

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

STEPHANY BONIN GODINHO DOS SANTOS

**EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A PESTICIDAS E A RELAÇÃO COM A
DESREGULAÇÃO IMUNOLÓGICA EM PACIENTES COM CÂNCER
DE MAMA**

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(SETEMBRO/2022)

STEPHANY BONIN GODINHO DOS SANTOS

**EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A PESTICIDAS E A RELAÇÃO COM A
DESREGULAÇÃO IMUNOLÓGICA EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

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. Dalila Moter Benvegnú

Coorientador(a): Dra. Carolina Panis

FRANCISCO BELTRÃO – PR
(SETEMBRO/2022)

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

Bonin Godinho dos Santos, Stephany
Exposição ocupacional a pesticidas e a relação com a desregulação imunológica em pacientes com câncer de mama / Stephany Bonin Godinho dos Santos; orientadora Dalila Moter Benvegnú; coorientadora Carolina Panis. -- Francisco Beltrão, 2022.
106 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. Agrotóxicos. 3. Sistema imune. 4. Interleucinas. I. Moter Benvegnú, Dalila, orient. II. Panis, Carolina, coorient. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

STEPHANY BONIN GODINHO DOS SANTOS

**EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL A PESTICIDAS E A RELAÇÃO COM A
DESREGULAÇÃO IMUNOLÓGICA EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Dalila Moter Benvegnú
UNIOESTE

Membro da banca: Profa. Dra. Aedra Carla Bufalo Kawassaki
UNIOESTE

Membro da banca: Prof. Dr. Marcelo Moreno
UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

FRANCISCO BELTRÃO, PR
Setembro/2022

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a Deus que sempre esteve presente ao longo da minha caminhada, dando-me discernimento para nunca desistir. Agradeço aos meus pais, Edna e Roberto, por terem possibilitado que eu continuasse meus estudos e nunca mediram esforços para me fazer feliz e realizada. Também agradeço minha madrinha Joice, que sempre incentivou e motivou todas minhas conquistas. Agradeço a minha irmã Roberta, por sempre acreditar em mim e por além de minha irmã ser minha melhor amiga. Com muito carinho, agradeço ao meu namorado Matheus Ryan, que esteve ao meu lado me incentivando e encorajando em todos os momentos, sua presença significou a segurança e a certeza de que não estou sozinha nessa trajetória tão difícil. Sou imensamente grata, a minha colega de mestrado e amiga Maiara, que deu o maior incentivo a iniciar e continuar essa trajetória, deixando-a mais leve e proporcionando muitos momentos felizes mesmo em grandes dificuldades. Agradeço a professora orientadora Dra. Dalila e coorientadora Dra. Carolina Panis, admiráveis no âmbito profissional e pessoal, por toda paciência, dedicação, sugestões, por ter me auxiliado em todos os momentos, com sabedoria souberam dirigir-me os passos e os pensamentos para o alcance de meus objetivos, pelo tempo gasto comigo sem medir qualquer esforço para me ajudar. Agradeço também à Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o Hospital do Câncer de Francisco Beltrão – CEONC, obrigada por viabilizarem a realização desse trabalho. Agradeço imensamente aos meus colegas do laboratório Biologia de Tumores e a todo o grupo Saúde Humana e Animal - UFFS que sempre estiveram dispostos a ajudar. Obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para essa etapa e para o meu crescimento!

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado ao meu avô
Liberalino Bonin e a minha mãe.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Incidência mundial de câncer em mulheres.....	19
Figura 2 – Resposta imune a tumores.....	23
Figura 3 – Esquema de ativação da resposta imune do tipo Th1, Th2 e Th17.....	25

Mechanisms of immune dysregulation induced by pesticide exposure and their implications for cancer: a systematic review.

Figure 1 – Flow diagram for searching and extracting data.....	58
Figure 2– Mechanism of dysregulation of immune system cells and cytokines through exposure to pesticides based on in vivo and in vitro studies.....	59

Exposição ocupacional a pesticidas e a relação com a desregulação imunológica em pacientes com câncer de mama.

Figura 1 – Variações significativas no perfil Th17 sistêmico de mulheres portadoras de câncer de mama ocupacionalmente expostas ou não aos pesticidas.....	72
Figura 2 – Variações significativas no perfil Th1 sistêmico de mulheres portadoras de câncer de mama ocupacionalmente expostas ou não aos pesticidas.....	74
Figura 3 – Variações significativas no perfil Th2 sistêmico de mulheres portadoras de câncer de mama ocupacionalmente expostas ou não aos pesticidas.....	75

LISTA DE TABELAS

Mechanisms of immune dysregulation induced by pesticide exposure and their implications for cancer: a systematic review.

Tabela 1 - Results in chronological order and publication of studies selected in full to compose the systematic review..... 54/57

Exposição ocupacional a pesticidas e a relação com a desregulação imunológica em pacientes com câncer de mama.

Tabela 1 - Frequência (n) e porcentagem (%) de dados clinicopatológicos (variáveis discretas) considerando a exposição aos pesticidas..... 68/71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D: 2,4-diclorofenoxiacético

APCs: Células Apresentadoras de Antígenos

ASM: Acibenzol-S-metil

CCL2: Ligante de Quimiocina 2

CD4: Linfócito T CD4+

CD8: Linfócitos T CD8+

CDI: Carcinoma Ductal Infiltrante ou Invasor

CEONC: Hospital do Câncer de Francisco Beltrão

DDD: Dicloro-difenil-dicloroetano

DDE: Dicloro-difenil-dicloroetileno

DDT: Dicloro-difenil-Tricloroetano

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DP: Desvio-Padrão

HCB: Hexaclorobenzeno

HCH: γ -Hexaclorociclohexano

HER2: Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2

HPA: Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal

HSCs: Células Tronco Pluripotente

IFN- γ - Interferon Gama

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-12: Interleucina 12

IL-12p70: Interleucina 12p70

IL-13: Interleucina 13

IL-17-A: Interleucina 17 A

IL-1 β : Interleucina 1 Beta

IL-2: Interleucina 2

IL-21: Interleucina 21

IL-22: Interleucina 22

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IMC: Índice de Massa Corporal

INCA: Instituto Nacional de Câncer

Ki-67: Índice de Proliferação

LT: Linfócitos T

LTCs: Linfócitos T Citotóxico

LTh: Linfócito T Helper

M: Média

M: Metástases

MHC I: Complexo de Histocompatibilidade I

MHC II: Complexo de Histocompatibilidade II

MHC: Complexo de Histocompatibilidade

N: Nódulos

NK: Natural Killer

NTN: Não Triplo Negativo

PCBs: Bifenilos Policlorados

PCP: 2,3,4,5,6-pentaclorofenol

PPP: Produtos de Proteção Vegetal

PRISMA: Principais Itens Para Relatar Revisões Sistemáticas e Meta-Análises

RE: Receptor de Estrogênio

RNA_m: Ácido Ribonucleico Mensageiro

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

RP: Receptor de Progesterona

SCIELO: Scientific Electronic Library Online

T: Tumor

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Th1: Células T Auxiliares 1

Th17: Células T Auxiliares 17

Th2: Células T Auxiliares 2

TN: Triplo Negativo

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

Treg: Célula T Regulador

UNIOESTE: Universidade Estadual Do Oeste do Paraná

Exposição ocupacional a pesticidas e sua relação com a desregulação imunológica em pacientes com câncer de mama

Resumo

O câncer de mama é a neoplasia mais incidente em mulheres, não tem uma causa única, porém 80% a 90% dos casos estão associados a causas externas, que são os denominados fatores ambientais, dentre eles, a exposição a pesticidas. O objetivo deste estudo, foi investigar a exposição ocupacional a pesticidas e a relação com a desregulação imunológica de citocinas em pacientes com câncer de mama. Os procedimentos metodológicos estão divididos em duas etapas. A primeira etapa consiste em uma revisão sistemática sobre a temática: pesticidas, desordens imunes e câncer, realizada com base nas diretrizes PRISMA e estratégia PICO. A segunda etapa foi composta por um estudo original. Esse é um estudo retrospectivo e prospectivo com seleção de 187 mulheres com câncer de mama, 111 expostas ocupacionalmente a pesticidas e 71 não expostas, todas atendidas no Hospital do Câncer de Francisco Beltrão (CEONC) no período de 2015 a 2021. As pacientes foram divididas conforme o perfil clinicopatológico, baseado na expressão imunohistoquímica do receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), índice de proliferação Ki-67, tamanho do tumor, grau histológico, êmbolo intratumoral, presença de metástases em linfonodos axilares, distância da metástase, idade ao diagnóstico (definido como cedo ou tardio), status menopausal, índice de massa corporal (IMC), ocorrência de recidiva, sítios de metástase e perfil de sobrevida. Realizou-se perfil de citocinas plasmáticas das pacientes, através da dosagem de interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 12 (IL-12), interleucina 4 (IL-4), interleucina 17 A (IL-17-A) e fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α). Como resultados parciais, na revisão sistemática foram encontrados poucos estudos em humanos em relação ao tema proposto. Na pesquisa original, relação ao perfil clinicopatológico comparando as pacientes dos dois grupos é possível constatar que o subtipo molecular mais agressivo, TN, teve um percentual mais elevado entre as mulheres expostas aos pesticidas (29,58%), sendo o dobro em relação as não expostas (14,08%). Outro ponto foi a metástase em linfonodos, sendo que a variável de pelo menos um linfonodo acometido, foi 10% maior em mulheres expostas

(34,23%) em relação as não expostas (23,94%). Outra característica foi que 5% a mais de mulheres expostas aos pesticidas apresentaram um IMC mais elevado, indicando sobrepeso ou obesidade. Em relação ao perfil plasmático de citocinas, não foi evidenciada diferença estatística entre as médias dos grupos exposto e não exposto aos pesticidas. Porém, quando essas citocinas foram comparadas de maneira individual com cada variável do perfil clinicopatológico, foi possível identificar uma desregulação imunológica, onde em algumas condições específicas, as pacientes expostas aos pesticidas apresentaram um valor menor de citocina plasmática circulante em relação as não expostas, indicando uma queda na resposta do perfil Th17, para: Luminal B, Ki67>14%, Grau histológico 3, RE e pacientes eutróficas. No perfil Th1 para: tamanho tumoral e invasão linfonodal presente, neste último o valor de citocinas Th2 também foi menor entre expostas comparado com as não expostas.

Palavras-chave: agrotóxicos, sistema imune, citocina, xenobióticos, câncer de mama.

Occupational pesticide exposure and its relationship with immune dysregulation in breast cancer patients

Abstract

Breast cancer is the most frequent neoplasm in women, it does not have a single cause, but 80% to 90% of cases are associated with external causes, which are the so-called environmental factors, including exposure to pesticides. The aim of this study was to investigate occupational exposure to pesticides and the relationship with immunological dysregulation of cytokines in breast cancer patients. The methodological procedures are divided into two stages. The first step consists of a systematic review on the topic: pesticides, immune disorders and cancer, based on the PRISMA guidelines and the PICO strategy. The second stage consisted of an original study. This is a retrospective and prospective study with a selection of 187 women with breast cancer, 111 occupationally exposed to pesticides and 71 not exposed, all treated at the Francisco Beltrão Cancer Hospital (CEONC) from 2015 to 2021. The patients were divided according to clinicopathological profile, based on immunohistochemical expression of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), Ki-67 proliferation index, tumor size, histological grade, intratumoral embolus, presence of axillary lymph node metastases, distance to metastasis, age at diagnosis (defined as early or late), menopausal status, body mass index (BMI), recurrence, metastasis sites, and survival profile. A profile of the patients' plasma cytokines was performed, through the measurement of interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 12 (IL-12), interleukin 4 (IL-4), interleukin 17 A (IL-17-A) and factor of tumor necrosis – alpha (TNF- α). As partial results, in the systematic review few studies were found in humans in relation to the proposed topic. In the original research, in relation to the clinicopathological profile, comparing the patients of the two groups, it is possible to verify that the most aggressive molecular subtype, TN, had a higher percentage among women exposed to pesticides (29.58%), being double that of the women exposed to pesticides (14.08%). Another point was the metastasis in lymph nodes, and the variable of at least one affected lymph node was 10% higher in exposed women (34.23%) compared to non-exposed women (23.94%). Another feature was

that 5% more women exposed to pesticides had a higher BMI, indicating overweight or obesity. Regarding the plasma profile of cytokines, no statistical difference was found between the means of the groups exposed and not exposed to pesticides. However, when these cytokines were compared individually with each variable of the clinicopathological profile, it was possible to identify an immunological dysregulation, where in some specific conditions, patients exposed to pesticides had a lower value of circulating plasma cytokine in relation to those not exposed, indicating a drop in Th17 profile response, for: Luminal B, Ki67>14%, Histological Grade 3, ER and eutrophic patients. In the Th1 profile for: tumor size and lymph node invasion present, in the latter, the value of Th2 cytokines was also lower among exposed individuals compared with non-exposed individuals.

Keywords: pesticides, immune system, cytokine, xenobiotics, breast cancer.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	17
1.1 Câncer de mama.....	18
1.2 Resposta imune a tumores	22
1.2.1 Respostas Th1, Th2 e Th17.....	24
1.3 Pesticidas.....	27
1.3.1 Pesticidas: Indução de alteração imune e tumoral.....	27
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Geral	31
2.2 Específicos.....	31
3. ARTIGO 1.....	32
4. ARTIGO 2.....	60
5. ANEXOS	93
ANEXO A	93
ANEXO B	95
ANEXO C.....	97
ANEXO D.....	106

1. INTRODUÇÃO GERAL

A primeira descrição médica do câncer no mundo foi no Egito, em aproximadamente 2500 a.C. No antigo texto egípcio o câncer de mama foi descrito como “uma massa abaulada no peito”, para a qual não há cura (MUKHERJEE, 2012).

A primeira proposta de tratamento ocorreu em 1880, quando foi introduzida a mastectomia radical, no entanto, não foi considerado um tratamento de sucesso para todos os casos, uma vez que como o câncer de mama é imprevisível, em algumas mulheres o tumor permanece na mama, mas em outras pode espalhar para outros órgãos. Em 1896, uma mulher idosa foi tratada com irradiação e seu tumor mamário foi ulcerado e retrocedeu, porém a irradiação é extremamente forte e perigosa, também podendo causar outros tipos de cânceres (ROCHA *et al.*, 2009).

Com o passar do tempo, os tratamentos foram sendo aperfeiçoados, a quimioterapia descoberta por acaso no século XX melhorou a sobrevivência de pacientes e houve um declínio nas taxas de mortalidade, porém a cura nunca foi realmente descoberta (PEREIRA, 2017).

Ainda hoje, o câncer de mama é a neoplasia maligna mais diagnosticada em mulheres de todo o mundo, e é a segunda principal causa de morte por câncer em mulheres. Por esse motivo, a prevenção é um desafio para o mundo e em sua forma primária, consiste em diminuir os fatores de risco e promover os fatores de proteção (SUN *et al.*, 2017).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer não tem uma causa única, porém 80% a 90% dos casos estão associados a causas externas, que são os denominados fatores ambientais e estilo de vida. O ser humano é exposto a várias substâncias químicas presentes no ambiente que alteram a homeostasia do organismo, criando alterações para o desenvolvimento do tumor (INCA, 2022).

Um potencial fator de risco ambiental para o câncer de mama é a exposição a pesticidas (HE *et al.*, 2017), que além de interferir em processos biológicos por criar um microambiente favorável para o desenvolvimento do tumor, ainda está associado a um pior prognóstico da doença (PIZZATTI *et al.*, 2020). Em populações onde há uma predominância da agricultura familiar, como, por exemplo, nos estados da região Sul do Brasil, o trabalho envolvendo a aplicação e manuseio de pesticidas não diz

respeito somente ao homem. A mulher possui participação em algumas ou todas as etapas, que vai desde o preparo, diluição e aplicação, até a descontaminação e lavagem das roupas de proteção e utensílios utilizados (RECH, 2018).

Estudos demonstram que a exposição aos pesticidas ocasiona distúrbios imunológicos que impactam na funcionalidade e produção de várias células e citocinas, causando frequentemente, imunodesregulação no organismo exposto (CALAF, 2021). Essa imunossupressão interfere de diferentes formas no desenvolvimento tumoral (PANIS *et al.*, 2021)

O sistema imune atua com mecanismos sinérgicos e antagônicos para manter a homeostase, esse equilíbrio é muito sensível à ação de substâncias como pesticidas, responsáveis por alterações estruturais e funcionais da rede. E tais alterações, quando ocorrem, aumentam o processo inflamatório (COSTA *et al.*, 2020). A inflamação é uma marca estabelecida do câncer, seu controle e sua resolução torna-se um componente crítico da prevenção e tratamento bem-sucedido (FISHBEIN *et al.*, 2021).

Estudos anteriores envolvendo esta temática se concentraram em grande parte no estudo de exposições a um metabólito, fator ou contaminante de cada vez, além disso o estudo em humanos é bem escasso. Tais estudos, apesar de elucidar os mecanismos da exposição a pesticidas, não refletem o ambiente real, ainda mais quando o propósito se trata de elucidar o mecanismo de desarranjo imunológico e o câncer, o que justifica a realização desse trabalho. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi elucidar a relação da exposição ocupacional a pesticidas com a desregulação imunológica de citocinas em pacientes com câncer de mama.

1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum nas mulheres do Brasil e do mundo. Segundo o INCA, em sua última atualização de 2020, a estimativa de novos casos de câncer de mama foi de 66.280, o que corresponde a 29,5% do número total de casos de câncer, e de mortes 18.032 casos. O risco nacional estimado é de 56,33 para cada 100.000 habitantes. No entanto, quando comparado a região sul do país, o risco aumenta para 73,07 a cada 100.000 habitantes. Além disso, na região

sudoeste paranaense a incidência e letalidade desse câncer também ultrapassa a média nacional (PANIS *et al.*, 2021)

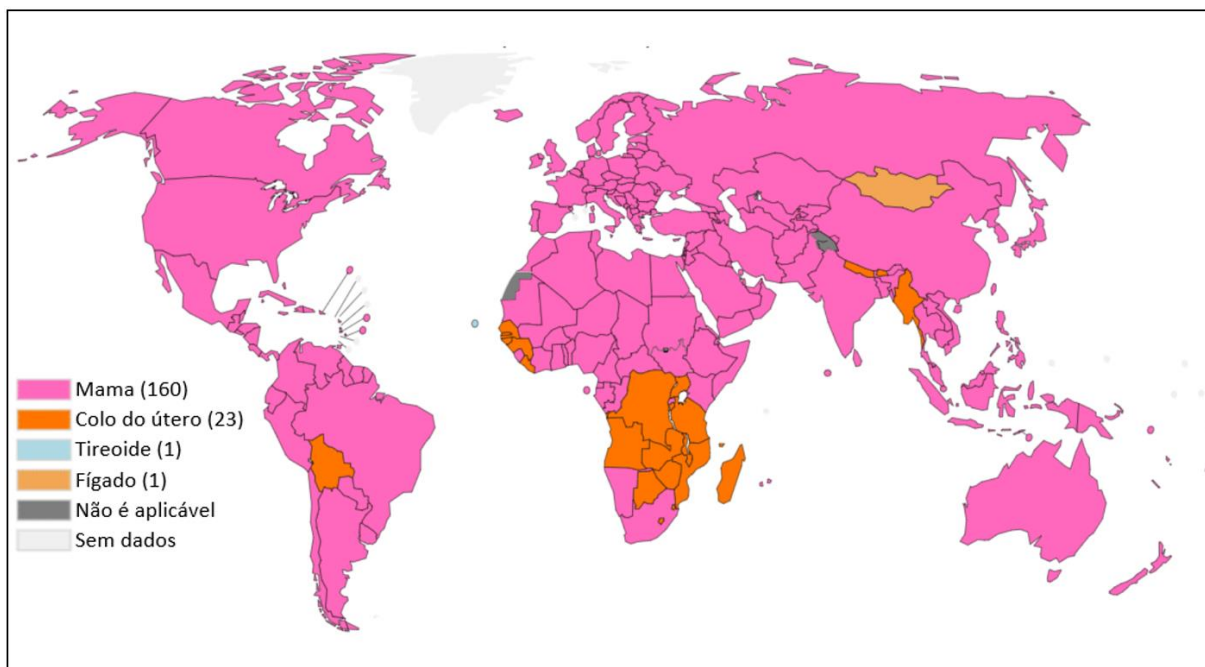


Figura 1 – Incidência mundial de câncer em mulheres.

Fonte: (GLOBOCAN, 2020)

O principal fator de risco para tumores mamários é o sexo feminino, pela alta densidade mamária, sendo este considerado um fator não inalterável. Juntamente a este fator estão idade, mutações genéticas (correspondente a 5 a 10% dos cânceres de mama), histórico familiar, raça e cor (maior risco para brancos), histórico reprodutivo, menopausa tardia ou menarca precoce. Os fatores que podem ser modificados incluem ter o primeiro filho antes dos 30 anos, uso de contraceptivos hormonais por tempo prolongado, uso de terapia hormonal após a menopausa, consumo de bebidas alcólicas, sedentarismo, sobrepeso e obesidade (SILVA *et al.*, 2021). Na população brasileira os fatores de risco mais apontados são o envelhecimento e estado de menopausa. Além disso, há possíveis riscos associados à exposição a pesticidas e a presença de câncer de mama em mulheres residentes no Sul do Brasil (ROMEIRO *et al.*, 2022).

O câncer é uma doença multifatorial, basicamente causada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais, que envolve vários mecanismos relacionados a sua fisiopatologia e comportamento clínico, possuindo uma

heterogeneidade de subtipos. Essa complexidade de diferentes subtipos e dados clinicopatológicos do carcinoma de mama é um grande desafio a ser enfrentado, tendo em vista que tumores com os mesmos tipos histológicos, estágios e graus de diferenciação podem apresentar desfechos distintos em relação aos fatores prognósticos e às respostas aos tratamentos instituídos (SILVA, 2021; ROMEIRO *et al.*, 2022)

Pela ampla variedade de tipos de tumores pode-se dividi-los em diferentes classificações, sendo uma delas pelo padrão de crescimento e aspectos histológicos do tumor. Deste modo, os tumores podem ser classificados como carcinomas *in situ*, que não invadiram tecidos adjacentes e estão confinados às estruturas que lhes deram origem: ductos ou lóbulos. Ou então em carcinomas invasivos, que possuem células epiteliais malignas com capacidade de invadir tecidos adjacentes e sofrer metástase para locais mais distantes. O tipo histológico mais comum, que corresponde a 80% dos casos, é o carcinoma ductal infiltrante (CDI), seguido pelo carcinoma lobular infiltrante, com cerca de 15% dos casos, sendo o restante distribuído entre os outros tipos menos frequentes (SOUZA, 2021).

A classificação conforme estadiamento apresenta-se de três formas. 1) Estadiamento Anatômico: baseado na extensão de tumor (T), nódulos (N) e metástases (M), sendo sugerido seu uso em localidades onde a análise de biomarcadores não estiverem disponíveis; 2) Estadiamento prognóstico clínico: aplicável a pacientes com base na história, exame físico, estudos de imagem e biópsias relevantes, sendo o mesmo determinado pelo T, N e M juntamente com grau tumoral, proteína de fator de crescimento celular mamário humano HER2 (ou ainda - human epidermal growth factor receptor-type2), receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP); 3) Estadiamento prognóstico patológico: utilizado para pacientes submetidas a ressecção cirúrgica prévia a qualquer tratamento sistêmico ou radioterápico e baseia-se em informações clínicas, marcadores biológicos, achados cirúrgicos e tecido ressecado (PAOLINO, 2018; SANTOS, 2019).

Além disso, pode ser denominado por estágios, sendo I e II para tumores menores que 5cm, III para tumores maiores que 5cm e metástase em linfonodo e o estágio IV com metástase em órgão distante. Essas são características clinicopatológicas essenciais a serem analisadas, pois todas implicam em maior probabilidade de metástase para órgãos distantes, estando relacionadas à

desdiferenciação dos tumores, aumentando o risco de recorrência e mortalidade (SILVA, 2021).

Outro fator de prognóstico é o índice de proliferação (Ki-67), que consiste em um marcador liberado durante a divisão celular. Portanto, na multiplicação exagerada, que ocorre em tumores mais agressivos é liberado mais Ki-67, sendo considerado pior prognóstico quando acima de 30%. Já em tumores menos agressivos, ou seja, de melhor prognóstico, considera-se quando menor que 10% (MOHAMED *et al.*, 2012).

