expressão de receptor de estrogênio, expressão de receptor de progesterona, expressão de HER-2, índice de proliferação ki67, subtipo molecular do tumor, tamanho tumoral, grau histológico, e presença de metástase em linfonodos.

As pacientes foram subdivididas em 2 grupos de acordo com a estratificação de risco e com a exposição aos pesticidas: intermediário exposto (IE) e intermediário não exposto (INE).

Para cada variável foi realizado o teste de Qui-quadrado para independência para analisar a associação entre as categorias e os grupos. Em situações de ferimento do pressuposto de frequência mínima esperada igual a 5, foi utilizado como teste de associação o método de Monte Carlo, com 5% de significância. O objetivo desse teste é o mesmo que o do Qui-quadrado para independência, entretanto é estatisticamente mais robusto quando os pressupostos não são verificados.

Na sequência, as variáveis foram analisadas por meio da Análise de Componentes Principais (ACP). Na ACP são estabelecidas as cargas fatoriais, as quais são definidas como as correlações de cada variável com a composição do fator, sendo o fator uma nova variável estatística definida pelo conjunto das

cargas fatoriais. As cargas fatoriais resultantes dos componentes principais foram avaliadas quanto sua significância por meio de Análise da Variância Fator Único. As células marcadas como “NA” foram consideradas na ACP como células vazias e não como outra categoria.

Por fim, foi construído o dendrograma no qual as variáveis qualitativas, incluindo exposição aos pesticidas e estratificação de risco, foram agrupadas por dissimilaridade, gerando três novos grupos. Nesta etapa, para comparação dos perfis, foi adicionado um grupo de pacientes de alto risco.

As análises foram realizadas nos programas XLStat Versão 2017 (Addinsoft, 2017) e R (R Development Core Team, 2021).

Em relação às análises laboratoriais, a distribuição dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. Assim, as variáveis com distribuição normal foram analisadas com testes paramétricos. Quando a suposição de normalidade não foi atendida, testes não paramétricos foram usados. Para comparar os dados entre os grupos IE e INE, o teste t de Student ou o teste de Mann-Whitney foram usados na comparação de dois grupos. Os resultados foram analisados no programa GraphPad Prism versão 7.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, EUA).

4. REFERÊNCIAS

1. Adams S, Gray RJ, Demaria S, et al (2014) Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancers From Two Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J Clin Oncol* 32:2959–2966. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.55.0491>.
2. Alavanja MCR, Bonner MR (2012) Occupational Pesticide Exposures and Cancer Risk: A Review. *J Toxicol Environ Heal Part B* 15:238–263. <https://doi.org/10.1080/10937404.2012.632358>.
3. Arora H, Panara K, Kuchakulla M, et al (2018) Alterations of tumor microenvironment by nitric oxide impedes castration-resistant prostate cancer growth. *Proc Natl Acad Sci* 115:11298–11303. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812704115>.
4. Bankaitis KV, Fingleton B (2015) Targeting IL4/IL4R for the treatment of epithelial cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* 32:847–856. <https://doi.org/10.1007/s10585-015-9747-9>.
5. Barrera G, Cucci MA, Grattarola M, et al (2021) Control of Oxidative Stress in Cancer Chemoresistance: Spotlight on Nrf2 Role. *Antioxidants* 10:510. <https://doi.org/10.3390/antiox10040510>.
6. Batlle E, Massagué J (2019) Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* 50:924–940. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024>.
7. Cardona B, Rudel RA (2021) Application of an in Vitro Assay to Identify Chemicals That Increase Estradiol and Progesterone Synthesis and Are Potential Breast Cancer Risk Factors. *Environ Health Perspect* 129:077003. <https://doi.org/10.1289/EHP8608>.
8. Chen X, Shao Q, Hao S, et al (2017) CTLA-4 positive breast cancer cells suppress dendritic cells maturation and function. *Oncotarget* 8:13703–13715. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14626>.
9. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, et al (2015) IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* 522:345–348. <https://doi.org/10.1038/nature14282>.
10. Croxford AL, Kulig P, Becher B (2014) IL-12-and IL-23 in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 25:415–421. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.017>.
11. Cruceiru D, Baldasici O, Balacescu O, Berindan-Neagoe I (2020) The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cell Oncol* 43:1–18. <https://doi.org/10.1007/s13402-019-00489-1>.
12. de Kruijf EM, Dekker TJA, Hawinkels LJAC, et al (2013) The prognostic role of TGF- β signaling pathway in breast cancer patients. *Ann Oncol* 24:384–390. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds333>.

13. de la Cruz-Merino L, Barco-Sánchez A, Henao Carrasco F, et al (2013) New Insights into the Role of the Immune Microenvironment in Breast Carcinoma. *Clin Dev Immunol* 2013:1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/785317>.
14. de Mascarel I, Debled M, Brouste V, et al (2015) Comprehensive prognostic analysis in breast cancer integrating clinical, tumoral, micro-environmental and immunohistochemical criteria. *Springerplus* 4:528. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1297-8>.
15. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>.
16. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22:329–360. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>.
17. El-Zaemey S, Heyworth J, Fritschi L (2013) Noticing pesticide spray drift from agricultural pesticide application areas and breast cancer: a case-control study. *Aust N Z J Public Health* 37:547–555. <https://doi.org/10.1111/1753-6405.12111>.
18. Engel LS, Werder E, Satagopan J, et al (2017) Insecticide Use and Breast Cancer Risk among Farmers' Wives in the Agricultural Health Study. *Environ Health Perspect* 125:097002. <https://doi.org/10.1289/EHP1295>.
19. Fasoulakis Z, Kolios G, Papamanolis V, Kontomanolis EN (2018) Interleukins Associated with Breast Cancer. *Cureus* 10:1–11. <https://doi.org/10.7759/cureus.3549>.
20. Ferro R, Parvathaneni A, Patel S, Cheriya P (2012) Pesticides and Breast Cancer. *Adv Breast Cancer Res* 01:30–35. <https://doi.org/10.4236/abcr.2012.13005>.
21. GABOARDI SC (2021) O uso de agrotóxicos no sudoeste do paraná a partir de uma perspectiva geográfica multiescalar. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
22. Gaggianesi M, Turdo A, Chinnici A, et al (2017) IL4 Primes the Dynamics of Breast Cancer Progression via DUSP4 Inhibition. *Cancer Res* 77:3268–3279. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-3126>.
23. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al (2011) Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 22:1736–1747. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr304>.
24. Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A (1991) Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 10:93–100. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90002-K](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90002-K).

25. González R, Molina-Ruiz FJ, Bárcena JA, et al (2018) Regulation of Cell Survival, Apoptosis, and Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Nitric Oxide-Dependent Post-Translational Modifications. *Antioxid Redox Signal* 29:1312–1332. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7072>.
26. Halliwell B & Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University, 2015.
27. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144:646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
28. He TT, Zuo AJ, Wang JG, Zhao P (2017) Organochlorine pesticides accumulation and breast cancer: A hospital-based case-control study. *Tumor Biol* 39:. <https://doi.org/10.1177/1010428317699114>.
29. Instituto Nacional de Câncer Estimativa 2020. <https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>.
30. Kartikasari AER, Huertas CS, Mitchell A, Plebanski M (2021) Tumor-Induced Inflammatory Cytokines and the Emerging Diagnostic Devices for Cancer Detection and Prognosis. *Front Oncol* 11:1–16. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.692142>.
31. Kawaguchi K, Sakurai M, Yamamoto Y, et al (2019) Alteration of specific cytokine expression patterns in patients with breast cancer. *Sci Rep* 9:2924. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39476-9>.
32. Kawassaki BCA (2019) Exposição aos agrotóxicos e níveis plasmáticos de cortisol, citocinas e perfil redox em pacientes com câncer de mama. Universidade Estadual de Londrina.
33. Kern R, Correa SC, Scandolara TB, et al (2020) Current advances in the diagnosis and personalized treatment of breast cancer: lessons from tumor biology. *Per Med* 17:399–420. <https://doi.org/10.2217/pme-2020-0070>.
34. Kern R, Panis C (2021) CTLA-4 Expression and Its Clinical Significance in Breast Cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 69:16. <https://doi.org/10.1007/s00005-021-00618-5>.
35. Kim K-H, Kabir E, Jahan SA (2017) Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci Total Environ* 575:525–535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>.
36. Korde Choudhari S, Chaudhary M, Bagde S, et al (2013) Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol* 11:118. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-118>.
37. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG (2011) Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 711:193–201. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.12.016>.
38. Lasek W, Zagożdżon R, Jakobisiak M (2014) Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunol*

- Immunother 63:419–435. <https://doi.org/10.1007/s00262-014-1523-1>.
39. Lee JD, Cai Q, Shu XO, Nechuta SJ (2017) The Role of Biomarkers of Oxidative Stress in Breast Cancer Risk and Prognosis: A Systematic Review of the Epidemiologic Literature. *J Women's Heal* 26:467–482. <https://doi.org/10.1089/jwh.2016.5973>.
 40. Li W, Deng Y, Wu Q, et al (2021) Effects of clinicopathological factors on prognosis of young patients with resected breast cancer. *Medicine (Baltimore)* 100:e23693. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000023693>.
 41. Loi S, Michiels S, Salgado R, et al (2014) Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol* 25:1544–1550. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu112>.
 42. Loi S, Sirtaine N, Piette F, et al (2013) Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Phase III Randomized Adjuvant Breast Cancer Trial in Node-Positive Breast Cancer Comparing the Addition of Docetaxel to Doxorubicin With Doxorubicin-Based Chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol* 31:860–867. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.0902>.
 43. Ma Y-F, Chen C, Li D, et al (2017) Targeting of interleukin (IL)-17A inhibits PDL1 expression in tumor cells and induces anticancer immunity in an estrogen receptor-negative murine model of breast cancer. *Oncotarget* 8:7614–7624. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13819>.
 44. Marengo B, Nitti M, Furfaro AL, et al (2016) Redox Homeostasis and Cellular Antioxidant Systems: Crucial Players in Cancer Growth and Therapy. *Oxid Med Cell Longev* 2016:1–16. <https://doi.org/10.1155/2016/6235641>.
 45. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, et al (2011) Pivotal Role of Innate and Adaptive Immunity in Anthracycline Chemotherapy of Established Tumors. *Cancer Res* 71:4809–4820. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0753>.
 46. Mekonen S, Ibrahim M, Astatkie H, Abreha A (2021) Exposure to organochlorine pesticides as a predictor to breast cancer: A case-control study among Ethiopian women. *PLoS One* 16:e0257704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257704>.
 47. Mercogliano MF, Bruni S, Elizalde P V., Schillaci R (2020) Tumor Necrosis Factor α Blockade: An Opportunity to Tackle Breast Cancer. *Front Oncol* 10:. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00584>.
 48. Mercogliano MF, Bruni S, Mauro F, et al (2021) Harnessing Tumor Necrosis Factor Alpha to Achieve Effective Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 13:564. <https://doi.org/10.3390/cancers13030564>.
 49. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ (2014) New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol* 27:16–25.

<https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>.

50. Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J (1998) Semiautomated Measurement of Nitrate in Biological Fluids. *Clin Chem* 44:679–681. <https://doi.org/10.1093/clinchem/44.3.679>.
51. Oyewole-Said D, Konduri V, Vazquez-Perez J, et al (2020) Beyond T-Cells: Functional Characterization of CTLA-4 Expression in Immune and Non-Immune Cell Types. *Front Immunol* 11:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.608024>.
52. Pang M-F, Georgoudaki A-M, Lambut L, et al (2016) TGF- β 1-induced EMT promotes targeted migration of breast cancer cells through the lymphatic system by the activation of CCR7/CCL21-mediated chemotaxis. *Oncogene* 35:748–760. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.133>.
53. Panis C, Herrera AC, Victorino VJ, et al (2013) Screening of circulating TGF- β levels and its clinicopathological significance in human breast cancer. *Anticancer Res* 33:737–742.
54. Panis C, Herrera ACSA, Victorino VJ, et al (2012) Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 133:89–97. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1693-x>.
55. Panis C, Victorino VJ, Herrera ACSA, et al (2016) Can Breast Tumors Affect the Oxidative Status of the Surrounding Environment? A Comparative Analysis among Cancerous Breast, Mammary Adjacent Tissue, and Plasma. *Oxid Med Cell Longev* 2016:1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/6429812>.
56. Pardoll DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12:252–264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>.
57. Pertile E, Matias MI, Ribeiro Z da S, et al (2018) Evidências experimentais e epidemiológicas entre exposição aos agrotóxicos e o desenvolvimento de câncer de mama. *Rev Bras Pesqui em Saúde/Brazilian J Heal Res* 20:137–146. <https://doi.org/10.21722/rbps.v20i1.20618>.
58. Pizzatti L, Kawassaki ACB, Fadel B, et al (2020) Toxicoproteomics Disclose Pesticides as Downregulators of TNF- α , IL-1 β and Estrogen Receptor Pathways in Breast Cancer Women Chronically Exposed. *Front Oncol* 10:1–11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01698>.
59. Prochazkova J, Pokorna K, Holan V (2012) IL-12 inhibits the TGF- β -dependent T cell developmental programs and skews the TGF- β -induced differentiation into a Th1-like direction. *Immunobiology* 217:74–82. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.032>.
60. Rech D (2018) Perfil do câncer de mama em mulheres do sudoeste do paraná : identificação de possíveis fatores de risco regionais e correlação clínico-patológica paraná : identificação de possíveis fatores de risco

regionais e correlação clínico-patológica. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

61. Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, et al (1996) Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 255:107–117. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(96\)06394-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(96)06394-2).
62. Rotblat B, Melino G, Knight RA (2012) NRF2 and p53: Januses in cancer? *Oncotarget* 3:1272–1283. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.754>.
63. Ruffell B, Au A, Rugo HS, et al (2012) Leukocyte composition of human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci* 109:2796–2801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104303108>.
64. SAÚDE MDS (2018) Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Carcinoma de Mama.
65. SBOC (2011) Manual de Condutas 2011. *Rev da Soc Bras Oncol Clínica* 589.
66. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011) Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science (80-)* 331:1565–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>.
67. Shuai C, Yang X, Pan H, Han W (2020) Estrogen Receptor Downregulates Expression of PD-1/PD-L1 and Infiltration of CD8+ T Cells by Inhibiting IL-17 Signaling Transduction in Breast Cancer. *Front Oncol* 10:1–15. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.582863>.
68. Soni Y, Softness K, Arora H, Ramasamy R (2020) The Yin Yang Role of Nitric Oxide in Prostate Cancer. *Am J Mens Health* 14:155798832090319. <https://doi.org/10.1177/1557988320903191>.
69. Sparano JA, Gray RJ, Ravdin PM, et al (2019) Clinical and Genomic Risk to Guide the Use of Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *N Engl J Med* 380:2395–2405. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1904819>.
70. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71:209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
71. Teixeira GT (2020) Perfil clinicopatológico do câncer de mama em mulheres ocupacionalmente expostas aos agrotóxicos na região do sudoeste do paraná. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
72. Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, et al (2015) New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ* 22:237–246. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.134>.
73. Vannini F, Kashfi K, Nath N (2015) The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol* 6:334–343. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.009>.
74. Venmar KT, Fingleton B (2014) Lessons from immunology: IL4R directly promotes mammary tumor metastasis. *Oncoimmunology* 3:e955373.

<https://doi.org/10.4161/21624011.2014.955373>.

75. Waks AG, Winer EP (2019) Breast Cancer Treatment. *JAMA* 321:288. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>.
76. Weinberg RA. *A biologia do Câncer*. Porto Alegre: Artmed, 2008.
77. Welte T, Zhang XHF (2015) Interleukin-17 Could Promote Breast Cancer Progression at Several Stages of the Disease. *Mediators Inflamm* 2015:1–6. <https://doi.org/10.1155/2015/804347>.
78. WHO - World Health Organization (2017) Some organophosphate insecticides and herbicides. *IARC Monographs Volume 112*.
79. Yu H, Yang J, Jiao S, et al (2015) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 expression in human breast cancer: implications for prognosis. *Cancer Immunol Immunother* 64:853–860. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1696-2>.
80. Zarzynska JM (2014) Two Faces of TGF-Beta1 in Breast Cancer. *Mediators Inflamm* 2014:1–16. <https://doi.org/10.1155/2014/141747>.

5. ARTIGO CIENTÍFICO 1

Occupational Exposure to Pesticides Affects Pivotal Immunologic Anti-Tumor Responses in Breast Cancer Women from the Intermediate Risk of Recurrence and Death.

Abstract

Background: Breast cancer risk stratification is a strategy based on clinical parameters to predict disease recurrence or death. Based on this, patients can be categorized as low, intermediate, or high risk. Both low and high risk are based on well-defined clinical parameters, while intermediate risk is dependent on more malleable parameters. It means high possibility for suboptimal treatment of this group, leading to disease recurrence, or systemic damage due to drug overload toxicity. Therefore, identifying new factors that help to better characterize the intermediate risk stratification, as environmental exposures, is necessary. **Methods:** To reach this goal, we evaluated the impact of occupational exposure to pesticides on molecular features from intermediate risk patients (n = 130). Cytokines (IL-12, IL-4, IL-17A and TNF- α) and oxidative stress profiles (hydroperoxides, total antioxidants and nitric oxide metabolites) were measured in plasma samples, and TGF- β 1 and CTLA-4 expression investigated in tumors. **Results:** Occupational exposure to pesticides decreased the systemic levels of IL-12, and significantly changed the tissue expression of TGF- β 1 and CTLA-4 in the immune infiltrate. High expression of CTLA-4 was also observed in tumor samples from intermediate overweight or obese patients occupationally exposed that had at least one metastatic lymph node at the moment of diagnosis, reinforcing these findings meaning in worse prognosis. **Conclusion:** These findings indicate that occupational exposure to pesticides change the molecular behavior of disease and should be considered as a parameter for intermediate risk stratification assessment in breast cancer patients.

Keywords: Breast cancer, risk stratification; cytokine, oxidative stress; inflammation, pesticide exposure.

1. Introduction

Breast cancer is the leading cause of death in women worldwide [1]. It is a heterogeneous disease with distinct clinical outcomes depending on patient characteristics and tumor biology.

Due to its complexity, several approaches guide clinicians in decision-making. In this context, the risk stratification of disease recurrence and death is a helpful strategy based on clinical parameters defined by international guidelines, used to guide therapeutic decisions and predict clinical outcomes, such as response to treatment and survival [2–4].

Although the stratification of low- and high-risk patients lies on well-defined parameters, those from the intermediate-risk represent a challenge, as they present more conditionals to categorize patients than in the other sets. This group represents the most significant frustration for clinicians since they cannot accurately differentiate patients who have a micro-metastatic disease and need treatment from those who are cured with local treatment [5]. Therefore, it is clear that other parameters than those customarily used to categorize them need to be included.

Several parameters pose as potential candidates that could help to strengthen the current risk stratification. Pesticide exposure depicts an embracing environmental risk factor that could be enclosed in the risk stratification of breast cancer patients in areas of severe agrochemical exposure such as Brazil.

Studies demonstrate that pesticides can modify breast cancer biology by genotoxic effects [6], chromosomal damage [7], inflammation triggering [8], and the induction of oxidative stress [9], all closely linked to tumor development, genomic instability and disease progression [10, 11].

Pesticide exposure deregulate the inflammatory and immunological axis in occupationally exposed patients diagnosed with breast cancer, including systemic depletion of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β), both pivotal antitumor cytokines [12]. Inflammation is a hallmark of cancer [13], and its deregulation by pesticides may bring relevant consequences to tumor progress. Cytokines can act in a dual way, inhibiting tumor development or contributing to the chronic inflammation that supports tumor growth, which have been associated with poor prognosis in cancer patients [14]. Although associations between the risk of breast cancer and the occupational exposure to pesticides [14–16] and its induced endocrine disruption and carcinogenesis

[14–18], few is known about its impact on the risk stratification of patients and their tumor biology.

Therefore, the present study investigates whether occupational exposure to pesticides in women with breast cancer may affect tumor biology in patients classified as intermediate risk. For this purpose, we investigated the systemic inflammatory profile by analyzing the levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin 4 (IL-4), interleukin 17A (IL-17A) and interleukin 12 (IL-12), as well as oxidative stress markers and tumor expression of cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) and transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1). Also, we correlated these findings with clinicopathological features from patients.

2. Materials and methods

2.1 Study design

Primary data collection of women treated at the Cancer Hospital of Francisco Beltrão – Paraná, Brazil (CEONC), was carried out between May 2015 and August 2021. A total of 664 patients were screened during this period, and 342 were diagnosed with breast cancer.

The Institutional Ethics Committee has approved this proposal under the number CAAE 35524814.4.0000.0107. Only patients who signed an informed consent term were considered.

The risk stratification of disease recurrence and death was performed according to the following information collected from the medical records: estrogen receptor expression (ER), progesterone receptors expression (PR), human epidermal growth factor 2 receptors amplification (HER2), ki67 index expression, histological tumor grade, presence of lymph node metastases, tumor size, the molecular subtype of breast cancer, age at diagnosis, and body mass index. Patients' pesticide occupational exposure profile was obtained based on a systematized instrument containing questions about their working routine, such as time of exposure in years, type of exposure, amount, and chemical classes of pesticides, among others [19].

Thus, based on the combined risk stratification and pesticide exposure data, 130 women were eligible for this study and stratified as intermediate-risk patients occupationally exposed to pesticides (IE, $n = 77$) and intermediate-risk patients not exposed to pesticides

(INE, n = 53). Clinicopathological data from each group is shown in Table 1.

2.2 Sample obtention and determination of the systemic inflammatory profile

Heparinized blood samples (5 to 10 mL) were centrifuged for 5 minutes at 4000 rpm, and the plasma obtained was stored at -20° C until the time of analysis.

The pro-oxidative profile was determined by measuring the plasmatic hydroperoxides levels, performed by using high sensitivity chemiluminescence (CL) as previously described [20]. Aliquots of 125µl of plasma were added to 855µL of monobasic phosphate buffer (10mM, pH 7.4). The reaction was initiated by adding 20 µL of tert-butyl solution (3 mM) and monitored in a Glomax 20/20 luminometer (Promega, USA). The results were obtained by integrating the area under the curve of photon emission and expressed in relative light units (RLU).

