



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

BEATRIZ GEOVANA LEITE VACARIO

**Impacto da exposição aos agrotóxicos e da presença do polimorfismo rs7438135 no gene *UGT2B7* na geração de estresse oxidativo e perfil clinicopatológico em mulheres com câncer de mama.**

---

Londrina

2023

BEATRIZ GEOVANA LEITE VACARIO

**Impacto da exposição aos agrotóxicos e da presença do polimorfismo rs7438135 no gene *UGT2B7* na geração de estresse oxidativo e perfil clinicopatológico em mulheres com câncer de mama.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: *Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Panis*

Co-orientadora: *Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Mara Serpeloni*

Londrina

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

V112 Vacario, Beatriz Geovana Leite .  
Impacto da exposição aos agrotóxicos e da presença do polimorfismo rs7438135 no gene UGT2B7 na geração de estresse oxidativo e perfil clinicopatológico em mulheres com câncer de mama. / Beatriz Geovana Leite Vacario. - Londrina, 2023.  
100 f. : il.

Orientador: Carolina Panis.  
Coorientador: Juliana Mara Serpeloni.  
Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2023.  
Inclui bibliografia.

1. Câncer de mama - Tese. 2. Agrotóxico - Tese. 3. Enzima UGT2B7 - Tese. 4. Estresse Oxidativo - Tese. I. Panis, Carolina. II. Serpeloni, Juliana Mara . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

CDU 616-092

**BEATRIZ GEOVANA LEITE VACARIO**

**Impacto da exposição aos agrotóxicos e da presença do polimorfismo rs7438135 no gene *UGT2B7* na geração de estresse oxidativo e perfil clinicopatológico em mulheres com câncer de mama.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Panis  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marla Karine Amarante-  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Losi Guembarovski-  
Universidade Estadual de Londrina- UEL

Londrina, 25 de julho de 2023

## **APOIO FINANCEIRO**

- CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) - PROAP e concessão da bolsa de mestrado.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant: 404610/2021-8 e 402364/2021-0)

## **APOIOS INSTITUCIONAIS**

- Universidade Estadual de Londrina (UEL).
- Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial (PPGFCL).
- Hospital do Câncer de Francisco Beltrão (Ceonc).
- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Francisco Beltrão (UNIOESTE).

## AGREDECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer á Deus por ter me sustentado e capacitado em todos esses anos de estudo possibilitado a realização de um sonho.

Agradeço imensamente as minhas orientadoras Prof. Dra. Carolina Panis e Prof. Dra. Juliana Mara Serpeloni pela excelente orientação e apoio nesses dois anos. Por serem extremamente atenciosas, pacientes e por estarem sempre disponíveis para me ajudar e esclarecer todas as minhas dúvidas. A dedicação e paixão que ambas possuem pela pesquisa é inspiradora e forneceram combustível para a finalização deste projeto.

Á banca examinadora Prof. Dra. Marla Karine Amarante e Prof. Dra. Roberta Losi Guembarovski pela disponibilidade e suas contribuições intelectuais nessa dissertação.

Ao pessoal do laboratorio de Biologia de Tumores da Unioeste, os quais participaram diretamente na realização desse projeto através da obtenção das amostras e análises de estresse oxidativo.

Às minhas amigas do Laboratorio de Mutâgenese e Oncogenética da Uel, que me receberam com muito carinho e sempre estiveram dispostas a ajudar e tirar minhas dúvidas, fazendo os dias serem mais leves e divertidos.

Aos meus amados pais Fernando e Ester, por todo suporte, carinho, incentivo, esforço e sacrifício realizado para que eu pudesse alcançar meus objetivos, sem vocês nada disso seria possível, amo vocês e serei eternamente grata!

Ao meu querido irmão Felipe, pelos momentos de risada, carinho e incentivo durante os momentos mais difíceis dessa caminhada, amo você!

Ao meu namorado William, por todo apoio, carinho, cuidado e compreensão nesses últimos difíceis meses de finalização desse trabalho, deixando tudo mais leve e feliz, amo você!

VACARIO, Beatriz. **Impacto da exposição aos agrotóxicos e da presença do polimorfismo rs7438135 no gene *UGT2B7* na geração de estresse oxidativo e perfil clinicopatológico em mulheres com câncer de mama.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre, 2023.

## RESUMO

Em regiões com economia baseada na agricultura familiar e no agronegócio, as mulheres estão expostas ocupacionalmente aos agrotóxicos. Estas substâncias representam um fator de risco importante para o desenvolvimento de doenças a longo prazo, como o câncer de mama (CM). A detoxificação dos agrotóxicos inclui a família UDP-glucuronosiltransferase (UGTs), composta por um grupo de enzimas que participam das reações de fase II de eliminação. O polimorfismo rs7838135 (G>A) no gene *UGT2B7* aumenta seu potencial de glicuronidação e atua como um sistema antioxidante devido à neutralização de metabólitos do estresse oxidativo. No presente estudo investigamos o impacto da exposição ocupacional a agrotóxicos na geração do estresse oxidativo sistêmico em 228 mulheres com de câncer de mama, agrupadas em expostas ocupacionalmente á agrotóxicos (134) e não expostas á agrotóxicos (94), portadoras ou não do polimorfismo no gene *UGT2B7*. O DNA foi extraído de sangue periférico heparinizado e a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real investigou a presença do polimorfismo rs7838135. Marcadores de estresse oxidativo (níveis de peroxidação lipídica, capacidade antioxidante total – TRAP e metabólitos de óxido nítrico – NOx) foram mensuradas no plasma. Os dados clinicopatológicos como quimioresistência, recorrência, grau histopatológico, receptor de estrógeno, progesterona, fator de epidermal de crescimento (HER), alto índice de proliferação (Ki67), subtipo molecular, tamanho do tumor, agressividade do subtipo, êmbolos angiolinfáticos, idade ao diagnóstico, índice massa corporal, menopausa, estratificação de risco e a invasão de linfonodos, foram obtidos dos prontuários. A exposição aos agrotóxicos induziu aumento significativo da lipoperoxidação sistêmica na presença do polimorfismo rs7838135 para diversas condições clinicopatológicas, incluindo tumores com alto ki67 ( $p=0,0337$ ) e com alta agressividade (subtipos triplo-negativo e Luminal B) ( $p=0,0130$ ). Os níveis de NOx foram aumentados em pacientes portadoras de tumores com elevado ki67( $p=0,0300$ ), receptores de progesterona positivos ( $p=0,0360$ ), tumores de baixo grau ( $p=0,0519$ ), subtipos triplo-negativos/Luminal B ( $0,0268$ ) e pacientes estratificadas com baixo risco de óbito e recidiva ( $p=0,0233$ ). A TRAP foi depletada em pacientes jovens na menopausa ( $p=0,0431$ ) e naquelas com tumores triplo-negativos/Luminal B ( $p=0,0246$ ), bem como naquelas estratificados como de baixo risco de óbito e recorrência ( $p=0,0384$ ). Esses achados mostraram que mesmo a presença do polimorfismo rs7838135 no gene *UGT2B*, que eleva a atividade enzimática e em tese levaria a uma eliminação ideal dos agrotóxicos, não foi capaz de proteger da geração de estresse oxidativo induzida por essa substância em pacientes com CM. Indicando um possível, porém não elucidado papel dos agrotóxicos na supressão da atividade das enzimas *UGT2B7* que poderia potencialmente contribuir para a progressão do tumor, devido aos danos ocasionados pelo estresse oxidativo ao DNA.

**Palavras-chaves:** agrotóxico; polimorfismo de nucleotídeo único (SNP); estresse oxidativo; metabolismo; cancer de mama

VACARIO, Beatriz. **Impact of occupational pesticide exposure and the presence of the polymorphism rs7438135 in the UGT2B7 gene on the generation of systemic oxidative stress and its clinicopathological significance in women with breast cancer.** Dissertation presented to Postgraduate Program in Clinical and laboratory pathophysiology, at the State University of Londrina, as a requirement for obtaining a Master's degree, 2023.

## ABSTRACT

In regions with an economy based on family farming and agribusiness, women are occupationally exposed to pesticides. These substances represent an important risk factor for the development of long-term diseases such as breast cancer (BC). Detoxification of pesticides includes the UDP-glucuronosyltransferase (UGTs) family, composed of a group of enzymes that participate in phase II elimination reactions. The rs7838135 (G>A) polymorphism in the UGT2B7 gene increases its glucuronidation potential and acts as an antioxidant system due to the neutralization of oxidative stress metabolites. In the present study, we investigated the impact of occupational exposure to pesticides on the generation of systemic oxidative stress in 228 women with breast cancer, grouped into occupationally exposed to pesticides (134) and not exposed to pesticides (94), carriers or not of the polymorphism in the UGT2B7 gene. DNA was extracted from heparinized peripheral blood and real-time quantitative polymerase chain reaction investigated the presence of the rs7838135 polymorphism. Oxidative stress markers (lipid peroxidation levels, total antioxidant capacity – TRAP and nitric oxide metabolites – NOx) were measured in plasma. Clinicopathological data such as chemoresistance, recurrence, histopathological grade, estrogen receptor, progesterone, epidermal growth factor (HER), high proliferation index (Ki67), molecular subtype, tumor size, subtype aggressiveness, angiolymphatic emboli, age at diagnosis, body mass index, menopause, risk stratification and lymph node invasion were obtained from medical records. Exposure to pesticides induced a significant increase in systemic lipid peroxidation in the presence of the rs7838135 polymorphism for several clinicopathological conditions, including tumors with high ki67 ( $p=0.0337$ ) and with high aggressiveness (triple-negative and Luminal B subtypes) ( $p=0, 0130$ ). NOx levels were increased in patients with tumors with high ki67 ( $p=0.0300$ ), positive progesterone receptors ( $p=0.0360$ ), low-grade tumors ( $p=0.0519$ ), triple-negative subtypes /Luminal B (0.0268) and stratified patients with low risk of death and recurrence ( $p=0.0233$ ). TRAP was depleted in young menopausal patients ( $p=0.0431$ ) and in those with triple-negative/Luminal B tumors ( $p=0.0246$ ), as well as in those stratified as at low risk of death and recurrence ( $p=0 .0384$ ). These findings showed that even the presence of the rs7838135 polymorphism in the UGT2B gene, which increases enzymatic activity and in theory would lead to an ideal elimination of pesticides, was not able to protect against the generation of oxidative stress induced by this substance in patients with BC. Indicating a possible, but not yet elucidated, role of pesticides in suppressing the activity of UGT2B7 enzymes that could potentially contribute to tumor progression, due to damage caused by oxidative stress to DNA.

**Keywords:** Pesticides; Single nucleotide polymorphisms (SNP); oxidative stress; metabolism; breast cancer.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Número estimado de novos casos em 2020, no mundo, ambos os sexos, de todas as idades..	14
<b>Figura 2:</b> Vias gerais do metabolismo de drogas e sua relação direta com o câncer	233
<b>Figura 3:</b> Localização cromossômica do gene UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member B7 ( <i>UGT2B7</i> ).	266
<b>Figura 4:</b> Localização do polimorfismo rs7438135 no gene <i>UGT2B7</i>	288

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ahr	Receptor Hidrocarboneto Arílico
ANVISA	Agência Nacional da Vigilância Sanitária
ARE	Elementos de Resposta Antioxidante, do inglês <i>Antioxidant Response Elements</i>
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada, do inglês <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
BARD1	<i>BRCA1 Associada ao Anel Dominio</i> , do inglês <i>BRCA1 Associated RING Domain 1</i>
BRCA 1/2	Câncer de Mama do tipo 1 e 2, do inglês <i>Breast Cancer type 1 and 2</i>
BRIP1	BRCA 1 Integrador Elicase 1
CAR	Receptor Constitutivo de Androstano
CDI	Carcinoma Ductal Infiltrante
CDH1	Caderina 1
CHEK2	<i>Ponto de Verificação Quinase 2</i> , do inglês <i>Checkpoint Kinase 2</i>
c-MET	Proteína Tirosina Quinase Met, do inglês <i>Tyrosine-Protein Kinase Met</i>
COMT	<i>Catechol O-methyl Transferases</i>
COX-2	Ciclooxygenase-2
CYP1A1-	Família Citocromo P450 Subfamília A Membro 1
CYP1B1	Família Citocromo P450 Subfamília A Membro 1
CYP450	Família Citocromo P450
DDE	Diclorodifenildicloroetano
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ER1	Receptor de Estrógeno Alfa
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GRB2-SOS1	Receptor do Fator de Crescimento Ligado a Proteína 2- Filho de Sevenless 1, do inglês <i>Growth Factor Receptor Bound Protein 2 – Son of Sevenless 1</i>
GSH	Glutathiona
GSTs	Glutathiona Transferases
HER 2	Receptor do Fator do Crescimento Humano Epidermal- Tipo 2, do inglês <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor-Type 2</i>
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IFN- $\gamma$	Inteferon Gama
IL-4	Interleucina 4
KEAP1	Proteína 1
Ki-67	Índice de Proliferação Celular
MAF	Oncogene Homologo Musculoaponeurotico Fibrosarcoma V-Maf, do inglês <i>V-Maf Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MAPKs	Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
MCF-10A	Linhagem Celular Epitelial Não Tumorigênica
MCF-7	Linhagem Celular de Adenocarcinoma de Mama Humano

mi-RNA	Micro-RNA
MMP2	Matriz Metalopeptidase 2, do inglês <i>Matrix Metallopeptidase 2</i>
MMP7	Matriz Metalopeptidase 7, do inglês <i>Matrix Metallopeptidase 7</i>
MMP9	Matriz Metalopeptidase 9, do inglês <i>Matrix Metallopeptidase 9</i>
mPGES-1	Prostaglandia sintases do inglês <i>Prostaglandin Synthases</i>
MT2	Linhagem Célular Leucêmica
NADPH-CYP	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida-Adenina
NATs	N-acetil Transferases, do inglês - <i>N-acetyl Transferases</i>
NF Kappa B	Fator Nuclear Kappa B
NF1	Neurofibrina 1, do inglês <i>Neurofibromin 1</i>
NFR-2	Fator 2 Relacionado ao Fator Nuclear Eritróide
NK	Matadora Natural, do inglês <i>Natural Killer</i>
NOX	Óxido Nítrico
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OH	Grupo Hidroxila
PALB2	Parceiro e Localizador de <i>BRCA2</i> , do inglês <i>Partner And Localizer Of BRCA2</i>
PAPS	5'-fosfoadenosina-3'-fosfosulfato
PARA	Programa para Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PARP-1	Poly (ADP-ribose) Polimerase-1, do inglês <i>Poly(ADP-ribose) Polymerase-1</i>
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PNCRC	Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PTEN	Fosfatase e Tensina Homóloga Pseudogene 1, do inglês <i>Phosphatase and Tensi Homolog Pseudogene 1</i>
PXR	Receptor Pregnano X
RE	Receptor Estrógeno
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
RAD51C	RAD51 Paralógo C
SAM	S-Adenosil-L-Metionina
SNP	Polimorfismo Nucleotídeo Único, do inglês <i>Single Nucleotide Polimorphism</i>
STAT1a	Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição, do inglês <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
STK11	Serina/Treonina Kinase
SULTs	Sulfotransferases
TCGA/TIMER	Atlas Genoma Câncer, do inglês <i>Cancer Genome Atlas</i>
TKR	Receptor Tirosina Quinase
TNF - $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TP53	Proteína Tumoral <i>p53</i> , do inglês <i>Tumor protein p53</i>
TPMT	Metiltransferase, do inglês <i>Methyltransferases</i>
UDPGA	Ácido Uridina5'-Difosfo- $\alpha$ -D-Glucurônico
UGT2B7	UDP-glicuronil-Transferase 2B7
UGTs	UDP-glicuronil-Transferase
2,4 D	Ácido Diclorofenoxiacético
4-OH E1	4-hidroxiestrogênio, do inglês <i>4-hydroxyestrogen</i>
4-OH-TAM	4-hidroxi-tamoxifen
4T1	Linhagem Celular Carcinoma Mamário Murino
8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	14
2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS.....	14
2.2 EXPOSIÇÃO AOS AGROTÓXICOS E CARCINOGENESE .....	177
2.3 METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS E ENZIMAS ASSOCIADAS .....	22
2.3.1 Enzimas de Fase I.....	224
2.3.2 Enzimas de Fase II e o Gene <i>UGT2B7</i> .....	245
2.4. ESTRESSE OXIDATIVO, CÂNCER DE MAMA E METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS .....	258
2.4.1 Exposição aos Agrotóxicos, Geração de Estresse Oxidativo e Câncer de Mama .....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	31
3.1 Objetivo Geral .....	311
3.2 Objetivos Específicos .....	31
<b>4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	32
<b>5 CONCLUSÃO GERAL</b> .....	79
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	80
<b>APÊNDICES</b> .....	955
APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE .....	95
APÊNDICE B: Aprovação do projeto de pesquisa no Comitê de Ética .....	977
APÊNDICE C: TERMO DE CIÊNCIA DO RESPONSÁVEL PELO CAMPO DE ESTUDO .....	100

## 1 INTRODUÇÃO

Na região sudoeste do Paraná, cuja economia está centralizada na agricultura familiar e no agronegócio, há uso intensivo de agrotóxicos, destacando-se o glifosato, a atrazina e o ácido diclorofenoxiacético (2,4D) (GABOARDI; CANDIOTTO; RAMOS, 2019). Nos 27 municípios que compõem a 8ª Regional de Saúde do estado do Paraná, foi identificado que mulheres que desenvolvem câncer de mama (CM) e são expostas ocupacionalmente aos agrotóxicos desenvolveram tumores com fenótipos mais agressivos em comparação com as mulheres sem exposição ocupacional (PIZZATTI et al., 2020). Esse fato sinaliza um possível papel dos agrotóxicos na aquisição de mecanismos responsáveis pela agressividade dos tumores de mama e desenvolvimento de tumores com pior prognóstico.

Na última década, nosso grupo vêm caracterizando o impacto da exposição aos agrotóxicos no perfil do câncer de mama humano. Identificamos que existe intensa contaminação humana por agrotóxicos nesta população (TEIXEIRA et al., 2021), e que esta exposição está associada a um perfil de doença mais agressivo, com supressão dos mecanismos de respostas imunes antitumorais e alterações nos genes de reparo de DNA (DA SILVA et al., 2022; SCANDOLARA et al., 2022). Estes achados indicam que os agrotóxicos provavelmente possuem uma ação sistêmica e podem impactar outras vias biológicas.

As enzimas glucuronidases, das quais faz parte a enzima UGT2B7, são importantes na detoxificação de compostos endógenos e exógenos (YANG et al., 2017). Neste processo, as UGTs apresentam atividade antioxidante devido à sua capacidade de neutralizar espécies reativas e metabólitos do estresse oxidativo (KALTHOFF et al., 2010). A presença de polimorfismos nestes genes pode modificar esta atividade, o que no caso dos agrotóxicos poderia impactar na formação de compostos com potencial carcinogênico que influenciam diretamente na suscetibilidade e/ou prognóstico do câncer (MARUO et al., 2005; SHEN et al., 2019; WANG et al., 2018).

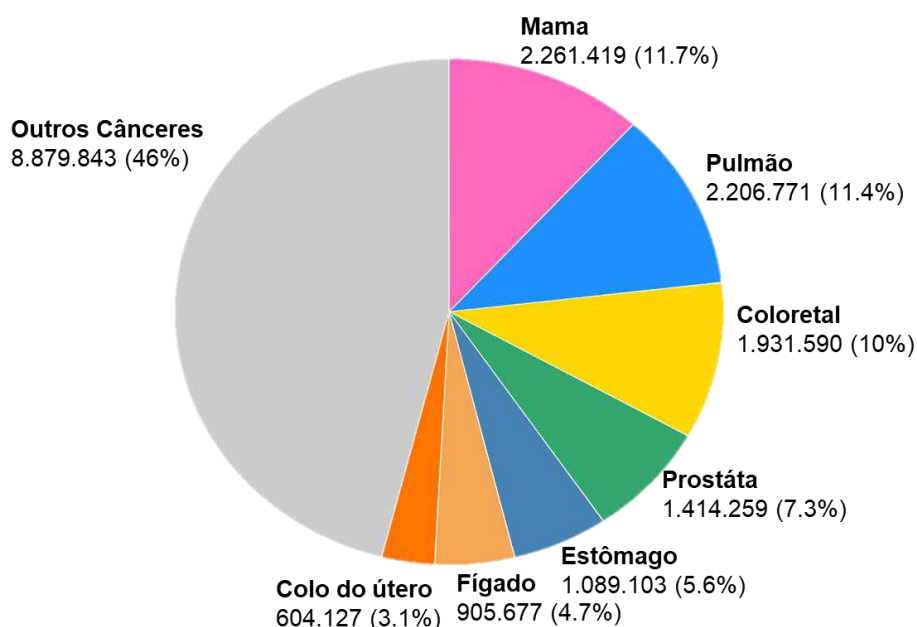
Pouco se sabe sobre a relação entre a exposição humana a agrotóxicos e os polimorfismos nos genes UGT, especialmente no CM. Por esse motivo, neste trabalho investigamos o impacto da exposição ocupacional aos agrotóxicos no perfil de estresse oxidativo sistêmico de mulheres com CM e portadoras do polimorfismo de

nucleotídeo único rs7438135 presente na região promotora do gene *UGT2B7* (G>A), e seu significado clínico.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS

O CM é a neoplasia maligna mais comum em mulheres no mundo. Segundo o *Global Cancer Observatory*, o número estimado de novos casos em 2020 foi de 2.261.419, comparado a ambos os sexos e em todas as idades, ultrapassando o número de casos de câncer de pulmão (Figura 1, GLOBOCAN, 2023). Desses casos, 684.996 resultaram em mortes, correspondendo a causa mais frequente de óbito por câncer em mulheres (SUNG et al., 2021). No Brasil, a estimativa total para os anos 2023-2025 é de 73.610 casos, com 66,54 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2022).



**Figura 1:** Número estimado de novos casos de câncer em 2020, no mundo, para ambos os sexos e todas as idades. Fonte: GLOBOCAN, 2023.

Segundo as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do CM do Ministério da Saúde (Portaria 05/2019), os principais fatores de risco para o câncer de mama são a idade avançada, as características reprodutivas e de risco hormonal, a história familiar

e pessoal, o estilo de vida e obesidade, além de influências ambientais (Ministério da Saúde, 2019).

O CM é fortemente associado a fatores ligados ao sistema reprodutor feminino. Os ovários, por exemplo, sintetizam hormônios esteroides, como o estradiol e a progesterona, entre o período da menarca e a menopausa, os quais afetam o desenvolvimento e a função das mamas (COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER, 2012). O estrógeno, ao se ligar aos seus receptores, leva ao crescimento e proliferação celular (STAREK-ŚWIECHOWICZ; BUDZISZEWSKA; STAREK, 2021) e ao ser metabolizado pela enzima família citocromo P450 Subfamília A membro (CYP1A1) o produto de seu metabolismo, 2-OH-catecol, pode gerar danos ao material genético, por meio da formação de aductos estáveis de ácido desoxirribonucleico (DNA). Semelhantemente, é observado a geração do 4-OH-catecol, por meio da enzima CYP1B1 (família Citocromo P450 Subfamília B membro 1); esse metabólito ao se ligar a adenina e guanina forma aductos instáveis de DNA que, posteriormente, sofrem depuração o que possibilita mutações de ponto, além desse metabólito passar por ciclagem redox e levar a formação de radicais livres ocasionando danos ao DNA. Essas alterações provocadas pelo estrogênio ao material genético são fundamentais para a iniciação da carcinogênese (SANTEN, 2014).

Somente a progesterona não pode ocasionar o crescimento das células mamárias, é necessário a presença do estrogênio (TRABERT et al., 2019). Seu papel ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que no tecido mamário sua presença induz a proliferação celular e possui efeito carcinogênico, diferindo de outros tecidos, o que pode ser explicado pelas suas interações parácrinas e a expressão de receptores de progesterona (PR) no estroma e epitélio da mama (KIM et al., 2013).

Devido aos hormônios sexuais possuírem um papel direto na patogênese desse tipo de tumor, observa-se um aumento do risco quando a mulher apresenta menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade e o uso de terapia hormonal pós menopausa. Entretanto, percebe-se uma redução do risco em situações de alta paridade e lactação (ANDERSON; SCHWAB; MARTINEZ, 2014).

