



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Colegiado do CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EMANUELY MARIA SANTANA

ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs2736100 NO GENE *TERT* COM PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA EXPOSTAS A AGROTÓXICOS

Londrina – Paraná

2025

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

EMANUELY MARIA SANTANA

**ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs2736100
NO GENE *TERT* COM PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM
CÂNCER DE MAMA EXPOSTAS A AGROTÓXICOS**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Juliana Mara Serpeloni

Coorientadora: Ma. Beatriz Geovana Leite Vacario

Londrina – Paraná

2025

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

E53a SANTANA, Emanuely Maria Santana.

ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs2736100 NO GENE TERT COM PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA EXPOSTAS A AGROTÓXICOS / Emanuely Maria Santana SANTANA. - Londrina, 2025. 63f.

Orientador: Juliana Mara Serpeloni Serpeloni.

Coorientador: Beatriz Geovana Leite Vacario Vacario.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, 2025.

Inclui bibliografia.

1. polimorfismo - TCC. 2. genética molecular - TCC. 3. câncer de mama - TCC. 4. exposição ocupacional - TCC. I. Serpeloni, Juliana Mara Serpeloni. II. Vacario, Beatriz Geovana Leite Vacario. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Juliana Mara Serpeloni

Profa. Dra. Marna Eliana Sakalem

Ma. Isabely Mayara da Silva

Ma. Lais Capelasso Lucas Pinheiro (suplente)

Londrina, 10 de fevereiro de 2025

DEDICATÓRIA

“Nós, para os outros, apenas criamos pontos de partida.”

(Simone de Beauvoir)

AGRADECIMENTOS

A caminhada até aqui não teria sido possível sem apoio e ajuda. A minha vida se torna muito mais leve por estar cercada de tantas pessoas boas.

Jamais será possível agradecer o suficiente a minha mãe, Izabel, que desde antes do meu nascimento luta pela minha existência, e as batalhas não foram (e não são) poucas. Este trabalho foi motivado principalmente pelo momento que estávamos vivendo, pela importância que o câncer de mama tomou na nossa vida a partir deste último ano. Fui encorajada diariamente neste processo todo por você, pela sua história e sua forma de viver. Agradeço também a minha irmã, Alana, que mesmo discordando de várias das minhas decisões, nunca tirou as mãos de perto de mim, sempre pronta pra me segurar caso eu caísse.

Sou muito grata também a toda minha família. Acredito que meu pai, Antonio, e minha avó, Anna, estiveram e estão comigo, me protegendo, onde quer que estejam. Agradeço a Maria Fernanda, a madrinha Pacífica, e a Anna Cristina por nunca saírem do meu lado nesse ano tão desafiador que vivi em 2024. Muito obrigada também a mãe Angela, a madrinha Regi e ao padrinho Adilson, que foram cruciais, seja dando colo, afago, ou me ajudando a aprender os exercícios de química analítica durante o curso.

Agradeço também aos meus amigos da graduação, Nadrienn, Rian, Beatriz, Lucas e Alice que tornaram este processo mais divertido.

A UEL, e principalmente o SAG, me trouxeram muitos amigos e inspirações. Agradeço à Tatiana, Eli, Maria Clara, Júlia, Luiza, Isabella e Lyvia. Agradeço também a equipe do LAMON, especialmente à minha orientadora, Juliana, e minha

coorientadora Beatriz, pela constante paciência e cuidado em cada processo deste trabalho.

Devo minha gratidão também aos amigos longevos que carrego comigo. Obrigada a Maria Eduarda, que me acompanhou de perto neste processo desde o ensino médio, e permanece até hoje, ambas formadas pela UEL, com muito orgulho. Agradeço às amigas que fiz na UENP, Bruna, que tornava meus dias puxados mais toleráveis e engraçados, e a Mariana, que me mostrou por meio da psicologia da educação, que de nada adianta conhecimento a um grupo seletivo de pessoas, e a importância de políticas públicas adequadas.

Tais políticas eu não poderia deixar de mencionar, pois tornaram possível minha permanência com um pouco mais de dignidade na graduação. Agradeço pelos 4 anos das bolsas de PIBIS oferecidas pela universidade que foram essenciais na minha formação.

SANTANA, M. Emanuely. **Análise da associação do polimorfismo rs2736100 no gene *TERT* em pacientes com câncer de mama expostas a agrotóxicos.** 2025. 63f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2025.

RESUMO

O câncer de mama (CaM) é o segundo em incidência global e a quarta causa de mortes por câncer no mundo. A telomerase é uma enzima crucial para a estabilidade da região telomérica e, polimorfismos no gene *TERT*, como o rs2736100, podem impactar diretamente na sua funcionalidade, no fenótipo celular e na carcinogênese. O presente trabalho avaliou a relação entre a exposição a agrotóxicos e os fatores prognósticos do CaM com a variante polimórfica rs2736100 (C>A), em pacientes expostas e não expostas a agrotóxicos. As amostras de sangue para extração de DNA foram obtidas de 204 mulheres com CaM no Hospital de Câncer de Francisco Beltrão e a genotipagem foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa. A frequência dos alelos em nossa população amostral foi de A= 0,52 e C=0,48. Cada parâmetro clinicopatológico das pacientes com CaM foi associado ao genótipo nos modelos dominante, recessivo e overdominante. No modelo recessivo (CC + AC vs AA), pacientes expostas a agrotóxicos homocigoto para o alelo mutado (AA) apresentaram maior risco para desenvolver CaM antes de entrarem na menopausa (OR= 2,484). Constata-se na literatura que o alelo mutado A diminui a atividade da telomerase, o que leva ao encurtamento dos telômeros. Portanto, mulheres AA teriam uma maior instabilidade telomérica e seriam predispostas a apresentarem telômeros menores e, em conjunto com a exposição a agrotóxicos, que acentua o encurtamento, estariam mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença ainda jovens.

Palavras-chave: SPN. telomerase. exposição ocupacional.

SANTANA, M. Emanuely. **Association analysis of the rs2736100 polymorphism in the *TERT* gene in breast cancer patients exposed to pesticides.** 2025. 63f. Final Course Work (Bachelor's Degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2025.

ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the second most common cancer worldwide and the fourth cause of cancer deaths worldwide. Telomerase is a crucial enzyme for the stability of the telomeric region, and polymorphisms in the *TERT* gene, such as rs2736100, can directly impact its functionality, cellular phenotype, and carcinogenesis. This study evaluated the relationship between exposure to pesticides and prognostic factors of BC with the polymorphic variant rs2736100 (C>A), in patients exposed and not exposed to pesticides. Blood samples for DNA extraction were obtained from 204 women with BC at the Francisco Beltrão Cancer Hospital, and genotyping was performed using the quantitative polymerase chain reaction technique. The allele frequencies in our sample population were A=0.52 and C=0.48. Each clinicopathological parameter of patients with CaM was associated with the genotype in the dominant, recessive and overdominant models. In the recessive model (CC + AC vs AA), patients exposed to pesticides who were homozygous for the mutated allele (AA) had a higher risk of developing CaM before entering menopause (OR = 2.484). The literature shows that the mutated allele A decreases telomerase activity, which leads to telomere shortening. Therefore, AA women would have greater telomeric instability and would be predisposed to have shorter telomeres and, together with exposure to pesticides, which accentuates shortening, would be more susceptible to developing the disease at a young age.

Keywords: SNP. telomerase. occupational exposure.

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Câncer de Mama: Epidemiologia e Fatores de Risco	15
2.2 Câncer de Mama: Desenvolvimento e classificação dos tumores	17
2.3 Exposição Ocupacional e Ambiental a Agrotóxicos e o Câncer de Mama	21
2.4 Telômeros e a telomerase	24
2.5 Variantes genéticas em TERT e o polimorfismo rs2736100	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Desenho do estudo	32
3.2 Coleta de Amostras e Obtenção de DNA a partir de buffy coat	33
3.3 Genotipagem das amostras pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)	34
3.4 Análise estatística	35
4. RESULTADOS	37
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICES	50

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CaM) é o segundo câncer em incidência global, com uma estimativa de 2,3 milhões de novos casos/ano e compreendendo 11,6% de todos os casos de câncer. Entre as mulheres, o CaM é o câncer mais comumente diagnosticado e é a quarta causa de mortes por câncer no mundo (Bray *et al.*, 2024a). O diagnóstico precoce do CaM está relacionado com melhor prognóstico da doença devido à sua patogênese complexa e multifatorial. Assim, os esforços para melhorar o diagnóstico e o prognóstico do CaM têm levado à busca de novos marcadores na tentativa de minimizar a agressividade do tratamento administrado e reduzir as taxas de mortalidade (Rodrigues *et al.*, 2013).

Os telômeros são estruturas nucleoproteicas essenciais para proteção dos terminais cromossômicos contra degradação, fusão e rearranjos (Zhou *et al.*, 2014). A transcriptase reversa da telomerase (TERT) é um dos componentes da telomerase, enzima que é essencial para a manutenção do comprimento do DNA dos telômeros, estabilidade cromossômica e imortalidade celular (Cong; Wen; Bacchetti, 1999). Na maioria dos tecidos somáticos humanos normais, a atividade da telomerase é indetectável, embora seja frequentemente detectável em quase todos os tipos de cânceres humanos, sugerindo a importância da telomerase nessa patologia (Dhaene; Van Marck; Parwaresch, 2000). Assim, a manutenção da atividade da telomerase é considerada um passo crucial durante a progressão do câncer, incluindo o de mama e, portanto, o tamanho dos telômeros pode estar associado a vários fatores prognósticos no CaM.

Os polimorfismos genéticos estão entre os fatores que podem alterar a atividade e expressão da telomerase. Polimorfismos de DNA são definidos como diferentes sequências de DNA entre indivíduos, grupos ou populações e incluem

uma gama de variações, desde alteração de um único par de bases, a muitos pares de bases e sequências repetidas. Sendo os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que, nos humanos, são as variantes mais comuns (Ismail; Essawi, 2012). O polimorfismo rs2736100 está localizado no íntron 2 do gene *TERT* localizado no braço curto do cromossomo 5 (5p15.33), e vários estudos mostraram sua associação com o risco de câncer (Choi, 2015; Kohno *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2022). Dessa forma, mostra-se de extrema relevância mais trabalhos acerca do assunto.

Os agrotóxicos também podem interferir no tamanho dos telômeros. Eles são amplamente empregados na agricultura e sua utilização aumentou nas últimas décadas para satisfazer uma procura crescente de alimentos, criando assim riscos para o ambiente e para a saúde humana (Shekhar *et al.*, 2024). De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, em 2022, o uso total de pesticidas na agricultura foi de 3,70 milhões de toneladas (Mt) de ingredientes ativos, um aumento de 4% em relação a 2021, 13% em uma década e o dobro desde 1990 (FAO, 2024).

A exposição ocupacional a agrotóxicos em locais de trabalhos agrícolas ocorre durante a preparação (mistura e carregamento) e aplicação (pulverização) dos agrotóxicos, sendo esta exposição muito superior à da população em geral. Os efeitos da exposição ocupacional a longo prazo a baixas doses de agrotóxicos são difíceis de diagnosticar, pois incluem resultados de saúde temporários e inespecíficos (García-García *et al.*, 2016). A literatura aponta que quanto maior a exposição a agrotóxicos, como os organoclorados, maior o risco, efeito na proliferação, desenvolvimento e promoção de células do CaM (Bradlow *et al.*, 1995a; Panis *et al.*, 2022, 2024).