The antioxidant profile was obtained by analyzing the total radical antioxidant parameter (TRAP)[21]. It consisted of adding 50 µL of 20 mM 2,2'-azobis (2-amidinopropane, ABAP) solution and 50 µL of a 40 µM luminol solution in 10 µL of plasma samples diluted 1:50 in a saline buffer. The reaction was monitored in a Glomax luminometer, one reading by second by 5 to 30 minutes, and the results were calculated concerning a standard curve using a hydrossoluble form of vitamin E standard (Trolox). Results were expressed as µM of Trolox.

The oxidation index was obtained from the ratio between CL and TRAP and expressed in arbitrary units.

To estimate the levels of nitric oxide metabolites (NOx) metabolites, aliquots of 60 µL of plasma samples were deproteinized with zinc sulfate (ZnSO₄, 75 mM) and 70 µL sodium hydroxide (NAOH 100 mM) solution. After centrifugation at 10.000 rpm, for 2 minutes, the supernatant was recovered, and 50 µL of glycine (NaOH 45g/L pH 9,7) buffer was added. The nitrate to nitrite conversion method was used through the cadmium-copper reaction and detection of total nitrite by the Griess reagent, as described [22]. The results are expressed in µM of nitrite.

The cytokines IL-12, IL-4, IL-17A, and TNF- α were quantified by using the enzyme immunoassay (ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay) method, using a commercial kit (e-Biosciences, USA), according to the manufacturer's guidelines. Results

were calculated in pg/mL from standard curve data for each cytokine. The kit's detection limit is 2 pg/mL.

2.3 Tumor analysis: Immunofluorescence labeling for Transforming Growth Factor- β 1 and Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4

TGF- β 1 and CTLA-4 expression in tumor samples was analyzed by immunofluorescence. Poly-lysine-coated slides containing 3 μ m-thick sections were kept for 24 hours in an incubator at 65°C. Subsequently, a chemical deparaffinization was carried out for 5 minutes consecutively in xylene, ethanol, and water. Antigen retrieval was performed only for CTLA-4 in humid heat with the immersion of the slides in 1mM sodium citrate buffer and pH 6.0 for 15 minutes at 100° C. TGF- β 1 did not require antigenic retrieval because it presented excellent immunostaining without the use of this process. Slides were incubated in 3% hydrogen peroxide solution for 15 minutes to block endogenous peroxidase. Sections were washed between each step with saline solution (sodium chloride – 150mM NaCl and pH 7.6) and 1% tween 20. Blocking nonspecific binding sites was also performed with a 5% powdered milk solution for 15 minutes. Then, the slides were incubated with the specific primary antibody (diluted 1:300 for TGF- β 1 and 1:1000 for CTLA-4) in a closed humid chamber, as specified in Table 2. Afterward, the slides were washed and incubated for 1 hour with secondary antibody (Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG, Thermo Fisher Scientific) diluted 1: 1000 for nuclear staining, the sections were treated with 4,6 diamidinophenylindole (DAPI) (Sigma Aldrich), 5 mg/mL solution, for 30 minutes and assembled in glycerol.

Images were captured in a fluorescence microscope Motic BA410E coupled to a MOTICAM ProS5 Plus camera and Motic Images Plus 3.0ML image acquisition and processing software. Slides were read using a DAPI excitation filter at 20X magnification. The following adjustments were predefined: auto exposure, gain + 20, and zero offsets. The images obtained were stored in BMP format, resolution 2048 x 1536 pixels. The REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK) were followed.

2.4 Statistical analysis

Data distribution was tested using the Shapiro-Wilk test. Thus, normally distributed variables were analyzed with parametric tests. When the normality assumption was not met, nonparametric tests were used. To compare molecular data between the intermediate group occupationally exposed and unexposed to pesticides, Student's t-test or the Mann-Whitney test were used to compare two groups. The results were analyzed using GraphPad Prism version 7.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). The primary data comparative analysis of the risk stratification profile of patients according to occupational exposure to pesticides was performed using the Chi-square test for independence. Correlation analysis of clinicopathological data according to systemic levels of IL-12 was performed with the R programming language (R Development Core Team). Data are represented as median: minimum and maximum in the results description and in the box-plot graphs.

3. Results

Descriptive data and a comparative analysis of the clinicopathological parameters of intermediate-risk patients from both unexposed and pesticide-exposed groups are shown in Table 3. The predominant molecular subtype was Luminal B for both groups (43% in the IE and 57% in the INE group). Other predominant characteristics for both groups were: tumor size above 2, histological grade I/II, no lymph nodes metastases, age at diagnosis above 50 years, Ki67 proliferation index and menopause at diagnosis. No statistical differences were observed between the groups regarding such features. IE group showed a significant predominance of overweight/obese patients ($p=0.04$) and at least one affected lymph node at the time of diagnosis ($p=0.03$).

Oxidative stress profile (Figure 2) was evaluated by measuring the systemic hydroperoxides levels (Figure 2A), TRAP (Figure 2B), oxidation index (Figure 2C) and NOx levels (Figure 3D).

No significant differences were found when comparing IE versus INE patients for hydroperoxides (772.13; 268.25 – 1.904.08 RLU and 823.14; 290.91 – 2.019.60 RLU, respectively, $p = 0.55$), TRAP (358.1; 82.84 – 1.074 nM Trolox for IE and 298.8; 26.93

– 828.8 nM Trolox for INE, $p = 0.41$), oxidation index (2941; 132.4 – 9.655 arbitrary units for IE and 4226; 143.4 – 14.777 arbitrary units for INE, $p = 0.19$), and NOx (32.33; 7.19 – 59.15 μM for IE and 32.07; 6.54 – 58.93 μM for INE), $p = 0.89$).

For cytokine profile (Figure 3), IL-4 (Figure 3A), IL-17-A (Figure 3B) and TNF- α (Figure 3C) were evaluated, and no significant differences were observed (IL-4 - 36.89; 9.73 – 117.1 pg/mL for INE and 32.84; 6.46 – 72.22 pg/mL for IE, $p = 0.39$; IL-17A – 71.2; 6.32 – 222.7 pg/mL for INE and 7765; 13.52 – 204.1 pg/mL for IE, $p = 0.57$; TNF- α – 94.87; 19.38 – 151 pg/mL for INE and 95.36; 12.21 – 245 pg/mL for IE, $p = 0.96$).

IL-12 (Figure 3D) showed a significant decrease in the IE patients when compared to those from the INE group (61.32; 5.66 – 190.9 pg/mL to INE and 27.37; 10.88 – 49.81 pg/mL to IE, respectively, $p = 0,03$).

Spearman's correlation analysis was performed concerning IL-12 levels and all clinicopathological parameters in both groups. As shown in the heat map, the stronger correlations (red squares) are located in opposite parameters when comparing IE and INE groups (highlighted black squared line, Figure 4A and B). It is noted that the strongest correlations regarding IL-12 levels observed in the IE group are focused on tumor characteristics (hormone receptors, Ki67 index, tumor subtypes), while in INE patients it is concentrated on patients' characteristics (BMI, menopause, age at diagnosis). Positive significant correlation was found between overweight/obese patients and positive hormonal receptor for IE patients, $R = 0.52$ and $p = 0.002$.

Since IL-12 was systemically reduced, we also investigated the expression of molecules described as negative regulators of immune response, TGF- β 1 and CTLA4 (Figure 5). Tumor-infiltrating cells from IE group had a significant increased expression of both markers (TGF- β 1, $p = 0.001$ and CTLA-4, $p = 0.002$, Table). Meanwhile, in tumor cells from INE patients, higher expression of CTLA-4 was found in relation to IE ($p = 0.001$).

4. Discussion

This study evaluated the meaning of inflammatory parameters in the clinical context of recurrence and death risk stratification and pesticide exposure for breast cancer patients. We observed that pesticides could induce significant changes in immune components, reducing anti-tumor mediators in the bloodstream and enhancing the expression of

immune evasion proteins in tumors and tumor-infiltrating cells. These findings reinforce the impact of pesticide-induced deregulation on the anti-tumoral immune response in intermediate-risk breast cancer patients, the most undefined clinic condition regarding breast cancer stratification for recurrence and death risks. As far as we know, this information is novel and adds to the literature regarding the importance of anti-tumoral immune response in the context of breast cancer prognostic and therapeutical decisions.

Breast cancer is a disease characterized by an extensive systemic inflammatory response that includes variations in cytokines, immune signaling mediators, and oxidative stress metabolites levels [23–26]. In particular, the investigation of patients' immunological profiles has emerged as a point of interest over the years.

Activation of immunity against tumors triggers the production of a series of circulating mediators [27], which can act dually, inhibiting tumor development or contributing to the chronic inflammation that supports tumor growth, associated with poor prognosis in cancer patients [14].

In this context, we analyzed the circulating levels of cytokines linked to specific T helper profiles and observed a reduction of IL-12 in the intermediate-risk patients occupationally exposed to pesticides. IL-12 is one of the main anti-tumor interleukins, acting through pleiotropic effects on different immune cells that form the tumor microenvironment, establishing links between innate and adaptive responses [28]. This cytokine can suppress tumorigenesis and induce regression of established tumors, promoting Th1-related adaptive immunity along with a cytotoxic response. The IL-12 depletion observed in the exposed patients may impair the immune response against tumors, leading to a higher risk of poor disease-related outcomes. Also, such patients exhibited a concomitant increase in TGF- β 1 and CTLA-4 expression in tumor infiltrate.

It is known that TGF- β 1 negatively regulates IL-12 levels [29] and is linked to immune evasion and poor responses to cancer immunotherapy [30]. In early stages of the disease, TGF- β 1 inhibits epithelial cell cycle progression and promote apoptosis, showing tumor suppressive effects. However, in more advanced stages, it is related to tumor progression, cell motility, cancer invasiveness and metastasis [31, 32].

Pesticides can increase TGF- β 1 expression and activation in breast cancer cells, enhancing migration and invasion [33]. These findings support a putative mechanism triggered by pesticide exposure, which has pro-tumor effects on intermediate-risk patients

by depleting their systemic IL-12 levels and enhancing TGF- β 1 expression in the breast tumors.

We also observed high expression of the immune checkpoint regulator CTLA-4 in breast tumor infiltrates from the exposed patients. Literature reports some associations between CTLA-4 expression in the tumor microenvironment and worse outcomes [34], reaching more than 50% of cases [35]. Despite we did not find any specific study about the impact of pesticides on CTLA-4 expression and considering the IL-12 and TGF- β 1-induced changes, exposure to such substances has a significant impact on the negative regulation of the immune environment of breast cancer patients. Therefore, the evaluation of these three markers may refine disease stratification in breast cancer patients under chronic pesticide exposure as the Brazilian population.

