



RENORBIO - REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FATORES BIOLÓGICOS E AMBIENTAIS ENVOLVIDOS NA
ETIOPATOGENIA DO CÂNCER DE MAMA

ELAINE STUR

VITÓRIA - ES
2017

ELAINE STUR

**FATORES BIOLÓGICOS E AMBIENTAIS ENVOLVIDOS NA
ETIOPATOGENIA DO CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Ponto Focal Espírito Santo, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Iúri Drumond Louro

VITÓRIA
2017

ELAINE STUR

Fatores biológicos e ambientais envolvidos na etiopatogenia do câncer de
mama

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Ponto Focal Espírito Santo, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Avaliada em 13 de dezembro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Iúri Drumond Louro
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Dra. Denise Coutinho Endringer
Universidade de Vila Velha
Examinadora Externa

Dra. Flávia Imbrosi Valle Errera
EMESCAM
Examinador Externo

Flávia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinadora Interna

Dr. Antônio Alberto Ribeiro Fernandes
Universidade Federal do Espírito Santo
Examinador Interno

Aos meus pais, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que é minha energia vital, que me faz acreditar até mesmo quando nada mais parece fazer sentido. Que me guia, me ilumina e me dá a força que preciso para correr atrás dos meus sonhos.

Agradeço a minha família pelo apoio, por acreditarem nos meus sonhos. Aos meus irmãos e ao meu pai por sempre me fazer querer ser melhor. A minha mãe, a pessoa mais guerreira que conheço, da qual orgulhosamente herdei toda a garra que tenho. Ao meu pequeno Daniel, meu sobrinho, que me fez ver a vida com mais amor, ternura e que facilmente me acalma e sempre consegue tirar o sorriso mais sincero do meu rosto. A vocês, devo toda minha gratidão, meu amor, devo cada conquista. Nada disso seria possível sem a presença de vocês na minha vida!

Agradeço ao meu orientador, Lúri, pelos 10 anos de orientação no Núcleo de Genética Humana e Molecular. Agradeço por ter sido amigo, por tantas vezes ter me orientado também para a vida. Agradeço por ter acreditado em mim e me fazer acreditar que eu era capaz e por ter me dado a oportunidade de construir e concretizar sonhos. Nunca terei palavras suficientes para expressar a gratidão que sinto por tudo em que sempre estive presente.

Agradeço a minha família de coração, Luana e Elaine, por serem família, amigas, por serem aconchego e lar. Essa conquista também tem a participação de vocês.

As minhas companheiras Raquel Reis, Raquel Spinassé e Lidiane, por aguentarem todas as minhas reclamações diárias, por estarem ao meu lado, por serem companheiras de jornada e por serem pessoas que também me fizeram crescer como bióloga molecular. Raquel Spinassé, obrigada por tantas correções nesta tese e nos trabalhos aqui apresentados!

Aos demais colegas de laboratório, que fizeram com que os dias fossem mais leves e alegres, em especial Diego, Fernanda e Elda, que são companheiros

de longa jornada. Agradeço a todos os participantes do laboratório que ajudaram no desenvolvimento dos artigos aqui apresentados.

Agradeço ao professor Wilson Araújo Junior, Kamila Perroni e ao Andres, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP, que auxiliaram grandemente no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do CDI-Mulher, em especial a Dra. Cristina Stefanon, que nos deu a oportunidade e pacientemente nos receberam e nos auxiliaram no levantamento epidemiológico.

Agradeço ao Dr. Donald Miller (University of Louisville) por ter me dado uma das oportunidades mais fantásticas que já tive na vida, que foi o Doutorado Sanduíche. Sem dúvida, mudou minha vida em muitos aspectos, foi uma etapa intensa e rápida de amadurecimento pessoal e profissional.

Agradeço ainda aos companheiros de trabalho da University of Louisville que tanto me ensinaram e se tornaram amigos, dividindo inclusive feriados em família, em especial Francine Rezzoug e Shelia Thomas, com as quais estava todos os dias. Agradeço a Julia Chariker, que teve calma e me mostrou os caminhos da bioinformática juntamente com o Dr. Eric, obrigada por ter feito com que eu acreditasse mais em mim mesma, no meu potencial e até mesmo me ajudar a sonhar mais alto. Agradeço ainda a Sabine, Dr. Zacharias, Dr. Eric, Lilibeth, Asheley, Dr. Tarik, que também se dividiram entre amizade e trabalho. Não há palavras que possam expressar minha gratidão...E que saudade que sinto de todos vocês!

Ao meu namorado Clark, que mesmo apesar da distância, está vivendo comigo um dos momentos mais importantes na minha vida, me compreende e tem a paciência que preciso em alguém. Está sendo um prazer ter você para compartilhar tudo isso!

Agradeço a FAPES, pela bolsa de doutorado que permitiu que eu realizasse mais esse sonho.

À banca que qualificação e de defesa que se dedicaram a leitura deste trabalho e pelas ricas sugestões que permitiram que ele se tornasse melhor.

Agradeço também aos professores que passaram por esta caminhada desde o início da graduação, que despertaram o amor pela ciência e foram essenciais para a minha formação.

Agradeço enormemente a todos aqueles que mesmo longe ou perto, caminharam comigo e me ajudaram a tornar esse sonho possível.

*“It has been my philosophy of life that difficulties
vanish when faced boldly.”*

Isaac Asimov

ESTRUTURA DA TESE

Esta versão da Tese está apresentada em formato de artigo científico e de acordo com o exigido pelo Regimento desse Programa - com a comprovação de submissão de, pelo menos, dois artigos em periódico Qualis B1 ou superior.

As Listas de Figuras e Tabelas, Abreviaturas e Siglas contemplam as informações descritas na Introdução e Revisão de Literatura.

RESUMO

STUR, E. **Fatores biológicos e ambientais envolvidos na etiopatogenia do câncer de mama**. 2017. 163f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O câncer de mama, dentre os diversos cânceres, possui a maior incidência e mortalidade na população feminina mundial, sendo atualmente o principal causador de morte entre mulheres. É uma doença heterogênea que possui como principais fatores de risco a idade, etnia, genética, obesidade, menarca, menopausa, fatores reprodutivos e densidade mamária. Devido à forte influência da densidade mamária como fator de risco, na primeira parte deste estudo, foi realizado um levantamento epidemiológico a partir de mamografias envolvendo 11.826 mulheres atendidas no Centro de diagnóstico por Imagem-Mulher-Vitória, Espírito Santo. Os resultados demonstraram que idade avançada, menopausa, número alto de filhos e, principalmente, alto índice de massa corpórea, estão relacionadas a baixas densidades mamárias. A idade avançada se apresentou como fator de proteção para lesões na mama, enquanto que cirurgia prévia, alto índice de massa corpórea e alta densidade mamária demonstraram associação com a presença de lesões. Fatores que influenciam na regulação hormonal do organismo também podem auxiliar no desenvolvimento do câncer de mama. A segunda parte deste trabalho, trata da relação do uso de herbicidas e o câncer. Nos últimos anos, com o crescimento no uso de herbicidas, diversos estudos têm relatado que o glifosato, herbicida mais utilizado no mundo, pode atuar como desregulador endócrino e mitógeno, levando a alterações na taxa de crescimento tumoral. Desta forma, este estudo buscou identificar como o Roundup® (forma complexada do glifosato) e o ácido aminometilfosfônico (metabólito principal do glifosato) atuam nos padrões de expressão gênica de linhagens de câncer de mama hormônio dependentes (MCF-7) e hormônio independentes (MDA-MB-468). Os resultados demonstraram que o glifosato levou a uma desregulação de pelo menos 11

vias canônicas em ambas as linhagens, sendo as mais importantes, ciclo celular e reparo de DNA. Além disso, a linhagem MDA-MB-468 apresentou diversas alterações nas vias de processos metabólicos. O ácido aminometilfosfônico levou a um menor número de alterações, porém as alterações encontradas indicam alterações no processo de metabolismo celular. Tais achados mostram que, de forma dose-dependente, o Roundup® leva a alterações na proliferação celular, um risco para o desenvolvimento de doenças mamárias. Assim, pode-se concluir a partir deste estudo que diversos fatores de risco podem influenciar no desenvolvimento e progressão de lesões mamárias, atuando de forma independente ou dependente e ainda que o uso de herbicidas influencia em funções celulares básicas, desregulando sua homeostase.

Palavras-chave: Câncer de mama. Densidade mamária. Lesões de mama. Glifosato. Roundup®. Ácido aminometilfosfônico.

ABSTRACT

STUR, E. **Biological and environmental factors involved in the etiopathogenesis of breast cancer.** 2017. 163f. Thesis (Doctoral in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

The breast cancer has the biggest incidence and mortality in the worldwide female population among others cancers, currently being the main cause of deaths among women. It is a heterogeneous disease with many risk factors, such as age, ethnicity, genetics, obesity, menarche, menopause, reproductive factors and mammary density. Due to the strong influence of mammary density as a risk factor, the first part of this thesis, were realized an epidemiological study using mammography data was conducted with 11,826 women by the Diagnostic Image Center-Woman- Vitoria in Espirito Santo, Brazil. The main results revealed that advanced age, menopause, high number of children, and especially, higher body mass index are associated with low mammary densities. The advanced age was associated with low risk to breast lesions, while previous surgery, high body mass index and high mammary density were associated with presence of lesions. Factors that influence on the hormonal regulation in the body may help in the development of breast cancer. The second part of this paper deals with the relationship between herbicide use and cancer. Studies have reported that with the increase of herbicide use in most recent years, specifically glyphosate, the worldwide most utilized herbicide, may act as endocrine disruptor and mitogen, leading to changes on the tumor growth ratio. Thus, this study evaluated how the Roundup® (composed by a complexed form of glyphosate) and aminomethylphosphonic acid (mainly metabolic of glyphosate) acts on the gene expression of breast cancer cell lines dependent-hormone (MCF-7) and independent-hormone (MDA-MB-468). The results showed that the glyphosate led to a deregulation of at least 11 canonical pathways in both cell lines, which are mainly responsible for cell cycle and DNA damage repair. Besides that, the cell line MDA-MB-468 showed many changes on the metabolic process pathways. The aminomethylphosphonic acid led to

fewer changes, nonetheless these indicated changes on the cellular metabolism. Such findings showed that, in a dose-dependent manner, Roundup® lead to changes on the cell proliferation, increasing the risk for the breast disease development. This study concludes that many risk factors can influence on the development and progression of breast lesions, acting in a dependent or independent manner, and also that the use of herbicides can influence in basic cellular functions, deregulating the homeostasis.

.

Keywords: Breast cancer. Mammary density. Breast lesions. Glyphosate. Roundup®. Aminomethylphosphonic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de progressão tumoral do câncer de mama.	29
Figura 2: Classificação histológica dos subtipos de câncer de mama.....	33
Figura 3: Origem do carcinoma ductal invasivo e do carcinoma lobular	34
Figura 4: Diferença entre os tumores de mama RE+ e RE-.	42
Figura 5: Distribuição dos tumores de mama ao longo do tempo.....	43
Figura 6: Características biológicas de acordo com o tamanho do tumor.	45
Figura 7: Estratificação de risco e ferramentas de predição e prognóstico	47
Figura 8: Consumo de agrotóxicos no Brasil, no período de 2005-2014.....	50
Figura 9: Via do chiquimato e sua inibição por glifosato	53
Figura 10: Vias de degradação catabólica do glifosato no solo.....	54
Figura 11: Alterações em processos fisiológicos celulares, causadas por AMPA e glifosato	55
Figura 12: Comprovação de submissão do manuscrito 1	71
Figura 13: Comprovação de submissão do manuscrito 2.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Subtipos moleculares do câncer de mama e seu padrão de imunomarcção.....	40
Tabela 2: Propriedades químico-físicas do glifosato.....	51
Tabela 3: Estudos epidemiológicos de associação de GBHs com o risco para o desenvolvimento do câncer em humanos	65
Tabela 4: Efeito de GBH's em linhagens celulares.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS	American Cancer Society
AHS	Agricultural Health Study
ALA	Ácido δ-aminolevulínico
AMPA	Aminomethylphosphonic acid
Ap1	Activator Protein 1
AR	Androgen receptor
ATM	ATM serine/threonine kinase
BC	Breast cancer
BI-RADS	Breast Imaging Report and Data System
BMI	Body mass index
BPA	Bisfenol A
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal
CARC	Cancer Assessment Review Committee
CAS	Chemical Abstracts Service
CDH1	Cadherin1
CDI	Carcinoma ductal
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CI	Confiance Interval
CL	Carcinoma lobular
CLI	Carcinoma lobular invasivo/invasiva
CM	Câncer de mama
CK5/6	Citoqueratina 5/6
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand 12
DM	Densidade mamária
DNA	Deoxyribonucleic acid
E1	Estrona
E2	17β-estradiol
E3	Estriol

EFSA	European Food Safety Authority
EGFR	Epidermal growth factor receptors
EGR1	Early growth response 1
EPA	US Environmental Protection Agency
EPSPS	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
ERE	Elementos responsivos ao estrógeno
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ESR1	Estrogen receptor 1
ESR2	Estrogen receptor 2
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Food and Agriculture Organization
GBH	Glyphosate based herbicide
HER1	erb-b2 receptor tyrosine kinase 1
HER2	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
HER3	erb-b2 receptor tyrosine kinase 3
HER4	erb-b2 receptor tyrosine kinase 4
HIF1α	Hypoxia inducible factor 1 alpha subunit
HIS	Histidina
IARC	International Agency for Research on Cancer
IF	Impact factor
IMC	Índice de massa corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Kg	Kilograma
Ki67	Antigen KI-67
MD	Mammographic density
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
p53	Protein p53
PALB2	partner and localizer of BRCA2
POEA	Polioxiétilenamida
PR	Prevalence Rate
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RAD51	RAD51 recombinase

RE	Receptor de estrógeno
RE-	Receptor de estrógeno negativo
RE+	Receptor de estrógeno positivo
REα	Receptor de estrógeno alfa
Reβ	Receptor de estrógeno beta
RP	Receptor de progesterona
RP+	Receptor de progesterona positivo
RP-A	Receptor de progesterona isoforma A
RP-B	Receptor de progesterona isoforma B
Sp1	Sp1 transcription factor
TP53	Tumor protein p53
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.1.2 Objetivos específicos	25
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
3.1 Câncer de mama	27
3.1.1 Epidemiologia.....	27
3.1.2 Evolução tumoral	28
3.1.3 Fatores de risco.....	29
3.1.4 Classificação histológica.....	32
3.1.4.1 Receptor de Estrogênio (RE).....	34
3.1.4.1.1. Estrogênio: biossíntese e ação	35
3.1.4.2 Receptor de Progesterona (RP)	36
3.1.4.3 Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2).....	37
3.1.4.4 Proteína Ki67.....	38
3.1.4.5 Proteína p53.....	38
3.1.4.6 Outros biomarcadores	39

3.1.5 <i>Classificação molecular</i>	40
3.1.6 <i>Diagnóstico e prevenção</i>	42
3.1.7 <i>Tratamento e prognóstico</i>	44
3.2 <i>Herbicidas</i>	47
3.2.1 <i>Histórico</i>	48
3.2.2 <i>Comercialização</i>	49
3.2.3 <i>Descrição e composição química dos herbicidas baseados em glifosato</i> ...	50
3.2.4 <i>Modo de ação e degradação</i>	52
3.2.5 <i>Uso, exposição e presença do glifosato</i>	55
3.2.6 <i>Glifosato e câncer</i>	58
3.2.6.1 <i>Classificação e risco para humanos</i>	58
3.2.6.2 <i>Efeito carcinogênico do glifosato e do AMPA em linhagens celulares</i>	61
3.2.6.3 <i>Efeito de herbicidas no câncer de mama</i>	61
4. ARTIGOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DA TESE	71
4.1 Manuscrito 1	71
4.2 Manuscrito 2	91
5. CONCLUSÃO	141
5.1 Densidade mamária e câncer de mama	141
5.2 Efeito do Roundup® e AMPA em linhagens celulares de câncer de mama	142

6. REFERÊNCIAS.....143

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....160

1. INTRODUÇÃO

O câncer se tornou um grande problema de saúde pública, visto que a incidência, o número de mortes e o impacto econômico advindos desta doença vêm aumentando nas últimas décadas (INCA, 2015). Dentre as neoplasias, o câncer de mama (CM) possui a maior incidência e mortalidade na população feminina mundial (INCA, 2015). No Brasil, são esperados para os anos de 2016-2017, mais de 57 mil novos casos (INCA, 2015).

Apesar do CM ser o maior causador de morte em mulheres, existem outras doenças que acometem as mamas. As doenças benignas da mama são mais comuns que as malignas e são responsáveis por cerca de 90% das lesões mamárias (ONSTAD e STUCKEY, 2013). Os fatores de risco mais comuns para o desenvolvimento do CM são idade, etnia, (OLDENBURG *et al.*, 2007), fatores genéticos, (SCHON e TISCHKOWITZ, 2017), obesidade (WOLIN *et al.*, 2010), menarca, menopausa, fatores reprodutivos (CAVALIERI *et al.*, 2000) e a densidade mamária (DM) (CAGLAYAN *et al.*, 2015).

A DM é medida pela proporção de tecido fibroglandular no tecido mamário (BOYD *et al.*, 2005). DMs maiores que 75% aumentam o risco de CM de 4-6 vezes, por isso tem sido consideradas um dos mais importantes fatores de risco para este câncer (CAGLAYAN *et al.*, 2015; ZIEMBICKI *et al.*, 2017).

Além do conhecimento sobre os fatores de risco para o CM, o caráter molecular da lesão tem grande relevância. Existem diversos marcadores moleculares para o CM, sendo os mais comuns o Receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), marcador de proliferação Ki67 e o p53. Destes, o RE é o mais importante biomarcador de prognóstico e predição, pois ele fornece o índice de sensibilidade ao tratamento endócrino tanto com o tamoxifeno quanto com inibidores de aromatase. Aproximadamente 70-80% dos CMs expressam RE (DAI *et al.*, 2016; OKUMURA *et al.*,

2017). Tal marcador permite a ligação do estrogênio, que é um hormônio esteroide sexual envolvido em processos fisiológicos relacionados com a regulação do ciclo menstrual e reprodução, densidade óssea, função cerebral e mobilização do colesterol (LIANG e SHANG, 2013).

Devido à alta importância do RE para o CM, estudos recentes têm demonstrado que herbicidas como o glifosato, tem potencial de atuar como desregulador endócrino e mitógeno, o que pode influenciar na carcinogênese (HOKANSON *et al.*, 2007; THONGPRAKAI SANG *et al.*, 2013; MESNAGE *et al.*, 2017).

O glifosato é um herbicida organofosforado, de amplo espectro, pós emergente, não seletivo, sistêmico, com capacidade de matar ou inibir o crescimento de plantas (IARC, 2017). O Roundup® é a forma complexada do glifosato contendo surfactantes. O surfactante, além de permitir uma maior absorção do glifosato pelas plantas, pode causar ecotoxicidade. A toxicidade do glifosato e do surfactante se torna ainda mais evidente quando atuam em sinergismo (SZÉKÁCS e DARVAS, 2012).

A IARC atualmente classifica o glifosato como “provavelmente carcinogênico para humanos- Grupo 2A”. Tal classificação significa que existem evidências limitadas em humanos, porém evidências suficientes em animais (IARC, 2017). Entretanto, tal classificação ainda é bastante discutível, sendo que outros órgãos de proteção ambiental não concordam com tal classificação (EPA, 2016).

Até o momento, apenas o estudo epidemiológico de Engel *et al.* (2005) buscou a associação entre o uso de glifosato e o CM, porém não foi encontrada associação estatisticamente significativa (RR= 0,9, 95% IC: 0,7-1,1) (ENGEL *et al.*, 2005).

A literatura é mais rica quando se trata dos efeitos do glifosato e seus metabólitos em linhagens celulares. O estudo de Thongprakaisang *et al.* (2013) e de Mesnage *et al.* (2017) analisaram o efeito do glifosato e de compostos como estrogênio, Roundup® e surfactantes em linhagens de CM RE+ (MCF-7) e RE- (MDA-MB-231), e verificaram que, de forma dose-dependente, o glifosato pode levar à proliferação. Mesnage *et al.*

(2017) relatam ainda que diferentemente do glifosato, o Roundup® não leva a tal proliferação e acreditam que tal composto seja mais tóxico por si só.

Considerando as informações apresentadas acima, este trabalho foi dividido em duas partes. A parte apresentada no manuscrito 1, intitulado: “*High mammographic density: an analysis of risk factors from a cross-sectional study in 11,826 brazilian women*” objetivou analisar a relação entre achados clínicos de mamografias e fatores de risco para o CM, avaliando a associação entre os diversos fatores de risco e a DM, bem como a associação da DM para a ocorrência de lesões mamárias.

Quanto ao manuscrito 2, intitulado: “*Glyphosate-based-herbicides at low doses can affect canonical pathways in Estrogen Positive and Negative breast cancer cell lines*” buscou analisar o efeito de herbicidas baseados em Glifosato, o Roundup®, e do ácido aminometilfosfônico (do inglês: *aminomethylphosphonic acid* – AMPA) na proliferação celular e na expressão gênica, principalmente com relação às vias canônicas, em linhagens de CM RE+ e RE-.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar fatores biológicos *in vivo* e fatores químicos *in vitro* e sua influência no desenvolvimento e progressão de lesões mamárias.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a relação entre achados clínicos de mamografias e fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama;
- Determinar os fatores de risco envolvidos na definição da densidade mamária;
- Analisar como a densidade mamária e outros fatores de risco influenciam no desenvolvimento de lesões mamárias;
- Avaliar a viabilidade celular nas linhagens de câncer de mama RE+ (MCF-7) e RE- (MDA-MB-468), submetidas aos tratamentos com Roundup® e AMPA;
- Identificar genes diferencialmente expressos e sua modulação em ambas as linhagens, submetidas aos tratamentos (Roundup® e AMPA);
- Identificar globalmente quais as principais vias e processos afetados em ambas as linhagens, submetidas aos tratamentos (Roundup® e AMPA);
- Comparar as semelhanças e diferenças de expressão gênica entre as linhagens, após tratamento com Roundup®;
- Avaliar o nível de toxicidade do Roundup® e do AMPA, com base nas alterações encontradas em cada uma das linhagens;

- Identificar o efeito dos tratamentos em vias canônicas e avaliar a capacidade de causarem danos em funções celulares essenciais para a homeostase celular.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Câncer de mama

3.1.1 Epidemiologia

O câncer se tornou um grande problema de saúde pública, visto que a incidência, o número de mortes e o impacto econômico advindos desta doença vêm aumentando nas últimas décadas. Em 2012, uma estimativa mundial, realizada pelo projeto Globocan/Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (do inglês: *International Agency for Research on Cancer* – IARC) estimou cerca de 14 milhões de novos casos no mundo (exceto câncer de pele não melanoma) (INCA, 2015). Estima-se para 2017, cerca de 1.688.780 mortes advindas do câncer somente nos Estados Unidos da América (EUA) (ACS, 2017b). Atualmente, o câncer é a segunda maior causa de morte no Brasil, com 190 mil óbitos por ano (INCA, 2015). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima cerca de 600.000 novos casos de câncer para os anos de 2016-2017 no país (INCA, 2015).

Dentre as neoplasias, o CM possui a maior incidência e mortalidade na população feminina mundial (INCA, 2015). No Brasil, são esperados para os anos de 2016-2017, mais de 57 mil novos casos (INCA, 2015).

Além do CM, existem outras doenças que acometem as mamas. Estas doenças são muito heterogêneas, podendo apresentar uma ampla diversidade histológica, serem proliferativas ou não proliferativas, invasivas ou não invasivas, entre outras características (MASCADRI e FERRANTI, 2011; HARTMAN *et al.*, 2016).

As doenças benignas da mama são mais comuns que as malignas e são responsáveis por cerca de 90% das lesões mamárias (ONSTAD e STUCKEY, 2013). Apesar de benignas, apresentam risco potencial de se desenvolverem em um câncer,

principalmente quando associadas a uma história familiar de alta incidência da doença (HARTMAN *et al.*, 2016).

O CM é hoje uma doença de grande interesse para saúde pública em nível mundial, motivando ampla discussão em torno de medidas que promovam a prevenção, o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, a redução em sua morbidade e mortalidade (RYERSON e MASSETTI, 2017). Tal doença é a mais temida pelas mulheres devido a sua alta frequência, a seus efeitos psicológicos e sociais e seu ao tratamento, muitas vezes, mutilador (BERTOZZI *et al.*, 2017; MANSANO-SCHLOSSER *et al.*, 2017).

3.1.2 Evolução tumoral

Apesar das doenças benignas da mama muitas vezes serem consideradas como lesões pré-malignas, apenas uma parcela delas progride para um câncer (COLE *et al.*, 2010; GALEA, 2016). Lesões proliferativas sem atipias aumentam o risco para o desenvolvimento de um carcinoma ductal invasivo (CDI) em cerca de 2%, enquanto que lesões hiperplásicas com atipias aumentam em 3,5-5% (COLE *et al.*, 2010; BANE, 2013).

As alterações mamárias vão desde problemas congênitos a aqueles adquiridos posteriormente e ambos possuem uma ampla diversidade histopatológica. As anomalias não congênitas mais comuns na mama, incluindo formações tumorais são: fibroadenomas, tumores filóides, cistos, lesões esclerosantes, secreção mamilar, mastalgia, infecções mamárias, necrose da área gordurosa, hiperplasia lobular e ductal (típica e atípica) e os carcinomas lobular (CL) e ductal *in situ* (CDIS) (COLE *et al.*, 2010; GALEA, 2016).

Existem diferentes modelos que tentam explicar como se dá a evolução de uma lesão pré-maligna para um câncer invasivo propriamente dito. A teoria mais aceita foi desenvolvida em 1973 e se baseia na ideia de uma evolução progressiva, partindo da

unidade de ducto lobular terminal e seguindo para: hiperplasia celular colunar, hiperplasia ductal atípica, CDIS e, finalmente, o CDI (POLYAK, 2007; COLE *et al.*, 2010). Porém, sabe-se que nem sempre tal evolução ocorre. A partir do CDIS, por exemplo, tal progressão é variável, a depender de características histopatológicas da lesão. Acredita-se que apenas 30% dos CDIS evoluam, em um período de 30 anos, para uma lesão maligna (BANE, 2013) (POLYAK, 2007; BANE, 2013). A **Figura 1** traz o modelo mais simples de progressão tumoral do câncer de mama.

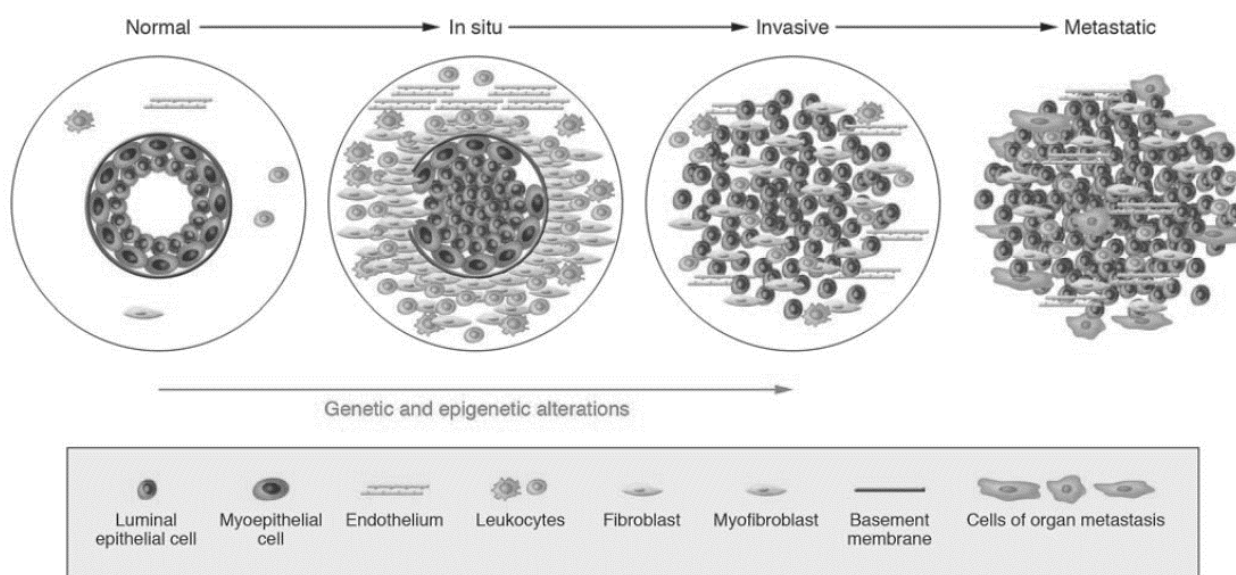


Figura 1: Modelo de progressão tumoral do câncer de mama. A ilustração mostra: condição normal, carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo e condição metastática. O esquema apresenta ainda os possíveis tipos celulares que participam do processo de evolução tumoral. FONTE: (POLYAK, 2007)

3.1.3 Fatores de risco

-Idade e etnia: o envelhecimento é considerado um forte fator de risco, visto que a incidência de tumores em mulheres jovens é menor, sendo que mulheres com mais de 40 anos apresentam 10 vezes mais chance de desenvolverem CM (OLDENBURG *et al.*, 2007). Além disso, mulheres negras são diagnosticadas em idades mais precoces,

porém mulheres brancas tem de 20-40% mais chances de desenvolverem a doença (59 e 63 anos, respectivamente) (OLDENBURG *et al.*, 2007; DESANTIS *et al.*, 2017).

-Fatores genéticos: o câncer propriamente dito é considerado uma doença de caráter genético e/ou hereditário. Para o CM, atualmente são conhecidos diversos *loci* que podem contribuir para sua origem familiar, sendo os mais importantes os genes BRCA1 e BRCA2 (*breast cancer gene 1 e 2*), que são considerados importantes supressores tumorais, envolvidos principalmente no reparo de DNA (ANDERSON *et al.*, 2014; NCBI, 2017b). Outros genes supressores tumorais com importante ação nos processos de regulação do ciclo celular, apoptose e reparo de DNA também se encontram frequentemente alterados, sendo eles: TP53 (*tumor protein p53*) (NCBI, 2017h), PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) (NCBI, 2017f), PALB2 (*partner and localizer of BRCA2*) (NCBI, 2017e); CDH1 (*cadherin1*) (NCBI, 2017d) (supressor tumoral envolvido no processo de adesão celular) e RAD51 (*RAD51 recombinase*) (NCBI, 2017g), ATM (*ATM serine/threonine kinase*) (NCBI, 2017a) e BRIP1 (*BRCA1 interacting protein C-terminal*) (NCBI, 2017c) (envolvidos no reparo de DNA) (NIC, 2002; SCHON e TISCHKOWITZ, 2017).