O conhecimento existente sobre os efeitos tóxicos ao organismo ocasionados pela exposição a agrotóxicos e sua associação com o prognóstico do CaM é limitado. Portanto, estudos que busquem compreender e trazer novas perspectivas a respeito destes mecanismos envolvidos no câncer e desencadeados pela exposição a agrotóxicos são de grande importância. Além disso, observa-se a necessidade de explorar a relação entre exposição ocupacional a agrotóxicos, a presença de variantes polimórficas e fenótipos mais agressivos de CaM.

Nesse contexto, o objetivo geral deste trabalho foi verificar se há associação entre o pior prognóstico de mulheres com CaM ocupacionalmente expostas a agrotóxicos e a presença do polimorfismo rs2736100 do gene *TERT*. Concomitantemente, os objetivos específicos foram i) avaliar a frequência da variante polimórfica rs2736100 entre as pacientes com CaM expostas e não expostas a agrotóxicos; ii) associar os genótipos obtidos das pacientes com os parâmetros clínicos-patológicos e quimioresistência dos tumores de mama; e iii) analisar estatisticamente as associações entre a presença do polimorfismo rs2736100 com as variáveis clinicopatológicas das pacientes a fim de averiguar o seu potencial como biomarcador prognóstico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer de Mama: Epidemiologia e Fatores de Risco

O câncer de mama (CaM) é a segunda principal causa de incidência global de câncer em 2022, com uma estimativa de 2,3 milhões de novos casos, compreendendo 11,6% de todos os casos de câncer. É a quarta causa de morte por câncer no mundo (666.000, 6,9% de todas as mortes por câncer) e dentre as mulheres, o mais comumente diagnosticado, e o sexto em causa de mortes no mundo. Na França, Austrália e Nova Zelândia, América do Norte e Norte da Europa, as taxas de incidência são quatro vezes maiores do que no Centro-Sul da Ásia e na África Central (Bray *et al.*, 2024b).

A ocorrência de CaM está crescendo rapidamente em regiões com desenvolvimento econômico médio e baixo, principalmente na América do Sul, África e Ásia. Esse aumento de casos está ligado ao envelhecimento da população, mudanças nos padrões de comportamento e estilo de vida, além da ampla implementação do rastreamento mamográfico, recomendado no Brasil para mulheres entre 50 e 69 anos (Migowski *et al.*, 2018; Sung *et al.*, 2021a). No Brasil, o CaM é o mais incidente em todas as regiões brasileiras, depois dos tumores de pele não melanoma (INCA, 2023). A maior incidência estimada da doença é observada na região Sudeste, de 84,46 por 100 mil mulheres. As incidências diminuem nas regiões Sul, Centro-oeste, Nordeste e Norte, sendo de 71,44, 57,28, 52,20 e 24,99 casos novos por 100 mil mulheres, respectivamente.

As glândulas mamárias são estruturas exócrinas características de mamíferos que produzem e secretam leite. Essas glândulas se desenvolvem em estágios pré-natal e pós-natal, que envolvem proliferação e diferenciação específicas do local de uma variedade de tipos de células (fase linear). Dessa forma,

a coordenação de todos os processos exige decisões críticas de desenvolvimento e anormalidades podem levar a falhas na lactação e também ao câncer (Watson; Khaled, 2008). Ainda que alterações tenham sido encontradas para interromper esses mecanismos de falhas, os determinantes genéticos da identidade celular que especificam as respostas do tipo celular são amplamente desconhecidos (de Bessa Garcia *et al.*, 2020).

A carcinogênese mamária está associada a fatores hormonais/reprodutivos e à idade. No geral, o desenvolvimento da glândula mamária é regulado por uma rede complexa de hormônios sistêmicos e fatores de crescimento locais. Curiosamente, muitas das vias e processos que são desregulados no CaM estão relacionados àqueles que controlam o desenvolvimento e a remodelação normais da glândula mamária (Fu *et al.*, 2020).

Além do sexo, o envelhecimento é um dos fatores de risco mais importantes do CaM, porque sua incidência está altamente relacionada ao aumento da idade. O histórico familiar também está relacionado ao maior risco de desenvolvimento de CaM. Mulheres, cuja mãe ou irmã tem CaM, são mais propensas a desenvolver a doença. Este risco é 2,5 vezes maior em mulheres com dois ou mais parentes de primeiro grau com CaM. A suscetibilidade hereditária ao CaM é parcialmente atribuída às mutações de genes como *BRCA1* e *BRCA2* (Brewer *et al.*, 2017).

Menarca precoce, menopausa tardia, idade tardia na primeira gravidez e baixa paridade, são fatores reprodutivos que também podem aumentar o risco de CaM. De acordo com estudos de Washbrook *et al.* (2006), cada atraso de 1 ano na menopausa pode aumentar o risco de CaM em 3% e cada atraso de 1 ano na menarca ou cada nascimento adicional diminui o risco de CaM em 5% ou 10%,

respectivamente. Horn et al. (2017) e Dall e Britt (2017) apontam que, a idade tardia (≥ 35 anos) e precoce (< 20 anos) no primeiro parto também são considerados fatores de risco. Tais fatores reprodutivos estão fortemente associados ao status do receptor de estrogênio (Rosato *et al.*, 2014).

Tanto os estrogênios endógenos quanto os exógenos estão relacionados ao risco de CaM. As principais fontes de estrogênio exógeno são os anticoncepcionais orais e a terapia de reposição hormonal (TRH) que envolve a administração de estrogênio ou outros hormônios para mulheres na menopausa ou pós-menopausa. O Million Women Study no Reino Unido relatou um risco relativo 1,66 vezes maior de CaM entre usuárias atuais de TRH e aquelas que nunca a usaram (Beral *et al.*, 2007). No entanto, o risco de CaM demonstrou diminuir significativamente após dois anos de interrupção da TRH (Narod, 2011). A taxa de recorrência também é alta entre sobreviventes de CaM que fazem TRH (Fahlén *et al.*, 2013).

A literatura mostra também que o risco de CaM é maior entre as mulheres na pré-menopausa do que nas mulheres na pós-menopausa (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2012). Heer et al. (2020) mostraram que o índice de CaM pré-menopausa em países de baixa e média renda foi maior, sendo 55,2% do total de casos de CaM em países de baixo índice de desenvolvimento humano (IDH).

2.2 Câncer de Mama: Desenvolvimento e classificação dos tumores

Na tentativa de padronizar os subtipos de tumores do CaM, vários sistemas de classificação foram propostos, sendo o mais amplamente aceito a classificação de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) (Amat *et al.*, 2002).

A análise imuno-histoquímica de receptor de estrogênio (RE), progesterona (RP), Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER2) e índice de proliferação (Ki-67) é usada para identificar os subtipos i) luminal tipo A, ii) tipo B luminal HER2 negativo, iii) tipo B luminal HER2 positivo, iv) HER2 positivo não luminal e v) triplo negativo (Thuc Nguyen; Dinh Le; Nguyen, 2023).

Os tumores luminais são caracterizados por serem RE+, RP+ e expressar genes associados ao RE, como *GATA Binding Protein 3* (GATA3), *Forkhead Box A1* (FOXA1) e *X-box Binding Protein 1* (XBP1), bem como pela expressão de citoqueratinas luminais 8 e 18 (Perou *et al.*, 2000). Os subtipos luminais A e B são caracterizados por um perfil molecular de expressão gênica que se assemelha às células normais da camada luminal do ducto mamário, bem como por outros genes associados à ativação do RE (Tsang; Tse, 2020).

O subtipo *luminal A* é o mais comum; expressa RE/RP, não superexpressa HER2, possui baixa expressão de genes associados à proliferação, baixo Ki-67, e menor frequência de metástase. O subtipo *luminal tipo B HER2 negativo*, apresenta RE+, RP- ou baixo, não superexpressa HER2, e alto Ki-67. Já no *luminal B HER2 positivo*, há presença de RE, superexpressão ou amplificação de HER2, Ki-67 alto ou não e RP+. Dentre os tumores não luminais, um dos subtipos classificados é o *HER2 positivo não luminal*, que possui superexpressão de HER2 e ausência de RE e RP. O subtipo *triplo negativo* é menos frequente e representa tumores com ausência de RE e PR, e sem superexpressão de HER2 (Ilić *et al.*, 2024).

A presença de RE e RP é utilizada como marcador prognóstico e preditivo, sendo também biomarcador para terapia endócrina. Acredita-se que o estrogênio, por meio das suas associações com elementos reguladores de ciclina D

e MYC no genoma, possam levar ao crescimento de células cancerosas. Como o estrogênio exerce seus efeitos por meio dos RE, supõe-se que o nível destes possa estar relacionado com os efeitos benéficos da terapia antiestrogênica (Barzaman *et al.*, 2020).

Outro biomarcador preditivo obrigatório em todos os pacientes recém-diagnosticados é o marcador HER2. Este biomarcador é membro de uma família de quatro receptores de membrana tirosina quinase (TK) (Citri; Yarden, 2006). Os receptores HER possuem um domínio extracelular de ligação ao ligante, um domínio transmembrana e um domínio TK intracelular e ativam múltiplas vias de sinalização que regulam a proliferação, apoptose, invasão e metástase, angiogênese e diferenciação celular. A alta expressão de HER2 leva à metástase, invasão e proliferação de células cancerosas (Rimawi; Schiff; Osborne, 2015).

Estudos apontam duas causas para o início e progressão do CaM. A teoria das células-tronco sugere que todos os subtipos de tumores são derivados das mesmas células-tronco ou células progenitoras. Alterações genéticas e epigenéticas adquiridas pelas células progenitoras levam a diferentes fenótipos tumorais (López-Lázaro, 2015). Para a teoria estocástica cada subtipo de tumor é iniciado a partir de um único tipo de célula (tronco, progenitora ou diferenciada) que acumula mutações aleatórias levando à sua transformação em célula tumoral (Polyak, 2007). Embora ambas as teorias sejam apoiadas por muitos dados, nenhuma delas pode explicar completamente a origem do CaM.

Os fatores morfológicos que contribuem para a progressão do CaM incluem o tamanho e a extensão da malignidade histológica do tumor (grau), Ki67 e condição dos linfonodos axilares. Além disso, a avaliação da expressão de RE, RP e HER2 são de importância primordial (Dratwa *et al.*, 2022a). Com base na morfologia,

o CaM invasivo é atualmente subclassificado de acordo com o padrão de crescimento e o grau de diferenciação, refletindo o quão próximo um tumor se assemelha às unidades ductais-lobulares terminais normais da mama (Tan *et al.*, 2020).