Although several pertinent pathways for the effects of xenobiotics have been identified, the mechanisms of actions for IL-12, TGF- β 1 and CTLA-4 remains to be established. Considering the clinical meaning of our findings, we observed that the majority of patients exhibiting a deregulation on anti-tumor immune response are in overweight or obesity at the time of diagnosis, also, patients in overweight/obesity showed an increased correlation with hormonal receptor according to IL-12 levels. Obesity is a well-known risk for breast tumor development, but also has been associated with inferior survival. Further, obesity can increase the risk of disease recurrence and death in 35 to 40% [36]. A case-control study done by [37], observed positive association between obesity and premenopausal breast cancer risk. Thus, understanding what lies behind this is an important opportunity to improve prognosis, therapy decision and its outcome.

Most of these patients also presented one or more affected lymph nodes, which implies a greater probability of metastasis to distant organs, increasing the risk of disease recurrence and decreasing the overall survival [38, 39]. In this way, although due to the sample size of the study it was not possible to obtain conclusive results regarding occupational exposure to pesticides as a stratification factor of risk in breast cancer patients, our results demonstrate that this exposure affects important immunologic anti-tumor responses in breast cancer women stratified as intermediate risk of recurrence, suggesting it as a valuable possible additional risk factor to be further investigate in the risk stratification of recurrence and death protocol.

5. Conclusion

The present study shows that occupational exposure to pesticides has a meaningful impact on breast cancer patients' systemic and tumor inflammatory profiles from the intermediate risk of death and recurrence. Impairment in systemic IL-12 levels associated with increased expression of TGF- β 1 and CTLA-4 in tumor and infiltrated immune cells may represent a putative signature of pesticide-induced immunocompromising in breast cancer and should be taken into consideration when calculating the risk of such patients.

6. References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71:209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. Sparano JA, Gray RJ, Ravdin PM, et al (2019) Clinical and Genomic Risk to Guide the Use of Adjuvant Therapy for Breast Cancer. *N Engl J Med* 380:2395–2405. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1904819>
3. Li W, Deng Y, Wu Q, et al (2021) Effects of clinicopathological factors on prognosis of young patients with resected breast cancer. *Medicine (Baltimore)* 100:e23693. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000023693>
4. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al (2011) Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 22:1736–1747. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr304>
5. SBOC (2011) Guideline 2011. *Rev da Soc Bras Oncol Clínica* 589
6. Pertile E, Matias MI, Ribeiro Z da S, et al (2018) Evidências experimentais e epidemiológicas entre exposição aos agrotóxicos e o desenvolvimento de câncer de mama. *Rev Bras Pesqui em Saúde/Brazilian J Heal Res* 20:137–146. <https://doi.org/10.21722/rbps.v20i1.20618>
7. Cepeda S, Forero-Castro M, Cárdenas-Nieto D, et al (2020) Chromosomal instability in farmers exposed to pesticides: High prevalence of clonal and non-clonal chromosomal alterations. *Risk Manag Healthc Policy* 13:97–110. <https://doi.org/10.2147/RMHP.S230953>
8. Ma J, Li X (2015) Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. *Chemosphere* 128:293–298. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.017>
9. Koureas M, Tsezou A, Tsakalof A, et al (2014) Increased levels of oxidative DNA damage in pesticide sprayers in Thessaly Region (Greece). Implications of pesticide exposure. *Sci Total Environ* 496:358–364. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.062>
10. Weinberg RA (2008) *The biology of cancer*. Artmed, Porto Alegre

11. He TT, Zuo AJ, Wang JG, Zhao P (2017) Organochlorine pesticides accumulation and breast cancer: A hospital-based case-control study. *Tumor Biol* 39:. <https://doi.org/10.1177/1010428317699114>
12. Pizzatti L, Kawassaki ACB, Fadel B, et al (2020) Toxicoproteomics Disclose Pesticides as Downregulators of TNF- α , IL-1 β and Estrogen Receptor Pathways in Breast Cancer Women Chronically Exposed. *Front Oncol* 10:1–11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01698>
13. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144:646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
14. Kartikasari AER, Huertas CS, Mitchell A, Plebanski M (2021) Tumor-Induced Inflammatory Cytokines and the Emerging Diagnostic Devices for Cancer Detection and Prognosis. *Front Oncol* 11:1–16. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.692142>
15. El-Zaemey S, Heyworth J, Fritschi L (2013) Noticing pesticide spray drift from agricultural pesticide application areas and breast cancer: a case-control study. *Aust N Z J Public Health* 37:547–555. <https://doi.org/10.1111/1753-6405.12111>
16. Mekonen S, Ibrahim M, Astatkie H, Abreha A (2021) Exposure to organochlorine pesticides as a predictor to breast cancer: A case-control study among Ethiopian women. *PLoS One* 16:e0257704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257704>
17. Ferro R, Parvathaneni A, Patel S, Cheriya P (2012) Pesticides and Breast Cancer. *Adv Breast Cancer Res* 01:30–35. <https://doi.org/10.4236/abcr.2012.13005>
18. Engel LS, Werder E, Satagopan J, et al (2017) Insecticide Use and Breast Cancer Risk among Farmers' Wives in the Agricultural Health Study. *Environ Health Perspect* 125:097002. <https://doi.org/10.1289/EHP1295>
19. Panis C, Gaboardi SC, Kawassaki ACB, et al (2022) Characterization of occupational exposure to pesticides and its impact on the health of rural women. *Rev Ciências Farm Básica e Apl - RCFBA* 43:e748. <https://doi.org/10.4322/2179-443X.0748>
20. Panis C, Herrera ACSA, Victorino VJ, et al (2012) Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 133:89–97.

<https://doi.org/10.1007/s10549-011-1693-x>

21. Victorino VJ, Campos FC, Herrera ACSA, et al (2014) Overexpression of HER-2/neu protein attenuates the oxidative systemic profile in women diagnosed with breast cancer. *Tumor Biol* 35:3025–3034. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1391-x>
22. Panis C, Mazzuco TL, Costa CZF, et al (2011) *Trypanosoma cruzi*: Effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. *Exp Parasitol* 127:58–65. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.030>
23. Pacholak LM, Kern R, de Oliveira ST, et al (2021) Effects of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms in glutathione levels and breast cancer development in Brazilian patients. *Mol Biol Rep* 48:33–40. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06107-w>
24. Scandolaro TB, da Silva JC, Malanowski J, et al (2020) Anti-neutrophil antibodies (anti-MPO-ANCAs) are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Immunobiology* 225:. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.152011>
25. Micheletti PL, de Borba Cecílio da Silva AP, Rech D, et al (2020) Low Plasmatic 25-hydroxyvitamin D at Diagnosis is Associated with Axillary Invasion, Chemoresistance and Metastasis in Women with Breast Cancer. *Arch Med Res* 51:542–547. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.05.014>
26. Herrera ACS, Victorino VJ, Campos FC, et al (2014) Impact of tumor removal on the systemic oxidative profile of patients with breast cancer discloses lipid peroxidation at diagnosis as a putative marker of disease recurrence. *Clin Breast Cancer* 14:451–459. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2014.05.002>
27. Kawaguchi K, Sakurai M, Yamamoto Y, et al (2019) Alteration of specific cytokine expression patterns in patients with breast cancer. *Sci Rep* 9:2924. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39476-9>
28. Mirlekar B, Pylayeva-Gupta Y (2021) IL-12 Family Cytokines in Cancer and Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 13:167. <https://doi.org/10.3390/cancers13020167>
29. Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, et al (2015) New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ* 22:237–246.

- <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.134>
30. Batlle E, Massagué J (2019) Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* 50:924–940. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024>
 31. Zarzynska JM (2014) Two Faces of TGF-Beta1 in Breast Cancer. *Mediators Inflamm* 2014:1–16. <https://doi.org/10.1155/2014/141747>
 32. Panis C, Herrera AC, Victorino VJ, et al (2013) Screening of circulating TGF- β levels and its clinicopathological significance in human breast cancer. *Anticancer Res* 33:737–42
 33. Miret N, Pontillo C, Ventura C, et al (2016) Hexachlorobenzene modulates the crosstalk between the aryl hydrocarbon receptor and transforming growth factor- β 1 signaling, enhancing human breast cancer cell migration and invasion. *Toxicology* 366–367:20–31. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.08.007>
 34. Kern R, Panis C (2021) CTLA-4 Expression and Its Clinical Significance in Breast Cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 69:16. <https://doi.org/10.1007/s00005-021-00618-5>
 35. Kassardjian A, Shintaku PI, Moatamed NA (2018) Expression of immune checkpoint regulators, cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and programmed death-ligand 1 (PD-L1), in female breast carcinomas. *PLoS One* 13:1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195958>
 36. Jiralerspong S, Goodwin PJ (2016) Obesity and breast cancer prognosis: Evidence, challenges, and opportunities. *J Clin Oncol* 34:4203–4216. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.68.4480>
 37. Kawai M, Malone KE, Tang MTC, Li CI (2014) Height, body mass index (BMI), BMI change, and the risk of estrogen receptor-positive, HER2-positive, and triple-negative breast cancer among women ages 20 to 44 years. *Cancer* 120:1548–1556. <https://doi.org/10.1002/cncr.28601>
 38. Tang C, Wang P, Li X, et al (2017) Lymph node status have a prognostic impact in breast cancer patients with distant metastasis. *PLoS One* 12:e0182953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182953>
 39. Tonello F, Bergmann A, Abrahao K de S, et al (2019) Impact of Number of Positive Lymph Nodes and Lymph Node Ratio on Survival of Women with Node-

Positive Breast Cancer. Eur J Breast Heal 15:76–84.
<https://doi.org/10.5152/ejbh.2019.4414>

Funding

This work was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Fundação Araucária and Programa de Pesquisa para o SUS - PPSUS

Competing Interests

The authors have no competing interests interests to disclose.

Author Contributions

Study conception and design were performed by Carolina Panis, Guilherme Ferreira Silveira and Janaína Carla da Silva. Material preparation were performed by Janaína Carla da Silva and Carolina Panis, data collection was performed by Janaína Carla da Silva, Thalita Basso Scandolaro, Hellen dos Santos Jacques, Jessica Malanowisk and Daniel Rech. Data analysis were performed by Carolina Panis, Janaína Carla da Silva and Thalita Basso Scandolaro. In situ analysis were performed by Carolina Panis, Janaína Carla da Silva and Rodrigo Kern. The first draft of the manuscript was written by Janaína Carla da Silva and Carolina Panis and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Data Availability

Data will be available upon request.

Ethics approval

This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of Western Paraná State University number CAAE 35524814.4.0000.0107.