O epitélio mamário é composto por células luminais, que expressam receptores para responder aos hormônios ovarianos, incluindo RE e RP. Esses receptores juntamente com o HER2, são usados como marcadores importantes, a fim de definir o tratamento e prognóstico da doença. Suas expressões variam amplamente dependendo do tipo de tumor mamário (DAI *et al.*, 2016).

Neoplasias malignas com receptores positivos para RE, na maioria das vezes são bem diferenciadas, menos agressivas e associadas a melhor resultado após cirurgia da mama. Além disso, há uma melhor resposta da terapia hormonal, o que acarreta redução da taxa de mortalidade dessas pacientes. É considerado ainda um fator preditivo para identificação do câncer de mama. Dessa mesma forma, tumores com RP positivos também são bons indicadores de melhor resposta ao tratamento medicamentoso. Ainda mais quando possuem dois grupos de receptor hormonal ao invés de um, ou seja, RE e RP positivos (LABRE, 2018).

Já no caso do HER2, ocorre o inverso, quando está presente amplificado (13 a 20%) é indicativo de mau prognóstico. Portanto, é importante a avaliação desse biomarcador, já que sua positividade representa uma forma mais agressiva da doença, o que reduz as chances de cura. Porém, atualmente, em tratamentos envolvendo a proteína HER2, o fármaco se liga a ela e ativa células do sistema imune, ajudando assim a combater o tumor (SANTOS, 2019).

Os tumores que não apresentam em sua superfície as expressões de RE, RP e HER2 são chamados câncer de mama triplo negativos (TN). Esse subtipo de câncer de mama costuma ser de mau prognóstico, mais agressivo, além de não possuir receptores, reduzindo as opções de tratamentos quando comparados aos tumores com receptores positivos. Já pacientes que possuem positividade para um ou mais receptores são denominados não triplo negativos (NTN) (SILVA, 2021).

O subtipo Luminal A, é considerado de bom prognóstico, pois se apresenta positivo para RE e negativo para ki67. Já o Luminal B se assemelha pelo fato de possuir RE positivo, porém possui aumentado índice para ki67, considerado assim, de uma acelerada multiplicação tumoral quando comparado com luminal A, conferindo um pior prognóstico. Desta forma, cada subtipo molecular é importante para ajudar na definição do tratamento e expectativa de sobrevivência do paciente, além de estar associado ao grau e incidência de metástase (LABRE, 2018).

1.2 Resposta imune a tumores

A principal característica do câncer é o crescimento desordenado das células malignas, que podem invadir tecidos e órgãos, espalhando-se a diferentes locais do organismo. Na carcinogênese ocorre alterações no DNA da célula, que acaba perdendo sua diferenciação, aumentando a divisão celular, multiplicação e assim crescimento incontrolável, formando massa tumoral. Nosso sistema imune possui mecanismos capazes de identificar e eliminar essas células pró-tumorais, ocorre o reconhecimento dos antígenos e assim uma resposta antitumoral (CALAF, 2021).

A resposta antitumoral ocorre primeiramente com a fase de eliminação, ativando o sistema imune inato e adaptativo. Macrófagos e células tumorais liberam citocinas inflamatórias como a interleucina 12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que são reconhecidas pelas células natural killer (NK) e linfócitos T (LT). Através de mecanismos de citotoxicidade, a morte celular dessas células tumorais é efetivada, ou seja, ocorre a apoptose (STANDISH *et al.*, 2010).

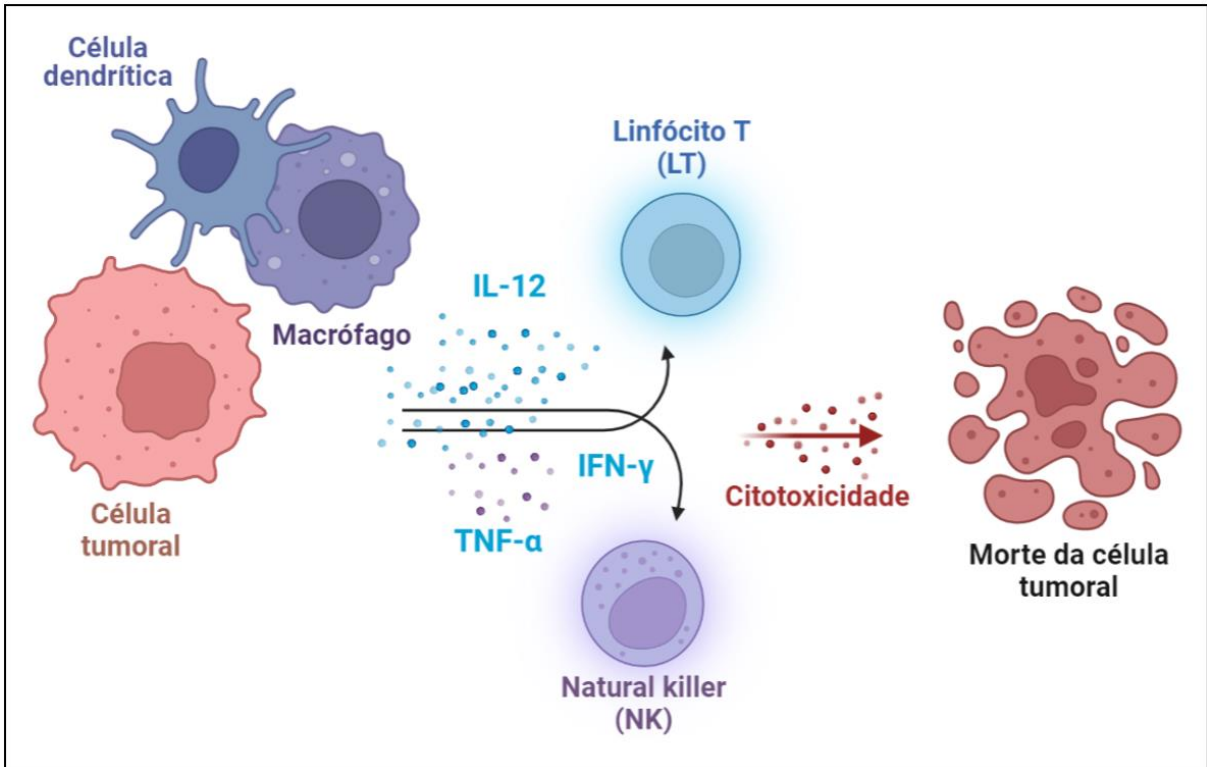


Figura 2 – Resposta imune a tumores. Células dendríticas e macrófagos reconhecem a célula tumoral e ativam TNF- α , IL-12 e interferon gama (IFN- γ), conseqüentemente ocorre ativação de células NK e LT, que são citotóxicas as células tumorais.

Os linfócitos T encontrados no microambiente tumoral são um dos principais responsáveis pelo mecanismo de controle de tumores. Eles são ativados pelas células tumorais ou através de antígenos ingeridos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). As APCs têm a função de ativar os linfócitos T citotóxicos (LTCs), que quando presentes na massa tumoral, ajudam a destruir o tumor. Além disso, os peptídeos derivados desse antígeno presente nas APCs, são exibidos através do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe I e assim são reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos CD8+ (CD8) e linfócitos T CD4+ (CD4) que são células auxiliares no combate do tumor (LOUREIRO, 2017; ABBAS *et al.*, 2019).

Quando há uma resistência na eliminação de algumas dessas células tumorais, ocorre a fase de equilíbrio, onde o sistema imune as controla e as deixa dormente, podendo ficar assim por anos. Porém, tais células podem em algum momento por diferentes fatores interferentes fugir do controle do sistema imunológico e entrar na fase de escape, que é onde acontece a progressão do tumor (LOUREIRO, 2017; SOUZA, 2021).

Na progressão tumoral, ocorre a ativação de respostas imunes mais específicas a depender do estágio e progressão da doença, cada fase de resposta ativa diferentes células ou citocinas que caracterizam padrões de respostas do tipo T auxiliares 1 (Th1), T auxiliares 2 (Th2) e T auxiliares 17 (Th17).

1.2.1 Respostas Th1, Th2 e Th17

Na resposta Th1, em um primeiro momento ocorre a ativação de macrófagos e liberação da citocina interferon gama (INF- γ), para combater o patógeno, nesse caso o tumor. Esta por sua vez, também tem papel no aumento de linfócitos CD8 e macrófagos, além da via de secreção TNF- α e INF- γ , que também são importantes na regulação do tumor. De uma maneira geral, os linfócitos CD4, possuem efeitos antitumorais e próinflamatórios, que são mediados pelos linfócitos T helper (LTh), que quando ativados secretam IFN- γ e outras citocinas próinflamatórias. Os efeitos imunossupressores ocorrem ainda pelas células T regulatórias (Treg), que são um subconjunto de células T, responsáveis por inibição de respostas mediadas tanto por resposta Th1 quanto Th2 (LOPES, 2018; ABBAS *et al.*, 2019).

A resposta Th2 é a chamada resposta imune humoral, a qual ajuda a ativar células B, que produzem anticorpos (GANGEMI *et al.*, 2016). Nesse tipo de resposta são secretadas citocinas do tipo interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13) e os anticorpos produzidos são os chamados anticorpos de memória, os linfócitos CD8 (ABBAS *et al.*, 2019). Portanto, dependendo do tipo de citocina que se encontra no ambiente tumoral será determinada a resposta ao tumor. A resposta Th17 é ativada pelas interleucinas 17 (IL-17-A) e interleucina 22 (IL-22) (FENGA *et al.*, 2014).

Pesquisadores acreditam que um microambiente tumoral com liberação de citocinas de respostas do tipo Th2, bem como a inflamação induzida por LTh, na resposta Th1 ajuda a inibir o crescimento do tumor. Já o perfil de citocinas e células T de pacientes com micrometástases em linfonodos e medula óssea, demonstrou que a porcentagem de linfócitos CD4 e CD8, que induz resposta Th1 (IL-2, IFN- γ ou TNF- α) e citocinas do tipo Th2 (IL-4), foi menor em pacientes com câncer de mama em comparação com o grupo controle saudável. Assim, tais observações indicam que há uma disfunção nas respostas do tipo Th1 e Th2 (STANDISH *et al.*, 2010).

O papel dos linfócitos Th17 no microambiente tumoral, ainda é incerto, uma vez que um estudo relata que estas células podem exercer um efeito antitumoral (TOSOLINI *et al.*, 2011), enquanto outro enfatiza sua capacidade de estimular a angiogênese tumoral (ZHANG *et al.*, 2009). Sabe-se que a inflamação no local do tumor recruta células Th17, bem como a interleucina IL-17-A, interferindo na resposta de Th1 e Th2, e sinalização de diversas células imunes que desempenham papel na imunidade do tumor, como as NK, além de outras citocinas como interleucina 8 (IL-8) e TNF- α . Sendo assim, esses variados perfis de citocinas infiltradas em tumores sugerem uma heterogeneidade e polifunção (efeito ou regulação) das células Th17 no microambiente tumoral. Além disso, há uma sugestão de adaptação do sistema imunológico, onde na presença de linfócitos, a IL-17-A promove rejeição do tumor, já na ausência a IL-17-A, favorece o crescimento (YE *et al.*, 2012; KUEN *et al.*, 2020; SOUZA, 2021).

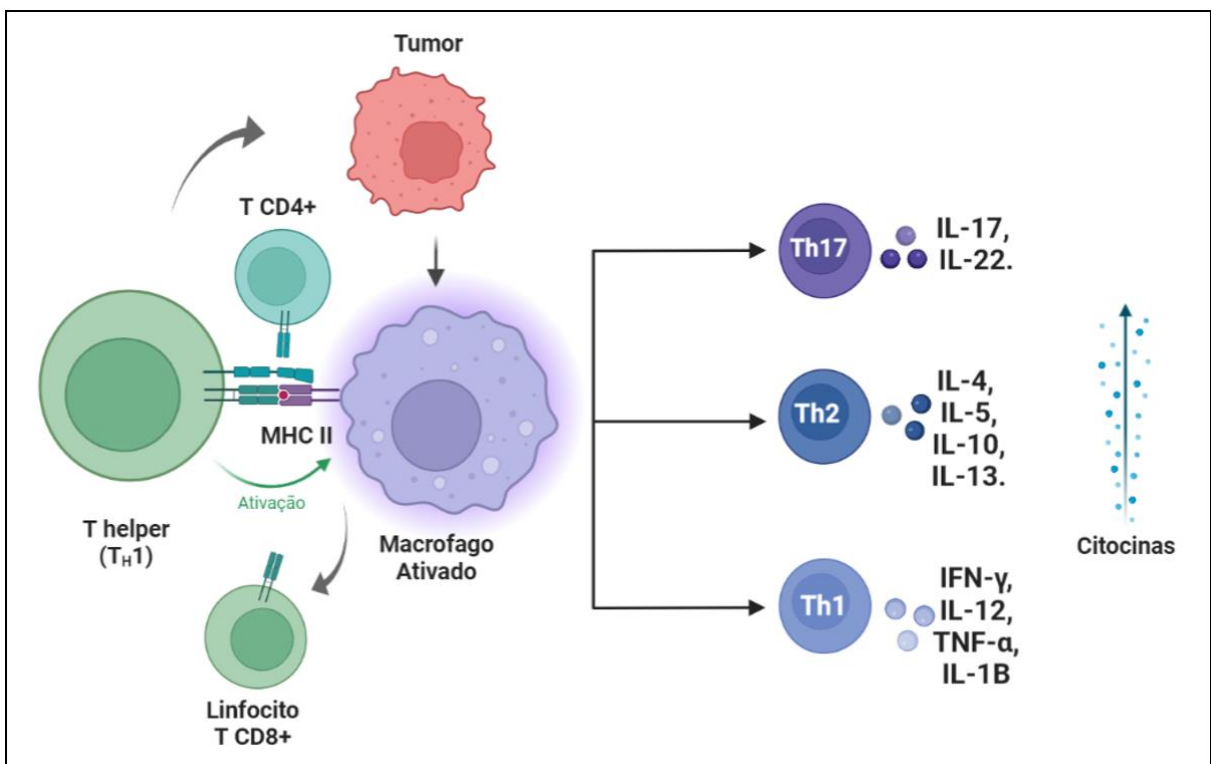


Figura 3 - Esquema de ativação da resposta imune do tipo Th1, Th2 e Th17, resultando em aumento de citocinas importantes na resposta imune de neoplasias.

Juntamente com as células imunes, como já citado no decorrer desse trabalho, as citocinas também estão associadas a formação do tumor, principalmente as envolvidas no processo inflamatório. Os macrófagos que estão presentes no tumor, por exemplo, favorecem um microambiente inflamatório via produção de interleucina-1 β (IL-1 β). A IL-1 β induz a expressão de quimiocina CC-ligante 2 (CCL2) nos macrófagos associados ao tumor, regulando o recrutamento de células mieloides para o tecido tumoral e promovendo angiogênese (LOUREIRO, 2017).

Em relação a IL-4, seu receptor nas células tumorais aumenta o nível de moléculas antiapoptose e seus efeitos são vastos, acarretando no desvio imunológico e na expansão do tumor (PEREIRA, 2021).

A IL-12 gerada por células que apresentam antígeno, também é um exemplo, a qual é responsável pela indução e pelo aumento da imunidade mediada por células. Esta citocina tem função em estimular a diferenciação de células LTh, ativando as células NK e células T. A IL-12 também fortalece a produção de elevadas quantidades de IFN- γ , o qual é um importante defensor anticâncer que tem função citostática e citotóxica, antiangiogênica e que pode ainda regular positivamente a expressão de MHC I e II em células tumorais para identificar e reforçar a lise da célula tumoral (JACOBSEN-PEREIRA *et al.*, 2020)

O TNF- α já citado, também faz parte de um grupo de citocinas importantes no processo de apoptose tumoral. Esta citocina é secretada por linfócitos, monócitos e macrófagos, sendo considerada uma das principais quando se refere a processos inflamatórios, pois pode agir praticamente em todo o organismo. Além disso, o TNF- α é capaz de induzir outras citocinas envolvidas no processo inflamatório (COLOTTA *et al.*, 2009).

De maneira geral, todas as células e citocinas trabalham através de mecanismos sinérgicos e antagônicos, a fim de manter o sistema imune funcionando de forma equilibrada, buscando sempre a homeostase e a regressão do tumor. Porém, esse equilíbrio é muito sensível à ação de substâncias como os pesticidas, que possuem baixo peso molecular, e assim acabam penetrando com facilidade pela pele; no ar, através das vias respiratórias e olhos, tornando-se responsáveis por alterações estruturais e funcionais da rede imunológica, prejudicando a resposta imune e favorecendo a formação de tumores (LOPES, 2018; SOUZA, 2021).

1.3 Pesticidas

A utilização de pesticidas teve início no século passado, mais precisamente na Primeira Guerra Mundial, onde os mesmos foram utilizados intensamente como armas químicas. Apesar das propriedades causadoras de danos irreversíveis à saúde humana e animal, os pesticidas passaram a ser utilizados como praguicidas, herbicidas, inseticidas e fungicidas (ARAUJO *et al.*, 2020).

A utilização incorreta de pesticidas pode causar impactos negativos à saúde humana (CASSAL *et al.*, 2014), cuja intensidade depende das suas características químicas, da rota de exposição, da quantidade absorvida, da frequência de uso, do modo de aplicação, do tempo de exposição e das condições gerais de saúde do indivíduo exposto (ARAUJO *et al.*, 2007; BENEDETTI *et al.*, 2013). A exposição humana pode se dar por diversas vias, incluindo a exposição acidental, através da ingestão de água e alimentos contaminados ou da inalação, e a exposição ocupacional, decorrente da manipulação continuada dos pesticidas durante o processo da produção através da agricultura convencional (MIRANDA *et al.*, 2007).

O amplo uso de pesticidas gera ainda poluição ambiental global. Depois de aplicados, seus resíduos atingem rios e lagos através do escoamento da água da chuva, causando poluição ecológica e afetando a sobrevivência de organismos aquáticos. No caso dos poluentes orgânicos persistentes, a contaminação ambiental pode ocorrer por décadas a partir da sua mobilização do solo contaminado.

Os impactos da exposição aos pesticidas são amplos, consistindo em um problema de saúde pública. Esses agentes químicos são capazes de acumular no organismo e interagir com processos bioquímicos, desregulando a homeostase do organismo e resultando em alterações de vários sistemas, incluindo desordens imunológicas (PANIS *et al.*, 2022).

1.3.1 Pesticidas: Indução de alteração imune e tumoral

Estudos recentes sugerem que a exposição a pesticidas prejudica a imunidade, reduzindo a defesa frente a microrganismos e alterando a produção de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas, fundamentais para as respostas imunes

contra patógenos, processos de cicatrização e reparo, além de vigilância contra o desenvolvimento de tumores (JACOBSEN-PEREIRA *et al.*, 2020).

As citocinas inflamatórias desempenham um papel fundamental na resposta de vigilância contra tumores afetando diretamente o crescimento, invasão celular e desenvolvimento de metástases (ARICI *et al.*, 2020). Todavia, a exposição a pesticidas dificulta a ação desta resposta e, conseqüentemente, cria condições favoráveis para o desenvolvimento de neoplasias (CAMARGO *et al.*, 2018).

Embora a identificação de xenobióticos associados à imunotoxicidade e os mecanismos pelos quais perturbam o sistema imunológico tenha crescido em importância nos últimos anos, há lacunas significativas em sua compreensão, principalmente no que tange a exposição aos pesticidas como fator de risco para o desenvolvimento de câncer (PANIS *et al.*, 2008).

Devido ao seu baixo peso molecular, os pesticidas penetram facilmente no corpo, e são distribuídos para as células e tecidos, quebrando a principal barreira imunológica física, que é a pele, exercendo sua imunotoxicidade tanto na imunidade inata como na imunidade adaptativa. Estas substâncias químicas possuem alta capacidade de bioacumulação e podem agir de forma direta nas células, ou se complexar com proteínas do nosso organismo formando haptenos (pequenas moléculas), que são facilmente reconhecidos pelo sistema imune (PERES & MOREIRA, 2003).

Após penetração dos pesticidas pela pele, as APCs, compostas pelas células dendríticas e os monócitos/macrófagos são as primeiras a ter contato com estas substâncias. Inicialmente, tais células aumentam em quantidade, para suprir a demanda necessária para o reconhecimento dos pesticidas, migrando para órgãos linfoides secundários em busca da ativação de linfócitos T e B (JACOBSEN-PEREIRA *et al.*, 2020).

Em casos de exposição crônica, como ocorre na exposição ocupacional dos agricultores por diversos anos, essas células apresentadoras de antígenos podem ficar comprometidas, desregulando sua função e reduzindo seu número. Assim, outras células tentam suprir a demanda e são superexpressas ou ainda reprimidas, dependendo do tipo de pesticida e características da exposição, o que resulta em exaustão imunológica (GANGEMI *et al.*, 2016; KARROW *et al.*, 2005).

Os estudos *in vitro* mostram que conforme aumento da dose de exposição a pesticidas, há um aumento de macrófagos do tipo M2, que são relatados pela literatura como células promotoras de tumores (MEDINA-BUELVAS *et al.*, 2019). O aumento de células dendríticas e macrófagos, pode ser resultado do estímulo antigênico da exposição. Nos órgãos linfoides secundários as células CD4 e CD8, que são responsáveis por processar esses estímulos, passam por exaustão e consequentemente esgotamento de células B (JORSARAEI *et al.* 2014).

Os pesticidas interferem no processo de apresentação de antígenos pelas APCs nos órgãos linfoides, desregulando ainda a capacidade de resposta dos linfócitos T e B. Deste modo, ocorre uma redução significativa de células T efetoras, cuja função torna-se diminuída em vista dos pesticidas, bem como a produção de IFN- γ e TNF- α (VOLKER *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2013; PIZZATTI *et al.*, 2020;).

Células produtoras de TNF- α demonstraram aumento apenas no início da exposição a pesticidas e em baixas doses, porém, na sequência, conforme o aumento da exposição, e tempo prolongado, como em exposição ocupacional, observou-se a sua redução. Diante do exposto, pode-se validar a teoria de que a redução ou aumento dessas células é dependente de dose e tempo de exposição aos pesticidas. Isso gera o comprometimento do sistema imune, já que tanto IFN- γ quanto TNF- α , são moléculas importantes para o combate de tumores (VOLKER *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2013; TÉLLEZ-BAÑUELOS *et al.*, 2016; CAMARGO *et al.*, 2018; PIZZATTI *et al.*, 2020).

Os estudos evidenciam ainda uma redução de células do tipo B, tanto B regulatórias, quanto plasmócitos, o que pode estar relacionado à disfunção dos linfócitos T ativadores, ou ainda devido à imunotoxicidade de órgãos linfoides induzida por pesticidas (JACOBSEN-PEREIRA *et al.*, 2020). Tais evidências corroboram com o estudo de Lee *et al.*, (2019), que demonstraram que células T e B são diminuídas em exposição a pesticidas.

Além da diminuição de linfócitos CD8, os pesticidas afetam os linfócitos CD4 e LTCs, mostrando ser uma via dependente de fatores de ativação. Quando uma via é alterada, nesse caso pela redução dessas células, ocorre também uma diminuição na secreção de citocinas, que são responsáveis por sinalizar as funções ou produção de outras células. O comprometimento de uma via, acaba criando um efeito cascata e

assim uma imunossupressão, o que é favorável ao desenvolvimento de tumores (FAUSTINI *et al.*, 1996; COSTA *et al.*, 2013; MEDINA-BUELVAS *et al.*, 2019).

A principal célula imune de combate aos tumores é a célula NK. Estudos demonstram que a exposição aos pesticidas acarreta redução destas células em seres humanos, criando um microambiente favorável para o desenvolvimento de câncer, já que essas células são responsáveis por reconhecer células estranhas e induzir apoptose, impedindo a iniciação de uma neoplasia (SELVAN *et al.*, 1989; FAUSTINI *et al.*, 1996; WHALEN *et al.*, 2003; HURD *et al.*, 2012; MEDINA-BUELVAS *et al.*, 2019; GARGOURI *et al.*, 2020; SHAH *et al.*, 2020).