O grau do tumor mamário, que é medido pelo sistema de classificação de Nottingham (NGS), refere-se à avaliação do grau de formação de túbulos ou glândulas, o pleomorfismo nuclear e a contagem mitótica (Rakha; Toss; Quinn, 2022). Este sistema se aplica a todos os subtipos histológicos de CaM. No entanto, tumores de grau semelhante não representam o resultado da mesma linha de diferenciação, por exemplo, carcinoma tubular e cribriforme invasivo são grau 1 por definição, enquanto carcinoma de mama invasivo (IBC) com características medulares e CaM tipo basal são tumores de alto grau. Portanto, tanto o grau histológico quanto o tipo de tumor têm significância prognóstica intrínseca que pode ser impulsionada pela combinação de ambos (Rakha *et al.*, 2008).

A quinta edição da Classificação de Tumores de Mama da Organização Mundial de Saúde (OMS) continua identificando vários tipos especiais de CaM, que juntos respondem por até 25% de todos os CaM invasivos. O conhecimento desses tipos especiais ajuda os patologistas a reconhecerem que um tumor é de origem primária da mama e pode fornecer informações clinicamente relevantes, como por exemplo a de que o carcinoma lobular invasivo tem menos probabilidade de responder à quimioterapia, o que é importante na seleção de pacientes para quimioterapia neoadjuvante (Rakha; Toss; Quinn, 2022).

2.3 Exposição Ocupacional e Ambiental a Agrotóxicos e o Câncer de Mama

Estudos do papel da exposição a baixas doses de poluentes ambientais na iniciação e progressão do câncer sugerem que esses produtos químicos podem promover o desenvolvimento de neoplasias e piorar o prognóstico (Koual *et al.*, 2020). Os agrotóxicos auxiliam o desenvolvimento agrícola porque podem reduzir perdas, melhorar o rendimento e a qualidade dos alimentos e produzir comida em larga escala e menor tempo (Bernardes *et al.*, 2015). Quando estes compostos são utilizados, seu comportamento no ambiente, como transferência e degradação, deve ser considerado. O uso e o manejo inadequados de agrotóxicos levam à poluição ambiental, incluindo poluição do solo, água, ar e contaminação de alimentos (Tudi *et al.*, 2021)

A exposição a agrotóxicos pode trazer prejuízos para a saúde a curto prazo, como envenenamento agudo, irritação da pele e dos olhos, dor de cabeça, tontura e náusea (El-Nahhal, 2017). Já o contato a longo prazo pode resultar em distúrbios do sistema reprodutivo (El-Nahhal; Lubbad; Al-Agha, 2020), cânceres (Safi *et al.*, 1993), asma, diabetes (Kim; Kabir; Jahan, 2017), entre outros. Entretanto, apesar da literatura apontar diversas intercorrências em detrimento do uso desenfreado de agrotóxicos, Li e Jennings (2017) mostraram que muitas nações não têm valores padrão de agrotóxicos para as principais vias de exposição, especialmente nações na África, Ásia e América do Sul.

Compostos químicos persistentes como os agrotóxicos tendem a ser lipofílicos e são detectados no leite materno e no tecido adiposo humano. Devido a sua ação como desregulador endócrino, os agrotóxicos podem causar CaM, alterando a atividade hormonal e modulando mecanismos epigenéticos (Bounias, 2003; Jaga; Dharmani, 2005; Weichenthal; Moase; Chan, 2010).

Estudos *in vitro* e experimentais exploram o papel dos agrotóxicos na carcinogênese mamária e ressaltam essencialmente a indução de danos ao DNA em associação com a desregulação hormonal e aumento de metabólitos que ativam oncogenes. No entanto, ainda pouco se sabe sobre como estes mecanismos se interligam, bem como a sua correlação com o prognóstico da doença e características clinicopatológicas do CaM como resultado da exposição a agrotóxicos (Alleva *et al.*, 2018; Bradlow *et al.*, 1995b).

A Organização para a Alimentação e a Agricultura (FAO) estima que a participação das mulheres na agricultura aumentou substancialmente, fenômeno denominado feminização da agricultura. Concomitantemente, altas taxas de incidência e mortalidade por CaM foram documentadas na China, nos Estados Unidos e no Brasil (Sung *et al.*, 2021b), três países que lideraram o ranking mundial de volume de comércio de agrotóxicos há vários anos (Panis *et al.*, 2022). A exposição de mulheres a grandes quantidades de agrotóxicos tende a aumentar, e diversos estudos comprovam a correlação entre a exposição a agrotóxicos e o desenvolvimento de CaM (Panis; Lemos, 2024).

O Paraná ocupa a terceira posição entre os estados que mais comercializam agrotóxicos no país (com 14%), ficando atrás somente do estado de Mato Grosso (20%) e de São Paulo (15%). Os municípios da região Sudoeste do estado, em sua maioria, possuem a economia atrelada ao setor agropecuário, conseqüentemente, seus moradores estão expostos constantemente a grandes quantidades de agrotóxicos. Nesta região, as trabalhadoras da zona rural com tumores de mama apresentam um perfil mais agressivo desta doença (Gaboardi; Candiotto; Ramos, 2019).

Os agrotóxicos são capazes de entrar no organismo durante as horas de trabalho por inalação, contato com a pele e absorção oral. Estes químicos inalados podem se acumular e aumentar sua proporção na cadeia alimentar devido a sua lenta capacidade de degradabilidade e lipofilicidade (Mekonen *et al.*, 2021).

As células contam com mecanismos controlados como a renovação e ativação de células imunocompetentes, dessa forma qualquer defeito em um desses parâmetros pode não levar a uma alteração imunológica de longo prazo. No entanto, os agrotóxicos podem afetar a resistência do hospedeiro interferindo nesses mecanismos (Mokarizadeh *et al.*, 2015). Na maioria dos casos, o metabolismo de agrotóxicos gera metabólitos tóxicos ou espécies reativas (ER) que podem induzir morte celular por meio de danos aos componentes da célula como lipídios, proteínas e ao próprio DNA. O estresse oxidativo induzido por agrotóxicos também pode perturbar a sinalização celular e a homeostase oxidativa por meio do esgotamento de reservatórios antioxidantes (Ranjbar; Pasalar; Abdollahi, 2002) e pode promover mutações (Tebourbi *et al.*, 2011).

Uma grande variedade de agrotóxicos demonstrou exercer sua citotoxicidade também por meio da interferência com a fosforilação oxidativa mitocondrial, diminuindo o consumo de oxigênio e o suprimento de energia celular (Abdollahi *et al.*, 2004). A exposição a agrotóxicos também pode induzir o retículo endoplasmático ao estresse. Como esta organela é especializada em síntese, dobramento, entrega de proteínas e também armazenamento de cálcio, qualquer distúrbio resulta no acúmulo de proteínas desdobradas ou mal dobradas na organela (Mostafalou; Abdollahi, 2013).

Em geral, perturbação ambiental durante o estágio crítico da maturação das células imunes inatas pode aumentar os riscos de distúrbios

inflamatórios crônicos, como câncer. Alguns agrotóxicos têm a capacidade de inibir a atividade enzimática, como por exemplo da esterase, levando a mudanças estruturais e funcionais nas populações de imunócitos. A modulação das vias de transdução de sinal como a principal consequência funcional da inibição da esterase pode inibir ou estimular a ativação, proliferação e subseqüentemente a função efetora das células imunes, como linfócitos e células T (Chambers; Oppenheimer, 2004; Galloway; Handy, 2003).

Uma vez que os controles genéticos regulam tanto o metabolismo de agrotóxicos para metabólitos imunotóxicos quanto sua remoção, indivíduos com certos polimorfismos genéticos podem ser mais ou menos suscetíveis aos efeitos de agrotóxicos ingeridos, inalados ou absorvidos (Aguilar-Garduño *et al.*, 2013).

2.4 Telômeros e a telomerase

Os telômeros são extensões de sequências de DNA repetidas em tandem (TTAGGG) associadas a complexo proteico chamado shelterina, na maioria dos casos, conservadas, que são responsáveis por formar as extremidades físicas dos cromossomos eucarióticos. As proteínas reconhecem especificamente DNA fita dupla e fita simples rica em guanina (Blackburn; Gall, 1978) como a fita mais longa que forma a extremidade 3' e se projeta em direção ao término do cromossomo (Meyne; Ratliff; Moyzis, 1989).

Os telômeros cobrem os terminais cromossômicos para distinguir as extremidades naturais das quebras de DNA fita dupla e evitar fusões cromossômicas. Eles servem como substratos para a telomerase, enzima responsável por adicionar as repetições de DNA às extremidades, mantendo assim o comprimento do cromossomo (Blackburn, 1990). A perda dos telômeros pode levar

à senescência ou apoptose e instabilidade do genoma, prejudicando a sobrevivência e a longevidade das células e resultando em danos no DNA. Eles são encurtados naturalmente durante o envelhecimento pela falta de atividade da telomerase (Cesare *et al.*, 2013); (Aubert; Lansdorp, 2008).

O problema de replicação final, proposto em 1972 (Watson, 1972), onde o DNA é duplicado semiconservativamente seguindo em apenas uma direção, da extremidade 5' para a extremidade 3'. As fitas geradas são montadas por meio da união de fragmentos de Okazaki que, posteriormente, serão conectados pela ligase. Depois que os fragmentos de Okazaki são sintetizados, a DNA polimerase I remove os primers de RNA e preenche as lacunas internas com DNA (Zhu *et al.*, 2019). No entanto, a DNA polimerase não pode formar o último segmento para substituir o primer ausente e uma pequena lacuna é deixada na fita complementar. O telômero, então, encurta a cada rodada de replicação de DNA (Edward M. De Robertis, 2014).

Quando os telômeros se tornam muito curtos, uma resposta celular é desencadeada, sinalizando às células para encerrarem o ciclo celular e senescerem. Esse processo indica que as células atingiram sua capacidade máxima de proliferação, conhecida como limite de Hayflick (Hayflick, 1965).

Nas células normais, quando os telômeros atingem um comprimento crítico, a perda da proteção destes leva à senescência replicativa e à apoptose celular (Baird, 2009). Se a apoptose não ocorrer e as células continuarem a se dividir, a instabilidade genômica resultante causa anormalidades cromossômicas. As células cancerosas que não possuem mecanismos normais de resposta a danos no DNA, continuam a se dividir por manterem a atividade regular da telomerase evitando a senescência (Valdes *et al.*, 2005). A maioria das células cancerosas têm alterações significativas na estrutura dos telômeros, e estudos mostram que

indivíduos com telômeros encurtados podem ter risco maior de câncer em comparação a indivíduos com telômeros mais longos (Wentzensen *et al.*, 2011).