Consent to participate

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

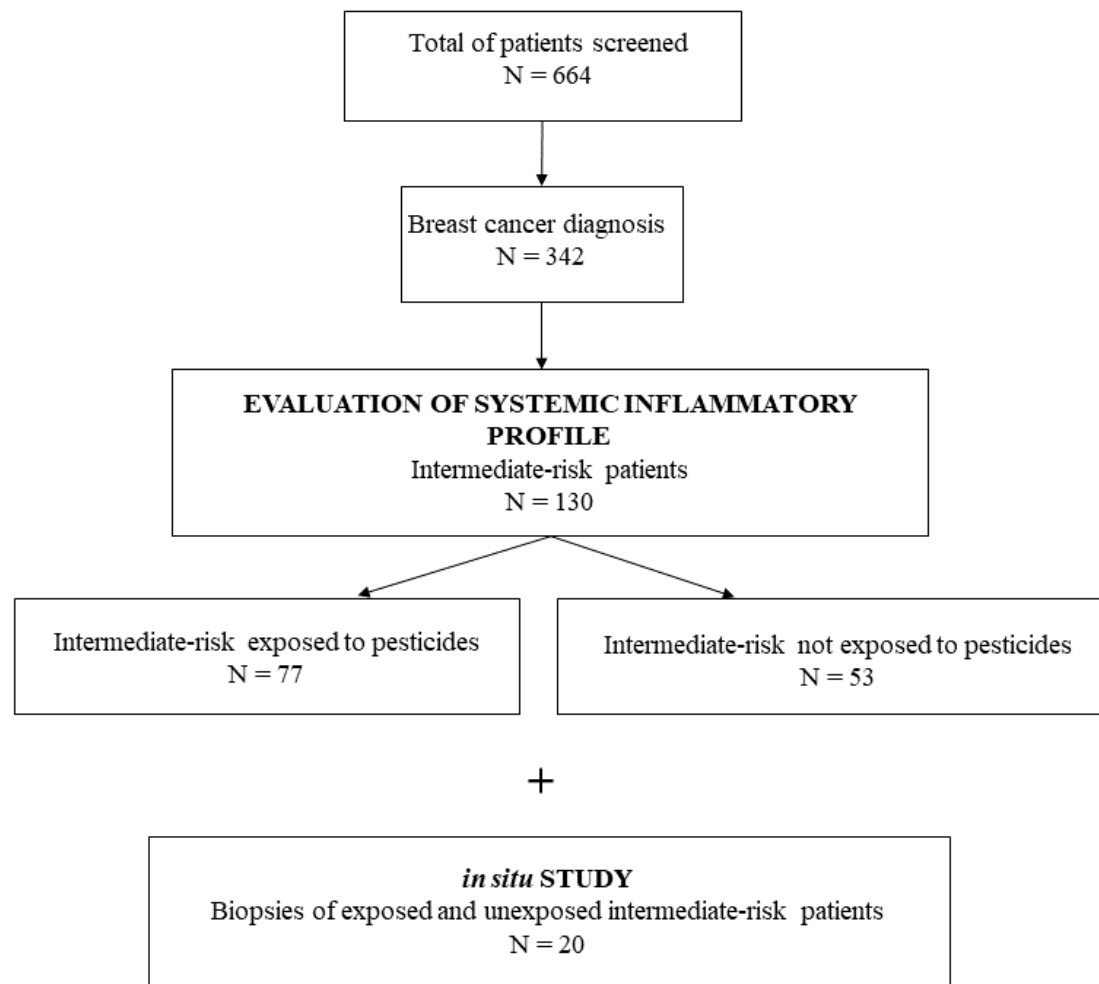


Figure 1. Study Design. Six hundred sixty-four patients were screened, and 342 were diagnosed with breast cancer. Based on risk stratification and pesticide exposure data, 130 patients were included, categorized into intermediate-risk exposed to pesticides (n = 77) and intermediate-risk unexposed to pesticides (n = 53). The *in situ* analysis was randomly selected by lot (n = 20 for each evaluated marker).

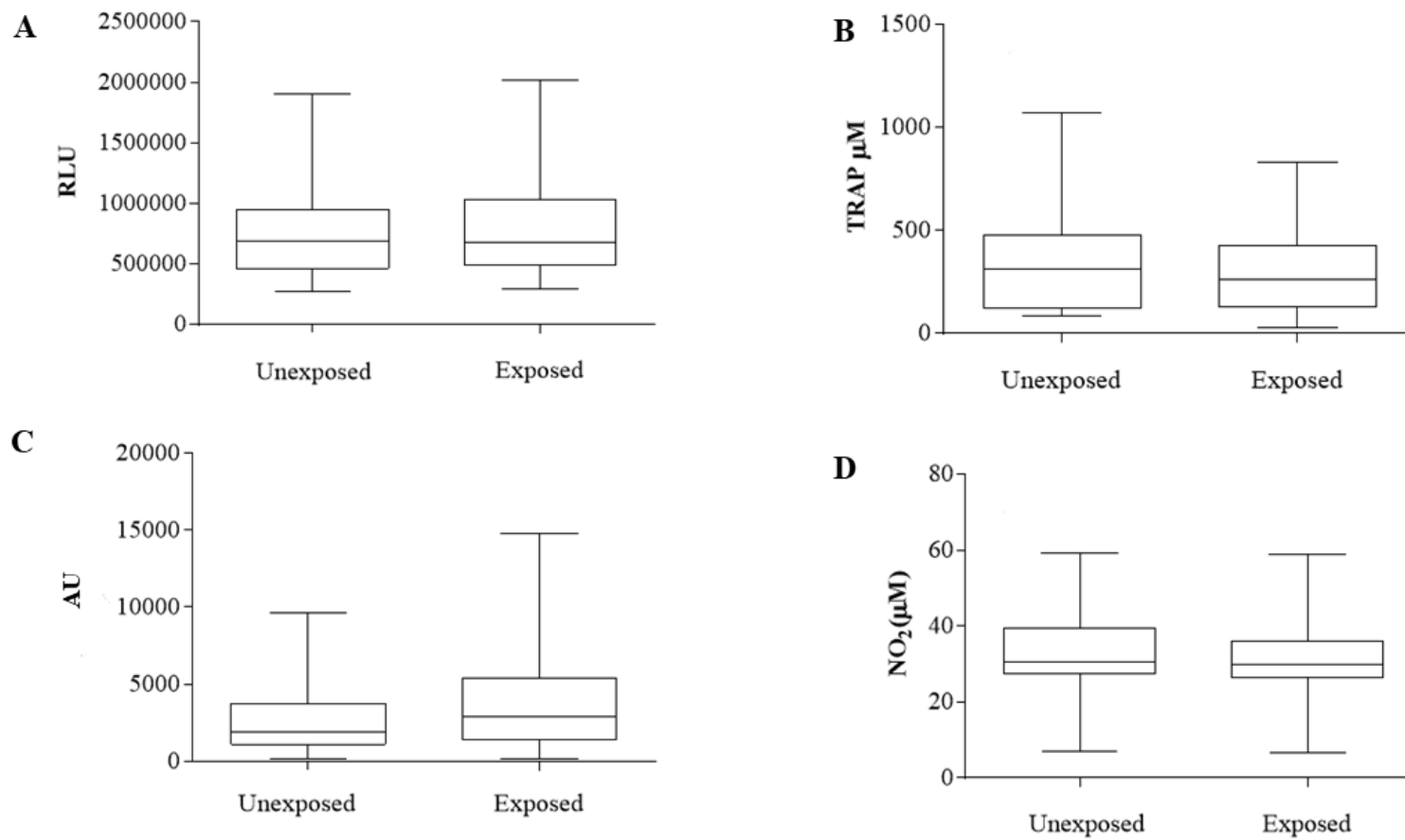


Figure 2. Oxidative stress analysis of plasma samples. A) Plasma hydroperoxide levels, measured in RLU = Relative Light Units. B) Total plasma antioxidant capacity (TRAP), measured in nM of Trolox. C) Oxidation index in arbitrary units. D) Levels of nitric oxide metabolites, measured in μM . Results are represented in box-plot (min-max). * Indicates significant difference ($p < 0.05$). The analysis were performed with GrapPad Prism 7.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

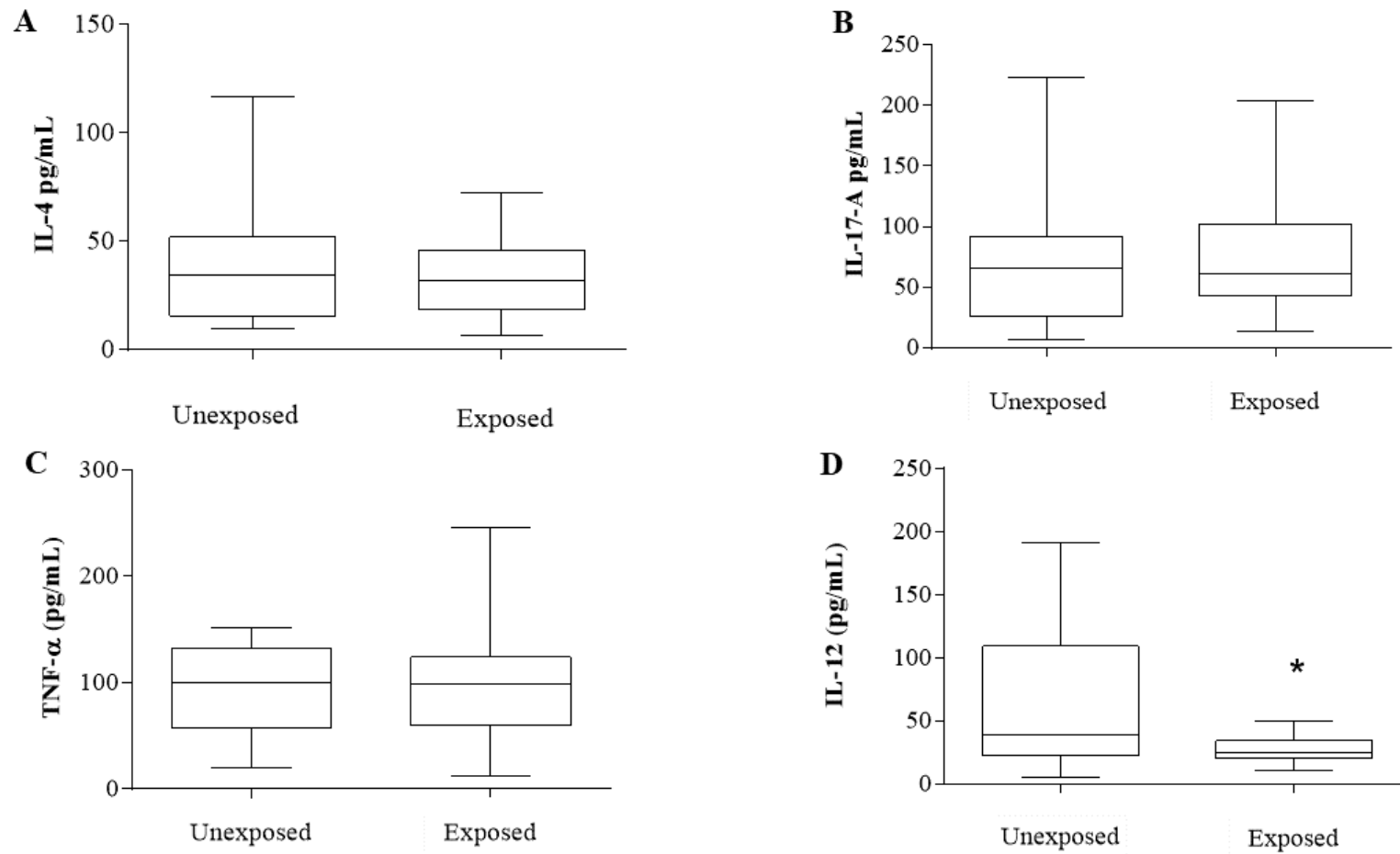


Figure 3. Cytokine profile: A) Interleukin 4. B) Interleukin 17-A. C) TNF- α . D) Interleukin 12. All measured in pg/mL. Results are represented in box-plot (min-max). * Indicates statistically significant difference ($p < 0.05$). The analysis were performed with GraphPad Prism 7.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