O risco de desenvolvimento do CM é duas vezes maior quando há histórico familiar de pelo menos um parente de primeiro grau que teve a doença. Aproximadamente 5 a 10% dos casos de CM estão relacionados a histórico familiar da doença, sendo mutações herdadas de forma autossômica dominante (COUGHLIN,

2019). Mutações em genes de alta penetrância, como as do gene Câncer de Mama tipo 1 e 2 (*BRCA1/2*), Caderina 1 (*CDH1*), Parceiro e Localizador de *BRCA2* (*PALB2*), Fosfatase e Homólogo de Tensina (*PTEN*), Serina/Treonina Kinase (*STK11*), Proteína Tumoral P53 (*TP53*), assim como os de penetrância intermediária, como Ataxia Telangectasia Mutante (*ATM*), Associado ao Anel de Domínio 1 (*BARD1*), Ponto de verificação quinase 2 (*CHEK2*), *BRCA 1* Integrador Helicase 1 (*BRIP1*), FA Complementação Grupo D2 (*FANCD2*), *RAD51* Paralógo C (*RAD51C*), já os genes e loci de baixa penetrância estão associados principalmente a polimorfismos. As mutações mencionadas anteriormente estão relacionadas a aproximadamente 20-25% ao risco de desenvolvimento do CM (*“Genetics of Breast and Gynecologic Cancers- National Cancer Institute”*, 2022; ZAVALA et al. 2019).

Em relação ao estilo de vida, sabe-se que a prática de atividade física e uma dieta pobre em gorduras ou mesmo vegetariana, contribui para a diminuição das concentrações circulantes de hormônios esteróides. O exercício também pode reduzir a inflamação crônica e o desequilíbrio no estado redox, fatores-chave na patogênese desse tumor (STAREK-ŚWIECHOWICZ; BUDZISZEWSKA; STAREK, 2021). O alto consumo de álcool pode elevar as concentrações sanguíneas do estrogênio, bem como ativar seus receptores. A dieta rica em gordura e o tabagismo, principalmente desde a juventude, também são fatores que aumentam o risco para o desenvolvimento deste câncer (SUN et al., 2017).

Fatores ambientais também estão relacionados ao desenvolvimento da doença podendo ser citados a exposição a substâncias químicas como organoclorados, metais e radiação ionizante. Organoclorados, como os agrotóxicos, por serem lipofílicos e resistentes a biotransformação podem se bioacumular em diversos tecidos adiposos como a mama, nesse local são capazes de atuar como o estrôgenio e por esse motivo estão associados com o câncer de mama (STRUMYLAITÉ; MECHONOŠINA; TAMAŠAUSKAS, 2010).

Assim, cerca de 90% das mutações genéticas são decorrentes de exposições ambientais e estilo de vida. Quando esses fatores coexistem, eleva-se o risco do surgimento do CM (KOLAK et al., 2017). Desta forma, é fundamental entendermos o papel das exposições ambientais como fatores desencadeantes ou agravantes neste câncer.

## 2.2 EXPOSIÇÃO AOS AGROTÓXICOS E CARCINOGENESE

Os agrotóxicos são produtos desenvolvidos com o intuito de eliminar e controlar diversos tipos de pragas causadoras de doenças em plantas, sendo empregados em atividades agrícolas relacionadas ao setor de produção (PERES, MOREIRA, DUBOIS 2003). São categorizados de acordo com sua composição química como organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, neonicotinoides e fenilpirazoles (WHO, 1996; BITENCOURT DE MORAIS VALENTIM et al., 2023). Todos os agrotóxicos detêm algum grau de toxicidade e, conseqüentemente, podem oferecer riscos à saúde humana e ao ambiente por serem usados de forma extensiva e sem medidas de segurança (PANIS et al., 2022a).

O Brasil, cuja a economia é baseada na agricultura, é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo e possui um controle bastante permissivo quanto ao uso dessas substâncias. Apesar do predomínio atual dos herbicidas glifosato, atrazina e 2,4D, existe ampla contaminação por outros agrotóxicos que foram usados no passado, como o diclorodifenildicloroetano (DDE) e o diclorodifeniltricloroetano (DDT), que apresentam elevada persistência ambiental (PANIS et al., 2022b). Portanto, sua população pode ser exposta de diversas maneiras, através de atividades ocupacionais, durante a produção e aplicação destes insumos, e também por intermédio da contaminação de alimentos e água, o que torna a exposição aos agrotóxicos um problema de saúde pública no país (BLAIR et al., 2015; PANIS et al., 2022a; PANIS; PESSÔA CANDIOTTO; GABOARDI, 2022).

A maior parte destes ativos utilizados no Brasil (cerca de 80%) tem seu uso proibido em vários países que compõem a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) da Comunidade Europeia, Índia e China. Uma análise realizada pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) mostrou que pelo menos 15 substâncias, como o glifosato, 2,4-D, malation, diazinon e clorotalonil, que são autorizados para uso no país, possuem algum potencial carcinogênico. Lavouras transgênicas são comuns no país, e têm como características serem resistentes a herbicidas como o glifosato, 2,4-D e dicamba, sendo necessária a aplicação de elevadas quantidades para atingirem o efeito desejado (FRIEDRICH et al., 2021), o que aumenta consideravelmente o risco de contaminação das populações expostas a estas substâncias e o desenvolvimento de

doenças diversas, incluindo o câncer. Por conta disso, os agrotóxicos tem sido foco de diversos estudos para elucidação dos mecanismos relacionados.

O desenvolvimento inicial do CM envolve modificações genéticas e epigenéticas. A progressão tumoral é consequência do acúmulo de mudanças genéticas adicionais garantindo uma vantagem no processo de seleção quando combinadas com a expansão clonal (ROSSI L; MAZZARA C; PAGANI O, 2019). Os agrotóxicos são associados ao desenvolvimento do câncer por promoverem estas alterações, incluindo a geração de estresse oxidativo, acúmulo de danos ao DNA e alterações epigenéticas.

Mutações gênicas são de três tipos substituição, deleção ou adição de base. Enquanto que alterações cromossômicas compreendem mudanças numéricas (aneuploidias, euploidias) ou estruturais em que há alteração no número de genes (deleções, duplicações, cromossomo em anel e isocromossomos) e aquelas que modificam a localização do gene (translocações e inversões). Essas mutações são capazes de afetar a expressão de um gene ou mesmo de seu produto final, e por esse motivo podem estar associadas à origem tumoral (GRIFFITHS, 2012).

Em relação aos oncogenes essas mutações são de ganho de função e dominantes, por isso a presença de apenas um alelo mutado contribui para a tumorigênese. Já no caso de genes supressores tumorais há perda de função, trata-se de mutações recessivas, sendo assim é preciso que os dois alelos estejam mutados para colaborar com a patologia. As mutações também interferem em genes que codificam enzimas de reparo do DNA, como aqueles que estão envolvidos no reparo por excisão de nucleotídeos, reparo por excisão de base, reparo de incompatibilidade, reparo recombinacional e segregação cromossômica (GRIFFITHS, 2012; LEREBOURS; LIDEREAU, 2002; SIEBER; HEINIMANN; TOMLINSON, 2003).

Oncogenes são os responsáveis pelo controle da proliferação celular, atuando positivamente sobre o ciclo celular, sendo alguns deles receptores de fatores de crescimento, proteínas de transdução de sinal e reguladores transcricionais. Já os supressores tumorais são aqueles que protegem a integridade do genoma impedindo o avanço no ciclo celular além de atuarem ativando a apoptose em caso de danificação celular quando ocorrem erros ou mutações, e inibem a metástase, nas células tumorais são praticamente não expressos ou inibidos (GRIFFITHS 2012; VAKONAKI et al., 2013). Alguns dos genes envolvidos no crescimento celular e proliferação são: *Kirsten ras oncogene homolog (KRAS)*, *N-ras oncogene (NRAS)*,

Hras proto-oncogene, GTPase (*HRAS*), B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Treonina Quinase (*BRAF*), Fator de crescimento semelhante à Insulina- AKT Serina/Treonina Quinase (*IGF-AKT*), Fosfatase e homóloga à Tensina (*PTEN*), Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfatase 3-Quinase Catalítica subunidade alfa (*PIK3CA*), APC Regulador da Via de Sinalização WNT (*APC*),  $\beta$ -Catenina, Fator de Transformação Beta (*TGF- $\beta$* ), Família SMAD Membro 4 (*SMAD4*), assim como genes de controle de ciclo celular como: Proteína Tumor P16 (*TP16*), RB Transcrição Corepressor 1 (*RB1*) e também aqueles envolvidos na resposta ao estresse e apoptose, como o Tumor proteína P53 (*TP53*) (YEANG; MCCORMICK; LEVINE, 2008; SHEIKH et al., 2015).

Os mecanismos epigenéticos são responsáveis por permitir ou reprimir a expressão de genes, por meio da conformação da cromatina mais aberta ou condensada, respectivamente, possibilitando a síntese de proteínas. Atuam sobre as proteínas que estão envolvidas na supressão tumoral ou mesmo silenciando outros genes participantes da tumorigênese e metástase de tumores (HAZRA et al., 2021).

As modificações epigenéticas, principalmente a metilação do DNA, por meio da hipermetilação de genes supressores tumorais ou hipometilação de oncogenes, bem como alterações de histonas, modificações na expressão de micro-RNA (mi-RNA), dentre outros mecanismos não completamente elucidados estão sendo associados a patogênese dos tumores de mama (WU; CHU, 2021). A hipometilação do DNA contribui para a progressão tumoral por meio i) da geração de instabilidade cromossômica, ii) reativação de elementos transponíveis, iii) da perda de *imprinting*, iv) f do favorecimento da recombinação mitótica, v) de deleções e translocações e vi) de rearranjos cromossômicos (ESTELLER, 2008).

Assim, a partir da carcinogênese mamária, os tumores de mama podem originar carcinomas *in situ*, ductais ou lobulares, que podem se tornar invasivos quando as células malignas se desligam da membrana basal e invadem o estroma (KENEMANS; VERSTRAETEN; VERHEIJEN, 2004). A metástase é influenciada pelo microambiente tumoral, mutações genéticas e mecanismos epigenéticos, que se caracterizam pela realocação das células tumorais de onde foram originadas para um segundo local devido à perda de adesão, migração e invasão (FROST et al., 2012).

A exposição a poluentes químicos ambientais está diretamente envolvida no aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer por atuar potencialmente em todas as etapas da carcinogênese. Devido às suas características lipofílicas, alguns pesticidas podem se acumular no tecido adiposo, ligar-se aos receptores de

estrogênio e modificar o sinal desencadeado por esse hormônio na mama (ROCHA et al., 2021). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que os agrotóxicos podem atuar como desreguladores endócrinos devido às suas propriedades estrogênicas, ocasionando distúrbios na sinalização celular, alterações epigenéticas, mudanças conformacionais em proteínas e conformação do DNA, instabilidade genética, amplificação da expressão de oncogenes, redução da supressão tumoral, modificações no ciclo celular e interferência na morte celular (KASS; GOMEZ; ALTAMIRANO, 2020; LANDAU-OSSONDO et al., 2009; WAN; CO; EL-NEZAMI, 2022). Por esse motivo, podem elevar o risco do surgimento do CM.

Alguns agrotóxicos como o DDE aumentam a suscetibilidade ao câncer de acordo com a dose exposta, podendo resultar no aumento de tamanho tumoral e comprometimento linfonodal, além de altas concentrações sanguíneas estarem associados a pior sobrevida (KOUAL et al., 2020). Em um estudo realizado por Robison e colaboradores (1985), verificou-se que o DDT, inseticida amplamente utilizado durante e após o período da segunda guerra mundial, ocasiona crescimento de tumores mamários estrógeno-positivos de maneira dose-dependente. O mesmo efeito foi observado em um estudo *in vitro* realizado em células obtidas de adenocarcinomas mamários de ratos Wistar (ROBISON; SIRBASKU; STANCEL, 1985).

O DDT, como demonstrado na análise de Kang e colaboradores (1996), observaram que esse agrotóxico também pode contribuir de forma indireta para a promoção tumoral, pois inibe a junção do tipo Gap (de comunicação intercelular) (KANG et al., 1996). Sua ação sobre a junção Gap é importante para a transição do tecido normal para o neoplásico, pois a inibição das junções celulares favorece o escape do controle de crescimento celular (ZEFFERINO et al., 2019).

Shen e colaboradores demonstraram ainda que o DDT favorece a proliferação celular em linhagens mamárias não-tumorais, induzindo a tumorigênese por meio da fosforilação elevada dos receptores tirosina quinase c-erbB2 (ERBB2), envolvidos na progressão do ciclo celular, rearranjo do citoequeleto, diferenciação celular e apoptose. Também atua fosforilando Proteína Tirosina Quinase Met (c-MET), participam do crescimento celular, motilidade, diferenciação e metabolismo (DU; LOVY, 2018). Possibilita a fosforilação do Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição (STAT1a), possibilitando a proliferação celular, inibição da apoptose e resistência a quimioterapia (LI et al., 2023). Ocasiona aumento da interação da proteína Fator de

Crescimento Receptor ligado a Proteína 2 (GRB2) e Ras/RAC Nucleotideo Guanina de Troca Fator 1 (SOS1), que por sua vez favorecem a proliferação e mitogênese celular (YU et al., 2017). Além da ampliação da fosforilação da proteína quinase ativada por mitógeno, também responsável por regular proliferação, diferenciação e morte celular (MORRISON, 2012; SHEN; NOVAK, 1997).

O glifosato, por sua vez, atua através de mecanismos epigenéticos reversíveis, principalmente provocando metilação do DNA, modificação de histonas e aumentando a expressão de micro-RNAs 182-5p, implicando no desenvolvimento do câncer de mama. Micro-RNAs são pequenos RNAs não codificantes responsáveis pela regulação endógena da expressão genica pós-transcricional, influenciam o ciclo células, diferenciação, proliferação e apoptose (BUKOWSKA et al., 2022). No estudo de Gomez e colaboradores (2018) verificou-se que a administração de glifosato em ratos machos altera o desenvolvimento da glândula mamária e ocasiona hipermetilação de promotores do receptor de estrógeno alfa (ER1), reduzindo sua expressão (GOMEZ et al., 2019). CM ER1 negativos possuem grau histológico mais baixo e maior proliferação celular ao serem comparados com CM ER1 positivo (AOUAD et al., 2022).

Já a atrazina foi associada à supressão do sistema imune no ambiente tumoral em linhagens de carcinoma mamário, além de afetar a proliferação, tamanho tumoral e expressão elevada da Matriz Metalopeptidase 2 (MMP2), Matriz Metalopeptidase 7 (MMP7) e Matriz Metalopeptidase 9 (MMP9), enzimas responsáveis pela degradação de proteínas presente na matriz extracelular (MEC) facilitando a invasão tumoral como também afetando o comportamento da célula tumoral conduzindo a progressão (WANG et al., 2023).

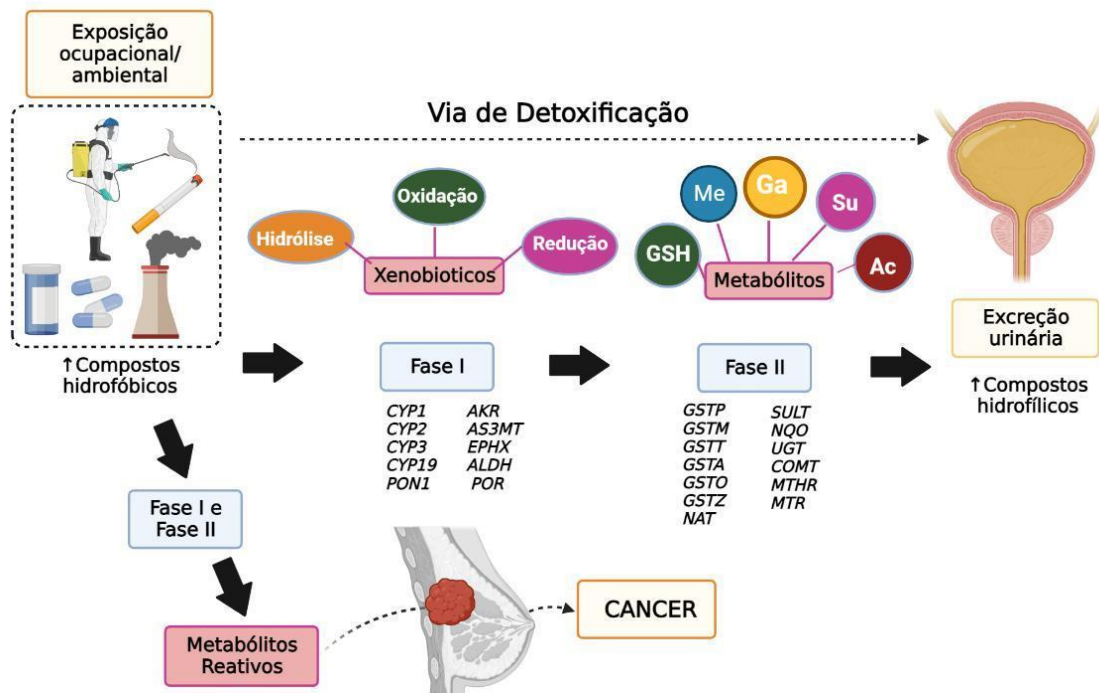
O herbicida 2,4-D está associado a suscetibilidade ao linfoma não-Hodgkin, câncer de pulmão e câncer de mama. A exposição a esse herbicida diminui os níveis de linfócitos T totais e células T helper, importantes na defesa nos primeiros estágios do câncer, além de induzir estresse oxidativo (LOOMIS et al., 2015). Esse agrotóxico pode atuar como desregulador no ciclo reprodutivo hormônio dependentes em ratas (GANDHI; SNEDEKER, 1998). No estudo de Badawi e colaboradores (2000) no qual foi analisado o efeito de hidrocarbonetos clorados, dentre eles o 2,4 D, em ratos *Sprague-Dawley* fêmeas, verificou-se indução da transcrição de genes envolvidos no metabolismo do estrógeno, principalmente do gene CYP1B1, além de elevar a síntese do 4-catecol estrógeno, o qual reage com DNA e leva a formação de adductos

estáveis. Esses adductos quando não reaperados por enzimas estão relacionados a diversas mutações de oncogenes, como nos genes K-ras e H-ras, regulam a proliferação, apoptose, metabolismo e angiogênese e gene supressor tumoral p53 e por esse motivo estão envolvidos na iniciação do câncer (BADAWI; CAVALIERI; ROGAN, 2000; CHEN et al., 2019).

### 2.3 METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS E ENZIMAS ASSOCIADAS

Para tornar possível a eliminação de xenobióticos no organismo por meio da urina ou bile, faz-se necessário o processo de metabolização, no qual as moléculas lipofílicas tornam-se hidrofílicas por intermédio de reações enzimáticas. As reações metabólicas são imprescindíveis, pois a natureza lipofílica de xenobióticos presentes por um longo período no organismo humano pode ser tóxica. Algumas drogas, entretanto, devem passar pela bioativação por meio da metabolização, para só então agir em seus alvos, influenciando, portanto, a eficácia do tratamento escolhido (ALMAZROO; MIAH; VENKATARAMANAN, 2017; SONG et al., 2021; ZHAO et al., 2021). A biotransformação enzimática de xenobióticos é uma forma de proteção contra ao seu potencial tóxico ao DNA, e os danos ao material genético ocasionados por exposição a sua ação, ao escaparem do sistema de reparo leva a mutações irreversíveis contribuindo para o desenvolvimento de tumores e progressão do câncer (HATAGIMA, 2002).

Esse processo é dividido em duas fases, sendo catalisado por distintas famílias enzimáticas. Na fase I ocorrem as seguintes reações: oxidação, redução e hidrólise, enquanto que a fase II é responsável pela conjugação de compostos polares no produto proveniente da primeira fase (WILKINSON, 2005) (Figura 2).



**Figura 2: Vias gerais do metabolismo de drogas e sua relação direta com o câncer. A via de detoxificação transforma moléculas lipofílicas em hidrofílicas para excreção por meio de reações enzimáticas, podendo também gerar metabólitos reativos tóxicos.** Desenvolvido com Biorender.com. AC: acetilação; ALDH: Aldeído Desidrogenase; AKR: Aldo-ceto redutase; AS3MT: arsenito metiltransferase; COMT: Catechol O-Metiltransferase; CYPs: citocromo P450; CYP1: Citocromo P450 família 1; CYP2: Citocromo P450 família 2; CYP3: Citocromo P450 família 3; CYP19: Citocromo P450 família 19 ME: metilação; EPHX1: Epóxido Hidrolase 1; Ga: ácido glucurônico; GSH: glutationa; SU: sulfatação; GSTP: Glutaciona S-Transferase Pi; GSTM: Glutaciona S-Transferase Mu; GSTT: Glutaciona S-Transferase Theta; GSTA: Glutaciona S-Transferase Alfa; GSTO: Glutaciona S-Transferase Omega; GSTZ: Glutaciona S-Transferase Zeta; MTHR: Metileno tetrahydrofolato Redutase; MTR: 5-metil tetrahydrofolato-homocisteína metiltransferase; NQO: NAD(P)H Quinona Desidrogenase; NAT: N-acetiltransferase PON1: Paraoxonase 1; POR: Citocromo P450 oxidoreductase; SULT: Sulfotransferase; UGT: Glucuronosiltransferase. Fonte: O próprio autor

A entrada de agrotóxicos no organismo humano ocorre principalmente através da inalação, contato com a pele ou absorção oral. Estas substâncias são caracterizadas pelo seu baixo peso molecular e lipossolubilidade, favorecendo sua absorção pelo organismo (HUSSEIN et al., 2018). Algumas substâncias como os organoclorados podem bioacumular no organismo devido à sua capacidade lenta de degradabilidade e lipofilicidade. Conseqüentemente, eles podem ser detectados no tecido adiposo humano, sangue e leite materno (MEKONNEN; SIRAJ; NEGASH, 2021).

Os xenobióticos, como os agrotóxicos, passam por um processo de detoxificação por meio da ação das enzimas metabolizadoras de fase I e II, para então serem eliminados. Neste processo, pode ocorrer a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila (OH), peróxido de

hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). A alta produção de ROS leva a fragmentação de ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, e por isso podem levar a carcinogênese quando há um desbalanço com o sistema de defesa antioxidante (KAUR; KAUR, 2018; THE MARIE-GENICA CONSORTIUM ON GENETIC SUSCEPTIBILITY FOR MENOPAUSAL HORMONE THERAPY RELATED BREAST CANCER RISK, 2010).

### 2.3.1 Enzimas de Fase I

As reações de fase I são realizadas em grande parte pela família de enzimas Citocromo P450 (CYP450), que se divide em três subfamílias: Citocromo P450 Família 1 (CYP1), Citocromo P450 Família 2 (CYP2) e Citocromo P450 Família 3 (CYP3), (VENKATAKRISHNAN; VON MOLTKE; GREENBLATT, 2001). Essas enzimas são expressas principalmente no fígado e intestino, locais onde ocorrem as primeiras reações de metabolização dos xenobióticos, e em menor quantidade nos túbulos proximais renais, onde são encarregadas de adicionar grupos funcionais podendo ser hidroxilas, carboxilas, aminas ou deletar grupos alquil não polares, alterando a bioatividade e toxicidade do composto (DANG et al., 2020; SERPE et al., 2015; SONG et al., 2021). Ao entrar no organismo, xenobióticos ativam diversos receptores nucleares, como o receptor pregnano (PXR), receptor constitutivo de androstano (CAR) e receptor hidrocarboneto arílico (AhR), os quais, por sua vez, regulam a expressão dos genes da família CYP (STIPP, ACCO, 2021).

Alguns fatores externos relacionados aos hábitos de vida e exposições ambientais, como gênero, idade, dieta, tabagismo, estados de doenças e fatores fisiopatológicos, bem como a variabilidade genética, podem interferir na expressão e na atividade dessas enzimas. A presença de polimorfismos genéticos nessas CYP pode estar associada a perda de função, resultando na diminuição da eliminação e aumento da concentração plasmática da substância metabolizada, ou ganho de função, levando ao aumento da formação de compostos reativos e diminuição da sua concentração no plasma. Essas alterações implicam, por exemplo, em alterações na eficácia de medicamentos e na existência de reações adversas que, em sua maioria, são decorrentes do baixo metabolismo (HASSANI IDRISSEI et al., 2018; ZHAO et al., 2021).

As enzimas dessa família também são responsáveis pelo metabolismo de diversos pré-carcinógenos. Os produtos desse metabolismo podem se ligar ao DNA e formar aductos químicos capazes de induzir mutações e iniciar a tumorigênese. Inclusive, polimorfismos presentes nos genes codificadores das CYP 450 Família 1 Subfamília A número 1 (*CYP1A1*), CYP450 Família 1 Subfamília A Número 2 (*CYP1A2*) e CYP 450 Família 2 Subfamília E Número 1 (*CYP2E1*), os quais são responsáveis pela biotransformação de químicos e ativação de pré-carcinógenos, estão associados a suscetibilidade ao câncer (LI et al., 2019; STIPP; ACCO, 2020).