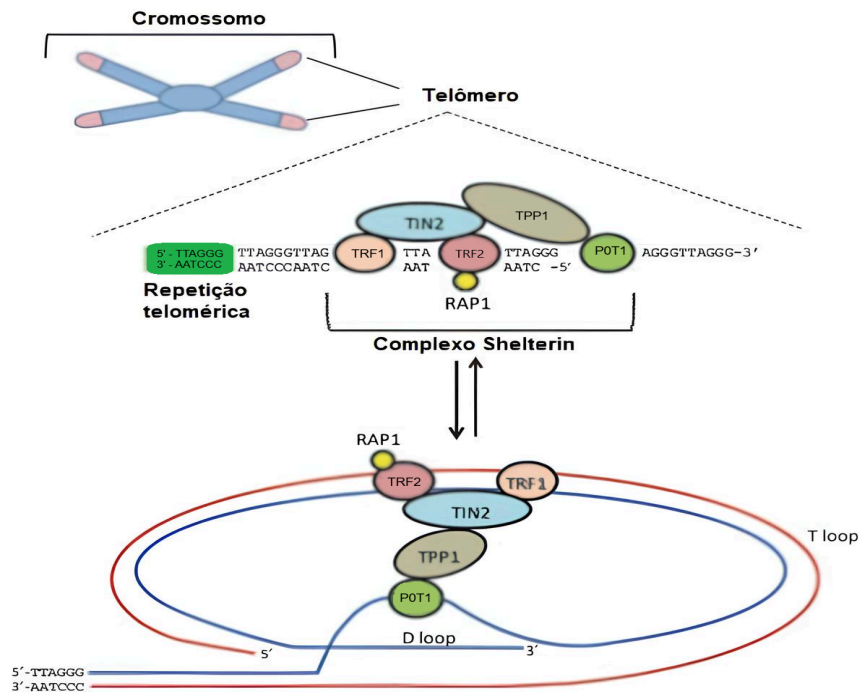
A perda da função telomérica leva à instabilidade genômica, por meio da imortalização celular e do acúmulo de alterações genéticas, que é o fator principal na iniciação e progressão de cânceres (Meeker *et al.*, 2004). Telômeros mais curtos em tecido mamário normal adjacente ao tumor podem estar associados a maiores taxas de recorrência local de CaM. Em tecido tumoral de mama, telômeros mais curtos parecem estar associados ao grau de tumor, mas não a origem hereditária do tumor (Ennour-Idrissi; Maunsell; Diorio, 2017; Wentzensen *et al.*, 2011).

A telomerase é uma polimerase dependente de RNA que sintetiza DNA telomérico (Nugent, 1998). Sua estrutura central consiste em um RNA estrutural que possui uma região complementar ao DNA telomérico e serve como molde para a adição *de novo* de desoxinucleotídeos à fita rica em guanina dos telômeros, e de uma proteína catalítica com atividade de transcriptase reversa (Nakamura *et al.*, 1997). Ela adiciona as sequências TTAGGG às extremidades 3' do DNA telomérico e promove a estabilidade genômica (Blackburn; Greider; Szostak, 2006). Estudos recentes mostram que a telomerase atua também em vários processos celulares, como estresse oxidativo, reparo de DNA e apoptose, os quais podem influenciar a saúde e a longevidade (Engin; Engin, 2024; Zhu *et al.*, 2024).

A transcriptase reversa da telomerase (TERT ou hTERT em humanos) é um componente proteico que atua como uma transcriptase reversa especializada e contém domínios catalíticos conservados. Com base em sua estrutura e função, o polipeptídeo TERT pode ser subdividido em três domínios principais: o domínio N-terminal essencial da telomerase, o domínio de ligação ao

RNA do TERT e o domínio da transcriptase reversa, que contém o sítio ativo para transcrição reversa (Lue, 2005).

Figura 1: Estrutura dos telômeros e o complexo Shelterina.



Os telômeros são regiões localizadas nas extremidades dos cromossomos compostas por repetições da sequência TTAGGG em vertebrados. O complexo Shelterina, formado pelas proteínas TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1 e RAP1, é responsável por proteger os telômeros e regular sua manutenção. A estrutura em laço (T-loop) e o laço de deslocamento (D-loop) são essenciais para a estabilidade e proteção contra a ativação de mecanismos de reparo de DNA. Fonte: Traduzido de Castro, Souza e Santos (2024).

O gene *hTERT* está localizado no braço curto (p) do cromossomo 5 na posição 15.33, e a expressão da proteína TERT funcional é um pré-requisito para a aquisição da atividade da telomerase (Zou *et al.*, 2012). Esta subunidade tem

papel essencial para a construção da enzima, sendo capaz de restaurar a atividade da telomerase em várias linhagens celulares (Bodnar *et al.*, 1998; Counter *et al.*, 1992; Vaziri; Benchimol, 1998; Weinrich *et al.*, 1997).

A atividade de hTERT *in vivo* é de extrema relevância para o prognóstico do câncer, pois a alta atividade da telomerase foi correlacionada com um prognóstico ruim para vários tipos de cânceres, incluindo neuroblastoma (Hiyama *et al.*, 1995), leucemia mieloide aguda (Xu *et al.*, 1998), mama (Clark *et al.*, 1997) e câncer gastrointestinal (Okusa *et al.*, 1998), por conta da imortalidade celular encontrada em células carcinogênicas com expressão alterada da enzima. Tendo em vista a possibilidade do gene *hTERT* estar relacionado à progressão precoce e à gravidade do câncer, os inibidores da subunidade hTERT estão atualmente sendo investigados quanto ao seu potencial terapêutico (Wang *et al.*, 2025).

A literatura demonstra que há influência do uso de agrotóxicos nos telômeros e o seu comprimento se tornou um biomarcador prospectivo de exposição ocupacional (Ziegler *et al.*, 2017). Ko e colaboradores (2017) mostraram que trabalhadores da indústria de equipamentos de ginástica tinham telômeros mais curtos do que os trabalhadores de escritório do mesmo setor. Kahl et al. (2018) observaram também que, além do comprimento significativamente menor do telômero em produtores de tabaco expostos ocupacionalmente a agrotóxicos, houve hipometilação global do DNA.

Esse processo de encurtamento pode ocorrer por um bloqueio feito pelos agrotóxicos a proteína AKT1, diminuindo a atividade do sistema ubiquitina-proteassoma, o que aumenta os níveis de TRF1 e TERT. O TRF1 é um componente importante do complexo shelterina da enzima telomerase. Assim,

enquanto TERT é responsável por promover a atividade da telomerase, o complexo shelterina se torna menor, bloqueando a atividade da enzima (Kahl; da Silva; da Silva, 2016).

2.5 Variantes genéticas em *TERT* e o polimorfismo rs2736100

Os polimorfismos são definidos como mutações genéticas que ocorrem em ao menos 1% da população e em pelo menos 2 alelos (Al-Koofee *et al.*, 2019) e incluem diferentes variações genéticas como a alteração de um único par de bases ou polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (Teama, 2018). Os SNPs ocorrem mais frequentemente do que outros tipos de polimorfismos e podem influenciar na expressão gênica e na estabilidade do RNA. Portanto, eles podem ser responsáveis pela suscetibilidade de um indivíduo a muitas doenças comuns, ao metabolismo de medicamentos e à evolução do genoma (Shastry, 2009).

O polimorfismo rs2736100 (C>A) é uma das variantes mais comuns do gene *hTERT*, localizada no segundo íntron (Kinnersley *et al.*, 2012). O alelo C (referência) do rs2736100 tem influência na resposta celular aos agentes antimitóticos (Kim *et al.*, 2013) enquanto o alelo A (mutado) já foi associado ao comprimento encurtado do telômero e à expressão reduzida do mRNA *hTERT* no câncer intestinal (Choi, 2015).

O rs2736100 pode contribuir diretamente para a suscetibilidade a alguns tipos de tumores ao modificar a função da TERT ou estando em desequilíbrio de ligação com outras mutações causadoras de doenças (Zhang *et al.*, 2022). A relação deste polimorfismo com o CaM ainda é controversa, tendo poucos trabalhos na literatura associando-os. De Souza Rodrigues e colaboradores (2017) mostraram que há associação entre a presença do alelo mutado e o aumento no risco de CaM

para mulheres na pós-menopausa. Aydin et al. (2018), não encontraram relação entre o CaM e esse polimorfismo na população da turca. No entanto, diversos estudos na literatura já apresentaram resultados que apontam a ligação entre rs2736100 e suscetibilidade a cânceres, como de pulmão (Wu *et al.*, 2023), câncer gástrico (Bayram *et al.*, 2016) e gliomas (Zhou *et al.*, 2014).

A respeito da associação entre o polimorfismo rs2736100 com a exposição a agrotóxicos, também pouco é encontrado na literatura. Kahl et al. (2018) investigaram aspectos da exposição ocupacional a agrotóxicos em plantações de tabaco, mostrando que trabalhadores com exposição apresentaram maior instabilidade genômica e epigenética. Eles mostraram que agricultores que apresentavam o genótipo GG (homozigoto referência) do rs2736100 tiveram níveis de manganês quase 1,5 vezes maiores quando comparados aos agricultores com o genótipo GT/TT, no entanto, o genótipo não influenciou diretamente o comprimento do telômero. Cheng et al. (2021) apontaram que o comprimento do telômero em trabalhadores expostos a Ometoato com genótipo TT (homozigoto mutado) do polimorfismo *TERT* rs2736100 foi menor do que nos indivíduos com genótipo GT.

Mo et al. (2009) associaram o uso de agrotóxicos organoclorados e organofosforados com a expressão de *TERT*. Células MCF-7 tratadas com endosulfan aumentaram a expressão de mRNA de *TERT*. Considerando a literatura prévia sobre o CaM, exposição a agrotóxicos e telômeros, é possível perceber que esse ainda é um campo de estudo pouco explorado. As mulheres avaliadas no presente estudo representam um grupo importante para avaliação do papel da exposição ocupacional e o da instabilidade telomérica no prognóstico do CaM pois estas pacientes são diretamente expostas a agrotóxicos no dia a dia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

O presente trabalho encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CAAE 35524814.4.0000.0107) (Anexo A). Neste estudo foram incluídas amostras de DNA de mulheres (N=204) atendidas no Hospital de Câncer de Francisco Beltrão (Ceonc), coletadas entre maio de 2017 e maio de 2024. Participaram do projeto mulheres encaminhadas para investigação de lesões suspeitas de neoplasia mamária atendidas no Ceonc no período determinado acima e que aceitaram participar do estudo. Foram excluídas mulheres menores de 18 anos, que receberam diagnóstico de outros tumores que não o de mama e aquelas que não aceitaram participar do estudo.

Após confirmação do diagnóstico, elas foram categorizadas como portadoras de doenças benignas da mama ou carcinoma ductal infiltrante de mama. Todas as mulheres assinaram termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo B).

Para caracterização clínico-patológica dos grupos foram considerados os seguintes parâmetros: idade ao diagnóstico da doença, peso, altura, classificação internacional de tumores de mama TNM para estadiamento, status hormonal dos tumores, tipo de regime quimioterápico instituído, categorização de risco das pacientes, status linfonodal e presença ou não de menopausa. Os tumores foram subtipados pelos patologistas do Ceonc por meio de marcação imunohistoquímica para ER, PR, índice de proliferação ki67 e HER2. Com base nesta imunomarcação, os tumores foram categorizados segundo o último Consenso de Saint Gallen (Balic *et al.*, 2023) em tumores Luminal A (ER e/ou PR positivos), Luminal B (ER e/ou PR positivos, e/ou HER2 positivos, e/ou ki 67 >14%), HER2

amplificados (ER e PR negativos, HER2 positivos) ou triplo negativos (todas marcações negativas, independentemente dos valores de ki67).