Outro ponto desregulado pela exposição aos pesticidas é a capacidade de o sistema imune coordenar a geração das respostas Th. As respostas celulares do tipo Th1, marcadas pelas interleucinas IL-1 β , IL-2, IL-8, IFN- γ e TNF- α , apresentou-se suprimida pelos pesticidas segundo alguns estudos avaliados, principalmente os em humanos (VOLKER *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2013; JORSARAEI *et al.*, 2014, JACOBSEN-PEREIRA *et al.*, 2020; PIZZATTI *et al.*, 2022).

A resposta do padrão Th17, identificada pelas interleucinas IL-17 e IL-22, IL-17 não se alterou, em contrapartida IL-22, apresentou aumento em homens frente à exposição à pesticidas. Segundo autores o motivo é incerto, e apenas um estudo abordou a resposta do tipo Th17 (FENGA *et al.*, 2014). As respostas Th1 e Th17 são importantes na ativação de células e produção de citocinas na imunidade contra tumores, na vigilância contra a iniciação tumoral, ou ainda, conferem mau prognóstico a pacientes com câncer quando comprometidas (VOLKER *et al.*, 2010; FENGA *et al.*, 2014).

Em contrapartida, os estudos mostram o aumento exacerbado de respostas do tipo Th2, que envolve a produção das interleucinas IL-4 e IL-10, conhecidas por seu papel pró-tumoral (VOLKER *et al.*, 2010; JORSARAEI *et al.*, 2014).

Sendo assim, a desregulação imune e a cascata desordenada de produção e supressão de citocinas, mais o aumento da resposta Th2 em detrimento da Th1, favorecem um microambiente extremamente pró-tumoral, aumentando consideravelmente o risco de câncer em pessoas expostas a pesticidas (JORSARAEI *et al.*, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a exposição ocupacional a pesticidas e a relação com a desregulação imunológica de citocinas em pacientes com câncer de mama.

2.2 Específicos

- Realizar uma revisão sistemática da literatura atual envolvendo os descritores pesticidas e sistema imunológico, bem como câncer como possível desfecho;
- Quantificar níveis de IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-4, e IL-17 plasmática, em mulheres com câncer de mama expostas e não expostas ocupacionalmente a pesticidas.
- Diferenciar o perfil clinicopatológico de mulheres com câncer de mama expostas e não expostas ocupacionalmente a pesticidas;
- Verificar associações entre o perfil clinicopatológico e os níveis de citocinas plasmáticas de mulheres com câncer de mama expostas e não expostas ocupacionalmente a pesticidas.

A partir dos objetivos apresentados, esta dissertação expõe a seguir dois manuscritos intitulados “Mecanismos de desregulação imune induzida pela exposição a pesticidas e suas implicações no câncer: uma revisão sistemática.” e “Desregulação imunológica causada por pesticidas em mulheres com condições clinicopatológicas específicas do câncer de mama.”.

3. ARTIGO CIENTÍFICO 1

REVIEW ARTICLE

Mechanisms of immune dysregulation induced by pesticide exposure and their implications for cancer: a systematic review.

Declaration of conflicts of interest: The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

ABSTRACT

Background: The inappropriate use of pesticides contaminates natural resources and has consequences for human health. Evidence of immune dysregulation caused by pesticides has been presented, but studies linking exposure to these substances with immune dysregulation and its relationship to cancer are scarce. **Objectives:** This study systematically reviews the published literature that addresses the topic of immune dysregulation and cancer and its relationship to pesticide exposure. **Methods:** Studies developed in vitro cell culture and in vivo experimental animals and human exposure data were included. **Results:** The results show that pesticide exposure has a relevant impact on immune dysfunction, negatively affecting immune system cells and cytokine production in innate and adaptive responses. The main consequences reported were suppression of the Th1 response, induction of the Th2 response, cellular balance dysregulation, and cytokine production changes. **Discussion:** All reported events are related to the occurrence of immunosuppression. This dysregulation is paramount for cancer progression and may lead to a worse prognosis in chronically exposed populations. These findings also point to the need for further studies, primarily focused on human exposure.

INTRODUCTION

The use of pesticides began in the last century, more precisely in the First World War, in which they were used intensively as chemical weapons. Despite the properties that cause irreversible damage to human and animal health, pesticides began to be used as pesticides, herbicides, insecticides, and fungicides.¹

The incorrect use of pesticides can cause negative impacts on human health,² whose intensity depends on their chemical characteristics, the route of exposure, the amount absorbed, the frequency of use, the mode of application, the exposure time, and the general health conditions of the exposed individual.^{3,4} Human exposure can occur by several routes, including accidental exposure, through ingestion of contaminated water and food or inhalation, and occupational exposure, resulting from continued handling of pesticides during the production process through conventional agriculture.⁵

The extensive use of pesticides also generates global environmental pollution. After application, their residues reach rivers and lakes through rainwater runoff, causing ecological pollution and affecting the survival of aquatic organisms. In the case of persistent organic pollutants, environmental contamination can occur for decades after their mobilization from contaminated soil.⁶

The impacts of pesticide exposure are wide-ranging, making it a public health problem. These chemical agents can accumulate in the body and interact with biochemical processes, disrupting the body's homeostasis and resulting in alterations of various systems, including immunological disorders.⁷

The immune system is a complex set of cells that communicate through signaling, activating a highly specialized dynamic network. These responses need to function orderly for the body's protection, and dysregulation of these pathways contributes to disease development. Recent studies suggest that pesticide exposure impairs immunity, reducing defense against microorganisms and altering the production of inflammatory mediators such as cytokines and chemokines, which are critical for immune responses against pathogens, healing processes, and repair, as well as surveillance against tumor development.^{8,9}

Inflammatory cytokines play a crucial role in the surveillance response against tumors by directly affecting growth, cell invasion, and metastasis development.¹⁰ However, pesticide exposure hinders the action of this response and consequently creates favorable conditions for the development of neoplasms.¹¹

Although the identification of xenobiotics associated with immunotoxicity and the mechanisms by which they disrupt the immune system has grown in importance in recent years, there are significant gaps in their understanding, particularly concerning pesticide exposure as a risk factor for cancer development in humans.⁷

Therefore, this literature review aims to systematize the mechanisms of immune dysregulations associated with pesticide exposure by reviewing *in vitro* and *in vivo* studies and their implication in developing neoplasms in exposed populations. To this end, this review comprises data published in the literature from the last 33 years regarding this topic and presents these findings as a systematic review.

METHODS

Study design

This systematic review was based on the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines.¹² The PICO (Patient, Intervention, Comparison, and Outcome) strategy was used involving the four components: population to be studied (patient); level or type of exposure (intervention); comparison between exposure and non-exposure to pesticides (comparison); effects on the immune system, cells, and cytokines related to the immune system (primary outcome) and cancer (secondary outcome).

Inclusion and exclusion criteria

Studies with experimental animals, *in vitro*, involving cell culture, or with human beings that related the subject of pesticide exposure to the immune system were included in this research. Also included were studies that directly or indirectly contained these two subjects and the factor cancer. Articles in any language were included. Literature review articles or articles covering any disease other than cancer were

excluded from this search. Studies in the form of theses, dissertations, videos or books, letters to the editor, or repeated studies were also excluded. In addition, when more than one study was conducted using the same data, we chose the study with the most comprehensive information.

Study search, screening, and selection

The searches were conducted in the electronic databases: PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) and Scientific Electronic Library Online (SciELO). However, in the SciELO database, no results in line with the established inclusion criteria were obtained. In the PubMed database, no minimum cutoff date was stipulated for the studies, and the oldest study referring to the research dated from 1989. A maximum cutoff date of March 1, 2022, was stipulated. In order to retrieve original documents reporting data on the association between pesticide exposure, immunity, and cancer, the following descriptor terms were used: "pesticides, cytokines, and cancer"; "pesticides, interleukins, and cancer"; "pesticides, immune and cancer"; "pesticides, immune system, and cancer"; "pesticides, immunotoxicity, and cancer"; "pesticides, immune alteration, and cancer"; "pesticides, immune response, and cancer."

The selection of studies involved steps through which the studies were evaluated and selected based on the inclusion and exclusion criteria. Initially, the studies were classified by title and then by abstract. When the abstract was considered relevant, the study was selected for reading the entire paper. Finally, in the last step, the information extracted and the selected criteria of each study were recorded, being considered suitable to compose the systematic review.

One author performed this screening, and any disagreement was discussed with two senior investigators (C.P. and D.M.B.). The reference list of each eligible article was also cross-checked for additional studies. If two studies involving the same sample reported complementary results (i.e., presenting estimates for different outcome measures) that would otherwise be missed if only one was included, both were considered eligible for data extraction. There was no gray literature search.

In total, the search found 1,272 published studies, of which 27 were selected according to the eligibility criteria above, as detailed in Figure 1.

For each observational study included, the following items were extracted: classification by population (humans, experimental animals, or in vitro), year of publication, study design, number of cases and controls, type of exposure, type of pesticide, markers of immune/inflammatory dysregulation, mechanisms of innate and adaptive immune system dysregulation, relationship to immune system cells and cytokines involved, and clinical outcome (cancer). The data collected were allocated into two groups: I) in vitro and experimental animals; II) humans. Given the heterogeneity of the categories of the studies found (types of studies, population involved, type of exposure, and various classes of pesticides), statistical studies were not used to explore the results found. Data from all included studies are available in Table 1.

RESULTS

Of the 1,272 results identified by searching the database, 596 were excluded based on reading the title, and 603 were excluded after reading the abstract. The full text of the remaining 73 articles was reviewed, and finally, 27 articles were selected for inclusion.

This systematic review identifies and discusses the mechanisms of 27 studies (Table 1) reporting the association between pesticide exposure and immune system dysregulation. Only ten (10) studies addressed the relationship with cancer (10/27). Of the 27 studies, seven (7) were conducted in humans, nine (9) in experimental animals, and 11 in vitro studies involving cell cultures. As for the countries where the studies were conducted, the sequence is as follows: United States of America (9/27); Brazil (4/27); Italy (3/27); France and Japan (2/27); and Germany, China, Canada, Iran, Mexico, Poland, and India (1/27).

The results concerning the mechanisms of immune dysregulation involved in the studies can be analyzed as presented in Figure 2.

Human Studies

Seven (7) studies evaluating pesticide exposure's impact on humans' immune system and its relationship to cancer were included in this systematic review. Sample sizes ranged from 10¹³ to 341¹⁴ individuals. The age range varied from newborns to adults, male and female, and the exposure time to pesticides from days to years. This exposure was analyzed in the studies by at least one indication factor, with i) 4/7 of the studies analyzed exposure by questionnaires or by working with pesticides (informing whether the person had some type of contact with such substances, regardless of the type of exposure), and ii) 3/7 studies analyzed exposure by quantifying pesticide levels in biological sample, being, 1/3 in urine samples¹⁵ and 2/3 in blood samples.^{16,14}

Additionally, the frequency with which the classes of pesticides were analyzed was counted, and greater homogeneity could be observed in two out of the seven studies which analyzed patients exposed to mixtures of fungicides, herbicides, and insecticides.^{9,17} Three of the seven studies checked insecticides, including pyrethroids.^{16,14,15} Another study (1/7) analyzed pyrethroids and organophosphates,¹⁸ and another (1/7) analyzed herbicides.¹³

The immune system was the main primary endpoint analyzed in the studies in question, being assessed by different methodological parameters, including cells and cytokines of the innate and adaptive response system. However, regardless of the method used for analysis, the relationship between pesticide exposure and adverse effects on the immune system was observed in all seven human studies included (100%) in this systematic review. Therefore, all classes of pesticides have been shown to interfere with different immune responses and cytokines critical in carcinogenesis.

Starting with the specific observations of each study in humans, Faustini et al. (1996) demonstrated that the metabolites of pesticides classified as phenoxy herbicides, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), have down-regulatory effects on T helper cells and cytotoxic T cells (CTL), causing a reduction of these cell types in the exposed organism, including circulating T helper cells (CD4), suppressor cells (CD8), and natural killer cells (NK). With these cells diminished, the immune system experiences a deficit in the secretion of cytokines, which are responsible for promoting or enhancing the functions of other cells, such as B lymphocytes. This immune compromise causes an entire cytokine cascade to be immunocompromised. According

to the author, prolonged episodes of immunosuppression may be involved in the process of lymphomagenesis.¹³

According to Volker et al. (2010), dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT), dichloro-diphenyl-dichloroethylene (DDE), dichloro-diphenyl-dichloroethane (DDD), 2,3,4,5,6-pentachlorophenol (PCP), polychlorinated biphenyls (PCBs), hexachlorobenzene (HCB) and γ -hexachlorocyclohexanes (HCH), when identified in the blood of farmers, caused a cellular suppression in Th1-type cytokines, specifically interleukin 2 (IL-2) and interferon-gamma (IFN- γ). However, they caused an induction in Th2-type cytokines, such as interleukin 4 (IL-4). Th2 cytokines inhibit Th1 cytokines and cellular immune responses. Their study did not relate the findings to any disease or cancer. However, the literature shows that these cytokines are closely associated with tumorigenesis.¹⁶

Chlorine levels found in the umbilical cord of newborns were associated with lower levels of expression of interleukin-1 β (IL-1 β), a pro-inflammatory cytokine involved with tumor suppression. Neta et al. (2011), also in the same study, describe the association of permethrin with lower levels of anti-inflammatory interleukin 10 (IL-10) expression and is positively associated with interleukin 12 (IL-12) levels. Again, a decrease in a cytokine responsible for mediating inflammation and various diseases was analyzed here, but the author does not relate the findings to cancer.¹⁴

Fenga and colleagues (2014) investigated exposure to neonicotinoid, pyrethroid, and organophosphate pesticides concerning interleukins 17 (IL-17) and 22 (IL-22) in healthy greenhouse workers without any symptoms or illnesses, all wearing personal protective equipment correctly. No interference with the IL-17 response was demonstrated; however, there was stimulation of the IL-22 response. It was the first report describing the involvement of this cytokine in greenhouse workers exposed to pesticides. The authors' findings support the hypothesis that pesticide exposure can reduce host defenses against cancer through a framework of oxidative stress and impaired Th1 function. Finally, they report that any compound that interferes with immune surveillance may increase cancer risk.

Individuals exposed to the pyrethroid cypermethrin did not demonstrate changes in total leukocytes or subpopulation of leukocytes but rather in the panel of cytokines and mediators of the immune response related to pro-inflammatory interleukins.¹⁵ In the study reviewed, there was a large suppression with significant

differences found for interleukin 12p70 (IL-12p70) and highly significant differences for INF- γ , IL-2, and interleukin 8 (IL-8), which are involved in antitumor immunity and the response to infection. Decreased antitumor immunity and lower levels of IL-2, IL-8, and IFN- γ appear to correlate with tumor growth and shorter survival. Finally, the authors believe that one possible mechanism may be oxidative stress.

The exposures to different grouped classes of pesticides (fungicides, insecticides, and herbicides) analyzed by Jacobsen-Pereira et al. (2020) caused a significant increase in cells of the innate immune activity, such as classical monocytes and dendritic cells, in the group of exposed individuals when compared to the control group. In addition, there was also an elevation in the number of total T cells, and there was a significant decrease in the total number of B cells (regulatory B and plasma cells). Finally, there was an increase in IL-6 levels. The increase in circulating CD8 T lymphocytes may compensate for the decrease in humoral immunity.

Still about the different classes, a study involving women with breast cancer exposed and not exposed to pesticides, conducted by Pizzatti and collaborators (2020), observed once again the suppression of Th1 response cytokines through tumor necrosis factor (TNF- α). They also analyzed IL-1 β , which did not differ except in obese patients. These two cytokines represent the primary key driver of inflammation and immune events. This toxic proteomic study revealed that women exposed to pesticides exhibit immune dysregulation in certain clinicopathological situations. In addition, this study was the most faithful to the topic of immune dysregulation in cancer outcomes, providing associations with breast cancer and revealing that pesticides affect the immune system by causing immunosuppression. This, in turn, may favor not only the onset of cancer but also increase its aggressiveness, leading the patient to a poor prognosis.¹⁷

Only three studies in humans specifically addressed the topic of cancer. Nonetheless, in all studies, cancer was somehow mentioned as an important secondary outcome of immune dysregulation.^{15,18,17}

Animal Studies

The selected studies (9/27) show a positive association between pesticide exposure and cytokine and immune system dysregulation in models using rats, mice, and fish (zebrafish). The outcome cancer was addressed by four studies, all of which

were associated with tumor induction, even indirectly. In addition, most of the other studies addressed this issue throughout the study.

A study relating cancer, cytokine dysregulation, and the pesticide atrazine was conducted by Karrow et al. (2005), which resulted in increased splenic CD8 T cells, cytotoxic T cells, and leukocyte response in mice. When the tumor was induced in the animal, a reduction in host resistance and tumor formation occurred in animals exposed to the pesticide. These findings may result from early exposure, in which the first defense cells are activated and have not yet suffered immune attrition over a long period of exposure.³⁰

Selvan et al. (1989) analyzed the effects of aldicarb (carbamate) on immune cells involved in carcinogenesis in female rats, showing that macrophages had their cytotoxicity reduced and NK cells were unchanged. Thus, it is suggested that this pesticide, at low doses, as theoretically found in the environment, such as in water, can suppress macrophage-mediated tumor cell death without affecting NK cell lysis. However, the author clarifies that activated macrophages play a vital role in the defense against neoplasms, and their dysregulation can then increase the risk of neoplasms by consuming water, vegetables, or fruits contaminated with the pesticide.⁶

Zeng et al. (2022) tested the fungicide metalaxyl-M in a zebrafish animal model, an ideal model to study the immune system due to its high similarity to the functioning of the human body. This study found that embryos exposed to the fungicide had growth impairment and a significant, exposure-dependent decrease in the number of neutrophils, macrophages, and thymus T cells. Assuming that all immune cells are derived from pluripotent stem cells (HSCs), and target gene pathways regulate these, the signaling pathway for HSC production was also studied, and an alteration was found that resulted in a decrease in such cells, which explains the reduction in cells of the innate immune system. These cells are important in fighting tumor initiation and may increase the chance of tumor development once they are decreased.³⁵

In their study with mice, the insecticide cyhalothrin apparently also decreases cells of innate immunity since Quinteiro-Filho et al. (2009) demonstrated a reduction in the activity of peritoneal macrophages. This study presents a rather peculiar mechanism of action, suggesting that this insecticide acts by producing stress symptoms, activating the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis, and affecting immune function. The study further suggests that these data provide evidence that

cyhalothrin simultaneously alters host resistance to the growth of the Ehrlich tumor, a mammary carcinoma induced in female mice.³⁶

When studied in male rats by Jorsaraei and colleagues (2014), Carbaryl showed similar results to other insecticides in humans, decreasing IL-2, IFN- γ , IL-1 β , and TNF- α , and increasing the cytokines IL-4 and IL-10. In addition, the pesticide suppressed the functions of lymphocytes and macrophages. Thus, increased Th2 and polarization in the Th1/Th2 balance occurred since IFN- γ was reduced and IL-4 and IL-10 increased. This mechanism may contribute to neoplasms through immunotoxicity and imbalance of Th1 and Th2, for which Th1 function decreased, and Th2 function increased. The study further suggests that carbaryl exposure may induce effects on immunotoxicity through toxicity in lymphoid organs, confirming the hypothesis that pesticides unbalance these types of immune responses that are of paramount importance in tumor processes, as the human studies already cited suggest.

Medina-Buelvas et al. (2019) evaluated the production of pro- and anti-inflammatory cytokines in a mouse model exposed to organophosphate metabolites (DEDTP). IL-6 and IL-10 production increased; however, the cytokines IL-2 and IL-12 did not change over time. Exposure reduced CD3 T lymphocytes at 5 and 20 days of exposure and increased at day 10, while CD4 T and CD8 T lymphocytes increased at 10 and 20 days of exposure. In the same study, the proportion of NK cells decreased on day 15 and increased after 20 days, as well as the total number of macrophages, which increased according to exposure, especially M2 macrophages, which increased by 1,000%. Therefore, it was observed that low dose exposure to the pesticide could alter immune cells and may modify the innate response. Furthermore, the immunomodulatory capacity of NK cells focused on the initial innate immune response of NK cells and macrophages, which trigger other cells by cytokine secretions.¹⁹

When analyzing cytokines in response to endosulfan exposure in rats, Téllez-Bañuelos et al. (2016), as well as in other previously reported studies,^{9,19} showed an increase in IL-6. Also, in that study, cytokine and TNF- α were increased.³²

The study by Noworyta-Glowacka et al. (2012), which tested organophosphate exposure by feeding Wistar male rats, did not show critical statistical results on immune cells. Flow cytometry analyses showed no difference between B, T, CD4+, CD8+, and NK cells in the exposed and control groups, which may be explained by the exposure time (28 days).³⁷

Camargo and colleagues (2018) also analyzed organophosphate pesticide metabolite exposure against immune cells but linked it to cancer. The insecticide dichlorvos (DDVP or 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate/ 2,2-dichlorophenyl dimethyl phosphate) increased the cytokine TNF- α early in tumor development in exposed mice, even at low doses, inducing apoptotic death and inflammatory responses. However, this cytokine, initially released by macrophages as a signaling agent, when in too high an amount, i.e., out of normality, triggers intracellular events that deviate from homeostasis, which could potentially hinder the immune response against tumors, creating favorable conditions for their further development.

In vitro Studies

Eleven studies involving in vitro cell culture were selected. The cells were exposed to different pesticides, with most studies using the metabolite DDT, precisely four studies.^{20, 21, 22, 23} These showed the following results: decreased NK cell function for binding to tumor cells and lysis of such cells; stimulation of IL-1 β and IL-6; decreased cell surface protein CD16 and TNF- α . The possible mechanisms cited by the authors were genetic factors due to increased translation, transcription, and messenger RNA stability.^{20, 21, 23}

Disorders involving the decreased function of NK cells have been associated with the lack of ability of these cells to bind to and lyses tumor cells. These same losses of function have been observed in cells exposed to atrazine and carbamates,²⁴ pyrethroids,²⁵ and organochlorines.^{22, 26}

Overexpression of inflammatory cytokines TNF- α , IL-6, and IL-1 β was also found.^{25, 26} These findings play a central role in tumor progression.²⁶

It was observed that herbicides were correlated with pancreatic cancer via induction of significant oxidative damage but no change in IL-16 and IL-8 levels. In the study by Arici et al. (2020), the data on inflammation mechanisms obtained in vitro appear to be insufficient.¹⁰

One of the studies²⁷ addressed exposure to plant protection products (PPP), with one of these compounds containing Acibenzolar-S-methyl (ASM) particles, inducing increased IL-1 β . Another compound containing laminarin strongly induced the expression of this same interleukin, even at a low dose. This result diverges from the

results in humans, showing that occupational exposure decreases this cytokine and cytokines of the same response type, the Th1.

DISCUSSION

This review presents the mechanisms discussed in the literature of how pesticide exposure affects the immune system and, consequently, how it can affect carcinogenesis. These findings show dysregulation in several cellular and humoral components of the immune response through different mechanisms, which act in cancer's origin, progression, or aggravation.

Due to their low molecular weight, pesticides easily penetrate the body and are distributed to the cells and tissues, breaking the main physical immune barrier (the skin) and exerting their immunotoxicity on both innate and adaptive immunity. These chemicals have a high capacity for bioaccumulation and can act directly on cells or complex proteins in our body, forming haptens (small molecules), easily recognized by the immune system.²⁸

After the penetration of pesticides into the skin, antigen-presenting cells (APCs) composed of dendritic cells and monocytes/macrophages are the first to come into contact with these substances. Initially, such cells increase in quantity to meet the demand for pesticide recognition, migrating to secondary lymphoid organs in search of T and B lymphocyte activation.⁹

In cases of chronic exposure, as occurs in occupational exposure of farmers for several years, these APCs can become compromised, dysregulating their function and reducing their number. Thus, other cells try to supply the demand and are overexpressed or repressed, depending on the type of pesticide and characteristics of the exposure, resulting in immune exhaustion. This exhaustion decreases cells that act directly and indirectly in cancer and may promote growth or even trigger metastasis factors and worse prognosis, conferring an unwanted aggressiveness.^{29,30,17}

In vitro studies show that as the frequency of pesticide exposure increases, there is an increase in M2-type macrophages, reported in the literature as tumor-promoting cells.¹⁹ The increase in dendritic cells and macrophages may result from antigenic stimulation from exposure. Moreover, with the constant increase of this

stimulus caused by pesticides, the immunological and carcinogenic homeostasis is altered, generating a cascade that deregulates all processes that should occur naturally in the body.