### 2.3.2 Enzimas de Fase II e o Gene *UGT2B7*

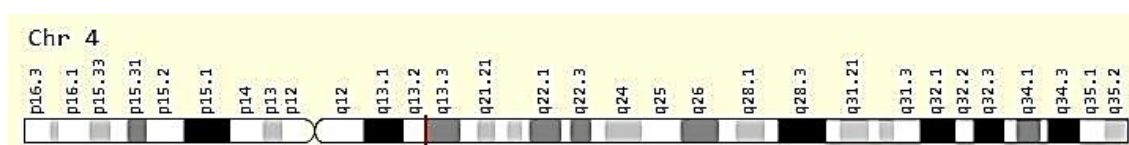
As enzimas de fase II são representadas pelas UDP-glucuronosil transferase (UGTs), sulfotransferases (SULTs), glutathione transferases (GSTs), N-acetil transferases (NATs), metiltransferases (TPMT) e as catechol O-metil transferases (COMT). Elas transformam os produtos da primeira fase em compostos solúveis em água, por meio da adição de grupos hidróxido alcoólicos ou fenólicos, e grupos aminos (KAEFERSTIEN, 2009; KAUR et al., 2020).

As enzimas SULT realizam a adição nos sítios nucleofílicos de seus substratos do grupo sulfo do cofator 5'-fosfoadenosina-3'-fosfosulfato (PAPS) (GLATT; MEINL, 2004). Por sua vez, as GST reduzem os sítios nucleofílicos, dos seus substratos, sendo eles halogenonitrobenzenos, areno óxidos, quinonas e carbonilas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas por meio da adição da glutathione (GSH) em compostos apolares que possuem um carbono eletrofílico, nitrogênio ou átomo de enxofre (HAYES JD; FLANAGAN JU; JOWSEY IR, 2005). As NATs se encontram no citosol e são encarregadas de transferir um grupo acetil da acetilcoenzima A para um substrato xenobióticos (SIM; WALTERS; BOUKOUVALA, 2008), enquanto as TPMT se encontram no citosol celular e catalisam a S-metilação de drogas tiopurinas ou outros compostos sulfidrílicos aromáticos e heterocíclicos (FRANCA et al., 2021). Já as enzimas COMT dependem de magnésio para realizarem sua atividade de metilação do substrato catecol por meio do S-adenosil-L-metionina (SAM) como um doador de metil a molécula de hidroxila presente em substratos catecol (FENG et al., 2019; JANACOVA et al., 2023).

O processo de produção do glicuronídeo, realizados pelas UGTs, é a etapa mais importante da fase II de metabolização, pois muitos compostos têm a

glucuronidação como único processo de biotransformação (ZHANG et al., 2019). As UGTs são divididas em quatro famílias nomeadas UGT1, UGT2 (subfamília 2A e 2B, UGT3 e UGT8). Essas enzimas estão associadas à membrana do retículo endoplasmático e realizam a ligação química entre o ácido uridina 5'-difosfo- $\alpha$ -D-glucurônico (UDPGA) a um átomo nucleofílico podendo ser ele oxigênio, nitrogênio, enxofre ou carbono, resultando em  $\beta$ -D-glucuronídeos. O produto originado da reação pode ser então eliminado com maior facilidade pela urina ou bile (IYANAGI, 2007; JANCOVA; ANZENBACHER; ANZENBACHEROVA, 2010; YIANNAKOPOULOU, 2013). As enzimas UGT2B são altamente expressas no fígado, bem como em tecidos-alvo de esteroides extra-hepáticos, como próstata e mama, e são responsáveis pela maior parte da glucuronidação de esteroides em humanos (HARRINGTON; SENGUPTA; KATZENELLENBOGEN, 2006).

Enzimas UGT2B7 realizam a glicuronidação de uma variedade de compostos endógenos como hormônios esteroides, ácidos retinóicos e biliares e de drogas como tamoxifeno, morfina, zidovudine, ácido micofenólico e oxcarbazepina. O gene *UGT2B7*, localizado no cromossomo 4, braço longo (q) na região 1, na banda 3 sub banda 2 (Figura 3), possui 6 exons e 5 íntrons, sendo seu comprimento de aproximadamente 16 Kb, codificando 529 aminoácidos. (HE et al., 2018; MOU et al., 2019).



**Figura 3: Localização cromossômica do gene UGT2B7 (UDP Glucuronosyltransferase Family 2 Member B7).** Fonte: (UGT2B7 Gene - GeneCards, 2023).

Estudos têm associado a ação da enzima UGT2B7 com a susceptibilidade ao câncer de mama. Como o de Gestl e colaboradores (2002) apontaram que a atividade da enzima UGT2B7, poderia ter um papel protetor do parênquima mamário, devido ao seu baixo nível de expressão no tecido tumoral quando comparado ao tecido normal adjacente (SHEN et al., 2019).

A glucuronidação realiza a inativação de hormônios sexuais sendo também um dos processos responsáveis pelo metabolismo de espécies reativas, tornando-as mais polares, facilitando sua excreção (AMBROSONE, 2000). Tanto os hormônios sexuais

quanto às espécies reativas podem participar da patogênese e progressão do CM. No estudo de Li e colaboradores (2019) foi observada uma elevação da expressão da enzima UGT2B7 nos tumores receptores de estrógeno positivo (RE), quando comparado com os tumores RE negativos. Indicando novamente um papel protetor na progressão do câncer, pois tumores RE negativos apresentam uma redução da sobrevida geral (LI et al., 2019).

Os polimorfismos são características monogênicas herdadas estavelmente encontradas em pelo menos dois genótipos. Ocorrem como acasos mutacionais e estão presentes em uma frequência maior que 1% na população (CROOM, 2012). Caracterizam-se pela diferença na sequência do DNA, podendo existir duas ou mais formas variantes de um gene entre indivíduos, grupos ou populações e compreendem polimorfismos de nucleotídeos único (SNPs), repetições de sequência, inserções, deleções e recombinações. Essas mutações podem ser em regiões codificadoras de proteínas ou não codificadoras (DANIELS, 2009). Dentre os polimorfismos citados, os SNPs acontecem a cada 1000 pares de bases no genoma e, por esse motivo, são os polimorfismos mais frequentes, geralmente identificados em regiões flanqueadoras de genes codificadores de proteínas (KARKI et al., 2015).

Polimorfismos sinônimos são aqueles que alelos diferentes produzem a mesma proteína, sendo considerados neutros, nesse caso são denominadas de mutações silenciosas. Contudo, quando a troca altera o aminoácido final que constitui a proteína, podendo influenciar na sua ação final, a mutação é denominada de *missense*. Já a mutação *nonsense* produz uma proteína truncada prematuramente devido a modificação gerar um códon de parada da tradução (ISMAIL; ESSAWI, 2012).

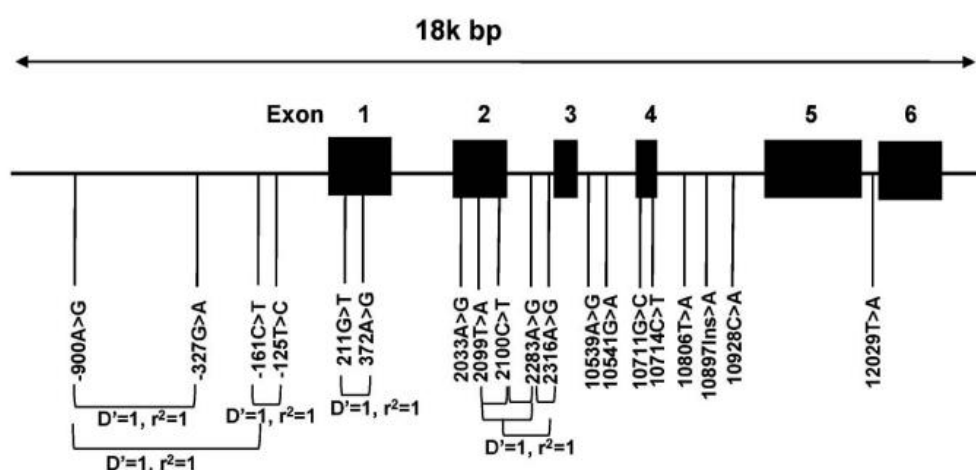
Polimorfismos em genes que codificam enzimas metabolizadoras de xenobióticos, genes de reparo do DNA, genes envolvidos no ciclo celular, na apoptose são essenciais para o aumento da suscetibilidade ao câncer (CLAPPER, 2000).

Polimorfismos em genes que codificam as UGTs podem comprometer seu funcionamento, diminuindo a capacidade de glucuronidação de carcinógenos e moléculas promotoras do câncer, resultando em aumento da suscetibilidade a esta doença (HU et al., 2016).

O presente estudo analisou o polimorfismo rs7438135 (G>A), localizado no cromossomo 4 na posição 70211269 (INNOCENTI et al., 2008). Trata-se de um SNP no qual ocorre a troca de uma guanina por uma adenina (G>A) na região promotora, presente, portanto, antes da sequência codificadora da enzima, responsável por iniciar

o processo de transcrição. Foi verificado que a presença do alelo mutante A resulta em alta atividade da enzima UGT2B7 quando comparada ao alelo de referência G, o qual diminui a ação da mesma (CILIÃO et al., 2018; TIAN et al., 2012).

No estudo desenvolvido por Xie e colaboradores (2019) foi relacionado o polimorfismo rs7438135 com a metabolização de medicamentos opiodes no tratamento para dores em pacientes com câncer. Observaram então que os pacientes portadores do polimorfismo em questão, devido a atividade elevada da enzima e consequentemente aumento do metabolismo do opioide, possuíam maior tolerância ao efeito do medicamento (XIE et al., 2019).



**Figura 4: Localização do polimorfismo rs7438135 no gene *UGT2B7*.** A=adenina; bp= base pair; C=citosina; D'= coeficiente de desequilíbrio; G= guanina; K= Kilobases;  $r^2$ = taxa de recombinação; T=timina. Fonte: Hwang e colaboradores (2010)

## 2.4 ESTRESSE OXIDATIVO, CÂNCER DE MAMA E METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS

### 2.4.1 Exposição aos agrotóxicos, geração de estresse oxidativo e câncer de mama

O estresse oxidativo é um fenômeno caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração de espécies reativas e sua neutralização pelos sistemas antioxidantes, e que tem consequências biológicas e implicações na patogênese de diversas doenças, incluindo o câncer (HALLIWELL, 2022).

Os agrotóxicos podem gerar estresse oxidativo por vias diretas ou indiretas, induzindo a produção de espécies reativas mitocondriais, oxidação de resíduos de tiol,

elevação da lipoperoxidação plasmática e diminuição das defesas antioxidantes (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; PIZZORNO, 2015).

O metabolismo de agrotóxicos gera espécies reativas de oxigênio (EROs) como o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radical hidroxil ( $\text{OH}^{\cdot}$ ). A reação dessas espécies reativas com lipídeos poliinsaturados desencadeia o processo de lipoperoxidação lipídica, ocasionando danos as membranas e lipídeos celulares. As espécies reativas originadas podem, por sua vez, interagir com constituintes celulares, gerando radicais livres secundários e terciários que propagam seus efeitos deletérios (BANERJEE; SETH; AHMED, 2001).

Os agrotóxicos podem alterar, dependendo do tempo e da dose, a expressão das defesas antioxidantes como as enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione redutase e paraoxonase (CURL et al., 2020; Wafa et al., 2013). Por este mecanismo, os agrotóxicos aumentam a apoptose atuando sobre os níveis de proteína PARP-1, enzima que realiza a transferência de unidades de Adenosina difosfato (ADP)-ribose do Dinucleotido de nicotinamida e adenina ( $\text{NAD}^+$ ) para proteínas envolvidas no estresse oxidativo, e modulando o mRNA do gene *TP53*. Podem ainda influenciar a expressão dos genes Fator Respiratório Nuclear 2 (*NRF-2*), diminuindo sua expressão, Cicloxigenase 2 (*COX-2*), envolvida na inflamação e crescimento neoplásico e o fator nuclear Kappa B (*NF Kappa B*), o qual tem papel sobre a inflamação, diferenciação e crescimento celular, e induz a expressão do óxido nítrico (RAVULA; YENUGU, 2021).

Neste contexto, o metabolismo de xenobióticos apresenta papel fundamental tanto na geração como na neutralização do estresse oxidativo, dependendo do sistema detoxificador ativado. Para geração de estresse oxidativo, ao entrarem no organismo, os xenobióticos são processados pelas enzimas de fase I, como a CYP450, juntamente com a enzima fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina ( $\text{NADPH-CYP}$  redutase), sofrendo oxidação, redução ou quebra enzimática, tornando-se viáveis para a excreção do organismo. Ao serem oxidados, há geração de íons de hidroxila altamente reativos e outras espécies reativas que podem interagir com lipídeos, proteínas e DNA. Ocorre também a síntese de intermediários metabólicos provenientes da fase I e que devem passar pela fase II para a detoxificação (STEBBENS, 2003).

Em relação a defesa antioxidante, uma das vias desencadeadas pela geração de estresse oxidativo durante o metabolismo de xenobióticos é a via do fator 2

relacionado ao fator nuclear eritróide 2 (NRF2), da *Kelch like Enoyl Coenzima A Hidratase* (ECH) associada a proteína 1 (KEAP 1) e da transcrição dos elementos de resposta antioxidante (AREs). Nesta via, a alteração dos resíduos de cisteínas do KEAP1 pelo excesso de espécies reativas promove a repressão da ubiquitinação e consequente acúmulo do NRF2 no citosol, que posteriormente migra para o núcleo onde se liga a proteína Fibrosarcoma Musculoaponeurótica (MAF) e promove a ativação da transcrição dos AREs (JIANG et al., 2015).

O estresse oxidativo desempenha um importante papel no desenvolvimento do CM pois é capaz de induzir modificações genéticas e epigenéticas, danos diretos ao DNA pela ação de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e induzir disfunção hormonal ou enzimática (MIAO et al., 2021). Dentre as alterações ocasionadas pelo estresse oxidativo no DNA, destaca-se a ativação aberrante de fatores de transcrição, mutações de ponto, deleções, inserções, translocações cromossômicas que podem induzir oncogenes e inativar genes supressores tumorais (KLAUNIG, 2019). Conserva-se, desse modo, a instabilidade genômica presente em células tumorais, possibilitando a sobrevivência da célula e determinando grande parte das suas características morfofuncionais diferenciadas em relação às células não-tumorais (PANIS et al., 2015). As EROs desempenham um importante papel nos estágios iniciais da carcinogênese mamária (HECHT et al., 2016), onde detecta-se elevados níveis de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), importante biomarcador utilizado para analisar danos oxidativos ao DNA (GURER-ORHAN et al., 2018).

Diversas vias de sinalização são moduladas pela produção de EROs, incluindo a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Como consequência, diferentes processos celulares são afetados, como a proliferação e diferenciação celular, crescimento, apoptose e senescência, metástase e resposta à quimioterapia e radioterapia (NOURAZARIAN; KANGARI; SALMANINEJAD, 2014). Sua produção também acarreta na inativação da proteína tirosina fosfatase (PTP), fosfatase homóloga à tensina (PTEN), favorece a sinalização Fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) e receptor tirosina quinase (TKR), necessárias para a progressão tumoral (ZHAO et al., 2017). Desta forma, a geração de estresse oxidativo ocorrida durante o metabolismo dos agrotóxicos apresenta potencial para fortalecer a progressão tumoral através da manutenção da instabilidade genômica e da inflamação crônica (MENCALHA et al., 2014).

O papel de sistemas antioxidantes como as enzimas codificadas pelos genes *UGT* no contexto das exposições ambientais ainda não está bem definido, especialmente em doenças humanas como o câncer de mama. Assim, tendo em vista a importância dos agrotóxicos no contexto da exposição ocupacional, neste trabalho investigamos seu impacto na geração de estresse oxidativo sistêmico em mulheres com CM portadoras ou não do polimorfismo rs7438135 no gene *UGT2B7* e suas implicações clínicas.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Verificar o impacto da exposição aos agrotóxicos e da presença do polimorfismo rs7438135 no gene *UGT2B7* na geração de estresse oxidativo e perfil clinicopatológico em mulheres com CM

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Analisar a frequência da variante polimórfica no gene *UGT2B7* e as frequências genótípicas em pacientes com CM expostas e não expostas ocupacionalmente a agrotóxicos;
- Quantificar os níveis de estresse oxidativo sistêmicos nestas mulheres através da medida biomarcadores perfil de lipoperoxidação plasmática, capacidade antioxidante total (TRAP) e dosagem de metabólitos do óxido nítrico (NOx);
- Relacionar a exposição ocupacional aos agrotóxicos com a presença e a ausência do polimorfismo rs7438135 do gene *UGT2B7*, medidas de estresse oxidativo e parâmetros clinicopatológicos desta população.

## 4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

**Pesticide exposure and oxidative stress generation are linked to poor prognosis outcomes in breast cancer women carrying the allelic variant rs7438135 in the UGT2B7 gene.**

Beatriz Geovana Leite Vacario<sup>1,2</sup>; Isabely Mayara da Silva<sup>3</sup>; Murilo Machado<sup>1</sup>, Julia Fernandes Orrutúa<sup>1</sup>, Aline Graciele Henriques Campos<sup>1</sup>, Rafaela Oliveira Matos<sup>1</sup>, Ana Carolina Lopes Federige<sup>1</sup>, Bruna Yukie Koizumi<sup>1</sup>, Maikely Bruna Leite<sup>1</sup>, Isabela Mitsu Suo Komori<sup>1</sup>, Hellen dos Santos Jaques<sup>1</sup>, Daniel Rech<sup>1</sup>, Roberta Losi Guembarovski<sup>3</sup>, Marla Amarante<sup>1</sup>, Juliana Mara Serpeloni<sup>3</sup>; Carolina Panis<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory and Clinical Physiopathology Program, State University of Londrina (UEL), Londrina, PR, 86057-970, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Tumor Biology, State University of West Paraná (UNIOESTE), Francisco Beltrão, PR, 85605-010, Brazil

<sup>3</sup> Laboratory of Mutagenesis and Oncogenetics, State University of Londrina (UEL), Londrina, PR, 86057-970, Brazil

### **\*Corresponding author**

Carolina Panis

Laboratório Biologia de Tumores, Universidade Estadual Do Oeste Do Paraná, Francisco Beltrão, PR, Brazil, [carolpanis@hotmail.com](mailto:carolpanis@hotmail.com)

### **Data availability statement**

Data will be available upon a reasonable request.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Abstract

In regions with an economy based on family agriculture and agribusiness, women are occupationally exposed to pesticides, which pose a risk factor for long-term disease development, such as breast cancer (BC). The detoxification of pesticides includes the UDP-glucuronosyltransferase family (UGTs), composed of a group of enzymes that participate in the phase II reactions of elimination. The rs7838135 (G>A) variant in the *UGT2B7* gene increases its glucuronidation potential and acts as an antioxidant system due to oxidative stress metabolites neutralization. In the present study, we investigated the impact of occupational pesticide exposure on the systemic oxidative stress generation from 228 women with breast cancer, being that these 185 carrying the mutant allele A in the *UGT2B7* gene (AA+AG). Real-time quantitative polymerase chain reaction investigated the presence of the rs7838135 variant; oxidative stress markers (lipid peroxidation levels, total antioxidant capacity – TRAP, and nitric oxide metabolites – NOx) were measured in plasma. Pesticide exposure induced significant augment in the systemic lipid peroxidation in the presence of the variant (AA+AG) for several clinicopathological conditions, including tumors with high proliferation index (ki67) and with high aggressiveness as triple-negative and Luminal B subtypes. NOx was augmented in high ki67, positive progesterone receptors, high-grade and triple-negative/Luminal B tumors, and low-risk stratified patients. TRAP was depleted in young patients at menopause and those with triple-negative/Luminal B tumors, as well as those stratified as at low risk for death and recurrence. These findings showed that the presence of the variant rs7838135 in the *UGT2B7* gene was not able to protect from pesticide-induced oxidative stress generation in BC patients, indicating a possible suppression of the activity of UGT2B7 enzymes that could potentially contribute to tumor progression.

**Keywords:** occupationally exposed; single nucleotide variant (SNV); cancer; detoxification; stress biomarkers; metabolism.

## 1 Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women worldwide and the leading cause of death among the female population<sup>1</sup>. It is a multifactorial disease resulting from both genetic and non-genetic risk factors. Aging, weight increase, and nulliparity are among the main behavioral known risk factors. At the same time, food habits, hormone intake, and environmental exposures compose the most common external events that predispose to breast cancer<sup>2</sup>.

There is a significant concern regarding pesticide exposure and breast cancer risk, especially in occupationally exposed women<sup>3,4,5,6</sup>. In the southwest region of Paraná state, whose economy is centered on family farming and agribusiness, pesticides are intensively used, emphasizing glyphosate, atrazine, and 2,4D<sup>7</sup>. A previous study in this population identified that women who develop breast cancer and are occupationally exposed to these pesticides have more aggressive tumors than women without occupational exposure<sup>8</sup>. This fact indicates a possible role of these pesticides in acquiring mechanisms responsible for the aggressiveness of breast tumors and the development of tumors with worse prognoses.

In the last decade, our group has been characterizing the impact of pesticide exposure on the profile of human breast cancer. We identified intense human contamination by pesticides in this population. This exposure is associated with a more aggressive disease profile, with suppression of antitumor immune response mechanisms and changes in DNA repair genes<sup>9</sup>. These findings indicate that pesticides can have a systemic action and further impact other biological pathways.

In exposed populations, xenobiotics such as pesticides are eliminated by a complex system formed by detoxification enzymes. In this context, glucuronidase enzymes are essential in detoxifying endogenous compounds, such as androgenic and estrogenic and exogenous substances, including pesticides. In addition, they eliminate estrogens through glucuronidation, which, when deficient, can be a critical factor in developing breast cancer since this hormone may be involved in its pathogenesis. Thus, the presence of variant in genes that encode glucuronidase enzymes can modify pesticide metabolism, making them carcinogens and directly influencing the susceptibility and/or prognosis of cancers related to occupational exposure<sup>10</sup>.

Within the glucuronidase enzymes family, a superfamily named UDP-glycosyltransferase (UGT) aggregates 22 functional enzymes of phase II metabolism. Among them, the UGT2B7 isoform is highly expressed in the liver but can be found in

other tissues such as the kidney, lung, skin, pancreas, prostate, adipose tissue, and breast <sup>11</sup>. Some studies point out that these enzymes' decreased expression and glucuronidation activity in breast tumors compared to adjacent normal breast tissue enables estrogen-induced carcinogenic effects <sup>12,13</sup>. Increased expression of the enzyme UGT2B7 was also observed in estrogen receptor-positive (ER+) tumors compared to ER-negative (ER-) tumors and linked to reduced overall survival. These findings favor the hypothesis of the protective role of the enzyme UGT2B7 in breast cancer <sup>14</sup>.

The *UGT2B7* gene is highly polymorphic, and studies have focused on understanding the impact of its variants in cancer. Some single nucleotide variant in *UGT2B7* are linked to cancer outcome <sup>15</sup>, treatment toxicity <sup>16</sup>, and cancer risk <sup>17</sup>. However, little is known regarding its clinical meaning in breast cancer. Because of its metabolic function against xenobiotics, it has been highlighted that some UGTs isoforms can act as indirect antioxidants, neutralizing reactive metabolites <sup>18</sup>. It is particularly important because breast cancer is well-known for its systemic redox stress generation, and oxidative and nitrosative stress metabolites are directly implicated in genomic instability and cancer progression <sup>19</sup>.

The present study analyzed the variant rs7438135 (G>A), located on chromosome 4. Is a SNV in which a guanine is exchanged for an adenine (G>A) in the promoter region, present, therefore, before the coding sequence of the enzyme, responsible for initiating the transcription process. It was verified that the presence of the mutant allele A results in high activity of the UGT2B7 enzyme when compared to the reference allele G, which decreases its action<sup>20,21,22</sup>.

For this reason, here we investigated the impact of pesticide exposure on the systemic oxidative stress levels of women diagnosed with breast cancer carrying the single nucleotide variant (SNV), rs7438135 (G>A) and evaluated its impact on the clinicopathological features that are determinants of disease prognosis.