As pacientes foram caracterizadas em expostas (Exp) ou não-expostas (NExp) ocupacionalmente por meios de instrumento padronizado e validado para este fim de acordo com Panis et al. (2022). Nesta caracterização, foram consideradas informações como a realização de trabalho semanal na agricultura, em contato direto com agrotóxicos no seu preparo, diluição, pulverização, descontaminação de EPIs e lavagem de roupas usadas na pulverização. As 119 mulheres que responderam positivamente a estes itens e foram categorizadas como ocupacionalmente expostas aos agrotóxicos (119 mulheres). O grupo não exposto foi composto por 89 mulheres que responderam negativamente a todas estas questões.

Tabela 1: Parâmetros clínico-patológicos e caracterização prognóstica das pacientes expostas e não expostas a agrotóxicos.

Parâmetro	Não Expostas (%)	Expostas (%)
Receptor de estrogênio (ER)		
Negativo	25,9	31,5
Positivo	74,1	68,5
Total	100	100,0
Receptor de progesterona (PR)		
Negativo	50,0	55,8
Positivo	50,0	44,2
Total	100	100

Índice de proliferação (Ki-67)

<14	37,6	39,9
≥14	62,4	59,5
Total	100	100

Subtipo molecular

Luminal A	36,7	29,8
Luminal B	34,9	33,5
HER-2	14,7	16,8
Triplo Negativo	13,8	19,9
Total	100	100

Tamanho do tumor (cm)

<2	47,6	38,4
≥2	52,4	61,0
Total	100	100

Grau histológico

1 e 2	78,3	78,1
3	20,8	21,9
Total	100	100

Invasão linfonodal

Não	61,3	59,4
Sim	38,7	40,6
Total	100	100

Idade no diagnóstico

≥50	66,7	62,6
<50	33,3	37,4
Total	100	100

Menopausa no diagnóstico

Sim	70,3	67,5
Não	29,7	32,5
Total	100	100

Índice de Massa Corporal (IMC)

Normal	32,9	28,5
Excesso	67,1	67,1
Total	100	100

Sem quimiorresistência	73,3	65,7
Com quimioresistência	17,2	20,0
Total	100	100

Sem recorrência	88,9	89,6
Com recorrência	11,1	10,4
Total	100	100

Histopatológico

Outros	27,6	24,6
CDI	72,4	75,4
Total	100	100

HER-2

Negativo	86,8	86,2
Positivo	13,2	13,8
Total	100	100

Agressividade do subtipo

Luminal A	37,5	37,5
Outros	62,5	62,5
Total	100	100

Êmbolos angiolinfáticos

Não	77,0	75,7
Sim	23,0	24,3
Total	100	100

Histórico de câncer na família

Não	50,0	40,2
Sim	50,0	59,8
Total	100	100

Estratificação de risco

Baixo	7,1	10,5
Intermediário	63,3	46,7
Alto	29,6	42,8
Total	100	100

Linfonodos (invasão/positividade)

Não	71,4	66,2
Sim	28,6	33,8
Total	100	100

3.2 Coleta de Amostras e Obtenção de DNA a partir de buffy coat

As amostras das pacientes com CaM foram adquiridas pela coleta do sangue periférico (10 mL) em tubo EDTA, no Hospital de Francisco Beltrão. Após a centrifugação à 4000 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos, o plasma e o buffy coat foram obtidos, em seguida armazenados à -20°C até a extração do DNA que foi realizada utilizando kit comercial (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, CAT: K182002). As amostras foram quantificadas posteriormente em Nanodrop e diluídas para a concentração de 1,1 ng/uL.

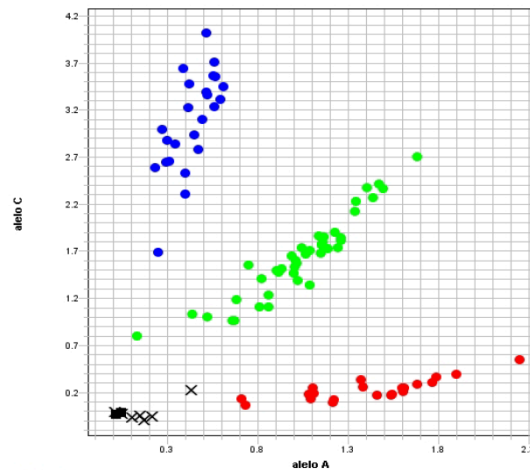
3.3 Genotipagem das amostras pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

A técnica utilizada para genotipagem foi a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) com sondas TaqMan® (Applied Biosystems) utilizando o reagente Genotyping Master Mix (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA). Resumidamente, uma mistura de reação de 10 µL consistiu em 4,5 µl de Master Mix, 0,8 µL de Buffer (Tris-EDTA), 0,2 µL de sonda TaqMan (40X) específica para a variante no gene *TERT*, SNP rs2736100 e 5.5 ng de DNA genômico, seguindo as recomendações do fabricante.

A amplificação foi realizada pelo sistema StepOnePlus (Applied Biosystems) durante 50 ciclos. Após a reação de amplificação, foi gerado o gráfico de discriminação alélica (Figura 2) e os genótipos analisados e planilhados. O SNP

rs2736100 do gene *TERT* foi validado em bases de dados públicas (Database of Single Nucleotide Polymorphisms/NCBI, 2021) e, de acordo com o 1000Genomes Global Study-wide, a frequência global de alelos do alelo referência é C=0,3817 e do alelo mutado é A= 0,6183, para população latino-americana 2.

Figura 2: Gráfico de discriminação alélica obtido após amplificação do DNA genômico por qPCR utilizando sonda para o rs2736100.



Legenda: Os símbolos da cor vermelha, verde e azul, representam os indivíduos AA, AC e CC, respectivamente. Os “x” em preto se referem a dois controles de reação e amostras não amplificadas que foram repetidas ou descartadas.

3.4 Análise estatística

Os desvios das frequências genótípicas do polimorfismo *TERT* daquelas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo estudado foram analisados pelo teste do χ^2 . Para estimativa de risco ou proteção específico do genótipo foi utilizada razão de chances (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95% e $p < 0,05$. Foram considerados OR significativos aqueles cujo IC não incluíam valor 1. Para as análises dos genótipos referentes ao polimorfismo rs2736100 foram avaliados quatro modelos genéticos: genotípico (CC, CA e AA), dominante (AA + CA vs. CC), recessivo (CC + CA vs. AA) e um modelo overdominante (CA vs. CC + AA).

As análises estatísticas utilizadas foram i) regressão logística multinomial para verificar o impacto do polimorfismo sobre as variáveis clinicopatológicas e ii) regressão logística multinomial com interação para examinar o impacto do polimorfismo associado a exposição a agrotóxicos e os fatores clinicopatológicos das pacientes. Os resultados foram analisados utilizando o programa IBM SPSS Statistics 26.

4. RESULTADOS

Na Tabela 2 estão presentes as frequências genótípicas do polimorfismo *TERT* rs2736100 em cada grupo amostral, dividido em pacientes NExp e Exp nos quatro modelos. A frequência dos alelos em nossa população amostral foi A= 0,52 e C=0,48, frequências aproximadas às encontradas para a população latina americana 2 (LA2, A=0,61 e G=0,38), que corresponde a população da América do Sul, apresentadas no site Database of Single Nucleotide Polymorphisms (NCBI, 2025). As frequências genótípicas da população estudada estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg para o polimorfismo *TERT* (rs2736100) ($\chi^2=5,600064$).

Tabela 2: Frequência do rs2736100 no gene *TERT* nos modelos genotípico, dominante, recessivo e overdominante nas mulheres não expostas (NExp) e expostas (Exp) a agrotóxicos.

<i>TERT</i> rs2736100	Genótipo	Nexp (N%)	Exp (N%)
Modelo Genotípico	AA	27 (31,8)	36 (30,3)
	AC	31 (36,5)	54 (45,4)
	CC	27 (31,8)	29 (24,4)
Modelo Dominante	AA+AC	58 (68,2)	90 (75,6)
	CC	27(31,8)	29 (24,4)
Modelo Recessivo	CC+AC	27 (31,8)	36 (30,3)
	AA	58 (68,2)	83 (69,7)
Modelo Overdominante	CC+AA	31(36,5)	54 (45,4)
	AC	54 (63,5)	65 (54,6)

Legenda: *TERT*: Telomerase Reverse Transcriptase; Nexp: não expostas; Exp: expostas.

Cada parâmetro clinicopatológico das pacientes com CaM foi associado ao genótipo nos modelos dominante, recessivo e overdominante. Obtivemos um resultado estatístico significativo no modelo recessivo (CC + AC vs AA), onde foi observado que pacientes expostas a agrotóxicos na presença do alelo mutado em homozigose (AA) apresentaram risco para desenvolver tumores de mama antes de entrarem na menopausa ($p=0,033$ / OR= 2,484/ IC=1,076-5,733). Em relação aos demais parâmetros não foram obtidos resultados estatísticos significativos (dados apresentados na Tabela Suplementar, Anexo C).

As frequências genóticas do rs2736100 do modelo genotípico (AA, AC e CC) para cada parâmetro do perfil clinicopatológico das pacientes incluídas no estudo estão apresentadas no Anexo C. Com está análise pretendia-se verificar uma possível associação entre cada genótipo com as variáveis recorrência, histopatológicas, grau histológico, receptores de estrógeno, receptores de progesterona, Ki-67, subtipo molecular, tamanho do tumor, grau histológico, agressividade, presença de êmbolos angiolinfáticos, invasão linfonodal, idade ao diagnóstico, menopausa ao diagnóstico e índice de massa corpóreo (IMC). Contudo, em nossas análises, não foram observados resultados estatísticos significativos.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que os agrotóxicos podem estar atuando na instabilidade telomérica, pois quando comparamos as mulheres expostas e não expostas a agrotóxicos, as primeiras apresentaram maior probabilidade de desenvolver câncer ainda jovens, antes da menopausa, quando portadoras do alelo mutado em homozigose (AA).

Agrotóxicos tendem a ser lipofílicos e são acumulados no tecido adiposo humano. Por conta de sua ação como desregulador endócrino, a exposição a agrotóxicos pode causar CaM alterando a atividade hormonal. A presença do metabólito do glifosato ácido aminometilfosfônico (AMPA) em amostras de urina de mulheres recém diagnosticadas com CaM, foi associada ao aumento da suscetibilidade para esse câncer (Ibarluzea *et al.*, 2004). Os mecanismos carcinogênicos associados aos agrotóxicos incluem alterações na metilação do DNA (Duforestel *et al.*, 2019), alterações na via do estrogênio (Thongprakaisang *et al.*, 2013), entre outras, que podem ocorrer em concentrações ambientalmente relevantes. Outros trabalhos mostraram ainda o papel dos agrotóxicos no encurtamento dos telômeros (Jiang *et al.*, 2024; Mu *et al.*, 2024; Shin *et al.*, 2010).

A relação entre os alelos do polimorfismo rs2736100 e a instabilidade telomérica, vem sendo alvo de estudos. SNPs em íntrons, como o rs2736100, são algumas vezes ligados a SNPs de genes próximos, afetando o splicing de mRNA e a ligação de RNAs não codificadores longos (lncRNA), podendo resultar em variações na sequência e função das proteínas maduras. Neste caso, SNPs intrônicos podem influenciar a suscetibilidade genética e o prognóstico do câncer por modular mecanismos genéticos e epigenéticos (Deng *et al.*, 2017).