-Obesidade: existe uma direta relação entre CM e obesidade. Altos IMCs em mulheres na pré-menopausa protegem contra o risco de CM, porém tornam-se um fator de risco para mulheres na pós-menopausa, devido ao aumento do estradiol circulante (WOLIN *et al.*, 2010; COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST, 2012). Além disso, mulheres obesas tendem a apresentar respostas menos eficientes ao tratamento quimioterápico (WOLIN *et al.*, 2010; RAUSCH *et al.*, 2017).

-Menarca e menopausa: a menarca e a menopausa constituem períodos de importante alteração hormonal, com relação direta com o CM. A menarca aumenta os níveis de produção hormonal, dando início à atividade endócrina reprodutiva. Já a menopausa pontua a transição da mulher para a fase não reprodutiva, com substancial queda do hormônio estrogênio. A ocorrência da menarca em idades precoces, bem como da menopausa em idades muito avançadas, aumenta o risco de CM, o que pode ser devido ao longo período de exposição do tecido mamário ao estrogênio,

considerado como um potente mitógeno (COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST, 2012). O uso de terapia de reposição hormonal e a obesidade em mulheres pós-menopausa, é uma das causas do aumento dos níveis de estrogênio no sangue, tornando-se um fator de risco potencial para o CM (SPRAGUE *et al.*, 2011).

-Fatores reprodutivos: como anteriormente citado, a variação hormonal é um importante fator de risco para o desenvolvimento do câncer, incluindo tanto o efeito dos hormônios naturais (como o estrogênio) quanto daqueles advindos de fontes exógenas, como terapias de reposição hormonal, contraceptivos e até mesmo da dieta. Apesar de não ser totalmente claro como os hormônios influenciam no processo carcinogênico, diferentes teorias buscam explicar tal relação. A primeira delas é de que os hormônios provocam um maior nível de proliferação celular e conseqüente aumento no acúmulo de mutações, levando à carcinogênese. Outra explicação está relacionada ao fato do potencial genotóxico dos metabólitos hormonais aumentar o risco de CM (CAVALIERI *et al.*, 2000; OLDENBURG *et al.*, 2007).

Alguns outros fatores como nuliparidade, idade gestacional tardia e baixo número de filhos também são importantes fatores de risco para o CM (OLDENBURG *et al.*, 2007; SIBBERING e COURTNEY, 2016). Os mecanismos envolvidos na relação entre estes fatores e a carcinogênese não estão totalmente esclarecidos, mas estão em grande parte envolvidos com os níveis hormonais e com a lipossustituição que ocorre normalmente no corpo feminino principalmente devido à menarca, à menopausa e a outros eventos reprodutivos, (OLDENBURG *et al.*, 2007; PALMER *et al.*, 2014; SIBBERING e COURTNEY, 2016).

-Densidade mamária: a DM é medida pela proporção de tecido fibroglandular no tecido mamário (BOYD *et al.*, 2005). O mamograma contém áreas claras que representam os tecidos fibrosos e glandulares (área densa) e áreas escuras, que representam o tecido gorduroso (área não densa). A proporção entre estas medidas é considerada como a porcentagem de DM (ALBERT *et al.*, 2015; FJELDHEIM *et al.*, 2016; RICE *et al.*, 2016; YAGHJYAN *et al.*, 2016).

A sensibilidade do mamograma é altamente relacionada com a DM (Boyd et al, 2007). Densidades maiores que 70% podem mascarar lesões, a multifocalidade tumoral, um cancer bilateral não suspeito e ainda subestimar o tamanho tumoral (BOYD *et al.*, 2007; ALBERT *et al.*, 2015; BANSAL *et al.*, 2016).

Além disso, DM's maiores que 75% aumentam o risco de CM de 4-6 vezes, por isso tem sido consideradas um dos mais importantes fatores de risco para este câncer (CAGLAYAN *et al.*, 2015; ABDOLLELL *et al.*, 2016; AMADOU *et al.*, 2016; BUSANA *et al.*, 2016; FJELDHEIM *et al.*, 2016; RICE *et al.*, 2016; ZIEMBICKI *et al.*, 2017).

A DM pode ser influenciada pela idade, menopausa, antropometria, fatores hormonais, genéticos e reprodutivos, IMC, entre outros (CAGLAYAN *et al.*, 2015; AMADOU *et al.*, 2016; FJELDHEIM *et al.*, 2016).

3.1.4 Classificação histológica

Segundo a classificação de tumores da mama da Organização Mundial de Saúde (do inglês: *World Health Organization – WHO*), os tumores mamários são classificados em: tumores epiteliais, carcinomas de mama invasivo, tumores epiteliais-mioepiteliais, lesões precursoras, lesões proliferativas intraductais, lesões papilares, proliferações epiteliais benignas, tumores mesenquimais, tumores fibroepiteliais, tumores do mamilo e linfomas malignos (PATHOLOGY OUTLINES, 2016). A **Figura 2** apresenta os tumores mais frequentes na população, bem como suas subclassificações.

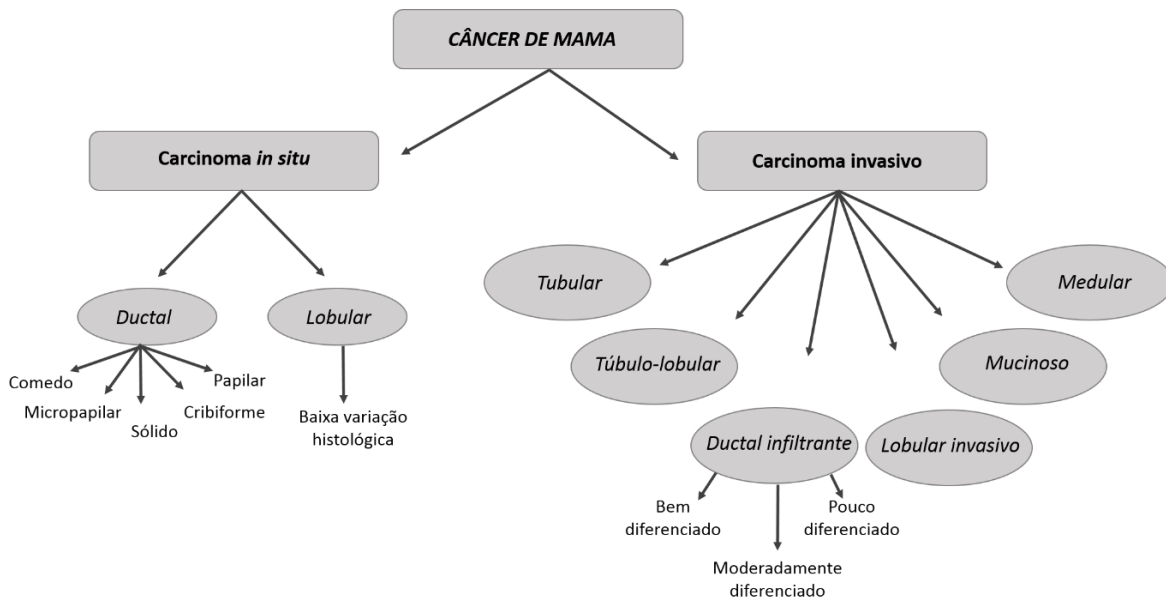


Figura 2: Classificação histológica dos principais subtipos de câncer de mama. O esquema demonstra a heterogeneidade dos tumores mamários baseados nos padrões de desenvolvimento da neoplasia. FONTE: Modificado de (MALHOTRA *et al.*, 2010).

O mais comum de todos os tumores mamários é o adenocarcinoma, que corresponde a 95% dos casos. Dentro deste grupo encontram-se os mais frequentes tumores invasivos: o CDI, que corresponde a 55% dos casos e o CL invasivo (CLI), que corresponde a 15% (MAKKI, 2015; MCCART REED *et al.*, 2015). Ambos se originam do mesmo segmento da unidade de ducto lobular terminal, destacando apenas que os carcinomas ductais originam-se dos ductos enquanto que os lobulares originam-se dos lóbulos (MAKKI, 2015). A **Figura 3** demonstra onde se dá o surgimento e o crescimento do CDI e do CLI.

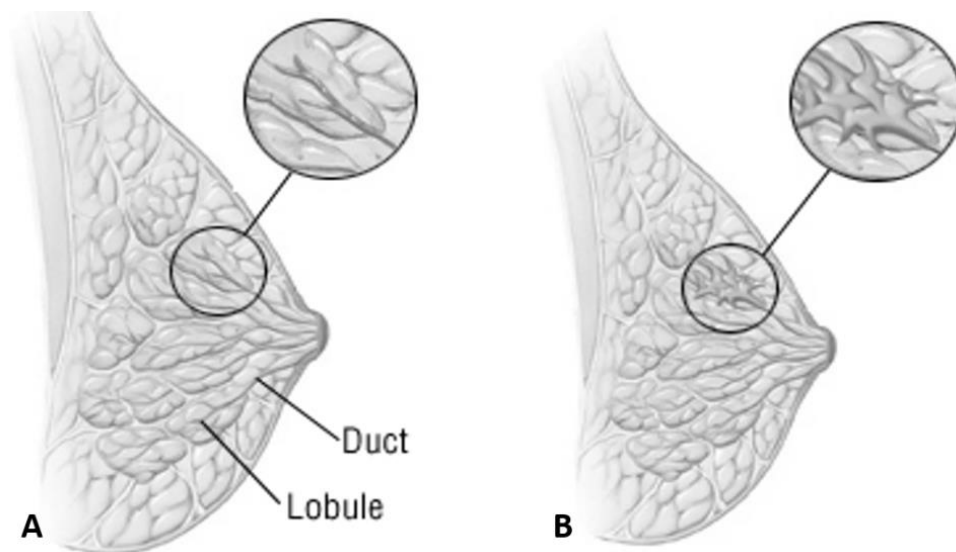


Figura 3: Origem do carcinoma ductal invasivo (A) e do carcinoma lobular (B). FONTE: (NEW HEALTH ADVISOR, 2017)

3.1.4.1 Receptor de Estrogênio (RE)

O RE representa o primeiro e permanece o mais importante biomarcador de prognóstico e predição no CM, pois ele fornece o índice de sensibilidade ao tratamento endócrino tanto com o tamoxifeno quanto com inibidores de aromatase. Aproximadamente 70-80% dos CMs expressam tal marcador (ANDERSON *et al.*, 2014; DAI *et al.*, 2016; OKUMURA *et al.*, 2017).

Tumores que possuem o receptor de estrógeno positivo (RE+) possuem um benefício substancial para a terapia endócrina, com redução de taxas de recorrência local, contralateral e à distância e redução da mortalidade por CM em 15 anos (HELDRING *et al.*, 2007; DAI *et al.*, 2016). Isto porque, o RE é o alvo direto das terapias endócrinas e tumores RE+ usam o esteroide estradiol como seu principal estímulo para crescimento (CIRUELOS GIL, 2014; DE MARCHI *et al.*, 2016).

O RE pertence à família dos receptores hormonais nucleares, que agem como fatores de transcrição ativados por ligantes. A sinalização por estrogênio resulta de um balanço

entre dois RE opostos: RE α (forma avaliada clinicamente) e RE β . RE α e RE β são codificados por dois genes distintos, sendo eles *ESR1* e *ESR2* (HELDRING et al., 2007). No CM, o RE tem papel importante na angiogênese, reparo de DNA, progressão do ciclo celular e apoptose (HELDRING et al., 2007; KOS e DABBS, 2016; OKUMURA et al., 2017).

3.1.4.1.1. Estrogênio: biossíntese e ação

O estrogênio é um hormônio esteroide sexual, envolvido em diversos processos fisiológicos que incluem a regulação do ciclo menstrual e reprodução, densidade óssea, função cerebral e mobilização do colesterol (LIANG e SHANG, 2013).

Existem descritos três tipos de estrogênio, sendo eles o 17 β -estradiol (E2- o mais comum), estrona (E1) e o estriol (E3) (LIANG e SHANG, 2013). O E1 e o E2 são secretados pelos ovários durante o ciclo menstrual com pequenas quantidades derivadas do tecido adiposo e das glândulas adrenais. O E3 é produzido principalmente pela placenta durante a gestação (LIANG e SHANG, 2013). Em mulheres na pré-menopausa, os estrogênios são produzidos principalmente pelos ovários e na pós-menopausa, são produzidos em tecidos periféricos, como no tecido adiposo (SAMAVAT e KURZER, 2015). A sua produção também pode ocorrer no tecido ósseo, fígado e cérebro (VRTACNIK et al., 2014)

A síntese ovariana se inicia na teca interna do ovário, pela síntese de androstenediona a partir do colesterol. Tal composto atravessa a membrana basal das células granulosas, onde é convertido em estrona ou em testosterona e na etapa seguinte, catalisada pela arotamase, é convertido a estradiol (NELSON e BULUN, 2001).

A ação do estrógeno se dá por meio da ligação nos RE no citoplasma, o que causa uma mudança conformacional que permite sua translocação para o núcleo, onde irá

formar complexos homo ou heterodiméricos para se ligar aos elementos responsivos ao estrógeno (ERE) presentes nos promotores dos genes alvo (LIANG e SHANG, 2013).

A ação indireta se dá quando os genes alvos não possuem o ERE. Dessa forma, o RE e o estrógeno podem ainda formar monômeros e se ligarem diretamente aos promotores gênicos com auxílio de outros fatores de transcrição, como o Sp1 e o Ap1 (LIANG e SHANG, 2013; VRTACNIK *et al.*, 2014). Para ambos os casos, após a ligação ao promotor, na presença de co-reguladores (que vão facilitar a transcrição gênica a partir de modificações na cromatina) e da maquinaria transcricional, inicia-se a transcrição gênica (DEMAYO *et al.*, 2002; LIANG e SHANG, 2013).

3.1.4.2 Receptor de Progesterona (RP)

O RP existe em duas isoformas primárias codificadas pelo mesmo gene, RP-A e RP-B (MC CORMACK *et al.*, 2007). O RP é um membro da superfamília dos receptores de hormônios esteroides e é um efetor negativo da sinalização de RE. Assim, o RP é comumente expresso juntamente com RE, sendo que pelo menos 50% dos tumores apresentam tal característica (MC CORMACK *et al.*, 2007). Tumores que expressam RP mas não o RE são incomuns e representam uma minoria de todos os casos de CM (BAE *et al.*, 2015; DAI *et al.*, 2016). O RP liga-se ao DNA, diretamente, pelos elementos responsivos a progesterona ou indiretamente, por interações com outros fatores de transcrição. Esse receptor potencializa a proliferação de glândulas mamárias, podendo atuar como desencadeador do CM (KOS e DABBS, 2016).

Alguns estudos indicam maior benefício para a terapia endócrina em tumores RE+ e RP+ (CIRQUEIRA *et al.*, 2011). Em contraste à capacidade de predição controversa do RP, a significância prognóstica para este marcador é bem estabelecida, com subgrupos de CM RE+ e RP+ demonstrando melhores resultados (CIRQUEIRA *et al.*, 2011). Há evidências de que no CM metastático a resposta ao tratamento anti-estrogênio é

melhor entre pacientes com tumores que expressam RE e RP *versus* aqueles que mostram apenas positividade para RE (BAE *et al.*, 2015).

3.1.4.3 Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2)

O HER2 pertence à família dos receptores de fatores de crescimento epidermais (do inglês: *epidermal growth factor receptors* - EGFR), juntamente com HER1, HER3, e HER4 (INOUE e FRY, 2016). Os membros dessa família regulam o crescimento, sobrevivência, diferenciação e migração celular, assim como outras respostas celulares por meio de diversas vias de sinalização que promovem o crescimento tumoral (KOS e DABBS, 2016).

HER2 é uma tirosina quinase ligada à membrana e sua expressão tem sido associada à maior agressividade biológica do tumor, metástase linfonodal, resistência a alguns tipos de tratamento e piores prognósticos. Isto ocorre porque a proteína de membrana codificada por *HER2* permite que as células tumorais se desenvolvam mais rápido e aumentem a sua proliferação, tornando os tumores mais agressivos (MITRI *et al.*, 2012; HADI e JAMAL, 2015; DAI *et al.*, 2016; INOUE e FRY, 2016). Além disso, tem-se sugerido que exista uma relação entre a superexpressão de *HER2* e a resistência ao tratamento endócrino (CIRUELOS GIL, 2014). A amplificação do gene que codifica a proteína é considerada o principal mecanismo de superexpressão em tumores positivos para este biomarcador (HER2+) (TOSS e CRISTOFANILLI, 2015). A amplificação e superexpressão estão fortemente correlacionados e ocorrem em aproximadamente 20–30% de todos os CMs humanos. Por tal motivo, o *HER2* é considerado alvo molecular para terapias específicas, como trastuzumab e lapatinib (MITRI *et al.*, 2012; DAI *et al.*, 2016).

3.1.4.4 Proteína Ki67

A proteína Ki67 é universalmente expressa entre as células em proliferação e ausente em células em G0, sendo expressa durante as fases do ciclo celular G1, S e G2, com um pico durante a mitose (INWALD *et al.*, 2013; YADAV *et al.*, 2015).

Embora pouco se saiba sobre a função exata da proteína, o *Ki67* tem sido considerado um bom marcador de proliferação, prognóstico e predição. Além disso, a análise é fácil e barata de ser realizada (KOS e DABBS, 2016; YUAN *et al.*, 2016). Estudos demonstram que o percentual de células positivas para Ki67 pode ser usado para estratificar pacientes em grupos de bom ou mau prognóstico, mostrando-se um potencial alvo para escolha do melhor alvo terapêutico (YADAV *et al.*, 2015).

3.1.4.5 Proteína p53

A proteína p53, uma supressora tumoral, é codificada pelo gene *TP53* e é considerada uma importante reguladora do ciclo celular, atuando sobre o crescimento, multiplicação, proliferação, apoptose e, estabilidade cromossomal (LIU *et al.*, 2014; SCHON e TISCHKOWITZ, 2017). Tal gene encontra-se mutado em 50% de todos os tumores e no CM são observadas mutações em 18%-25% dos cânceres primários (LIU *et al.*, 2014; TOSS e CRISTOFANILLI, 2015; SCHON e TISCHKOWITZ, 2017).

A p53 desempenha um papel importante no prognóstico do CM. Sua superexpressão resulta em um fenótipo mais agressivo, tumores pouco diferenciados, frequente expressão negativa do RE e RP, altas taxas de proliferação e alto grau histológico e nuclear, o que leva a um prognóstico ruim, diminuindo significativamente a sobrevida global, principalmente naqueles pacientes com tumores basais (YADAV *et al.*, 2015; BUYUKPINARBASILI *et al.*, 2016). Apesar de tais características, tumores que

superexpressam *TP53* têm mostrado boa resposta à quimioterapia (BERTHEAU *et al.*, 2013; UJI *et al.*, 2014). Além disso, a coexistência com HER2 foi relacionada à recidiva precoce e morte em um período menor após a cirurgia (YADAV *et al.*, 2015).

Apesar da sua importância, a imuno-histoquímica do p53 ainda não é amplamente utilizada. Atualmente tem sido mais utilizado como biomarcador auxiliar em pacientes que apresentam tumores triplo negativos, ou seja, expressão negativa para RE, RP e HER2 (RAKHA e GREEN, 2017). Nestes casos, os tumores triplo-negativos podem ser divididos em alta ou baixa expressão de p53, frequentemente com um ponto de corte de 10% (TANG e TSE, 2016; RAKHA e GREEN, 2017).

3.1.4.6 Outros biomarcadores

Devido à alta heterogeneidade do CM e os avanços nas técnicas de biologia molecular, principalmente referente a análise de expressão gênica em larga escala (RAKHA e GREEN, 2017), frequente são descobertos e adicionados novos biomarcadores auxiliares com o intuito de facilitar o diagnóstico e auxiliar na escolha do melhor tratamento a ser utilizado.

A expressão das citoqueratinas 5 (CK5) e/ou 5/6 (CK5/6) no câncer de mama está frequentemente associado com maior expressão de marcadores de proliferação como o Ki67 e p53 (TANG e TSE, 2016). A expressão de CK5 pode ser encontrada tanto em tumores luminais quanto basais, porém é mais utilizado em casos de tumores basais, por estarem relacionados a um pior prognóstico e recidiva (AXLUND *et al.*, 2013).

O receptor de andrógenos (do inglês, *androgen receptors- AR*) é um receptor nuclear de esteroides, muito frequente expresso em tumores mamários, sendo ainda mais comuns que o RE. Apesar do seu papel no CM ainda não está totalmente claro, sabe-se que está relacionado a um melhor prognóstico e menor chance de recorrência (HICKEY *et al.*, 2012; TANG e TSE, 2016).

3.1.5 Classificação molecular

Devido à alta heterogeneidade da doença quanto à morfologia, ao prognóstico, potencial de metástase e a diferentes respostas ao tratamento, os marcadores citados anteriormente são de fundamental importância para definição de terapia e prognóstico, porém nem todos os tumores podem ser assim classificados, o que torna ainda mais difícil a definição da melhor prática terapêutica.

Ao nível molecular, o CM pode ser classificado como: luminal A, luminal B, superexpressão do HER2, basal e triplo negativo não basalóide, sendo o último, menos usado. A classificação de um tumor nestes subtipos moleculares inclui a determinação do nível de expressão de RE, RP e HER2 e, algumas vezes, de outros marcadores como Ki67, p53, CD5, EGFR e, mais recentemente, o *claudin-low* (MALHOTRA *et al.*, 2010; CIRQUEIRA *et al.*, 2011; BANE, 2013). A **Tabela 1** apresenta os subtipos moleculares, bem como o padrão de imunomarcção de cada um deles.

Tabela 1: Subtipos moleculares do câncer de mama e seu padrão de imunomarcção.

<i>Subtipo molecular</i>	<i>Classificação Padrão de imunomarcção</i>
<i>Luminal A</i>	RE+ e/ ou RP- HER2- Ki67<14%
<i>Luminal B</i>	RE+ e/ ou RP+ HER2- Ki67 ≥14%
<i>Superexpressão de HER2</i>	RE-

<i>Subtipo molecular</i>	<i>Classificação Padrão de imunomarcção</i>
	RP- HER2+
<i>Basalóide</i>	RE- RP- HER2- CK5+ e/ou EGFR+
<i>Triplo negativo não basalóide</i>	RE- RP- HER2- CK5- EGFR-

FONTE: (CIRQUEIRA *et al.*, 2011)

Os tumores luminal A representam cerca de 70% dos tumores de mama e são os que possuem melhor prognóstico. São bastante semelhantes aos tumores luminal B, que representam cerca de 10% dos tumores, porém os últimos possuem uma resposta mais variável ao tratamento e apresentam um pior prognóstico do que os tumores luminal A (ANDERSON *et al.*, 2014; MAKKI, 2015).

Os tumores com superexpressão de HER2 representam cerca de 5-15% dos CMs e tem características mais similares aos tumores com classificação luminal do que com os tumores basalóides. Geralmente apresentam alta expressão de Ki67, mutações em *TP53*, frequente presença de metástase linfonodal e prognóstico ruim (ANDERSON *et al.*, 2014; MAKKI, 2015).

Quanto aos tumores basalóides, também chamados de triplo negativos, podem ser classificados de diferentes maneiras. A **Tabela 1**, apresentada anteriormente, traz duas divisões, sendo elas o basalóide propriamente dito e os triplo negativos não basalóides, que se diferenciam por outros marcadores que não o RE, RP e HER2. Os triplo negativos não basalóides frequentemente possuem mutações nos genes *BRCA1* e

TP53 e, conseqüentemente, possuem um pior prognóstico (ANDERSON *et al.*, 2014; HADI e JAMAL, 2015; MAKKI, 2015). A **Figura 4** apresenta as principais diferenças entre os tumores ER+ e ER-, baseados em critérios gerais.

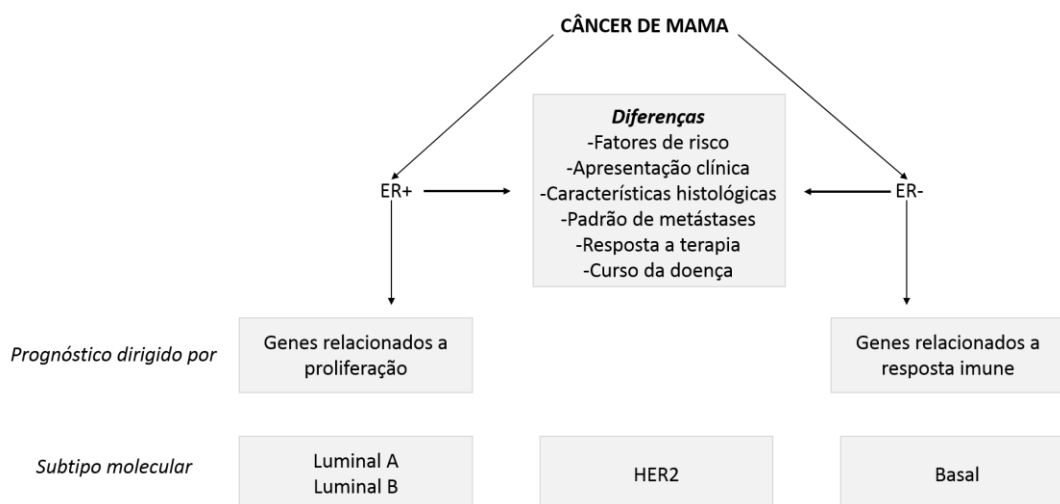


Figura 4: Diferença entre os tumores de mama RE+ e RE-. Estes dois tumores são considerados doenças distintas, com diferente padrão molecular, bem como diferentes fatores de risco, apresentação clínica, características histológicas, padrão de metástase, resposta a terapia e curso da doença. FONTE: Adaptado de (WEIGELT e REIS-FILHO, 2014).

3.1.6 Diagnóstico e prevenção

A melhor forma de se evitar morte por CM é a prevenção. As triagens tanto populacionais como para indivíduos inclusos em grupos de risco reduzem drasticamente o tamanho tumoral no momento do diagnóstico (WELCH *et al.*, 2016), como pode ser visto na **Figura 5**.

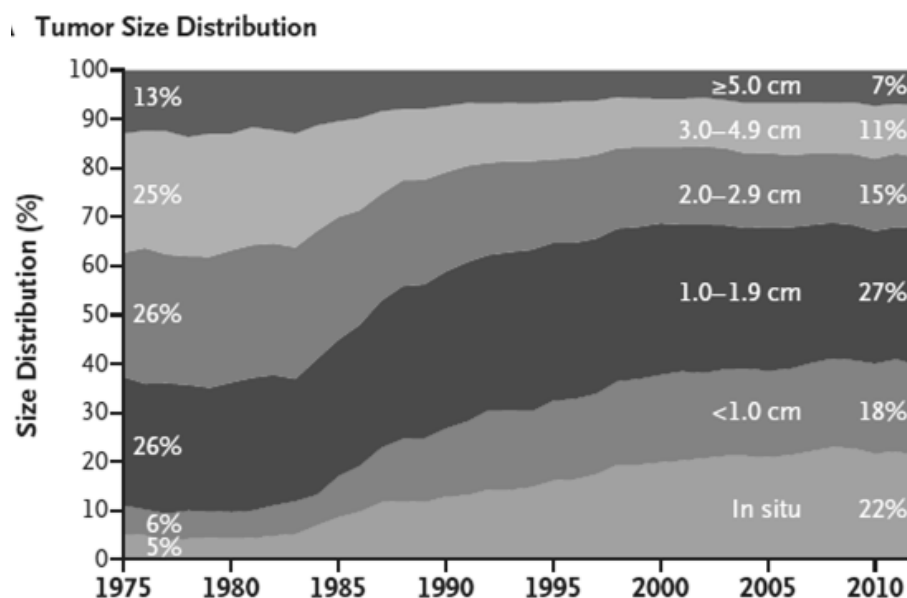


Figura 5: Distribuição dos tumores de mama ao longo do tempo. A porcentagem apresenta a frequência dos tamanhos tumorais encontrados desde o ano de 1975 a 2010. Devido ao maior acesso a mamografias, é possível observar uma redução na frequência de grandes tumores. FONTE: (WELCH et al., 2016).

Ainda se discute muito sobre os reais riscos do exame mamográfico, visto que o mesmo se baseia em radiação. Apesar do risco da exposição frequente aos raios-X, o risco cumulativo é baixo, apresentando algum dano por volta de 1-10 a cada 100.000 mulheres. Tal risco pode ser influenciado ainda tanto pela idade quanto pela frequência de realização do exame, o que o torna insignificante diante dos benefícios oferecidos pelo diagnóstico precoce (LAUBY-SECRETAN *et al.*, 2015).

Atualmente, a Sociedade Americana de Câncer (do inglês: *American Cancer Society - ACS*) apresenta as seguintes indicações para realização da mamografia:

- Mulheres entre 40 e 44 anos: caso desejem, podem começar a realizar mamografias preventivas;
- Mulheres entre 45-54: devem fazer mamografias todos os anos;

- Mulheres com 55 anos ou mais: podem continuar com mamografias anuais, ou realizá-las a cada dois anos;
- A triagem deve continuar por toda a vida, especialmente em mulheres saudáveis e que tem uma expectativa de vida maior que 10 anos (ACS, 2017a).

3.1.7 Tratamento e prognóstico

O CM possui prognóstico relativamente bom, se diagnosticado e tratado oportunamente. No entanto, suas taxas de mortalidade continuam elevadas no Brasil (14 óbitos a cada 100 mil mulheres em 2013). A sobrevida em cinco anos na maioria dos países desenvolvidos foi de aproximadamente 85% durante o período de 2005 a 2009 (INCA, 2015).

Fatores como idade e tamanho do tumor são cruciais para o prognóstico, como pode ser visto na **Figura 6**. Tumores descobertos em idades mais precoces tendem a ser mais agressivos do que aqueles diagnosticados em idades mais avançadas, bem como tumores menores tendem a ter um melhor prognóstico do que tumores grandes (WELCH *et al.*, 2016; LANNIN e WANG, 2017). Características histopatológicas tendem a ser mais importantes no prognóstico do que o tamanho tumoral e a idade por si só (WELCH *et al.*, 2016; LANNIN e WANG, 2017). Com o avanço das técnicas de triagem, os tumores passaram a ser diagnosticados quando ainda pequenos, o que favorece o tratamento (WELCH *et al.*, 2016).