## **2 Material and Methods**

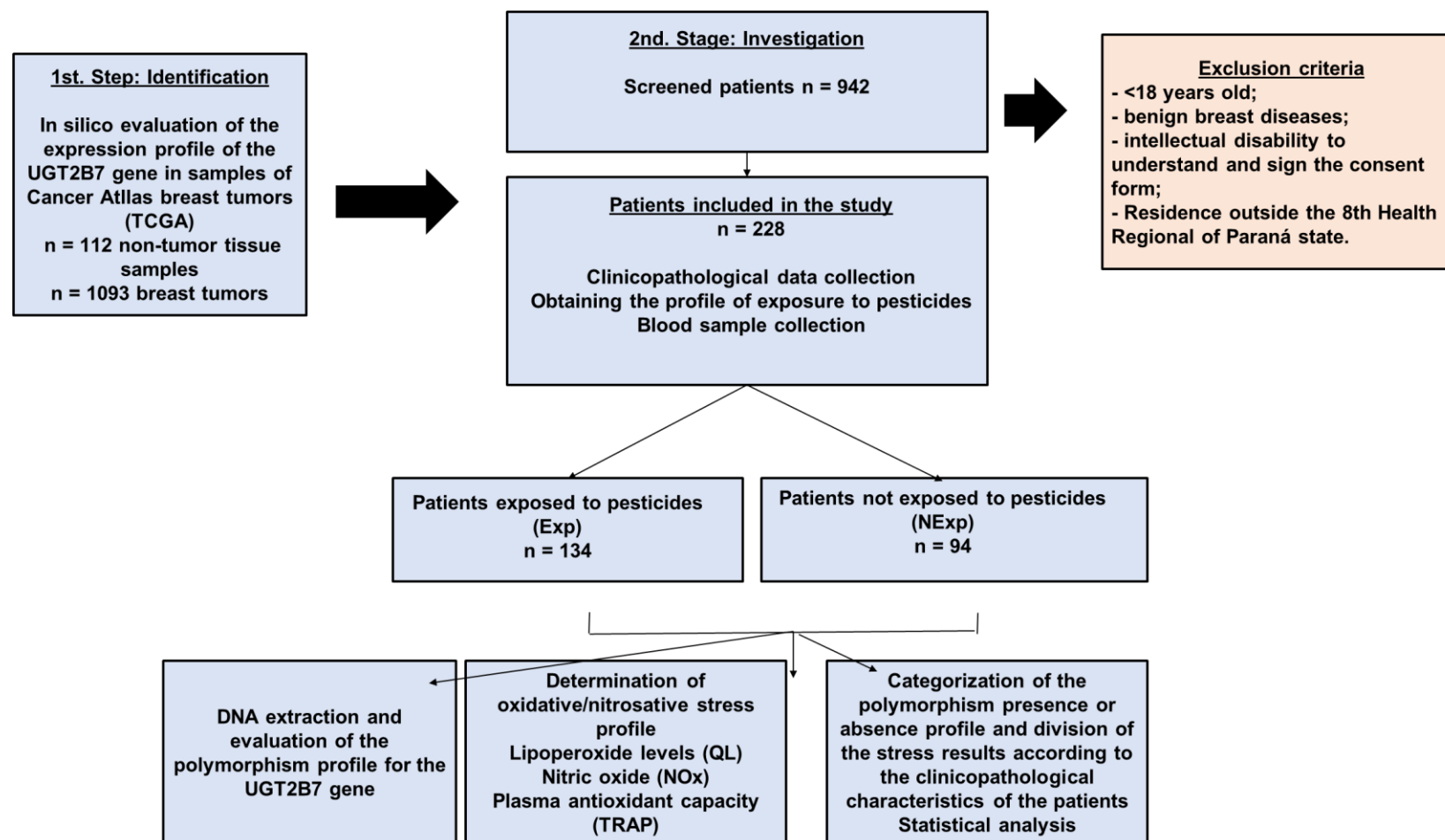
### **2.1 Study Design**

The present work is a retrospective and prospective study, with the collection of primary data and samples from women assisted at a public hospital located at Paraná

Southwest (Hospital de Câncer de Francisco Beltrão – PR), between 2015 and 2022 and UGT2B7 gene expression data from the Cancer Atlas Genome (TCGA).

During this period, 228 women were eligible and included in this study. Inclusion criteria were having a diagnosis of breast cancer confirmed by biopsy and having a DNA sample available for analysis of UGT2B7 rs7438135 variant. Exclusion criteria were underage patients, patients diagnosed with benign breast diseases, patients with intellectual disability to understand and sign the consent form, and patients outside the 8th Paraná Health Region. The Institutional Ethics Committee approved this proposal under CAAE 35524814.4.0000.0107, opinion number 810.501. Only patients who signed the free and informed consent form were considered.

TCGA data collection included information from 112 non-tumor and 1093 tumor samples from breast cancer patients for UGT2B7 expression (<http://timer.cistrome.org/>). A summary of the experimental design is shown in Figure 1.



**Figure 1: Study Design.** In the first step, the expression profile of the *UGT2B7* gene was investigated in samples of normal breast tissue (n = 112) and tumor breast tissue (n = 1093) in samples of patients from Cancer Atlas (TCGA). To investigate the impact of pesticide exposure in women diagnosed with breast cancer with a variant in this gene, 869 women consecutively treated at the Francisco Beltrão Cancer Hospital (Ceonc) were screened to investigate suspicious images for breast cancer. Based on the biopsy result, availability of clinicopathological data, and samples for analysis, 228 women with breast cancer were

included in the study. Clinicopathological data were collected from medical records, and peripheral blood samples were collected. After applying a validated questionnaire to obtain the profile of occupational exposure to pesticides, patients were categorized as exposed (Exp = 134) or not (NExp = 94). DNA extraction was performed to determine the variant profile of the UGT2B7 gene and dosage of oxidative/nitrosative stress markers (levels of lipoperoxides, nitric oxide metabolites - NOx, and plasma antioxidant capacity - TRAP). For statistical analysis, the data were categorized according to the clinical variables that determine the prognosis of interest, the presence profile of the variant in the UGT2B7 gene, and pesticide exposure.

## 2.2 Clinicopathological characterization

A questionnaire was applied to collect clinical and pathological data from the patients, which, together with the consultation of medical records, obtained the following information:

- a) Histopathological characterization of the biopsy: histological tumor grade (1 - well differentiated, 2 - moderately differentiated, or 3 - poorly differentiated), presence of intratumoral angiolymphatic emboli, tumor size, and the number of metastatic lymph nodes.
- b) Molecular subtyping of breast tumors: It was based on the criteria established by St. Gallen Consensus<sup>23</sup> by immunohistochemical staining (IHC) of tumors. Based on the clinicopathological behavior of tumors, we categorized them into two groups: low (Luminal A and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2-amplified) or high (triple-negative and Luminal B) aggressiveness subtypes.
- c) Determination of the clinical profile of the patients: It was carried out from the collection of clinical data obtained during the medical consultation and from the medical records, including age at diagnosis (equal/below or above 50 years), body mass index - BMI (normal BMI, overweight or obese), menopausal status at diagnosis (yes or no), presence of distant metastases (yes or no), treatment response profile (responsive or chemoresistance), and survival profile (dead by cancer or alive at the last clinical follow-up). Based on the combination of their clinicopathological profiles, patients were further categorized according to their risk of death and disease recurrence into low, intermediate, or high-risk<sup>9</sup>.

## 2.3 Characterization of the exposure profile to pesticides

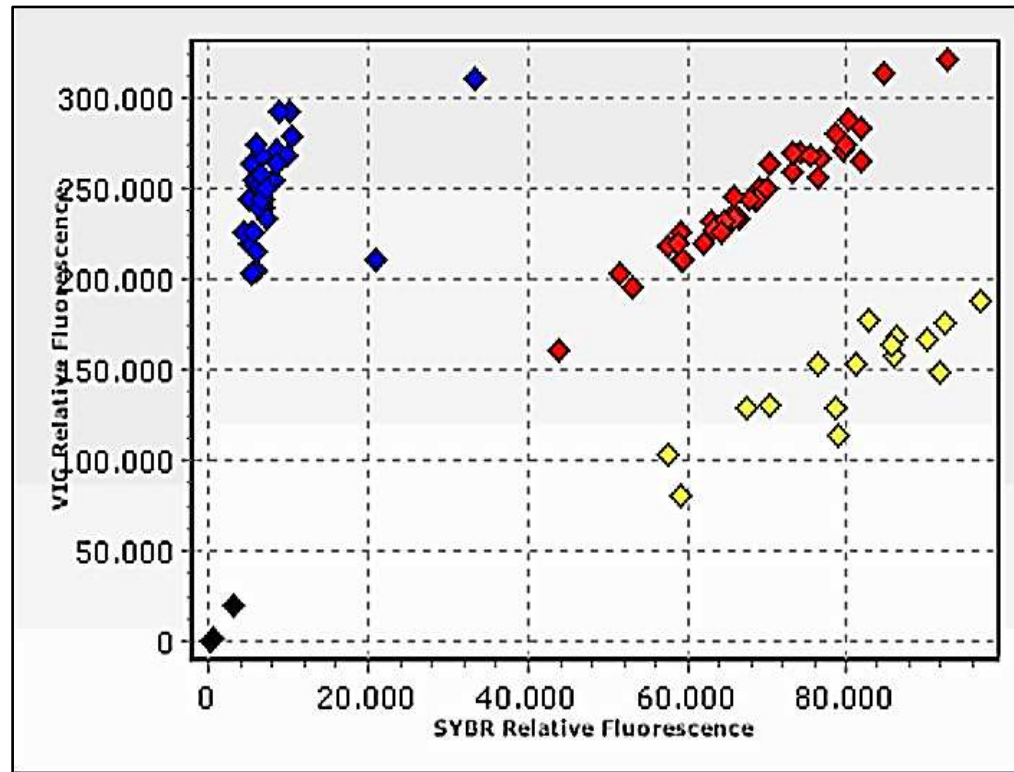
A validated instrument was applied to characterize occupational exposure to pesticides<sup>24</sup>. Rural women with a history of direct handling of pesticides during the preparation and dilution of the poison solution, application of pesticides, and/or decontamination of personal protective equipment (PPE) and/or washing of clothes used during spraying without wearing gloves or any protection were considered as exposed (Exp group). These women reported living in rural areas for at least 50% of their lives and working unprotected 1-3 times a week throughout the year. The unexposed group consisted of urban female workers with no previous or current history of occupational exposure to pesticides working in urban jobs (NExp group).

## **2.4 Blood collection, Genomic DNA Extraction and Genotyping**

To obtain plasma, 10 mL samples of heparinized blood were centrifuged for 5 minutes at 4000 rpm and subsequently stored at -20° C until the time of analysis. Plasma samples were used to determine the oxidative stress profile and the buffy coat for DNA extraction.

DNA extraction was performed using a commercial kit (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, CAT: K182002) following the manufacturer's instructions. The samples were quantified in Nanodrop, observing the A260/A280 nm ( $\geq 1.8$ ) and A260/A230 nm ( $\geq 1.8$ ) ratios, DNA samples with an acceptable degree of purity show A260/A230 ratios between 1.8 and 2.2 and A260/A280 equal  $> 1.8$ .

The technique used for genotyping was real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) with TaqMan® probes (Applied Biosystems) through a hydrolysis system, Genotyping Master Mix (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA).



**Figure 2: Allelic discrimination graph for the *UGT2B7* gene (rs7438135) obtained by the RT-qPCR technique.** VIC: reference allele (G); FAM: mutant allele (A). Blue (population close to y-axis): individuals homozygous for the reference allele (GG); red (population in the middle): heterozygous individuals (AG); yellow (population close to x-axis): individuals homozygous for the mutant allele (AA). Black squares indicate two negative controls (identical reactions to the others without DNA).

reagent was used. Briefly, an 11  $\mu\text{L}$  reaction mixture consists of 4.5  $\mu\text{L}$  of Master Mix, 0.8  $\mu\text{L}$  of Buffer (Tris-EDTA), 0.2  $\mu\text{L}$  of TaqMan probe (40X) specific for the variant in the *UGT2B7* gene (rs7438135), and 5 ng/mL of genomic DNA, following the manufacturer's recommendations. The amplification was performed in a PrimeQ Real-Time TECHNE® thermal cycler (Fisher Scientific UK), for 50 cycles. After each amplification reaction, the allelic discrimination graph (Figure 2) was generated and the genotypes were tabulated for later analysis. The SNV rs7438135 of the genotyped *UGT2B7* gene was validated in public databases (Database of Single Nucleotide Polymorphisms/NCBI, 2021), and according to 1000Genomes Global Study-wide, the global frequency of alleles is G=0.3351 and A=0.6649.

## **2. 4 Determination of the Oxidative Stress Profile**

### **2.4.1 Assessment of Lipoperoxide Levels by High Sensitivity Chemiluminescence Induced by Tert-Butyl Hydroperoxide**

To evaluate lipoperoxide levels, 125  $\mu\text{L}$  of plasma was added to 865  $\mu\text{L}$  of 10 mM monobasic phosphate buffer pH 7.4 in 0.9% NaCl with incubation at 37°C for 5 min. A 10  $\mu\text{L}$  aliquot of 20 $\mu\text{M}$  t-butyl solution was added to trigger the reaction. The reading was performed in a Promega luminometer (Promega, USA) in the protocol of 1 reading per second for 60 min. The qualitative photon emission curve was evaluated and measured in relative light units (URL) <sup>25</sup>.

### **2.4.2 Evaluation of the Total Antioxidant Capacity of Plasma – TRAP**

Plasma samples were diluted 1:50 in 980  $\mu\text{L}$  of 1M glycine buffer pH 8.6 and added 50  $\mu\text{L}$  of luminol solution (0.0398 mg/mL) and 50  $\mu\text{L}$  of ABAP solution (54.24 mg/mL). The chemiluminescent reaction was monitored in a Promega luminometer (10 reads per second, 30 minutes). The results were analyzed and expressed as nM Trolox, based on the inhibition profile of the ABAP curve of a standard solution of the water-soluble analog of vitamin E (Trolox 0.5 mg/mL) <sup>26,27</sup>.

### **2.4.3 Determination of Plasma Levels of Nitric Oxide Metabolites (NOx)**

NOx was determined as described by Navarro-Gonzalez<sup>28</sup> with modifications <sup>29</sup>. Aliquots of 60  $\mu\text{L}$  were deproteinized by adding 50  $\mu\text{L}$  of 75 mM ZnSO<sub>4</sub> solution

(Merck), shaking and centrifuging at 10,000 rpm for 2 min, and then adding 70  $\mu$ L of 55 mM NaOH (Merck). Then, they were shaken and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. The clear supernatant was recovered and diluted in a glycine buffer solution (45g/L pH 9.7, Merck) in a 5:1 ratio. Cadmium granules (Fluka) stored in 100 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (Merck) were washed three times in sterile distilled water and added to a 5 mM CuSO<sub>4</sub> solution in glycine-NaOH buffer (15 g/L, pH 9.7, Merck) for 5 min. Then the activated granules (600-1000 mg, approximately 1-2 granules) were added to the supernatant diluted in glycine buffer and stirred for 10 min.

Aliquots of 200  $\mu$ L were recovered in appropriate tubes for nitrite determination, and the same volume of Griess reagent was added (Reagent I: 50 mg of N-naphthyl ethylenediamine in 250  $\mu$ L of distilled water; Reagent II: 5 g of sulphanilic acid in 500  $\mu$ L of 3M HCl, Sigma). After a 10 min incubation at room temperature, the tubes were centrifuged at 10,000 rpm for 2 min, and 100  $\mu$ L were added to 96-well microplates in triplicate. To determine the nitrite concentration of the sample, the calibration curve was prepared by diluting NaNO<sub>2</sub> (Merck, CAS 7632-00-0) in sterile distilled water to concentrations from 125 to zero  $\mu$ M and 100  $\mu$ L of the curve point + 100  $\mu$ L of Griess reagent were added in triplicate to microplate wells. Absorbance was measured at 550 nm on a microplate reader. The final results were expressed in  $\mu$ M.

## 2.5 Statistical Analysis

The frequencies of the categories of each variable were compared for patients belonging to both groups Exp and NExp using the Chi-square test for adherence. To verify the frequency of genotypes in the total study sample and both Exp and NExp groups, the Chi-square test was applied using IBM® SPSS® Statistics for Windows, version 26.0 (IBM® Corp., Armonk, N.Y., USA). This same test was used to analyze the impact of occupational exposure to pesticides in the presence of the rs7438135 variant on the systemic levels of oxidative/nitrosative stress metabolites in these patients. Tests were performed at 5% statistical significance.

In situations when assumption injury occurred with a minimum expected frequency of 5, the Monte Carlo method was used as an association test with 5% significance. The purpose of this test is the same as the Chi-square test for independence; however, it is statistically more robust when assumptions are not verified.

The results were statistically analyzed using the GraphPad Prism 9.0 software. Data distribution was tested using the Shapiro-Wilk test. Thus, variables with normal distribution were analyzed with parametric tests. When the assumption of normality was not met, non-parametric tests were used. The Student's t-test or Mann-Whitney test was used to compare the two groups. Oxidative stress data are described in the results as min-max values. Values of  $p \leq 0.05$  were considered significant.

### 3. Results

Table 1 shows the clinicopathological profile of the patients distributed according to pesticide exposure. It was observed that most women were positive for estrogen receptors, with a prevalence of high ki67 proliferation index, tumors larger than 2 cm, menopause at diagnosis, and overweight. Despite no statistical difference, it is observed that the frequency of more aggressive subtypes (Luminal B + Triple-negative) and high histological grade was higher in patients exposed to pesticides.

**Table 1:** Comparative analysis of clinicopathological data of patients with breast cancer, exposed or not to pesticides.

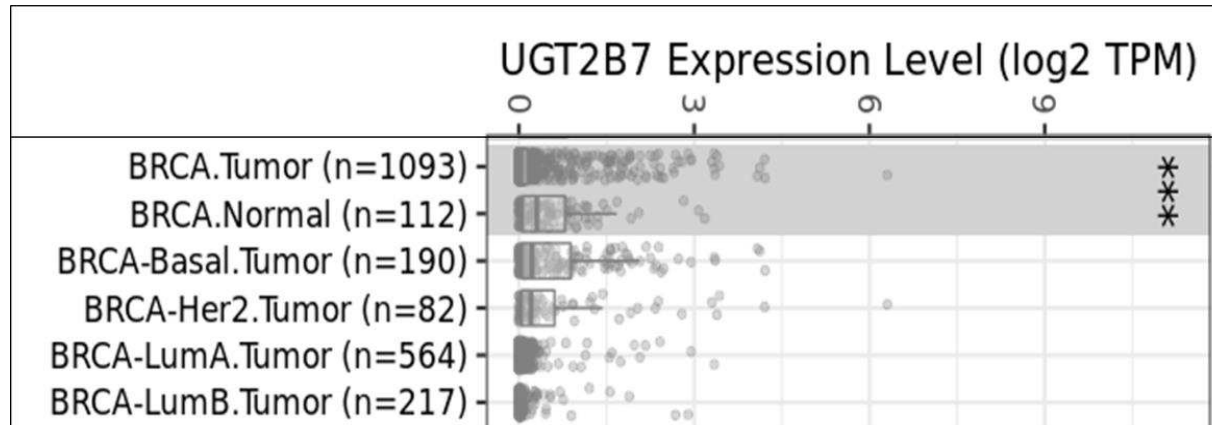
Parameter		Unexposed (%)	Exposed (%)	<i>p-value</i>
Estrogen receptor (ER)	Negative	25.9	31.5	0.313
	Positive	74.1	68.5	
	Total	100	100.0	
Progesterone receptor (PR)	Negative	50.0	55.8	

	Positive	50.0	44.2	0.346
	Total	100	100	
Proliferation index (Ki-67)	<14	37.6	39.9	
	≥14	62.4	59.5	0.656
	Total	100	100	
Molecular subtype	Luminal A	36.7	29.8	
	Luminal B	34.9	33.5	0.466
	HER-2	14.7	16.8	
	Triple Negative	13.8	19.9	
	Total	100	100	
Tumor size (cm)	<2	47.6	38.4	
	≥2	52.4	61.0	0.140
	Total	100	100	
Histological grade	1 e 2	78.3	78.1	
	3	20.8	21.9	0.472
	Total	100	100	
Lymphodonal invasion	No	61.3	59.4	
	Yes	38.7	40.6	0.776
	Total	100	100	
Age at diagnosis	≥50	66.7	62.6	
	<50	33.3	37.4	0.488
	Total	100	100	
Menopause at diagnosis	Yes	70.3	67.5	
	No	29.7	32.5	0.629
	Total	100	100	
Body Mass Index (BMI)	Normal	32.9	28.5	
	Excess	67.1	71.5	0.495
	Total	100	100	

---

Chi-square \*p>0,05, considered statistical

Initially, we investigated the expression profile of the *UGT2B7* gene in samples of breast tumor and non-tumor tissues from patients in the Cancer Genome Atlas database – TCGA (Figure 3). A significant increase in *UGT2B7* gene expression was observed in breast cancer biopsies compared to non-tumor breast tissue ( $p < 0.0001$ ).



**Figure 3: *UGT2B7* gene expression profile in breast tumors from the Cancer Genome Atlas dataset.** Data based on the Cancer Genome Atlas database – TCGA collected in the TIMER 2.0 tool. Distributions of gene expression levels are displayed using boxplots. Statistical significance was calculated using the Wilcoxon test (\*: p-value < 0.001). It is possible to identify genes that are up-regulated or down-regulated in tumors compared to normal tissues for each cancer type, as displayed in the columns highlighted in gray. BRCA = breast cancer (general analysis, no specific subtype selected), Basal = triple-negative breast cancer, HER2 = tumor amplified for human epidermal growth factor receptor 2, LumA = Luminal A subtype, LumB = Luminal B subtype.

To compare the frequency of genotypes in all patients (N=228), a Chi-square test was performed on the entire sample (Table 2). When considering the entire sample, no statistical difference was obtained between the genotype frequencies ( $p>0.05$ ) in dominant (AA+GA) and recessive (AA) models.

**Table 2:** Comparison analysis between the frequency of the reference genotype (GG) and mutant carrier in dominant (GA+AA) and recessive model (AA) of the variant (SNV) rs7438135 in the *UGT2B7* gene, in patients with breast cancer.

SNV	Genotypes	Frequency	p-value
rs7438135	GG	43 (18.9%)	<b>reference</b>
	AG	102 (44.7%)	0.374
	AA	83 (36.4%)	0.796
Dominant Model	<b>Total (N)</b>	<b>228</b>	
	GG	43 (18.8%)	0.293
	AG+AA	185 (81.2%)	
Recessive Model	<b>Total (N)</b>	<b>228</b>	
	GG+AG	145 (63.6%)	0.242
	AA	83 (36.4%)	
	<b>Total (N)</b>	<b>228</b>	

Chi-square analysis, \* $p>0,05$ , considered statistical

The frequency of genotypes among exposed and unexposed breast cancer patients was evaluated, and the statistical analysis was performed using the Chi-square test (Table 3). Considering the presence of the mutant allele (A) in homozygosis for the rs7438135 variant in the *UGT2B7* gene, unexposed patients had a higher frequency than exposed ones ( $p<0.05$ ).