Pesticides interfere with the process of antigen presentation by APCs in lymphoid organs, dysregulating the responsiveness of T and B lymphocytes. Hence, a significant reduction of effector T cells occurs, whose function becomes diminished due to pesticides, as well as the production of IFN- γ and TNF- α .^{16,15,17}

TNF- α producing cells showed an increase only at the beginning of pesticide exposure and at low doses. However, as exposure increased and time prolonged, as in occupational exposure, its reduction was observed.^{31,17} Given the above, one can validate the theory that the reduction or increase of these cells is dose and time depending on pesticide exposure, generating the impairment of the immune system and defense against tumors. TNF- α has a multifunctional role in tumor immunity and can induce apoptosis and proliferation of cancer cells, depending on the stimulus. When coming from the tumor cells themselves, TNF- α favors their multiplication, when produced by an immune system response, it has the opposite role, assisting in fighting the tumor and increasing the production of other cytokines that help this process, which together are part of the Th1 response pattern, and this pathway is suitable to act against tumor growth and progression.^{16,15,31,32,11,25,17}

Regarding the type of response, which in the present study were marked by the interleukins IL-1 β ,³⁸ IL-2, and IL-8, besides the IFN- γ and TNF- α cytokines aforementioned, Th1 response was suppressed by pesticides according to some studies evaluated, mainly in humans.^{16,15,31,9,17} Regarding carcinogenesis, the ideal would be an organism with these cytokines in high quantity, i.e., the opposite of the proposed by the exposure in the studies mentioned. It would occur because these cytokines directly regulate antitumor pathways, indicating to the organism the necessary ways to cease the tumor by recruiting other cytotoxic cells, such as lymphocytes, or even exacerbating the existing cytokines in the environment. This process prevents tumor progression and metastasis to distant organs, thus conferring a better prognosis to patients.^{33,7}

Moreover, studies highlight a reduction in B-type cells, both regulatory B and plasma cells, which may be related to the dysfunction of activating T lymphocytes or to pesticide-induced immunotoxicity of lymphoid organs.⁹ Such evidence corroborates

the study by Lee et al. (2019), which demonstrated that T and B cells are decreased in pesticide exposure.³⁹

Besides the decrease in T and B lymphocytes, pesticides affect CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, and CTL, showing that it is a pathway dependent on activation factors. When a pathway is altered, in this case by reducing these cells, there is also a decrease in the secretion of cytokines responsible for signaling the functions or production of other cells. The impairment of a pathway creates a cascade effect and thus immunosuppression, which is favorable for the development of tumors.^{13,15,19} CD4 T and CD8 T lymphocytes, responsible for processing stimuli, undergo this depletion, and consequently, B-cell depletion also occurs.³¹ This process is detrimental in fighting tumor initiation since these cells are cytotoxic and responsible for attack signals to cancer cells. Consequently, their reduction facilitates tumor growth.⁴⁰

The Th17 response, identified by interleukins IL-17 and IL-22, IL-17, was not altered. On the other hand, IL-22 showed an increase in men facing pesticide exposure. According to the authors, the reason is uncertain, and only one study addressed the Th17 type response.¹⁸ The Th1 and Th17 responses are essential in activating cells and cytokine production in immunity against tumors, in surveillance against tumor initiation, or even conferring an unfavorable prognosis to cancer patients when compromised.^{16,18}

According to the literature, the role of the Th17 response seems adaptive to the environment; depending on the situation, such as in a tumor microenvironment, it can be harmful. However, when activated by the immune system, it helps fight and grow cancer cells. Therefore, there are many limitations to this type of response due to the scarcity of studies on its role in tumor immunity, generating uncertainty.³⁴

Alternatively, studies show an exacerbated increase in Th2 type responses, and this type of response is thought to be the leading promoter of tumors, here represented by the production of the interleukins IL-4 and IL-10. As mentioned throughout this review, these are known for their pro-tumor role.^{16,31}

Thus, immune dysregulation and the disordered cascade of cytokine production and suppression plus the increase in Th2 response at the expense of Th1 favor an extremely pro-tumor microenvironment, considerably increasing the risk of cancer in people exposed to pesticides.^{16,31}

Finally, it is worth mentioning that the NK cell, another of the primary tumor-fighting cells, also showed alterations in our review. Studies show that pesticide exposure causes a reduction of these cells in humans,^{6,13} creating a favorable microenvironment for cancer development since they are responsible for recognizing foreign cells and inducing apoptosis, preventing the initiation of a neoplasm.⁴¹

CONCLUSION

Exposure to pesticides causes immunological disturbances that impact innate and adaptive immunity, interfering in its functionality through the dysregulation of several cells and cytokine production, causing immunosuppression. Finally, this dysregulation is paramount for cancer progression and may generate an unfavorable prognosis in populations chronically exposed to pesticides.

REFERENCES

¹Araujo CAT, Camel TO. 2020. Os organofosforados: da segunda guerra mundial à agricultura.http://www.hcte.ufrj.br/downloads/sh/sh6/SHVI/trabalhos%20posterres%20completos/POSTER_09.pdf. [accessed 18 February 2022].

²Cassal VB, Azevedo LF, Ferreira RP, Silva DG, Simão RS. 2014. Pesticidas: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. *Revista eletrônica em gestão educação e tecnologia ambiental* 18(1):437-445, <https://doi.org/10.5902/2236117012498>.

³Araújo AJ, Lima JS, Moreira JC, Jacob SC, Soares MO, Monteiro MCM, et al. 2007. Multiple exposure to pesticides and impacts on health: a cross-section study of 102 rural workers, Nova Friburgo, Rio de Janeiro State, Brazil. *Ciência & saúde coletiva* 12(1):115-130, PMID: 17680063, <https://doi.org/10.1590/S1413-81232007000100015>.

⁴Benedetti D, Nunes E, Sarmiento M, Porto C, Santos CEI, Dias JF, et al. 2013. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutation research* 752(1-2):28-33, PMID: 23347873, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.01.001>.

⁵Miranda AC, Moreira JC, Carvalho R, Peres F. 2007. Neoliberalism, pesticide consumption and food sovereignty crisis in Brazil. *Ciência & Saúde Coletiva* 12(1):7-14, PMID: 17680050, <https://doi.org/10.1590/S1413-81232007000100002>.

⁶Selvan RS, Dean TN, Misra HP, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. 1989. Aldicarb suppresses macrophage but not natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity of tumor cells. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 43:676-682, PMID: 2804406, <https://doi.org/10.1007/BF01701987>.

⁷Panis C, Kawassaki ACB, Crestani APJ, Pascotto CR, Bortoloti DS, Vicentini GE, et al. 2022. Evidence on human exposure to pesticides and the occurrence of health hazards in the Brazilian population: a systematic review. *Frontiers in public health* 9:787438, PMID: 35071167, <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.787438>.

⁸ Thong T, Forté CA, Hill EM, Colacino JA. 2019. Environmental exposures, stem cells, and cancer. *Pharmacology & therapeutics* 204:107398, PMID: 31376432, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.107398>.

⁹Jacobsen-Pereira CH, Cardoso CC, Gehlen TC, Santos CR, Santos-Silva MC. 2020. Immune response of Brazilian farmers exposed to multiple pesticides. *Ecotoxicology and environmental safety* 202:110912, PMID: 32800247, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110912>.

¹⁰Arici M, Abudayyak M, Boran T, Özhan G. 2020. Does pendimethalin develop in pancreatic cancer induced inflammation?. *Chemosphere* 252:126644, PMID: 32443284, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126644>.

¹¹Camargo MR, Akamine PVT, Venturini J, Arruda MSP, Silva Franchi CA. 2018. Pesticide dichlorvos induces early solid Ehrlich tumoral development associated with a non-protective pro-inflammatory response. *Environmental science and pollution research* 25(8):7681-7687, PMID: 29285702, <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1104-x>.

¹²Moher D, Shamseer L, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. 2015. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Systematic reviews* 4:1, PMID: 25554246, <https://doi.org/10.1186/2046-4053-4-1>.

¹³Faustini A, Settimi L, Pacifici R, Fano V, Zuccaro P, Forastiere F. 1996. Immunological changes among farmers exposed to phenoxy herbicides: preliminary observations. *Occupational and environmental medicine* 53(9):583-585, PMID: 8882113, <https://doi.org/10.1136/oem.53.9.583>.

¹⁴Neta G, Goldman LR, Barr D, Apelberg BJ, Witter FR, Halden RU. 2011. Fetal exposure to chlordane and permethrin mixtures in relation to inflammatory cytokines and birth outcomes. *Environmental science & technology* 45(4):1680-1687, PMID: 21235202, <https://doi.org/10.1021/es103417j>.

¹⁵Costa C, Rapisarda V, Catania S, Di Nola C, Ledda C, Fenga C. 2013. Cytokine patterns in greenhouse workers occupationally exposed to α -cypermethrin: an observational study. *Environmental toxicology and pharmacology* 36(3):796-800, PMID: 23958972, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.004>.

¹⁶Volker D, Wolfgang H, Klausdieter B, Caner S, Christian C, Gerhard O. 2010. Associations of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) 4.4 and Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) 4.4 blood levels with plasma IL-4. *Archives of environmental health: an international journal*, 57(6):541-547, PMID: 12696651, <https://doi.org/10.1080/00039890209602086>.

¹⁷Pizzatti L, Kawassaki ACB, Fadel B, Nogueira FCS, Evaristo JAM, Woldmar N, et al. 2020. Toxicoproteomics disclose pesticides as downregulators of tnf- α , il-1 β and estrogen receptor pathways in breast cancer women chronically exposed. *Frontiers in oncology* 10:1698, PMID: 32984049, <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01698>.

¹⁸Fenga C, Gangemi S, Catania S, Luca A, Costa C. 2014. IL-17 and IL-22 serum levels in greenhouse workers exposed to pesticides. *Inflammation Research* 63:895-897, PMID: 25138977, <https://doi.org/10.1007/s00011-014-0769-6>.

¹⁹Medina-Buelvas D, Estrada-Muñiz E, Flores-Valadez M, Vega L. 2019. Genotoxic and immunotoxic effects of the organophosphate metabolite diethyldithiophosphate (DEDTP) in Vivo. *Toxicology and applied pharmacology* 366:96-103, PMID: 30703381, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.023>.

²⁰Burow ME, Tang Y, Collins-Burow BM, Krajewski S, Reed JC, McLachlan JA, Beckman BS. 1999. Effects of environmental estrogens on tumor necrosis factor α -mediated apoptosis in MCF-7 cells. *Carcinogenesis* 20(11):2057-2061, PMID: 10545406, <https://doi.org/10.1093/carcin/20.11.2057>.

²¹Udoji F, Martin T, Etherton R, Whalen MM. 2010. Immunosuppressive effects of triclosan, nonylphenol, and DDT on human natural killer cells in vitro. *Journal of Immunotoxicology* 7(3):205-212, PMID: 20297919, <https://doi.org/10.3109/15476911003667470>.

²²Hurd-Brown T, Udoji F, Martin T, Whalen MM. 2013. Effects of DDT and triclosan on tumor-cell binding capacity and cell-surface protein expression of human natural killer cells. *Journal of applied toxicology* 33(6):495-502, PMID: 22729613, <https://doi.org/10.1002/jat.2767>.

²³Martin TJ, Gabure S, Maise J, Snipes S, Peete M, Whalen MM. 2019. The organochlorine pesticides pentachlorophenol and dichlorodiphenyltrichloroethane increase secretion and production of interleukin 6 by human immune cells. *Environmental toxicology and pharmacology* 72:103263, PMID: 31542660, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103263>.

²⁴Whalen MM, Loganathan BG, Yamashita N, Saito T. 2003. Immunomodulation of human natural killer cell cytotoxic function by triazine and carbamate pesticides. *Chemico-Biological interactions* 145(3):311-319, PMID: 12732457, [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(03\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(03)00027-9).

²⁵Gargouri B, Boukholda K, Kumar A, Benazzouz A, Fetoui H, Fiebich BL, et al. 2020. Bifenthrin insecticide promotes oxidative stress and increases inflammatory mediators in human neuroblastoma cells through NF-kappaB pathway. *Toxicology in vitro* 65:104792, PMID: 32061760, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104792>.

²⁶Shah HK, Sharma T, Banerjee BD. 2020. Organochlorine pesticides induce inflammation, ROS production, and DNA damage in human epithelial ovary cells: an in vitro study. *Chemosphere* 246:125691, PMID: 31887490, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125691>.

²⁷Teyssier L, Sorci G, Chluba J, Aimé S, Wendehenne D, Lamotte O, Connat JL. 2020. Some Plant Defense Stimulators can induce IL-1 β production in human immune cells in vitro. *Toxicology reports* 7:413-420, PMID: 32140425, <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.02.013>.

²⁸Peres F, Moreira JC. 2003. É veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente. *Fiocruz* 9:384, <https://static.scielo.org/scielobooks/sg3mt/pdf/peres-9788575413173.pdf> [accessed 18 March 2022].

²⁹Gangemi S, Gofita E, Costa C, Teodoro M, Briguglio G, Nikitovic D, et al. 2016. Occupational and environmental exposure to pesticides and cytokine pathways in chronic diseases (review). *International journal of molecular medicine* 38(4):1012-1020, PMID: 27600395, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2728>.

³⁰Karrow NA, McCay JA, Brown RD, Musgrove DL, Guo TL, Germolec DR, et al. 2005. Oral exposure to atrazine modulates cell-mediated immune function and decreases host resistance to the B16F10 tumor model in female B6C3F1 mice. *Toxicology* 209(1):15-28, PMID: 15725510, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.12.002>.

³¹Jorsaraei SGA, Maliji G, Azadmehr A, Moghadamnia AA, Faraji AA. 2014. Immunotoxicity effects of carbaryl in vivo and in vitro. *Environmental toxicology and pharmacology* 38(3):838–844, PMID: 25461543, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.09.004>.

³²Téllez-Bañuelos MC, Haramati J, Franco-Topete K, Peregrina-Sandoval J, Franco-Topete, R, Zaitseva GP. 2016. Chronic exposure to endosulfan induces inflammation in murine colon via β -catenin expression and IL-6 production. *Journal of immunotoxicology* 13(6):842-849, PMID: 27494533, <https://doi.org/10.1080/1547691X.2016.1206998>.

³³Horssen VR, Hagen TLMT, Eggermont AMM. 2006. TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *The oncologist* 11(4): 397-408, PMID: 16614236, <https://doi.org/10.1634/theoncologist.11-4-397>.

³⁴Karpisheh V, Ahmadi M, Abbaszadeh-Goudarzi K, Saray MM, Barshidi A, Mohammadi H, et al. 2022. The role of Th17 cells in the pathogenesis and treatment of breast cancer. *Cancer cell Int* 22:108, PMID: 35248028, <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02528-8>.

³⁵Zeng S, Peng Y, Ma J, Ge Y, Huang Y, Xie S, et al. 2022. Hematopoietic stem cell and immunotoxicity in zebrafish embryos induced by exposure to Metalaxyl-M. *Science of the total environment* 809:152102, PMID: 34863748, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152102>.

³⁶Quinteiro-Filho WM, Righi DA, Palermo-Neto J. 2009. Effect of cyhalothrin on ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. *Brazilian journal of medical and biological research* 42:912–917, PMID: 15905015, <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009001000006>.

³⁷Noworyta-Głowacka J, Bańkowski R, Siennicka J, Wiadrowska B, Beresińska M, Ludwicki JK. 2011. Influence of chlorpyrifos on the profile of subpopulations of immunoactive cells and their phagocytic activity in an experimental in vivo model. *Annals of agricultural and environmental medicine* 19(3):483-485, PMID: 23020043.

³⁸Xue H, Lin B, Ni P, Xu H, Huang G. 2010. Interleukin-1B and interleukin-1 RN polymorphisms and gastric carcinoma risk: a meta-analysis. *Journal of gastroenterology and hepatology* 25:1604-1617, PMID: 20880168, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06428>.

³⁹Lee GH, Hwang KA, Choi KC. 2019. Effects of Fludioxonil on the cell growth and apoptosis in T and B lymphocytes. *Biomolecules*, 9(9):500, PMID: 31540454, <https://doi.org/10.3390/biom9090500>.

⁴⁰Standish LJ, Sweet ES, Novack J, Wenner CA, Bridge C, Nelson, A, et al. 2008. Breast cancer and the immune system. *Journal of the society for integrative oncology* 6(4):158-168, PMID: 19134448.

⁴¹Hurd T, Walker J, Whalen MM. 2012. Pentachlorophenol decreases tumor-cell-binding capacity and cell-surface protein expression of human natural killer cells. *Journal of applied toxicology* 32(8):627, PMID: 22912977, <https://doi.org/10.1002/jat.1781>.

TABLES

Table 1. Results in chronological order and publication of studies selected in full to compose the systematic review.

Author and year	Title article	Access link
Sevan <i>et al.</i> , (1989)	Aldicarb suppresses macrophage but not natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity of tumor cells.	DOI: 10.1007/BF01701987
Faustini <i>et al.</i> , (1996).	Immunological Changes among Farmers Exposed to Phenoxy Herbicides: Preliminary Observations	DOI: 10.1136/oem.53.9.583
Burow <i>et al.</i> , (1999)	Effects of environmental estrogens on tumor necrosis factor α -mediated apoptosis in MCF-7 cells	DOI: 10.1093/carcin/20.11.2057
Whalen <i>et al.</i> , (2003)	Immunomodulation of human natural killer cell cytotoxic function by triazine and carbamate pesticides	DOI: 10.1016/S0009-2797(03)00027-9
Karrow <i>et al.</i> , (2005)	Oral exposure to atrazine modulates cell-mediated immune function and decreases host resistance to the B16F10 tumor model in female B6C3F1 mice	DOI: 10.1016/j.tox.2004.12.002
Quinteiro-Filho <i>et al.</i> , (2009)	Effect of cyhalothrin on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice	DOI: 10.1590/S0100-879X200901000006
Udoji <i>et al.</i> , (2010)	Immunosuppressive effects of triclosan, nonylphenol, and DDT on human natural killer cells in vitro	DOI: 10.3109/15476911003667470
Volker <i>et al.</i> , (2010).	Associations of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) 4.4	DOI: 10.1080/00039890209602086

	and Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) 4.4 Blood Levels with Plasma IL-4	
Noworyta-Głowacka <i>et al.</i> , (2011)	Influence of chlorpyrifos on the profile of subpopulations of immunoactive cells and their phagocytic activity in an experimental in vivo model	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23020043/
Neta <i>et al.</i> , (2011).	Fetal Exposure to Chlordane and Permethrin Mixtures in Relation to Inflammatory Cytokines and Birth Outcomes	DOI: 10.1021/es103417j
Hurd <i>et al.</i> , (2012)	Pentachlorophenol decreases tumor-cell-binding capacity and cell-surface protein expression of human natural killer cells	DOI: 10.1002/jat.1781
Costa <i>et al.</i> , (2013)	Cytokine patterns in greenhouse workers occupationally exposed to α -cypermethrin: an observational study	DOI: 10.1016/j.etap.2013.07.004
Hurd-Brown <i>et al.</i> , (2013)	Effects of DDT and triclosan on tumor-cell binding capacity and cell-surface protein expression of human natural killer cells	DOI: 10.1002/jat.2767
Jorsaraei <i>et al.</i> , (2014)	Immunotoxicity effects of carbaryl in vivo and in vitro	DOI: 10.1016/j.etap.2014.09.004
Fenga <i>et al.</i> , (2014)	IL-17 and IL-22 serum levels in greenhouse workers exposed to pesticides	DOI: 10.1007/s00011-014-0769-6
Télez-Bañuelos <i>et al.</i> , (2016)	Chronic exposure to endosulfan induces inflammation in murine colon via β -catenin expression and IL-6 production	DOI: 10.1080/1547691X.2016.1206998
De Camargo <i>et al.</i> , (2018)	Pesticide dichorvos induces early solid Ehrlich tumoral development associated with a non-protective pro-inflammatory response	DOI: 10.1007/s11356-017-1104-x

Martin <i>et al.</i> , (2019)	The organochlorine pesticides pentachlorophenol and dichlorodiphenyltrichloroethane increase secretion and production of interleukin 6 by human immune cells	DOI: 10.1016/j.etap.2019.103263
Martin <i>et al.</i> , (2019)	Exposures to the environmental contaminants pentachlorophenol and dichlorodiphenyltrichloroethane increase production of the proinflammatory cytokine, interleukin-1 β , in human immune cells	DOI: 10.1002/jat.3798
Medina-Buevas <i>et al.</i> , (2019)	Genotoxic and immunotoxic effects of the organophosphate metabolite diethyldithiophosphate (DEDTP) in Vivo	DOI: 10.1016/j.taap.2019.01.023
Jacobsen-Pereira <i>et al.</i> , (2020)	Immune response of Brazilian farmers exposed to multiple pesticides	DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110912
Pizatti <i>et al.</i> , (2020)	Toxicoproteomics Disclose Pesticides as Downregulators of TNF- α , IL-1 β and Estrogen Receptor Pathways in Breast Cancer Women Chronically Exposed	DOI: 10.3389/fonc.2020.01698
Arici <i>et al.</i> , (2020)	Does pendimethalin develop in pancreatic cancer induced inflammation?	DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126644
Teyssier <i>et al.</i> , (2020)	Some Plant Defense Stimulators can induce IL-1 β production in human immune cells in vitro	DOI: 10.1016/j.toxrep.2020.02.013
Gargouri <i>et al.</i> , (2020)	Bifenthrin insecticide promotes oxidative stress and increases inflammatory mediators in human neuroblastoma cells through NF-kappaB pathway	https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104792

Shah <i>et al.</i> , (2020)	Organochlorine pesticides induce inflammation, ROS production, and DNA damage in human epithelial ovary cells: An in vitro study	DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125691
Zeng <i>et al.</i> , (2022)	Hematopoietic stem cell and immunotoxicity in zebrafish embryos induced by exposure to Metalaxyl-M	https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152102

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Flow diagram for searching and extracting data

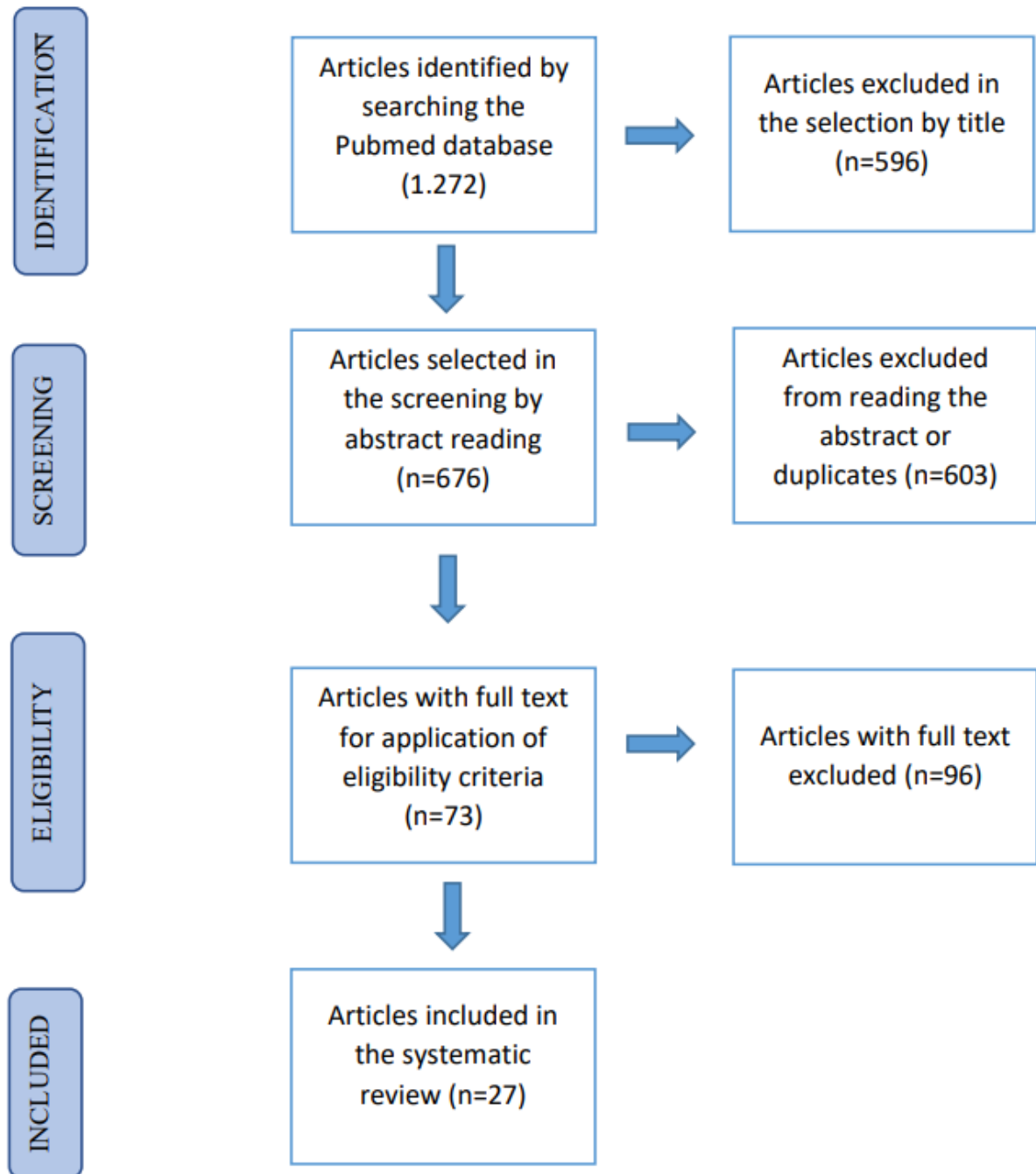


Figure 1 - Flowchart of search results in databases.