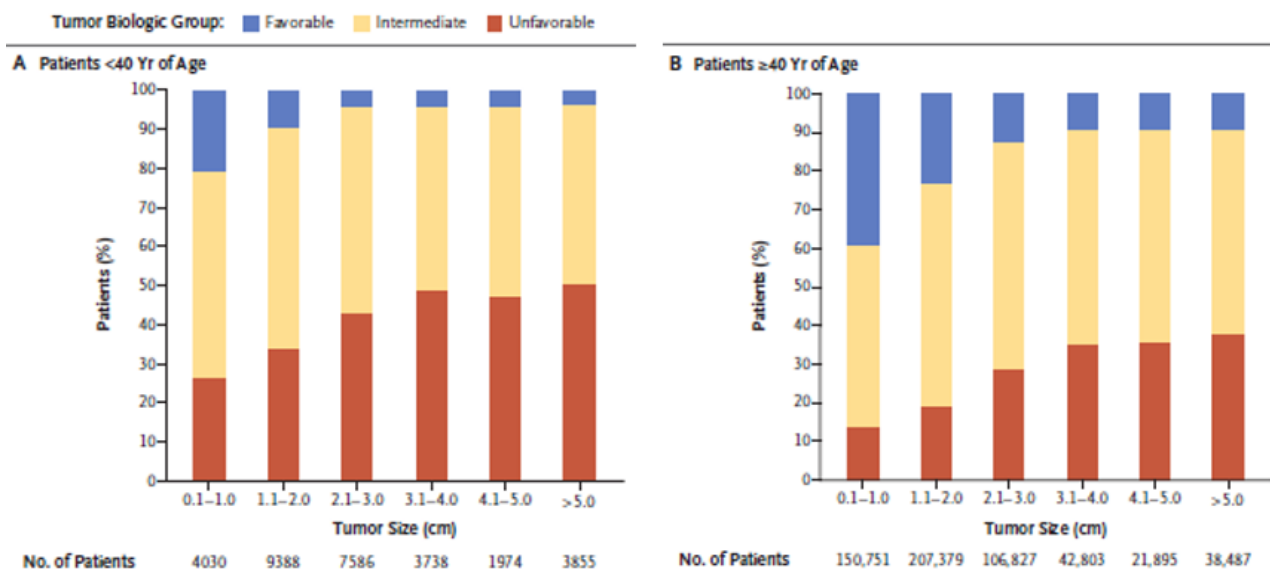


Figura 6: Características biológicas de acordo com o tamanho do tumor. FONTE: (LANNIN e WANG, 2017)

Diferentes estratégias de tratamento são comumente aplicadas, incluindo intervenções locais (cirurgia/radioterapia) e tratamentos sistêmicos (quimioterapia e terapia hormonal ou tratamentos direcionados) (BOZORGI *et al.*, 2015). Características clinicopatológicas como tamanho do tumor, estado de acometimento linfonodal e invasão linfovascular são fatores de risco associados ao prognóstico (GYORFFY *et al.*, 2015). Outras características como grau histopatológico, estado do RE, RP, HER2 e taxa de proliferação (Ki67) estão associadas tanto com o prognóstico quanto com a sensibilidade às diferentes modalidades de tratamento (GYORFFY *et al.*, 2015).

Para tumores luminal A, o tratamento mais indicado é a terapia endócrina ou quimioterapia; para tumores luminal B, indica-se a terapia endócrina com ou sem quimioterapia; para os casos de HER2+, é utilizado como tratamento a quimioterapia, terapia anti-HER2 e terapia endócrina; para aqueles tumores considerados basais, somente a quimioterapia é utilizada para o tratamento (TOSS e CRISTOFANILLI, 2015; GOSS *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2017).

Enquanto pacientes com CM primário são tratados com sucesso, ainda é claramente necessário o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de tumores recorrentes e invasivos (AESOY *et al.*, 2015). A **Figura 8** mostra as estratificações clínicas e as ferramentas disponíveis para a obtenção de prognóstico e predição. As ferramentas citadas baseiam-se em análise genética e características do paciente e do tumor, para classificar risco de recorrência e prognóstico (GYORFFY *et al.*, 2015).

Terapias endócrinas adjuvantes têm provado ser um método altamente efetivo para reduzir o risco de recorrência da doença, prevenindo metástases locais e à distância e reduzindo a mortalidade (CUZICK *et al.*, 2015). Apesar dos benefícios comprovados da terapia endócrina adjuvante em mulheres com CM com expressão positiva dos receptores hormonais, ainda é discutível qual o melhor plano para uso das terapias endócrinas, visto que recidivas ainda ocorrem em 5 anos mesmo após o tratamento inicial (CUZICK *et al.*, 2015). Buscando avaliar o benefício de manter ou implementar a terapia endócrina por mais de 5 anos, o estudo de Goss *et al.* (2016) concluiu que mulheres na pós-menopausa com tumores RE+ são beneficiadas com o uso de inibidores de aromatase por mais 5 anos depois do tratamento inicial, diminuindo as taxas de recorrência da doença.

Como mostrado na **Figura 7**, tumores mais agressivos, grau 3 e/ou basais apresentam uma pior resposta à terapia, além da baixa disponibilização de tratamentos e ferramentas que auxiliam a prever o prognóstico e a resposta terapêutica. Em casos mais agressivos, 90% dos pacientes com CM morrem em consequência de metástases comumente encontradas no tecido ósseo (RAUSCH *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2017).

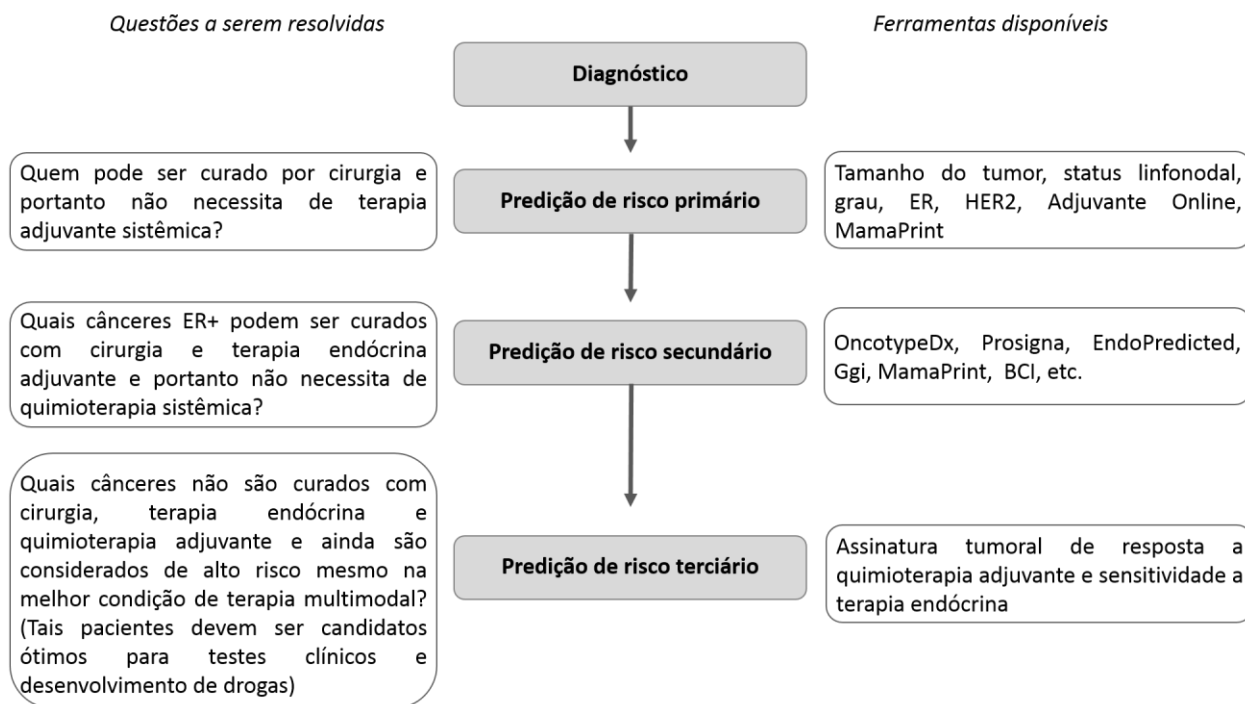


Figura 7: Estratificação de risco e ferramentas de predição e prognóstico atuais. FONTE: Modificado de (GYORFFY *et al.*, 2015)

3.2 Herbicidas

Tumores de mama RE+ normalmente apresentam boa resposta à terapia, principalmente quando há o tratamento adjuvante com terapias hormonais como com tamoxifeno e inibidores da aromatase. Tratamentos que bloqueiam tal receptor conseguem inibir o crescimento tumoral, levando à redução tumoral (CUZICK *et al.*, 2015; DAI *et al.*, 2016).

Devido à alta importância do RE para o CM, estudos recentes têm demonstrado que herbicidas como o glifosato têm potencial de atuarem como desreguladores endócrinos em diversos processos, reguladas primariamente por hormônios, como desregulação da atividade de linhagens placentárias, diferenciação sexual em animais e no processo

gestacional (YOUSEF *et al.*, 1995; DARUICH *et al.*, 2001; BENACHOUR *et al.*, 2007). Além disso, estudos demonstram que o glifosato pode atuar de maneira semelhante ao estrogênio e, conseqüentemente, influenciar no desenvolvimento e progressão do CM (HOKANSON *et al.*, 2007; THONGPRAKAISANG *et al.*, 2013; MESNAGE *et al.*, 2017).

3.2.1 Histórico

O composto *N*-(phosphonomethyl)glycine foi inicialmente descoberto em 1950 por Henry Martin da empresa *Cilag*, porém por não demonstrar a atividade terapêutica que se desejava, deixou de ser intensamente estudado. Por volta de 1964, uma fabricante de herbicidas, a *Stauffer Chemical Company* patentou tal produto como um quelador de metais (magnésio, cobre e zinco) (KOMIVES e SCHRÖDER, 2016). Infelizmente, a empresa falhou em identificar tal composto como um poderoso herbicida, devido ao seu curto tempo de ensaios (cerca de 5 dias), sendo que normalmente, o composto começa a apresentar efeito após pelo menos uma semana (SZÉKÁCS e DARVAS, 2012; KOMIVES e SCHRÖDER, 2016).

Foi somente cerca de 10 anos depois que a empresa *Monsanto* apresentou interesse pelo composto, devido à sua metabolização formar o AMPA, o qual foi previamente estudado pela *Monsanto* como um potencial herbicida. Diante disso, a empresa pesquisou o *N*-(phosphonomethyl)glycine como possível herbicida, e as pesquisas demonstraram sucesso na inibição do crescimento de ervas daninhas (MYERS *et al.*, 2016).

Assim, na década de 70 tal composto passou a ser chamado de glifosato. Em 1974, foi solicitado o registro de patente por John Edward Franz (registro sob número US3799758-A) e assim, introduziu-se no mercado o produto Roundup®, como uma formulação de sal de isopropilamina com surfactantes, sendo o mais comum deles a

polioxietilenamida (POEA) (JOHN, 1974; SZÉKÁCS e DARVAS, 2012; KOMIVES e SCHRÖDER, 2016; MYERS *et al.*, 2016).

Inicialmente as vendas do Roundup® não eram tão grandes, porém, após o conhecimento de que se tratava de um herbicida de baixo preço, baixa toxicidade para mamíferos e alta eficácia, passou a ser considerado o herbicida ideal, sendo atualmente, o mais utilizado em todo o mundo (KOMIVES e SCHRÖDER, 2016).

3.2.2 Comercialização

Em 1987, apenas 10 anos depois de ser patenteado, mais de 3 milhões de quilogramas (Kg) do Roundup® já haviam sido utilizados. Em 1996, as vendas expandiram de forma surpreendente devido ao surgimento das primeiras plantas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato, porém seu uso correspondia a menos de 4% do volume total de herbicidas utilizado. Já em 2009, seu uso cresceu para mais de 50% (MYERS *et al.*, 2016). Em 2014, estima-se que foram utilizados mais de 100 milhões de Kg do glifosato, sendo que só na última década foi utilizado cerca de 2/3 de todo produto utilizado até hoje no mundo (REDDY e NANDULA, 2012; MYERS *et al.*, 2016).

Atualmente são reportados cerca de 750 produtos compostos por glifosato, sendo a marca Roundup® a mais comum, estando presente em mais de 120 países. No Brasil existe atualmente 7 diferentes tipos de Roundup®'s sendo eles: Roundup® WG, Ultra, Transorb R, Transorb, Original, Original Di e o Roundup® Ready (específico para plantas geneticamente modificadas) (DE AVILA *et al.*, 2017; IARC, 2017; MONSANTO, 2017).

Conforme o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o uso de agrotóxicos no Brasil passou de 206.591,7 toneladas em 2005 para 508.556,8 em 2014, sendo dessa quantidade, 294.915,53 toneladas somente de herbicidas. Quanto ao glifosato,

os dados mostram que em 2005 foram vendidas cerca de 60 mil toneladas, tendo um grande acréscimo em 2012, com 186.483,3 toneladas e em 2014, com 193.947,9 toneladas, correspondendo a 65,8% de todos os agrotóxicos utilizados no Brasil. A **Figura 8** apresenta o consumo em toneladas dos principais princípios ativos de agrotóxicos no Brasil. É possível observar, que além da vasta maioria do uso ser de glifosato, este consumo ainda vem aumentando enormemente nos últimos anos (IBAMA, 2016).

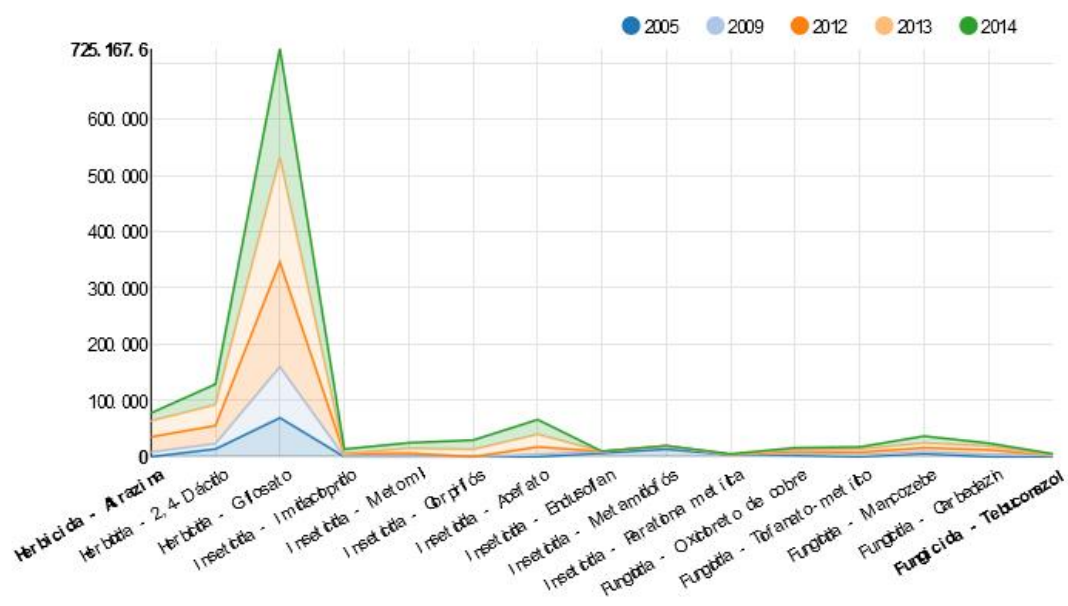


Figura 8: Consumo de agrotóxicos no Brasil, no período de 2005-2014. FONTE: (IBAMA, 2016).

3.2.3 Descrição e composição química dos herbicidas baseados em glifosato

O glifosato é um herbicida organofosforado, de amplo espectro, pós emergente, não seletivo, sistêmico, com capacidade de matar ou inibir o crescimento de plantas e ainda atua como disseccante (IARC, 2017). É identificado pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*- IUPAC) como ácido 2-[(fosfonometil)amino] acético (Chemical Abstracts Service- CAS: 1071-

83-6). Possui fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ e peso molecular de 169.073 g/mol. É encontrado como um sólido cristalino, incolor e inodoro (HAN, H. *et al.*, 2016; IARC, 2017). A **Tabela 2**, traz uma descrição químico-física completa do glifosato.

Tabela 2: Propriedades químico-físicas do glifosato.

Propriedades	Glifosato
Nomenclatura (IUPAC*)	Ácido 2-[(fosfonometil)amino] acético
CAS**	1071-83-6
Grupo químico	Organofosforado
Fórmula química	$C_3H_8NO_5P$
Massa molar (g.mol ⁻¹)	169.073 g/mol
Polaridade	Polar
Ponto de fusão (°C)	184,5 °C
Ponto de ebulição (°C)	187 °C
Solubilidade em água (mg.L ⁻¹)	1.01g/100ml (20°C)

* IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*; **CAS: *Chemical Abstracts Service*.

O Roundup® é a forma complexada do glifosato contendo surfactantes não iônicos. O surfactante, além de permitir uma maior absorção do composto pelas plantas, pode causar ecotoxicidade. A toxicidade do glifosato e do surfactante se torna ainda mais evidente quando atuam em sinergismo (SZÉKÁCS e DARVAS, 2012).

Curiosamente, a maioria dos surfactantes que compõem os herbicidas baseados em glifosato (do inglês: *glyphosate based herbicides* – GBHs) são mantidos como segredo industrial. Sabe-se que comumente são usados compostos como POEA, taloamina etoxilada, alquil poliglicosídeo ou destilados de petróleo, muitos destes considerados inertes (RICHARD *et al.*, 2005; MYERS *et al.*, 2016). Porém, a falta de informações sobre a exata composição dos GBHs impede que determinados estudos sejam realizados para verificar se de fato são inertes, tanto individualmente quanto quando complexados (MYERS *et al.*, 2016).

3.2.4 Modo de ação e degradação

A absorção do glifosato se dá pela penetração rápida do composto através da cutícula das folhas, seguida por uma absorção lenta pelo simplasto. Esta entrada pode se dar tanto por difusão passiva como por um sistema de transporte endógeno. O tempo deste processo poderá variar dependendo da espécie e idade da planta, bem como de condições ambientais e da concentração do herbicida (GOMES *et al.*, 2014).

Quando aplicado na região foliar da planta, o herbicida é translocado das folhas (local de síntese dos açúcares) através do sistema vascular para locais com maior atividade metabólica como tecidos meristemáticos (raízes e novos brotos) (MCQUEEN *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2014). Os sintomas pós aplicação desenvolvem-se lentamente, com efeito de morte podendo variar de dias até várias semanas. Alguns dias após a aplicação há uma redução dos níveis de fotossíntese com aparente clorose foliar seguida de necrose, bem como enrugamento e má formações nas áreas de rebrotamento, retardo no crescimento, necrose do meristema e do rizoma, além de aumento no estresse oxidativo (KOMIVES e SCHRÖDER, 2016).

O exato mecanismo de ação do glifosato foi apenas descoberto em 1980 por Steinrücken (STEINRUCKEN e AMRHEIN, 1980). Comprovou-se que seu modo de atuação é baseado na via do chiquimato, essencial para a síntese de aminoácidos aromáticos essenciais e, conseqüentemente, de pigmentos como flavonoides e antocianinas (STEINRUCKEN e AMRHEIN, 1980; KWIATKOWSKA *et al.*, 2016). O glifosato, por inibição competitiva, bloqueia a síntese da enzima 5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato sintase (do inglês: *5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase* - EPSPS), impedindo a formação do corismato, a partir do qual são formados os aminoácidos aromáticos essenciais triptofano, fenilalanina e tirosina (**Figura 9**). Tal processo ocorre em plantas, fungos e em algumas bactérias (STEINRUCKEN e AMRHEIN, 1980; YAMADA e CASTRO, 2004; SZÉKÁCS e DARVAS, 2012; KOMIVES e SCHRÖDER, 2016; KWIATKOWSKA *et al.*, 2016).

Além dos efeitos diretos sobre a via do chiquimato, outras alterações ocorrem. Entre as principais pode-se citar alterações no processo fotossintético e na produção de clorofila, metabolismo de carbono e nitrogênio, estresse oxidativo, entre outros (GOMES *et al.*, 2014).

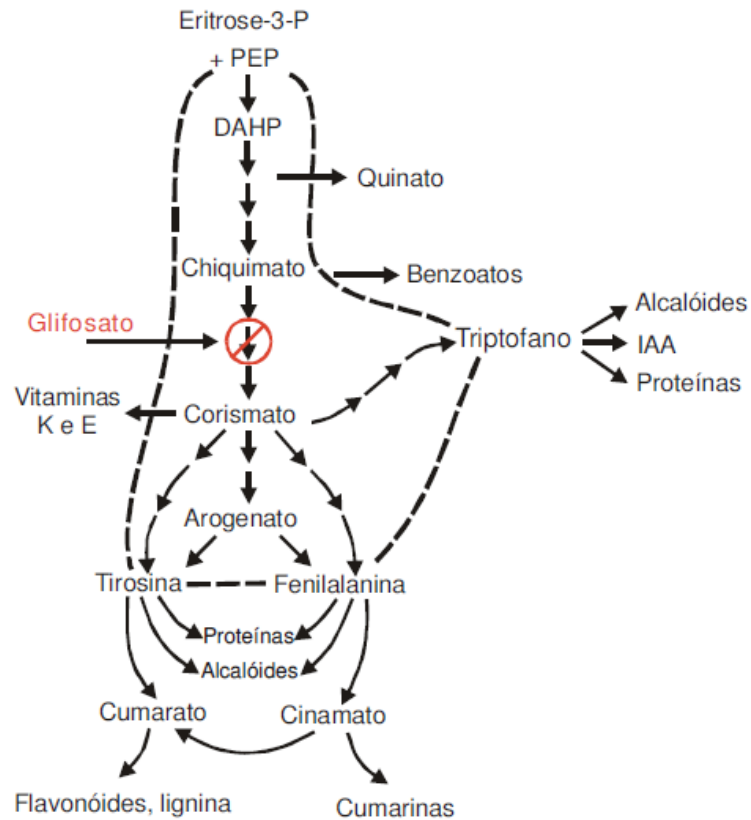


Figura 9: Via do chiquimato e sua inibição por glifosato. FONTE: (YAMADA e CASTRO, 2004)

Apesar da enzima EPSPS ser o único alvo conhecido e comprovado, o mecanismo preciso de como o glifosato leva à morte da planta não está totalmente esclarecido. O que se sabe é que depois que o alvo do inibidor é afetado, a morte pode ocorrer devido a: 1) acumulação ou maior disponibilidade do substrato da via inibida; 2) perda do produto final gerado pela via inibida ou 3) diversos efeitos colaterais devido à desregulação dessa via. Assim, a morte da planta pode se dar não apenas por

processos biológicos diretamente afetados, mas também por aqueles associados à toxicidade do glifosato (ZABALZA *et al.*, 2017).

O glifosato pode ser degradado no solo por microorganismos, através de diferentes vias. Pouco se sabe sobre a degradação do glifosato em plantas, porém ambos os organismos apresentam mecanismos semelhantes (REDDY *et al.*, 2004). A via mais utilizada é através da clivagem do glifosato pela enzima glifosato oxireductase, formando o glioxilato e o AMPA, sendo que o último será degradado em metilalanina e fosfato inorgânico pela enzima C-P liase. Tanto o glioxilato quanto a metilalanina permitem o crescimento de microorganismos. Alternativamente, pode ocorrer a degradação pela glicina oxidase, gerando produtos similares à via anterior. Uma segunda via de degradação é pela enzima C-P liase que faz a quebra do fosfato inorgânico do glifosato, produzindo a sarcosina, que será degradada em formaldeído e glicina (**Figura 10**) (DUKE *et al.*, 2012; KWIATKOWSKA *et al.*, 2016).

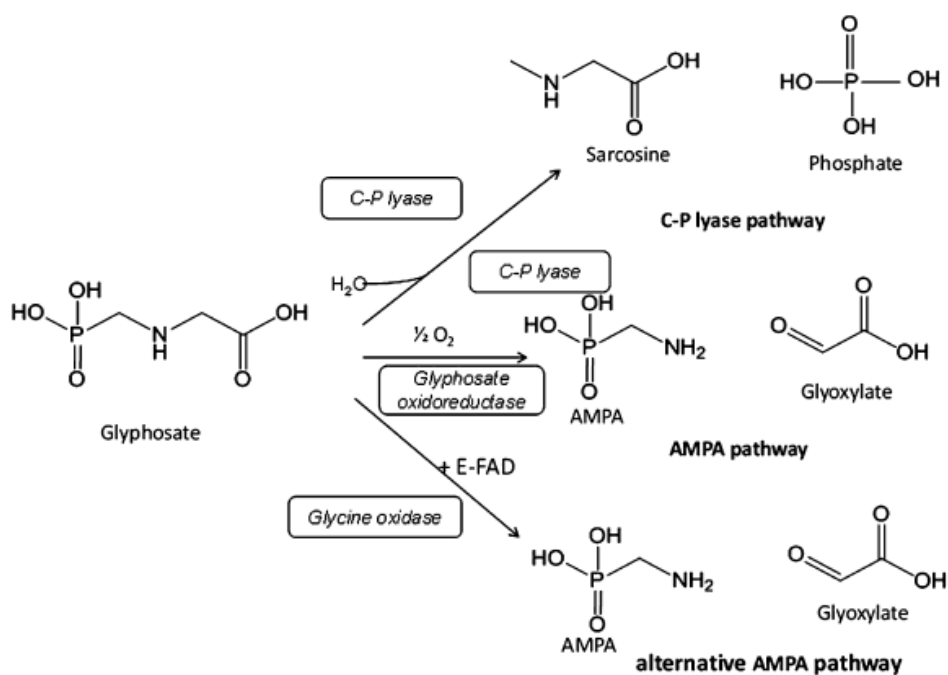


Figura 10: Vias de degradação catabólica do glifosato no solo. FONTE: (DUKE *et al.*, 2012).

O AMPA é considerado uma fitotoxina com potencial para ampliar os efeitos indiretos do glifosato em processos fisiológicos, como alterar a nutrição mineral da planta, fotossíntese, produção hormonal e estresse oxidativo. Além disso, este composto pode competir com a glicina, podendo afetar a biossíntese de clorofila e o processo fotossintético, através da inibição do ácido δ -aminolevulínico (ALA), componente essencial na via de produção da clorofila (**Figura 11**) (GOMES *et al.*, 2014).

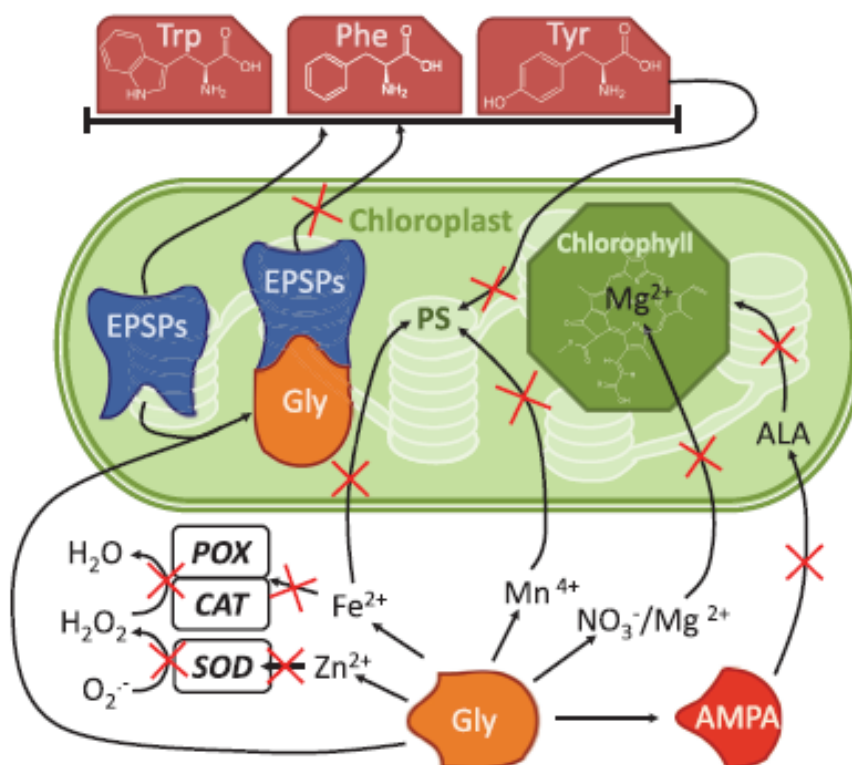


Figura 11: Alterações em processos fisiológicos celulares, causadas por AMPA e glifosato. FONTE: (GOMES *et al.*, 2014)

3.2.5 Uso, exposição e presença do glifosato

Existem diversas discussões acerca da concentração limite permitida para uso do glifosato na agricultura, de modo a não causar danos à saúde humana e animal. A Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (do inglês: *US Enviromental*

Protection Agency - EPA) defende que 1,75mg por Kg de peso corporal por dia (mg/kg/dia) não são prejudiciais, ao contrário das agências europeias, que em 2002, definiram como seguras as concentrações de até 0,3mg/kg/dia e, recentemente, de até 0,5mg/kg/dia. Porém, tais números, para ambos os casos, são muito discutíveis visto que ainda não se tem uma visão completa dos danos que podem ser causados aos organismos como um todo (MYERS *et al.*, 2016).

Devido à sua ampla utilização, os GBHs têm contaminado a água potável através do escoamento de águas de chuva e lixiviação das águas superficiais, tornando a água potável fonte potencial de contaminação (MYERS *et al.*, 2016).

Além disso, a exposição a esses compostos pode se dar por contato direto na preparação e aplicação do produto, bem como por meio de alimentos contaminados, do contato com roupa, sapatos e até mesmo cachorros, principalmente quando trazidos para dentro das residências (CURWIN *et al.*, 2007; MCQUEEN *et al.*, 2012). A absorção do glifosato pela pele pode se dar através da produção, distribuição, aplicação e de presença residual no meio ambiente (ZHAI *et al.*, 2008). A alta solubilidade do glifosato em água é uma característica crítica para a baixa absorção do glifosato pela pele, devido ao fato da epiderme possuir uma camada lipídica, funcionando como uma barreira à prova d'água (WESTER *et al.*, 1996; NIELSEN *et al.*, 2007). Assim, a absorção do glifosato é muito lenta. Estudos *in vitro* em células de pele humana, tratados com glifosato por 30 minutos, 4, 8 e 16 horas, mostram uma absorção de até 2%. Enquanto que *in vivo*, a exposição cutânea de macacos ao glifosato durante 12 horas, mostra que apenas 1,5% da dose inicial pode ser absorvido (WESTER *et al.*, 1996).

A meia-vida do glifosato no solo varia de 0,8-151 dias, enquanto que a do AMPA vai de 10-98 dias. Depois de aplicado, o glifosato pode ser mineralizado, imobilizado ou lixiviado, mas não será volatilizado, devido a suas características químicas (BAI e OGBOURNE, 2016).