**Table 3:** Frequency of the reference genotype (GG) and mutant carrier in dominant (GA+AA) and recessive model (AA) of the variant (SNV) rs7438135 in the *UGT2B7* gene distributed according to exposure or not to pesticides in patients with breast cancer

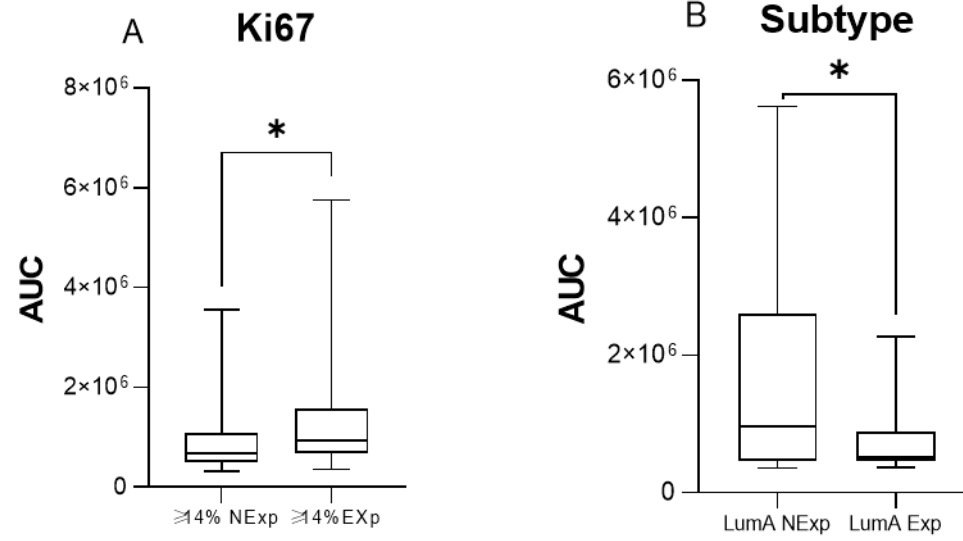
SNV/ Model	Genotypes	Exposed N (%)	Unexposed N (%)	p-value
rs7438135	GG	30 (22.4%)	13 (13.8%)	<b>reference</b> 0.360 <b>*0.031</b>
	AG	63 (47.0%)	39 (41.5%)	
	AA	41 (30.6%)	42 (44.7%)	
	<b>Total (N)</b>	134	94	
Dominant model	GG	30 (22.4%)	13 (13.8%)	0.735
	AG+AA	104 (69.4%)	81 (55.3%)	
	<b>Total (N)</b>	134	94	
Recessive model	GG+AG	93 (69,4%)	52 (55.3%)	<b>*0.030</b>
	AA	41 (30,6%)	42 (44.7%)	
	<b>Total (N)</b>	134	94	

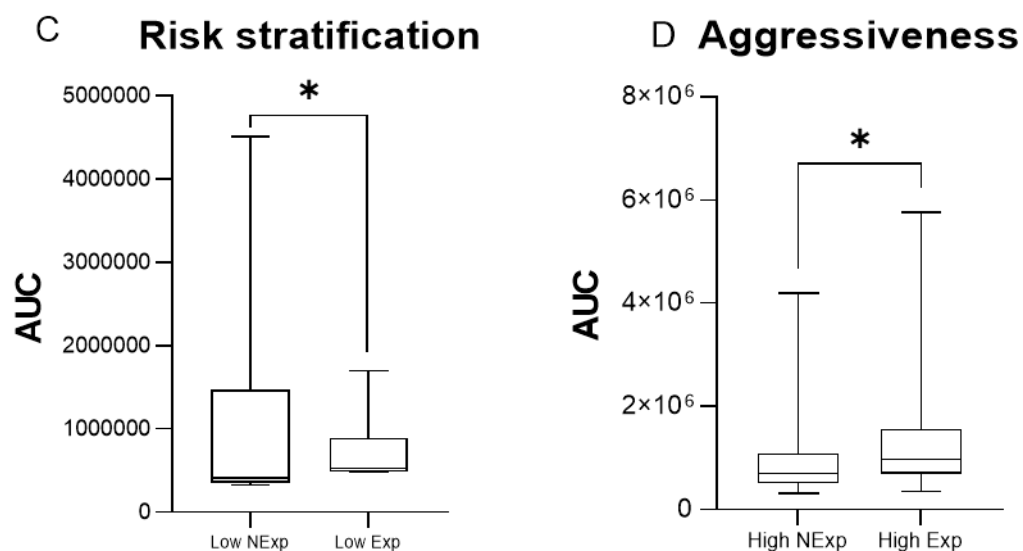
Chi-square analysis, \*p<0.05, considered statistical.

Considering the role of the UGT2B7 enzyme in the detoxification of xenobiotics and oxidative stress products, we investigated the impact of occupational exposure to pesticides in the presence of the rs7438135 variant on the systemic levels of oxidative/nitrosative stress metabolites in these patients.

As shown in Figure 4, the variant significantly alters the systemic levels of lipoperoxides in patients exposed to pesticides, depending on the clinicopathological parameter evaluated. We found increased lipoperoxide levels in patients exposed to pesticides and with tumors with a high ki67 proliferation index (above 14%, Figure 4A, 307457-3551445 AUC for the NExp group and 351433-5758871 for the Exp group, p = 0.0337). Regarding the molecular subtypes of breast cancer, exposure to pesticides reduced lipoperoxide levels in patients carrying the A allele and with tumors of the Luminal A subtype (Figure 4B, 355678-5621944 AUC for the NExp group and 369182-2265412 AUC for the Exp group, p = 0.0542). Exposed patients carrying the A allele also showed a reduction in lipoperoxide levels when stratified into the low risk of death and disease recurrence (Figure 4C, 326764 4511188 AUC for the NExp group and 476702-1699154 AUC for the Exp group, p = 0.0513). There was also an increase in

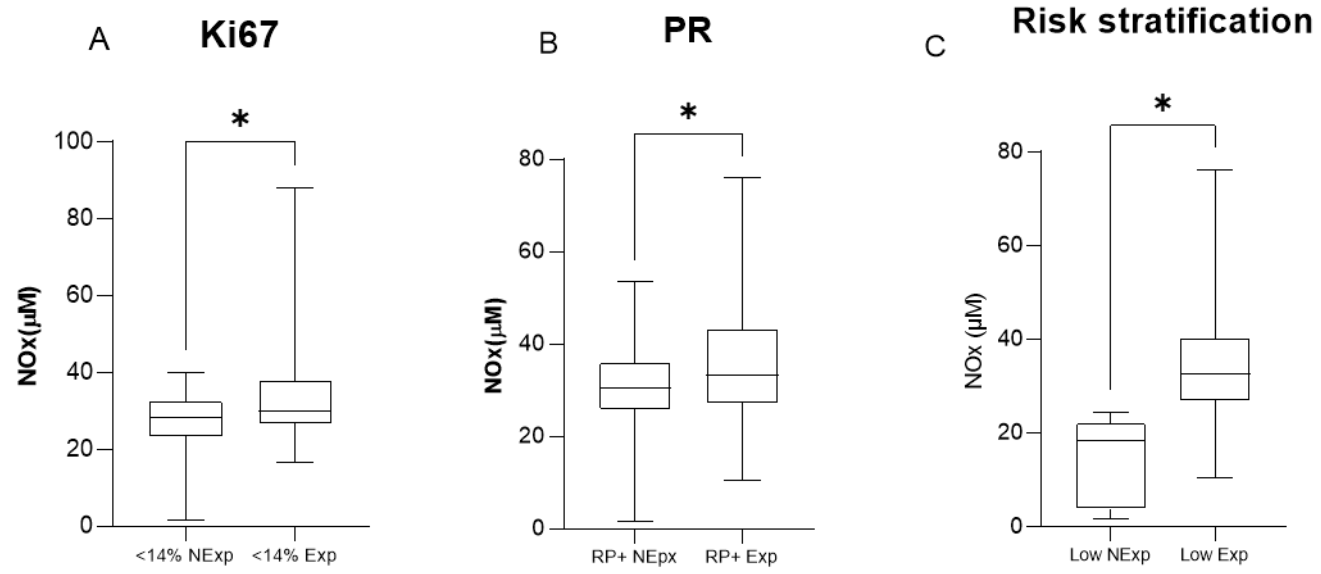
lipoperoxide levels in patients exposed to pesticides with highly aggressive tumors (Triple-negative + Luminal B subtype) and in the presence of the variant (Figure 4D, 388904-5621944 AUC in the NExp group and 369182-2265412 AUC in the Exp group,  $p = 0.0130$ ).

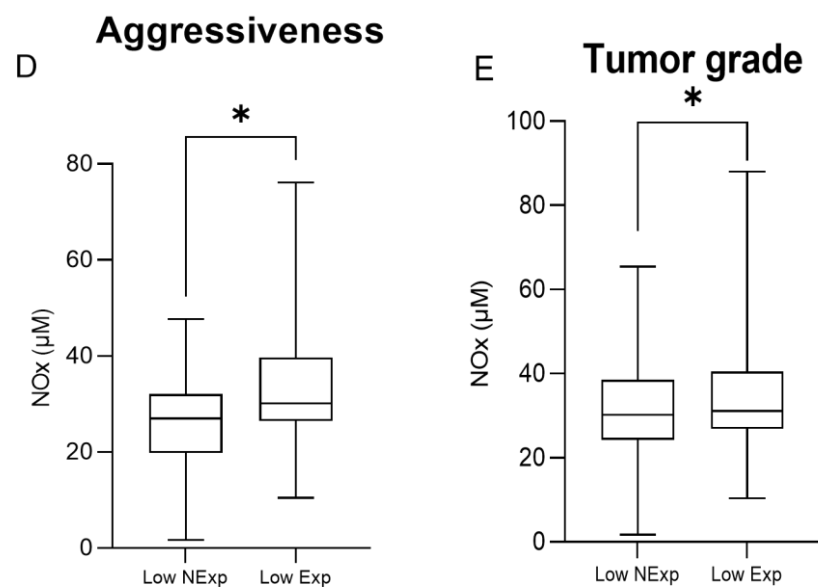




**Figure 4: Plasma lipid peroxidation profile of breast cancer patients occupationally exposed (Exp) or not (NExp) to pesticides and carriers of the A allele in the *UGT2B7* gene.** In A, levels according to the tumoral proliferation index profile ki67 (below or above 14%). In B, levels according to the Luminal A molecular subtype. In C, lipoperoxide values according to the stratification profile of risk of death and recurrence of patients for low risk. In D, levels are distributed according to the aggressiveness profile of the tumors (high = triple negative, low = other subtypes – Luminal A+ Luminal B+ HER2-amplified). Data expressed in arbitrary AUC units (integral of the area under the lipid peroxidation curve). \* indicates  $p \leq 0.05$ .

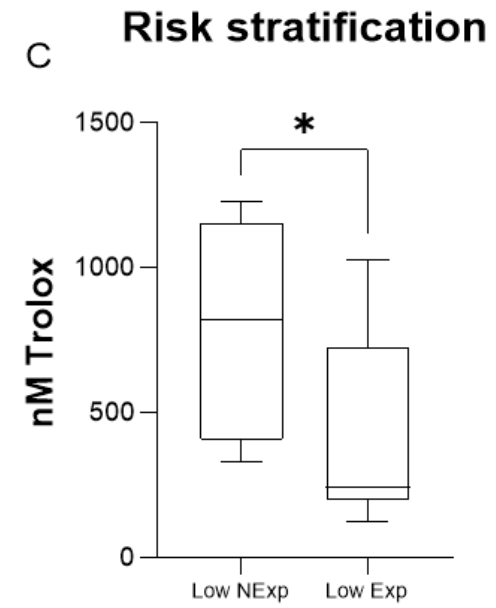
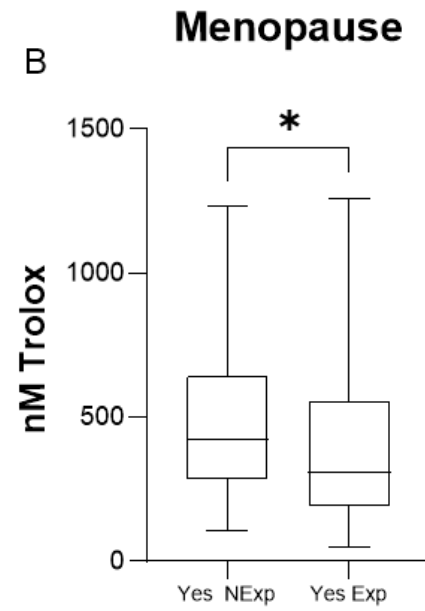
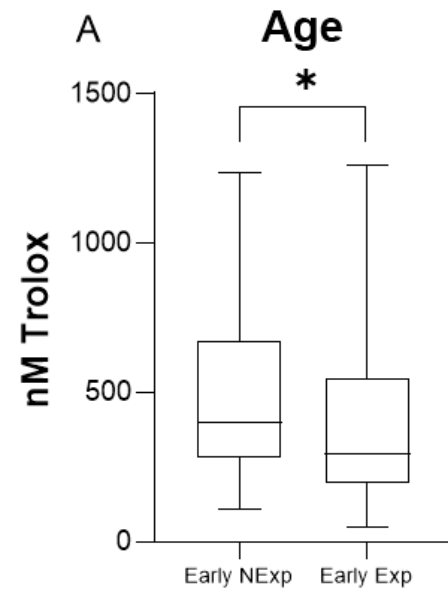
Regarding NOx, exposed patients carrying the A allele also showed significant changes according to clinical variables that determine prognosis depending on their profile (Figure 5). There was an increase in NOx in exposed patients and with the presence of the variant in all evaluated parameters: ki67 < 14% (Figure 5A, 1.71-40  $\mu$ M for the NExp group and 16.50-88.07  $\mu$ M for the Exp group,  $p = 0.0300$ ), progesterone receptor positivity (Figure 4B, 1.71-53.50  $\mu$ M for the NExp group and 10.41-76.11  $\mu$ M for the Exp group,  $p = 0.0360$ ), low risk of death and recurrence (Figure 5C, 1.71-24.37  $\mu$ M for the NExp group and 10.41-76.11  $\mu$ M for the Exp group,  $p = 0.0233$ ), presence of low-aggressive tumors (Figure 5D, 1.71-47.63  $\mu$ M for the NExp group and 10.41-76.11  $\mu$ M for the Exp group,  $p = 0.0268$ ) and for the presence of low-grade tumors (Figure 5E, 1.71 -65.46  $\mu$ M in the NExp group and 10.41-88.07  $\mu$ M in the Exp group,  $p = 0.0519$ ).

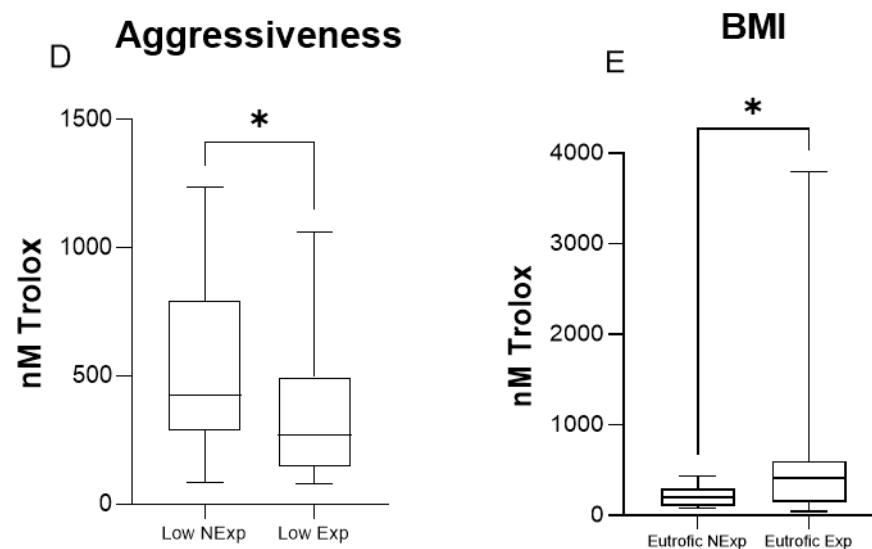




**Figure 5: Profile of plasmatic nitric oxide (NOx) metabolites of breast cancer patients occupationally exposed (Exp) or not (NExp) to pesticides and carriers of the A allele in the *UGT2B7* gene.** In A, levels according to the tumor profile of the ki67 proliferation index (below or above 14%). In B, levels according to the expression profile of progesterone receptors (PR, present + or absent -). In C, values according to the stratification profile of risk of death and recurrence of patients for low risk. In D, levels are distributed according to the aggressiveness profile of the tumors (high = triple negative, low = other subtypes – Luminal A + Luminal B+ HER2-amplified). In E, the distribution of NOx according to the histological grade profile for low-grade tumors. Data expressed in  $\mu\text{M}$  of NOx. \* indicates  $p \leq 0.05$ .

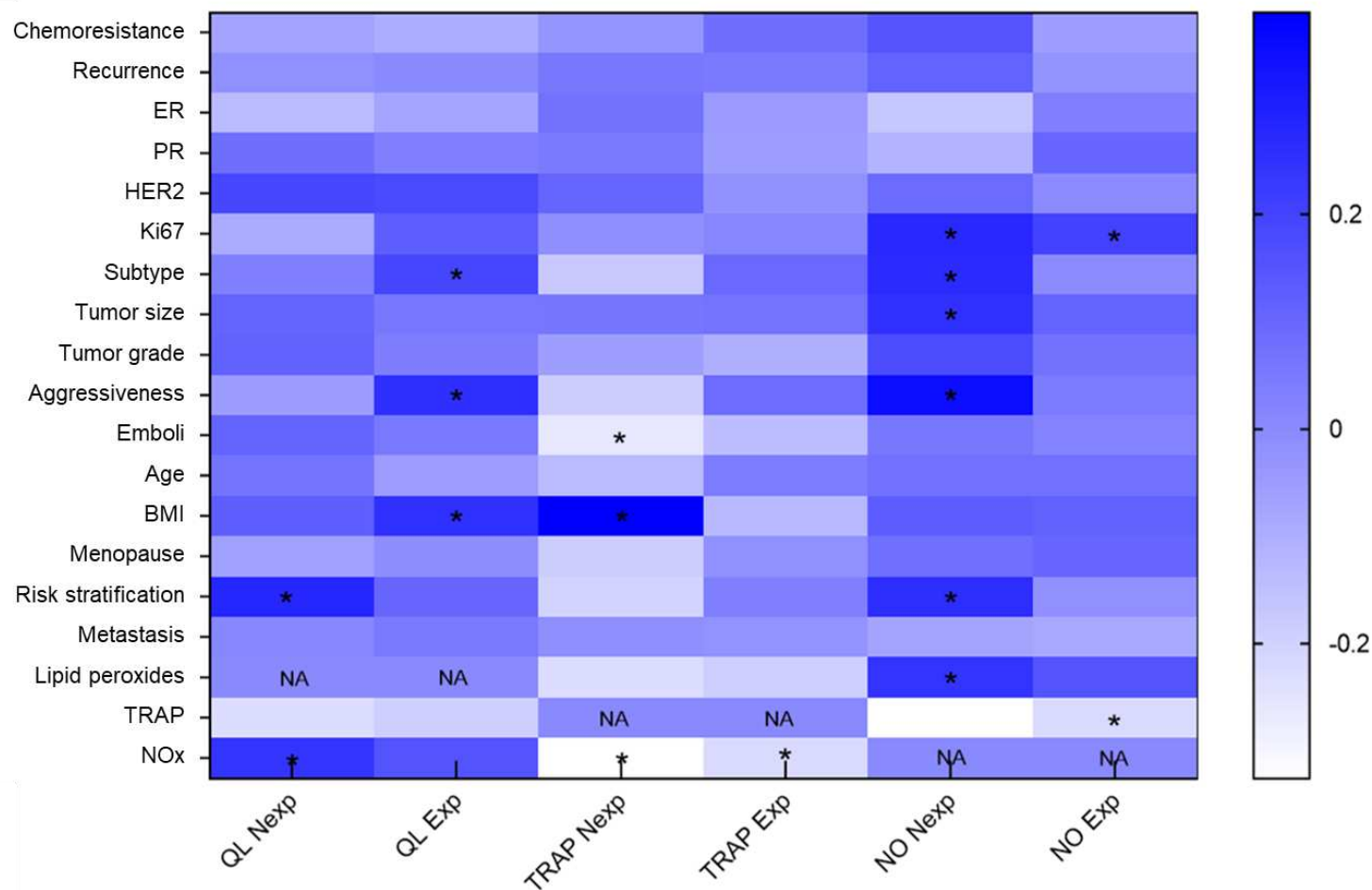
We also observed a significant variation in the TRAP of exposed patients carriers of the A allele (Figure 6). There was a reduction in TRAP in patients under 50 years at diagnosis (Figure 6A, 106.3-134 nM Trolox in the NExp group and 47-1259 nM Trolox in the Exp group,  $p = 0.055$ ). Increase in TRAP in exposed patients with menopause at diagnosis (Figure 6B, 47.38-1259 in the NExp group and 106.3-1234 nm Trolox in the Exp group,  $p = 0.0431$ ). A reduction in trap in patients with a low risk of death and recurrence (Figure 6C, 330.6-1229 nM Trolox for the NExp group and 127.1-1029 nM Trolox for the Exp group,  $p = 0.0384$ ), carriers of low aggressiveness tumors (Figure 6D, 82.84-1234 nM Trolox for the NExp group and 77.77-1059 nM Trolox for the Exp group,  $p = 0.0246$ ). We observed an increase in TRAP in those with eutrophic BMI (Figure 6E, 82.84-430.8 nM Trolox in the NExp group and 47.38-3802 nM Trolox in the Exp group,  $p = 0.0256$ ).





**Figure 6: Total plasma antioxidant capacity (TRAP) of breast cancer patients occupationally exposed (Exp) or not (NExp) to pesticides and carriers of the A allele in the *UGT2B7* gene.** In A, levels according to age at diagnosis (below 50 years old = early disease). In B, levels according to the presence of menopause at diagnosis. In C, values according to the stratification profile of risk of death and recurrence of patients for low risk. In D, levels are distributed according to the aggressiveness profile of the tumors (high = triple negative, low = other subtypes – Luminal A + Luminal B+ HER2-amplified). In E, TRAP profile in eutrophic patients. Data expressed in nM of Trolox. BMI = body mass index. \* indicates  $p \leq 0.05$ .

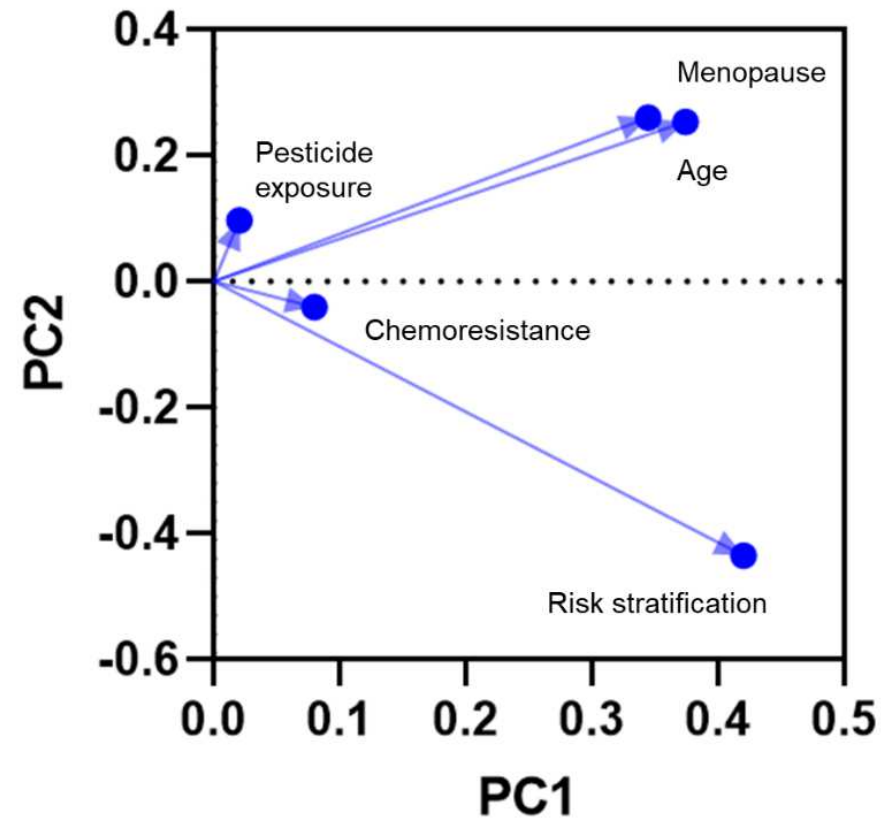
Correlation analysis (Figure 7) demonstrated the occurrence of significant points ( $p < 0.05$ ) between levels of lipoperoxidation in the presence of the A allele versus risk stratification in the unexposed patients and lipoperoxidation versus subtype, aggressiveness, and BMI in the exposed patients. For TRAP, we observed a correlation with emboli, BMI, and NOx in patients in the unexposed group and only NOx in the exposed ones. NOx levels were significantly correlated with ki67, subtype, size, aggressiveness, stratification, and lipoperoxide levels in unexposed patients. There was a correlation between ki67 and TRAP for this parameter for exposed women.



**Figure 7 – Heatmap of correlations between plasma oxidative stress markers levels and clinicopathological parameters of breast cancer patients occupationally exposed (Exp) or not (NExp) to pesticides and carriers of the A allele of the *UGT2B7*.** The intensity of the color of each square represents the R values for the Spearman correlations—the more intense the color, the more positive the correlation; the less intense, the weaker the correlation. RQT = chemoresistance, ER = estrogen receptors, RP = progesterone receptors, HER2 = tumors with epidermal growth factor 2 receptor amplification, ki67 = ki67

proliferation index, BMI = body mass index, QL = plasma lipoperoxidation levels, TRAP = plasma antioxidant capacity, NOx = levels of metabolites in nitric oxide. \* indicates  $p \leq 0.05$ . NA = not applicable.

Principal component analysis (PCA, Figure 8) grouping clinicopathological variables, stress parameters, and pesticide exposure revealed the existence of 2 significant components (PC1 and PC2). PC1 showed a grouping of the variables stratification of risk of death and recurrence + chemoresistance, and PC2 grouped the variables age at diagnosis + menopause + BMI + exposure to pesticides.



**Figure 8: Principal component analysis according to the clinicopathological variables profile and oxidative stress markers levels in breast cancer patients occupationally exposed to pesticides and carriers of the A allele in the gene *UGT2B7*. The two main components are represented: component 1 (PC1: risk stratification of death and recurrence + chemoresistance) and component 2 (PC2: age at diagnosis + menopause + BMI + exposure to pesticides)**

#### 4. Discussion

The clinical implications of pesticide exposure in breast cancer patients carrying the rs7438135 variant in the *UGT2B7* gene are unknown. In this study, we demonstrated for the first time that pesticide exposure in women with breast cancer carrying the mutant allele (A) in homozygosis or heterozygosis enhances patients' systemic oxidative/nitrosative profile and correlates to parameters correlated to disease aggressiveness and poor prognosis.