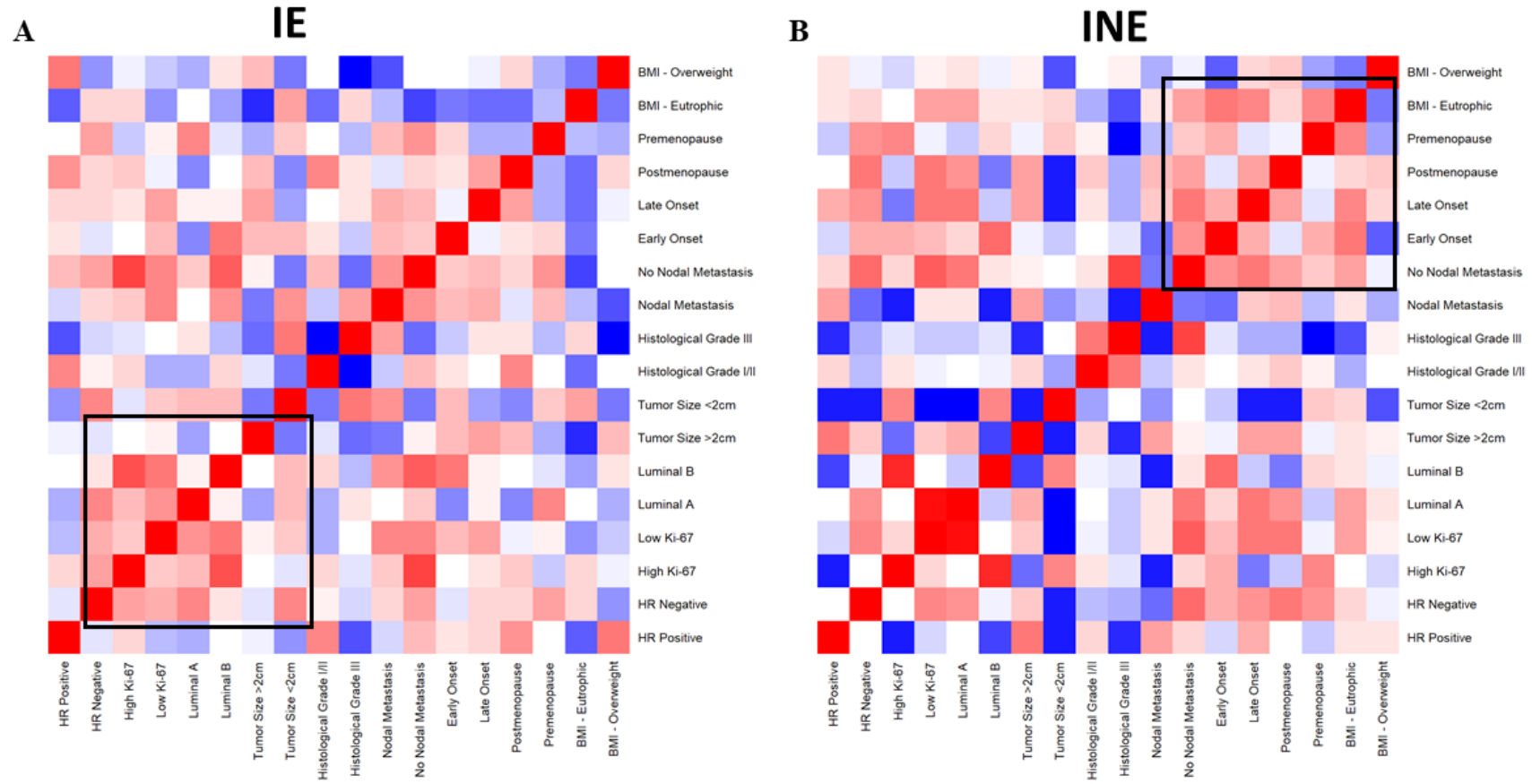


Figure 4. Heatmap: Correlation analysis of clinicopathological data according to systemic levels of IL-12. A) Exposed group. B) Unexposed group. The analysis was performed with R programming language (R Development Core Team, 2021). Red squares indicate positive correlations, blue squares indicate the negative ones. As intense the color, as stronger the correlation.

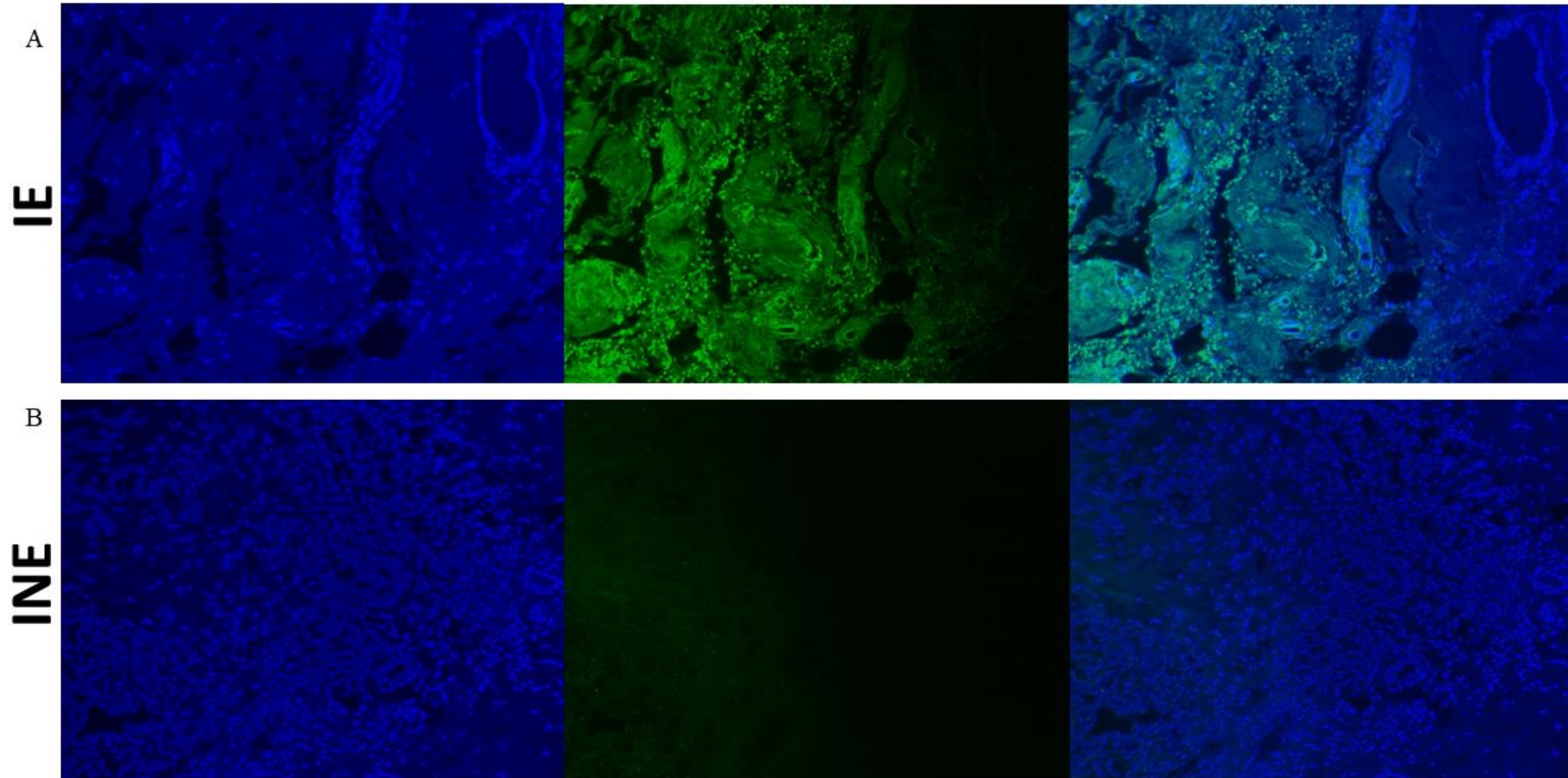


Figure 5. Immunostaining of TGF- β 1 and CTLA-4 in breast tumor biopsies from intermediate risk patients exposed (IE) or unexposed (INE) to pesticides. Labeling was evaluated in breast tumors and infiltrating leukocytes (Magnitude 20 and 400 \times). A = IE-TGF; B = INE-TGF, C = IE-CTLA4 and D = INE-CTLA4. The resulting images were merged in ImageJ to generate the final images. For all images: positive immunostaining in green and DAPI in blue.