O glifosato é amplamente utilizado em cultivos de milho, soja, canola, trigo, cevada, feijão, entre outros. Estudos demonstram que vestígios tanto do próprio glifosato,

quanto de seu principal metabólito, o AMPA, podem ser encontrados tanto nos alimentos pós colheita, quanto em suas versões processadas (MYERS *et al.*, 2016). É importante destacar ainda que a concentração encontrada nos alimentos parece depender do momento em que tal composto foi aplicado nos cultivos. Acredita-se que quanto mais tarde for realizada a aplicação, maior é a concentração encontrada. A aplicação tardia é feita de uma a duas semanas antes da colheita, acelerando a secagem dos plantios, permitindo que colheitas comecem mais cedo. A aplicação pré-cultivo, em estágios iniciais ou até mesmo no período de repouso, raramente resulta em resíduos detectáveis de herbicidas ou seus metabólitos nos alimentos (MYERS *et al.*, 2016; GOEN *et al.*, 2017).

Além disso, resíduos de herbicidas em frutas e vegetais contribuem para uma ingestão diária destes compostos, fazendo com que populações vegetarianas sejam mais prejudicadas, fato este não observado em comunidades que fazem uso de produtos orgânicos (GOEN *et al.*, 2017). Porém, Bai *et al.* (2016) concluíram em sua revisão, que a contaminação não oferece riscos para a maioria dos organismos nem para o meio ambiente, desde que as condições de aplicação e repetição do tratamento sejam respeitadas.

O LD₅₀ do Roundup® líquido foi estimado em 2mL/Kg em humanos. A taxa de mortalidade causada por intoxicação com GBHs é em torno de 7-17%, valores estes bem mais baixos do que os de outros pesticidas comuns, como o paraquat (69.2%) (HAN, J. *et al.*, 2016). Os riscos advindos da exposição aos GBHs tendem a aumentar em pacientes mais velhos e em indivíduos que fazem ingestão de altas doses, os quais chegam a apresentar concentrações maiores que >734 mg/mL no plasma sanguíneo (ZOUAOU *et al.*, 2013; HAN, J. *et al.*, 2016).

Sintomas característicos de envenenamento por glifosato são: distúrbios gastrointestinais, consciência alterada, hipotensão, dificuldade respiratória, falha renal e morte. Acredita-se que alterações gastrointestinais, lesões no esôfago, estômago e laringe devem-se pela presença do surfactante POEA e não pelo próprio glifosato. Além disso, tais lesões podem se desenrolar em problemas como hipotensão, diarreia, entre

outras, o que corrobora ainda mais a ideia de que o herbicida complexado é mais tóxico do que o próprio glifosato (ZOUAOUI *et al.*, 2013).

Quanto à exposição a longo prazo, os dados ainda são incertos, principalmente quando se trata de populações humanas. Em camundongos, foram observadas alterações no fígado, rim e desregulação do sistema endócrino (MYERS *et al.*, 2016).

3.2.6 Glifosato e câncer

3.2.6.1 Classificação e risco para humanos

Desde o registro do glifosato, diversos grupos têm avaliado os possíveis riscos da exposição a este composto para a saúde humana e desde então, tais estudos têm sido avaliados por diversas agências internacionais com o intuito de gerar uma classificação precisa e segura para o glifosato.

A IARC, em 2015, classificou o glifosato como “provavelmente carcinogênico para humanos (Grupo 2A)”, o que significa que apesar de haver diversos estudos epidemiológicos envolvendo humanos, as evidências são limitadas, sendo suficientes em animais (IARC, 2017).

A WHO e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês: *Food and Agriculture Organization- FAO*) classificam o glifosato como “improvável carcinógeno a partir de exposição através da dieta (água e alimentos)” (WHO/FAO, 2016). O Comitê de revisão da avaliação do câncer (do inglês: *Cancer Assessment Review Committee - CARC*) classifica o glifosato como “improvável de ser cancerígeno para humanos”. Para tal classificação, foram considerados apenas estudos que usaram glifosato de alta pureza e com informações completas tanto do

produto quanto dos experimentos, porém não foram utilizados dados de estudos envolvendo os GBHs (EPA, 2016).

Em 2015, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (do inglês: *European Food Safety Authority - EFSA*) classificou o glifosato como “improvável que represente risco carcinogênico para humanos”. Em 2016, a EPA classificou o glifosato como “improvável carcinogênico para humanos” (EPA, 2016).

Claramente existem contradições quanto ao real potencial carcinogênico do glifosato. Até o momento, os resultados em humanos (baseados em estudos epidemiológicos populacionais) não conseguiram comprovar atividade carcinogênica. A monografia da IARC traz uma extensa revisão bibliográfica e sugere possíveis relações, porém estatisticamente não significativas. São incluídos ainda estudos com animais e linhagens celulares, com achados como o aumento do estresse oxidativo e danos cromossomais, sendo estes, considerados os principais pontos para a classificação 2A da IARC. Os demais órgãos acima citados discordam de tal classificação, defendendo que estes achados não são suficientemente conclusivos, o que torna ainda mais difícil a decisão de como os países devem tratar o uso do herbicida. Na **Tabela 3**, é apresentada uma série de estudos epidemiológicos nos quais tais decisões foram baseadas.

Quanto a estudos que envolvem modelos animais, a metodologia mais comum baseia-se em incluir o glifosato nas dietas, seja na comida ou na água. De uma forma geral, são utilizadas diferentes concentrações, desde aquelas consideradas como abaixo dos níveis permitidos a aquelas com valores extremamente altos, sendo alguns deles em mais de 1000mg/kg/dia.

Os estudos de Burnett et al. (1979) e Lankas (1981) estudaram o efeito de baixas concentrações de glifosato (variando de 3-34mg/kg/dia) no desenvolvimento de possíveis lesões tumorais. O segundo estudo relatou a presença de tumores de células intersticiais testiculares, porém por não apresentar um padrão de aumento no risco com aumento de dose e por ter uma resposta não esperada dos controles, tais dados não

foram considerados como biologicamente representativos (BURNETT *et al.*, 1979; LANKAS, 1981).

Stout and Ruecker (1990), Atkinson *et al.* (1993a), Suresh (1996), Enemoto (1997), Brammer. (2001) e Wood *et al.* (2009a) utilizaram concentrações de glifosato variando de 11-1498 mg/kg/dia. Apesar dos estudos de Stout e o de Brammer terem observado algumas formações tumorais, as análises estatísticas não foram estatisticamente significantes para nenhum dos casos, nem mesmo quando usadas concentrações altíssimas, maiores que 1000mg/kg/dia (STOUT e RUECKER, 1990; ATKINSON, STRUTT, *et al.*, 1993; SURESH, 1993; ENEMOTO, 1997; BRAMMER, 2001; WOOD, E. *et al.*, 2009).

Quanto a análises em camundongos, o primeiro estudo registrado é o de Reyna and Gordon (1973), que analisou o glifosato em concentrações de 17 e 50mg/kg/dia e não observou a formação de nenhum tipo tumoral. Já os estudos de Knezevich e Hogan (1983), Atkinson *et al.* (1993b), Sugimoto (1997) e Wood *et al.* (2009b), também utilizando o glifosato, avaliaram concentrações altas variando de 71-6069 mg/kg/dia. Em conjunto, estes estudos identificaram a formação de possíveis tumores como hemangiossarcoma, adenocarcinoma de pulmão, linfoma e hemangioma, porém nenhum deles, novamente, apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo controle (REYNA e GORDON, 1973; KNEZEVICH e HOGAN, 1983; ATKINSON, MARTIN, *et al.*, 1993; SUGIMOTO, 1997; WOOD, *et al.*, 2009).

Tanto a monografia do IARC quanto a avaliação do potencial carcinogênico feita pela EPA trazem uma extensa revisão de artigos incluindo tratamento em ratos e camundongos. Ambos os grupos, apesar de apresentarem conclusões finais diferenciadas quanto ao potencial carcinogênico do glifosato, não apresentam estudos com forte significância estatística. Em alguns estudos que sugerem um possível papel carcinogênico, foram citados problemas durante a execução do estudo que levaram à perda de confiabilidade dos dados, como curto tempo de exposição, falta de informações sobre dosagem, tempo de tratamento, entre outros.

3.2.6.2 Efeito carcinogênico do glifosato e do AMPA em linhagens celulares

Estudos em linhagens celulares permitem uma maior manipulação e abrangência da pesquisa em termos da observação e entendimento das vias moleculares. Existem diversos estudos que buscam entender o efeito não só do glifosato como de outros agrotóxicos em linhagens celulares. Tais estudos abrangem o uso de linhagens advindas de diferentes espécies com diferentes objetivos. Aqui, será dado foco a estudos que buscaram avaliar o efeito genotóxico, citotóxico e carcinogênico tanto do glifosato quanto de GBHs, conforme pode ser observado na **Tabela 4**.

Diferentemente dos estudos epidemiológicos e em muitos casos até mesmo daqueles estudos realizados em animais, foram encontrados diversos efeitos que levam à interpretação de um possível papel carcinogênico de GBHs em linhagens celulares. Os principais achados que levam a esta conclusão estão relacionados ao potencial do glifosato em causar estresse oxidativo, com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (GEORGE e SHUKLA, 2013; CHAUFAN *et al.*, 2014), dano cromossomal (GASNIER *et al.*, 2009) e em atuar como desregulador endócrino, influenciando a proliferação celular (BENACHOUR *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2013).

3.2.6.3 Efeito de herbicidas no câncer de mama

O trabalho de Engel *et al.* (2005) trata-se de um estudo epidemiológico, realizado em Iowa e Carolina do Norte (EUA), durante o período de 1993-1997. A casuística incluiu cerca de 30 mil esposas de fazendeiros sendo que destas 455 já apresentavam câncer de mama antes do início das coletas de dados e outras 74 apresentaram carcinoma de mama *in situ* e foram excluídas do estudo, ficando apenas outras 309. Os resultados não demonstraram associação entre glifosato e o CM, em nenhuma das situações analisadas (RR= 0,9, 95% IC: 0,7-1,1). Apesar de ter sido um estudo bastante robusto,

apresentou uma série de limitações, destacando-se problemas na coleta de dados. Sendo assim, o estudo concluiu, de uma forma geral, que o uso de pesticidas não apresenta associação com o CM, sugerindo a necessidade de estudos posteriores para melhor caracterização do problema (ENGEL *et al.*, 2005).

A literatura é muito mais rica quando se trata do estudo dos efeitos do glifosato e seus metabólitos em linhagens celulares. O estudo de Thongprakaisang *et al.* (2013) analisou o efeito do glifosato puro nos REs. Para isso, utilizou linhagens de CM RE+ (T47D) e triplo negativa (MDA-MB-231), tratadas com concentrações consideradas baixas, variando de 10^{-12} a 10^{-6} M. Os resultados demonstraram que o glifosato não tem efeito proliferativo sobre a linhagem RE-, diferentemente do que ocorre na RE+, que além de apresentar aumento na proliferação celular, também tiveram a expressão de ER α e β alterados. O autor defende assim, que a proliferação celular acontece devido à ativação da via do RE, porém, permanece incerto como tal mecanismo ocorre, sugerindo apenas que o glifosato poderia se ligar ao receptor, ativando-o. Concluiu-se ainda que o glifosato possui atividade estrogênica um pouco mais fraca do que o próprio estradiol e que esta atividade estrogênica do glifosato pode levar a um aumento no risco para o CM (THONGPRAK AISANG *et al.*, 2013).

Baseado nas hipóteses de Thongprakaisang *et al.* (2013), Mesnage *et al.* (2017) buscou explicar como ocorre a ligação do glifosato ao RE, bem como o efeito de 4 formulações de GBHs, do surfactante POEA e do bisfenol A (BPA), que mimetiza o estrogênio. Para tal, utilizaram as linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e T47D. Foram realizados testes para medir a capacidade estrogênica de tais compostos e todos eles, com exceção dos GBHs, aumentaram a proliferação apenas das linhagens RE+ (para o glifosato foram usadas concentrações entre 1000 e 10.000 μ g/L), o que novamente sugere que a proliferação é baseada na via do RE. Os GBHs induziram uma proliferação insignificante, o que poderia ser explicado pela sua maior toxicidade, conseqüentemente levando à morte celular. Na análise de expressão por *microarray* e *RNA-Seq* após tratamento com glifosato a 10.000 μ g/L, foi encontrado um baixo número de genes da via do RE diferencialmente expressos e as análises de enriquecimento apontaram alterações nos processos de regulação do ciclo celular,

morte celular e apoptose. Para verificar como se dá a ativação de RE pelo glifosato, foram realizados estudos de simulação da dinâmica molecular, com a conclusão de que, apesar do glifosato se ligar em algumas regiões da molécula do RE, é improvável que tal ligação ocorra no resíduo essencial (HIS 524) para a manutenção da estrutura da proteína em uma conformação biologicamente ativa. Assim, o grupo concluiu que o glifosato ativa o RE, somente em altas concentrações, por meio de uma via independente de ligação, o que os permitiu sugerir que em níveis típicos de exposição, tal ativação não deva ocorrer. Além disso, não se conhece a relevância clínica de exposição de humanos ao glifosato, principalmente quando combinados com outros fatores como hormônios naturais ou exógenos e poluentes ambientes que também podem agir como desreguladores endócrinos (THONGPRAKAISANG *et al.*, 2013; MESNAGE *et al.*, 2017).

O estudo de Hokanson *et al.* (2007) analisou o efeito do glifosato na linhagem de mama RE+, MCF-7. As células foram tratadas com: 1) glifosato em meio livre de fenol *red*; 2) glifosato e estrogênio e 3) apenas estrogênio. Através da análise de *microarray*, o grupo demonstrou uma baixa regulação dos genes *CXCL12* e *EGR1* e aumento da expressão do gene *HIF1 α* após o tratamento com glifosato. O resultado para o tratamento somente com estrogênio apresentou padrões de expressão gênica intermediário aos demais tratamentos, sugerindo assim, um possível sinergismo entre o glifosato e o estradiol. O grupo concluiu assim, que a desregulação destes genes, principalmente do *HIF1 α* e do *CXCL12* estão relacionados a iniciação da apoptose, podendo influenciar ainda nos níveis de vascularização associado a formação tumoral (HOKANSON *et al.*, 2007).

Considerando as informações apresentadas acima, este trabalho de tese foi dividido em duas partes, sendo a primeira delas relacionada ao efeito biológico da densidade mamária e a segunda relacionada ao efeito de herbicidas em linhagens de câncer de mama.

Baseado na hipótese de que fatores biológicos intrínsecos e extrínsecos ao organismos feminino levam a alterações na densidade mamária e que tais alterações podem levar

ao desenvolvimento de lesões na mama, desenvolveu-se o manuscrito 1, intitulado: “*High mammographic density: an analysis of risk factors from a cross-sectional study in 11,826 brazilian women*” que objetivou analisar a relação entre achados clínicos de mamografias e fatores de risco para o CM, avaliando a associação entre os diversos fatores de risco e a DM, bem como a associação da DM para a ocorrência de lesões mamárias.

Quanto ao manuscrito 2, intitulado: “*Glyphosate-based herbicides at low doses can affect canonical pathways in Estrogen Positive and Negative breast cancer cell lines*”, buscou analisar o efeito de herbicidas baseados em glifosato, o Roundup®, e do ácido aminometilfosfônico (do inglês: *aminomethylphosphonic acid* – AMPA) na proliferação celular e em alterações na expressão gênica, principalmente aquelas com potencial para afetar vias canônicas em linhagens de câncer de mama RE+ e RE-. Como já descrito na literatura, acredita-se que linhagens de câncer de mama ER+ sofrem alterações devido ao efeito direto do glifosato no receptor levando ao aumento de proliferação nessas células, bem como outras alterações a nível molecular. Assim, a hipótese deste estudo é que linhagens de câncer de mama RE-, tratadas com Roundup® e AMPA, também sofrem alterações a nível molecular, bem como linhagens ER+ sofrem alterações que podem ser consideradas independentes da expressão do receptor. Este estudo ajuda a entender o efeito da formulação complexada do glifosato, ainda não claramente entendido e não descrito na literatura recente para linhagens de câncer de mama.

Tabela 3: Estudos epidemiológicos de associação de GBHs com o risco para o desenvolvimento do câncer em humanos

Referência/ Local do estudo	Câncer	Número de casos	Risco estimado	Comentários
(CANTOR <i>et al.</i> , 1992)/ Iowa e Minnessota	Linfoma Não-Hodgkin (LNH)	622	OR: 1,1; 95% IC: 0,7-1,9	O estudo sugere um maior risco de desenvolvimento de LNH em fazendeiros (OR:1,2 95% IC: 1,0-1,5), porém, assim como para o glifosato, os resultados não foram estatisticamente significativos.
(NORDSTROM <i>et al.</i> , 1998)/ Suécia	Leucemia de células pilosas	121	OR= 3,1; 95%IC: 0,8-12	O estudo encontrou um aumento no risco de ocorrência de leucemia na análise conjunta de todos os herbicidas (OR= 2,9; 95% IC: 1,4-5,9), porém, quando a multivariada foi ajustada por idade, tal significância desapareceu (OR=1,8; 95% IC: 0,7-4,6). Não foram encontrados valores estatisticamente significantes.
(MCDUFFIE <i>et al.</i> , 2001)/ Canadá	LNH	517	OR= 1,20; 95% IC: 0,83–1,74	O estudo não demonstrou relação entre o uso de glifosato e a ocorrência de LNH, porém, quando estruturado por número de dias por ano em que se teve contato, foi observada uma relação de dose-resposta (OR= 2,12; 95% IC: 1,20–3,73) naquele grupo que fez uso por mais de 2 dias.
(ALAVANJA <i>et al.</i> , 2003)/ Iowa e Carolina do Norte ¹ -AHS*	Próstata	566	NA**	Apesar da alta incidência de câncer de próstata em fazendeiros, o estudo não encontrou relação entre tal câncer e o uso de glifosato. Porém, o grupo sugere uma associação entre o uso de agrotóxicos de uma forma geral e o câncer de próstata (OR= 1,14, 95% IC: 1.05, 1.24)
(DE ROOS <i>et al.</i> , 2003)/ Nebraska,	LNH	3417	OR= 1,6; 95% IC: 0,9- 2,8	Análise integrativa. O uso de glifosato foi associado a LNH no modelo de regressão logística (OR= 2,1; 95% IC: 1,1-4,0),

Referência/ Local do estudo	Câncer	Número de casos	Risco estimado	Comentários
Iowa, Minnessota e Kansas				porém, não no modelo de regressão logística hierárquica. Apesar de não ser totalmente conclusivo, este estudo abrange uma população maior, porém apresenta com limitantes a ausência do período de contato com os herbicidas, a frequência de uso, entre outros.
(LEE <i>et al.</i> , 2004)/ Nebraska	(a) Estômago (b) Esôfago	(a) 170 (b) 137	(a) OR= 0,8.; 95% IC: 0,4-1,5 (b) OR= 0,7; 95% IC: 0,3-1,4	Não foi encontrada associação entre o trabalho em fazendas por jovens e adultos e o risco de tais cânceres (OR= 0,6; 95% IC: 0,3-1,1; OR= 0,9, 95%IC: 0,5 -1,2, respectivamente). Assim, como o uso de glifosato também não apresentou associação.
(RUDER <i>et al.</i> , 2004)/ Iowa, Michigan, Minnessota e Winsconsin	Glioma	457	NA	Apesar de utilizar o glifosato nas análises, apenas relata-se a inexistência de associação entre o uso de glifosato e a ocorrência de gliomas (risco estimado não apresentado).
(DE ROOS <i>et al.</i> , 2005)/ 1	Quaisquer cânceres	1074	RR=1,0; 95% IC: 0.9–1.2	O estudo avaliou alguns cânceres isolados, bem como todos em conjunto. O grupo sugere uma possível associação entre mieloma múltiplo e o uso de glifosato (RR= 2.6, 95% IC: 0.7–9.4), porém em nenhuma das análises os resultados foram estatisticamente significantes.
(LEE <i>et al.</i> , 2007)/ 1	(a) Colorretal (b) Cólon (c) Reto	(a) 305 (b) 212 (c) 93	(a) OR= 1.2, 95% IC: 0,9-1,6 (b) OR= 1,0, 95% IC: 0,7-1,5 (c) OR= 1,6, 95% IC= 0,9-2,9	Não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre o uso de glifosato e a ocorrência de câncer colorretal.
(ERIKSSON <i>et al.</i> ,	LNH	910	OR= 1,51; 95%IC: 0,77–2,94	O estudo demonstrou associação entre exposição a herbicidas e

Referência/ Local do estudo	Câncer	Número de casos	Risco estimado	Comentários
2008)/ Suécia				o LNH (OR= 1,72; 95% IC: 1,18–2,51). Para o uso de glifosato, a análise univariada apresentou significância, que foi perdida após análise multivariada. Porém, o uso cumulativo por mais de 10 dias por ano e período de latência de 10 anos para o desenvolvimento da doença após o uso de glifosato apresentaram significância (OR= 2,36; 95% IC: 1,04–5,37 e OR= 2,26; 95% IC: 1,16–4,40, respectivamente).
(ORSI <i>et al.</i> , 2009)/ França	Neoplasma linfóide	491	OR= 1,2; 95% IC: 0,6-2,1	Não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre o uso de glifosato e a ocorrência de linfomas.
(ANDREOTTI <i>et al.</i> , 2009)/ 1	Pâncreas	93	OR= 1,1; 95% IC: 0,6-1,7	Não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre o uso de glifosato (e qualquer outro pesticida) e a ocorrência de câncer de pâncreas (OR= 0,7; 95% IC: 0,4-1,4).
(DENNIS <i>et al.</i> , 2010)/	Melanoma	150	NA	Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o uso de glifosato e a ocorrência de melanoma.
(KACHURI <i>et al.</i> , 2013)/ Canadá	Mieloma múltiplo	342	OR= 1,11; 95% IC: 0,66-1,86	O estudo não encontrou relação estatisticamente significativa tanto para o uso de glifosato, independente da frequência, quanto na análise baseada em número de dias de exposição.
(SORAHAN, 2015)/ 1	Mieloma múltiplo	32	RR= 1.12; 95% IC: 0,50- 2,49	Reanálise do estudo de De Ross <i>et al.</i> (2005). Comprovou a inexistência de relação entre o uso de glifosato e a ocorrência da doença.

*O estudo prospectivo da AHS (*Agricultural Health Study*) inclui mais de 57 mil indivíduos que tenham feito uso de agrotóxicos durante algum momento da vida, bem como suas famílias. A coleta de dados inicial foi realizada nos anos de 1993-1997, nos estados de Iowa e Carolina do Norte (EUA) (ALAVANJA *et al.*, 1996). **Dados não apresentados.

Tabela 4: Efeito de GBHs em linhagens celulares.

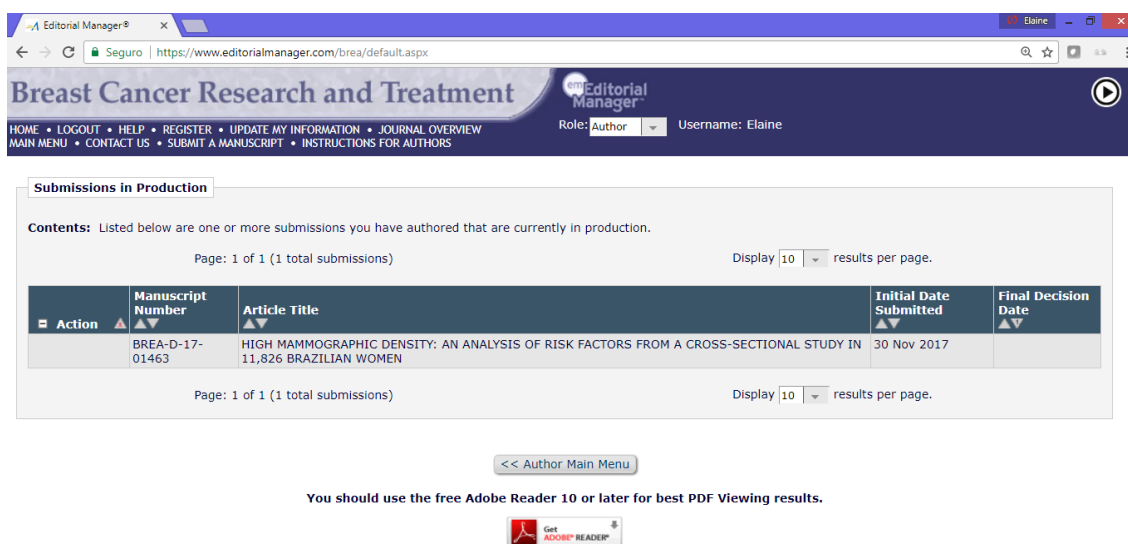
Referência	Linhagens estudadas	Principais achados	Conclusão
(BENACHOUR <i>et al.</i> , 2007)	HEK293 (células embrionárias de rim), JEG3 (células placentárias), células humanas de placenta e testículo de equino- Humana e equino	Foi observado efeito tóxico do Roundup® mesmo em baixas concentrações, destacando este composto como mais potente do que o glifosato, provavelmente devido ao seu efeito sinérgico com surfactantes. Porém, ambos atuaram como desreguladores da aromatase.	O estudo concluiu que tais compostos atuam como desregulares endócrinos em todas as linhagens e destaca a necessidade de estudos <i>in vivo</i> com o Roundup®, visto que os existentes são focados no glifosato apenas.
(GASNIER <i>et al.</i> , 2009)	Linhagem HepG2 (hepatoma) e MDA-MB453-kb2 (mama)	Foram testados GBHs e glifosato puro. Os GBHs diminuíram a viabilidade celular, induziram quebras no DNA, ativação de caspases e indução de apoptose. Além disso, ocorreu a inibição da conversão de andrógenos para estrógeno e aumento de expressão da aromatase, efeitos estes não vistos para o glifosato.	O estudo sugeriu que GBHs possuem potencial carcinogênico e mutagênico, por causarem danos no DNA e ainda por influenciarem na desregulação hormonal.
(GEORGE e SHUKLA, 2013)	HaCaT (queratonócitos)- Camundongo	Glifosato a 0.1mM induz a proliferação celular, diminui o $[Ca^{2+}]_i$, aumenta a produção de EROs e aumenta a expressão de ciclinas associadas a G1/S.	O grupo conclui que o glifosato induz a proliferação celular por meio da desregulação entre os níveis de $[Ca^{2+}]_i$ e EROS, o que leva a uma desregulação da atividade mitocondrial.
(LI <i>et al.</i> , 2013)	RWPE-1 e pRNS-1-1 (Células	Glifosato e AMPA inibem a proliferação	O estudo conclui que ambos os compostos

Referência	Linhagens estudadas	Principais achados	Conclusão
	epiteliais imortalizadas da próstata); C4-2B, LNCaP, DU-145 e PC-3 (próstata); KOV-3 e OVCAR-3 (ovário); HeLa (cancer cervical) e A549 (pulmão)	celular nas linhagens de câncer, porém não nas linhagens normais imortalizadas. Além disso, o AMPA inibe a entrada das células na fase S do ciclo celular, direcionando para a apoptose. Eventos estes que poderiam ser explicados pela baixa regulação do <i>TP53</i> , com consequentemente aumento dos níveis de <i>p21</i> .	têm potencial de inibir a proliferação celular de linhagens de câncer, porém não em células normais, sugerindo que tais compostos têm potencial para serem uma nova terapia anticâncer dose dependente.
(CHAUFAN <i>et al.</i> , 2014)	Linhagem HepG2 (hepatoma)-Humana	Neste estudo foram testados o glifosato, AMPA e GBHs. Os resultados demonstraram toxicidade apenas para GBHs, com aumento da produção de EROS, ativação de enzimas antioxidantes e aumento na expressão de caspases. O AMPA apenas aumentou a expressão de GSH (antioxidante).	O estudo concluiu que GBHs, mesmo em concentrações 100 vezes menor que o permitido, apresentam maior toxicidade que os demais compostos.

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DA TESE

4.1 Manuscrito 1

O manuscrito intitulado “High mammographic density: an analysis of risk factors from a cross-sectional study in 11,826 Brazilian women” foi submetido para avaliação ao periódico Breast Cancer Research and Treatment, de acordo com os critérios estipulados pelo Regimento do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (IF: 3.626) (Figura 12).



The screenshot shows the Editorial Manager interface for the journal Breast Cancer Research and Treatment. The user is logged in as Elaine, with the role of Author. The page displays a table of submissions in production, with one submission listed: BRE-A-D-17-01463, titled 'HIGH MAMMOGRAPHIC DENSITY: AN ANALYSIS OF RISK FACTORS FROM A CROSS-SECTIONAL STUDY IN 11,826 BRAZILIAN WOMEN', submitted on 30 Nov 2017. The page also includes navigation links, a search bar, and a download icon.

Submissions in Production

Contents: Listed below are one or more submissions you have authored that are currently in production.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Article Title	Initial Date Submitted	Final Decision Date
	BRE-A-D-17-01463	HIGH MAMMOGRAPHIC DENSITY: AN ANALYSIS OF RISK FACTORS FROM A CROSS-SECTIONAL STUDY IN 11,826 BRAZILIAN WOMEN	30 Nov 2017	

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

You should use the free Adobe Reader 10 or later for best PDF Viewing results.

Get ADOBE READER

Figura 12: Comprovação de submissão do manuscrito 1 para a revista *Journal of Epidemiology & Community Health*

Breast Cancer Research and Treatment
HIGH MAMMOGRAPHIC DENSITY: AN ANALYSIS OF RISK FACTORS FROM A
CROSS-SECTIONAL STUDY IN 11,826 BRAZILIAN WOMEN
 –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	HIGH MAMMOGRAPHIC DENSITY: AN ANALYSIS OF RISK FACTORS FROM A CROSS-SECTIONAL STUDY IN 11,826 BRAZILIAN WOMEN
Article Type:	Epidemiology
Keywords:	BI-RADS. Breast cancer. Mammographic density. Risk factors.
Corresponding Author:	ELAINE STUR, MSc Universidade Federal do Espírito Santo Vitória, Espírito Santo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal do Espírito Santo
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Elaine Stur
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Elaine Stur Marcos Pereira-Santos Jéssica Afliávio Dos Santos Fernanda Mariano Garcia Diego do Prado Ventorim Lidiane Pignaton Agostini Raquel Spinassé Detogni Julia Del Piero Pereira Lyvia Neves Rebello Alves Raquel Silva Dos Reis Andres Felipe Aristizabal-Pachon Cristina Caetano Stefanon Iuri Drumond Louro
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Purpose: Mammographic density (MD) has been considered the most important breast cancer (BC) independent risk factor. Due the significance of MD in BC development, we aimed to establish statistical associations between risk factors and MD.</p> <p>Methods: Was performed a cross-sectional study involving 11,826 women attended in a breast imaging center in Espírito Santo, Brazil, during 2014-2016. Body mass index (BMI), age, menopausal status, pregnancy, number of children, hormonal use, previous breast surgery breast imaging report and data system (BI-RADS) for breast composition according to density and suspect breast lesions (SBL) were analyzed.</p> <p>Results: Our data showed that higher ages (prevalence rate - PR: 0.14, 95% confidence interval - CI: 0.08, 0.23), menopause, higher number of children and, mainly, BMI (PR: 0.03, 95% CI: 0.02, 0.05) were directly related to lower MD. It was verified that advanced age protects against benign lesions (PR: 0.37, 95% CI: 0.23, 0.59), previous surgery also was associated with benign lesions (PR: 1.45, 95% CI: 1.21, 1.74) and</p>

HIGH MAMMOGRAPHIC DENSITY: AN ANALYSIS OF RISK FACTORS FROM A CROSS-SECTIONAL STUDY IN 11,826 BRAZILIAN WOMEN

Elaine Stur^{1,2}, Marcos Pereira-Santos³, Jéssica Aflávio dos Santos², Fernanda Mariano Garcia^{1,2}, Diego do Prado Ventorim^{1,2}, Lidiane Pignaton Agostini^{1,2}, Raquel Spinassé Detogni^{1,2}, Julia Del Piero Pereira², Lyvia Neves Rebello Alves², Raquel Silva dos Reis^{1,2}, Andres Felipe Aristizabal-Pachon⁴, Cristina Caetano Stefanon⁵, Iúri Drumond Louro^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

²Departamento de Ciências Biológicas-Núcleo de Genética Humana e Molecular. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

³Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal do Oeste da Bahia, Bahia, Brasil.