Pesticide exposure risks breast cancer development, mainly because of its endocrine-disrupting properties<sup>30</sup>. Some pesticides, such as those primarily used in our study population (glyphosate, atrazine, and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid) are classified by the International Agency for Cancer Research (2015)<sup>31</sup> as potentially or probably carcinogens, which means that information proving their impact on generating cancer in humans is still missing. Although our study did not focus on breast cancer risk, we investigated the combined effect of conditions that potentially affect disease outcome: pesticide exposure, oxidative/nitrosative stress generation, and the *UGT2B7* rs7438135 variant.

The expression of the *UGT2B7* gene in breast cancer is poorly known. Since we aimed to investigate the impact of pesticide exposure on women with breast cancer carrying this variant, we initially investigated the expression profile of the *UGT2B7* gene in normal and cancerous breast tissue. When analyzing the data extracted from TCGA, we observed a higher expression of the *UGT2B7* gene in samples of breast tumors when compared to normal breast tissue, pointing to its possible relationship with breast cancer. UGT enzymes, of which *UGT2B7* is an isoform, have an essential role in cancer progression, as they can regulate endogenous signals, such as those triggered by sex steroid hormones, affecting oncogenic pathways through glucuronidation<sup>32</sup>.

Sex hormones favor breast tumor growth, as when binding to their receptors, they promote the expression of target genes, such as a growth factor responsible for the proliferation of epithelial cells<sup>33,34</sup>. The products of estrogen metabolism, such as 2-OH-catechol and 4-OH-catechol, can also bind to DNA and form DNA adducts, in addition to generating reactive oxygen species, impairing the integrity of the genome<sup>35</sup>. The sustained exposure to progesterone can lead to histone methylation and consequently silence tumor suppressor genes<sup>36</sup>.

It is known that the rs7438135 is a functional variant considering that the mutant allele A encodes a UGT2B7 enzyme with greater activity (50%) than the reference allele G<sup>37,38</sup>. The presence of at least one mutant allele would probably be associated with both the ideal elimination of xenobiotics and pesticides and the elimination of oxidative/nitrosative stress metabolites, thus favoring the occurrence of good disease outcomes.

Although the genes of the UGT family are known for their antioxidant role<sup>39</sup>, we observed an increase in the systemic production of oxidative/nitrosative stress mediators in several clinicopathological conditions that predict a worse prognosis in patients with breast cancer exposed to agrochemicals. This exposure impaired the antioxidant capacity of the UGT2B7 enzyme in breast cancer patients carrying the A allele (rs7438135), generating more significant amounts of stress metabolites. This argument is supported by the data obtained from the analysis of the mutant allele (A) and the determinant variables of breast tumors, in which no statistical relationship was observed between them.

Pesticides can inhibit 50% of the glucuronidation activity of UGT enzymes, leading to their complete suppression<sup>40</sup>. The pesticides 2,4D and atrazine, widely used in the southwest region of Paraná state, where the population of women included in this study is located, suppress the glucuronidation carried out by UGT enzymes<sup>41</sup>. This information is in line with our findings, in which we observed that patients with highly aggressive breast tumors (carriers of the triple-negative subtype) and high ki-67, when exposed to pesticides, showed increased systemic levels of lipoperoxides even in the presence of the rs7438135 variant in the UGT2B7 gene, suggesting that exposure to pesticides may affect the metabolic capacity of this enzyme to eliminate lipoperoxides.

In the context of hormone-positive tumors, several pesticides, such as glyphosate, also widely used in our population study, can generate endocrine dysfunction<sup>42</sup>. These pesticides often can act analogously to hormones such as progesterone and estrogen, leading to physiological responses related to hormonal action. They may also influence the synthesis, transport, metabolism, or elimination of estrogen, thus affecting the endocrine system homeostasis<sup>43</sup>. The reduction in the activity of UGT enzymes caused by pesticide exposure can reduce the body's ability to perform glucuronidation of carcinogens and cancer-promoting molecules. The UGT2B7 enzyme plays an essential role in the hormonal axis by carrying out the

glucuronidation of catechol estrogens, mainly 4-hydroxy estrogen (4-OH E1), which have a carcinogenic effect in breast tissue<sup>44</sup>. The increase in catechol estrogen quinones, which have genotoxic action, occurs due to a decrease in their UGT2B7 activity<sup>45</sup>. Thus, occupational exposure influencing the action of the analyzed enzyme may represent a significant risk factor in breast cancer, especially in hormone-dependent tumors such as the Luminal subtype.

Some pesticides, such as herbicides, initiate a process in which they undergo a reduction of one electron by NADPH and form a superoxide anion<sup>46</sup>. These formed ROS can be eliminated in several ways, including the glucuronidation process carried out by UGT enzymes; otherwise, there is an imbalance between its production and its elimination and installation of oxidative stress<sup>47</sup>. Reactive nitrogen species (RNS) contribute to oxidative stress and, combined with metabolites generated by the mitochondrial respiration chain, may generate nitric oxide (NOx) metabolites, which can react extensively with macromolecules such as lipids, causing lipoperoxidation and depletion of systemic antioxidants<sup>48</sup>.

Chronic oxidative stress induces a more aggressive phenotype in breast cancer cells, such as MCF-7, by decreasing the expression of ER, leading to loss of estrogen dependence and phenotype change. In addition, high concentrations of oxidative stress metabolites are described in more aggressive and metastatic tumors<sup>49</sup>. Therefore, chronic and continuous pesticide exposure can lead to sustained oxidative stress and consequently influence the progression of hormone-positive breast tumors. The increase in lipoperoxide levels in patients with a low risk of death and recurrence observed in our study may strengthen this hypothesis, as this risk stratum is formed by patients with small luminal A tumors that have not yet metastasized.

Our results showed an increase in NOx levels in patients in women occupationally exposed to pesticides, demonstrating the inability of the UGT2B7 enzyme to neutralize the reactive nitrogen species formed by exposure, even in the presence of the mutated allele A. The NOx increase and the antioxidant capacity reduction can influence tumor progression. This is known that tumor breast tissue has higher concentrations of NOx when compared to normal breast tissue<sup>50</sup> and can influence the growth and proliferation of tumor cells, in addition to contributing to metastasis and collaborating with tumor angiogenesis<sup>51,52</sup>. The enzyme nitric oxide synthetase 3 (NOS3), an isoform that majorly contributes to NO synthesis, is detected

in breast cancer and is positively associated with ER and PR tumors<sup>53</sup>. Increased expression of all NOS isoforms concomitant to enhanced NOx production have been reported in MCF7 cells treated with low concentrations of pesticides such as hexachlorobenzene and chlorpyrifos<sup>54</sup>.

Our study also pointed out that young women with breast tumors exposed to pesticides, carriers of at least one mutant allele (A) of the rs7438135 variant, have lower concentrations of antioxidants compared to those not exposed, probably due to the reduction of the UGT2B7's antioxidant effects, due to exposure. The reduction of antioxidant capacity may represent a risk for the worsening of the disease in younger women, as they develop more aggressive tumors, with a high histological grade, highly proliferative capacity, and greater possibility of vascular invasion, in addition to manifesting lower overall survival and higher recurrence rate<sup>55,56,57,58</sup>.

Antioxidant levels are finely regulated by the transcription factor NRF2 (erythroid nuclear factor); xenobiotics trigger this pathway to protect the cell by transcribing metabolizing enzyme genes and antioxidant proteins essential for regulating redox imbalance<sup>59,60</sup>. The *UGT2B7* gene is one of the transcriptional targets of NRF2, and the presence of the rs7438135 G>A variant suppresses the transcription action performed by NRF2, thus affecting the antioxidant response induced by environmental exposures in an allele-dependent manner<sup>61,62</sup>. Despite the existence of several antioxidants that can be affected by both breast cancer and pesticides, our data demonstrated that the studied variant in the *UGT2B7* gene has a clinical significance in this context.

Our study has limitations, such as the modest sample size (228 genotyped) and the lack of dosage of pesticides in patients to assess the relationship between exposure and the presence of variant. Despite this, our results demonstrate that exposure to pesticides may somehow interfere in redox response to neutralize systemic oxidative/nitrosative stress in the context of *UGT2B7* rs7438135 G>A variant, especially in clinical situations of worse breast cancer prognosis. It may be true since the association of exposure to pesticides, even in the presence of the variant, significantly increased the levels of systemic stress metabolites and decreased the antioxidant defense system.

#### **Future perspectives:**

The presence of the variant studied in women exposed to pesticides can impact the progression of the disease even in conditions of good clinical prognosis. The rs7438135 variant may also impair the action of the UGT2B7 and other UGT enzymes in chemotherapeutic metabolism, such as tamoxifen 17 and anthracyclins<sup>59</sup>, commonly used in treating these women. The study will therefore continue to collect information to assess this situation in the context of the 5-year clinical follow-up. Considering the accessibility of searching for variant in clinics, our study opens a putative new marker for investigation in pesticide exposed populations with breast cancer in the future.

## 5. Conclusions

Our results showed that pesticide exposure significantly impacts the oxidative stress levels of breast cancer patients despite the presence of the mutant allele (A) rs7438135 in the *UGT2B7* gene. Considering the antioxidant protection that should be given by the presence of the allele (A), patients occupationally exposed to pesticides showed high lipid peroxidation, NOx, and depleted antioxidant levels, essential for tumor progression. Considering that the variant increases the enzyme's activity, these findings indicate a possible, but not elucidated, role of pesticides in suppressing the action of the UGT2B7 enzyme. This suppression can mainly affect hormone-dependent tumors, contributing to the advancement of the disease. Therefore, our work indicates one of the many pathways possibly influenced by exposure to pesticides involved in the progression of breast cancer and strongly suggests a differentiated follow-up for occupationally exposed women carrying some UGT variant.

## Acknowledgments

The authors thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Grant 404610/2021-8 to Serpeloni, J. M. and Grants 402364/2021-0 and 305335/2021-9 to Panis, C.), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; Finance Code #01, Silva, I. M. and Vacario, B.) and Araucaria Foundation (Call 048/2021 to Panis, C) for supporting this study.

## Author Contributions

Carolina Panis, Juliana Serpeloni, Beatriz Vacario contributed to desing and work conception, analysis from genotyping and stress oxidative biomarks, interpretation of

data. Isabely da Silva participated of analysis and genotyping of the samples. Murilo Machado, Julia Fernandes Orrutéa, Aline Campos, Rafaela Matos, Ana Carolina Federige, Bruna Koizumi, Maikely Bruna Leite, Isabela Komori, Hellen Jaques, participated by obtaining data from patients and analysis of stress oxidative biomarkers. Daniel Rech responsible for obtaining the samples and datas of patients. Roberta Losi Guembarovski and Marla Amarante involved in critically review important intellectual content.

## ORCID

Carolina Panis <https://orcid.org/0000-0002-0104-4369>

Juliana Mara Serpeloni <https://orcid.org/0000-0001-9846-5807>

Beatriz Geovana Leite Vacario <https://orcid.org/0000-0003-1181-7617>

## REFERENCES

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL et al. Global Cancer Statistics 2020:GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
2. Colditz GA, Bohlke K. Priorities for the primary prevention of breast cancer. *CA*. 2014;64(3):186-194. doi:10.3322/caac.21225.
3. Alavanja MC, Sandler DP, McMaster SB et al. The Agricultural Health Study. *Environ Health Perspect*. 1996;104(4):362-369. doi:10.1289/ehp.96104362
4. Brophy, JT, Keith, M M, Gorey, KM, Laukkanen, E, Hellyer, D, Watterson, A, Gilberston, M. Occupational Histories of Cancer Patients in a Canadian Cancer Treatment Center and the Generated Hypothesis Regarding Breast Cancer and Farming. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 2002 8(4), 346–353. doi:10.1179/107735202800338669
5. Duell EJ, Millikan RC, Savitz DA et al. A Population-Based Case-Control Study of Farming and Breast Cancer in North Carolina. *Epidemiology*. 2000;11(5):523-531. doi:10.1097/00001648-200009000-00007
6. Mills PK, Yang R. Breast Cancer Risk in Hispanic Agricultural Workers in California. *Int J Occup Environ Health*. 2005;11(2):123-131. doi:10.1179/oeht.2005.11.2.123
7. Gaboardi SC, Candiotta LZ, Ramos LM. Perfil do uso de agrotóxicos no sudoeste do paraná (2011 – 2016)/Profile of pesticides use in the southwest of Paraná (2011-2016). *REV NERA*. 2019;(46):13-40. doi:10.47946/rnera.v0i46.5566

8. Pizzatti L, Kawassaki AC, Fadel B et al. Toxicoproteomics Disclose Pesticides as Downregulators of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and Estrogen Receptor Pathways in Breast Cancer Women Chronically Exposed. *Front Oncol*. 2020;10. doi:10.3389/fonc.2020.01698
9. da Silva JC, Scandolara TB, Kern R et al. Occupational Exposure to Pesticides Affects Pivotal Immunologic Anti-Tumor Responses in Breast Cancer Women from the Intermediate Risk of Recurrence and Death. *Cancers*. 2022;14(21):5199. doi:10.3390/cancers14215199
10. Maruo Y, Iwai M, Mori A, Sato H, Takeuchi Y. Polymorphism of UDP-Glucuronosyltransferase and Drug Metabolism. *Curr Drug Metab*. 2005;6(2):91-99. doi:10.2174/1389200053586064
11. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-Glucuronosyltransferases: Metabolism, Expression, and Disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40(1):581-616. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.581
12. Gestl SA, Green MD, Shearer DA, Frauenhoffer E, Tephly TR, Weisz J. Expression of UGT2B7, a UDP-Glucuronosyltransferase Implicated in the Metabolism of 4-Hydroxyestrone and All-Trans Retinoic Acid, in Normal Human Breast Parenchyma and in Invasive and in Situ Breast Cancers. *Am J Pathol*. 2002;160(4):1467-1479. doi:10.1016/s0002-9440(10)62572-2
13. Davenport AS. Characterization of UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) Promoter Polymorphisms and Gene Expression on Ethnicity, Stage of Disease, and Menopausal Status in Breast Cancer. *J Drug Metab Amp Toxicol*. 2012;s4. doi:10.4172/2157-7609.s4-001
14. Li H, Hu B, Guo Z, Jiang X, Su X, Zhang X. Correlation of UGT2B7 Polymorphism with Cardiotoxicity in Breast Cancer Patients Undergoing Epirubicin/Cyclophosphamide-Docetaxel Adjuvant Chemotherapy. *Yonsei Med J*. 2019;60(1):30. doi:10.3349/ymj.2019.60.1.30
15. Matsumoto J, Nishimoto A, Watari S et al. Significance of UGT1A6, UGT1A9, and UGT2B7 genetic variants and their mRNA expression in the clinical outcome of renal cell carcinoma. *Mol Cell Biochem*. 2022. doi:10.1007/s11010-022-04637-4
16. Li J, Luo H, Liu YY et al. Value of UGT2B7-161 Single Nucleotide Polymorphism in Predicting the Risk of Cardiotoxicity in HER-2 Positive Breast Cancer Patients Who Underwent Pertuzumab Combined with Trastuzumab Therapy by PSL. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2022;Volume 15:215-225. doi:10.2147/pgpm.s351718
17. AL-Eitan LN, Rababa'h DM, Alghamdi MA, Khasawneh RH. Association between ESR1, ESR2, HER2, UGT1A4, and UGT2B7 polymorphisms and breast Cancer in Jordan: a case-control study. *BMC Cancer*. 2019;19(1). doi:10.1186/s12885-019-6490-7
18. Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP. Interaction between Oxidative Stress Sensor Nrf2 and Xenobiotic-activated Aryl Hydrocarbon Receptor in

the Regulation of the Human Phase II Detoxifying UDP-glucuronosyltransferase 1A10. *J Biol Chem*. 2010;285(9):5993-6002. doi:10.1074/jbc.m109.075770

19. Monteiro HP, Rodrigues EG, Amorim Reis AK et al. Nitric oxide and interactions with reactive oxygen species in the development of melanoma, breast, and colon cancer: A redox signaling perspective. *Nitric Oxide*. 2019;89:1-13. doi:10.1016/j.niox.2019.04.009

20. Innocenti F, Liu W, Fackenthal D et al. Single nucleotide polymorphism discovery and functional assessment of variation in the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 gene. *Pharmacogenetics Genom*. 2008;18(8):683-697. doi:10.1097/fpc.0b013e3283037fe4

21. Cilião HL, Camargo-Godoy RB, Souza MF, Zanuto A, Delfino VD, Cólus IM. Polymorphisms in IMPDH2, UGT2B7, and CES2 genes influence the risk of graft rejection in kidney transplant recipients taking mycophenolate mofetil. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2018;836:97-102. doi:10.1016/j.mrgentox.2018.06.008

22. Chen CH, Wang SC, Tsou HH et al. Genetic polymorphisms in CYP3A4 are associated with withdrawal symptoms and adverse reactions in methadone maintenance patients. *Pharmacogenomics*. 2011;12(10):1397-1406. doi:10.2217/pgs.11.103

23. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013;24(9):2206-2223. doi:10.1093/annonc/mdt303

24. Panis C, Gaboardi SC, Kawassaki AC et al. Characterization of occupational exposure to pesticides and its impact on the health of rural women. *Rev Cienc Farm Basica Apl RCFBA*. 2022;43:e748. doi:10.4322/2179-443x.0748

25. de Oliveira ST, Bessani MP, Scandolara TB et al. Systemic lipid peroxidation profile from patients with breast cancer changes according to the lymph nodal metastasis status. *Oncoscience*. 2022;9:1-10. doi:10.18632/oncoscience.550

26. Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta*. 1996;255(2):107-117. doi:10.1016/0009-8981(96)06394-2

27. Garbim MR, Broto GE, Trigo FC et al. Chemotherapy induces plasmatic antioxidant changes in pediatric patients with acute lymphoid leukemia B that correlate to disease prognosis. *Curr Res Immunol*. 2022;3:228-233. doi:10.1016/j.crimmu.2022.09.001

28. Navarro-González R, Molina MJ, Molina LT. Nitrogen fixation by volcanic lightning in the early Earth. *Geophys Res Lett*. 1998;25(16):3123-3126. doi:10.1029/98gl02423

29. Panis C, Victorino VJ, Herrera AC et al. Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;133(3):881-888. doi:10.1007/s10549-011-1851-1
30. Steingraber S. What We Know About Pesticides and Breast Cancer. *Rev Environ Health.* 2009;24(4). doi:10.1515/reveh.2009.24.4.345
31. IARC. Hepatitis Viruses (Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans). *World Health Organisation*;
32. Li Y, Zhou Y, Mao F et al. miR-452 Reverses Abnormal Glycosylation Modification of ER $\alpha$  and Estrogen Resistance in TNBC (Triple-Negative Breast Cancer) Through Targeting UGT1A1. *Front Oncol.* 2020;10. doi:10.3389/fonc.2020.01509
33. Mousa NA, Marino N, Simões BM. Editorial: Sex steroid hormones: effects on breast cancer risk and etiology. *Front Endocrinol.* 2023;14. doi:10.3389/fendo.2023.1198770
34. Coradini D, Oriana S. Impact of sex hormones dysregulation and adiposity on the outcome of postmenopausal breast cancer patients. *Clin Obes.* 2020;11(1). doi:10.1111/cob.12423
35. Rangrikphoti P, Marquez-Garban DC, Pietras RJ, McGowan E, Boonyaratanakornkit V. Sex steroid hormones and DNA repair regulation: Implications on cancer treatment responses. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2023;227:106230. doi:10.1016/j.jsbmb.2022.106230
36. Folkerd E, Dowsett M. Sex hormones and breast cancer risk and prognosis. *Breast.* 2013;22:S38—S43. doi:10.1016/j.breast.2013.07.007
37. Cilião HL, Camargo-Godoy RB, Souza MF, Zanuto A, Delfino VD, Cólus IM. Polymorphisms in IMPDH2, UGT2B7, and CES2 genes influence the risk of graft rejection in kidney transplant recipients taking mycophenolate mofetil. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2018;836:97-102. doi:10.1016/j.mrgentox.2018.06.008
38. Hu DG, Mackenzie PI, McKinnon RA, Meech R. Genetic polymorphisms of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) genes and cancer risk. *Drug Metab Rev.* 2016;48(1):47-69. doi:10.3109/03602532.2015.1131292
39. Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP. Interaction between Oxidative Stress Sensor Nrf2 and Xenobiotic-activated Aryl Hydrocarbon Receptor in the Regulation of the Human Phase II Detoxifying UDP-glucuronosyltransferase 1A10. *J Biol Chem.* 2010;285(9):5993-6002. doi:10.1074/jbc.m109.075770
40. Grancharov K. Natural and synthetic inhibitors of UDP-glucuronosyltransferase. *Pharmacol Amp Ther.* 2001;89(2):171-186. doi:10.1016/s0163-7258(00)00109-1

41. Naydenova Z, Krauss GJ, Golovinsky E, Grancharov K. Effect of s-triazine and phenoxyalkanoic acid herbicides on UDP-glucuronosyltransferase in rat liver microsomes. *Pestic Sci.* 1999;55(8):825-830. doi:10.1002/ps.2780550809
42. Singh S, Kumar V, Gill JP et al. Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(20):7519. doi:10.3390/ijerph17207519
43. FENGA C. Occupational exposure and risk of breast cancer. *Biomed Rep.* 2016;4(3):282-292. doi:10.3892/br.2016.575
44. Yong M, Schwartz SM, Atkinson C et al. Associations between Polymorphisms in Glucuronidation and Sulfation Enzymes and Mammographic Breast Density in Premenopausal Women in the United States. *Cancer Epidemiology Biomark Amp Prev.* 2010;19(2):537-546. doi:10.1158/1055-9965.epi-09-0898
45. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monit.* 2004;10(6):RA141-RA147.
46. Ambrosone CB. Oxidants and Antioxidants in Breast Cancer. *Antioxid Amp Redox Signal.* 2000;2(4):903-917. doi:10.1089/ars.2000.2.4-903
47. Forcados GE, James DB, Sallau AB, Muhammad A, Mabeta P. Oxidative Stress and Carcinogenesis: Potential of Phytochemicals in Breast Cancer Therapy. *Nutr Cancer.* 2017;69(3):365-374. doi:10.1080/01635581.2017.1267777
48. Mahalingaiah PK, Ponnusamy L, Singh KP. Chronic oxidative stress causes estrogen-independent aggressive phenotype, and epigenetic inactivation of estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;153(1):41-56. doi:10.1007/s10549-015-3514-0
49. Garrido P, Shalaby A, Walsh EM et al. Impact of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression on triple negative breast cancer outcome and activation of EGFR and ERK signaling pathways. *Oncotarget.* 2017;8(46):80568-80588. doi:10.18632/oncotarget.19631
50. Liu X, Zhang Y, Wang Y, Yang M, Hong F, Yang S. Protein Phosphorylation in Cancer: Role of Nitric Oxide Signaling Pathway. *Biomolecules.* 2021;11(7):1009. doi:10.3390/biom11071009
51. Monteiro HP, Rodrigues EG, Amorim Reis AK et al. Nitric oxide and interactions with reactive oxygen species in the development of melanoma, breast, and colon cancer: A redox signaling perspective. *Nitric Oxide.* 2019;89:1-13. doi:10.1016/j.niox.2019.04.009
52. Vakkala M, Paakko P, Soini Y. eNOS expression is associated with the estrogen and progesterone receptor status in invasive breast carcinoma. *Int J Oncol.* 2000. doi:10.3892/ijo.17.4.667

53. Zárate LV, Pontillo CA, Español A et al. Angiogenesis signaling in breast cancer models is induced by hexachlorobenzene and chlorpyrifos, pesticide ligands of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2020;401:115093. doi:10.1016/j.taap.2020.115093

54. Erić I. Breast Cancer in Young Women: Pathologic and Immunohistochemical Features. *Acta Clin Croat.* 2018. doi:10.20471/acc.2018.57.03.13

55. Radecka B, Litwiniuk M. Breast cancer in young women. *Ginekol Pol.* 2016;87(9):659-663. doi:10.5603/GP.2016.0062

56. Rossi L, Mazzara C, Pagani O. Diagnosis and Treatment of Breast Cancer in Young Women. *Curr Treat Options Oncol.* 2019;20(12):86. Published 2019 Nov 27. doi:10.1007/s11864-019-0685-7

57. Walker R, Lees E, Webb M, Dearing S. Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years) are different. *Br J Cancer.* 1996;74(11):1796-1800. doi:10.1038/bjc.1996.632

58. Jiang T, Harder B, Rojo de la Vega M, Wong PK, Chapman E, Zhang DD. p62 links autophagy and Nrf2 signaling. *Free Radic Biol Med.* 2015;88:199-204. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.014

59. Wang P, Zhao Y, Zhu Y, Sang S. Glucuronidation and its impact on the bioactivity of [6]-shogaol. *Mol Nutr Amp Food Res.* 2017;61(9):1700023. doi:10.1002/mnfr.201700023

60. Nakamura A, Nakajima M, Higashi E, Yamanaka H, Yokoi T. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region of human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 affect the Nrf2-dependent transcriptional regulation. *Pharmacogenetics Genom.* 2008;18(8):709-720. doi:10.1097/fpc.0b013e32830500c9

61. Sutiman N, Lim JS, Muerdter TE et al. Pharmacogenetics of UGT1A4, UGT2B7 and UGT2B15 and Their Influence on Tamoxifen Disposition in Asian Breast Cancer Patients. *Clin Pharmacokinet.* 2016;55(10):1239-1250. doi:10.1007/s40262-016-0402-7

62. Mou P, Wang H, An L, Yin Q, Chang J. RS7435335 located in the UGT2B7 gene may be a possible genetic marker for the clinical response and prognosis of breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *J Cell Biochem.* 2018;120(5):7167-7173. doi:10.1002/jcb.27990

### Figure Legend:

**Figure 1: Study Design.** In the first step, the expression profile of the UGT2B7 gene was investigated in samples of normal breast tissue (n = 112) and tumor breast tissue (n = 1093) in samples of patients from Cancer Atlas (TCGA). To investigate the impact of pesticide exposure in women diagnosed with breast cancer with a polymorphism in this gene, 869 women consecutively treated at the Francisco Beltrão Cancer Hospital (Ceonc) were screened to investigate suspicious images for breast cancer. Based on the biopsy result, availability of clinicopathological data, and samples for analysis, 228 women with breast cancer were included in the study. Clinicopathological data were collected from medical records, and peripheral blood samples were collected. After applying a validated questionnaire to obtain the profile of occupational exposure to pesticides, patients were categorized as exposed (Exp = 134) or not (NExp = 94). DNA extraction was performed to determine the polymorphism profile of the UGT2B7 gene and dosage of oxidative/nitrosative stress markers (levels of lipoperoxides, nitric oxide metabolites - NO<sub>x</sub>, and plasma antioxidant capacity - TRAP). For statistical analysis, the data were categorized according to the clinical variables that determine the prognosis of interest, the presence profile of the polymorphism in the UGT2B7 gene, and pesticide exposure

**Figure 2: Allelic discrimination graph for the UGT2B7 gene (rs7438135) obtained by the RT-qPCR technique.** VIC: reference allele (A); FAM: mutant allele (G). Blue (population close to y-axis): individuals homozygous for the reference allele (AA); red (population in the middle): heterozygous individuals (AG); yellow (population close to x-axis): individuals homozygous for the mutant allele (GG). Black squares indicate two negative controls (identical reactions to the others without DNA)

**Figure 3: UGT2B7 gene expression profile in breast tumors from the Cancer Genome Atlas dataset.** Data based on the Cancer Genome Atlas database – TCGA collected in the TIMER 2.0 tool. Distributions of gene expression levels are displayed using boxplots. Statistical significance was calculated using the Wilcoxon test (\*: p-value <0.001). It is possible to identify genes that are up-regulated or down-regulated in tumors compared to normal tissues for each cancer type, as displayed in the

columns highlighted in gray. BRCA = breast cancer (general analysis, no specific subtype selected), Basal = triple-negative breast cancer, HER2 = tumor amplified for human epidermal growth factor receptor 2, LumA = Luminal A subtype, LumB = Luminal B subtype.