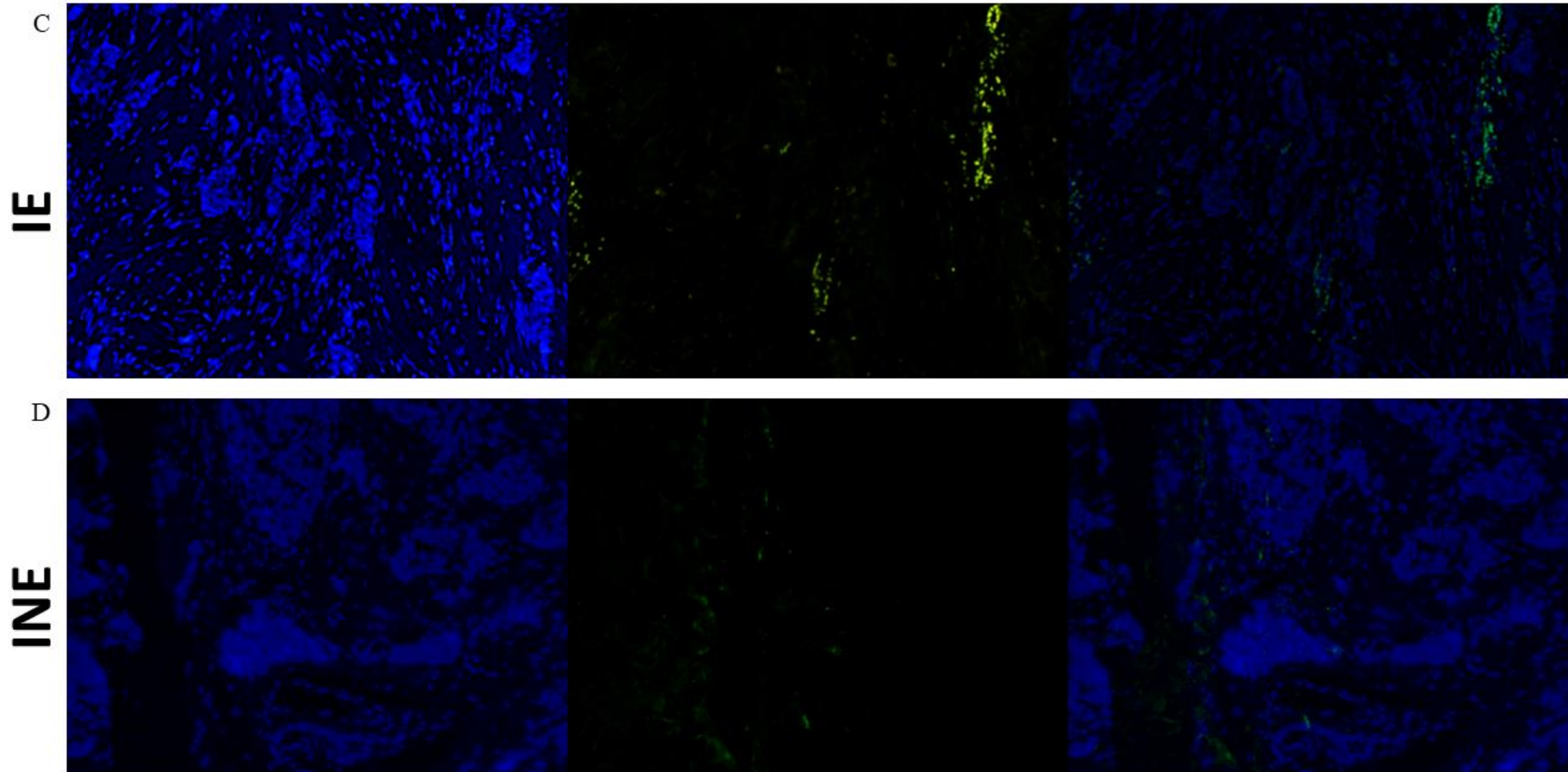


Figure 5. Immunostaining of TGF- β 1 and CTLA-4 in breast tumor biopsies from intermediate risk patients exposed (IE) or unexposed (INE) to pesticides. Labeling was evaluated in breast tumors and infiltrating leukocytes (Magnitude 20 and 400 \times). A = IE-TGF; B = INE-TGF, C = IE-CTLA4 and D = INE-CTLA4. The resulting images were merged in ImageJ to generate the final images. For all images: positive immunostaining in green and DAPI in blue.

Table1. Risk stratification of recurrence and death of patients diagnosed with breast cancer (Goldhirsch et al., 2007)

Low risk	Negative lymph nodes and all the following criteria: pT under 2 cm; Histological grade 1; ER or PR positive; HER-2 negative; Molecular subtype luminal A; and Age equal or above 35 years old.
Intermediate risk	Negative lymph nodes and at least one of the following criteria: pT higher than 2 cm; or Histological grade 2 - 3; or ER or PR negative; or Molecular subtype luminal B (HER-2 negative); or Age under 35 years old; or yet 1 to 3 affected lymph nodes, if ER and PR positive.
High risk	4 or more positive lymph nodes; or Lymph nodes negative with ER, PR and HER-2 negative, pT higher than 2 cm; or Lymph node negative, pT higher than 1 cm and HER-2 positive.

pT: Tumor size; ER: Estrogen receptor; PR: Progesterone receptor; HER-2: human epidermal growth factor receptor 2

Table 2. Conditions of immunofluorescence reactions and antibody specifications.

Antibody	Clone	Reactivity	Titration	Incubation
Anti-TGF- β	Monoclonal antibody	mouse anti-human	1:300	2 hours in dark and humid chamber, room temperature
Alexa Fluor 488	Superclonal Recombinant Secondary Antibody	goat anti-mouse IgG	1:500	1 hour in dark and humid chamber, room temperature
Anti-CTLA-4	BNI3 monoclonal antibody	mouse anti-human CD152	1:1000	<i>overnight</i> , in dark and humid chamber, 4°C
Alexa Fluor 488	Superclonal Recombinant Secondary Antibody	goat anti-mouse IgG	1:1000	1 hour in dark and humid chamber, room temperature

Table 3. Comparative analysis of clinicopathological data of exposed and unexposed patients. Chi-square analysis.

Variable	Group	Category	%	p value
Estrogen receptor	Exposed	Negative	7,79	> 0.05
		Positive	92,21	
	Unexposed	Negative	5,88	
		Positive	94,11	
Progesterone receptor	Exposed	Negative	44,16	> 0.05
		Positive	55,84	
	Unexposed	Negative	45,09	
		Positive	54,9	
KI67 (%)	Exposed	< 14	41,09	> 0.05
		> 14	58,9	
	Unexposed	< 14	45,83	
		> 14	54,16	
Molecular subtype	Exposed	Luminal A	38,96	> 0.05
		Luminal B	57,14	
		Triple Negative	3,9	
	Unexposed	Luminal A	43,13	
		Luminal B	47,05	
		Triple Negative	9,8	
Tumor size (cm)	Exposed	< 2	35,61	> 0.05
		> 2	64,38	
	Unexposed	< 2	40	
		> 2	60	
Histological grade	Exposed	I and II	81,33	> 0.05
		III	18,66	
	Unexposed	I and II	80,39	
		III	19,6	
Lymph nodes metastases	Exposed	None affected	60	0.0353
		At least one affected	40	
	Unexposed	None affected	74	
		At least one affected	26	
Age at diagnosis	Exposed	< 50	32,47	> 0.05
		> 50	67,53	
	Unexposed	< 50	39,21	
		> 50	60,78	
Menopause status at diagnosis	Exposed	No	27,27	> 0.05
		Yes	72,73	
	Unexposed	No	35,29	

		Yes	64,7		
BMI	Exposed	Eutrophic	25	0.0478	
		Overweight/Obese	75		
	Unexposed	Eutrophic	38		
		Overweight/Obese	62		

Table 4. TGF- β 1 and CTLA-4 expression profile in tumor tissue and immunological infiltrate from tumor biopsies.

	INE	IE	P value
TGF- β 1 tumor	70%	80%	NS
TGF- β 1 infiltrate	40%	90%	<0.001
CTLA-4 tumor	40%	10%	<0.001
CTLA-4 infiltrate	70%	100%	<0.002

NS: not significant.

ANEXO I

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Mapeamento do câncer de mama familiar no sudoeste do Paraná e estudo de associação de risco com exposição ocupacional à agrotóxicos.

Pesquisador: CAROLINA PANIS

Área Temática: Versão: 1 CAAE: 35524814.4.0000.0107

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 810.501 Data da Relatoria: 25/09/2014

Apresentação do Projeto: Neste estudo pretende-se avaliar todas as mulheres diagnosticadas com câncer de mama, atendidas no Hospital de Câncer de Francisco Beltrão (Ceonc), em um período de 48 meses. A partir da análise de anotações em prontuários serão selecionadas para investigação dos genes de interesse aquelas mulheres com história de câncer de mama familiar com ou sem exposição ocupacional à agrotóxicos. Atende aos requisitos teóricos, metodológicos e éticos. Objetivo da Pesquisa: Mapear os casos de câncer de mama familiar na região Sudoeste do Paraná e identificar possível associação a exposição ocupacional à agrotóxicos. Avaliação dos Riscos e Benefícios: Não há riscos diretos aos sujeitos, uma vez que serão estudados materiais coletados durante cirurgias oncológicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: Relevante para a área de oncologia. Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Todos apresentados. Recomendações: Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Não há pendências.

Situação do Parecer: Aprovado Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Aprovado. O projeto não necessita adequações. CASCAVEL, 29 de Setembro de 2014

Assinado por: João Fernando Christofolletti (Coordenador)

Endereço: UNIVERSITARIA Bairro: UNIVERSITARIO CEP: 85.819-110 UF: PR

Município: CASCAVEL Telefone: (45)3220-3272 E-mail: cep.prppg@unioeste.br

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Título do Projeto: Mapeamento do câncer de mama familiar no Sudoeste do Paraná e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional à agrotóxicos.

Pesquisador responsável: Profa Dra CAROLINA PANIS – Telefones (43)99165316 e (46) 30571079

Convidamos você a participar de nossa pesquisa que tem o objetivo de identificar os casos de câncer de mama em mulheres que tem história da doença na família, que moram na região Sudoeste do Paraná. Para isso será realizada a coleta de um tubo de sangue (10 mL) e um tubo de saliva (1 mL) para fazer os exames necessários para identificar porque alguns tumores de mama levam à doenças tão agressivas. Durante a execução do projeto também vamos precisar de uma parte do tecido tumoral que o médico irá remover durante a sua cirurgia ou que foi coletado para o diagnóstico da doença (na biópsia). Também precisaremos consultar o prontuário médico, para saber informações sobre sua saúde e sua ocupação de trabalho. Para algum questionamento, dúvida ou relato de algum acontecimento os pesquisadores poderão ser contatados a qualquer momento, pelos telefones (43)99165316 e (46) 30553026. Estamos disponíveis para esclarecer quaisquer dúvidas, a qualquer momento. Desta forma, você está contribuindo para a identificação de fatores que levam à alta incidência de cânceres agressivos na nossa região. Este termo será entregue em duas vias, sendo que uma ficará com você. Você não pagará nem receberá para participar do estudo. Seus dados serão mantidos em sigilo, ou seja, ninguém além dos pesquisadores terá acesso ao material ou informações coletadas. Estes dados serão utilizados somente para fins científicos. Você poderá cancelar sua participação a qualquer momento. Se necessitar de maiores informações, o telefone do comitê de ética é 3220-3272 e da pesquisadora responsável é 46 30553026. A coleta de material será feita dentro do Ceonc, portanto qualquer imprevisto será resolvido imediatamente no local. Ao término do projeto, se a pesquisa identificar que a sua doença se classifica como câncer familiar, você

será chamado ao Ceonc para receber esclarecimentos sobre como proceder no acompanhamento da doença nos próximos anos.

Declaro estar ciente do exposto e desejo participar do projeto. Nome do sujeito de pesquisa ou responsável:

Assinatura:

CPF:

Eu,___, declaro que forneci todas as informações do projeto ao participante e/ou responsável.

ANEXO III - NORMAS DA REVISTA

Breast Cancer Research and Treatment

Submission guidelines

Instructions for Authors

Types of Paper

The journal publishes original laboratory investigations, clinical and translational studies. It also hosts reviews, editorials, and letters.

The length of submitted papers should not exceed 3500 words. Word count does not include abstract, title page, tables and figures or references.

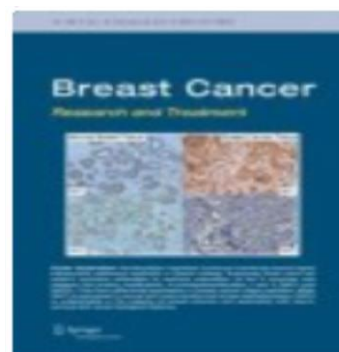
Submissions of review and meta-analyses papers require pre-approval by the Editor.

Letter to the Editor

Manuscript body text is limited to 750 words. There is no abstract. There may be 1 figure, up to 3 references, and no more than 3 authors, with author affiliations only including main institution, place name and (state plus) country (i.e. no departments, etc.).

Tumor Marker Studies

Manuscript describing the results of tumor marker studies should include the essential elements of "Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK)" (McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM (2006) Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *Breast Cancer Res Treat* 100(2):229-235).



Failure to do so will result in the manuscript being returned to the author without peer review, as outlined by the editors of Breast Cancer Research and Treatment: Hayes DF, Ethier S, Lippman ME (2006) New guidelines for reporting of tumor marker studies in breast cancer research and treatment: REMARK. Breast Cancer Res Treat 100(2):237-238). J Clin Oncol. 2005 23:9067-9072.