Duan et al. (2019) mostraram que o comprimento dos telômeros de trabalhadores expostos a COEs (gases emitidos de fornos de coque) foi significativamente maior nos portadores de pelo menos um alelo referência no *locus TERT* rs2736100. Estes dados sugerem que o alelo G (mutado) deste *locus* pode ser um fator de proteção ao encurtamento acelerado dos telômeros. Resultados semelhantes também foram apontados por Rampazzo, et al. (2020) em que o genótipo CC (referência) do polimorfismo citado anteriormente, mostrou-se associado a telômeros mais longos, relacionado assim, ao aumento da transcrição da subunidade TERT.

A diminuição dos telômeros associada ao alelo mutado demonstrada nesses estudos se alinha aos dados obtidos no presente trabalho, pois a presença do alelo A mutado em homozigose, pode estar associada com o menor comprimento telomérico em pacientes jovens, apresentando assim, maior risco de desenvolver a doença precocemente.

Mulheres antes da menopausa, tradicionalmente não são consideradas grupo de risco, no entanto, nossos dados podem representar uma sobreposição dos efeitos do polimorfismo e da exposição ocupacional. A detecção precoce do CaM é mais difícil em mulheres na pré-menopausa devido à densidade mamária, assim os cânceres geralmente são identificados em estágios mais avançados (Heer *et al.*, 2020). Além disso, os tumores que acometem pacientes mais jovens, antes dos 40 anos, geralmente apresentam curso mais agressivo, prognóstico menos favorável e piores taxas de sobrevivência em comparação com pacientes mais velhas (Anders *et al.*, 2011).

Alguns estudos associaram a exposição a bifenilos policlorados (PCBs) que são encontrados também em agrotóxicos com tumores mais agressivos

de mama (Demers *et al.*, 2000). No entanto, no presente trabalho não foram encontrados valores significativos entre a agressividade do tumor e a exposição ocupacional a agrotóxicos das pacientes.

Apesar do presente estudo não avaliar a associação direta entre o tamanho dos telômeros e as pacientes com CaM, a literatura aponta que o encurtamento dos telômeros pode contribuir para a seleção de células capazes de crescer na ausência de receptores hormonais (Ceja-Rangel *et al.*, 2016). Heaphy e colaboradores (2011) mostraram que o encurtamento dos telômeros está associado a outros fatores prognósticos estabelecidos para CaM, observando em mulheres com telômeros mais curtos uma proporção aumentada de tumores negativos para ER e PR, maior resistência a quimioterápicos e piores prognósticos. Além disso, mulheres com telômeros mais curtos também apresentaram uma proporção aumentada de tumores *TP53* positivos, marcador molecular associado ao pior prognóstico do CaM (Tsuda, 2009). Estes dados mostram que tumores menos agressivos podem ser caracterizados por telômeros de comprimento normal e nenhuma mutação no gene *TP53*, já telômeros curtos e disfuncionais podem exercer uma forte pressão seletiva para a inativação da via p53 e resultarem em tumores de pior prognóstico (Dratwa *et al.*, 2022b).

A exposição a agrotóxicos influencia o tamanho dos telômeros, como observado por Kahl *et al.* (2018) que, além do comprimento significativamente menor do telômero em produtores de tabaco expostos ocupacionalmente a agrotóxicos, observaram hipometilação global do DNA. Esse processo de encurtamento pode ocorrer tanto pela desregulação do complexo shelterina quanto da enzima telomerase (Kahl; da Silva; da Silva, 2016).

O genótipo homozigoto AA para o polimorfismo rs2736100 foi mais

frequente entre as pacientes com CaM expostas ocupacionalmente a agrotóxicos que não estavam na menopausa. A relação do polimorfismo rs2736100 com o CaM ainda é pouco explorada, entretanto, este SNP foi associado com possível fator de risco para o desenvolvimento de CaM em mulheres na pós-menopausa (de Souza Rodrigues *et al.*, 2017). Mulheres antes da menopausa não são consideradas grupo de risco, no entanto, nossos resultados mostram, pela primeira vez, que, na presença do genótipo AA para o polimorfismo rs2736100, e de exposição a agrotóxicos, essas mulheres se tornam suscetíveis para o desenvolvimento do CaM.

6. CONCLUSÕES

Constata-se na literatura que o alelo mutado A está relacionado com a diminuição da atividade enzimática de TERT, o que leva ao encurtamento dos telômeros. Nossos resultados sugerem que, na presença do alelo mutado em homozigose, as pacientes seriam predispostas a apresentarem telômeros menores e a exposição a agrotóxicos acentuaria ainda mais o seu encurtamento, favorecendo o desenvolvimento da doença em mulheres jovens (Figura 3). Estudos em andamento pelo mesmo grupo de pesquisa avaliam a relação entre a presença/ausência do polimorfismo e o tamanho telomérico, o que ajudará no embasamento molecular dos resultados obtidos no presente estudo.

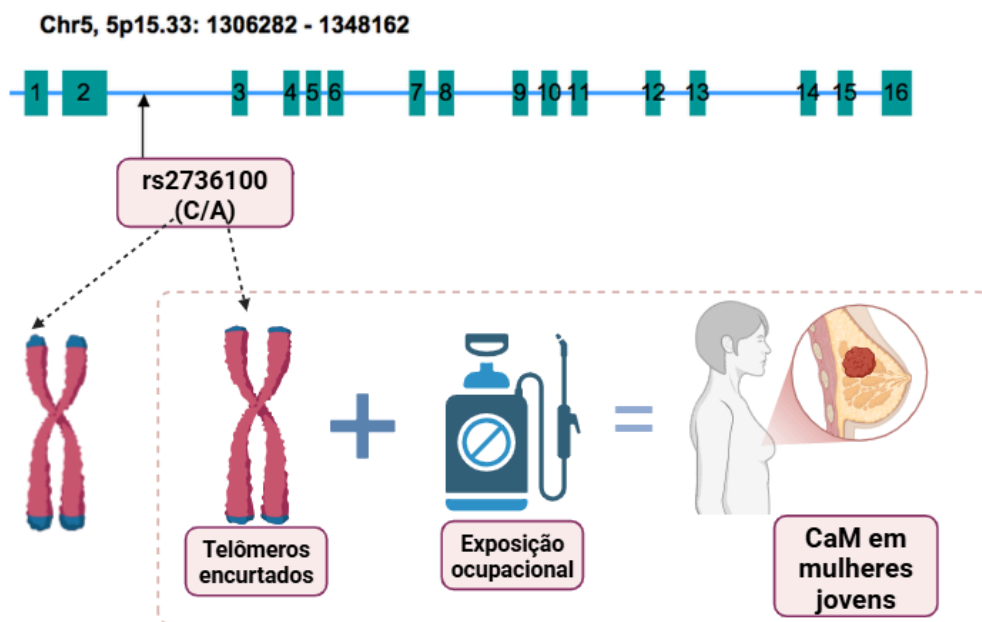


Figura 3: Resumo gráfico dos principais resultados obtidos no presente estudo.

Fonte: Autoria própria.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, Mohammad *et al.* Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. RA141-147, 2004.
- AGUILAR-GARDUÑO, C. *et al.* Changes in male hormone profile after occupational organophosphate exposure. A longitudinal study. **Toxicology**, [s. l.], v. 307, p. 55–65, 2013.
- AL-KOOFEE, Dhafer A. F. *et al.* Genetic Polymorphisms. *In*: [S. l.]: IntechOpen, 2019. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/68164>. Acesso em: 6 jan. 2025.
- ALLEVA, Renata *et al.* Mechanism underlying the effect of long-term exposure to low dose of pesticides on DNA integrity. **Environmental Toxicology**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 476–487, 2018.
- AMAT, Sophie *et al.* Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 791–796, 2002.
- ANDERS, Carey K. *et al.* Breast Carcinomas Arising at a Young Age: Unique Biology or a Surrogate for Aggressive Intrinsic Subtypes?. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. e18–e20, 2011.
- AUBERT, Geraldine; LANSDORP, Peter M. Telomeres and aging. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 88, n. 2, p. 557–579, 2008.
- AYDIN, Muhsin *et al.* Genetic polymorphisms in human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene polymorphisms do not associated with breast cancer in patients in a turkish population: hospital-based case-control study. **Cellular and Molecular Biology**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 108–115, 2018.
- BAIRD, D.M. Mechanisms of telomeric instability. **Cytogenetic and Genome Research**, [s. l.], v. 122, n. 3–4, p. 308–314, 2009.
- BALIC, Marija *et al.* St. Gallen/Vienna 2023: Optimization of Treatment for Patients with Primary Breast Cancer – A Brief Summary of the Consensus Discussion. **Breast Care**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 213–222, 2023.
- BARZAMAN, Khadijeh *et al.* Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 84, p. 106535, 2020.
- BAYRAM, Süleyman *et al.* Polymorphisms in human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene and susceptibility to gastric cancer in a Turkish population: Hospital-based case-control study. **Gene**, [s. l.], v. 585, n. 1, p. 84–92, 2016.
- BERAL, Valerie *et al.* Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million

Women Study. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 369, n. 9574, p. 1703–1710, 2007.

BERNARDES, Mariana Furio Franco *et al.* Impact of Pesticides on Environmental and Human Health. *In: TOXICOLOGY STUDIES - CELLS, DRUGS AND ENVIRONMENT*. [S. l.]: IntechOpen, 2015. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/48406>. Acesso em: 14 jan. 2025.

BLACKBURN, E. H. Telomeres and their synthesis. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 249, n. 4968, p. 489–490, 1990.

BLACKBURN, Elizabeth H.; GALL, Joseph G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 120, n. 1, p. 33–53, 1978.

BLACKBURN, Elizabeth H.; GREIDER, Carol W.; SZOSTAK, Jack W. Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging. **Nature medicine**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 1133–1138, 2006.

BODNAR, A. G. *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 279, n. 5349, p. 349–352, 1998.

BOUNIAS, M. Etiological factors and mechanism involved in relationships between pesticide exposure and cancer. **Journal of Environmental Biology**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 1–8, 2003.

BRADLOW, H. L. *et al.* Effects of pesticides on the ratio of 16 alpha/2-hydroxyestrone: a biologic marker of breast cancer risk. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v. 103 Suppl 7, n. Suppl 7, p. 147–150, 1995a.

BRADLOW, H. L. *et al.* Effects of pesticides on the ratio of 16 alpha/2-hydroxyestrone: a biologic marker of breast cancer risk. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v. 103 Suppl 7, n. Suppl 7, p. 147–150, 1995b.

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024a.

BRAY, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024b.

BREWER, Hannah R. *et al.* Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 165, n. 1, p. 193–200, 2017.

CÂNCER, Instituto Nacional de. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Nacional De Câncer, 2023.

CASTRO, Camila Teixeira Botelho; SOUZA, Giovanna Andrade Rocha de; SANTOS, Phillippe Braga. Telomerase no processo de rejuvenescimento: a ação da enzima

telomerase. **REVISTA DELOS**, [s. l.], v. 17, n. 61, p. e2652–e2652, 2024.