⁴Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

⁵CDI-Centro de Diagnóstico por Imagem, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

Corresponding author: Elaine Stur

Address: avenue Fernando Ferrari, nº 514, Vitória, ES, Brazil, 29075-910.

Phone: 55 27 4009 2324, ramal *5324. FAX: 55 27 4009 2324.

Email: elaine_stur@yahoo.com.br

ABSTRACT

Purpose: Mammographic density (MD) has been considered the most important breast cancer (BC) independent risk factor. Due the significance of MD in BC development, we aimed to establish statistical associations between risk factors and MD.

Methods: Was performed a cross-sectional study involving 11,826 women attended in a breast imaging center in Espirito Santo, Brazil, during 2014-2016. Body mass index (BMI), age, menopausal status, pregnancy, number of children, hormonal use, previous breast surgery breast imaging report and data system (BI-RADS) for breast composition according to density and suspect breast lesions (SBL) were analyzed.

Results: Our data showed that higher ages (prevalence rate - PR: 0.14, 95% confidence interval - CI: 0.08, 0.23), menopause, higher number of children and, mainly, BMI (PR: 0.03, 95% CI: 0.02, 0.05) were directly related to lower MD. It was verified that advanced age protects against benign lesions (PR: 0.37, 95% CI: 0.23, 0.59), previous surgery also was associated with benign lesions (PR: 1.45, 95% CI: 1.21, 1.74) and BMI was associated with lesions in overweight women (PR: 1.48, 95% CI: 1.07, 2.05). High MD was associated with breast lesions (PR: 3.87, 95% CI: 1.71, 8.77).

Conclusion: We were able to show a relationship between MD and other risk factors, connecting these with BC risk.

Keywords: BI-RADS. Breast cancer. Mammographic density. Risk factors.

Abbreviations	
MD	mammographic density
BC	breast cancer
BMI	body mass index
BI-RADS	breast imaging report and data system
PR	prevalence rate
CI	confidence interval
SBL	suspect breast lesions
SD	standard deviation

INTRODUCTION

Breast cancer is the most common female cancer worldwide, with more than 1.4 million new cases each year, being the second cause of cancer death in women [1-3]. Among known risk factors, MD has been considered the most important one. It is believed that high MD can raise BC risk by 4-6 times [2].

Mammographic density is measured by the proportion of fibroglandular cells in the breast tissue [3]. Mammogram light areas represent fibrous and glandular tissues (dense areas) and dark areas represent fat tissue (non-dense areas). Ratio between these values is considered the overall breast density [1, 4]. MD is influenced by age, BMI, reproductive and hormonal and genetic factors [4, 5].

There are two qualitative and quantitative classifications for MD: Wolfe classification created in 1976 and BI-RADS, the latter being the most used tool in mammography reports. BI-RADS is used to describe breast composition according to density, as well as SBL [1, 5, 6].

Mammography sensitivity is highly related with breast density [7]. High densities can lead to misinterpretation of lesion presence and tumor size [1, 8]. In addition, there is a higher tumor risk in mammographically dense areas, possibly explained by the higher number of epithelial cells at these sites [9].

Given the significance of MD in development of benign lesions and BC, we aimed to use a large mammography database to establish statistical association between various many variables as BMI, age, menopause status, pregnancy, number of children, hormonal therapy and previous surgery with breast density and presence of lesions.

METHODS

Study population and data measurement

A cross-sectional study covering the period from 2014 to 2016, involving 11,826 women, was performed using a breast imaging reference center database located in Vitoria, Espirito Santo, Brazil. Data were retrospectively compiled in an Access database (Microsoft Corporation, Washington, USA). This study was approved by the Ethics Committee (Centro Integrado de Atenção à Saúde/Unimed Vitoria #1.683.709). Informed consent was waived.

Women who performed any type of mammography were included in this study, independently of diagnosis. Variables analyzed were BMI (18.5-24.9, 25-29.9 and ≥ 30), age (20-43, 44-53, 54-64 and ≥ 65), menopausal status, pregnancy, number of children (0, 1-4 and ≥ 5), hormonal use (contraceptive, hormonal therapy reposition, hormone

therapy and others), previous breast surgery (from esthetics procedures to therapeutic surgeries), MD BI-RADS ($_{MD}BI-RADS$) and SBL BI-RADS ($_{SBL}BI-RADS$). All data were described by the same mammography specialist.

Mammographic density BI-RADS descriptors classified density into levels 1 to 4: 1 - almost entirely fat (<25% glandular density); 2 - scattered fibroglandular densities (25–50% glandular density); 3 - heterogeneously dense (51–75% glandular density) and 4 - extremely dense (>75% glandular density) [10, 11]. Figure 1 shows this characterization.

Suspect breast lesions BI-RADS were divided into 6 categories: B1 - normal exam; B2 - typically benign with a normal followup interval; B3 - probably benign; B4 - suspicious of abnormalities; B5 - highly suggestive of malignancy and B6 - histologically proven malignancy [6]. Due to the low number of $_{SBL}BI-RADS$ higher than B3, we decided to pool B4, B5 and B6 into a single group.

Statistical Analysis

Prevalence was used to describe categorical variables, whereas average and standard deviation (SD) was used to describe continuous variables. To identify factors associated with $_{MD}BI-RADS$ and $_{SBL}BI-RADS$, polytomous logistic regression analysis was used. Covariates that integrated the multivariate model were selected based on the backward technique [12], which consists of consecutively discarding variables of smaller statistical significance until only variables with a value of $P < 0.05$ are left.

Prevalence rate and CI (95%) were used as measures of association and P value (< 0.05) was used to assess the magnitude of a found association. Analysis was performed in Stata Software v.12 [13].

RESULTS

Demographic Characterization

This is a retrospective study in which 11,826 medical records were analyzed. Tables 1 and 2 show the distribution of studied population by demographic categories according to $_{MD}BI-RADS$ and $_{SBL}BI-RADS$. Mammography average age was 52.86 years (SD=11.13) and 15.18% of women were over 65 years old. $_{MD}BI-RADS-4$ was presented in approximately 14% of women between 20-43 years old and in 7.16% of women over 65 years old.

In respect to reproductive history, 86.3% of women had at least one pregnancy and 81.49% had between 1 and 4 children. Women with 0-4 children showed higher $_{SBL}BI-RADS$ than women with five or more.

Approximately half of the cases were women in their postmenopausal period. Clearly, density category 4 showed a proportion of women in premenopause 3 times higher than in postmenopause. Hormones were used by 26.7% of women.

Previous surgery was observed in 35.6% of patients, but in $_{MD}BI-RADS-4$ patients, absence of previous surgery was twice more frequent.

BMI average was 25.75 Kg/m² (SD=4.33, overweight), whereas 35.66% of all patients were overweight and 15.22% were obese. BMI distribution by $_{SBL}BI-RADS$ and $_{MD}BI-RADS$ is shown at Figure 2. There is a direct relationship between $_{SBL}BI-RADS$ and BMI and an inverse relationship between $_{MD}BI-RADS$ and BMI.

As for $_{SBL}BI-RADS$ mammography report, 65.9% did not show any lesion or morphological changes (B1) and approximately 2% showed potentially malignant lesions (B4, B5 and B6). Heterogeneously dense breasts showed a higher frequency of lesions (benign or malignant) than other density categories.

Demographic variables and their effects on $_{MD}BI-RADS$

Table 3 shows age as an important risk factor for MD. Younger women (20-43 yo) had 2.52-fold more chance of extremely dense breast ($_{MD}BI-RADS-4$ - PR: 2.52, 95% CI: 1.83, 3.45) when compared to middle-age women (44-53 yo). In older patients (≥ 65 yo), a decreased risk of $_{MD}BI-RADS-4$ (PR: 0.14, 95% CI: 0.08, 0.23) was observed. Therefore, higher ages are less associated with extremely dense breast.

Premenopause was associated with $_{MD}BI-RADS-4$. Premenopausal women were 2.05-fold more prone to have heterogeneously dense breast ($_{MD}BI-RADS-3$ - PR: 2.05, 95% CI: 1.64, 2.56) and 2.3-fold more prone to have $_{MD}BI-RADS-4$ (PR: 2.34, 95% CI: 1.71, 3.21).

Pregnancy was not related with MD. However, nulliparous women showed a 2.95-fold higher chance of developing $_{MD}BI-RADS-4$. Hormone therapy acted as a protecting factor against $_{MD}BI-RADS-3$ (PR: 0.76, 95% CI: 0.65, 0.89).

Our results suggest that high BMI is related to lower breast density. Obese women showed an increasingly lower probability of $_{MD}BI-RADS-4$, $_{MD}BI-RADS-3$ and $_{MD}BI-RADS-2$ (Table 4). Similarly, previous surgeries were associated with an MD reduction, mainly for extremely dense breasts (PR: 0.24, 95% CI: 0.19, 0.30).

Women with $_{MD}BI-RADS$ -3 and 4 had 6.35- and 9.48-fold higher chances of $_{SBL}BI-RADS$ B3, respectively. Therefore, high-density breasts were more prone to develop benign and malignant lesions.

Demographic variables and their effect on $_{SBL}BI-RADS$

Table 4 shows that increased age (≥ 65) had a protective effect against benign breast lesions ($_{MD}BI-RADS$ B3: PR: 0.37, 95% CI: 0.23, 0.59) and hormone therapy increases the occurrence of $_{SBL}BI-RADS$ B3 (PR: 1.46, 95% CI: 1.19, 1.79). A positive association between previous surgery and $_{SBL}BI-RADS$ B2 and B3 was observed.

BMI between 25-29.9 showed a positive association with $_{SBL}BI-RADS$ B4, B5 and B6, increasing the occurrence of breast lesions (PR: 1.48, 95% CI: 1.07, 2.05).

Tables 3 and 4 show that, independently of the main outcome, higher densities were associated with a higher probability of breast lesions.

No association between menopause, pregnancy and number of children with $_{SBL}BI-RADS$ categories was found.

DISCUSSION

Our results show that age, menopause, number of children and, mainly, BMI are directly related to MD levels. In addition, it was verified that age, previous surgery and BMI may influence the occurrence of breast lesions, both malignant and benign. As a third result and previously described in the literature, a positive relationship was found between breast density and the occurrence of breast lesions.

The data shows an inverse relationship between age and MD. Premenopause was associated with high-density breast. According to Burton et al., a decline in MD occurs with increased age, starting at premenopause and being more pronounced at menopausal transition, as a result of an intrinsic biological mechanism inherent to all women [14]. We have shown that breast density is much lower in postmenopausal than in premenopausal women of the same age and it is generally lower in older women. This association has been made in other studies that found non-linear declines with age, often more accentuated during the perimenopausal period and plateauing around 65 years old [15-17].

Density decreases with age due to changes in stromal and epithelial tissues, probably reflecting the involution of terminal duct lobular units [14]. Hormonal changes during the menopausal transition certainly

influence the accentuated MD decline [18]. Greendale et al. described that estrogen and progesterone increase the percentage of MD. Thus, reduction of these hormones and consequent changes in plasma lipid-lipoprotein levels during menopause would be related to the decrease in breast density [19].

Considering age associated with breast lesions, multivariate analysis showed increase of age as a protective factor against benign lesions ($_{\text{SBLBI-RADS B3}}$). According to American Cancer Society, 80% of BC patients are diagnosed over age 50 [20]. Sridharan et al. reported that frequency of DNA damage increases with age, which can threaten genome stability, ultimately increasing cancer risk [21]. Progressive decline in DNA repair efficiency, increased oxidative stress, telomere shortening and disrupted tissue architecture are also key factors that contribute to transformation in older cells [22].

This study showed that women with 1-4 children had higher $_{\text{MDBI-RADS}}$ and nulliparous women have almost 3 times higher chances to develop extremely dense breasts ($_{\text{MDBI-RADS-4}}$), when compared with those with 5 or more. These results are in agreement with previous reports in literature, that show parity as inversely related to MD and BC risk, being this effect stronger in nulliparous women [5, 23].

According to Woolcott et al., alterations in breast tissue composition promoted by maternity may have an impact on reduction of MD that could explain the association between parity and cancer risk, such as number and differentiation of lobular units, proportion of collagen and changes in gene expression [23]. Additionally, Gils & Hendriks suggested a possible synergistic relation between MD and nulliparity: nulliparous women with high-density breast have a higher susceptibility to carcinogenic events than low density nulliparous or parous women [24].

Previous surgeries were related to MD reduction and $_{\text{SBLBI-RADS B3}}$. These results were difficult to compare with previous studies due the study design differences [25, 26]. Despite these discrepancies, it is important to notice that MD decrease may be a result of fibroglandular tissue removed during breast surgery; therefore, surgery can cause asymmetries in the distribution of breast tissue after the surgery. One portion of the breast has asymmetric density when compared with another, which could be interpreted as $_{\text{SBLBI-RADS B3}}$.

As previously described in the literature, BMI showed an inverse relationship with MD, as well as higher BMI was associated with breast lesions, being them benign or malignant [5, 27-30].

Many factors can affect BMI. Generally, higher BMI (overweight or obesity) is caused by complex and multifactorial traits including genetic, metabolic and environmental factors [31]. The age *per se*, especially after 50

years, shows a tendency of association with higher BMI, possibly due to the reduction of resting metabolic rate. Menopause, independently of age, causes the same effect, leading to a reduction on fat-free mass and physical activity energy expenditure, which could increase BMI or total fat mass [19, 32].

Influence of BMI in BC development is not totally clear, however it is known that peripheral body fat and breast fat levels act in this process through different mechanisms. Baglieto et al. and Wang et al. argue that in postmenopausal women, higher peripheral fat increases BC risk due to maintenance of high levels of estrogens by androgen aromatization, leading to cellular proliferation [4, 10, 28]. Furthermore, obesity has a correlation with chronic inflammatory process, insulin, insulin growth factor 1, adipokines, macrophage infiltration, obesity-induced hypoxia, possibly leading to angiogenesis and tumor development [33, 34]. In contrast, in premenopausal women, higher BMI acts as a protective factor against BC, by a mechanism not fully understood. Currently, it is accepted that fat tissue is rich in vitamin D, with anticarcinogenic effects, working in cellular proliferation pathways [5, 28, 35]. It remains to be explained why peripheral fat is a stronger risk factor than breast fat is a protective factor in breast carcinogenesis.

Therefore, BMI has a strong correlation with density percentage, which in turn has a correlation with benign or malignant lesions. Our data shows that the occurrence of lesions is more frequent in higher density breasts, similarly to current reports in the literature [5, 28, 35, 36].

It is clear that non-dense and dense tissues differ histologically, for instance, the latter can have up to 30% more epithelial tissue than the former, being dense breast composed mainly of epithelial tissue, fat, glandular tissue and collagen. Furthermore, vascularization and metabolism are increased in dense tissues [29, 37]. It has been proposed that stroma has a bigger proliferation rate and consequent accumulation of mutations that may cause cancer [26].

However, Huo et al. and Ghosh et al. did not find any difference in immunohistochemistry of Ki67, a cellular marker for proliferation and much too contrary, they found higher proliferation rates in non-dense tissues [37, 38]. Hawes et al., comparing proliferation rate in both tissues, found that epithelial cells proliferation in high density areas was much lower than in low-density areas [39]. Considering these findings, it has been proposed that increased BC risk in women with higher MD is a simple reflex of more breast epithelial tissue [17, 39].

For decades, it has been known that high MD is the strongest independent risk factor for BC, but biological mechanisms are still poorly understood [16, 40]. Some factors can work together as a cascade, where age increases

BMI and leads to menopause, which in turn leads to an increased BMI. Other factors such as reproductive history can help understand complexity of breast tissue composition and carcinogenesis process.

Main limitations of this study were lack of complete data about used mammography (digital or conventional) and ultrasound techniques, as well as about hormones used and reason for stopping them. Due to these limitations, an in-depth discussion about hormones could not be conducted here. Other incomplete data were menarche and menopause age, age of first parity and sub-classification of surgery. In addition, the fact that all routine cases were included in this study, regardless of presence or absence of lesions, number of lesion cases (B4, B5 and B6) was significantly lower than normal cases, which may have impaired statistical analysis power. Nonetheless, our main strengths are the fact that we analyzed a large population, classification of density and lesions were made by the same physician and diversity of demographic information is high, which allows a good dispersion of intercategorical data.

In summary, through retrospective analysis of over 11,000 mammography patients, we were able to show a relation between MD and age, menopause, number of children, BMI and previous surgery, therefore connecting these factors all together with breast lesions risk.

ACKNOWLEDGMENTS

Stur E and Agostini LP were supported by FAPES (Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo). We would like to thank Cleyton Santana de Souza for developing Access database and to CDI's team for helping with medical records.

COMPETING INTERESTS

None declared.

ETHICAL APPROVAL

All procedures performed in this study involving human participates were in accordance with ethical standards of institutional and/or national research committee and wit 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

INFORMED CONSENT

Informed consent was waived.

REFERENCES

1. Albert M, Schnabel F, Chun J, et al (2015) The relationship of breast density in mammography and magnetic resonance imaging in high-risk women and women with breast cancer. *Clin Imaging* 39(6):987-992.
2. Byrne C, Schairer C, Wolfe J, et al (1995) Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age, and menopause status. *J Natl Cancer Inst* 87(21):1622-1629.
3. Boyd NF, Rommens JM, Vogt K, Lee V, Hopper JL, Yaffe MJ, Paterson AD (2005) Mammographic breast density as an intermediate phenotype for breast cancer. *Lancet Oncol* 6(10):798-808.
4. Fjeldheim FN, Frydenberg H, Flote VG, et al (2016) Polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene (ESR1), daily cycling estrogen and mammographic density phenotypes. *BMC Cancer* 16(1):776.
5. Caglayan EK, Caglayan K, Alkis I, Aslan E, Okur A, Banli O, Engin-Ustun Y (2015) Factors Associated with Mammographic Density in Postmenopausal Women. *Menopausal Med* 21(2):82-88.
6. Ballleyguier C, Ayadi S, Van Nguyen K, Vanel D, Dromain C, Sigal R (2007) BIRADS classification in mammography. *Eur J Radiol* 61(2):192-194.
7. Boyd NF, Guo H, Martin LJ, et al (2007) Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N Engl J Med* 356(3):227-236.
8. Bansal GJ, Santosh D, Davies EL (2016) Selective magnetic resonance imaging (MRI) in invasive lobular breast cancer based on mammographic density: does it lead to an appropriate change in surgical treatment? *Br J Radiol* 89(1060):20150679.
9. Boyd NF, Martin LJ, Bronskill M, Yaffe MJ, Duric N, Minkin S (2010) Breast tissue composition and susceptibility to breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 102(16):1224-1237.
10. Wang Z, Hauser N, Kubik-Huch RA, D'Isidoro F, Stampanoni M (2015) Quantitative volumetric breast density estimation using phase contrast mammography. *Phys Med Biol* 60(10):4123-4135.
11. Irshad A, Leddy R, Ackerman S, Cluver A, Pavic D, Abid A, Lewis MC (2016) Effects of Changes in BI-RADS Density Assessment Guidelines (Fourth Versus Fifth Edition) on Breast Density Assessment: Intra- and Interreader Agreements and Density Distribution. *AJR Am J Roentgenol* 207(6):1366-1371.

12. Hosmer; D, Lemeshow S (2000) Applied logistic regression. New York, Wiley.
13. Stata Corporation (2011) Stata Statistical Software, release 12. College Station, Stata Corporation.
14. Burton A, Maskarinec G, Perez-Gomez B, et al (2017) Mammographic density and ageing: A collaborative pooled analysis of cross-sectional data from 22 countries worldwide. *PLoS Med* 14(6):e1002335.
15. Kelemen LE, Pankratz VS, Sellers TA, et al (2008) Age-specific trends in mammographic density: the Minnesota Breast Cancer Family Study. *Am J Epidemiol* 167(9):1027-1036.
16. McCormack VA, dos Santos Silva I (2006) Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(6):1159-1169.
17. Lokate M, Stellato RK, Veldhuis WB, Peeter PH, van Gils CH (2013) Age-related changes in mammographic density and breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 178(1):101-109.
18. Burger HG, Hale GE, Dennerstein L, Robertson DM (2008) Cycle and hormone changes during perimenopause: the key role of ovarian function. *Menopause* 15(4 Pt 1):603-612.
19. Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Peohلمان ET (2000) Menopause-related changes in body fat distribution. *Ann N Y Acad Sci* 904:502-506.
20. American Cancer Society (AMC) (2015) Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016. Atlanta, American Cancer Society.
21. Sridharan DM, Enerio S, LaBarge MA, Stampfer MM, Pluth JM (2017) Lesion complexity drives age related cancer susceptibility in human mammary epithelial cells. *Aging* 9(3):665-686.
22. Anisimov VN (2003) The relationship between aging and carcinogenesis: a critical appraisal. *Crit Rev Oncol Hematol* 45(3):277-304.
23. Woolcott CG, Koga K, Conroy SM, et al (2012) Mammographic density, parity and age at first birth, and risk of breast cancer: an analysis of four case-control studies. *Breast Cancer Res Treat* 132(3):1163-1171.
24. van Gils CH, Hendriks JH, Otten JD, Holland R, Verbeek AL (2000) Parity and mammographic breast density in relation to breast cancer risk: indication of interaction. *Eur J Cancer Prev* 9(2):105-111.
25. Alvares BR FC, Jales RM, Almeida OJ, Marussi EF (2012) Mammographic density in asymptomatic menopausal women: correlation with clinical and sonographic findings. *Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem* 45:149-154.

26. Maskarinec G, Woolcott CG, Kolonel LN (2010) Mammographic density as a predictor of breast cancer outcome. *Future Oncol* 6(3):351-354.
27. Li T, Sun L, Miller N, Nicklee T, Woo J, Hulse-Smith L, et al (2005) The association of measured breast tissue characteristics with mammographic density and other risk factors for breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(2):343-9.
28. Baglietto L, Krishnan K, Stone J, et al (2014) Associations of mammographic dense and nondense areas and body mass index with risk of breast cancer. *Am J Epidemiol* 179(4):475-483.
29. Taroni P, Quarto G, Pifferi A, et al (2015) Breast tissue composition and its dependence on demographic risk factors for breast cancer: non-invasive assessment by time domain diffuse optical spectroscopy. *PLoS one* 10(6):e0128941.
30. Hopper JL, Nguyen TL, Stone J, et al (2016) Childhood body mass index and adult mammographic density measures that predict breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 156(1):163-170.
31. Barisic T, Mandic V, Barac I (2017) Associations of Body Mass Index and Gestational Weight Gain with Term Pregnancy Outcomes. *Mater Sociomed* 29(1):52-57.
32. Poehlman ET, Tchernof A (1998) Traversing the menopause: changes in energy expenditure and body composition. *Coron Artery Dis* 9(12):799-803.
33. Gillman J, Chun J, Schwartz S, Schnabel F, Moy L (2016) The relationship of obesity, mammographic breast density, and magnetic resonance imaging in patients with breast cancer. *Clin Imaging* 40(6):1167-1172.
34. De Pergola G, Silvestris F (2013) Obesity as a major risk factor for cancer. *J Obes* 2013. 2013:291546.
35. Pettersson A, Tamimi RM (2012) Breast fat and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 135(1):321-323.
36. Boyd NF, Martin LJ, Sun L, et al (2006) Body size, mammographic density, and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(11):2086-2092.
37. Huo CW, Chew G, Hill P, et al (2015) High mammographic density is associated with an increase in stromal collagen and immune cells within the mammary epithelium. *Breast Cancer Res* 17:79.
38. Ghosh K, Brandt KR, Reynolds C, et al (2012) Tissue composition of mammographically dense and non-dense breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 131(1):267-275.

39. Hawes D, Downey S, Pearce CL, Bartow S, Wan P, Malcolm CP, Wu AH (2006) Dense breast stromal tissue shows greatly increased concentration of breast epithelium but no increase in its proliferative activity. *Breast Cancer Res* 8(2):R24.

40. Martin LJ, Boyd NF (2008) Mammographic density. Potential mechanisms of breast cancer risk associated with mammographic density: hypotheses based on epidemiological evidence. *Breast Cancer Res* 10(1):201.

FIGURES

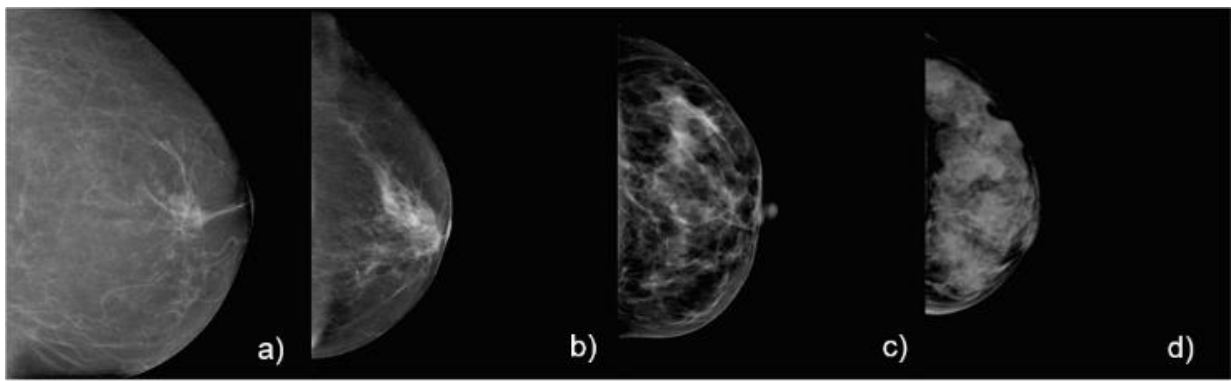


Fig. 1 Example of mammographic density breast imaging report and data system ($_{MD}BI-RADS$) involving woman attended in a breast imaging reference center located in Espirito Santo, Brazil, during 2014-2016. a) almost entirely fat (<25% glandular density); b) scattered fibroglandular densities (25-50% glandular density); c) heterogeneously dense (51-75% glandular density) and d) extremely dense (>75% glandular density).

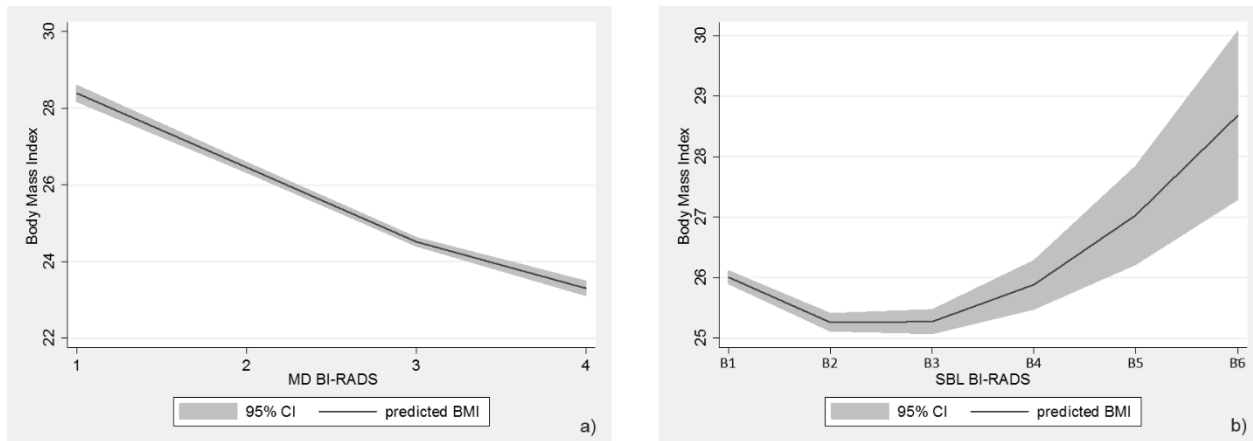


Fig. 2 Distribution of body mass index (BMI) categories by suspect breast lesions breast imaging report and data system ($_{SBL}BI-RADS$) and mammographic density BI-RADS ($_{MD}BI-RADS$) involving woman attended in a breast imaging reference center located in Espirito Santo, Brazil, during 2014-2016. a) distribution of $_{MD}BI-RADS$ in relation of BMI; b) distribution of $_{SBL}BI-RADS$ in relation to BMI.