Figure 2. Mechanism of dysregulation of immune system cells and cytokines through exposure to pesticides based on in vivo and in vitro studies.

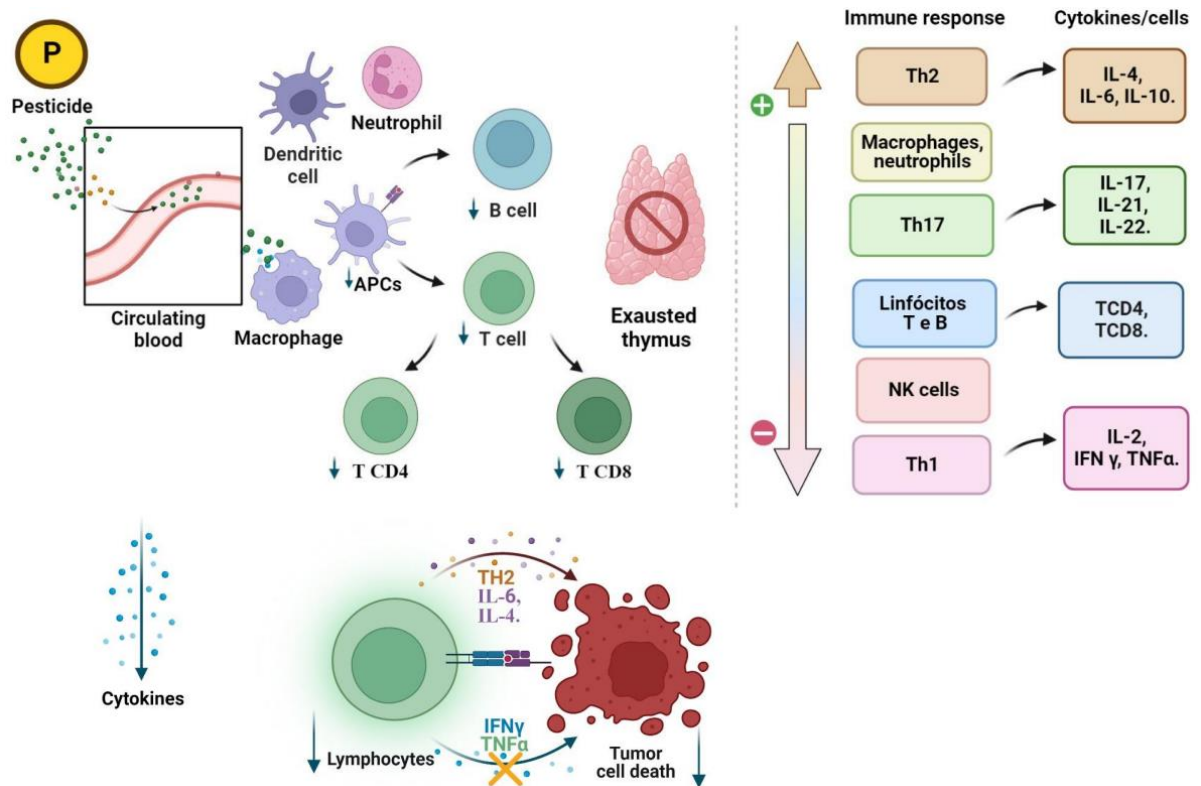


Figure 2 - Pesticides enter the bloodstream, being engulfed by Antigen-presenting cells (APCs), dendritic cells, and macrophages. Then, they are forwarded to lymphoid organs such as the thymus, which may become exhausted and diminish cells of the B-lymphocyte, T-lymphocyte, TCD4, and TCD8 types. Due to this mechanism, there is a downregulation of cytokines, increased Th2 response, decreased Th1, and increased tumor susceptibility.

4. ARTIGO CIENTÍFICO 2

RESEARCH ARTICLE

A exposição ocupacional a agrotóxicos causa desregulação imunológica sistêmica em citocinas dos padrões Th1/Th2/Th17 e se correlaciona com piores desfechos clínicos em pacientes com câncer de mama.

Resumo:

Os agrotóxicos são compostos conhecidos por causar desregulação imunológica em indivíduos expostos, que têm potencial para modificar substancialmente o prognóstico de patologias dependentes de uma resposta imune eficiente, como o câncer de mama. Nesse contexto, examinamos o perfil de citocinas circulantes dos padrões Th1/Th2/Th17 em mulheres ocupacionalmente expostas a agrotóxicos e sua correlação com piores desfechos prognósticos. Amostras de sangue periférico foram coletadas de 187 mulheres trabalhadoras rurais com câncer de mama, ocupacionalmente expostas ou não a agrotóxicos, para quantificar os níveis das citocinas IL-1 β , IL-12, IL-4, IL-17-A e TNF- α . Os dados sobre o perfil da doença e os desfechos clínicos foram coletados por meio de acompanhamento médico. Níveis significativamente reduzidos de IL-17A foram observados em pacientes expostos com tumores do subtipo Luminal B, com altas taxas de proliferação de ki67, alto grau histológico e positivo para o receptor de progesterona. A IL-12 foi reduzida em mulheres expostas com tumores maiores que 2 cm e naquelas com metástases linfonodais. A redução de IL-4 também foi observada em mulheres expostas com invasão de linfonodos. Nossos dados mostram que a exposição ocupacional a agrotóxicos induz mudanças significativas nos níveis de citocinas necessárias para o controle do tumor e se correlaciona com desfechos clínicos de mau prognóstico no câncer de mama.

Palavras-chave: câncer de mama; prognóstico, resposta imune, citocinas.

INTRODUÇÃO

Os pesticidas são amplamente utilizados no Brasil e no mundo. Os impactos da exposição ambiental e ocupacional são amplos, consistindo em um problema de saúde pública. Esses agentes químicos são capazes de se acumular no organismo e interagir com processos bioquímicos normais, tornando-se um fator de risco para diversas doenças como o câncer de mama (HE *et al.*, 2017). Além de interferir em processos biológicos por criar um microambiente favorável para o desenvolvimento do tumor, a exposição a pesticidas ainda está associada a um pior prognóstico da doença (PIZZATTI *et al.*, 2020).

Em populações onde há uma predominância da agricultura familiar, como por exemplo nos estados da região Sul do Brasil, o trabalho envolvendo a aplicação e manuseio de pesticidas não diz respeito somente ao homem. A mulher possui participação em algumas ou todas as etapas, que vai desde o preparo, diluição e aplicação, até a descontaminação e lavagem das roupas de proteção e utensílios utilizados (RECH, 2018).

Panis e colaboradores (2021), caracterizaram o perfil de exposição ocupacional das mulheres do Sudoeste do Paraná, Brasil, e observaram incidência de câncer de mama de elevada agressividade na população de mulheres ocupacionalmente expostas aos pesticidas. Ademais, alguns estudos demonstram que os pesticidas, participam da fisiopatologia do câncer por diferentes mecanismos, dentre eles a desregulação imunológica, que contribui para o desenvolvimento tumoral (CALAF, 2021).

O sistema imune funciona de maneira ordenada a partir de células e citocinas que atuam via mecanismos sinérgicos para manter a homeostase. Contudo, este equilíbrio é muito sensível à ação de substâncias tais como os pesticidas. Os pesticidas possuem baixo peso molecular, sendo assim, acabam penetrando na pele com facilidade, pelo ar, através das vias respiratórias e olhos, tornando-se responsáveis por alterações estruturais e funcionais da rede imunológica (GANGEMI *et al.*, 2016).

Deste modo, a exposição a pesticidas pode prejudicar a imunidade, e perturbar o sistema endócrino, alterando a produção de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas (JACOBSEN-PEREIRA *et al.*, 2020).

As citocinas inflamatórias desempenham um papel fundamental na progressão das células tumorais alterando o microambiente tumoral. Elas também afetam diretamente o crescimento, invasão celular e metástase das células cancerosas (ARICI *et al.*, 2020). E a relação com o consumo de pesticidas dificulta, por sua vez, a ação da resposta imune contra tumores e, conseqüentemente, cria condições favoráveis para o desenvolvimento da neoplasia (CAMARGO *et al.*, 2017).

Esses ambientes imunológicos tumorais modificados pelos pesticidas, pode ainda interferir no prognóstico da doença, através de condições clinicopatológicas desfavoráveis (PANIS *et al.*, 2020). Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar se mulheres com câncer de mama expostas a pesticidas apresentam desregulação imunológica de citocinas em relação aos desfechos de pior prognóstico.

METODOLOGIA

Aspectos legais

Este estudo encontra-se aprovado no Comitê de Ética Institucional da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) sob 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).

Desenho do estudo

Trata-se de um estudo transversal, sendo uma parte retrospectiva e outra prospectiva, onde foram avaliados parâmetros de dados primários de mulheres atendidas no Hospital do Câncer de Francisco Beltrão – Paraná, Brasil, entre os anos de 2015 e 2021. O CEONC é um hospital público de Oncologia que reúne um grande

número de mulheres de todos os 27 municípios incluídos na 8ª Regional de Saúde do Paraná para o rastreamento do câncer de mama anualmente. O estudo foi realizado com o objetivo de atingir tanto pacientes oncológicas quanto não oncológicas, expostas ocupacionalmente ou não a pesticidas. Porém, nesse estudo foram incluídas pacientes oncológicas apenas com câncer de mama (sem outros tipos de neoplasias), por ser a neoplasia predominante na população estudada. A confirmação do diagnóstico de câncer de mama foi obtida a partir de prontuários, gentilmente cedidos pelo hospital.

Durante o período, foram triadas todas as pacientes que apresentaram tumor mamário, tanto maligno quanto benigno, porém, foram incluídas somente as que receberam o diagnóstico de câncer de mama, que aceitaram participar da pesquisa, responder os questionários propostos e que foi possível a coleta de sangue para análise de citocinas. Não foram incluídas as pacientes em que não foi possível realizar a coleta de dados clinicopatológicos, a verificação da exposição ou não a pesticidas, a análise de citocinas no plasma, bem como aquelas que não puderam ou não aceitaram participar de algum dos processos da pesquisa, por motivos distintos.

Instrumentos para coleta de dados

Após explicar o objetivo da entrevista e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido, o instrumento de coleta de dados sobre o perfil de exposição ocupacional aos agrotóxicos foi aplicado por uma equipe treinada para realizar a coleta de dados padronizada. A entrevista foi realizada no leito do hospital com o paciente confortavelmente alocado, sem comprometer os procedimentos médicos que estavam em andamento.

Questionário

Um questionário foi elaborado como instrumento para coleta de dados para inicialmente identificar aspectos relacionados à exposição a agrotóxicos das mulheres entrevistadas, tanto no presente, quanto no passado, a fim de definir os grupos de pacientes expostas e não expostas a pesticidas.

Quanto à sua estrutura, inicialmente, nas questões 1 a 4, o formulário identifica o município da paciente, se mora no interior ou na cidade, e o tempo de residência nesses locais (anos). Posteriormente, pergunta sobre a agricultura baseada em pesticidas e, em caso afirmativo, quem aplica esses produtos e por quantos anos. As questões de 5 a 15 caracterizaram a exposição de mulheres e familiares a agrotóxicos atualmente, e as questões de 16 a 27, no passado. Com base nessas questões (5-27), foi possível identificar se as mulheres estiveram ou não expostas ocupacionalmente aos agrotóxicos, o tipo de exposição (contato direto ou indireto) e quanto tempo durou a exposição. As questões 28 a 31 eram sobre sintomas potencialmente relacionados ao uso de agrotóxicos e se a família consumia algum produto propriamente cultivado com essas substâncias. Por fim, o formulário levou em consideração aspectos de saúde das mulheres e suas famílias.

O instrumento de coleta de dados foi aplicado por uma equipe científica previamente treinada para esse fim.

Definição dos grupos quanto à exposição a pesticidas

A partir das respostas, foram criados dois grupos de exposição ocupacional a pesticidas: 1) mulheres expostas direta e indiretamente; 2) mulheres não expostas ocupacionalmente. A exposição direta foi definida por mulheres que responderam positivamente a pelo menos uma das seguintes perguntas "Você aplica agrotóxicos atualmente?" (Pergunta 7); "Você já aplicou pesticidas?" (Questão 15); "Você lava ou já lavou as roupas de alguém da família após a aplicação de agrotóxicos?" (Questão 19). O grupo exposto indiretamente foi composto por pacientes que responderam positivamente a pelo menos uma das seguintes perguntas "Algum vizinho seu usa agrotóxicos?" (Questão 23); "Algum vizinho seu usou pesticidas?" (Questão 24). Assim, buscou-se identificar se havia alguma forma de exposição, mesmo que distante aos agrotóxicos. O grupo não exposto ocupacionalmente foi composto por pacientes que responderam negativamente a todas as questões relacionadas as duas subclassificações do outro grupo (de expostos).

Prontuários médicos

A categorização do perfil clinicopatológico e agressividade do câncer de mama das pacientes foi realizada através de coleta de dados referente ao comportamento intrínseco do tumor, presentes nos laudos histopatológicos das biópsias e nos prontuários médicos. Foram avaliadas as seguintes informações como fatores de prognóstico: expressão de receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor de fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), índice de proliferação tumoral mensurado pelo ki67 maior que 14%, subtipo molecular do câncer de mama, tamanho do tumor, grade histológica, êmbolo intratumoral, presença de metástases em linfonodos axilares, metástase a distância, idade ao diagnóstico (definido como precoce ou tardio), status menopausal, índice de massa corporal (IMC), ocorrência de recidiva e perfil de sobrevida.

Coleta sanguínea e obtenção do perfil de citocinas.

A coleta sanguínea das pacientes ocorreu durante a consulta das mesmas ao CEONC. O sangue foi coletado via punção venosa no antebraço e disposto em tubos contendo heparina. Posteriormente o sangue foi centrifugado por 5 minutos a 4.000 rpm, o sobrenadante denominado plasma foi separado e, logo em seguida, armazenado em congelador a -20° C, até o momento de realização das análises.

Para quantificação dos níveis plasmáticos das citocinas, foram mensuradas interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) para representar a resposta em nível de Th1 das pacientes; interleucina 4 (IL-4) para respostas Th2 e finalmente a interleucina 17 A (IL-17-A) a fim de investigar a resposta Th17. Para isso, utilizou-se o método de imunoenensaio enzimático (ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) por meio de kits comerciais (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 de cada kit foi de 2 pg/mL.

Análises estatísticas

O estudo estatístico foi realizado com o intuito de avaliar se existem diferenças entre o perfil imunológico de citocinas de pacientes com câncer expostas e não-expostas ocupacionalmente a pesticidas sob diferentes parâmetros clinicopatológicos. Também foi caracterizada a amostra no que tange aos aspectos clinicopatológico das pacientes, comparando as mulheres expostas e as não expostas ocupacionalmente a pesticidas.

As frequências das categorias de cada variável clinicopatológica, foram comparadas para as pacientes pertencentes a ambos os grupos utilizando o teste Qui-quadrado para aderência. Além disso, fez-se uso deste mesmo teste para comparar os grupos segundo as categorias de cada variável. Os testes foram feitos com 5% de significância estatística.

Para cada variável foi realizado ainda 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, também 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.

Os dados foram tabulados em planilhas do programa Microsoft Excel ®. As análises citadas acima foram realizadas no software R (R Development Core Team, 2022) e o software IBM SPSS Statistics®, versão 25 foi utilizado para comparação entre as variáveis clinicopatológicas e níveis de citocinas, na criação de gráficos box-plot.

RESULTADOS

Foram incluídas no presente estudo 187 mulheres (111 expostas ocupacionalmente a pesticidas e 71 não expostas). A idade das pacientes variou entre 30 e 82 anos, com uma média e mediana de 55 anos, com desvio padrão $\pm 12,7$.

Perfil clinicopatológico

Analisando as pacientes não expostas aos pesticidas, foi verificado que (Tabela 1; p-valores₁ $\leq 0,05$): o receptor de estrogênio foi positivo em cerca de 65% dos casos, enquanto a expressão de HER2 foi negativa em 78,87% das mulheres deste grupo. O ki67 foi maior ou igual a 14% para a maioria dos casos (52,11%). Os subtipos moleculares mais verificados foram Luminal A (29,58%) e Luminal B (30,99%). O tamanho tumoral foi superior a 20 mm (47,89%), não havendo embolia intratumoral (66,20%). Nenhum linfonodo estava acometido em 60,56% das mulheres, e em apenas 8,45% foi constatada metástase à distância. Na maioria dos casos deste grupo o diagnóstico foi considerado tardio (59,15%), em mulheres já na menopausa (66,20%) e com sobrepeso/obesas (56,34%). Como desfecho, não houve quimioresistência (63,38%), recorrência (83,10%) ou óbito (90,14%) na maioria das pacientes. Não houve diferença estatística entre as categorias das variáveis receptor de progesterona, agressividade do tumor (mais e menos agressivo) e grau histológico (Tabela 1; p-valores₁ $> 0,05$).

Em relação às mulheres expostas aos pesticidas, se constatou que (Tabela 1; p-valores₂ $\leq 0,05$): o receptor de estrogênio foi positivo em cerca de 62% dos casos e a expressão de HER2 foi negativa em 78,38% das mulheres deste grupo. Os subtipos moleculares mais verificados foram Luminal A (34,23%) e TN (29,58%). O tamanho tumoral foi superior a 20 mm (53,15%), com grau histológico 2 (45,05%) e ausência de embolia intratumoral (54,05%). Nenhum linfonodo estava acometido em 53,15% das mulheres, tendo sido constatada metástase à distância em 10,81% dos casos. Na maioria das pacientes deste grupo o diagnóstico foi considerado tardio (64,86%), em mulheres já na menopausa (65,77%) e com sobrepeso/obesas (61,26%). Não houve quimioresistência (63,06%), recorrência (86,49%) ou óbito (94,59%) na maioria das

pacientes. Não foi verificada diferença estatística entre as categorias das variáveis receptor de progesterona, ki67>14% e agressividade do tumor (mais e menos agressivo) (Tabela 1; p-valores₂>0,05).

Em pacientes expostas, foi verificado maior chance de invasão em linfonodos, em que a constatação de pelo menos um linfonodo acometido foi 10% maior em mulheres expostas (34,23%) em relação as não expostas (23,94%) (p-valor₃<0,0001; Tabela 1). Outra característica foi que 5% a mais de mulheres expostas aos pesticidas apresentaram um IMC mais elevado, indicando sobrepeso ou obesidade (p-valor₃=0,0001; Tabela 1). Embora não tenha sido verificada diferença estatística em relação a frequência (p-valor₃=0,1336; Tabela 1), comparando as pacientes dos dois grupos é possível constatar que o subtipo molecular mais agressivo, TN, teve um percentual mais elevado entre as mulheres expostas aos pesticidas (29,58%), sendo o dobro em relação as não expostas (14,08%) (Tabela 1).

Não foi verificada dependência entre as categorias das variáveis e os grupos exposto e não exposto aos pesticidas (p-valores₄>0,05; Tabela 1).

Tabela 1 - Frequência (n) e porcentagem (%) de dados clinicopatológicos (variáveis discretas) considerando a exposição aos pesticidas.

Variável	Categoria	Não exposto		Exposto		p-valor ₃	p-valor ₄
		n (%)	p-valor ₁	n (%)	p-valor ₂		
Receptor de estrogênio	Negativo	14 (19.72)		25 (22.52)		0.0127	0.6498
	Positivo	46 (64.79)	<0.0001	69 (62.16)	<0.0001	0.0024	
	NA	11 (15.49)		17 (15.32)		-	
Receptor de progesterona	Negativo	30 (42.25)		46 (41.44)		0.0094	0.9727
	Positivo	31 (43.66)	0.8563	47 (42.34)	0.8834	0.0104	
	NA	10 (14.08)		18 (16.22)		-	

Expressão de HER-2	Negativo	56 (78.87)		87 (78.38)		0.0002	0.6809
	Positivo	5 (7.04)	<0.0001	6 (5.41)	<0.0001	0.6698	
	NA	10 (14.08)		18 (16.22)		-	
Ki67 (%)	< 14	24 (33.80)		42 (37.84)		0.0017	0.5115
	≥ 14	37 (52.11)	0.0186	52 (46.85)	0.1447	0.0245	
	NA	10 (14.08)		17 (15.32)		-	
Agressividade do tumor	Menos agressivo	26 (36.62)		45 (40.54)		0.0014	0.4828
	Mais agressivo	35 (49.30)	0.1032	48 (43.24)	0.6600	0.0436	
	NA	10 (14.08)		18 (16.22)		-	
Subtipo molecular do tumor	Luminal A	21 (29.58)		38 (34.23)		0.0017	0.8736
	Luminal B	22 (30.99)		29 (6.31)		0.1617	
	HER-2	5 (18.31)	0.0009	7 (16.22)	<0.0001	0.4142	
	Triplo-negativo	13 (14.08)		19 (29.58)		0.1336	
	NA	10 (34.23)		18 (30.99)		-	
Tamanho tumoral (em mm)	< 20	23 (32.39)		36 (32.43)		0.0167	0.7636
	≥ 20	34 (47.89)	0.0394	59 (53.15)	0.0008	0.0002	
	NA	14 (19.72)		16 (14.41)		-	
Grau histológico	1	19 (26.76)	0.1433	26 (23.42)	<0.0001	0.1400	0.3428

	2	26 (36.62)		50 (45.05)		<0.0001	
	3	16 (22.54)		17 (15.32)		0.8055	
	NA	10 (14.08)		18 (16.22)		-	
Embolia intratu-moral	Não	47 (66.20)		60 (54.05)		0.0755	0.0986
	Sim	14 (19.72)	<0.0001	33 (29.73)	<0.0001	<0.0001	
	NA	10 (14.08)		18 (16.22)		-	
Metástase em linfonodos	Nenhum acometido	43 (60.56)		59 (53.15)		0.0251	0.1665
	Pelo menos um acometido	17 (23.94)	<0.0001	38 (34.23)	0.0026	<0.0001	
	NA	11 (15.49)		14 (12.61)		-	
Metástase à distância	Não	54 (76.06)		85 (76.58)		0.0002	0.6505
	Sim	6 (8.45)	<0.0001	12 (10.81)	<0.0001	0.0455	
	NA	11 (15.49)		14 (12.61)		-	
Diagnósti-co	Precoce	29 (40.85)		39 (35.14)		0.2195	0.4373
	Tardio	42 (59.15)	0.0291	72 (64.86)	<0.0001	<0.0001	
Menopau-sa ao diagnósti-co	Não	23 (32.39)		34 (30.63)		0.0008	0.8803
	Sim	47 (66.20)	<0.0001	73 (65.77)	<0.0001	0.0394	
	NA	1 (1.41)		4 (3.60)		-	
IMC	Eutrófico	27 (38.03)	0.0247	36 (32.43)	<0.0001	0.1088	0.4520

	Sobrepeso/ Obeso	40 (56.34)		68 (61.26)		0.0001	
	NA	4 (5.63)		7 (6.31)		-	
Quimioresistência	Não	45 (63.38)		70 (63.06)		0.0010	
	Sim	14 (19.72)	<0.0001	22 (19.82)	<0.0001	0.0593	0.9793
	NA	12 (16.90)		19 (17.12)		-	
Recorrência	Não	59 (83.10)		96 (86.49)		<0.0001	
	Sim	9 (12.68)	<0.0001	13 (11.71)	<0.0001	0.2278	0.7974
	NA	3 (4.23)		2 (1.80)		-	
Óbito	Não	64 (90.14)	<0.0001	105 (94.59)	<0.0001	1	0.2551
	Sim	7 (9.86)	1	6 (5.41)	1	0.6949	

A frequência da categoria NA não foi considerada nas análises estatísticas. Valores em negrito, indicam que houve diferença estatística entre as categorias da variável. p-valor₁ do teste Qui-quadrado para aderência comparando as categorias de cada variável para as pacientes não expostas aos pesticidas; p-valor₂ do teste Qui-quadrado para aderência comparando as categorias de cada variável para as pacientes expostas aos pesticidas; p-valor₃ do teste Qui-quadrado para aderência comparando os grupos segundo as categorias de cada variável; p-valor₄ do teste Qui-quadrado para independência.