**Figure 4: Plasma lipid peroxidation profile of breast cancer patients occupationally exposed (Exp) or not (NExp) to pesticides and carriers of the A allele in the UGT2B7 gene.** In A, levels according to the tumoral proliferation index profile ki67 (below or above 14%). In B, levels according to the Luminal A molecular subtype. In C, lipoperoxide values according to the stratification profile of risk of death and recurrence of patients for low risk. In D, levels are distributed according to the aggressiveness profile of the tumors (high = triple negative, low = other subtypes – Luminal A+ Luminal B+ HER2-amplified). Data expressed in arbitrary AUC units (integral of the area under the lipid peroxidation curve). \* indicates  $p \leq 0.05$ .

**Figure 5: Profile of plasmatic nitric oxide (NOx) metabolites of breast cancer patients occupationally exposed (Exp) or not (NExp) to pesticides and carriers of the A allele in the UGT2B7 gene.** In A, levels according to the tumor profile of the ki67 proliferation index (below or above 14%). In B, levels according to the expression profile of progesterone receptors (PR, present + or absent -). In C, values according to the stratification profile of risk of death and recurrence of patients for low risk. In D, levels are distributed according to the aggressiveness profile of the tumors (high = triple negative, low = other subtypes – Luminal A + Luminal B+ HER2-amplified). In E, the distribution of NOx according to the histological grade profile for low-grade tumors. Data expressed in  $\mu\text{M}$  of NOx. \* indicates  $p \leq 0.05$ .

**Figure 6: Total plasma antioxidant capacity (TRAP) of breast cancer patients occupationally exposed (Exp) or not (NExp) to pesticides and carriers of the A allele in the UGT2B7 gene.** In A, levels according to age at diagnosis (below 50 years old = early disease). In B, levels according to the presence of menopause at diagnosis. In C, values according to the stratification profile of risk of death and recurrence of patients for low risk. In D, levels are distributed according to the aggressiveness profile of the tumors (high = triple negative, low = other subtypes – Luminal A + Luminal B+

HER2-amplified). In E, TRAP profile in eutrophic patients. Data expressed in nM of Trolox. BMI = body mass index. \* indicates  $p \leq 0.05$ .

**Figure 7 – Heatmap of correlations between plasma oxidative stress markers levels and clinicopathological parameters of breast cancer patients occupationally exposed (Exp) or not (NExp) to pesticides and carriers of the A allele of the UGT2B7.** The intensity of the color of each square represents the R values for the Spearman correlations—the more intense the color, the more positive the correlation; the less intense, the weaker the correlation. RQT = chemoresistance, ER = estrogen receptors, RP = progesterone receptors, HER2 = tumors with epidermal growth factor 2 receptor amplification, ki67 = ki67 proliferation index, BMI = body mass index, QL = plasma lipoperoxidation levels, TRAP = plasma antioxidant capacity, NOx = levels of metabolites in nitric oxide. \* indicates  $p \leq 0.05$ . NA = not applicable.

**Figure 8: Principal component analysis according to the clinicopathological variables profile and oxidative stress markers levels in breast cancer patients occupationally exposed to pesticides and carriers of the A allele in the gene UGT2B7.** The two main components are represented: component 1 (PC1: risk stratification of death and recurrence + chemoresistance) and component 2 (PC2: age at diagnosis + menopause + BMI + exposure to pesticides)

**Supplementary table:** *Odds ratio* relating the AA+GA genotypes with the clinicopathological variables using the GG genotype as a reference in total breast cancer patients (N=229)

Variable	P valor	<i>Odds ratio</i> (OR)	Confidence interval
Estrogen receptor	0.760	0.896	0.442-1.816
Progesterone receptors	0.186	0.635	0.323-1.250
Ki-67 proliferation index	0.495	1.273	0.637-2.544
molecular subtype	0.110	0.782	0.578-1.057
Tumor size	0.418	1.324	0.672-2.611
Histological grade	0.505	0.791	0.397-1.576
Aggressiveness	0.328	0.688	0.324-1.457
Angiolymphatic emboli	0.623	1.228	0.541-2.783
Lymphodonal invasion	0.694	0.863	0.413-1.800
Age at diagnosis	0.846	0.934	0.470-1.857
Menopause at diagnosis	0.384	1.396	0.659-2.959
Body Mass Index (BMI)	0.823	1.100	0.476-2.540
Risk stratification	0.135	0.660	0.383-1.138

Analysis performed by binary logistic regression,  $p < 0.05$  considered statistical.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

Fatores ambientais como a exposição á agrotóxicos, dependendo da dose e seu tempo de exposição pode elevar o risco ou mesmo favorecer a progressão do câncer de mama ao ativar vias que possibilitam a proliferação celular como consequência da sua natureza lipofílica ou mesmo ocasionando danos diretos ou indiretos ao material genético. A presença de polimorfismos em enzimas metabolizadoras de moléculas com potencial carcinogênico também contribui para o inicio e progressão dessa doença que é uma patologia genética complexa que envolve diferentes vias e fatores.

No presente estudo ao analisar a frequência do polimorfismo observamos que o grupo de pacientes não expostas detiam maior frequência do alelo mutado A. Não foi observada associação estatística entre a presença do alelo A com os parâmetros histopatológicos entre os grupos averiguados. Já em relação aos biomarcadores de estresse oxidativo lipoperoxidação plasmática total, NO e capacidade antioxidante total plasmática foi observada diferenças estáticas entre os grupos de pacientes expostas e não expostas.

A partir dos resultados obtidos foi possível verificar, portanto, que embora a presença do alelo mutante (A) do polimorfismo estudado elevasse a atividade da enzima UGT2B7, sendo, portanto, um dos mecanismos associados à proteção antioxidante por meio da detoxificação de agrotóxicos e dos produtos provenientes do estresse oxidativo ocasionados por esses xenobióticos, isso não foi observado.

As pacientes expostas ocupacionalmente a agrotóxicos, ainda que possuindo o alelo mutante (A) apresentaram elevados níveis de lipoperoxidação e metabólitos do óxido nítrico, além da depleção dos níveis antioxidantes, que podem colaborar para a progressão tumoral.

Esses achados indicam um possível, porém não elucidado, papel dos agrotóxicos suprimindo a ação das enzimas UGT2B7. Essa supressão pode afetar, principalmente, tumores hormônio-dependentes contribuindo para o avanço da doença, tornando-a mais agressiva. Assim sendo, nosso trabalho indica uma das

inúmeras vias possivelmente influenciadas pela exposição a agrotóxicos que estão envolvidas na progressão do câncer de mama.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABASS, K.; PELKONEN, O. The inhibition of major human hepatic cytochrome P450 enzymes by 18 pesticides: Comparison of the N-in-one and single substrate approaches. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 5, p. 1584–1588, 1 ago. 2013.
- ABDOLLAHI, M. et al. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**, v. 10, n. 6, p. RA141–RA147, 3 jun. 2004.
- AL-EITAN, L. N. et al. Association between ESR1, ESR2, HER2, UGT1A4, and UGT2B7 polymorphisms and breast Cancer in Jordan: a case-control study. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1257, 30 dez. 2019.
- ALLAIN, E. P. et al. Emerging roles for UDP-glucuronosyltransferases in drug resistance and cancer progression. **British Journal of Cancer**, v. 122, n. 9, p. 1277–1287, abr. 2020.
- ALMAZROO, O. A.; MIAH, M. K.; VENKATARAMANAN, R. Drug Metabolism in the Liver. **Clinics in Liver Disease**, v. 21, n. 1, p. 1–20, fev. 2017.
- AMBROSONE CB. Oxidants and antioxidants in breast cancer. **Antioxidants & redox signaling**, v. 2, n. 4, Winter 2000.
- ANDERSON, K. N.; SCHWAB, R. B.; MARTINEZ, M. E. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 144, n. 1, p. 1–10, 1 fev. 2014.
- ANDROUTSOPOULOS, V. P. et al. A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. **Toxicology**, Emerging health issues from chronic pesticide exposure: Innovative methodologies and effects on molecular cell and tissue level. v. 307, p. 89–94, 10 maio 2013.
- ATAEI, M.; ABDOLLAHI, M. A systematic review of mechanistic studies on the relationship between pesticide exposure and cancer induction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 456, p. 116280, dez. 2022.
- AOUAD, P. et al. Epithelial-mesenchymal plasticity determines estrogen receptor positive breast cancer dormancy and epithelial reconversion drives recurrence. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 25 ago. 2022.
- BADAWI, A.; CAVALIERI, E. L.; ROGAN, E. G. Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and 2- and 4-hydroxylation of

17 $\beta$ -estradiol in female Sprague–Dawley rats. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 8, p. 1593–1599, 1 ago. 2000.

BADID, N. et al. Oxidant/Antioxidant Status, Lipids and Hormonal Profile in Overweight Women with Breast Cancer. **Pathology & Oncology Research**, v. 16, n. 2, p. 159–167, 1 jun. 2010.

BANERJEE, B. D.; SETH, V.; AHMED, R. S. Pesticide-Induced Oxidative Stress : Perspective and Trends. **Reviews on Environmental Health**, v. 16, n. 1, p. 1–40, 1 jan. 2001.

BITENCOURT DE MORAIS VALENTIM, J. M. et al. Monitoring residues of pesticides in food in Brazil: A multiscale analysis of the main contaminants, dietary cancer risk estimative and mechanisms associated. **Frontiers in Public Health**, v. 11, 2023.

BLAIR, A. et al. Pesticides and human health. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 72, n. 2, p. 81–82, 1 fev. 2015.

BRINTON, L. A. Menopause and the risk of breast cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 592, p. 357–362; discussion 390-394, 1990.

BUKOWSKA, B. et al. Glyphosate disturbs various epigenetic processes in vitro and in vivo – A mini review. **Science of The Total Environment**, v. 851, p. 158259, 10 dez. 2022.

CHEN, S. et al. The Function of RAS Mutation in Cancer and Advances in its Drug Research. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 10, p. 1105–1114, 2019.

CILIÃO, H. L. et al. Polymorphisms in IMPDH2, UGT2B7, and CES2 genes influence the risk of graft rejection in kidney transplant recipients taking mycophenolate mofetil. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Latin-American Congress of Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Teratogenesis Association (ALAMCTA). v. 836, p. 97–102, 1 dez. 2018.

CLAPPER, M. L. Genetic polymorphism and cancer risk. **Current Oncology Reports**, v. 2, n. 3, p. 251–256, 1 jun. 2000.

CLEMONS, M.; SIMMONS, C. Identifying menopause in breast cancer patients: considerations and implications. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 104, n. 2, p. 115–120, 1 ago. 2007.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. **The Lancet. Oncology**, v. 13, n. 11, nov. 2012.

COLLINS, A. R. Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. **BioEssays**, v. 21, n. 3, p. 238–246, 29 mar. 1999.

COUGHLIN, S. S. Epidemiology of Breast Cancer in Women. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1152, p. 9–29, 2019.

CROOM, E. Chapter Three - Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. Em: HODGSON, E. (Ed.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. Toxicology and Human Environments. [s.l.] Academic Press, 2012. v. 112p. 31–88.

CURL C L et al. Synthetic Pesticides and Health in Vulnerable Populations: Agricultural Workers. **Current environmental health reports**, v. 7, n. 1, mar. 2020.

DA SILVA, J. C. et al. Occupational Exposure to Pesticides Affects Pivotal Immunologic Anti-Tumor Responses in Breast Cancer Women from the Intermediate Risk of Recurrence and Death. **Cancers**, v. 14, n. 21, p. 5199, 23 out. 2022.

DANG, N. L. et al. The Metabolic Rainbow: Deep Learning Phase I Metabolism in Five Colors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 3, p. 1146–1164, 23 mar. 2020.

DANIELS, G. The molecular genetics of blood group polymorphism. **Human Genetics**, v. 126, n. 6, p. 729–742, dez. 2009.

DE OLIVEIRA, S. T. et al. Systemic lipid peroxidation profile from patients with breast cancer changes according to the lymph nodal metastasis status. **Oncoscience**, v. 9, p. 1–10, 2022.

DE SOUZA, E. S. A. et al. Exposure to pesticides and oxidative stress in Brazilian agricultural communities. **Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals**, v. 26, n. 6, p. 539–547, set. 2021.

DU, Z.; LOVLY, C. M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. **Molecular Cancer**, v. 17, n. 1, 19 fev. 2018.

ELICKER, L. M. A. et al. A CITOLOGIA MAMÁRIA NA DETECÇÃO PRECOCE DO CÂNCER DE MAMA: UMA REVISÃO. **Revista Espaço Ciência & Saúde**, v. 7, n. 2, p. 20–34, 28 set. 2020.

EL-ZAEMEY, S.; HEYWORTH, J.; FRITSCHI, L. Noticing pesticide spray drift from agricultural pesticide application areas and breast cancer: a case-control study. **Australian and New Zealand Journal of Public Health**, v. 37, n. 6, p. 547–555, 2013.

ERIC, I. et al. BREAST CANCER IN YOUNG WOMEN: PATHOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURES. **Acta Clinica Croatica**, v. 57, n. 3, p. 497–502, set. 2018.

ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 11, p. 1148–1159, 13 mar. 2008.

FARHADI, K. et al. In vitro study of the binding between chlorpyrifos and sex hormones using headspace solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography: A new aspect of pesticides and breast cancer risk. **Human & Experimental Toxicology**, v. 34, n. 8, p. 819–827, ago. 2015.

FENG, L. et al. Fluorescent probes for bioactive detection and imaging of phase II metabolic enzymes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 399, p. 213026, 15 nov. 2019.

FENGA, C. Occupational exposure and risk of breast cancer (Review). **Biomedical Reports**, v. 4, n. 3, p. 282–292, 1 mar. 2016.

FORCADOS, G. E. et al. Oxidative Stress and Carcinogenesis: Potential of Phytochemicals in Breast Cancer Therapy. **Nutrition and Cancer**, v. 69, n. 3, p. 365–374, 3 abr. 2017.

FRANCA, R. et al. Understanding thiopurine methyltransferase polymorphisms for the targeted treatment of hematologic malignancies. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 17, n. 10, p. 1187–1198, 3 out. 2021.

FREDERICO PERES; JOSINO COSTA MOREIRA. É veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente. [s.l.] Editora Da Fundação Oswaldo Cruz, 2003.

FRIEDRICH, K. et al. Situação regulatória internacional de agrotóxicos com uso autorizado no Brasil: potencial de danos sobre a saúde e impactos ambientais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, p. e00061820, 14 maio 2021.

FROST, A. R. et al. The Influence of the Cancer Microenvironment on the Process of Metastasis. **International Journal of Breast Cancer**, v. 2012, p. e756257, 18 abr. 2012.

FUCHS-TARLOVSKY, V. Role of antioxidants in cancer therapy. **Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 1 jan. 2013.

GABOARDI, S. C.; CANDIOTTO, L. Z. P.; RAMOS, L. M. PERFIL DO USO DE AGROTÓXICOS NO SUDOESTE DO PARANÁ (2011 – 2016)/Profile of pesticides use in the southwest of Paraná (2011-2016). **REVISTA NERA**, n. 46, p. 13–40, 2019.

GANDHI, R.; SNEDEKER, S. M. Pesticides and Breast Cancer Risk, An Evaluation of 2,4-D, BCERF Fact Sheet No. 14. **ecommons.cornell.edu**, 1 mar. 1998.

GANZ, P. A. Breast cancer, menopause, and long-term survivorship: critical issues for the 21st century. **The American Journal of Medicine**, v. 118, n. 12, p. 136–141, 19 dez. 2005.

GENE CARDS. **UGT2B7 Gene - GeneCards | UD2B7 Protein | UD2B7 Antibody**. Disponível em: <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=UGT2B7>>. Acesso em: 16 jun. 2023.

**Genetics of Breast and Gynecologic Cancers (PDQ®)–Health Professional Version - National Cancer Institute.** Disponível em:

<[https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-ovarian-genetics-pdq#\\_3165](https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-ovarian-genetics-pdq#_3165)>.

GESTL, S. A. et al. Expression of UGT2B7, a UDP-Glucuronosyltransferase Implicated in the Metabolism of 4-Hydroxyestrone and All-Trans Retinoic Acid, in Normal Human Breast Parenchyma and in Invasive and in Situ Breast Cancers. **Am J Pathol**, v. 160, n. 4, p. 1467–1479, 1 abr. 2002.

GLATT, H.; MEINL, W. Pharmacogenetics of soluble sulfotransferases (SULTs). **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 369, n. 1, p. 55–68, 1 jan. 2004.

GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 9, p. 2206, set. 2013.

GOMEZ, AL et al. Male mammary gland development and methylation status of estrogen receptor alpha in Wistar rats are modified by the developmental exposure to a glyphosate-based herbicide. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 481, 2 maio 2019.

GONZALEZ FLECHA BS et al. Inhibition of microsomal lipid peroxidation by alpha-tocopherol and alpha-tocopherol acetate. **Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems**, v. 21, n. 8, ago. 1991.

GRANCHAROV, K. et al. Natural and synthetic inhibitors of UDP-glucuronosyltransferase. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 89, n. 2, p. 171–186, 1 fev. 2001.

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; LEWONTIN, R. C.; CARROLL, S. B. *Introdução a Genética*. 2012.

HALLIWELL B. Reactive oxygen species (ROS), oxygen radicals and antioxidants: Where are we now, where is the field going and where should we go? **Biochem Biophys Res Commun**. 2022 Dec 10;633:17-19.

HAO Z et al. The inhibition of tamoxifen on UGT2B gene expression and enzyme activity in rat liver contribute to the estrogen homeostasis dysregulation. **BMC pharmacology & toxicology**, v. 23, n. 1, 31 maio 2022.

HARRINGTON, W. R.; SENGUPTA, S.; KATZENELLENBOGEN, B. S. Estrogen Regulation of the Glucuronidation Enzyme UGT2B15 in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Cells. **Endocrinology**, v. 147, n. 8, p. 3843–3850, 1 ago. 2006.

HASSANI IDRISSE, H. et al. A synergic effect between CYP2C19\*2, CYP2C19\*3 loss-of-function and CYP2C19\*17 gain-of-function alleles is associated with Clopidogrel resistance among Moroccan Acute Coronary Syndromes patients. **BMC**

**Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 46, 18 jan. 2018.

HAYES JD; FLANAGAN JU; JOWSEY IR. Glutathione transferases. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 45, 2005.

HATAGIMA, A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. 357–377, abr. 2002.

HAZRA, A. et al. Molecular epigenetic dynamics in breast carcinogenesis. **Archives of Pharmacal Research**, v. 44, n. 8, p. 741–763, ago. 2021.

HE, B.-X. et al. Association between UDP-glucuronosyltransferase 2B7 tagSNPs and breast cancer risk in Chinese females. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 45, n. 5, p. 437–443, 2018.

HODGSON, E. In vitro human phase I metabolism of xenobiotics I: Pesticides and related chemicals used in agriculture and public health, September 2001. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 15, n. 6, p. 296–299, 2001.

HONG, R.; XU, B. Breast cancer: an up-to-date review and future perspectives. **Cancer Communications**, v. 42, n. 10, p. 913–936, 2022.

HOUSMAN, G. et al. Drug Resistance in Cancer: An Overview. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1769–1792, set. 2014.

HU, D. G. et al. Genetic polymorphisms of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) genes and cancer risk. **Drug Metabolism Reviews**, v. 48, n. 1, p. 47–69, 2 jan. 2016.

INNOCENTI, F. et al. Single nucleotide polymorphism discovery and functional assessment of variation in the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 gene. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 18, n. 8, p. 683–697, ago. 2008. **Instituto Nacional de Câncer - INCA**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br>>. Acesso em: 16 jun. 2023.

ISMAIL, S.; ESSAWI, M. Genetic polymorphism studies in humans. **Middle East Journal of Medical Genetics**, v. 1, n. 2, p. 57–63, 2012.

IYANAGI, T. Molecular Mechanism of Phase I and Phase II Drug-Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification. Em: **International Review of Cytology**. [s.l.] Academic Press, 2007. v. 260p. 35–112.

JANACOVA, L. et al. Catechol-O-methyl transferase suppresses cell invasion and interplays with MET signaling in estrogen dependent breast cancer. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 1285, 23 jan. 2023.

JANCOVA, P.; ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVA, E. Phase II drug metabolizing enzymes. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the**

**University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 154, n. 2, p. 103–116, 1 jun. 2010.

JIANG T et al. p62 links autophagy and Nrf2 signaling. **Free radical biology & medicine**, v. 88, n. Pt B, nov. 2015.

KAEFERSTEIN, H. Forensic relevance of glucuronidation in phase-II-metabolism of alcohols and drugs. **Legal Medicine**, v. 11, p. S22–S26, abr. 2009.

KALTHOFF S et al. Interaction between oxidative stress sensor Nrf2 and xenobiotic-activated aryl hydrocarbon receptor in the regulation of the human phase II detoxifying UDP-glucuronosyltransferase 1A10. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 9, 26 fev. 2010.

KANG, K. S. et al. Inhibition of gap junctional intercellular communication in normal human breast epithelial cells after treatment with pesticides, PCBs, and PBBs, alone or in mixtures. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. 2, p. 192–200, fev. 1996.

KARKI, R. et al. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. **BMC Medical Genomics**, v. 8, n. 1, p. 37, 15 jul. 2015.