Table 1 Demographic data analysis according to *MDBI-RADS*, involving women attended in a breast imaging reference center located in Espirito Santo, Brazil, during 2014-2016

Variable	<i>MDBI-RADS</i>					
	N	%	1 1733 (15.0)	2 4452 (38.6)	3 4520 (39.2)	4 826 (7.2)
Age						
20-43	2624	22.17	116 (4.58)	680 (26.82)	1391 (54.87)	348 (13.73)
44-53	3882	32.80	346 (9.12)	1305 (34.39)	1851 (48.77)	293 (7.72)
54-64	3534	29.86	728 (21.08)	1598 (46.28)	974 (28.21)	153 (4.43)
≥65	1797	15.18	1733 (15.03)	4452 (38.61)	4520 (39.2)	826 (7.16)
Pregnancy						
Yes	10221	86.3	1608 (16.03)	4017 (40.24)	3789 (37.77)	598 (5.96)
No	1616	13.7	125 (8.34)	415 (27.69)	731 (48.77)	228 (15.21)
N of children						
0	1590	13.51	120 (8.14)	409 (27.75)	720 (48.85)	225 (15.26)
1-4	9593	81.49	1399 (14.85)	3753 (39.84)	3688 (39.15)	579 (6.15)
≥5	589	5.00	204 (35.48)	270 (46.96)	86 (14.96)	15 (2.61)
BMI						
18.5-24.9	5,533	49.12	409 (7.54)	1755 (32.36)	2667 (49.17)	593 (10.93)
25-29.9	4017	35.66	700 (17.78)	1734 (44.03)	1334 (33.88)	170 (4.32)
≥30	1.715	15.22	543 (32.21)	772 (45.79)	337 (19.99)	34 (2.02)
Hormone use						
Yes	3158	26.7	364 (11.96)	1082 (35.55)	1357 (44.58)	241 (7.92)
No	8648	73.3	1369 (16.13)	3369 (39.70)	3163 (37.27)	585 (6.89)
Previous Surgery						
No	7553	64.4	903 (12.13)	2913 (39.13)	2975 (39.96)	654 (8.78)
Yes	4172	35.6	824 (20.32)	1524 (37.57)	1537 (37.89)	171 (4.22)
Menopause						
No	4697	42.7	291 (6.30)	1322 (28.61)	2488 (53.84)	520 (11.25)
Yes	6304	57.3	1343 (21.75)	2851 (46.18)	1739 (28.17)	241 (3.90)
<i>SBLBI-RADS</i>						
B1	7804	65.93	1421 (19.15)	3222 (43.42)	2405 (32.41)	372 (5.01)
B2	3099	26.18	244 (8.14)	906 (30.24)	1530 (51.07)	316 (10.55)
B3	698	5.9	28 (4.27)	168 (25.61)	367 (55.95)	93 (14.18)
B4, B5, B6	236	1.99	17 (7.69)	78 (35.29)	111(50.23)	15 (6.79)

MDBI-RADS Mammographic density breast imaging report and data system, *BMI* Body mass index, *SBLBI-RADS* Suspect breast lesions breast imaging report and data system

Table 2 Demographic data analysis according to *SBLBI-RADS*, involving women attended in a breast imaging reference center located in Espirito Santo, Brazil, during 2014-2016

Variable	<i>SBLBI-RADS</i>					
	N	%	B1 7804 (65.93)	B2 3099 (26.18)	B3 698 (5.90)	B4, B5, B6 236 (1.99)
Age						
20-43	2624	22.17	1636 (62.35)	638 (24.31)	287 (10.94)	63 (2.40)
44-53	3882	32.80	2308 (59.45)	1255 (32.33)	240 (6.18)	79 (2.04)
54-64	3534	29.86	2508 (70.97)	844 (23.88)	132 (3.74)	50 (1.41)
≥65	1797	15.18	1352 (75.24)	362 (20.14)	39 (2.17)	44 (2.45)
Pregnancy						
Yes	10221	86.3	6864 (67.16)	2628 (25.71)	538 (5.26)	191 (1.87)
No	1616	13.7	940 (58.20)	470 (289.10)	160 (9.91)	45 (2.79)
N of children						
0	1590	13.51	924 (58.11)	463 (29.12)	158 (9.94)	45 (2.83)
1-4	9593	81.49	6380 (66.51)	2519 (26.26)	520 (5.42)	174 (1.81)
≥5	589	5.00	458 9 (77.76)	100 (16.98)	16 (2.72)	15 (2.55)
BMI						
18.5-24.9	5533	49.12	3480 (62.90)	1597 (28.86)	363 (6.56)	93 (1.68)
25-29.9	4017	35.66	2757 (68.63)	974 (24.25)	200 (4.98)	86 (2.14)
≥ 30	1715	15.22	1229 (71.66)	363 (21.17)	86 (5.01)	37 (2.16)
Hormone use						
Yes	3158	26.7	2064 (65.36)	867 (27.45)	171 (5.41)	56 (1.77)
No	8648	73.3	5735 (66.32)	2219 (25.66)	515 (5.96)	179 (2.07)
Previous Surgery						
No	7553	64.4	5144 (68.11)	1825 (24.16)	419 (5.55)	165 (2.18)
Yes	4172	35.6	2628 (62.99)	1229 (29.46)	249 (5.97)	66 (1.58)
Menopause						
No	4697	42.7	2859 (60.87)	1340 (28.53)	396 (8.43)	102 (2.17)
Yes	6304	57.3	458 (70.72)	1502 (23.83)	235 (3.73)	109 (1.73)
<i>MDBI-RADS</i>						
1	1733	15.0	1421 (83.10)	244 (14.27)	28 (1.64)	17 (0.99)
2	4452	38.6	3222 (73.66)	906 (20.71)	168 (3.84)	78 (1.79)
3	4520	39.2	2405 (54.50)	1530 (34.67)	367 (8.32)	111 (2.52)
4	826	7.2	372 (46.73)	316 (39.70)	93 (11.68)	15 (1.89)

SBLBI-RADS Suspect breast lesions breast imaging report and data system, *BMI* Body mass index, *MDBI-RADS* Mammographic density breast imaging report and data system

Table 3 Polytomous logistic regression analysis to $_{MD}BI$ -RADS, involving women attended in a breast imaging reference center located in Espirito Santo, Brazil, during 2014-2016

Variable	RP adjusted (CI 95%)					
	Density 2		Density 3		Density 4	
	RP adjusted	CI 95%	RP adjusted	CI 95%	RP adjusted	CI 95%
Age						
20-43	1.49	1.14, 1.94	1.79	1.37, 2.33	2.52	1.83, 3.45
44-53	1	1	1	1	1	1
54-64	0.66	0.55, 0.80	0.41	0.33, 0.50	0.46	0.33, 0.63
≥ 65	0.49	0.40, 0.61	0.21	0.16, 0.27	0.14	0.08, 0.23
Menopause						
Yes	1	1	1	1	1	1
No	1.18	0.95, 1.46	2.05	1.64, 2.56	2.34	1.71, 3.21
Pregnancy						
Yes	1	1	1	1	1	1
No	0.71	0.36, 1.49	1.55	0.72, 3.31	2.23	0.79, 6.29
N of children						
0	1.96	0.92, 4.13	1.93	0.89, 4.17	2.95	1.05, 8.28
1-4	1.24	1.05, 1.46	1.86	1.52, 2.28	2.27	1.49, 3.45
≥ 5	1	1	1	1	1	1
Hormone use						
No	1	1	1	1	1	1
Yes	0.90	0.77, 1.05	0.76	0.65, 0.89	0.85	0.68, 1.07
Previous Surgery						
No	1	1	1	1	1	1
Yes	0.52	0.46, 0.59	0.48	0.41, 0.55	0.24	0.19, 0.30
BMI						
18.5-24.9	1	1	1	1	1	1
25-29.9	0.58	0.50, 0.68	0.31	0.26, 0.36	0.17	0.13, 0.22
≥ 30	0.30	0.26, 0.36	0.08	0.07, 0.10	0.03	0.02, 0.05
$_{SBL}BI$ -RADS						
B1	1	1	1	1	1	1
B2	1.80	1.52, 2.14	3.80	3.24, 4.61	5.25	4.15, 6.63
B3	2.50	1.61, 3.86	6.35	4.11, 9.83	9.48	5.75, 15.65
B4, B5 and B6	2.37	1.30, 4.32	4.92	2.65, 9.12	3.92	1.71, 8.95

PR Prevalence rate, *CI* Confidence interval, *BMI* Body mass index, *$_{SBL}BI$ -RADS* Suspect breast lesions breast imaging report and data system

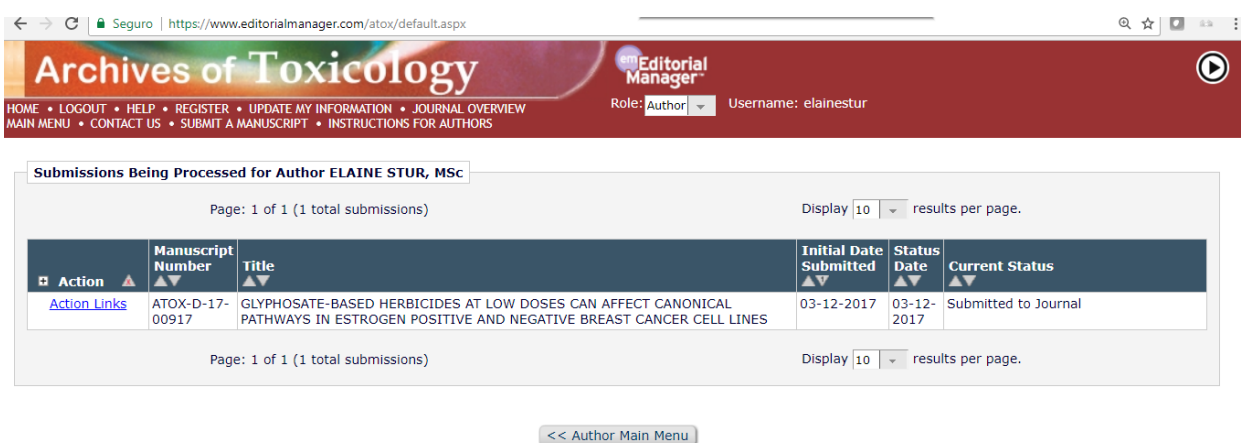
Table 4 Polytomous logistic regression analysis to _{SBL}BI-RADS, involving women attended in a breast imaging reference center located in Espirito Santo, Brazil, during 2014-2016

Variable	RP adjusted (CI 95%)					
	BI-RADS B2		BI-RADS B3		BI-RADS 4,5,6	
	RP adjusted	CI 95%	RP adjusted	CI 95%	RP adjusted	CI 95%
Age						
20- 43	1	1	1	1	1	1
44-53	1.61	1.41, 1.84	0.82	0.66, 1.02	1.01	0.68, 1.52
54-64	1.24	1.03, 1.50	0.56	0.40, 0.796	0.64	0.35, 1.1
≥65	1.11	0.89, 1.38	0.37	0.23, 0.59	1.14	0.60, 2.16
Menopause						
Yes	1	1	1	1	1	1
No	1.03	0.89, 1.19	1.07	0.82, 1.40	1.01	0.64, 1.50
Pregnancy						
Yes	1	1	1	1	1	1
No	1.23	0.74, 2.03	1.20	0.51, 2.77	0.82	0.21, 3.17
N of children						
0	0.90	0.54, 1.49	1.14	0.49, 2.64	1.15	0.29, 4.47
1-4	1.06	0.90, 1.25	1.00	0.71, 1.41	1.56	1.00, 2.43
≥5	1	1	1	1	1	1
Hormone Use						
No	1	1	1	1	1	1
Yes	1.09	0.98, 1.21	1.46	1.19, 1.79	1.21	0.85, 1.72
Previous Surgery						
No	1	1	1	1	1	1
Yes	1.45	1.32, 1.60	1.45	1.21, 1.74	0.81	0.58, 1.13
BMI						
18.5-24.9	1	1	1	1	1	1
25-29.9	0.99	0.89, 1.10	0.95	0.78, 1.16	1.48	1.07, 2.05
≥ 30	1.04	0.87, 1.20	1.24	0.94, 1.63	1.56	1.00, 2.43
_{MD} BI-RADS						
1	1	1	1	1	1	1
2	1.74	1.47, 2.06	2.34	1.52, 3.60	2.24	1.24, 4.04
3	3.75	3.15, 4.46	5.99	3.90, 9.18	4.68	2.54, 8.60
4	5.22	4.14, 6.59	8.84	5.43, 14.40	3.87	1.71, 8.77

PR Prevalence rate, CI Confidence interval, BMI Body mass index, _{MD}BI-RADS Mammographic density breast imaging report and data system

4.2 Manuscrito 2

O manuscrito intitulado “*Glyphosate-Based Herbicides at low doses can affect canonical pathways in Estrogen Positive and Negative breast cancer cell lines*” foi submetido para avaliação ao periódico *Archives of Toxicology*, de acordo com os critérios estipulados pelo Regimento do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (IF: 5.901) (Figura 13).



Seguro | https://www.editorialmanager.com/atox/default.aspx

Archives of Toxicology Editorial Manager

HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Role: Author Username: elainestur

Submissions Being Processed for Author ELAINE STUR, MSc

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	ATOX-D-17-00917	GLYPHOSATE-BASED HERBICIDES AT LOW DOSES CAN AFFECT CANONICAL PATHWAYS IN ESTROGEN POSITIVE AND NEGATIVE BREAST CANCER CELL LINES	03-12-2017	03-12-2017	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

Figura 13: Comprovação de submissão do manuscrito 1 para a revista *Archives of Toxicology*.

GLYPHOSATE-BASED HERBICIDES AT LOW DOSES CAN AFFECT CANONICAL PATHWAYS IN ESTROGEN POSITIVE AND NEGATIVE BREAST CANCER CELL LINES

-Archives of toxicology-

Elaine Stur^{1,2}, Andrés Felipe Aristizabal-Pachon^{3,4}, Kamila Chagas Peronni^{3,4}, Lidiane Pignaton Agostini^{1,2}, Sabine J. Waigel⁵, Julia Chariker⁶, Donald M. Miller⁷, Shelia Dian Thomas⁷, Francine Rezzoug⁷, Raquel Spinassé Detogni^{1,2}, Raquel Reis^{1,2}, Wilson Araujo Silva Junior^{3,4}, Iuri Drumond Louro^{1,2}

(1) Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

(2) Departamento de Ciências Biológicas-Núcleo de Genética Humana e Molecular. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

(3) Department of Genetics at Ribeirão Preto Medical School, and Center for Medical Genomics - HCRP, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

(4) National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy and Center for Cell-Based Therapy, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

(5) Molecular Targets Program, JG Brown Cancer Center, University of Louisville, Louisville, Kentucky.

(6) Department of Computer Engineering and Computer Science, Speed School of Engineering, University of Louisville, Kentucky, United States of America.

(7) James Graham Brown Cancer Center, Department of Medicine, University of Louisville, Louisville, Kentucky, United States of America.

Corresponding author: Elaine Stur – ORCID ID: 0000-0001-5962-0050

Address: avenue Fernando Ferrari, nº 514, Vitória, ES, Brazil, 29075-910.

Phone: 55 27 4009 2324, ramal *5324. FAX: 55 27 4009 2324.

Email: elaine_stur@yahoo.com.br

ACKNOWLEDGMENTS

Stur E, Agostini LP, were supported by FAPES (Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo). Part of this work was performed with assistance of the UofL Genomics Facility, which is supported by NIH P20GM103436 (KY IDeA Networks of Biomedical Research Excellence), NIH P30GM106396 (UofL J. G. Brown Cancer Center Phase III CoBRE), the J. G. Brown Foundation, and user fees.

ABSTRACT

Glyphosate is a broad-spectrum herbicide that is used worldwide. It is the main pollutant of rivers and surface water, and when commercially mixed with surfactants, its ability to spread is greatly magnified. The most well-known glyphosate based product is Roundup®. This herbicide is considered an endocrine disruptor and many studies have shown the cytotoxicity potential of glyphosate and glyphosate-based herbicides, the latter being more toxic. In breast cancer it has been demonstrated that glyphosate can induce cellular proliferation via estrogen receptors. Using the Human Transcriptome Arrays 2.0 for gene expression analysis, we identified cellular processes and canonical pathways altered by low glyphosate concentrations at a short exposure time to Roundup® Original and AMPA, in estrogen positive receptor and triple negative breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-468). Using 0.05% Roundup®, at 48 hours, both cell lines suffered deregulation of 11 canonical pathways, the most important being cell cycle and DNA damage repair pathways. Enrichment analysis showed similar results, except that MDA-MB-468 mainly altered metabolic processes. Although 48-hour 10mM AMPA showed few differentially expressed genes, it altered metabolic processes (doxorubicin metabolic process in MDA-MB-468 and response to abiotic stimulus in MCF-7). Therefore, we conclude that both compounds cause damage at low doses in a relatively short period of time in these two models, mainly in cell cycle and DNA repair.

Key words: Glyphosate-based herbicide; Breast cancer; AMPA; cell cycle; DNA repair.

INTRODUCTION

Glyphosate (*N*-(phosphonomethyl) glycine) is a broad-spectrum herbicide used worldwide in agriculture and forestry for weed control, and it is the main pollutant of rivers and surface water (Richard et al. 2005; Hokanson et al. 2007; Gasnier et al, 2009; Mink et al. 2012; Thongprakaisang et al. 2013). It has been commercialized since 1974, as Glyphosate-Based Herbicides (GBHs). The commercialized products are often formulated with other materials, such as surfactants, with the most well-known brand being Roundup® (Monsanto Co, St Louis, MO, USA) (Myers et al. 2016) .

Roundup® is a powerful herbicide due to its action in the shikimate pathway targeting the enzyme 5-enolpyruvyl-3-shikimate phosphate synthase (EPSPS), the main pathway to essential aminoacids production, such as tryptophan, phenylalanine and tyrosine (Steinrucken and Amrhein 1980; Komives and Schröder 2016). The shikimate pathway only exists in plants, bacteria and some fungi, which may explain the low toxicity in mammals (LD₅₀ >4g/kg in humans). Because of these characteristics, glyphosate is the most successful herbicide in history (Hokanson et al. 2007; Thongprakaisang et al. 2013).

Adjuvants used to produce Roundup® are surfactants that facilitate glyphosate uptake in cells through plasma membranes, increasing efficiency, stability and bioaccumulation (Benachour et al. 2007). The exact formulation of surfactants is unknown, but the most common is polyethoxylated tallowamine (POEA) or alkylamine (Miller et al. 2010). Many studies demonstrate that Roundup® is more efficient than its active principle, suggesting a synergistic effect caused by adjuvants (Richard et al. 2005; Benachour et al. 2007; Gasnier et al. 2009).

Glyphosate is degraded in the soil by microorganisms to aminomethylphosphonic acid (AMPA) (Li et al. 2013; IARC, 2017). In mammals glyphosate is not completely degraded and is eliminated unchanged in urine, but some studies showed that glyphosate can be degraded by gut bacteria (Samsel and Seneff, 2015; IARC, 2017). There is no consensus about the AMPA action in mammals, but it is known that after glyphosate is metabolized, AMPA accounts for only 0.2-0.3% of the initial volume. While glyphosate is the most commercialized herbicide in the world, AMPA has no commercial use (Li et al. 2013).

Although currently considered by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a class 2A carcinogen (probably carcinogenic), there is no consensus about how aggressive the GBHs are in mammals. Typically, GBHs are used in concentrations between 1-2%, with 21-42mM of glyphosate, but in some cases, even low concentrations can have an impact on human health (Benachour et al. 2007; Hokanson et al. 2007). Nevertheless, there is limited evidence that glyphosate is carcinogenic. Human *in vitro* studies and animal models show genotoxic potential, chromosomal damage, and oxidative stress induction (IARC, 2017). In addition, GBH may disrupt estrogen synthesis (Benachour et al. 2007) through aromatase deregulation. Therefore,

glyphosate may impact diseases related to hormone physiology, such as breast cancer (BC) (Gasnier et al. 2009).

Thongprakaisang (2013) and Mesnage et al (2017) showed glyphosate stimulation of estrogen receptor (ER) in ER+ BC cell lines, but not in ER-, in a dose-dependent manner. Hokanson et al (2005) showed a similar effect of glyphosate and estrogen in ER+ cells. The effect of GBHs on ER- BC cells is not well understood. Therefore, we aimed to identify gene expression changes in ER+ and ER- BC cell lines treated with low concentration short time Roundup® and AMPA, to address changes in canonical pathways, which we believe could interfere with cell proliferation.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

(Aminomethyl)phosphonic acid (AMPA, CAS Number: 1066-51-9), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). The Roundup® Original herbicide formulation (N - (Phosphonomethyl) glycine Isopropylamine salt - 480 g/L and 360g/L of glyphosate) (Monsanto, São Paulo, Brazil) was available on the market.

Cell lines and culture conditions

A hormone-independent human breast cancer cell line MDA-MB-468 (ER-) and a hormone-dependent human BC cell line MCF-7 (ER+) were cultured in RPMI 1640 (1X) and DMEM (1X) respectively, and supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 1% Penicillin-streptomycin. Cells were maintained at 37 °C in humidified environment with 95% air and 5% CO₂. Culture medium and supplements were purchased from Gibco-Invitrogen Life Technology (Carlsbad, CA, USA).

Cell viability MTT Assay

Cell growth and viability were tested using the MTT reagent assay. Cells were seeded at $5 \cdot 10^3$ cells/100 μ L/well in 96-well microtiter plates. After 24h incubation for the attachment, the cells were treated with concentrations of AMPA ranging from 0.01 to 10mM and 0.01% to 0.3% of Roundup®. After 3h, 15h, 24 and 48h of incubation period, the medium was removed and 0.5mg/mL of MTT was added into each well. Cells were incubated for 3h, then the medium was removed and 100 μ L of DMSO was added to each well to dissolve the precipitated dye. After 1 hour, the changes were measured by optical density at 570 nm, using microplate readers FLUOstar Omega® (BGM LabTech). Cell sensitivity to a chemical was expressed as the % cell viability compared to the control cells.

RNA Extraction

Total RNA was extracted from biological samples treated with Roundup® at 0.05% (1.1mM of glyphosate) and AMPA at 10mM for 48 hours, using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA purity was assessed using a NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) and RNA quality was checked using Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Only RNA preparations with a RNA integrity number (RIN) >7 were considered for microarray analysis.

Transcriptome Profiling

The RNA was analyzed using the Human Transcriptome Arrays 2.0 (HTA 2.0), which evaluates more than 67,500 coding and non-coding transcripts, with more than six million oligonucleotide probes (25 bases in length). This array is able to interrogate all transcript isoforms in the human transcriptome with probes targeting coding transcripts, exon-exon splice junctions and non-coding transcripts (Nunez-enriquez et al. 2016; Friess et al. 2017).

All procedures were performed according to the manufacturer's protocols. From each sample, complementary RNA (cRNA) was prepared from 100ng of total RNA according to the Affymetrix Whole Transcript (WT) protocol. The cRNA was used to generate single-stranded DNA, which was fragmented and biotinylated. The labeled single-stranded DNA was hybridized for 16 h at 45 °C on the Affymetrix HTA 2.0 microarrays. Then, the microarrays were washed and stained with a streptavidin-phycoerythrin conjugate in an Affymetrix Fluidics Station 450. Scanning and data extraction were followed by the transformation of fluorescence data into CEL files employing the Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC) software (Yao et al. 2016; Friess et al. 2017).

Data Analysis

The data were analyzed using the Partek Genomics Suite v 6.6 (Partek Inc., Louis, MO). Principal Component Analysis (PCA) was applied to assess the distribution of the samples studied. Pre-processing of Affymetrix CEL-files was performed using the robust multi-chip analysis (RMA) algorithm, which performs background adjustment, quantile normalization and probe summarization. Differential expression analysis was realized using a one-way ANOVA. Class comparison was performed using ANOVAs, which included a multiple testing correction using False Discovery Rates (FDRs) set with a p-value <0.01 considered as significant for the biological and molecular function analyses. Up and down-regulated genes were identified using a fold-change of ≥ 1.5 and ≤ -1.5 .

An enrichment analysis (EA) was performed using MetaCore (GeneGo™, Thomson Reuters, NY), where genes with altered expression were mapped to Gene Ontology (GO). GO annotations were used as indicators of biological functions. GO describes gene products in terms of their associated biological processes, cellular components, and molecular functions (Hassan et al. 2010). Pathview (Luo et al. 2013) was used to construct the maps of canonical pathways.

RESULTS

Cell viability evaluation

MTT analysis is shown in Figure 1. Both cell lines exhibited similar patterns under Roundup® and AMPA treatments, being the 3 hour-exposure causing more death than 48 hours.

In MCF-7 cells, 0.15% Roundup® caused more cell death at 3 hours than at 48 hours, and at 0.3% concentration less than 30% of the cells survived. Similar responses were found for MDA-MB-468, in which the 3 hour-treatment was more damaging than all other timepoints for all concentrations. At 48 hours using the highest concentration (0.3% Roundup®), survival was less than 50% for both cell lines.

AMPA effects at 48h caused less death than at 3h, for all concentrations on both cell lines. Similar results were observed for 10mM/48 hours, with a survival rate of approximately 70%. In MCF-7, a 15 hour-treatment cause more death, and in MDA-MB-468 the 3-hour exposure caused the most death, for all concentrations.

Differential gene expression

A 48-hour treatment of 1.1mM glyphosate (0.05%) and 10mM AMPA was chosen to analyze gene expression. Differentially expressed genes (DEGs) were identified using a p-value adjusted (FDR) of <0.01 and a minimal fold change of 1.5. There were 1,686 DEGs identified in MCF-7 after Roundup® exposure and 7 DEGs after AMPA treatment. There were 1,214 DEGs identified in Roundup®-treated MDA-MB-468 and 268 DEGs after AMPA treatment. In Figure 2, there were 531 common DEGs for Roundup® and 3 for AMPA, which were downregulated for all treatments and cell lines (*BNIP3*, *FAM162A* and *PGK1*) (Online Resource Table 1). Figure 2, a Venn diagram for all treatments and cell lines, and Figure 3, a hierarchical distribution of the top 500 DEGs, show Roundup® exposure leading to different gene expression patterns when compared to AMPA exposure and control.

Enrichment analysis

Comprehensive process networks analysis of deregulated genes after Roundup® treatment revealed their association with cell cycle and DNA damage repair. MCF-7 GO (Gene Ontology) cellular process analysis showed changes related to cell cycle and cell metabolism processes, whereas MDA-MB-468 cells changes were related to metabolism. Table 1 displays the top 10 processes networks and GO cellular processes. Figure 5 displays the correlation between cell cycle and DNA damage repair of Roundup®-treated MCF-7 cells.

There was no significant pathway enrichment for either cell line exposed to AMPA. However, some enrichment was found for GO cellular processes (see Table 2). MDA-MB-468 was enriched for doxorubicin metabolic process and MCF-7 was enriched for response to abiotic stimulus.

When looking at MCF-7 unique differentially expressed genes, cellular component organization or biogenesis is the main altered GO cellular process, which is responsible for biosynthesis of constituent macromolecules, assembly, arrangement of constituent parts or disassembly of cellular components. The second GO cellular process enriched for this cell line was cell cycle. Table 3 lists the top significantly enriched GO cellular processes for each cell line. In the process network analysis, the main process was cell cycle.

The top 10 GO cellular processes of MDA-MB-468 unique differentially expressed genes did not include cell cycle. However, most processes were related to metabolism, which was confirmed by the process networks analysis (Table 3).

Despite the low number of common DEGs (3 genes), the EA indicated that GO cellular process response to hypoxia was significantly enriched. A Metacore pathway enrichment analysis indicated a significant enrichment in the transcription of *HIF-1* targets pathway (see Online Resource Figure 1), which included 2 out of the 3 DEGs common to both cell lines (*BNIP3* and *PGK1*).

Canonical Pathways

Using Pathview web, the effect of DEGs in 11 canonical pathways was analyzed: NOTCH, WNT, Hedgehog, TGF- β , MAPK, JAK-STAT, PI3K-AKT, RAS, Cell cycle, Apoptosis and DNA damage control. Roundup® treatment showed deregulation of all these pathways in both cell lines. AMPA-treated MDA-MB-468 showed some DEGs in WNT, Hedgehog, MAPK, JAK-STAT, PI3K, RAS, Cell cycle and Apoptosis, which were not found in MCF-7. Figure 4 shows pathway changes in the two cell lines and treatments.

As previously reported in EA, cell cycle was the most affected process. MDA-MB-468 exhibited changes when exposed to both treatments, while MCF-7 exhibited changes only with Roundup® (see Online Resource Figure 2). In MCF-7, pathway deregulation is associated with downregulation of key genes, such as *c-MYC*, cyclins and *PCNA*. MDA-MB-468 was also deregulated, however, fewer genes were affected.

Several pathways related to DNA damage repair, base excision repair, nucleotide excision repair and mismatch repair, were included in the analysis. None of them were altered by AMPA treatment. In comparison, Roundup® treatment affected all of them, especially base excision repair, where all genes affected were downregulated. DNA damage repair pathways and the complete deregulated gene list for 11 canonical pathways are shown in the Online Resource (Figures 3-5 and Tables 2-14).

DISCUSSION

As previously described in the literature, glyphosate can potentially induce cell proliferation of ER+ BC cell lines, while Roundup® (the complexed herbicide), due to a toxic cellular effect (death) not shown by glyphosate. Our aim was to show gene expression changes in ER+ BC cell line (MCF-7) and in a triple negative BC cell line (MDA-MB-468) exposed to Roundup® and AMPA to understand if the effect of these chemicals is dependent on ER positivity in cells.

Low concentration Roundup® Original showed high levels of cell death on both cell lines at time-points 3h, 15h, 24h and 48h. Thongprakaisang et al. (2013) found increased proliferation on ER+ BC cell lines treated with glyphosate (Thongprakaisang et al. 2013). Similarly, Mesnage et al. (2017) described the same results for glyphosate, whereas Roundup® did not cause a significant increase in cell proliferation and had a more toxic effect than glyphosate (Mesnage et al. 2017). Other studies have demonstrated the same effect in other cell lines. Benachour et al. (2007) showed that Roundup® formulations are more toxic to HEK293 (human embryonic kidney) than glyphosate alone (Benachour et al. 2007). Moreover, Richard et al. (2005) analyzed the JEG3 cell line (choriocarcinoma), showing high toxicity for Roundup® treatment (Richard et al. 2005).

It seems clear that AMPA is less toxic than glyphosate and Roundup®. Li et al. (2013) analyzed 8 human cancer and 2 immortalized human cell lines, showing inhibition of cell proliferation of all cancer cell lines at 50mM, but not of immortalized cell lines. In our study, it was possible to observe that AMPA was more toxic to BC cells lines than previously reported for other cell lines (60% death at 10mM). Li et al. (2013) suggests that highly proliferative cancer cells are more sensitive to these drugs than slower ones (Li et al. 2013).

AMPA, is a glycine analog, that may decrease the synthesis of intracellular glycine, through inhibition of serine hydroxymethyltransferase (SHMT). This occurs because SHMT catalyzes the production of one-carbon units used for *de novo* thymidylate biosynthesis (Baluz et al. 2002; Anderson and Stover 2009; Li et al. 2013). Rapidly proliferating cancer cells show a high demand of glycine, one third of which comes from extracellular sources, whereas slowly proliferating cancer cells are self-sufficient for glycine production (Jain et al. 2012; Li et al. 2013). Therefore, a reduction in glycine production may have a toxic effect on rapidly proliferating tumor cells, which could explain the results of viability found here.

Moreover, the main GO cellular process altered after MCF7-cells exposure to AMPA was response to abiotic stimulus. The EA to MDA-MB-468 showed an association with doxorubicin metabolic processes, which should lead to cancer cell death. Furthermore, EA showed pathways related with transcription of *HIF-1* targets for both cell lines. Together, overall metabolism changes and a putative glycine synthesis reduction may account for cancer cell death.