Associação entre o perfil de citocinas e condições clinicopatológicas

Os gráficos em forma de box-plot, representados pelas figuras 1, 2 e 3, a seguir, apresentam os resultados significativos, separados por níveis de resposta Th17, Th1 e Th2, com valores individuais de citocinas em relação ao perfil clinicopatológico.

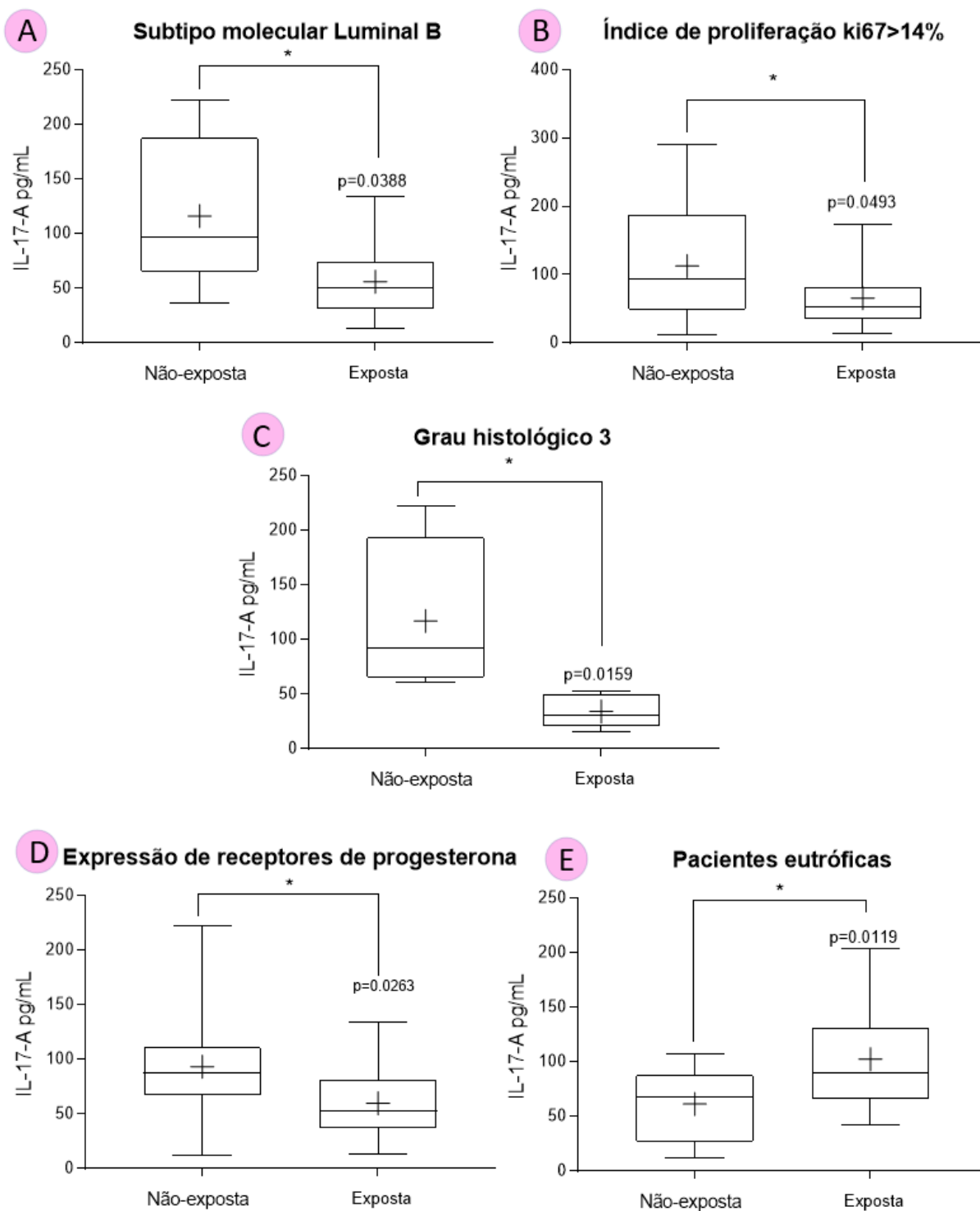


Figura 1 – Variações significativas no perfil Th17 sistêmico de mulheres portadoras de câncer de mama ocupacionalmente expostas ou não aos pesticidas. O perfil Th17 foi determinado através da dosagem da IL-17-A plasmática. Níveis detectados nos grupos exposto e não-exposto segundo as seguintes variáveis clinicopatológicas: A – Subtipo molecular Luminal B, B – índice de proliferação ki67, C – grau histológico tumoral, D – Presença de receptores de progesterona e E – Pacientes eutróficas. Os dados estão mostrados como box-plot das variações mínima, máxima e mediana. +

representa a média de cada grupo. Os valores de p estão apresentados nos gráficos, sendo considerado significativo quando $p < 0,05$.

Analisando o perfil de resposta Th17, demonstrou-se que dentre as pacientes com subtipo molecular Luminal B, houve diminuição na média da IL-17-A entre as mulheres expostas em comparação com não expostas a pesticidas (p-valor=0,0388; Figura 1A). Àquelas com índice de proliferação ki67 superior a 14% também apresentaram redução média entre a IL-17-A quando expostas em relação a aquelas não expostas (p-valor=0,0493; Figura 1B). A média de IL-17-A também foi estatisticamente diferente, sendo menor entre as expostas em comparação com não expostas (p-valor=0,0159; Figura 1C) dentre as pacientes com grau histológico 3. Mulheres com presença de receptores de progesterona ocupacionalmente expostas e não expostas, também tiveram declínio médio no valor da IL-17-A (p-valor=0,0263; Figura 1D). Por fim, nas pacientes eutróficas a IL-17-A diferiu estatisticamente, aumentando em média, entre as expostas e não expostas a pesticidas (p-valor=0,0119; Figura 1E).

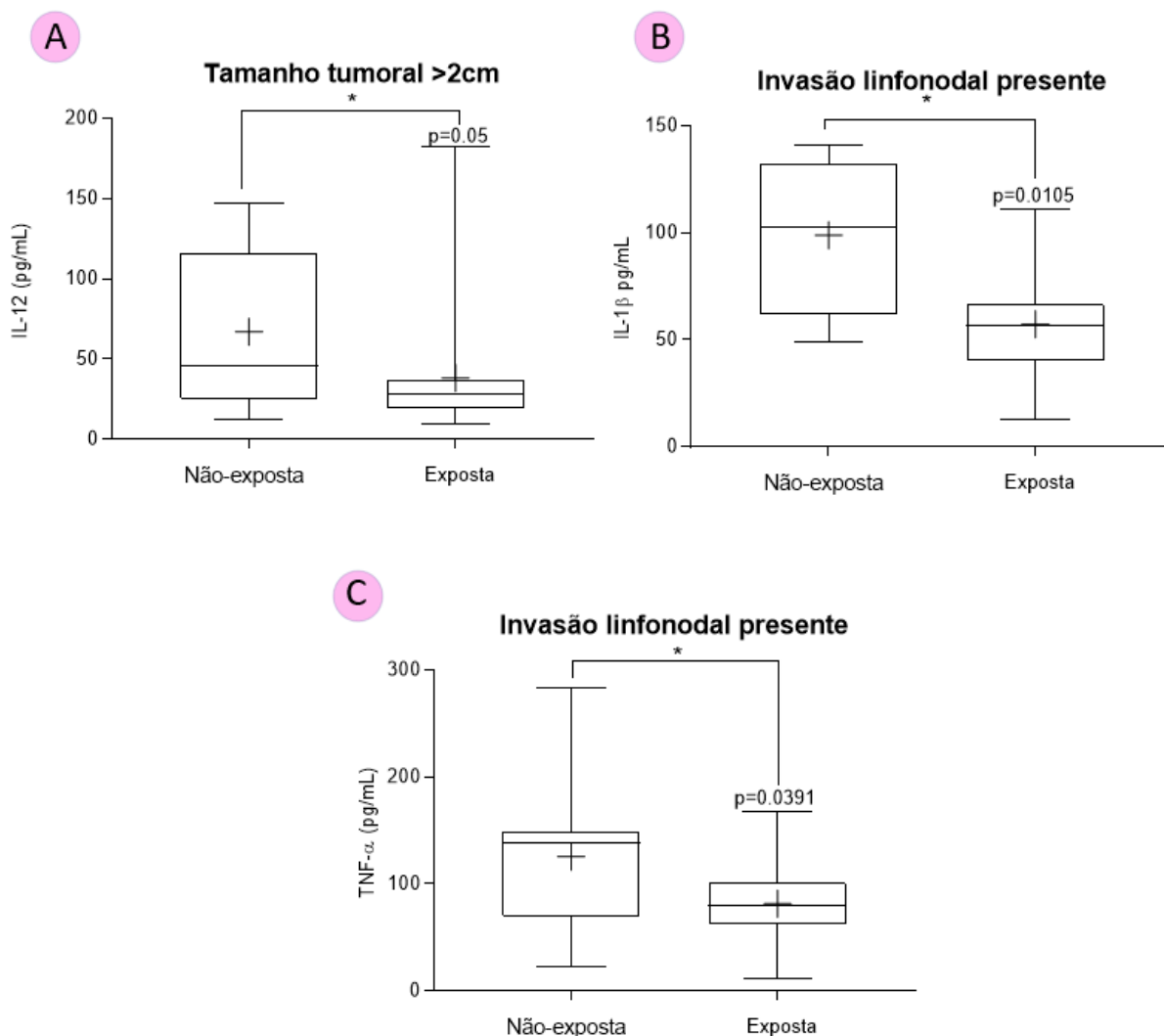


Figura 2 – Variações significativas no perfil Th1 sistêmico de mulheres portadoras de câncer de mama ocupacionalmente expostas ou não aos pesticidas. O perfil Th1 foi determinado através da dosagem plasmática da IL-12, IL-1 β e TNF- α . Níveis detectados nos grupos exposto e não-exposto segundo as seguintes variáveis clinicopatológicas: A – Tamanho tumoral acima de 2 cm para IL-12, B – presença de invasão linfonodal para IL-1 β e C – presença de invasão linfonodal para TNF- α . Os dados estão mostrados como box-plot das variações mínima, máxima e mediana. + representa a média de cada grupo. Os valores de p estão apresentados nos gráficos, sendo considerado significativo quando $p < 0,05$.

Quando analisado a resposta Th1, pacientes com tamanho tumoral maior que 2 cm tiveram níveis médios de IL-12 menores entre os grupos de mulheres expostas e não expostas (p -valor=0,0500; Figura 2A). Mulheres com presença de invasão linfonodal apresentaram redução entre os grupos na dosagem plasmática média de:

IL-1 β (p-valor=0,0105; Figura 2B), TNF- α (p-valor=0,0391; Figura 2C) e também na IL-4 de resposta Th2 (p-valor=0,0292; Figura 3).

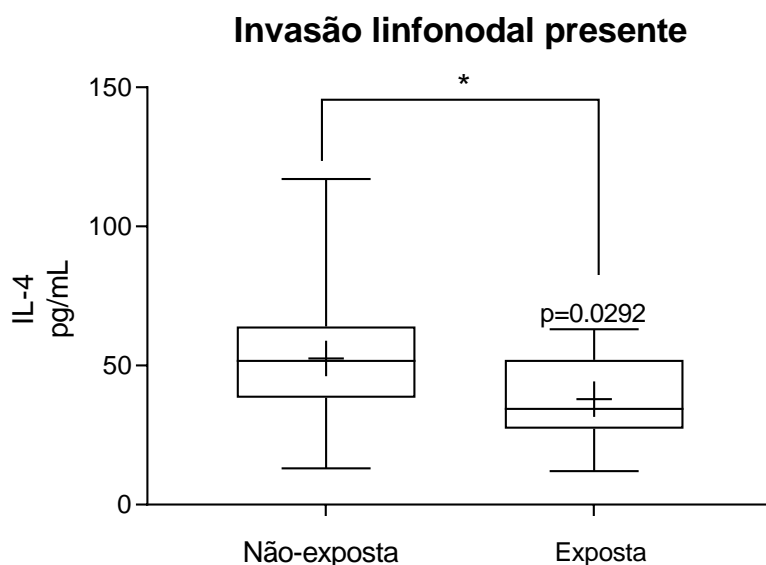


Figura 3 – Variações significativas no perfil Th2 sistêmico de mulheres portadoras de câncer de mama ocupacionalmente expostas ou não aos pesticidas. O perfil Th2 foi determinado através da dosagem plasmática da IL-4. Níveis detectados nos grupos exposto e não-exposto segundo a presença de invasão linfonodal para IL-4. Os dados estão mostrados como box-plot das variações mínima, máxima e mediana. + representa a média de cada grupo. Os valores de p estão apresentados nos gráficos, sendo considerado significante quando $p < 0,05$.

Além disso, para a maioria das características observadas, especialmente em relação aos níveis de IL-17-A, IL-12, IL-1 β e TNF- α , a variabilidade das pacientes não expostas foi maior que as expostas a pesticidas, indicando que a dispersão das expostas foi menor (Figuras 1, 2 e 3). Esse fato pode ser observado pelo maior intervalo interquartilico nos gráficos box-plot.

DISCUSSÃO

Nossos principais achados demonstram que os pesticidas favorecem alguns fatores considerados de mau prognóstico para o câncer de mama, agindo como disruptores imunológicos, causando diminuição de respostas do tipo Th1, Th2 e Th17, em associação com características clinicopatológicas relevantes.

Observamos que mulheres com câncer de mama expostas a pesticidas possuem maior incidência de metástase em linfonodos, sendo esse fenômeno considerado como um mau prognóstico, uma vez que as células tumorais se desalojaram de seu local de origem e encontram-se em glândulas linfáticas, normalmente axilares. Além disso, este resultado sugere que a exposição aos pesticidas pode influenciar na agressividade do tumor. Estudo de Demers e colaboradores (2000), comprova essa associação, visto que mulheres com câncer de mama, que apresentaram maiores concentrações plasmáticas de pesticidas, apresentaram maior probabilidade de metástase em linfonodos. Ainda, a hipótese de que os pesticidas podem influenciar na agressividade do tumor é sustentada pelo fato de que tais substâncias exacerbam um fenótipo celular pró-migratório, contribuindo para um alto grau de malignidade do tumor, favorecendo desta forma a progressão do câncer de mama (MIRET *et al.*, 2016).

Além desses fatores que demonstram um tumor mais agressivo, as pacientes com câncer de mama e expostas a pesticidas também apresentaram IMC aumentado, manifestando sobrepeso ou obesidade. Pedreira e colaboradores (2018), em uma revisão de literatura, descobriram que disruptores endócrinos, como os pesticidas, aumentam o número de células adiposas, e modificam o metabolismo do indivíduo exposto, predispondo à obesidade ao longo da vida. Considerando que os pesticidas são produtos químicos altamente lipossolúveis e são armazenados no tecido adiposo, vale ressaltar a hipótese de interações na biologia celular tumoral (NAN *et al.*, 2016) uma vez que tais vias estão substancialmente ligadas às respostas inflamatórias e imunes. Estudos sugerem ainda, que esse excesso de gordura corporal pode conferir um mau prognóstico, favorecendo tumores de subtipos mais agressivos como o Luminal B e TN (PIEROBON *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2016).

Os cânceres de mama são classificados patologicamente de acordo com seu subtipo molecular (Luminal A, Luminal B, superexpressão de HER2 e TN) (YIN *et al.*, 2020). Mesmo com diferenças nas características demográficas e biológicas entre esses subtipos, a literatura é escassa em relação a estudos de exposição crônica a pesticidas em relação a esses subtipos moleculares. Porém, Ellsworth *et al.*, (2018) sugere que a carga corporal de pesticida, pode influenciar o desenvolvimento de subtipos específicos do câncer de mama (PEDREIRA *et al.*, 2018). Embora nosso estudo não tenha demonstrado diferença estatística em relação aos diferentes

subtipos moleculares, o subtipo molecular TN, foi mais comum em mulheres com câncer de mama expostas a pesticidas, em comparação com não expostas. Esse é o subtipo mais agressivo e considerado de prognóstico ruim pela ausência de alvo terapêutico (BORRI *et al.*, 2021), portanto o tratamento é mais difícil, deixando a quimioterapia como única alternativa terapêutica sistêmica (ENSENYAT-MENDEZ *et al.*, 2021).

Os pesticidas também podem atuar como mediadores pró-inflamatórios ou inflamatórios, capazes de interferir na inflamação e no sistema imunológico, potencializando ou reduzindo citocinas de resposta do tipo Th1, Th2 ou Th17, implicadas na carcinogênese (STANDISH *et al.*, 2010). A resposta imune contra o câncer tem como mecanismo central uma rede de citocinas, cuja produção e sinalização funciona de maneira homeostática, a fim de combater o tumor (DHOUIB *et al.*, 2016). No entanto, nosso estudo mostrou que a exposição ocupacional a pesticidas prejudica essa produção sistêmica de citocinas em mulheres com câncer de mama, reduzindo os níveis de citocinas em condições clínicas específicas, quando comparado ao grupo não exposto. Esse “blackout” imunológico sugere um efeito negativo em células tumorais, favorecendo o crescimento desordenado, um aumento de fatores de mau prognóstico e de agressividade tumoral. Isso provavelmente se deve ao fato de essas citocinas serem importantes sinalizadores e mediadores de variados processos envolvidos, afetando diretamente o crescimento, invasão celular e metástase das células cancerosas (GIRARD *et al.*, 2020).

A resposta Th1, em nosso trabalho representada pela IL-1 β , IL-12 e TNF- α , se mostrou diminuída em condições clinicopatológicas específicas. Mulheres com tumor de tamanho maior de 2cm expostas a pesticidas apresentaram menor quantidade circulante da IL-12 em comparação com as não expostas. Essa citocina possui potente atividade antineoplásica, pela indução de uma resposta tipo Th1 e rejeição do tumor, além de que uma melhor sobrevida foi correlacionada com níveis mais elevados dessa citocina (GUIDA *et al.*, 2007). Além disso, seu valor diminuído em pacientes expostas a pesticidas pode aumentar o tamanho tumoral com mais facilidade, já que não estarão em quantidade suficiente para cessar o crescimento do tumor. Desta maneira, este cenário caracteriza um mau prognóstico, já que o tamanho do tumor determina também o tipo de tratamento e evolução da doença (RAUPP *et al.*, 2017).

Estudos demonstram que a geração de uma resposta Th1 eficiente parece ser a ideal na ação antitumoral, pois ela auxilia na ativação de linfócitos T CD8+ e citocinas que são auxiliares no combate tumoral (interferon gama (IFN- γ), IL-12, TNF- α) (WHITESIDE *et al.*, 2013). Ainda relacionado a esse tipo de resposta, nosso estudo demonstrou que mulheres expostas a pesticidas e com presença de invasão linfonodal tiveram o nível de TNF- α e IL-1 β diminuído, em relação as não expostas. O TNF- α , possui funções variadas, podendo atuar como citocina promotora ou supressora de tumores a variar do microambiente que o promoveu. No microambiente tumoral, induz a proliferação e a metástase, mas ainda tem papel na destruição dessas células, quando estimulado a partir do sistema imune, por outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 β (LAHA *et al.*, 2021). Porém em nosso estudo, a IL-1 β , também estava reduzida, indicando que o sistema imune possivelmente estava com uma disfunção em pacientes expostas a pesticidas, o que por sua vez, favorece fatores de mau prognóstico como a metástase em linfonodos, já que o tumor tem a chance de evoluir (CALAF *et al.*, 2021).

Outros estudos envolvendo TNF- α demonstraram um aumento dessa citocina quando expostas a pesticidas, induzindo a produção do tumor, onde este fator foi relatado apenas em estudos *in vitro* (TÉLLEZ-BAÑUELOS *et al.*, 2016; CAMARGO *et al.*, 2018; GARGOURI *et al.*, 2020). Já em relação à exposição ocupacional em humanos (PIZZATI *et al.*, 2020) e em animais (JORSARAEI *et al.*, 2014), os resultados estão de acordo com nosso estudo.

Os resultados sobre a diminuição de citocinas relação ao tamanho tumoral e invasão linfonodal presente vão ao encontro de estudos que demonstram que os pesticidas são capazes de diminuir a resposta imunológica do tipo Th1 (COSTA *et al.*, 2013; VOLKER *et al.*, 2010). Pizzati e colaboradores (2020), relacionam a redução de IL-1 β e TNF- α , em pacientes com câncer de mama expostas a pesticidas, a fatores clínicos de prognóstico como tecidos adiposos-tróficos, menopausa e formação de coágulos intratumorais. Contudo, estudos que relacionam essa associação a fatores clinicopatológicos em geral, são escassos.

Considerando que o eixo inflamatório pudesse estar desequilibrado nas pacientes expostas, investigamos ainda o perfil dos níveis de resposta Th2, através da IL-4 (citocina inflamatória), tendo em vista que o câncer é considerado uma doença dominante em relação a este tipo de resposta (WHITESIDE *et al.*, 2013). Segundo a

literatura, os pesticidas são capazes de aumentar a IL-4, e favorecer o crescimento do tumor, através da indução de efeitos na inflamação e toxicidade em órgãos linfoides (JORSARAEI *et al.*, 2014). Já nossos resultados, sugerem que a exposição a pesticidas por tempo prolongado, a exemplo de nossas pacientes expostas, pode levar ao esgotamento do sistema imune. Por sua vez, estudos envolvendo a exposição a pesticidas e a desregulação imune, em sua maioria, relata que citocinas Th2 estão presentes em quantidade aumentada, frente a exposição a pesticidas (VOLKER *et al.*, 2010; MEDINA-BUELVAS *et al.*, 2019). Esse mecanismo algumas vezes, é explicado pela diminuição da resposta th1 que em detrimento, aumenta th2 (DURAMAD *et al.*, 2006). Porém, em nossos resultados, a IL-4 plasmática estava reduzida em pacientes expostas, com presença de invasão em linfonodos. Desta forma, sugere-se que mesmo com a diminuição de Th1, o sistema imune não foi capaz de recuperar a resposta Th2 do tipo inflamatória, mostrando-se totalmente debilitado nas pacientes expostas a pesticidas.

Entre esse contexto de mecanismos de imunodesregulação devido à exposição a pesticidas, identificamos ainda, resultados significativos na redução dos componentes da via de resposta Th17. As respostas imunocelulares desse modelo, são um dos principais moduladores envolvidos no câncer por meio de processos inflamatórios (KARPISHEH *et al.*, 2022). Elas fazem parte tanto da imunidade inata como adaptativa, secretando outras citocinas que modulam a progressão do câncer de mama. Porém o mecanismo imune exato dessas células frente ao tumor ainda é desconhecido. Segundo a literatura o que parece, é que elas possuem dupla função, podendo se adaptar ao ambiente (YE *et al.*, 2012).