Cell Line Studies

In general, Breast Cancer Research and Treatment will not accept for publication papers in which all of the data shown in the paper were obtained using a single cell line. Indeed, for most studies, experiments involving the use of multiple cell lines (more than 2) is highly recommended. In rare exceptions 'single cell line' papers will be considered but only when the use of a single line was necessitated by the scope of the other experiments, such as those involving screens of thousands of shRNAs or compounds. When submitting a paper in which all reported data were obtained with a single cell line, the authors must justify why one cell line was used, or the paper will be returned without review.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit manuscript” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

ORCID ID

This publication requires that the corresponding author provides his/her ORCID ID before proceeding with submission.

Title Page

Please make sure your title page contains the following information.

Title

The title should be concise and informative.

Author information

- The name(s) of the author(s)
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- Purpose (stating the main purposes and research question)
- Methods
- Results
- Conclusion

For life science journals only (when applicable)

- Trial registration number and date of registration for prospectively registered trials
- Trial registration number and date of registration followed by “retrospectively registered”, for retrospectively registered trials

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.

- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor or MathType instead.
- Save your file in doc format. Do not submit docx files.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter. A table of Abbreviations can be included following the Abstract.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments and Funding Information

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full. In addition, please provide the funding information in a separate step of the submission process in the peer review system. Funder names should preferably be selected from the standardized list you will see during submission. If the funding institution you need is not listed, it can be entered as free text. Funding information will be published as searchable metadata for the accepted article, whereas acknowledgements are published within the paper.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

The entries in the list should be numbered consecutively.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. "<https://doi.org/abc>").

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibliography style file sn-basic.bst which is included in the Springer Nature Article Template.

Statements & Declarations

The following statements must be included in your submitted manuscript under the heading 'Statements and Declarations'. This should be placed after the References section. Please note that submissions that do not include required statements will be returned as incomplete.

Funding

Please describe any sources of funding that have supported the work. The statement should include details of any grants received (please give the name of the funding agency and grant number).

Example statements:

“This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...]). Author A.B. has received research support from Company A.”

“The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.”

Competing Interests

Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame

must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work.

Example statements:

“Financial interests: Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company N. Author D has received travel support from Company O. Non-financial interests: Author D has served on advisory boards for Company M and Company N.”

“The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.”

Please refer to the “Competing Interests” section below for more information on how to complete these sections.

Author Contributions

Authors are encouraged to include a statement that specifies the contribution of every author to the research and preparation of the manuscript.

Example statement:

“All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.”

Please refer to the “Authorship Principles” section below for more information on how to complete this section.

Data Availability

All original research must include a Data Availability Statement. Data Availability Statements should provide information on where data supporting the results reported in the article can be found. Statements should include, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. When it is not possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Example statements:

“The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT LINK TO DATASETS]”

“The datasets generated during and/or analysed during the current study are not publicly available due to [REASON(S) WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request[.]”

Please refer to the “Research Data Policy and Data Availability” section below for more information on how to complete this section.

In addition to the above, manuscripts that report the results of studies involving humans and/or animals should include the following declarations:

Ethics approval

Authors of research involving human or animal subjects should include a statement that confirms that the study was approved (or granted exemption) by the appropriate institutional and/or national research ethics committee (including the name of the ethics committee and reference number, if available). For research involving animals, their data or biological material, authors should supply detailed information on the ethical treatment of their animals in their

submission. If a study was granted exemption or did not require ethics approval, this should also be detailed in the manuscript.

“This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of University B (Date.../No....).”

“This is an observational study. The XYZ Research Ethics Committee has confirmed that no ethical approval is required.”

For detailed information on relevant ethical standards and criteria, please refer to the sections on “Research involving human participants, their data or biological material”, “Research involving animals, their data or biological material”.

Consent to participate

For all research involving human subjects, freely-given, informed consent to participate in the study must be obtained from participants (or their parent or legal guardian in the case of children under 16) and a statement to this effect should appear in the manuscript.

Example statement:

“Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

“Written informed consent was obtained from the parents.”

Please refer to the section on “Informed Consent” for additional help with completing this information.

Consent to publish

Individuals may consent to participate in a study, but object to having their data published in a journal article. If your manuscript contains any individual person’s data in any form (including any individual details, images or videos), consent for

publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. This is in particular applicable to case studies. A statement confirming that consent to publish has been received from all participants should appear in the manuscript.

Example statement:

“The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication of the images in Figure(s) 1a, 1b and 1c.”

Please refer to the section on “Informed Consent” for additional help with completing this information.

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

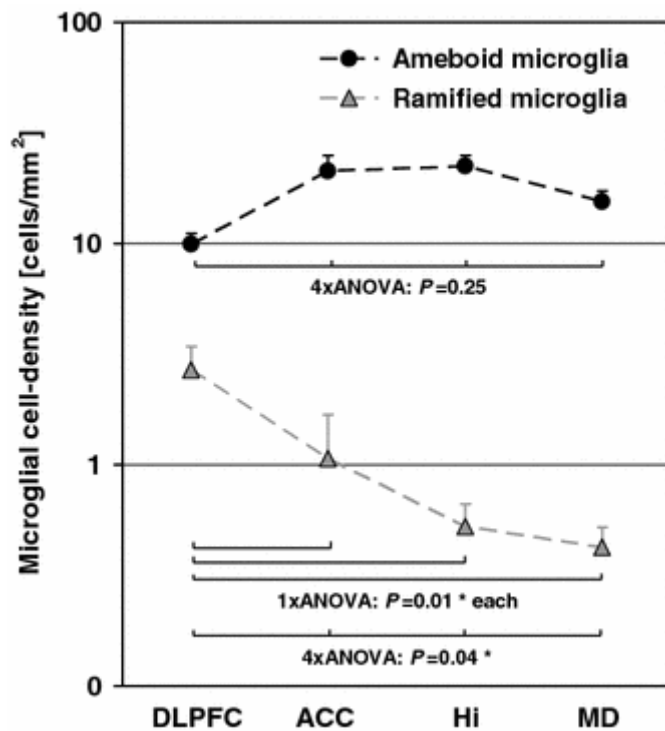
Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

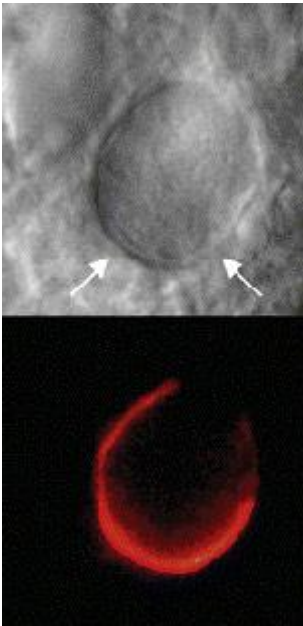
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



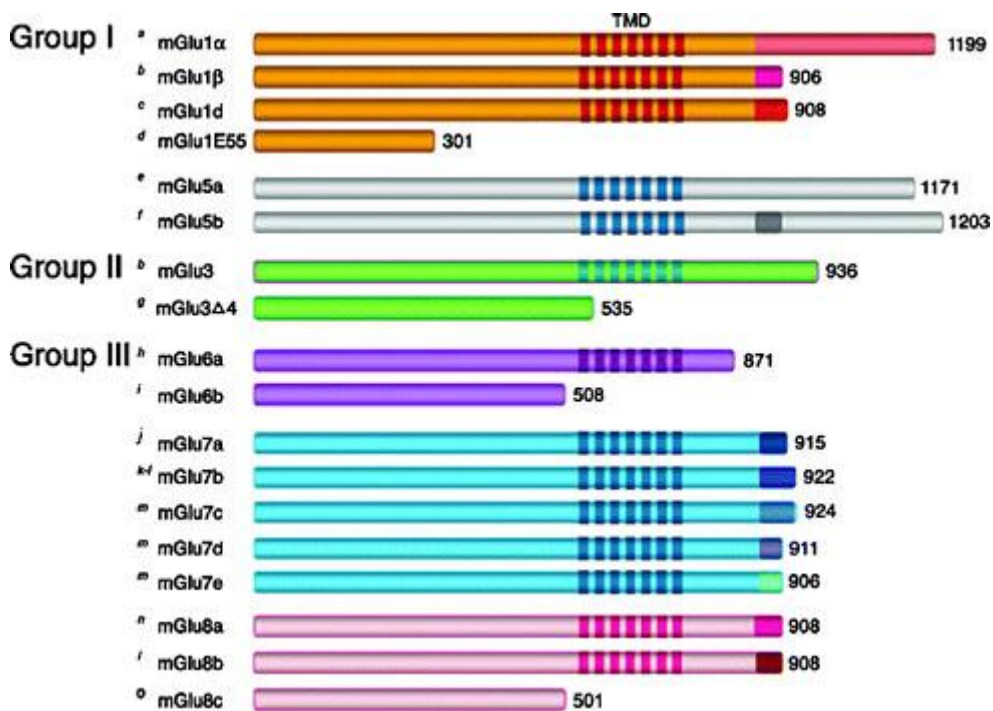
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Supplementary Information (SI)

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as Supplementary Information, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.
- High resolution (streamable quality) videos can be submitted up to a maximum of 25GB; low resolution videos should not be larger than 5GB.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB for high resolution files; 5 GB for low resolution files
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Supplementary Information (SI) will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Research Data Policy and Data Availability Statements

This journal operates a [type 3 research data policy](#). A submission to the journal implies that materials described in the manuscript, including all relevant raw data, will be freely available to any researcher wishing to use them for non-commercial purposes, without breaching participant confidentiality.

Data availability

All original research must include a data availability statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found, if applicable. Statements should include, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. For the purposes of the data availability statement, “data” is defined as the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and

build upon the findings reported in the article. When it is not possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access. Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

1. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]

2. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

3. All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

4. The datasets generated during and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON(S) WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.].

5. Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.

6. The data that support the findings of this study are available from [THIRD PARTY NAME] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under licence for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [THIRD PARTY NAME].

More templates for data availability statements, including examples of openly available and restricted access datasets, are available here:

[Data availability statements](#)

Data repositories

This journal strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely are available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature's information on recommended repositories.

List of Repositories

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may be used where appropriate.

Data citation

The journal also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI), should be included in the reference list using the minimum information recommended by DataCite, and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs.

Research data and peer review

Peer reviewers are encouraged to check the manuscript's Data availability statement, where applicable. They should consider if the authors have complied with the journal's policy on the availability of research data, and whether reasonable effort has been made to make the data that support the findings of the study available for replication or reuse by other researchers. Peer reviewers are entitled to request access to underlying data (and code) when needed for them to perform their evaluation of a manuscript.

If the journal that you're submitting to uses double-blind peer review and you are providing reviewers with access to your data (for example via a repository link,

supplementary information or data on request), it is strongly suggested that the authorship in the data is also blinded. There are data repositories that can assist with this and/or will create a link to mask the authorship of your data.

Authors who need help understanding our data sharing policies, help finding a suitable data repository, or help organising and sharing research data can access our Author Support portal for additional guidance.

For more information:

<http://www.springernature.com/gp/group/data-policy/faq>