After Roundup® treatment analysis of 11 canonical pathways and association with EA showed that cell cycle and DNA damage repair are affected, and that this chemical is more toxic to MCF-7. Chaufan et al. (2014) analyzed the effects of glyphosate, GBHs and AMPA on HepG2 (liver hepatocellular cells), finding that AMPA and glyphosate did not affect cell viability in a concentration up to 1000mg/L, while GBHs caused rapid cell death. In addition, GBHs induced cytotoxicity, reactive oxygen species (ROS) production and apoptosis at low doses (Chaufan et al. 2014). In a similar fashion, Mesnage et al. (2017) analyzing glyphosate treated MCF-7 cell gene expression found cell cycle alterations (Mesnage et al. 2017), whereas Hokanson et al. (2005) reported changes on the *HIF-1* pathway (Hokanson et al. 2007).

Studies with sea urchin have shown that Roundup® is able to cause a delay on cell cycle progression after 30 minutes of treatment, suggesting that the delay in activating CDK1/cyclin B complex is responsible for the deregulation of cell cycle progression (Marc et al. 2002). Similarly, in 2004, Marc et al. showed that in Roundup® treated sea urchin embryos, DNA synthesis was inhibited by 75%, possibly due to the same mechanism (Marc et al. 2004).

Our results show downregulation of cyclins and DNA damage repair pathways. Main cell cycle changes happened on G1 and S phases (Online Resource Figure 2).

Martini et al. (2012) showed that fibroblasts temporarily exposed to Roundup® were able to proliferate normally after drug removal (Martini et al. 2012).

Roundup®'s higher toxicity is probably due to the addition of surfactants in its formula, which may explain the lack of cell proliferation after treatment with it (Mesnage et al. 2017).

Our findings suggest that Roundup® affects survival due to cell cycle downregulation, metabolism changes, which may alter mitochondria oxygen consumption, increase levels of ROS, hypoxia, damaged DNA repair, and mutation accumulation, ultimately causing cell death.

To our knowledge, this is the first study that analyzes the effects of Roundup® and AMPA on gene expression in triple negative BC cells. EA analysis shows that independently of ER positivity, the two cell lines can suffer deregulation of cell cycle and DNA repair.

MDA-MB-468 changes were more related to metabolism, whereas MCF-7 changes were more linked to cell cycle. Considering both cell lines doubling time (MCF-7: 24 hours, MDA-MB-468: 48 hours), it is possible that our 48-hour treatment allowed MCF-7 cells to divide twice, and show changes in the cell cycle more clearly than MDA-MB-468 cells.

CONCLUSION

We have found that Roundup®, at much lower doses than the ones used in practice, was able to deregulate important intracellular pathways in ER+ and triple negative BC cell lines, showing that glyphosate's effect on cells is not exclusive to the ER pathway. Cell cycle effects were more severe on MCF-7 than MDA-MB-468 cells. In contrast, AMPA exposure had a higher effect on MDA-MB-468 than MCF-7 cells.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

BIBLIOGRAPHY

Anderson WF, Rosenberg PS, Prat A, Perou CM, Sherman ME (2014) How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more?. *J Natl Cancer Inst* 106(8). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju165>.

Baluz K, do Carmo MGT, Rosas G (2002) O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. *Revista Brasileira de Cancerologia* 48(4):597-607.

Benachour N, Seralini GE (2009). Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem Res Toxicol* 22(1):97-105. <https://doi.org/10.1021/tx800218n>

Chaufan G, Coalova I, Rios de Molina Mdel C (2014) Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient. *Int J Toxicol* 33(1):29-38. <https://doi.org/10.1177/1091581813517906>

Friess J, Hecker M, Roch L, Koczan D, Fitzner B, Angerer IC, Schroder I, Flechtner K, Thiesen HJ, Winkelmann A, Zettl UK (2017) Fingolimod alters the transcriptome profile of circulating CD4+ cells in multiple sclerosis. *Sci Rep* 7:42087. <https://doi.org/10.1038/srep42087>

Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair, E, Chagnon MC, Seralini GE (2009) Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262(3):184-191. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.06.006>

Hassan HE, Myers AL, Lee IJ, Chen H, Coop A, Eddington ND (2010) Regulation of gene expression in brain tissues of rats repeatedly treated by the highly abused opioid agonist, oxycodone: microarray profiling and gene mapping analysis. *Drug Metab Dispos* 38(1):157-167. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.029199>

Hokanson R, Fudge R, Chowdhary R, Busbee D (2007) Alteration of estrogen-regulated gene expression in human cells induced by the agricultural and horticultural herbicide glyphosate. *Hum Exp Toxicol* 26(9):747-752. <https://doi.org/10.1177/0960327107083453>

IARC (2017) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 112, pp. 464.

Jain M, Nilsson R, Sharma S, Madhusudhan N, Kitami T, Souza AL, Kafri R, Kirschner MW, Clish CB, Mootha VK (2012) Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science* 336(6084):1040-1044. <https://doi.org/10.1126/science.1218595>

Komives T, Schröder P (2016) On glyphosate. *Ecocycles* 2(2):1-8. <https://doi.org/10.19040/ecocycles.v2i2.60>

Li Q, Lambrechts MJ, Zhang Q, Liu S, Ge D, Yin R, Xi M, You Z. (2013). Glyphosate and AMPA inhibit cancer cell growth through inhibiting intracellular glycine synthesis. *Drug Des Devel Ther* 7:635-643. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S49197>

Luo W, Brouwer C. (2013) Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics* 29(14):1830-1831. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btt285>

Marc J, Belle R, Morales J, Cormier P, Mulner-Lorillon O (2004) Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. *Toxicol Sci* 82(2):436-442. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh281>

Marc J, Mulner-Lorillon O, Boulben S, Hureau D, Durand G, Belle R (2002) Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem Res Toxicol* 15(3):326-331.

Martini CN, Gabrielli M, Vila Mdel C (2012) A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. *Toxicol In Vitro* 26(6):1007-1013. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.04.017>

Mesnage R, Phedonos A, Biserni M, Arno M, Balu S, Corton JC, Ugarte R, Antoniou MN (2017) Evaluation of estrogen receptor alpha activation by glyphosate-based herbicide constituents. *Food Chem Toxicol* 108(Pt A):30-42. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.025>

Miller A, Gervais JA, Luukinen B, Buhl K, Stone D (2010) Glyphosate Technical Fact Sheet. <http://npic.orst.edu/factsheets/glyphotech.pdf>. Accessed 20 Oct 2017

Mink PJ, Mandel JS, Scurman BK, Lundin JI (2012) Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: a review. *Regul Toxicol Pharmacol* 63(3):440-452. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.05.012>

Myers JP, Antoniou MN, Blumberg B et al (2016) Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ Health* 15. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>

Nunez-Enriquez JC, Barcenas-Lopez DA, Hidalgo-Miranda A et al (2016) Gene Expression Profiling of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children with Very Early Relapse. *Arch Med Res* 47(8):644-655. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2016.12.005>

Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Seralini GE (2005) Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ Health Perspect* 113(6):716-720.

Samsel A, Seneff S (2015) Glyphosate, pathways to modern diseases III: Manganese, neurological diseases, and associated pathologies. *Surg Neurol Int* 6(45). <https://doi.org/10.4103/2152-7806.153876>

Steinrucken HC, Amrhein N (1980) The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 94(4):1207-1212.

Thongprakaisang S, Thiantanawat A, Rangkadilok N, Suriyo T, Satayavivad J (2013) Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food Chem Toxicol* 59:129-136. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.057>

Yao Y, Shang J, Song W, Deng Q, Liu H, Zhou Y (2016) Data for the gene expression profiling and alternative splicing events during the chondrogenic differentiation of human cartilage endplate-derived stem cells under hypoxia. *Data Brief* 7:1438-1442. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.04.037>

FIGURES AND TABLES

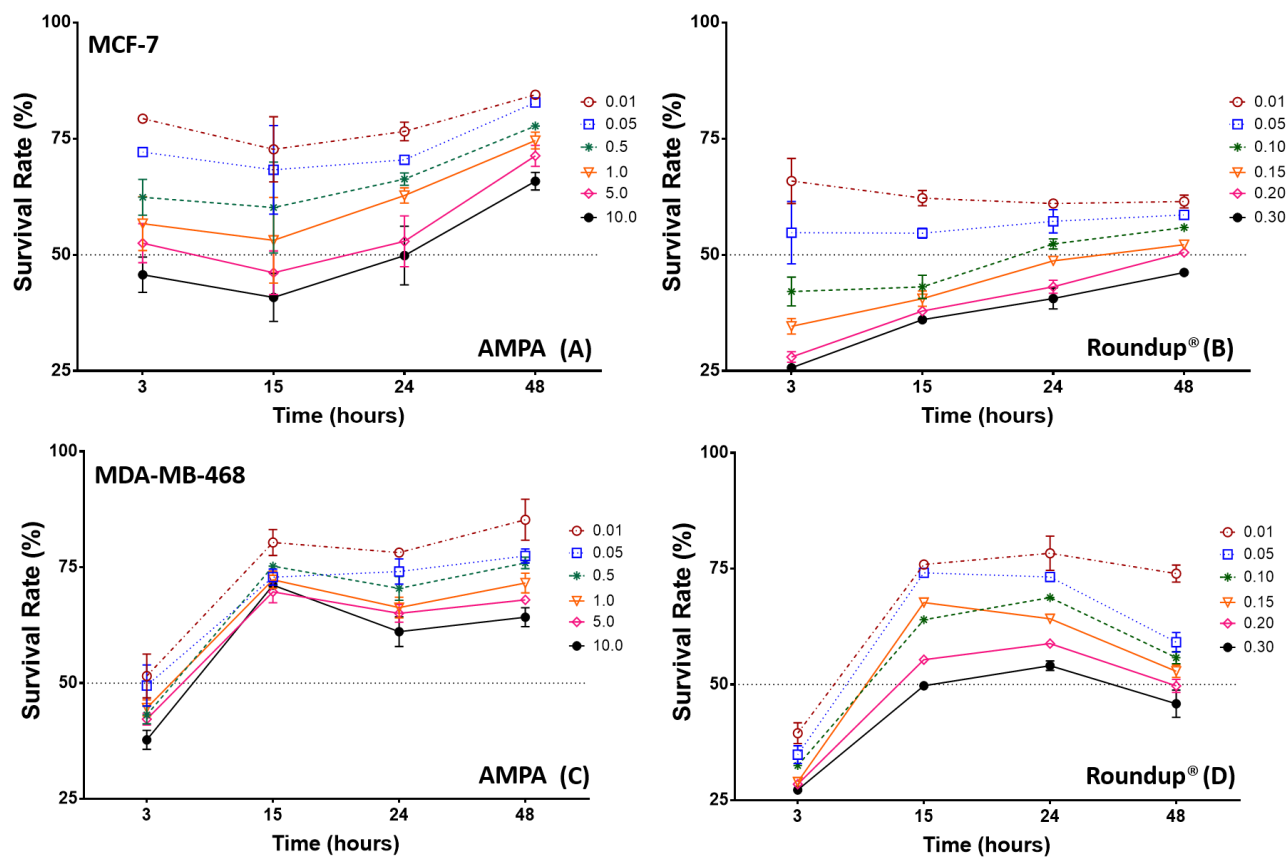


Fig 1 Results of cell viability (MTT Assay) of MCF-7 and MDA-MB-468 after treatments with Roundup® and AMPA

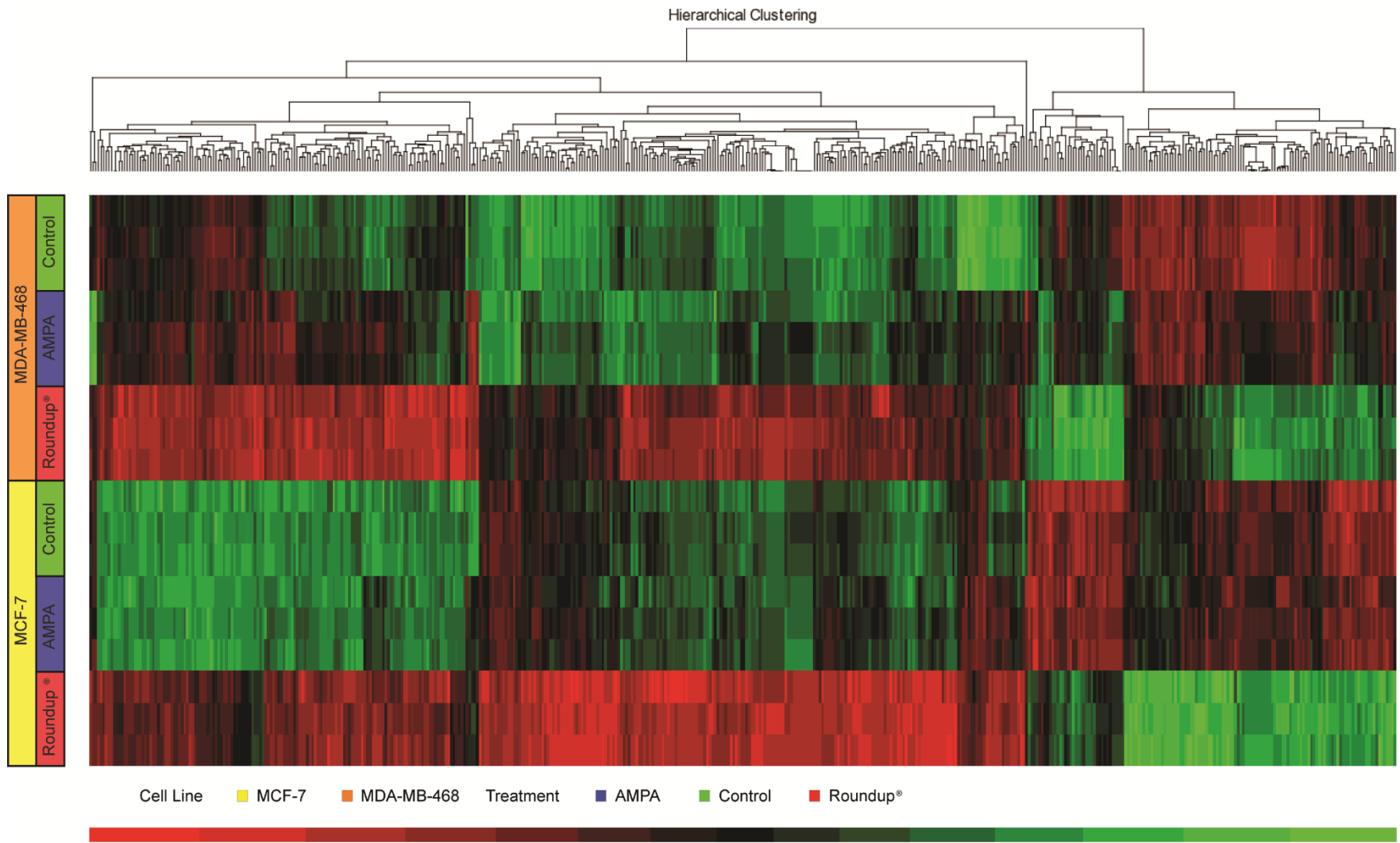


Fig 3 The hierarchical distribution of the Top 500 DEGs.

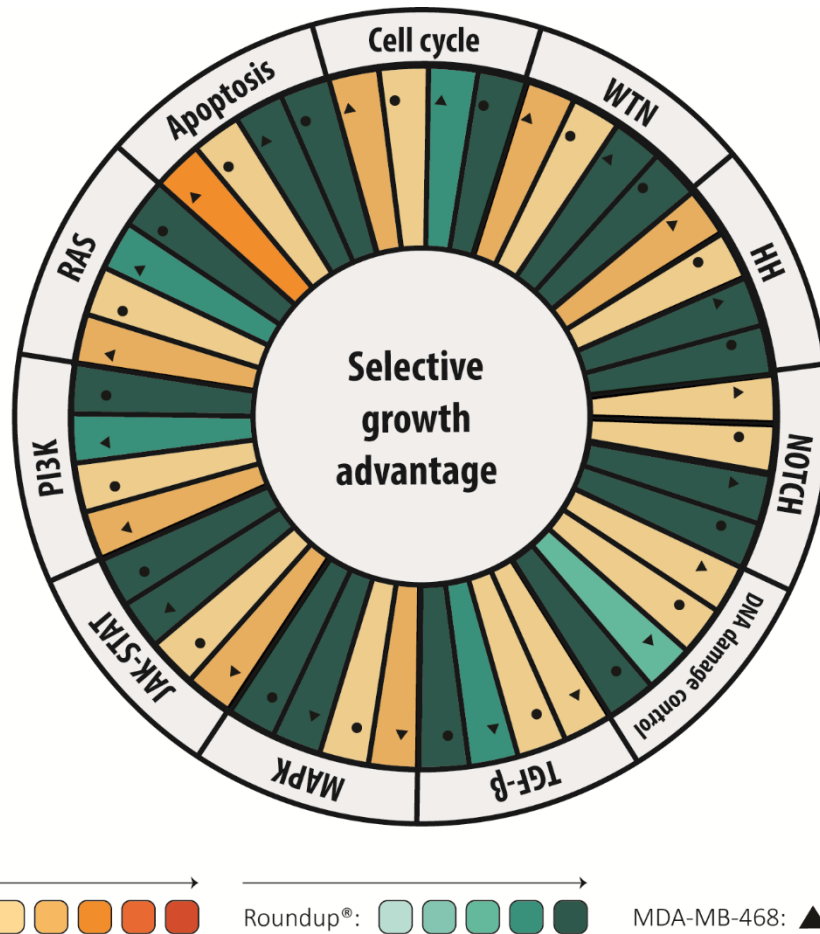


Fig 4 Figure shows 11 canonical pathways included in the DEGS found for both cell lines and treatments. Color intensity correlates with pathways alteration level.

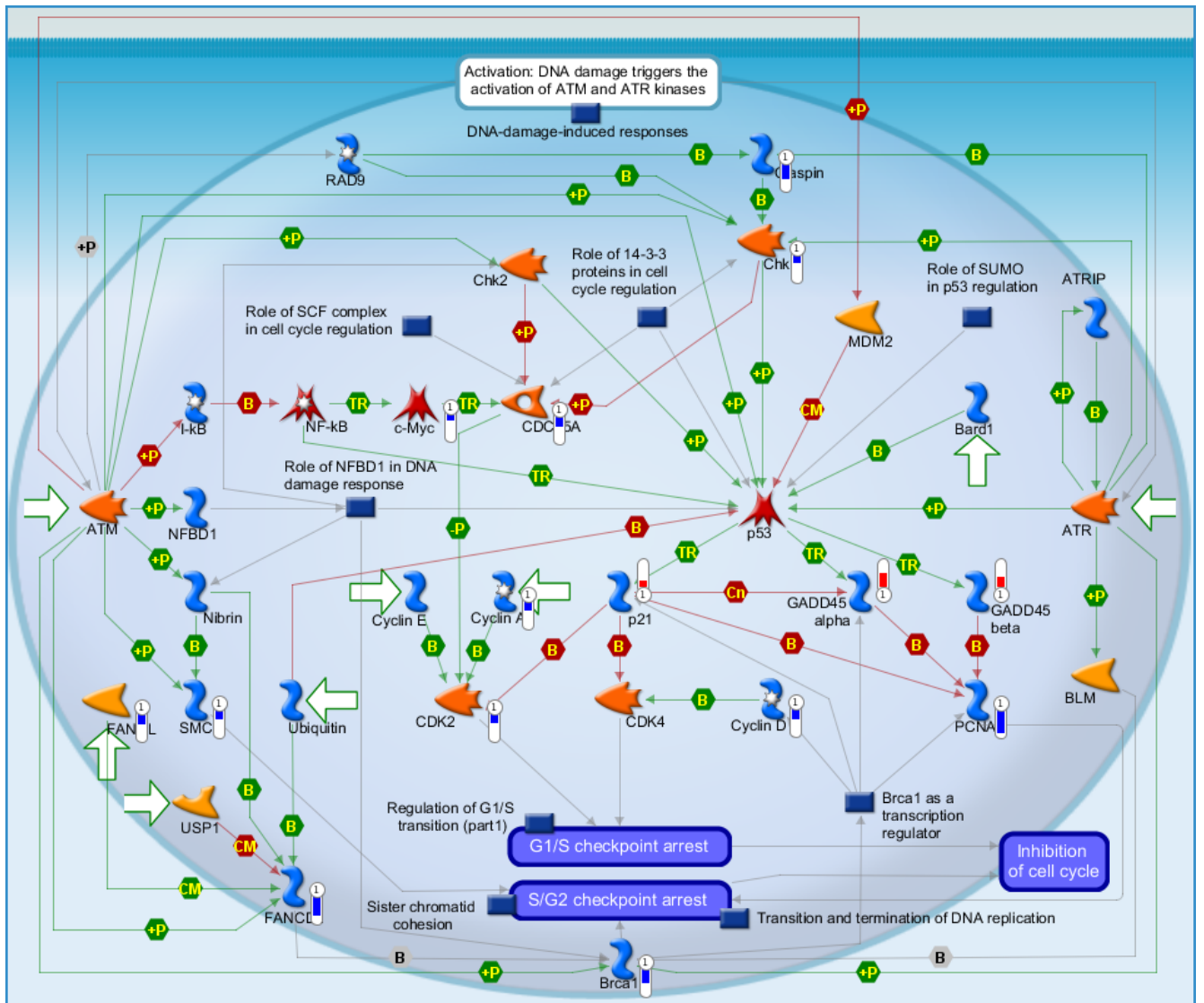


Fig 5 DNA damage ATM/ATR regulation of G1/S checkpoint from MCF-7 treated with Roundup®.

Table 5: Top 10 process networks and GO cellular processes to MCF-7 and MDA-MB-468 treated with Roundup®.

MCF-7- Roundup®			
<i>Process Network</i>	<i>FDR</i>	<i>GO Process</i>	<i>FDR</i>
Cell cycle_S phase	1.90E-18	Cell cycle	3.943E-41
DNA damage_Checkpoint	5.411E-14	Cellular metabolic process	1.067E-40
Cell cycle_Core	2.114E-11	Mitotic cell cycle	2.625E-40
Cell cycle_G1-S	4.673E-07	Cell cycle process	9.226E-38
Cell cycle_G2-M	5.459E-07	Cellular macromolecule metabolic process	1.555E-36
DNA damage_DBS repair	3.781E-06	Cellular response to stress	1.652E-36
Cell cycle_Mitosis	9.690E-06	Nucleobase-containing compound metabolic process	1.100E-35
DNA damage_MMR repair	4.794E-05	Organic cyclic compound metabolic process	3.301E-35
Apoptosis_Apoptotic nucleus	4.794E-05	Mitotic cell cycle process	7.841E-35
Cell cycle_Meiosis	2.837E-04	Nucleic acid metabolic process	1.242E-34
MDA-MB-468- Roundup®			
<i>Process Network</i>	<i>FDR</i>	<i>GO Process</i>	<i>FDR</i>
Cell cycle_S phase	5.484E-05	Cellular metabolic process	1.153E-16
DNA damage_Checkpoint	4.621E-03	Primary metabolic process	1.170E-15
Reproduction_FSH-beta signaling pathway	1.915E-02	Cellular macromolecule metabolic process	3.385E-15
Cell cycle_G1-S	1.915E-02	Metabolic process	3.178E-14
Cell cycle_G2-M	1.915E-02	Organic substance metabolic process	1.328E-13
Apoptosis_Apoptotic nucleus	2.516E-02	Cellular process	3.276E-13
Protein folding_Response to unfolded proteins	2.516E-02	Nitrogen compound metabolic process	7.355E-13
Cytoskeleton_Intermediate filaments	2.516E-02	Mitotic cell cycle	7.355E-13
Development_Blood vessel morphogenesis	3.680E-02	Regulation of cellular metabolic process	6.546E-12
Proliferation_Negative regulation of cell proliferation	3.680E-02	Cell cycle	1.088E-11

Table 6: Statistic significant GO cellular processes to MCF-7 and MDA-MB-468 treated with AMPA.

MCF-7- AMPA	
<i>GO Process</i>	<i>FDR</i>
Response to abiotic stimulus	3.701E-03
NADH regeneration	3.701E-03
Glucose catabolic process to pyruvate	3.701E-03
Canonical glycolysis	3.701E-03
Glycolytic process through glucose-6-phosphate	3.701E-03
Glycolytic process through fructose-6-phosphate	3.701E-03
Glucose catabolic process	3.701E-03
Positive regulation of release of cytochrome c from mitochondria	3.701E-03
Cellular response to hypoxia	3.701E-03
Cellular response to decreased oxygen levels	3.826E-03
MDA-MB-468- AMPA	
<i>GO Process</i>	<i>FDR</i>
Doxorubicin metabolic process	7.606E-08
Daunorubicin metabolic process	7.606E-08
Polyketide metabolic process	7.606E-08
Aminoglycoside antibiotic metabolic process	1.246E-07
Single-organism cellular process	1.859E-07
Small molecule biosynthetic process	1.859E-07
Cellular response to decreased oxygen levels	4.617E-07
Cellular response to oxygen levels	9.563E-07
Alcohol biosynthetic process	9.844E-07
Single-organism biosynthetic process	1.072E-06

Table 7: Results of enrichment analysis (GO cellular processes) after exclusion of common genes from Roundup®.

MCF-7- Roundup®		MDA-MB-468- Roundup®	
<i>GO Process</i>	<i>FDR</i>	<i>GO Process</i>	<i>FDR</i>
Cellular component organization or biogenesis	5.555E-29	Regulation of cellular metabolic process	1.415E-13
Cell cycle	5.977E-28	Tissue development	1.415E-13
Organic cyclic compound metabolic process	2.161E-26	Regulation of macromolecule metabolic process	3.462E-13
Cellular component organization	6.472E-26	Regulation of nitrogen compound metabolic process	7.725E-13
Cellular metabolic process	1.651E-25	Anatomical structure morphogenesis	7.725E-13
Nucleobase-containing compound metabolic process	4.998E-25	Regulation of metabolic process	7.725E-13
Cellular nitrogen compound metabolic process	1.727E-24	Tissue morphogenesis	1.360E-12
Nucleic acid metabolic process	1.764E-24	Regulation of primary metabolic process	2.495E-12
Cellular aromatic compound metabolic process	6.957E-24	Single-organism cellular process	2.495E-12
Heterocycle metabolic process	8.398E-24	Anatomical structure formation involved in morphogenesis	3.331E-12

ONLINE RESOURCES

Table 8: Differentially expressed genes, downregulated in two cell lines after Roundup® and AMPA treatments.

Gene Symbol	Fold-change			
	MDA- AMPA	MDA- Roundup®	MCF-7- AMPA	MCF-7- Roundup®
<i>BNIP3</i>	-3.39378	-3.19528	-2.08295	-1.94162
<i>FAM162A</i>	-1.97305	-2.36339	-2.02376	-2.48821
<i>PGK1</i>	-2.30474	-4.52354	-1.71906	-3.93362

Table 9: Notch signaling altered by AMPA and Roundup treatments in MDA-MB-468 and MCF-7.

04330-Notch signaling pathway			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	-	0	-
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	23385	NCSTN	-1.41337
<i>Roundup</i>	5664	PSEN2	1.17528
	3065	HDAC1	-1.26378
	9541	CIR1	1.73447
	1488	CTBP2	-1.31652
	3280	HES1	1.28645
	3516	RBPJ	-2.82186
	2033	EP300	-2.0143
	6868	ADAM17	-1.92828
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF-7	-	0	-
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF-7	9541	CIR1	1.98466
<i>Roundup</i>	3280	HES1	1.96858
	22938	SNW1	1.44856
	9794	MAML1	-1.43547
	196403	DTX3	1.31302
	4851	NOTCH1	1.4173
	18,561,857	DVL2,DVL3	2.70439
	28514	DLL1	1.3083

Table 10: WNT signaling altered by AMPA and Roundup treatments in MDA-MB-468 and MCF-7.

04310-Wnt signaling pathway			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	4316	MMP7	-7.78181
<i>AMPA</i>	595	CCND1	2.9637
	80319	CXXC4	-1.61665
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	55,305,533	PPP3CA,PPP3CC	-0.30658
<i>Roundup</i>	79,768,323	FZD3,FZD6	-3.95466
	23002	DAAM1	-2.11321
	79,768,323	FZD3,FZD6	-3.95466
	81839	VANGL1	-1.62484
	595	CCND1	1.87235
	4609	MYC	2.22488
	1488	CTBP2	-1.31652
	2033	EP300	-2.0143
	57680	CHD8	-1.82124
	79718	TBL1XR1	-2.03447
	1499	CTNNB1	-1.32101
	5566	PRKACA	-1.61444
	59343	SENP2	-1.5124
	80319	CXXC4	-2.36176
	4040	LRP6	-1.72543
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	-	0	-
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	4088	SMAD3	-1.5902
<i>Roundup</i>	55,305,533	PPP3CA,PPP3CC	-0.73434
	817	CAMK2D	1.89155
	23236	PLCB1	-2.42803
	18,561,857	DVL2,DVL3	2.70439
	79,768,322	FZD3,FZD4	-3.73954
	81839	VANGL1	-1.81805
	595	CCND1	-2.31627
	3725	JUN	3.03238
	4609	MYC	-1.57555

8607	RUVBL1	-1.73136
8454	CUL1	-2.33451
6477	SIAH1	1.31385
59343	SENP2	-1.33729
22943	DKK1	-2.04525
25805	BAMBI	-1.88864
27130	INVS	-1.73232

Table 11: Hedgehog signaling altered by AMPA and Roundup treatments in MDA-MB-468 and MCF-7.

04340-Hedgehog signaling pathway			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	595	CCND1	2.9637
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	5566	PRKACA	-1.61444
<i>Roundup</i>	157	GRK3	-3.26704
	408	ARRB1	-1.85475
	8405	SPOP	-1.39725
	595	CCND1	1.87235
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	-	0	-
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	8454	CUL1	-2.33451
<i>Roundup</i>	157	GRK3	-1.60021
	408	ARRB1	-4.29066
	8405	SPOP	-1.6621
	595	CCND1	-2.31627

Table 12: TGF-Beta signaling altered by AMPA and Roundup treatments in MDA-MB-468 and MCF-7.