Observamos redução significativa dos níveis de IL-17-A, em pacientes expostas ocupacionalmente a pesticidas em comparação com o grupo de não expostas: de subtipo molecular Luminal B; com índice de ki67 maior que 14%; grau histológico III; e ainda em pacientes positivos para RP. O subtipo molecular Luminal B, por mais que apresente opção terapêutica, tem como característica índice de proliferação aumentado. Esse índice é medido pela proteína ki67, sendo considerado alto quando acima de 14%, indicando que as células cancerígenas estão se multiplicando rapidamente. Já em relação ao grau histológico do tipo III as células não têm características normais e tendem a crescer e se disseminar de forma mais agressiva (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021). Dentre os fatores citados acima,

o de melhor prognóstico pode-se dizer é das pacientes positivas para RP, pela opção terapêutica, onde o medicamento tem alvo para ação. Entretanto, esse indicativo não é utilizado de forma isolada, devendo ser levado em consideração as outras características tumorais (LABRE, 2018).

Fenga e colaboradores investigaram a resposta de interleucinas Th17 em trabalhadores de estufa, sendo este o único artigo encontrado que associou a exposição a pesticidas neste tipo de resposta. Em oposição ao nosso estudo, os trabalhadores expostos tiveram a IL-17-A inalterada e a interleucina 22 (IL-22) aumentada.

Como existe uma plasticidade nas respostas imunes Th17, podendo alterar o padrão de respostas, como por exemplo Th1 ou Th2, a depender do estímulo do ambiente ou agente agressor, sugerimos que a exposição a pesticidas afeta de maneira intensa o sistema imune, sendo que em determinadas condições clinicopatológicas, como as destacadas em nosso estudo, o mesmo não é capaz de reagir. Neste caso, não ocorre diferenciação para células CD4, ou de resposta Th1, que são de suma importância para cessar condições de pior prognóstico e, nem ao menos, as respostas Th2, já que essas também estavam reduzidas em determinadas características clinicopatológicas. Vale ressaltar, que alguns estudos (YE *et al.*, 2012; KARPISHEH *et al.*, 2022) mostraram uma desregulação significativa da IL-17-A em fatores de pior prognóstico, estando a mesma na maioria das vezes aumentada. Assim, nossos resultados sugerem que os pesticidas fazem o papel inverso, ou ainda, que simplesmente anulam as funções imunológicas, possibilitando a atuação das células cancerosas (HE *et al.*, 2017).

Um achado um tanto curioso, foi que a IL-17-A plasmática de mulheres eutróficas com câncer de mama estava aumentada no grupo exposto a pesticidas. Esse fato pode ser explicado por uma possível adaptação do sistema imune nessas pacientes. Olhando pelo ponto de vista de que mulheres com sobrepeso ou obesas, quando comparado com mulheres eutróficas, possuem a homeostase e fisiologia desreguladas pelo intenso processo inflamatório comum, explicaria a vantagem de o organismo reagir nessas pacientes eutróficas e se adaptar a fisiologia sugerida. Isto poderia reforçar a hipótese de que a resposta Th17 é adaptativa e modulável (KUEN *et al.*, 2020).

Em conjunto, os fatores clinicopatológicos, em que citocinas mostram-se reduzidas frente a exposição a pesticidas em nosso trabalho, são características de câncer de alto risco. Assim como também o tamanho de tumor maior que 2cm e envolvimento de linfonodo (encontrado nos resultados dessa pesquisa em respostas Th1 e Th2). Deste modo, em pacientes com essas características, o tratamento, normalmente quimioterápico, se torna mais agressivo, o que é uma desvantagem para a paciente. E adicionando o fator da exposição a pesticidas vimos que é ainda mais complicado, já que a paciente apresenta uma deficiência da imunidade tanto inata quando adaptativa (TOSOLINI *et al.*, 2011). Sem a sinalização e ação das citocinas responsáveis pela indução de outras células importantes no combate ao tumor, sugere-se que esses fatores de pior prognóstico se encontram favorecidos, já que as células tumorais se multiplicam, aumentando de tamanho, envolvendo linfonodos e, conseqüentemente, evoluindo a um estágio III da doença (DHOUIB *ET AL.*, 2017; HE *et al.*, 2017).

Em suma, destacar os efeitos dos pesticidas em fatores imunológicos no câncer de mama em humanos permanece difícil pois poucos estudos trazem esta temática. Além disso, o tamanho limitado da amostra e a falta de medidas de outras citocinas, acabam por definir algumas limitações desse trabalho. Ainda, a inespecificidade de marcadores biológicos de exposição a pesticidas, limitam muitos estudos a qualificar a exposição apenas através da aplicação de questionários.

Por fim, nossos dados indicam que os pesticidas são potenciais desreguladores imunológicos em pacientes com câncer de mama. Além disso, tal desequilíbrio do sistema imune foi associado com invasão em linfonodos das pacientes e com potencial comprometimento dos mecanismos de controle do crescimento tumoral pela redução de citocinas circulantes.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Elsevier. 9ª Edição, 2019. cap. 18, pag. 1026-1077.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Understanding a Breast Cancer Diagnosis. Cancer.Org. 2021. Disponível em: 8580.00.pdf (cancer.org).

ARAÚJO, A.J.DE.; LIMA J.S.DE.; MOREIRA, J.C.; JACOB, S.DO.C.; SOARES, M. DE.O.; MONTEIRO, M.C.M.; AMARAL, A.M.DO.; KUBOTA, A.; MEYER, A.; COSENZA, C.A.N.; NEVES, C.DAS.; & MARKOWITZ, S. Exposição múltipla a pesticidas e efeitos à saúde: Estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, pag. 115–130, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232007000100015>.

ARAUJO, C.A.T.DE.; CAMEL, T.O. **Os organofosforados: da segunda guerra mundial à agricultura. História das ciências e das técnicas e epidemiologia**. Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, 2020. Disponível em: http://www.hcte.ufrj.br/downloads/sh/sh6/SHVI/trabalhos%20poster%20completos/POSTER_09.pdf.

ARICI, M.; ABUDAYYAK, M.; BORAN, T.; & ÖZHAN, G. Does pendimethalin develop in pancreatic cancer induced inflammation? **Chemosphere**, v. 252, p. 126644. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126644>.

BENEDETTI, D.; NUNES, E.; SARMENTO, M.; PORTO, C.; DOS SANTOS, C.E.I.; DIAS, J.F.; & DA SILVA, J. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. **Mutation Research**, v. 752, n. 1-2, pp. 28–33. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.01.001>.

BORRI, F.; GRANAGLIA, A. Pathology of triple negative breast cancer. **Semin Cancer Biol.**, v. 72, p. 136-145. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32544511/>.

BUROW, M.E.; TANG, Y.; COLLINS-BUROW, B.M.; KRAJEWSKI, S.; REED, J.C.; MCLACHLAN, J.A.; & BECKMAN, B.S. Effects of environmental estrogens on tumor necrosis factor α -mediated apoptosis in MCF-7 cells. **Carcinogenesis**. v. 20, n. 11, pp. 2057–2061. 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/carcin/20.11.2057>.

CALAF, G.M.; Role of organophosphorous pesticides and acetylcholine in breast carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**. v. 76, p. 206-217. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.03.016>.

CAMARGO, M.R.; AKAMINE, P.V.T.; VENTURINI, J.; DE ARRUDA, M.S.P.; & DA SILVA FRANCHI, C.A. Pesticide dichorvos induces early solid Ehrlich tumoral development associated with a non-protective pro-inflammatory response. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 25, n. 8, pp. 7681–7687. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1104-x>.

CASSAL, V.B.; AZEVEDO, L.F. DE; FERREIRA, R.P.; SILVA, D.G.DA; & SIMÃO, R.S. Pesticidas: Uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. pp. 437–445. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/2236117012498>.

CHEN, L; COOK L.S.; TANG, M.C; PORTER, P.L.; HILL, D.A. Body mass index and risk of luminal, HER2-overexpressing, and triple negative breast cancer. **Breast cancer research and treatment**. v. 157, n. 3, p. 545–554. 2016. Disponível em: [doi:10.1007/s10549-016-3825-9](https://doi.org/10.1007/s10549-016-3825-9).

COLASSO, C.; AZEVEDO, F.A. Riscos da utilização de Armas Químicas. Parte I - Histórico. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 4, n. 3, p. 137- 172, out. 2011.

COLOTTA, F.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A.; Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 7, pag. 1073–1081, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>.

COSTA, C.; BRIGUGLIO, G.; CATANOSO, R.; GIAMBO, F.; POLITO, I.; TEODORO, M.; FENGA, C. New Perspective on Cytokine Pathways Modulation by Pesticide Exposure. **Current Opinion in Toxicology**. v. 19, pp. 99-104, fev. 2020.

COSTA, C.; RAPISARDA, V.; CATANIA, S.; DI NOLA, C.; LEDDA, C.; & FENGA, C. Cytokine patterns in greenhouse workers occupationally exposed to α -cypermethrin: An observational study. **Environmental Toxicology and Pharmacology** v. 36 n. 3, pp. 796–800. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.004>.

DAI, X.; XIANG, L.; LI, T.; BAI, Z. Cancer hallmarks, biomarkers and breast cancer molecular subtypes. **Journal of Cancer**, Sydney, v. 7, n. 10, pp. 1281–1294, 2016. Disponível em: [doi: 10.7150/jca.13141](https://doi.org/10.7150/jca.13141).

DEMERS, A.; AYOTTE, P.; BRISSON, J.; DODIN, S.; ROBERT, J.; & DEWAILLY, E. Risk and aggressiveness of breast cancer in relation to plasma organochlorine concentrations. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 9 n. 2, pag.161-166. 2000. Disponível em: Risk and Aggressiveness of Breast Cancer in Relation to Plasma Organochlorine Concentrations1 | Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention | American Association for Cancer Research (aacrjournals.org).

DHOUIB, I.; JALLOULI, M.; ANNABI, A. et al. From immunotoxicity to carcinogenicity: the effects of carbamate pesticides on the immune system. **Environ Sci Pollut Res.** v. 23, p.9448–9458. 2016.

DURAMAD P.; HARLEY K.; LIPSETT M.; BRADMAN A.; ESKENAZI B.; HOLLAND N.T.; TAGER I.B. Early Environmental Exposures and Intracellular Th1/Th2 Cytokine Profiles in 24-Month-Old Children Living in an Agricultural Area. **Environ Health Perspect.** v. 114, n. 12, p.1916-22. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1289/ehp.9306>.

ELLSWORTH, R.E.; KOSTYNIK, P.J.; CHI, L.; SHRIVER, C.D.; COSTANTINO, N.S.; ELLSWORTH, D.L. Organochlorine pesticide residues in human breast tissue and their relationships with clinical and pathological characteristics of breast cancer. **Environ Toxicol.** 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29923341/>.

ENSENYAT-MENDEZ, M.; LLINÀS-ARIAS, P.; OROZCO, J.I.J.; ÍÑIGUEZ-MUÑOZ, S.; SALOMON, M.P.; SESÉ, B.; DINOME, M.L.; MARZESE, D.M. Current Triple-Negative Breast Cancer Subtypes: Dissecting the Most Aggressive Form of Breast Cancer. **Front Oncol.**, v. 11, p. 681476. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34221999/>.

FAUSTINI, A.; SETTIMI, L.; PACIFICI, R., FANO, V.; ZUCCARO, P.; & FORASTIERE, F. Immunological changes among farmers exposed to phenoxy herbicides: preliminary observations. **Occupational and environmental medicine.** v. 53 n. 9, pp. 583–585.1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/oem.53.9.583>.

FENGA, C.; GANGEMI, S.; CATANIA, S. IL-17 and IL-22 serum levels in greenhouse workers exposed to pesticides. **Inflammation Research**, v. 63, pp. 895–897. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00011-014-0769-6>.

FISHBEIN, A.; HAMMOCK, B.D.; SERHAN, C.N.; PANIGRAHY, D.; Carcinogenesis: failure of resolution of inflammation?. **Pharmacology & Therapeutics.** Vol. 218, pag. 107670, fev. 2021.

GABOARDI, S. C. **O Uso de Agrotóxicos no Sudoeste do Paraná a Partir de Perspectiva Geográfica Multiescalar**. Orientador: Luciano Zanetti Pessoa Candiotto. Dissertação (Doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Pós-Graduação em Geografia, Francisco Beltrão, 2021.

GANGEMI, S.; GOFITA, E.; COSTA, C.; TEODORO, M.; BRIGUGLIO, G.; NIKITOVIC, D.; TZANAKAKIS, G.; TSATSAKIS, A.M.; WILKS, M.F.; SPANDIDOS, D.A.; & FENGA, C. Occupational and environmental exposure to pesticides and cytokine pathways in chronic diseases (Review). **International Journal of Molecular Medicine**. v. 38, n. 4, pp. 1012–1020. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2728>.

GARGOURI, B.; BOUKHOLDA, K.; KUMAR, A.; BENAZZOZ, A.; FETOUI, H.; FIEBICH, B. L.; & BOUCHARD, M. Bifenthrin insecticide promotes oxidative stress and increases inflammatory mediators in human neuroblastoma cells through NF-kappaB pathway. **Toxicology in Vitro**, v. 65, p. 104792. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104792>.

GIOVANAZ, D. **Outubro Rosa: Conheça Relação entre Agrotóxicos e o Câncer que Mais Mata Mulheres no Brasil**. Brasil de Fato. Out. 2021. Disponível em: <https://contraosagrototoxicos.org/outubro-rosa-conheca-relacao-entre-agrototoxicos-e-o-cancer-que-mais-mata-mulheres-no-brasil/>. Acesso em: 20 dez. 2021.

GIRARD, L.; REIX, N.; MATHELIN, C. Impact of endocrine disrupting pesticides on breast cancer. **Gynecol Obstet Fertil Senol.**, v. 48 n. 2, p. 187-195. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31634589/>.

GUIDA, M.; CASAMASSIMA, A.; MONTICELLI, G.; QUARANTA, M.; COLUCCI, G. Basal cytokines profile in metastatic renal cell carcinoma patients treated with subcutaneous IL-2-based therapy compared with that of healthy donos. **J Transl Med**. v. 5, p. 51. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17953739/>.

HE, T.T.; ZUO, A.J.; WANG, J.G.; & ZHAO, P. Organochlorine pesticides accumulation and breast cancer: A hospital-based case-control study. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**. v. 39, n. 5, pp. 1010428317699114. 2017. Disponível em: <https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1177/1010428317699114>. Acesso em: 05 mai. 2022.

HURD, T.; WALKER, J.; & WHALEN, M. M. Pentachlorophenol Decreases Tumor-cell-binding Capacity and Cell-Surface Protein Expression of Human Natural Killer Cells. **Journal of Applied Toxicology : JAT**, v. 32, n. 8, p. 627. 2012.

HURD-BROWN, T.; UDOJI, F.; MARTIN, T.; & WHALEN, M.M. Effects of DDT and triclosan on tumor-cell binding capacity and cell-surface protein expression of human natural killer cells. **Journal of Applied Toxicology**. v. 33, n. 6, pp. 495–502. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jat.2767>.

INCA. Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva. **Estatísticas de Câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 5 março. 2022.

INCA. Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva. **O que Causa Câncer?** Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-causa-cancer>>. Acesso em: 5 março. 2022.

JACOBSEN-PEREIRA, C.H.; CARDOSO, C.C.; GEHLEN, T.C.; SANTOS, C.R. DOS; & SANTOS-SILVA, M.C. Immune response of Brazilian farmers exposed to multiple pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 202, p. 110912. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110912>.

JORSARAEI, S.G.A.; MALIJI, G.; AZADMEHR, A.; MOGHADAMNIA, A.A.; & FARAJI, A.A. Immunotoxicity effects of carbaryl in vivo and in vitro. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 3, pp. 838–844. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.09.004>.

KARPISHEH, V.; AHMADI, M.; ABBASZADEH-GOUDARZI, K.; SARAY, M.M.; BARSHIDI, A.; MOHAMMADI, H.; YOUSEFI, M.; JADIDI-NIARAGH, F. The role of Th17 cells in the pathogenesis and treatment of breast cancer. **Cancer Cell International**, v. 22, p. 108. 2022. Disponível em: <https://cancerci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12935-022-02528-8#citeas>.

KARROW, N.A.; MCCAY, J.A.; BROWN, R.D.; MUSGROVE, D.L.; GUO, T.L.; GERMOLEC, D.R.; & WHITE, K.L. Oral exposure to atrazine modulates cell-mediated immune function and decreases host resistance to the B16F10 tumor model in female B6C3F1 mice. **Toxicology**, v. 209, n. 1, pp. 15–28. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.12.002>

KAWASSAKI, A. C. B.; **Exposição a Agrotóxicos em Níveis Plasmáticos de Cortisol, Citocinas e Perfil Redox em Pacientes com Câncer de Mama**. Orientador: Wander R. Pavanelli. 2019. 106 f. Dissertação (Doutorado) – Pós-Graduação em Patologia Experimental, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

KUEN, D.S.; KIM, B.S.; CHUNG, Y. IL-17-Producing Cells in Tumor Immunity: Friends or Foes? **Immune Netw.** v. 20 n. 1 e. 6. 2020. Disponível em: doi: 10.4110/in.2020.20.e6. PMID: 32158594; PMCID: PMC7049578.

LABRE, L.V.Q. **Relação Entre a Presença de Macrófagos no Microambiente Tumoral e Fatores Prognósticos em Câncer de Mama.** 2018. 124 f. Dissertação (Doutorado) – Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.

LAHA, D.; GRANT, R.; MISHRA, P.; NILUBOL, N. The Role of Tumor Necrosis Factor in Manipulating the Immunological Response of Tumor Microenvironment. **Front Immunol.** v. 12, p. 656908. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33986746/>.

LEE, G.H.; HWANG, K.A.; CHOI, K.C. Effects of Fludionil on the Cell Growth and Apoptosis in T and B Lymphocytes. **Biomolecules**, v. 9, n. 9, p. 500, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom9090500>.

LOPES, M.L.D.S. **Resposta Imune e Mecanismos de Evasão na Carcinogênese de Lábio: Um Estudo Imunoistoquímico.** Orientadora: Éricka Janine Dantas da Silveira. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Pós-Graduação em Patologia Oral, Natal, 2018.

LOUREIRO, L.C. **Atividade Antiproliferativa por Fosfolipídio Oxidado do Líquido Surfactante e Modulação de Macrófagos Associados a Tumores.** Orientador: Carlos Arterio Sorgi. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amazonas, Pós-Graduação em Imunologia Básica, Manaus, 2017.

MARTIN, T.J.; GABURE, S.; MAISE, J.; SNIPES, S.; PEETE, M.; WHALEN, M. M; The organochlorine pesticides pentachlorophenol and dichlorodiphenyltrichloroethane increase secretion and production of interleukin 6 by human immune cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 72, p. 103263. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103263>.

MARTIN, T.J.; MAISE, J.; GABURE, S.; & WHALEN, M.M; Exposures to the environmental contaminants pentachlorophenol and dichlorodiphenyltrichloroethane increase production of the proinflammatory cytokine, interleukin-1 β , in human immune cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 39, n. 8, pp. 1132–1142. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jat.3798>.

MEDINA-BUELVAS, D.; ESTRADA-MUÑIZ, E.; FLORES-VALADEZ, M.; & VEGA, L. Genotoxic and immunotoxic effects of the organophosphate metabolite diethyldithiophosphate (DEDTP) in Vivo. **Toxicology and Applied**

Pharmacology, v. 366, pp. 96–103. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.023>.

MIRANDA, A.C.DE; MOREIRA, J.C.; CARVALHO, R.DE; & PERES, F. Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, pp. 7–14. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232007000100002>.

MIRET, N.; PONTILLO, C.; VENTURA, C.; CAROZZO, A.; CHIAPPINI, F.; PISAREV, D. K. 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**, v. 366–367, p. 20–31, 2016. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.08.007>.

MOHAMMED, Z.M.A.; MCMILLAN, D.C.; ELSBERGER, B.; GOING, J.J.; ORANGE, C.; MALLON, E.; DOUGHTY, J.C.; EDWARDS, J. Comparison of Visual Automated Assessment of Ki-67 Proliferative Activity and Their Impact on Outcome in Primary Operable Invasive Ductal Breast Cancer. **Nature**. Vol. 106, pag. 383-388, mar. 2012.

MOHER, D.; SHAMSEER, L.; CLARKE, M.; GHERSI, D.; LIBERATI, A.; PETTICREW, M.; SHEKELLE, P.; STEWART, L.A. Prisma-p group. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. **Systematic Reviews**, v. 4, n. 1. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2046-4053-4-1>.

MUKHERJEE, S. **O Imperador de Todos os Males**. 1ª Edição. São Paulo, Companhia das Letras, 3 de fevereiro de 2012.

NAM, S.; PARK, S.; PARK, H.S.; KIM, S.; KIM, J.Y.; KIM, S I.L. Association Between Insulin Resistance and Luminal B Subtype Breast Cancer in Postmenopausal Women. **Medicina (Baltimore)**. v. 95 n. 1-8. e. 2825. 2016. Disponível em: PMID: 26945364 PMCID: PMC4782848 DOI: 10.1097/MD.0000000000002825.

NETA, G.; GOLDMAN, L.R.; BARR, D.; APELBERG, B.J.; WITTER, F.R.; & HALDEN, R.U. Fetal exposure to chlordane and permethrin mixtures in relation to inflammatory cytokines and birth outcomes. **Environmental science & technology**, v. 45, n. 4, pp. 1680–1687. 2011. Disponível em: [https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1021/es103417j](https://doi.org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.1021/es103417j).

NOWORYTA-GLOWACKA, J.; BAŃKOWSKI, R.; SIENNICKA, J.; WIADROWSKA, B.; BERESIŃSKA, M.; & LUDWICKI, J.K. Influence of chlorpyrifos on the profile of subpopulations of immunoactive cells and their phagocytic activity in an experimental in vivo model. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine** v. 13, n. 19, pp. 483-485. 2011.

PANIS, C.; GABOARDI, S.C.; KAWASSAKI, A.C.B.; DIAS, E.C.M.; TEIXEIRA, G.T.; SILVA, D.R.P.; RECH, D.; CANDIOTTO, L.Z.P. Caracterização da Exposição Ocupacional a Agrotóxicos e seu Impacto na Saúde de Mulheres Rurais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. Francisco Beltrão, vol. 43, n. 748, 06 dez. 2021.

PANIS, C.; KAWASSAKI, A.C.B.; CRESTANI, A.P.J.; PASCOTTO, C.R.; BORTOLOTTI, D.S.; VICENTINI, G.E.; LUCIO, L.C.; FERREIRA, M.O.; PRATES, R. T.C.; VIEIRA, V.K.; GABOARDI, S.C.; & CANDIOTTO, L.Z.P. Evidence on Human Exposure to Pesticides and the Occurrence of Health Hazards in the Brazilian Population: A Systematic Review. **Frontiers in Public Health**, v. 9. 2022. Disponível em: Doi: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2021.787438>.

PAOLINO, B. M.; **Análise dos Subtipos Imunoistoquímicos de Câncer de Mama em um Hospital de Referência Oncológica no Amazonas**. Orientador: Ione Rodrigues Brum. 2018. 97 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Cirurgia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.

PEDREIRA, G.D.M; FERNANDES, A.L.M; BORBA, M.C.O; BECHARA, M.Z. Disruptores Endócrinos E Sua Relação com a Obesidade. **International Journal of Nutrology. Thieme Revinter Publicações Ltda**. v. 11, p. Trab318. 2018. Disponível em: DOI: 10.1055/s-0038-1674615.

PEREIRA, HILKA F. B. E. S. A. **Perfil Epidemiológico e Clínico de Mulheres Jovens com Câncer de Mama no Amazonas: Estudo de 11 Anos**. Orientador: Kátia Luz Torres Silva. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016. Disponível em: doi: 10.1080/1547691X.2016.1206998. Acesso em: 10 out. 2021.

PEREIRA, L.M. Interleucina-12 e produção de citocinas por linfócitos t auxiliares periféricos em mulheres com câncer submetidas à imunoterapia com células dendríticas. **Tese de dissertação Mestrado**, Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). p. 65. 2017.

PERES, F., & MOREIRA, J. C. **E veneno ou é remédio? pesticidas, saúde e ambiente**. (Orgs.). Editora Fiocruz. Rio de Janeiro, 2003.
PIEROBON, M.; FRANKENFELD, C.L. Obesity as a risk factor for triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. **Breast cancer research and treatment**. v.137, n.1, p. 307–314. 2013. Disponível em: doi:10.1007/s10549-012-2339-3.