CEJA-RANGEL, Hugo A. *et al.* Shorter telomeres and high telomerase activity correlate with a highly aggressive phenotype in breast cancer cell lines. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 37, n. 9, p. 11917–11926, 2016.

CESARE, Anthony J. *et al.* The Telomere Deprotection Response Is Functionally Distinct from the Genomic DNA Damage Response. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 141–155, 2013.

CHAMBERS, Janice; OPPENHEIMER, Seth F. Organophosphates, serine esterase inhibition, and modeling of organophosphate toxicity. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 185–187, 2004.

CHENG, Shuai *et al.* Relationship between TERT Polymorphism and Telomere Length in Workers Exposed to Omethoate. **Biomedical and environmental sciences: BES**, [s. l.], v. 34, n. 10, p. 838–841, 2021.

CHOI, Byung Joon. Influence of the *hTERT* rs2736100 polymorphism on telomere length in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 21, n. 31, p. 9328, 2015.

CITRI, Ami; YARDEN, Yosef. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 505–516, 2006.

CLARK, G. M. *et al.* Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, [s. l.], v. 89, n. 24, p. 1874–1881, 1997.

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**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 1141–1151, 2012.

CONG, Y. S.; WEN, J.; BACCHETTI, S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 137–142, 1999.

COUNTER, C. M. *et al.* Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. **The EMBO journal**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1921–1929, 1992.

DALL, Genevieve Victoria; BRITT, Kara Louise. Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 7, p. 110, 2017.

DE BESSA GARCIA, Simone Aparecida *et al.* HOX genes function in Breast Cancer development. **Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer**, [s. l.], v. 1873, n. 2, p. 188358, 2020.

DE SOUZA RODRIGUES, Katherine *et al.* Clinical relevance of telomerase polymorphism for breast cancer: A systematic review. **Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 1494–1499, 2017.

DEMERS, A. *et al.* Risk and aggressiveness of breast cancer in relation to plasma organochlorine concentrations. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 161–166, 2000.

DENG, Na *et al.* Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 66, p. 110635–110649, 2017.

DHAENE, K.; VAN MARCK, E.; PARWARESCH, R. Telomeres, telomerase and cancer: an up-date. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, [s. l.], v. 437, n. 1, p. 1–16, 2000.

DRATWA, Marta *et al.* Relationship between Telomere Length, TERT Genetic Variability and TERT, TP53, SP1, MYC Gene Co-Expression in the Clinicopathological Profile of Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 5164, 2022a.

DRATWA, Marta *et al.* Relationship between Telomere Length, TERT Genetic Variability and TERT, TP53, SP1, MYC Gene Co-Expression in the Clinicopathological Profile of Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 5164, 2022b.

DUAN, Xiaoran *et al.* Genetic polymorphisms, mRNA expression levels of telomere-binding proteins, and associates with telomere damage in PAHs–Exposure workers. **Chemosphere**, [s. l.], v. 231, p. 442–449, 2019.

DUFORESTEL, Manon *et al.* Glyphosate Primes Mammary Cells for Tumorigenesis by Reprogramming the Epigenome in a TET3-Dependent Manner. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 10, p. 885, 2019.

EDWARD M. DE ROBERTIS, José Hib. **Biologia Celular e Molecular**. [S. l.], 2014. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/mod/resource/view.php?id=4708414&forceview=1>. Acesso em: 23 jan. 2025.

EL-NAHHAL, Yasser. Acute Poisoning among Farmers by Chlorpyrifos: Case Report from Gaza Strip. **Occupational Diseases and Environmental Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 47–57, 2017.

EL-NAHHAL, Yasser; LUBBAD, Raaed; AL-AGHA, Mohammad R. Toxicity evaluation of chlorpyrifos and diuron below maximum residue limits in rabbits. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 177–190, 2020.

ENGIN, Ayse Basak; ENGIN, Atilla. Obesity-Senescence-Breast Cancer: Clinical Presentation of a Common Unfortunate Cycle. *In*: ENGIN, Ayse Basak; ENGIN, Atilla (org.). **Obesity and Lipotoxicity**. Cham: Springer International Publishing, 2024. p.

821–850. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-031-63657-8_27. Acesso em: 21 jan. 2025.

ENNOUR-IDRISSI, Kaoutar; MAUNSELL, Elizabeth; DIORIO, Caroline. Telomere Length and Breast Cancer Prognosis: A Systematic Review. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 3–10, 2017.

ESTIMATIVA 2023: INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2023-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 6 jan. 2025.

FAHLÉN, Mia *et al.* Hormone replacement therapy after breast cancer: 10 year follow up of the Stockholm randomised trial. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 52–59, 2013.

FAO. Pesticides use and trade, 1990–2022. [s. l.], 2024. Disponível em: <https://openknowledge.fao.org/handle/20.500.14283/cd1486en>. Acesso em: 20 jan. 2025.

FU, Nai Yang *et al.* Stem Cells and the Differentiation Hierarchy in Mammary Gland Development. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 100, n. 2, p. 489–523, 2020.

GABOARDI, Shaiane Carla; CANDIOTTO, Luciano Zanetti Pessôa; RAMOS, Lucinéia Maria. PERFIL DO USO DE AGROTÓXICOS NO SUDOESTE DO PARANÁ (2011 – 2016)/Profile of pesticides use in the southwest of Paraná (2011-2016). **REVISTA NERA**, [s. l.], n. 46, p. 13–40, 2019.

GALLOWAY, Tamara; HANDY, Richard. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. **Ecotoxicology (London, England)**, [s. l.], v. 12, n. 1–4, p. 345–363, 2003.

GARCÍA-GARCÍA, Carmen R. *et al.* Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. **Life Sciences**, [s. l.], v. 145, p. 274–283, 2016.

HAYFLICK, L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. **Experimental Cell Research**, [s. l.], v. 37, p. 614–636, 1965.

HEAPHY, Christopher M *et al.* Shorter telomeres in luminal B, HER-2 and triple-negative breast cancer subtypes. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 194–200, 2011.

HEER, Emily *et al.* Global burden and trends in premenopausal and postmenopausal breast cancer: a population-based study. **The Lancet. Global Health**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. e1027–e1037, 2020.

HIYAMA, E. *et al.* Telomerase activity in gastric cancer. **Cancer Research**, [s. l.], v.

55, n. 15, p. 3258–3262, 1995.

HORN, Julie; VATTEN, Lars J. Reproductive and hormonal risk factors of breast cancer: a historical perspective. **International Journal of Women's Health**, [s. l.], v. 9, p. 265–272, 2017.

IBARLUZEA, Jesús M. *et al.* Breast Cancer Risk and the Combined Effect of Environmental Estrogens. **Cancer Causes & Control**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 591–600, 2004.

ILIĆ, Ivan *et al.* Differences in Histological Subtypes of Invasive Lobular Breast Carcinoma According to Immunohistochemical Molecular Classification. **Diagnostics**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 660, 2024.

ISMAIL, Somaia; ESSAWI, Mona. Genetic polymorphism studies in humans. **Middle East Journal of Medical Genetics**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 57, 2012.

JAGA, Kushik; DHARMANI, Chandrabhan. The epidemiology of pesticide exposure and cancer: A review. **Reviews on Environmental Health**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 15–38, 2005.

JIANG, Ying *et al.* Association Between Prenatal Exposure to Organochlorine Pesticides and Telomere Length in Neonatal Cord Blood. **Toxics**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 769, 2024.

KAHL, Vivian F. Silva *et al.* Occupational Exposure to Pesticides in Tobacco Fields: The Integrated Evaluation of Nutritional Intake and Susceptibility on Genomic and Epigenetic Instability. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2018, n. 1, p. 7017423, 2018.

KAHL, Vivian Francília Silva; DA SILVA, Juliana; DA SILVA, Fernanda Rabaioli. Influence of exposure to pesticides on telomere length in tobacco farmers: A biology system approach. **Mutation Research**, [s. l.], v. 791–792, p. 19–26, 2016.

KIM, Julie *et al.* Association between hTERT rs2736100 polymorphism and sensitivity to anti-cancer agents. **Frontiers in genetics**, [s. l.], v. 4, p. 162, 2013.

KIM, Ki-Hyun; KABIR, Ehsanul; JAHAN, Shamin Ara. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **The Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 575, p. 525–535, 2017.

KINNERSLEY, B *et al.* The TERT variant rs2736100 is associated with colorectal cancer risk. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 107, n. 6, p. 1001–1008, 2012.

KO, Jiunn-Liang *et al.* The association of occupational metals exposure and oxidative damage, telomere shortening in fitness equipments manufacturing workers. **Industrial Health**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 345–353, 2017.

KOHNO, Yuuta *et al.* Relationship of psychological characteristics and self-efficacy in gastrointestinal cancer survivors. **Psycho-Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 71–76, 2010.

KOUAL, Meriem *et al.* Environmental chemicals, breast cancer progression and drug resistance. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 117, 2020.

LI, Zijian; JENNINGS, Aaron. Worldwide Regulations of Standard Values of Pesticides for Human Health Risk Control: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 826, 2017.

LÓPEZ-LÁZARO, Miguel. Stem cell division theory of cancer. **Cell Cycle**, [s. l.], v. 14, n. 16, p. 2547–2548, 2015.

LUE, Neal F. A physical and functional constituent of telomerase anchor site. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 280, n. 28, p. 26586–26591, 2005.

MEEKER, Alan K. *et al.* Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 3317–3326, 2004.

MEKONEN, Seblework *et al.* Exposure to organochlorine pesticides as a predictor to breast cancer: A case-control study among Ethiopian women. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. e0257704, 2021.

MEYNE, J; RATLIFF, R L; MOYZIS, R K. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 86, n. 18, p. 7049–7053, 1989.

MIGOWSKI, Arn *et al.* Diretrizes para detecção precoce do câncer de mama no Brasil. II - Novas recomendações nacionais, principais evidências e controvérsias. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 34, p. e00074817, 2018.

MO, Jinyao *et al.* Elevated Human Telomerase Reverse Transcriptase Gene Expression in Blood Cells Associated with Chronic Arsenic Exposure in Inner Mongolia, China. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v. 117, n. 3, p. 354–360, 2009.

MOKARIZADEH, Aram *et al.* A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences. **Toxicology Mechanisms and Methods**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 258–278, 2015.

MOSTAFALOU, Sara; ABDOLLAHI, Mohammad. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 268, n. 2, p. 157–177, 2013.

MU, Changhui *et al.* Associations between maternal serum neonicotinoid pesticide exposure during pregnancy and newborn telomere length: Effect modification by sampling season. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 273, p. 116164, 2024.

NAKAMURA, T. M. *et al.* Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 277, n. 5328, p. 955–959, 1997.

NAROD, Steven A. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 669–676, 2011.

OKUSA, Y. *et al.* Correlation between telomerase activity and DNA ploidy in gastric cancer. **Oncology**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 258–264, 1998.

PANIS, Carolina *et al.* Exposure to Pesticides and Breast Cancer in an Agricultural Region in Brazil. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 58, n. 24, p. 10470–10481, 2024.