KASS L; GOMEZ AL; ALTAMIRANO GA. Relationship between agrochemical compounds and mammary gland development and breast cancer. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 508, 15 maio 2020.

KALTHOFF S, EHMER U, FREIBERG N, MANNS MP, STRASSBURG CP. Interaction between oxidative stress sensor Nrf2 and xenobiotic-activated aryl hydrocarbon receptor in the regulation of the human phase II detoxifying UDP-glucuronosyltransferase 1A10. **J Biol Chem**. 2010 Feb 26;285(9):5993-6002.

KAUR, G. et al. Drug-metabolizing enzymes: role in drug resistance in cancer. **Clinical and Translational Oncology**, v. 22, n. 10, p. 1667–1680, 13 mar. 2020.

KAUR, K.; KAUR, R. Occupational Pesticide Exposure, Impaired DNA Repair, and Diseases. **Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 22, n. 2, p. 74–81, 2018.

KENEMANS, P.; VERSTRAETEN, R. A.; VERHEIJEN, R. H. M. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. **Maturitas**, v. 49, n. 1, p. 34–43, 24 set. 2004.

KERN, R. et al. The Expression of CTLA-4 in Breast Tumors and Tumor-Infiltrating Leukocytes Affects Patients' Systemic Inflammatory Status and Varies According to Their Molecular Subtypes. **Inflammation**, 26 maio 2023.

KLAUNIG, J. E. Oxidative Stress and Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 40, p. 4771–4778, 15 mar. 2019.

- KOUAL, M. et al. Environmental chemicals, breast cancer progression and drug resistance. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 19, n. 1, p. 117, 17 nov. 2020.
- KOLAK, A. et al. Primary and secondary prevention of breast cancer. **Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM**, v. 24, n. 4, p. 549–553, 2017.
- KUNDAKTEPE BP et al. The evaluation of oxidative stress parameters in breast and colon cancer. **Medicine**, v. 100, n. 11, 19 mar. 2021.
- LANDAU-OSSONDO M et al. Why pesticides could be a common cause of prostate and breast cancers in the French Caribbean Island, Martinique. An overview on key mechanisms of pesticide-induced cancer. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 63, n. 6, jul. 2009.
- LEREBOURS, F.; LIDEREAU, R. Molecular alterations in sporadic breast cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, n. 2, p. 121–141, 1 nov. 2002.
- LI, H. et al. Correlation of UGT2B7 Polymorphism with Cardiotoxicity in Breast Cancer Patients Undergoing Epirubicin/Cyclophosphamide-Docetaxel Adjuvant Chemotherapy. **Yonsei Medical Journal**, v. 60, n. 1, p. 30, 1 jan. 2019.
- LI, Y. et al. miR-452 Reverses Abnormal Glycosylation Modification of ER $\alpha$  and Estrogen Resistance in TNBC (Triple-Negative Breast Cancer) Through Targeting UGT1A1. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 2020.
- LI, M.; LI, A.; HE, R.; DANG, W.; LIU, X.; YANG, T.; SHI, P.; XIANG, B.; GAO, D.; ZHANG, N.; DU, S.; JIN, T.; CHEN, M. Gene polymorphism of cytochrome P450 significantly affects lung cancer susceptibility. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 10, p. 4892–4905, jul. 2019.
- LI, Y.-J. et al. STAT proteins in cancer: orchestration of metabolism. **Nature Reviews Cancer**, p. 1–20, 3 jan. 2023.
- LOOMIS, D. et al. Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 8, p. 891–892, ago. 2015.
- LU SC. Glutathione synthesis. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 5, maio 2013.
- MAHALINGAIAH, P. K. S.; PONNUSAMY, L.; SINGH, K. P. Chronic oxidative stress causes estrogen-independent aggressive phenotype, and epigenetic inactivation of estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 153, n. 1, p. 41–56, ago. 2015.
- MARUO, Y. et al. Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase and drug metabolism. **Current Drug Metabolism**, v. 6, n. 2, p. 91–99, abr. 2005.
- MEKONNEN, B.; SIRAJ, J.; NEGASH, S. Determination of Pesticide Residues in Food Premises Using QuECHERS Method in Bench-Sheko Zone, Southwest

Ethiopia. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.

Mencalha A, Victorino VJ, Cecchini R, Panis C. Mapping oxidative changes in breast cancer: understanding the basic to reach the clinics. **Anticancer Res.** 2014 Mar;34(3):1127-40. PMID: 24596350.

MILLS, P. K. et al. Agricultural Exposures and Breast Cancer Among Latina in the San Joaquin Valley of California. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 61, n. 7, p. 552–558, jul. 2019.

MOSTAFALOU S; ABDOLLAHI M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 268, n. 2, 15 abr. 2013.

MORRISON, D. K. MAP kinase pathways. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 11, p. a011254–a011254, 1 nov. 2012.

MOU, P. et al. RS7435335 located in the UGT2B7 gene may be a possible genetic marker for the clinical response and prognosis of breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 5, p. 7167–7173, 2019.

NAKAMURA, A. et al. Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region of human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 affect the Nrf2-dependent transcriptional regulation. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 18, n. 8, p. 709, ago. 2008.

NAVARRO-GONZÁLEZ, R.; MOLINA, M. J.; MOLINA, L. T. Nitrogen fixation by volcanic lightning in the early Earth. **Geophysical Research Letters**, v. 25, n. 16, p. 3123–3126, 1998.

NAYDENOVA, Z. et al. Effect of s-triazine and phenoxyalkanoic acid herbicides on UDP-glucuronosyltransferase in rat liver microsomes. **Pesticide Science**, v. 55, n. 8, p. 825–830, 1999.

NEBBIOSO, M. et al. Oxidative Stress Implication in Retinal Diseases—A Review. **Antioxidants**, v. 11, n. 9, p. 1790, set. 2022.

NOURAZARIAN, A.; KANGARI, P.; SALMANINEJAD, A. Roles of Oxidative Stress in the Development and Progression of Breast Cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 15, p. 4745–4751, 8 jul. 2014.

PANIS, C. et al. Characterization of occupational exposure to pesticides and its impact on the health of rural women. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 43, p. 1–14, 21 jan. 2022b.

PANIS, C. et al. Differential oxidative status and immune characterization of the early and advanced stages of human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 3, p. 881–888, jun. 2012.

PANIS, C. et al. 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, 2022a.

PANIS, C.; PESSÔA CANDIOTTO, L. Z.; GABOARDI, S. C. Permissiveness of Brazilian Legislation, Widespread Contamination by Pesticides in Food and Water, and Risks to the Population's Health. **Frontiers in Environmental Science**, v. 10, 2022.

PILCO-FERRETO, N.; CALAF, G. M. Influence of doxorubicin on apoptosis and oxidative stress in breast cancer cell lines. **International Journal of Oncology**, v. 49, n. 2, p. 753–762, 1 ago. 2016.

PIZZATTI, L. et al. Toxicoproteomics Disclose Pesticides as Downregulators of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and Estrogen Receptor Pathways in Breast Cancer Women Chronically Exposed. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 2020.

PIZZORNO L. Nothing Boring About Boron. **Integrative medicine (Encinitas, Calif.)**, v. 14, n. 4, ago. 2015.

RADECKA, B.; LITWINIUK, M. Breast cancer in young women. **Ginekologia Polska**, v. 87, n. 9, p. 659–663, 2016.

RAE JM et al. CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 6, 21 mar. 2012.

RAVULA, A. R.; YENUGU, S. Pyrethroid based pesticides – chemical and biological aspects. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 51, n. 2, p. 117–140, 7 fev. 2021.

REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, v. 255, n. 2, p. 107–117, 29 nov. 1996.

RIBEIRO, A. P. SANTANA, A. J.; OLIVEIRA, I. R. M.; PEREIRA, J. M. A.; MIRANDA, L. M.; ALMEIDA, J. C. F. CÂNCER DE MAMA. **Revista Projetos Extensionistas**, v. 1, n. 2, p. 126–136, 10 dez. 2021.

ROBISON, A. K.; SIRBASKU, D. A.; STANCEL, G. M. DDT supports the growth of an estrogen-responsive tumor: Mammary tumor growth; pesticides. **Toxicology Letters**, v. 27, n. 1, p. 109–113, 1 set. 1985.

ROCHA P et al. Exposure to endocrine disruptors and risk of breast cancer: A systematic review. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 161, maio 2021.

ROMERO-LORCA, A. et al. Impacts of the Glucuronidase Genotypes UGT1A4, UGT2B7, UGT2B15 and UGT2B17 on Tamoxifen Metabolism in Breast Cancer Patients. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0132269, 15 jul. 2015.

ROSSI, L.; MAZZARA, C.; PAGANI, O. Diagnosis and Treatment of Breast Cancer in

Young Women. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 20, n. 12, p. 86, 27 nov. 2019.

SÁEZ-FREIRE, M. DEL M. et al. The biological age linked to oxidative stress modifies breast cancer aggressiveness. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 120, p. 133–146, 20 maio 2018.

SANTEN, R. J. Menopausal hormone therapy and breast cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Current Views of Hormone Therapy for Management and Treatment of Postmenopausal Women. v. 142, p. 52–61, 1 jul. 2014.

SANTOS, L. et al. Overweight Women with Breast Cancer on Chemotherapy Have More Unfavorable Inflammatory and Oxidative Stress Profiles. **Nutrients**, v. 12, n. 11, p. 3303, 28 out. 2020.

SCANDOLARA, T. B. et al. Clinical implications of lipid peroxides levels in plasma and tumor tissue in breast cancer patients. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 161, p. 106639, 1 ago. 2022.

SCANDOLARA TB, VALLE SF, TEIXEIRA CE, SCHERER NM, DE ARMAS EM, FURTADO C, BORONI M, JAQUES HDS, ALVES FM, RECH D, PANIS C, BONVICINO CR. Somatic DNA Damage Response and Homologous Repair Gene Alterations and Its Association With Tumor Variant Burden in Breast Cancer Patients With Occupational Exposure to Pesticides. **Front Oncol**. 2022 Jul 8;12:904813. doi: 10.3389/fonc.2022.904813. Erratum in: **Front Oncol**. 2022 Sep 23;12:1014392. PMID: 35875117; PMCID: PMC9305859.

SERPE, L. et al. Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes in Italian populations. **Drug Metabolism and Personalized Therapy**, v. 30, n. 2, p. 107–120, jun. 2015.

SHEN, K.; NOVAK, R. F. DDT Stimulates c-erbB2, c-met, and STATS Tyrosine Phosphorylation, Grb2-Sos Association, MAPK Phosphorylation, and Proliferation of Human Breast Epithelial Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 231, n. 1, p. 17–21, 3 fev. 1997.

SHEN, M.-L. et al. Associations between UGT2B7 polymorphisms and cancer susceptibility: A meta-analysis. **Gene**, v. 706, p. 115–123, 20 jul. 2019.

SHEIKH, A.; HUSSAIN, S. A.; GHORI, Q.; NAEEM, N.; FAZIL, A.; GIRI, S.; SATHIAN, B.; MAINALI, P.; TAMIMI, D. M. A. The Spectrum of Genetic Mutations in Breast Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 6, p. 2177–2185, 2015.

SIEBER, O. M.; HEINIMANN, K.; TOMLINSON, I. P. M. Genomic instability — the engine of tumorigenesis? **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 9, p. 701–708, set. 2003.

SIM, E.; WALTERS, K.; BOUKOUVALA, S. Arylamine N-acetyltransferases: From Structure to Function. **Drug Metabolism Reviews**, v. 40, n. 3, p. 479–510, 1 jan. 2008.

SINGH, S. et al. Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 20, p. 7519, jan. 2020.

SONG, Y. et al. Drug-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes Have Multifarious Influences on Treatment Outcomes. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 60, n. 5, p. 585–601, maio 2021.

SPARKS, R. et al. UDP-glucuronosyltransferase and sulfotransferase polymorphisms, sex hormone concentrations, and tumor receptor status in breast cancer patients. **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 5, p. R488, 29 jun. 2004.

STAREK-ŚWIECHOWICZ, B.; BUDZISZEWSKA, B.; STAREK, A. Endogenous estrogens—breast cancer and chemoprevention. **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 6, p. 1497–1512, 1 dez. 2021.

STARLARD-DAVENPORT, A.; WORD, B. R.; LYN-COOK, B. Characterization of UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1) Promoter Polymorphisms and Gene Expression on Ethnicity, Stage of Disease, and Menopausal Status in Breast Cancer. **Journal of drug metabolism & toxicology**, v. 2012, n. Suppl 4, 2012.

STEBBENS, W. E. Oxidative stress, toxic hepatitis, and antioxidants with particular emphasis on zinc. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 75, n. 3, p. 265–276, 1 dez. 2003.

STIPP, M. C.; ACCO, A. Involvement of cytochrome P450 enzymes in inflammation and cancer: a review. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 87, n. 3, p. 295–309, mar. 2021.

STRUMYLAITĖ, L.; MECHONOŠINA, K.; TAMAŠAUSKAS, Š. Environmental factors and breast cancer. **Medicina**, v. 46, n. 12, p. 867, 12 dez. 2010.

SULE, R. O.; CONDON, L.; GOMES, A. V. A Common Feature of Pesticides: Oxidative Stress—The Role of Oxidative Stress in Pesticide-Induced Toxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. e5563759, 19 jan. 2022.

SUN, Y.-S. et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 11, p. 1387–1397, 2017.

SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, 4 fev. 2021.

SUTIMAN N et al. Pharmacogenetics of UGT1A4, UGT2B7 and UGT2B15 and Their Influence on Tamoxifen Disposition in Asian Breast Cancer Patients. **Clinical pharmacokinetics**, v. 55, n. 10, out. 2016.

TEIXEIRA, G. T. **Perfil clinicopatológico do câncer de mama em mulheres ocupacionalmente expostas aos agrotóxicos na região do sudoeste do paraná' 05/03/2021 59 f. mestrado em ciências aplicadas a saúde** Instituição de Ensino: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA, Francisco Beltrão Biblioteca Depositária: Unioeste-campus de Francisco Beltrão/CCS

THE MARIE-GENICA CONSORTIUM ON GENETIC SUSCEPTIBILITY FOR MENOPAUSAL HORMONE THERAPY RELATED BREAST CANCER RISK. Genetic polymorphisms in phase I and phase II enzymes and breast cancer risk associated with menopausal hormone therapy in postmenopausal women. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 119, n. 2, p. 463–474, 1 jan. 2010.

THIBAudeau, J. et al. Characterization of common UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 variants with different capacities to inactivate mutagenic 4-hydroxylated metabolites of estradiol and estrone. **Cancer Research**, v. 66, n. 1, p. 125–133, 1 jan. 2006.

TIAN, J.-N. et al. UGT2B7 genetic polymorphisms are associated with the withdrawal symptoms in methadone maintenance patients. **Pharmacogenomics**, v. 13, n. 8, p. 879–888, jun. 2012.

VAKONAKI, E. ANDROUTSOPOULOS, V. P.; LIESIVUORI, J.; TSATSAKIS, A.; SPANDIDOS, D. A. Pesticides and oncogenic modulation. **Toxicology**, v. 307, p. 42–45, maio 2013.

VENKATAKRISHNAN, K.; VON MOLTKE, L. L.; GREENBLATT, D. J. Application of the relative activity factor approach in scaling from heterologously expressed cytochromes p450 to human liver microsomes: studies on amitriptyline as a model substrate. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 297, n. 1, p. 326–337, abr. 2001.

VIDYASAGAR, J. et al. Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. abr. 2004.

Wafa, T. et al. Oxidative stress, hematological and biochemical alterations in farmers exposed to pesticides. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 48, n. 12, p. 1058–1069, 2 dez. 2013.

WALKER, R. A. et al. Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years) are different. **British Journal of Cancer**, v. 74, n. 11, p. 1796–1800, dez. 1996.

WAN, M. L. Y.; CO, V. A.; EL-NEZAMI, H. Endocrine disrupting chemicals and breast cancer: a systematic review of epidemiological studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 24, p. 6549–6576, 29 ago. 2022.

WANG, J. et al. Lipid Metabolism Genes in Contralateral Unaffected Breast and Estrogen Receptor Status of Breast Cancer. **Cancer Prevention Research**, v. 6, n. 4, p. 321–330, 3 abr. 2013.

WANG, M. et al. Atrazine promotes breast cancer development by suppressing immune function and upregulating MMP expression. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 253, p. 114691, 15 mar. 2023.

WANG, P. et al. Effect of UGT2B7 genotypes on plasma concentration of valproic acid: a meta-analysis. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 74, n. 4, p. 433–442, 1 abr. 2018.

WANG, P. et al. Glucuronidation and its impact on the bioactivity of [6]-shogaol. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, n. 9, p. 1700023, 2017.

WAYNE, R. K.; OSTRANDER, E. A. Origin, genetic diversity, and genome structure of the domestic dog. **BioEssays**, v. 21, n. 3, p. 247–257, 1999.

WILKINSON, G. R. Drug Metabolism and Variability among Patients in Drug Response. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 21, p. 2211–2221, 26 maio 2005.

WHO 2004. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004, **World Health Organization**, Ginebra.

WU, H.-J.; CHU, P.-Y. Epigenetic Regulation of Breast Cancer Stem Cells Contributing to Carcinogenesis and Therapeutic Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 8113, jan. 2021.

XIE, G.; ZHANG, W.; Li, D. P.; LIU, C. [Effect of opioid-related gene polymorphisms on patients with high-dose opioid-tolerant cancer pain]. v. 99, n. 47, p. 3720–3724, 17 dez. 2019.

YANG N, Sun R, Liao X, Aa J, Wang G. UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) and their related metabolic cross-talk with internal homeostasis: A systematic review of UGT isoforms for precision medicine. **Pharmacol Res**. 2017 Jul;121:169-183. doi: 10.1016/j.phrs.2017.05.001. Epub 2017 May 4. PMID: 28479371.

YIANNAKOPOULOU, E. C. Pharmacogenomics of phase II metabolizing enzymes and drug transporters: clinical implications. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 13, n. 2, p. 105–109, abr. 2013.

YEANG, C.-H.; MCCORMICK, F.; LEVINE, A. Combinatorial patterns of somatic gene mutations in cancer. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 8, p. 2605–2622, 23 abr. 2008.

YONG, M. et al. Associations between polymorphisms in glucuronidation and sulfation enzymes and mammographic breast density in premenopausal women in the United States. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 19, n. 2, p. 537–546, fev. 2010.

ZAVALA, V. A.; SERRANO-GOMEZ, S. J.; DUTIL, J.; FEJERMAN, L. Genetic Epidemiology of Breast Cancer in Latin America. **Genes**, v. 10, n. 2, p. 153, 1 fev. 2019.

YU, Y. et al. Targeted Covalent Inhibition of Grb2–Sos1 Interaction through Proximity-Induced Conjugation in Breast Cancer Cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 1548–1557, 17 jan. 2017.

ZEFFERINO, R. et al. Gap Junction Intercellular Communication in the Carcinogenesis Hallmarks: Is This a Phenomenon or Epiphenomenon? **Cells**, v. 8, n. 8, p. 896, ago. 2019.

ZHANG, Z. et al. Establishment of rat liver microsome-hydrogel system for in vitro phase II metabolism and its application to study pharmacological effects of UGT substrates. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 34, n. 2, p. 141–147, 1 abr. 2019.

ZHAO, M. et al. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12808, jan. 2021.

ZHAO, Y. et al. ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. **Molecular Cancer**, v. 16, n. 1, p. 79, 13 abr. 2017.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A

#### 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) 30553026

Equipe do projeto: Ms. Aedra Bufalo – Professora Adjunta do Curso de Medicina da Unioeste, Campus de Francisco Beltrão. Dra Rosebel Prates – Professora Adjunta do Curso de Medicina da Unioeste, Campus de Francisco Beltrão. Dra Claudicéia Risso Pascotto - Professora Adjunta do Curso de Medicina da Unioeste, Campus de Francisco Beltrão. Dra Léia Carolina Lúcio Professora Adjunta do Curso de Medicina da Unioeste, Campus de Francisco Beltrão. Ms. Geraldo Vicentini – Professor do Curso de Medicina da Unioeste, Campus de Francisco Beltrão.

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) para fazer os exames necessários para identificar porque alguns tumores de mama levam à doenças tão agressivas.

Durante a execução do projeto também vamos precisar de uma parte do tecido tumoral que o médico irá remover durante a sua cirurgia ou que foi coletado para o diagnóstico da doença (na biópsia). Também precisaremos consultar o prontuário médico, para saber informações sobre sua saúde e sua ocupação de trabalho. Para algum questionamento, dúvida ou relato de algum acontecimento os pesquisadores poderão ser contatados a qualquer momento, pelos telefones (43)99165316 e (46)

30553026. Estamos disponíveis para esclarecer quaisquer dúvidas, a qualquer momento.

Desta forma, você está contribuindo para a identificação de fatores que levam à alta incidência de cânceres agressivos na nossa região.

Este termo será entregue em duas vias, sendo que uma ficará com você. Você não pagará nem receberá para participar do estudo. Seus dados serão mantidos em sigilo, ou seja, ninguém além dos pesquisadores terá acesso ao material ou informações coletadas. Estes dados serão utilizados somente para fins científicos. Você poderá cancelar sua participação a qualquer momento. Se necessitar de maiores informações, o telefone do comitê de ética é 3220-3272 e da pesquisadora responsável é 46 30553026. A coleta de material será feita dentro do Ceonc, portanto qualquer imprevisto será resolvido imediatamente no local. Ao término do projeto, se a pesquisa identificar que a sua doença se classifica como câncer familiar, você será chamado ao Ceonc para receber esclarecimentos sobre como proceder no acompanhamento da doença nos próximos anos.

Declaro estar ciente do exposto e desejo participar do projeto.

Nome do sujeito de pesquisa ou responsável:

Assinatura:

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

Data:

## APÊNDICE B: Aprovação do projeto de pesquisa no Comitê de Ética

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO  
OESTE DO PARANÁ



### 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 a exposição ocupacional à agrotóxicos.

**Pesquisador:** CAROLINA PANIS

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 35524814.4.0000.0107

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 810.501

**Data da Relatoria:** 25/09/2014

#### Apresentação do Projeto:

Neste estudo pretende-se avaliar todas as mulheres diagnosticadas com câncer de mama, atendidas no Hospital de Câncer de Francisco Beltrão (Ceonc), em um período de 48 meses. A partir da análise de anotações em prontuários serão selecionadas para investigação dos genes de interesse aquelas mulheres com história de câncer de mama familiar com ou sem exposição ocupacional à agrotóxicos. Atende aos requisitos teóricos, metodológicos e éticos.

#### Objetivo da Pesquisa:

Mapear os casos de câncer de mama familiar na região Sudoeste do Paraná e identificar possível associação a exposição ocupacional à agrotóxicos.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos diretos aos sujeitos, uma vez que serão estudados materiais coletados durante cirurgias oncológicas.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Relevante para a área de oncologia.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos apresentados.

Endereço: UNIVERSITARIA

Bairro: UNIVERSITARIO

UF: PR

Telefone: (45)3220-3272

Município: CASCAVEL

CEP: 85.819-110

E-mail: cep.prppg@unioeste.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO  
OESTE DO PARANÁ



Continuação do Parecer: 810.501

**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.

CASCADEL, 29 de Setembro de 2014

---

**Assinado por:**  
**João Fernando Christofolletti**  
**(Coordenador)**

APÊNDICE C: TERMO DE CIÊNCIA DO RESPONSÁVEL PELO CAMPO DE ESTUDO

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: Carolina Panis

Local da pesquisa: Ceonc – Francisco Beltrão

Responsável pelo local de realização da pesquisa: Carolina Panis

O pesquisador acima identificado está autorizado a realizar a pesquisa e coletar dados, preservando as informações referentes aos sujeitos de pesquisa, divulgando-as exclusivamente para fins científicos apenas anonimamente, respeitando todas as normas da Resolução 466/2013 e suas complementares, conforme firmado através do documento abaixo.

# HOSPITAL DO CÂNCER

## FRANCISCO BELTRÃO

ceonc

### Declaração de participação em projeto de pesquisa

Declaro para os devidos fins que o Centro de Oncologia Cascavel SS LTDA - Filial Francisco Beltrão (CEONC-FB) irá participar como parceiro do projeto "Mapeamento do câncer de mama familiar no sudoeste do Paraná e estudo da associação de risco com a exposição ocupacional à agrotóxicos", coordenado pela Profa. Dra. Carolina Panis, a ser desenvolvido na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Francisco Beltrão-PR. Disponho-me para eventuais esclarecimentos.

Londrina, 18 de março de 2014.

Enfa Cinthya R. Alba Rech  
Serviço de Serviço de Saúde  
Hospital do Câncer de Francisco Beltrão



Enfa Cinthya R. Alba Rech  
Gerente de Serviço de Saúde

Hospital do Câncer de Francisco Beltrão - CEONC