PIZZATTI, L.; KAWASSAKI, A.C.B.; FADEL, B.; NOGUEIRA, F.C.S.; EVARISTO, J.A.M.; WOLDMAR, N.; TEIXEIRA, G.T.; DA SILVA, J.C.; SCANDOLARA, T.B.;

QUINTEIRO-FILHO, W.M.; RIGHI, D.A.; & PALERMO-NETO, J. Effect of cyhalothrin on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, pp. 912–917. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009001000006>.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R:A language and environment for statistical computing**. R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2022.

RAUPP, G.S.; GASPERI, J.; SILVA, L.G.C.; SCHERER, M.O.; FRASSON, A. Câncer de mama: diagnóstico e abordagem cirúrgica / Breast cancer: diagnosis and surgical treatment. **Acta méd.** v. 38, p. 7. 2017. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-883238>.

RECH, D.; CANDIOTTO, L.P.Z.; SILVEIRA, G.F.; PAVANELLI, W.R.; & PANIS, C. Toxicoproteomics Disclose Pesticides as Downregulators of TNF- α , IL-1 β and Estrogen Receptor Pathways in Breast Cancer Women Chronically Exposed. **Frontiers in Oncology**, v. 10. 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.01698>Acesso em: 10 mai. 2022.

RECH, D. **Perfil do Câncer de Mama em Mulheres do Sudoeste do Paraná: Identificação de Possíveis Fatores de Risco Regionais e Correlação Clínico-Patológicas**. Orientador: Carolina Panis. 2018. 78 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências Aplicadas a Saúde, Universidade do Oeste do Paraná, Francisco Beltrão, 2018.

ROCHA, E.G.; PEDRINI, J.L. **Uma História da Mama**. 1ª Edição. Porto Alegre, Da Barca, 2009.

ROMEIRO, N.M.L.; PANIS, C.; SANTOS, M.C.T.; RECH, D.; NATTI, P.L.; CIRILO, E.R. Covariate clustering: Women With Breast Cancer in Southwestern Paraná, Brazil. **Revista de Senologia y Patologia Mamaria**. 20 jan. 2022. Disponível em: Dói: <https://doi.org/10.1016/j.senol.2021.12.005>.

SANTOS, A. B.; **Análise do Perfil Sociodemográfico de Pacientes que Buscam Primeiro Atendimento por Lesão Mamária Suspeita de Malignidade em Hospital de Referência no Amazonas**. Orientador: Ione Rodrigues Brum. 2019. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Cirurgia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

SELVAN, R.S.; DEAN, T.N.; MISRA, H.P.; NAGARKATTI, P.S.; & NAGARKATTI, M. Aldicarb suppresses macrophage but not natural killer (NK) cell-mediated

cytotoxicity of tumor cells. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 43, pp. 676–682. 1989.

SHAH, H.K.; SHARMA, T.; & BANERJEE, B.D. Organochlorine pesticides induce inflammation, ROS production, and DNA damage in human epithelial ovary cells: An in vitro study. **Chemosphere**, v. 246, 125691. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125691>.

SILVA, J.L. **Câncer de Mama Triplo-Negativo: Avaliação de Fatores Clínicos e Biomarcadores Tumorais**. Orientador: Andreia Cristina de Melo. 2021. 198 f. Dissertação (Doutorado) – Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional do Câncer. Rio de Janeiro, 2021.

SOUZA, R. S.; **Identificação de Biomarcadores Lipídicos em Tumores Mamários e Correlação com IL-17 como Fator Inflamatório**. Orientador: Carlos Artério Sorgi. 2021. 114 f. Dissertação (Doutorado) – Curso em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2021.

STANDISH, L.J.; SWEET, E.S.; NOVACK, J.; WENNER, C.A.; BRIDGE, C.; NELSON, A.; MARTZEN, M.; & TORKELSON, C. Breast Cancer and the Immune System. **Journal of the Society for Integrative Oncology**, v. 6, n. 4, p.158–168. 2008.

STANDISH, L.J.; SWEET, E.S.; NOVACK, J.; WENNER, C.A.; BRIDGE, C.; NELSON, A.; MARTZEN, M.; TORKELSON, C. Câncer de Mama e o Sistema Imunológico. **J Soc. Integr. Oncol.** Vol. 6, p. 158-168, mar. 2010.

SUN, Y.S.; ZHAO, Z.; YANG, Z.N.; XU, F.; LU, H.J.; ZHU, Z.Y.; SHI, W.; JIANG, J., YAO, P.P.; & ZHU, H.P. Fatores de Risco e Prevenção do Câncer de Mama. **Revista internacional de ciências biológicas**, China, v. 11, n. 13, pp. 1387-1397. 01 nov. 2017. Disponível em: <https://doi-org.ez89.periodicos.capes.gov.br/10.7150/ijbs.21635>. Acesso em: 10 out. 2021.

TÉLLEZ-BAÑUELOS, M.C.; HARAMATI, J.; FRANCO-TOPETE, K.; PEREGRINA-SANDOVAL, J.; FRANCO-TOPETE, R.; & ZAITSEVA, G.P. Chronic exposure to endosulfan induces inflammation in murine colon via β -catenin expression and IL-6 production. **Journal of Immunotoxicology**, vol. 13, n. 6, pp. 842–849. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1547691X.2016.1206998>.

TEYSSIER, L.; SORCI, G.; CHLUBA, J.; AIMÉ, S.; WENDEHENNE, D.; LAMOTTE, O.; & CONNAT, J.L. Some Plant Defense Stimulators can induce IL-1 β production in human immune cells in vitro. **Toxicology Reports**, v. 7, pp. 413–420. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.02.013>.

TOSOLINI, M.; KIRILOVSKY, A.; MLECNIK, B.; FREDRIKSEN, T.; MAUGER, S.; BINDEA, G.; BERGER, A.; BRUNEVAL, P.; FRIDMAN, W.H.; PAGÈS, F.; GALON, J. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. **Cancer Res.** Vol. 71:4732. Pag. 1263-1271, 2011.

UDOJI, F.; MARTIN, T.; ETHERTON, R.; WHALEN, M. M. Immunosuppressive effects of triclosan, nonylphenol, and DDT on human natural killer cells in vitro. **Journal of Immunotoxicology**, v. 7, n. 3, pp. 205–212. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/15476911003667470>.

VOLKER D.; WOLFGANG H.; KLAUSDIETER B.; CANER S.; CHRISTIAN C.; GERHARD O. Associations of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) 4.4 and Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) 4.4 Blood Levels with Plasma IL-4, *Archives of Environmental Health: An International Journal*, v. 57, n. 6, pp. 541-547. 2010. Disponível em: Doi: 10.1080/00039890209602086.

WHALEN, M.M.; LOGANATHAN, B.G.; YAMASHITA, N.; SAITO, T. Immunomodulation of human natural killer cell cytotoxic function by triazine and carbamate pesticides. **Chemico-Biological Interactions**, v. 145, n. 3, pp. 311–319. 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(03\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(03)00027-9).

WHITESIDE, T. L. Immune responses to cancer: are they potential biomarkers of prognosis?. **Frontiers in oncology**, v. 3, p. 107, 2013.

YE, J.; LIVERGOOD, R.S.; PENG, G. The Role and Regulation of Human Th17 Cells in Tumor Immunity; **The American Journal of Pathology**, v. 182, pp. 10-20, jan. 2013. Disponível em: Doi:<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.041>.

YIN, L.; DUAN, J.; BIAN, X.; Y.U.S. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Res.**, v. 1, p. 61. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32517735/>.

ZENG, S.; PENG, Y.; MA, J.; GE, Y.; HUANG, Y.; XIE, S.; YUAN, W.; LU, C.; ZHANG, H.; LUO, Q.; LIAO, X.; LU, H. Hematopoietic stem cell and immunotoxicity in zebrafish embryos induced by exposure to Metalaxyl-M. **Science of The Total Environment**, v. 809, p. 152102. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152102>.

ZHANG, J.P.; YAN, J.; XU, J.; PANG, X.H.; CHEN, M.S.; LI, L.; WU, C.; LI, S.P.; ZHENG, L.; Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. **J Hepatol.** v. 50, pp. 980-989, 2009.

5. ANEXOS

ANEXO A

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: 1CAAE: 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: 62 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 B

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 57 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:

ANEXO C

NORMAS DA REVISTA

GENERAL GUIDELINES

A few requirements apply to all manuscript types; those requirements are listed below. Consult separate sections for more detailed information on preparing specific article types.

General Guidance

Manuscripts should be as concise as possible without sacrificing clarity or limiting reproducibility. When appropriate, use active voice to avoid ambiguity. *EHP* covers all disciplines engaged in the broad field of environmental health science.

Therefore, we ask authors to avoid jargon and define any terms that may not be universally recognized or consistently used.

Line Numbering

Enable continuous line numbering on all manuscripts (i.e., line numbers should NOT restart at 1 on each page). Manuscripts received without continuous line numbers will be returned to the author for revision before peer review.

Title Page

Include the following items in the order shown, beginning on the first page of the manuscript:

- Manuscript title
- Names of the authors, with the first name provided first
- Affiliations of all authors (department, institution, city, state/province, and country)
- Complete contact information for the corresponding author (name, email address, and postal address)
- Declaration of conflicts of interest

Symbols and Equations

Use MathType or Word's Equation Builder tool to generate mathematical expressions and equations, as well as any equation variables used within the text itself.

- Place simple expressions and equations in line. Present in-line equations on one line, and do not stack fractions. Example:

$$M_{pas}/(R_{PUF-PAS} \times t).$$

Average air concentration (C_{air}) was derived using $C_{air} =$

- Place complex expressions and equations, including those with stacked fractions, on a separate line, and include a number in brackets (on the same line, to the right) if needed. Example:

$$CD = \left(\frac{100 \times C_B^Y}{E_{50}^Y + C_B^Y} \right) \quad [1]$$

- Define all nonstandard elements, including superscripts and subscripts.
- Use bold text to represent vectors.

Footnotes

Do not use footnotes in the main manuscript text.

REVIEWS

Review articles present, contrast, and combine information from previously-published research to address a specific question or issue related to environmental health. Although *EHP* does not publish narrative reviews or reviews based on meetings (meeting summaries or reports), we may consider a variety of review formats:

State-of-the-science review (also called scoping review): examination of the extent, range, and nature of evidence on a well-defined environmental health topic or question.

- Provides an overview of the current knowledge base and identifies potential gaps and priorities for future research.
- May include evidence maps to display study characteristics and results.

Systematic review: comprehensive collection, critical evaluation, and synthesis of previous studies to address predetermined research question(s).

- Specific requirements vary depending on the goals of the review. Systematic reviews performed to inform regulatory decision-making processes generally require an a priori protocol and formal study quality assessment.
- Systematic reviews may include quantitative meta-analyses depending on the goal(s) of the review and the suitability and extent of the available data.

Regardless of review type, authors are required to integrate and critically analyze information from previous research. They should identify information gaps, make recommendations for future research, and draw conclusions based on the stated purpose of the review.

Systematic methods, including comprehensive and clearly defined search strategies and study eligibility criteria, must be used to identify the relevant literature and current state of knowledge in an unbiased and comprehensive manner.

Note: Before conducting a review, authors should consult appropriate guidelines, such as PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) and the EQUATOR network, for guidance on planning, executing, and reporting of systematic reviews and meta-analyses, and scoping reviews.

Suggested Length

The suggested review length is < 10,000 words, excluding the text in the abstract, references, tables, figure captions, acknowledgments, and Supplemental Material.

Title

The title should consist of ≤ 300 characters and state the subject of the review including exposures, outcomes, and evidence types (e.g., epidemiological, experimental animals, mechanistic, etc.) assessed. The type of review (e.g., state-of-the science, systematic review) should also be stated, when appropriate. The title should not be a declarative statement of the study results or conclusions.

Abstract

Authors should include a structured abstract of ≤ 300 words using the following headings: Background, Objectives, Methods, Results, Discussion. The abstract should not include references or any information that does not appear in the text of the manuscript.

We recommend that authors summarize the main takeaways from the review such as key characteristics of included studies, challenges and limitations of the current knowledge base and review approach, and recommendations to address potential knowledge gaps.

Main Text Structure

Sections should appear in the following order:

- Introduction
- Methods
- Results
- Discussion
- References
- Tables
- Figure captions

Concise subheadings (≤ 8 words each) may be used to designate major topics within each of these sections. Subheadings should be used to organize information but should not summarize or interpret results or conclusions.

Introduction

Define the question or problem and provide enough background to allow the reader

to understand the importance of the review. Provide a rationale based on previous research and relevant reviews, including how the current review advances upon previously published reviews. Provide specific aims of the review with reference to study questions, including relevant population(s) and exposure(s).

Methods

For all types of reviews, provide detailed descriptions and rationales for processes used to identify the corpus of relevant scientific literature, including but not limited to:

- **Protocols:** Describe the planning stage of the systematic review process including links to protocols deposited in online databases (e.g., [PROSPERO](#)) as appropriate.
- **Search strategy:** Describe the full electronic search strategy, databases searched, and date of final search, such that the search could be fully replicated by other researchers.
- **Study eligibility criteria:** Provide a detailed description of and rationale for all study inclusion/exclusion criteria, including population(s), exposure(s), evidence stream(s) (e.g., human observational, experimental animal, in vitro, etc.), date and language limitations, etc.
- **Study selection:** Describe the formal screening process used to select studies, such as number of screeners, conflict resolution, and any computer-assisted techniques (e.g., machine learning, automated text recognition).
- **Data extraction:** Indicate the data that were extracted and how meta-data and results were collected from records.
- **Study quality:** Describe quality assessments of individual studies, lines of evidence, or outcomes (e.g., internal validity, risk of bias) as appropriate. Discuss the strengths/limitations of individual studies, as well as the body of evidence and any knowledge gaps.
- **Meta-analyses (if applicable):** Provide all details of statistical analyses used to quantitatively synthesize data across studies, including summary measures, consistency measures, and subgroup analyses.

Results

Provide the results of study screening, summaries of extracted data, and any synthesis measures across studies using tables and figures that allow readers to draw their own conclusions rather than solely being led by the authors' narrative.

- **Study selection:** Provide numbers of studies screened and included in the review, along with reasons for exclusion at each stage. Flow diagrams (see [PRISMA](#)) are generally most effective and may be included as Supplemental Material.
- **Summary of findings:** Present extracted data, justifications for data selection or exclusion, and any individual study quality ratings along with citations for each study in summary tables.
 - For broad scoping reviews, online interactive visualizations may be used to complement tables and figures within the main body of the manuscript.

- For meta-analyses, include confidence intervals and consistency measures along with results of any additional analyses. Individual estimates used to derive summary estimates should also be reported.

Discussion

Summarize the main findings for primary exposures or outcomes, and put them into context with previous related research and reviews. Discuss any limitations of the body of evidence at the exposure and/or outcome level as well as any limitations of the review process.

Conclude with a brief overview of the main objectives and results of the review, including summaries of the state of the knowledge and potential knowledge gaps.

Acknowledgments

Include sources of funding for the research (if applicable), such as granting agencies, foundations, private support, etc. Authors may also include (as relevant) specific author contributions, acknowledgment of other contributors, information about data sharing, or names of large cohort groups.

REFERENCES AND CITATIONS

References

Begin the list of references on a new page after the “Discussion” section of the manuscript. Please provide complete, accurate information for references, including:

- Author/editor name(s) or authoring agency
- Year of publication
- Full title of article or chapter
- Title of journal or book/proceedings
- For books and meeting reports, city/state/country of publication and name of publisher
- Volume and inclusive page numbers
- PubMed article identifier (PMID)
- Digital object identifier (DOI)
- For websites and online documents, the URL and date accessed
- For software, the version number
- For data sets or data files, the electronic location or identifier, and version number or date accessed as appropriate

If you are uncertain whether to include a piece of information, err on the side of inclusion.

Number references numerically according to the order in which they first appear in the main text of the manuscript.

In-Text Citations

Place all in-text citations immediately after the information cited, using superscript numbers. Place citation numbers outside periods and commas but inside colons and semicolons, as shown below:

- High sodium intake has been strongly associated with increased risk of hypertension.¹ In some coastal areas, highly saline drinking water adds to people's sodium intake.²
- Other considerations in water safety include emerging chemicals of concern that cannot always be removed, such as pharmaceuticals^{31,34} and nanoparticles³³; aging infrastructure under streets and inside homes³⁴; and other persistent threats, such as Legionella bacteria.³⁵⁻³⁷

When citing an electronic source in the reference list (website/web page/database), use a direct link to the specific report, document, or fact sheet where possible. References that direct readers to a generic homepage should be removed from the reference list and inserted as an in-text citation.

Reference Managers

EHP does not have dedicated reference manager style. If using reference manager software, select any established style that uses superscripted numbered citations, such as AMA.

TABLES

EHP formats tables prior to publication. The editors reserve the right to request that complex tables be simplified to comply with Section 508 requirements.

Direct questions concerning tables to ehpsubmissions@niehs.nih.gov.

Creating Main Text Tables

- Begin each table on a new page after the list of references.
- Create tables using the Table feature in Microsoft Word. Do not submit tables as images.
- Number tables using Arabic numerals (e.g., Table 1, 2, 3, etc.) according to the order in which they are first mentioned in the main text.
 - Tables may not contain parts (e.g., Table 1A, 1B, etc.; or Table 1.1, 1.2, etc.).
- Ensure that all tables are cited in the main text.
- Give each table a title that describes what is shown but does not summarize results or present conclusions.

- Adhere to the following guidelines to ensure table readability for readers with disabilities:
 - Avoid using more than three layers of row or column headings.
 - Do not change column headings within the body of a table.
 - Do not merge cells across rows or across columns within the body of the table. All columns within the body of a table must comprise the same number of rows, and all rows must comprise the same number of columns.
 - Do not use shading, color, italics, underlining, or bold type for emphasis or to denote significance.
 - Do not include images or complex equations in tables.

Table Content

- Use the “±” symbol for arithmetic mean and standard deviation or standard error (e.g., “mean ± SE”) and parentheses for the standard error when presented with the geometric mean [e.g., “GM (SE)”].
- Present number and percent as “*n* (%)” in one column.
- Present confidence intervals in parentheses in the same column as the point estimate, with the upper and lower bounds separated by a comma [e.g., (0.1, 2.3)].

Table Notes

- List abbreviations, definitions, and general information about the table in a note immediately under the table.
 - Define relevant populations or samples, models, calculations, variables, and statistical analyses such that the table can be interpreted easily by the reader without having to read the entire manuscript.
 - Indicate numbers of observations (overall and according to subgroups, as appropriate) used to derive the data shown, after accounting for missing data
 - If *p*-values are reported:
 - Indicate the comparison to which the *p*-value applies (e.g., “compared with untreated controls”)
 - Indicate the statistical analysis used to derive the *p*-value
 - Provide numeric *p*-values for all estimates reported in the table, instead of using symbols to indicate *p*-value categories only
- List footnotes after the general note (if one is included) to explain or expand upon specific elements of the table.
 - Begin each footnote on a new line.
 - Indicate footnotes using lowercase italicized superscript letters, starting with “a” for each table. Lettered footnotes within the table should be ordered from top left to top right, next row left to right, and so on.
 - Do not use footnotes in the table title.

FIGURES

EHP does not redraw or format author images prior to publication. It is the authors' responsibility to ensure appropriate figure numbering, quality, and sizing to avoid publication delays.

EHP editors reserve the right to request that complex figures (e.g., figures with multiple panels showing information in a variety of formats, or that include panels related to different experiments) be divided into separate figures for publication. Authors also may be asked to edit figures to comply with [Section 508 requirements](#).

Direct questions concerning figures to ehpsubmissions@niehs.nih.gov.

Creating Main Text Figures

- Number figures according to the order in which they are first mentioned in the main text.
- Ensure that all figures are cited in the main text.
- Adhere to the following guidelines to ensure figure readability and accessibility:
 - Do not use color as the only means of conveying information; use contrast, patterns, or symbols instead of color (or in addition to color) whenever possible.
 - Whenever possible, ensure that all images can still be interpreted when printed in black and white.
 - Ensure all words are spelled correctly.
- Clearly label all axes, giving both the measure and the unit of measurement where applicable.
- Ensure that letters, numbers, and lines are clearly legible and easy to differentiate and that all text within each image is of similar size, with type sizes at 6 point (minimum), though preferably at 8 points or above when reduced to final publication size.
- When possible, ensure that terms are styled the same in figures as they are in the main text (e.g., subscript the “10” in “PM₁₀” in both the text and the figure labels/legends).
- Ensure that terms and styles (including symbols and colors) are consistent across figures. For example, if Figure 1 is a scatterplot and Figure 2 is a bar graph, you might use a black circle to represent the control in the scatterplot and a black bar to represent controls in the bar graph.
- For photomicrographs, provide a scale bar on the image or report the original objective used to take the image. Do not adjust the magnification based on camera adaptor or eyepiece lenses. If a scale bar is provided, specify the length in the figure caption (e.g., “bar = 10 μm”). You may adjust an image for brightness and contrast if you apply the change to the entire image. Do not remove background data of gels and blots. The final image must accurately represent the original data.
- Graphs used to summarize data should include individual data points in addition to summary values or regression lines when possible.

Figure Size

- Figures may be no larger than 7.5 inches in width. Ensure that reducing a figure to this size does not compromise readability, quality, or interpretability.
- These guidelines also apply to figures with multiple panels. *EHP* does not have the ability to rearrange panels within a figure to meet the size requirement.

Saving and Submitting Figures

- Save and submit each main text figure as an individual file in one of the following formats:
 - PDF (fonts must be embedded)
 - PS/EPS (embed fonts, or use system fonts only: Helvetica, Courier, Arial, Times)
 - TIFF (no layers, LZW compression, Interleaved Pixel Order, IBM Byte Order, minimum 300 dpi, 600 dpi preferred, minimum 8-bit color depth)
 - JPG (may be submitted if higher-quality image formats are not available; minimum 300 dpi, 600 dpi preferred, minimum 8-bit color depth)
- Submit only one version of each figure, but format can vary by figure.
- Submit figures with multiple panels as a single file.
- Include the figure number in the filename of each figure (e.g., “Figure 1.pdf”).
- Do not embed figures in the main text file.

Figure Captions

- Provide main text figure captions on a new page of the main text after tables.
- Include a title for the entire figure and descriptors for each panel [e.g., “Figure 1. Incidence of hepatocellular adenomas (*A*) and carcinomas (*B*) in mice exposed to DEHP”].
- Figure titles should describe the figure and not interpret its meaning or present conclusions.
- Define all uncommon abbreviations.
- Define relevant populations or samples, models, calculations, observations per data point, and statistical analyses such that the table can be interpreted easily by the reader without having to read the entire manuscript.
- Define all elements of the figure, including error bars, confidence intervals, symbols, whiskers, and lines or bars that are not already defined within the image itself.
- If statistical significance or *p*-values are reported, clearly indicate the comparison(s) to which they apply (e.g., “compared with controls from the corresponding age group”).
- Provide a credit line for any images reused with permission from the copyright holder. Present credit lines as the copyright holder requires; do not reword.

ANEXO D

COMPROVANTE DE SUBMISSÃO



Environmental Health Perspectives <em@editorialmanager.com>

Para: Você

You are being carbon copied ("cc:'d") on an e-mail "To" "Dalila Moter Benvegnú" dalilabenvegnu@uffs.edu.br

CC: "Stephany Bonin Godinho dos Santos" stephany.bgs@hotmail.com, "Matheus Ryan Noah Sierotta da Silva" matheusryan@alunos.utfpr.edu.br, "Roberta Bonin Godinho dos Santos" robertaboning@gmail.com, "Maiara Grasiela Rossi" mairossibio@gmail.com, "Gabriela Sandri" gabi-sandri03@hotmail.com, "Carolina Panis" carolpanis@hotmail.com

Dear Prof. Benvegnú,

Your submission entitled "Mechanisms of immune dysregulation induced by pesticide exposure and their implications for cancer: a systematic review." has been assigned the following manuscript number: EHP12178.

As corresponding author, you can check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <https://www.editorialmanager.com/ehp/>.

**Please note that coauthors will not have access to the manuscript from their account.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Environmental Health Perspectives