PANIS, Carolina *et al.* Widespread pesticide contamination of drinking water and impact on cancer risk in Brazil. **Environment International**, [s. l.], v. 165, p. 107321, 2022.

PANIS, Carolina; LEMOS, Bernardo. Pesticide exposure and increased breast cancer risk in women population studies. **The Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 933, p. 172988, 2024.

PEROU, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, [s. l.], v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.

POLYAK, Kornelia. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 117, n. 11, p. 3155–3163, 2007.

RAKHA, Emad A. *et al.* Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 26, n. 19, p. 3153–3158, 2008.

RAKHA, Emad; TOSS, Michael; QUINN, Cecily. Specific cell differentiation in breast cancer: a basis for histological classification. **Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 75, n. 2, p. 76–84, 2022.

RAMPAZZO, Enrica *et al.* Genetic Variants of the TERT Gene, Telomere Length, and Circulating TERT as Prognostic Markers in Rectal Cancer Patients. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 3115, 2020.

RANJBAR, A.; PASALAR, P.; ABDOLLAHI, M. Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers. **Human & Experimental Toxicology**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 179–182, 2002.

RIMAWI, Mothaffar F.; SCHIFF, Rachel; OSBORNE, C. Kent. Targeting HER2 for the treatment of breast cancer. **Annual Review of Medicine**, [s. l.], v. 66, p. 111–128, 2015.

ROSATO, Valentina *et al.* Reproductive and hormonal factors, family history, and breast cancer according to the hormonal receptor status. **European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 412–417, 2014.

SAFI, J. M. *et al.* Mutagenic and carcinogenic pesticides used in the agricultural environment of Gaza Strip. **The Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 132, n.

2–3, p. 371–380, 1993.

SHASTRY, Barkur S. SNPs: impact on gene function and phenotype. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 578, p. 3–22, 2009.

SHEKHAR, Chander *et al.* A systematic review of pesticide exposure, associated risks, and long-term human health impacts. **Toxicology Reports**, [s. l.], v. 13, p. 101840, 2024.

SHIN, Ji-Yeon *et al.* Low-dose persistent organic pollutants increased telomere length in peripheral leukocytes of healthy Koreans. **Mutagenesis**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 511–516, 2010.

SUNG, Hyuna *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**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021a.

SUNG, Hyuna *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**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021b.

TAN, Puay Hoon *et al.* The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. **Histopathology**, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 181–185, 2020.

TEAMA, Salwa. DNA Polymorphisms: DNA-Based Molecular Markers and Their Application in Medicine. *In: GENETIC DIVERSITY AND DISEASE SUSCEPTIBILITY*. [S. l.]: IntechOpen, 2018. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/62578>. Acesso em: 6 jan. 2025.

TEBOURBI, Olfa *et al.* Molecular Mechanisms of Pesticide Toxicity. *In: PESTICIDES IN THE MODERN WORLD - PESTS CONTROL AND PESTICIDES EXPOSURE AND TOXICITY ASSESSMENT*. [S. l.]: IntechOpen, 2011. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/20786>. Acesso em: 15 jan. 2025.

THONGPRAKASANG, Siriporn *et al.* Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 59, p. 129–136, 2013.

THUC NGUYEN, Thi Minh; DINH LE, Roanh; NGUYEN, Chu Van. Breast cancer molecular subtype and relationship with clinicopathological profiles among Vietnamese women: A retrospective study. **Pathology, Research and Practice**, [s. l.], v. 250, p. 154819, 2023.

TSANG, Julia Y. S.; TSE, Gary M. Molecular Classification of Breast Cancer. **Advances in Anatomic Pathology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 27–35, 2020.

TSUDA, Hitoshi. Gene and chromosomal alterations in sporadic breast cancer: correlation with histopathological features and implications for genesis and progression. **Breast Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 186–201, 2009.

TUDI, Muyesaier *et al.* Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact

on the Environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 1112, 2021.

VALDES, A. M. *et al.* Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 366, n. 9486, p. 662–664, 2005.

VAZIRI, Homayoun; BENCHIMOL, Samuel. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. **Current Biology**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 279–282, 1998.

WANG, Qin *et al.* BIBR1532 inhibits proliferation and metastasis of esophageal squamous cancer cells by inducing telomere dysregulation. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 99376, 2025.

WASHBROOK, Elinor. Risk factors and epidemiology of breast cancer. **Women's Health Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 1, Breast disorders, p. 8–14, 2006.

WATSON, J. D. Origin of Concatemeric T7DNA. **Nature New Biology**, [s. l.], v. 239, n. 94, p. 197–201, 1972.

WATSON, Christine J.; KHALED, Walid T. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. **Development (Cambridge, England)**, [s. l.], v. 135, n. 6, p. 995–1003, 2008.

WEICHENTHAL, Scott; MOASE, Connie; CHAN, Peter. A review of pesticide exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study cohort. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v. 118, n. 8, p. 1117–1125, 2010.

WEINRICH, S. L. *et al.* Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 498–502, 1997.

WENTZENSEN, Ingrid M. *et al.* The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 1238–1250, 2011.

WU, Xiaozheng *et al.* Ethnicity-specific association between TERT rs2736100 (A > C) polymorphism and lung cancer risk: a comprehensive meta-analysis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 13271, 2023.

XU, D. *et al.* Telomerase activity and the expression of telomerase components in acute myelogenous leukaemia. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 102, n. 5, p. 1367–1375, 1998.

ZHANG, Xinyu *et al.* TERT Gene rs2736100 and rs2736098 Polymorphisms are Associated with Increased Cancer Risk: A Meta-Analysis. **Biochemical Genetics**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 241–266, 2022.

ZHOU, Peng *et al.* Association between telomerase reverse transcriptase rs2736100 polymorphism and risk of glioma. **The Journal of Surgical Research**, [s. l.], v. 191,

n. 1, p. 156–160, 2014.

ZHU, Tian-Yi *et al.* Telomerase reverse transcriptase gene knock-in unleashes enhanced longevity and accelerated damage repair in mice. **Aging Cell**, [s. l.], v. n/a, n. n/a, p. e14445, 2024.

ZHU, Yukun *et al.* Telomere and its role in the aging pathways: telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction. **Biogerontology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–16, 2019.

ZIEGLER, Susanne *et al.* Accelerated telomere shortening in peripheral blood lymphocytes after occupational polychlorinated biphenyls exposure. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 289–300, 2017.

ZOU, Peng *et al.* The TERT rs2736100 Polymorphism and Cancer Risk: A Meta-analysis Based on 25 Case-Control Studies. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 7, 2012.

APÊNDICES

Anexo A: Termo de Ciência do Responsável pelo Campo de Estudo.

HOSPITAL DO CÂNCER

FRANCISCO BELTRÃO

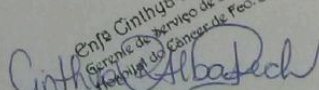
ce onc

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
Gerente de Serviço de Saúde
Hospital do Câncer de Franco Beltrão



Enfa Cinthya R. Alba Rech

Gerente de Serviço de Saúde

Hospital do Câncer de Francisco Beltrão - CEONC

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.

Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

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: Prof^a Dr^a 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:

Anexo C: Associação dos Parâmetros clinicopatológicos das pacientes com câncer de mama (CaM) com as frequências genótípicas considerando o modelo genotípico.

Características	Genótipo		OR (IC 95%)	p-valor
	Não	Sim		
Recorrência	AA (8,5)	AA (17,5)	0,900 (0,228-3,546)	0,880
	AC (14,3)	AC (29,4)	0,500 (0,150-1,665)	0,259
	CC (7,7)	CC (25,0)	Referência	
Histopatológico	Outros	CDI		
	AA (17,5)	AA (82,59)	0,635 (0,261-1,543)	0,316
	AC (29,4)	AC (70,6)	1,250 (0,582-2,683)	0,567
	CC (25,0)	CC (75,0)	Referência	
Receptor estrógeno	Negativo	Positivo		
	AA (38,1)	AA (61,9)	1,026 (0,488-2,155)	0,947
	AC (35,3)	AC (64,7)	0,909 (0,451-1,831)	0,790
	CC (37,5)	CC (62,5)	Referência	
Receptor progesterona	Negativo	Positivo		
	AA (52,4)	AA (47,6)	0,660 (0,317-1,374)	0,266
	AC (56,5)	AC (43,5)	0,778 (0,390-1,552)	0,477
	CC (62,5)	CC (37,5)	Referência	
Receptor Her	Negativo	Positivo		
	AA (87,1)	AA (12,9)	1,467 (0,535-4,027)	0,457
	AC (84,5)	AC (15,5)	1,187 (0,481-2,932)	0,710
	CC (82,1)	CC (17,9)	Referência	
Ki-67	Abaixo	Acima		
	AA (43,9)	AA (56,1)	0,923 (0,427-1998)	0,839
	AC (39,7)	AC (60,3)	0,779 (0,373-1,627)	0,506
	CC (45,8)	CC (54,2)	Referência	
	Luminal A	Luminal B	Luminal Her	Tripla negativo

	AC (77,8) CC (72,3)	AC (22,2) CC (27,7)	1,338 (0,574-3,121) Referência	0,500
	< 50 anos	> 50 anos		
	AA (38,7)	AA (61,3)	1,089 (0,516-2,294)	0,824
Idade ao diagnóstico	AC (35,7) CC (40,7)	AC (64,3) CC (59,3)	1,237 (0,613-2,499) Referência	0,552
	Normal	Excesso de peso		
IMC	AA (26,5)	AA (73,5)	0,671 (0,271-1,663)	0,388
	AC (27,0)	AC (73,0)	0,686 (0,292-1,614)	0,388
	CC (35,0)	CC (65,0)	Referência	
	Não	Sim		
Menopausa	AA (39,3)	AA (60,7)	0,667 (0,306-1,454)	0,308
	AC (27,7)	AC (72,3)	1,128 (0,528-2,408) Referência	0,755
	CC (30,2)	CC (69,8%)		
	Não	Sim		
Histórico na família	AA (44,1)	AA (55,9)	1,064 (0,491-2,306)	0,876
	AC (48,8)	AC (51,2)	1,284 (0,622- 2,653) Referência	0,499
	CC (42,6)	CC (57,4)		
	Baixo	Intermediário	Alto	
Estratificação de risco			1,370 (0,208-9,016)	0,744
	AA (5,2)	AA (55,2)	AA (39,7) 1,124 (0,512-2,466)	0,771
			3,231 (0,619-16,869)	0,164
	AC (10,7) CC (4,1)	AC (54,7) CC (53,1)	AC (34,7) CC (42,9) 1,274 (0,598-2,714) Referência	0,531
	Não	Sim		

	AA (65,3)	AA (34,7)	1,115 (0,475-2,619)	0,802
Linfonodos	AC (68,9)	AC (31,1)	1,314 (0,596-2,896)	0,498
	CC (62,8)	CC (37,2)	Referência	

Legenda: CDI: carcinoma ductal infiltrante; IMC: índice de massa corpórea; Ki-67: índice de proliferação celular. Análise realizada por regressão logística multinomial, $p < 0,05$ considerado estatístico. OR: Odds ration, IC: Intervalo de confiança.