04350-TGF-beta signaling pathway			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	-	0	-
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	4052	LTBP1	-1.97876
<i>Roundup</i>	93	ACVR2B	1.20955
	2033	EP300	-2.0143
	4609	MYC	2.22488
	7027	TFDP1	-1.80913
	5519	PPP2R1B	-2.50382
	7048	TGFBR2	-1.57831
	7046	TGFBR1	-1.69915
	657	BMPR1A	-2.27571
	653	BMP5	-3.65237
	4086	SMAD1	-1.67638
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	-	0	-
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	4052	LTBP1	-1.65399
<i>Roundup</i>	7057	THBS1	-3.83897
	8454	CUL1	-2.33451
	4088	SMAD3	-1.5902
	6667	SP1	1.34482
	4609	MYC	-1.57555
	7027	TFDP1	-3.59222
	1874	E2F4	-1.4231
	5933	RBL1	-4.344
	3398	ID2	2.2762
	90	ACVR1	1.4272
	36,243,625	INHBA,INHBB	-3.88588
	6198	RPS6KB1	-1.72698
	5518	PPP2R1A	-1.35476
	5595	MAPK3	1.22416
	7046	TGFBR1	-1.55386
	90,658	ACVR1,BMPR1B	-0.5689
	25805	BAMBI	-1.88864
	705,060,436	TGIF1,TGIF2	0.09653

Table 13: MAPK signaling altered by AMPA and Roundup treatments in MDA-MB-468 and MCF-7.

04010-MAPK signaling pathway			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	1847	DUSP5	1.66927
<i>AMPA</i>	5606	MAP2K3	1.50176
	1647	GADD45A	1.54826
	355	FAS	1.17572
	33,033,304	HSPA1A,HSPA1B	3.89323
	23,162,317	FLNA,FLNB	-3.93406
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	18,431,844,184,618,400	DUSP1,DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP8	8.63458
<i>Roundup</i>	8605	PLA2G4C	1.27595
	5970	RELA	-1.32536
	5604	MAP2K1	-1.34598
	5566	PRKACA	-1.61444
	4893	NRAS	-1.85861
	2768	GNA12	-1.91163
	2885	GRB2	-1.40373
	1956	EGFR	-1.30483
	5154	PDGFA	1.32849
	9261	MAPKAPK2	-1.26407
	1649	DDIT3	2.3392
	5603	MAPK13	-1.25662
	5608	MAP2K6	-1.9482
	5606	MAP2K3	1.45599
	1,844,184,618,471,850	DUSP2,DUSP4,DUSP5,DUSP8	7.08969
	207	AKT1	-1.27526
	9175	MAP3K13	-1.37583
	164,710,912	GADD45A,GADD45G	8.60731
	7189	TRAF6	-1.42077
	929	CD14	-1.65265
	70,467,048	TGFBR1,TGFBR2	-3.27746
	7132	TNFRSF1A	-1.33216
	6416	MAP2K4	-2.70982
	408	ARRB1	-1.85475
	2122	MECOM	1.13269
	33,033,304	HSPA1A,HSPA1B	7.45248
	55,305,533	PPP3CA,PPP3CC	-0.30658
	23,162,317	FLNA,FLNB	-3.47334
	8491	MAP4K3	-1.67587
	2353	FOS	-2.69185

	4609	MYC	2.22488
MCF7	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
<i>AMPA</i>	-	0	-
MCF7	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
<i>Roundup</i>	184,318,461,847,184	DUSP1,DUSP4,DUSP5,DUSP6, DUSP8,DUSP10,DUSP16	-0.18014
	8605	PLA2G4C	1.41421
	47,915,970	NFKB2,RELA	0.08107
	5595	MAPK3	1.22416
	8649	LAMTOR3	1.22905
	6237	RRAS	2.05348
	10125	RASGRP1	-1.86564
	6654	SOS1	-2.9132
	2768	GNA12	-1.39387
	776	CACNA1D	-1.14924
	5154	PDGFA	1.47476
	2258	FGF13	1.20082
	994	CDC25B	1.6969
	1649	DDIT3	11.22
	2005	ELK4	-2.62144
	5536	PPP5C	-1.20695
	1,846,184,718,501,120	DUSP4,DUSP5,DUSP8, DUSP10,DUSP16	-1.05683
	5494	PPM1A	1.21228
	207	AKT1	-1.45136
	9344	TAOK2	-1.46177
	1,647,461,610,912	GADD45A,GADD45B,GADD45G	7.60341
	7046	TGFBR1	-1.55386
	355	FAS	1.44028
	5058	PAK1	1.91433
	4215	MAP3K3	-1.36407
	6416	MAP2K4	-2.18441
	408	ARRB1	-4.29066
	3,303,330,433,103,310	HSPA1A,HSPA1B,HSPA6,HSPA8	5.7113
	3727	JUND	2.44368
	3725	JUN	3.03238
	55,305,533	PPP3CA,PPP3CC	-0.73434
	23162	MAPK8IP3	1.36088
	4609	MYC	-1.57555
	468	ATF4	1.33087
	2872	MKNK2	1.68252

Table 14: Jak-STAT signaling altered by AMPA and Roundup treatments in MDA-MB-468 and MCF-7.

04630-Jak-STAT signaling pathway			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	9655	SOCS5	-1.68149
<i>AMPA</i>	3,953,116,379	LEPR,IL22RA2	-1.49221
	4170	MCL1	1.54614
	595	CCND1	2.9637
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	4609	MYC	2.22488
<i>Roundup</i>	207	AKT1	-1.27526
	8503	PIK3R3	-1.39341
	2885	GRB2	-1.40373
	88,359,655	SOCS2,SOCS5	-0.73062
	2033	EP300	-2.0143
	6774	STAT3	-1.52988
	9063	PIAS2	-2.48894
	34,543,455,357,035,900	IFNAR1,IFNAR2,IL6R,IL13RA2,LEPR ,LIFR,PRLR,OSMR,IL22RA2	-9.10308
	4170	MCL1	1.9665
	5292	PIM1	2.64244
	595	CCND1	1.87235
	5781	PTPN11	-1.73574
	345,236,003,976	IFNA21,IL15,LIF	4.08332
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	-	0	-
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	4609	MYC	-1.57555
<i>Roundup</i>	207	AKT1	-1.45136
	52,958,503	PIK3R1,PIK3R3	-3.51345
	6654	SOS1	-2.9132
	122809	SOCS4	-1.77555
	345,434,593,566,357	IFNAR1,IFNGR1,IL4R,IL6R,PRLR,OSMR,IL23R	-3.51488
	5292	PIM1	2.25608
	595	CCND1	-2.31627
	1026	CDKN1A	1.54068
	2475	MTOR	-1.36336
	344,134,523,976	IFNA4,IFNA21,LIF	3.87752

Table 15: PI3K-Akt signaling altered by AMPA and Roundup treatments in MDA-MB-468 and MCF-7.

04151-PI3K-Akt signaling pathway			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	3791	KDR	-6.94965
<i>AMPA</i>	2997	GYS1	-1.44154
	595	CCND1	2.9637
	10971	YWHAQ	-1.28612
	2,847,422	ANGPT1,VEGFA	-2.89139
	2335	FN1	-3.98049
	64764	CREB3L2	1.43167
	4170	MCL1	1.54614
	5,959,134	CCND1,CCNE2	1.05963
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	57521	RPTOR	-1.21876
<i>Roundup</i>	207	AKT1	-1.27526
	5170	PDPK1	-1.25453
	19,563,791	EGFR,KDR	-11.20536
	23566	LPAR3	1.7081
	4609	MYC	2.22488
	4193	MDM2	-2.66374
	2997	GYS1	-2.18839
	595	CCND1	1.87235
	5970	RELA	-1.32536
	752,910,971	YWHAB,YWHAQ	-3.16721
	284,194,230,825,154	ANGPT1,EFNA1,HGF,PDGFA	2.85496
	2885	GRB2	-1.40373
	4893	NRAS	-1.85861
	5519	PPP2R1B	-2.50382
	5563	PRKAA2	-1.80201
	200186	CRTC2	1.58138
	8503	PIK3R3	-1.39341
	5604	MAP2K1	-1.34598
	6850	SYK	-1.26938
	59345	GNB4	-1.62336
	3,673,367,536,783,680	ITGA2,ITGA3,ITGA5,ITGAV	-4.74384
	36,883,694	ITGB1,ITGB6	-3.64339
	2335	FN1	-3.69669
	34,543,455,357,056,100	IFNAR1,IFNAR2,IL6R,PRLR,OSMR	-6.68513
	3452	IFNA21	1.20515
	672	BRCA1	-2.21952

	4170	MCL1	1.9665
	5586	PKN2	-2.10423
	6446	SGK1	-1.70915
	5,959,134	CCND1,CCNE2	-1.02277
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	-	0	-
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	6198	RPS6KB1	-1.72698
<i>Roundup</i>	57521	RPTOR	-1.35047
	2475	MTOR	-1.36336
	7248	TSC1	1.53369
	207	AKT1	-1.45136
	5170	PDPK1	-1.27301
	52,958,503	PIK3R1,PIK3R3	-3.51345
	3667	IRS1	-2.49024
	3815	KIT	1.17529
	4609	MYC	-1.57555
	2309	FOXO3	1.39091
	2997	GYS1	-2.22936
	595	CCND1	-2.31627
	92579	G6PC3	-1.49653
	5970	RELA	-1.37797
	752,910,971	YWHAB,YWHAQ	-2.9106
	1,942,225,851,547,420	EFNA1,FGF13,PDGFA,VEGFA	6.64949
	6654	SOS1	-2.9132
	117145	THEM4	-1.36324
	5518	PPP2R1A	-1.35476
	3320	HSP90AA1	-1.34752
	54541	DDIT4	1.53507
	200186	CRTC2	1.57985
	1026	CDKN1A	1.54068
	1027	CDKN1B	1.33111
	10,171,019	CDK2,CDK4	-3.52415
	5595	MAPK3	1.22416
	36,733,678	ITGA2,ITGA5	-4.638
	36,933,694	ITGB5,ITGB6	-4.01412
	705,770,597,148	THBS1,THBS3,TNXB	-1.07954
	34,543,566,357,056,100	IFNAR1,IL4R,IL6R,PRLR,OSMR	-6.10927
	34,413,452	IFNA4,IFNA21	2.4541
	672	BRCA1	-5.67086

4,681,385,958,664,760	ATF4,CREB1,CREB5,CREB3L2	-1.79553
4602	MYB	-2.98368
23678	SGK3	-1.9303
5,958,989,134	CCND1,CCNE1,CCNE2	-10.22877

Table 16: Ras signaling altered by AMPA and Roundup treatments in MDA-MB-468 and MCF-7.

04014-Ras signaling pathway			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	6464	SHC1	1.23454
<i>AMPA</i>	2,847,422	ANGPT1,VEGFA	-2.89139
	3791	KDR	-6.94965
	5336	PLCG2	2.41017
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	5604	MAP2K1	-1.34598
<i>Roundup</i>	4893	NRAS	-1.85861
	2885	GRB2	-1.40373
	207	AKT1	-1.27526
	284,194,230,825,154	ANGPT1,EFNA1,HGF,PDGFA	2.85496
	19,563,791	EGFR,KDR	-11.20536
	9846	GAB2	2.52185
	5781	PTPN11	-1.73574
	5898	RALA	1.3771
	5970	RELA	-1.32536
	8605	PLA2G4C	1.27595
	5878	RAB5C	-1.19987
	883,194,621,015,622	SYNGAP1,RASAL2,RASA4,RASA3	2.26049
	8503	PIK3R3	-1.39341
	59345	GNB4	-1.62336
	8315	BRAP	1.48726
	5566	PRKACA	-1.61444
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	-	0	-
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	5595	MAPK3	1.22416
<i>Roundup</i>	6237	RRAS	2.05348
	207	AKT1	-1.45136
	399694	SHC4	-2.16206
	1,942,225,851,547,420	EFNA1,FGF13,PDGFA,VEGFA	6.64949
	3815	KIT	1.17529
	9846	GAB2	2.01497
	7074	TIAM1	-1.53036
	58,985,899	RALA,RALB	2.787

5337	PLD1	1.73837
5970	RELA	-1.37797
8605	PLA2G4C	1.41421
2114	ETS2	1.6582
5869	RAB5B	1.44379
10125	RASGRP1	-1.86564
1,015,622,821,100,270	RASA4,RASA3,RASA4B	4.0107
52,958,503	PIK3R1,PIK3R3	-3.51345
382	ARF6	1.21823
6654	SOS1	-2.9132
805,808	CALM2,CALM3	-2.88519
5058	PAK1	1.91433
29110	TBK1	-1.80757

Table 17: Cell cycle altered by AMPA and Roundup treatments in MDA-MB-468 and MCF-7.

04110-Cell cycle			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	25847	ANAPC13	1.23834
<i>AMPA</i>	10971	YWHAQ	-1.28612
	1647	GADD45A	1.54826
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	41,724,175	MCM3,MCM6	-3.98753
<i>Roundup</i>	4175	MCM6	-1.82966
	4172	MCM3	-2.15787
	5111	PCNA	-2.59038
	752,910,971	YWHAB,YWHAQ	-3.16721
	4193	MDM2	-2.66374
	2033	EP300	-2.0143
	9700	ESPL1	-1.47626
	824,327,127	SMC1A,SMC1B	-0.59717
	6502	SKP2	-2.72852
	164,710,912	GADD45A,GADD45G	8.60731
	8317	CDC7	-1.99808
	1022	CDK7	1.41379
	9134	CCNE2	-2.89512
	595	CCND1	1.87235
	4609	MYC	2.22488
	1871	E2F3	-1.55193
	3065	HDAC1	-1.26378
	7027	TFDP1	-1.80913
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	-	0	-
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	417,141,724,173,417	MCM2,MCM3,MCM4,MCM5,MCM6,MCM7	-18.34083
<i>Roundup</i>	4998	ORC1	-1.93171
	258,475,143,364,682	ANAPC13,ANAPC5,ANAPC1	-2.45386
	8454	CUL1	-2.33451
	4176	MCM7	-2.43615
	4175	MCM6	-3.60524
	4174	MCM5	-2.39331
	4173	MCM4	-3.17951

4172	MCM3	-4.67229
4171	MCM2	-2.05433
5111	PCNA	-5.47179
752,910,971	YWHAB,YWHAQ	-2.9106
1111	CHEK1	-1.7673
1026	CDKN1A	1.54068
5591	PRKDC	-2.97235
6502	SKP2	-3.32078
9700	ESPL1	-1.73692
8243	SMC1A	-2.09591
1,647,461,610,912	GADD45A,GADD45B,GADD45G	7.60341
1027	CDKN1B	1.33111
4088	SMAD3	-1.5902
8317	CDC7	-2.55017
994	CDC25B	1.6969
8318	CDC45	-2.54137
990	CDC6	-3.23631
993	CDC25A	-2.40053
890	CCNA2	-2.16991
1022	CDK7	1.37178
1017	CDK2	-2.04264
1019	CDK4	-1.48151
8,989,134	CCNE1,CCNE2	-7.9125
595	CCND1	-2.31627
5933	RBL1	-4.344
1874	E2F4	-1.4231
4609	MYC	-1.57555
7027	TFDP1	-3.59222
18,691,871	E2F1,E2F3	-3.02979
5933	RBL1	-4.344

Table 18: Apoptosis altered by AMPA and Roundup treatments in MDA-MB-468 and MCF-7.

04210-Apoptosis			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	8795	TNFRSF10B	1.43596
<i>AMPA</i>	355	FAS	1.17572
	5366	PMAIP1	1.47177
	1647	GADD45A	1.54826
	355	FAS	1.17572
	15,151,519	CTSV,CTSO	0.72999
	3710	ITPR3	-1.16208
	7846	TUBA1A	-1.46443
	4170	MCL1	1.54614
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	9131	AIFM1	-1.407
<i>Roundup</i>	329	BIRC2	-1.98009
	5970	RELA	-1.32536
	317	APAF1	-2.47035
	823	CAPN1	-1.47334
	207	AKT1	-1.27526
	8503	PIK3R3	-1.39341
	7132	TNFRSF1A	-1.33216
	8795	TNFRSF10B	1.39465
	8743	TNFSF10	-1.58924
	4001	LMNB1	-2.59316
	142	PARP1	-2.38293
	2081	ERN1	1.64533
	164,710,912	GADD45A,GADD45G	8.60731
	2353	FOS	-2.69185
	107,515,091,514	CTSC,CTSD,CTSL	-1.22752
	1649	DDIT3	2.3392
	37,083,710	ITPR1,ITPR3	0.09737
	5170	PDPK1	-1.25453
	60	ACTB	-1.52606
	78,461,037,684,790	TUBA1A,TUBA1B,TUBA1C	-4.79514
	4170	MCL1	1.9665
	4893	NRAS	-1.85861
	5604	MAP2K1	-1.34598
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange

Table 19: Base excision repair system altered by AMPA and Roundup treatments in MDA-MB-468 and MCF-7.

03410-Base excision repair			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	-	0	-
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	27301	APEX2	-1.60136
<i>Roundup</i>	2237	FEN1	-1.94905
	142	PARP1	-2.38293
	3146	HMGB1	-2.06694
	5111	PCNA	-2.59038
	2237	FEN1	-1.94905
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	-	0	-
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	27301	APEX2	-1.46954
<i>Roundup</i>	2237	FEN1	-2.62275
	142	PARP1	-2.17357
	3980	LIG3	1.43578
	54,265,427	POLE,POLE2	-4.96738
	10714	POLD3	-2.95037
	7374	UNG	-2.50307
	3146	HMGB1	-2.79473
	5111	PCNA	-5.47179
	27343	POLL	1.39738
	4968	OGG1	-1.27013
	8930	MBD4	-1.65589
	55247	NEIL3	-1.88933

Table 20: Nucleotide excision repair system altered by AMPA and Roundup treatments in MDA-MB-468 and MCF-7.

03420-Nucleotide excision repair			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	-	0	-
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	2967	GTF2H3	-1.87898
<i>Roundup</i>	1022	CDK7	1.41379
	8451	CUL4A	-1.36692
	5111	PCNA	-2.59038
	6117	RPA1	-1.86887
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	-	0	-
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	2967	GTF2H3	-1.95178
<i>Roundup</i>	728340	GTF2H2C	-2.01246
	5,982,598,359,845,980	RFC2,RFC3,RFC4,RFC5	-8.15281
	5111	PCNA	-5.47179
	54,265,427	POLE,POLE2	-4.96738
	2073	ERCC5	1.40596
	10714	POLD3	-2.95037
	6118	RPA2	-1.3303
	8451	CUL4A	-1.34642
	1161	ERCC8	-1.90062
	1022	CDK7	1.37178

Table 21: Mismatch repair system altered by AMPA and Roundup treatments in MDA-MB-468 and MCF-7.

03430-Mismatch repair			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	-	0	0
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MDA-MB-468	5111	PCNA	-2.59038
<i>Roundup</i>	6117	RPA1	-1.86887
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	-	0	-
<i>AMPA</i>			
	kegg.names	all.mapped.symb	FoldChange
MCF7	4436	MSH2	-2.35992
<i>Roundup</i>	27030	MLH3	-1.63873
	5111	PCNA	-5.47179
	10714	POLD3	-2.95037
	6118	RPA2	-1.3303
	9156	EXO1	-4.00237
	5,982,598,359,845,980	RFC2,RFC3,RFC4,RFC5	-8.15281

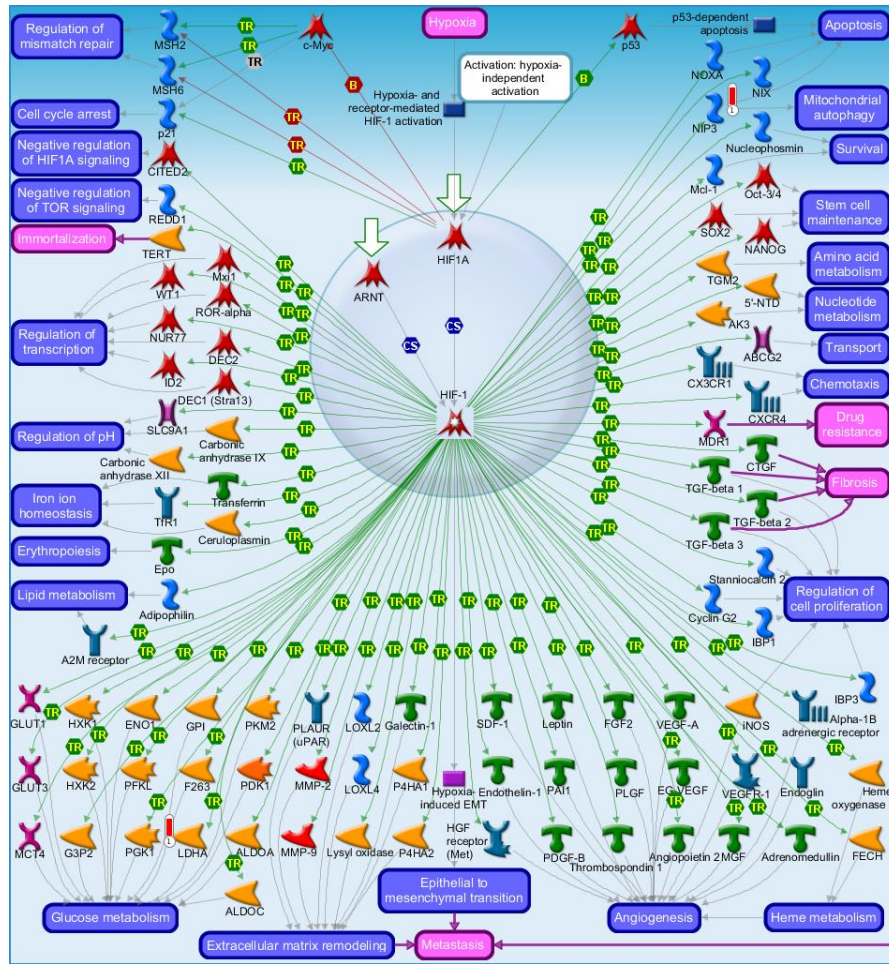


Fig 1 Transcription- HIF 1 targets pathways from common genes expressed in both cell lines and treatments

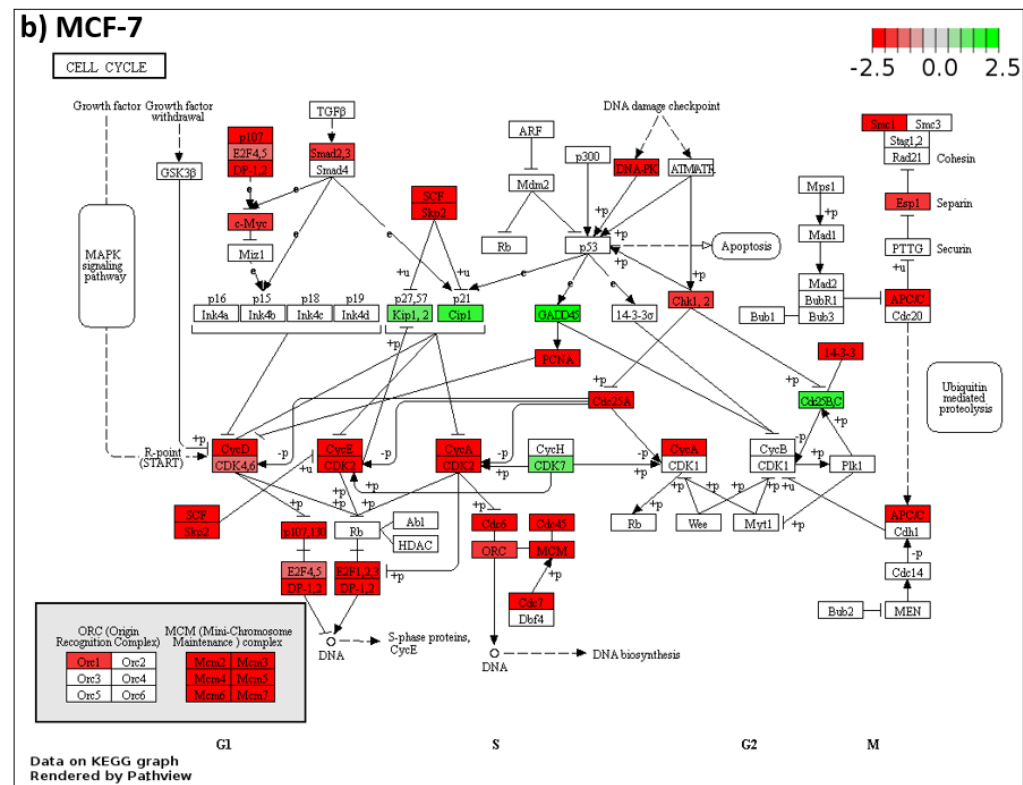
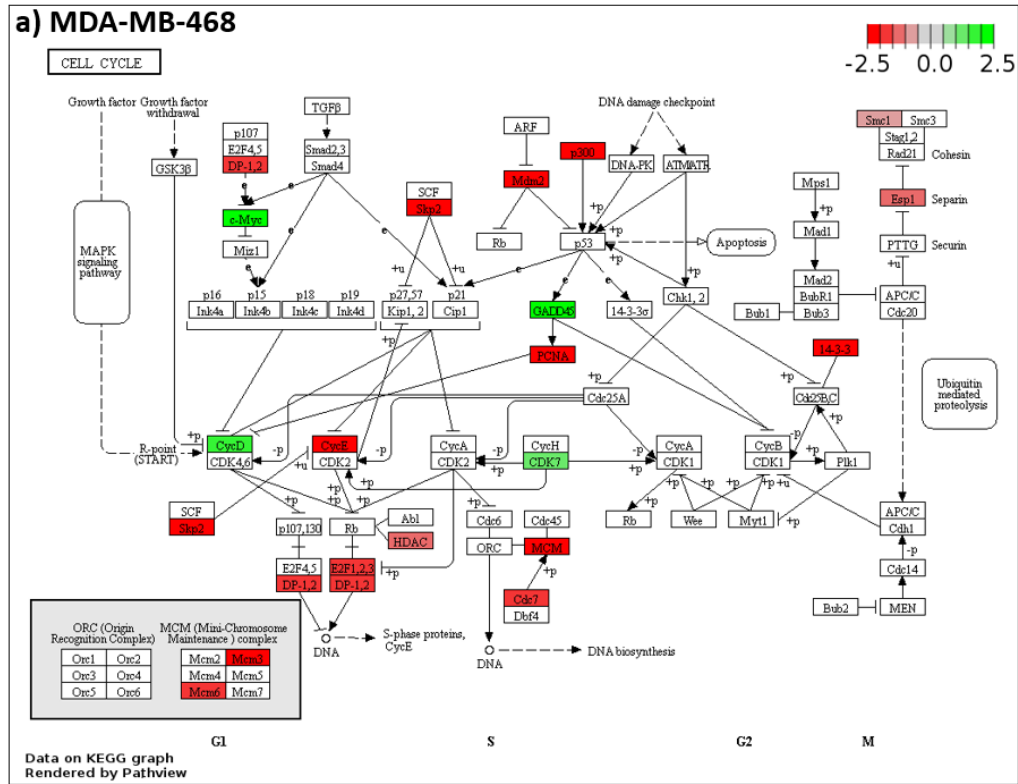


Fig. 2 Gene expression alterations in the cell cycle pathway on MDA-MB-468 (ER-) (a) and MCF-7 (ER+) (b) cell lines, after treatment with Roundup®

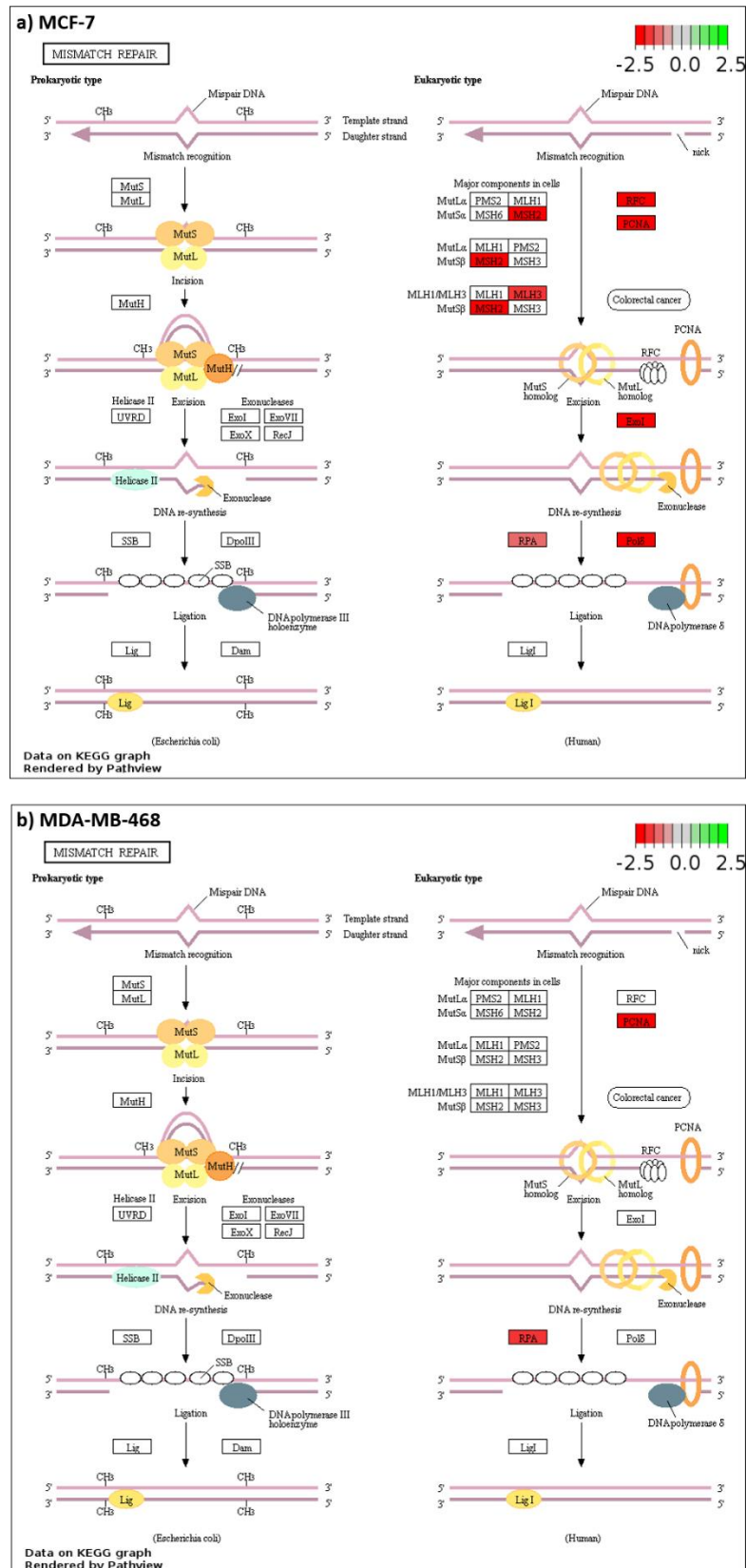


Fig. 3 Mismatch repair altered by Roundup treatment in a) MCF-7 and b) MDA-MB-468.

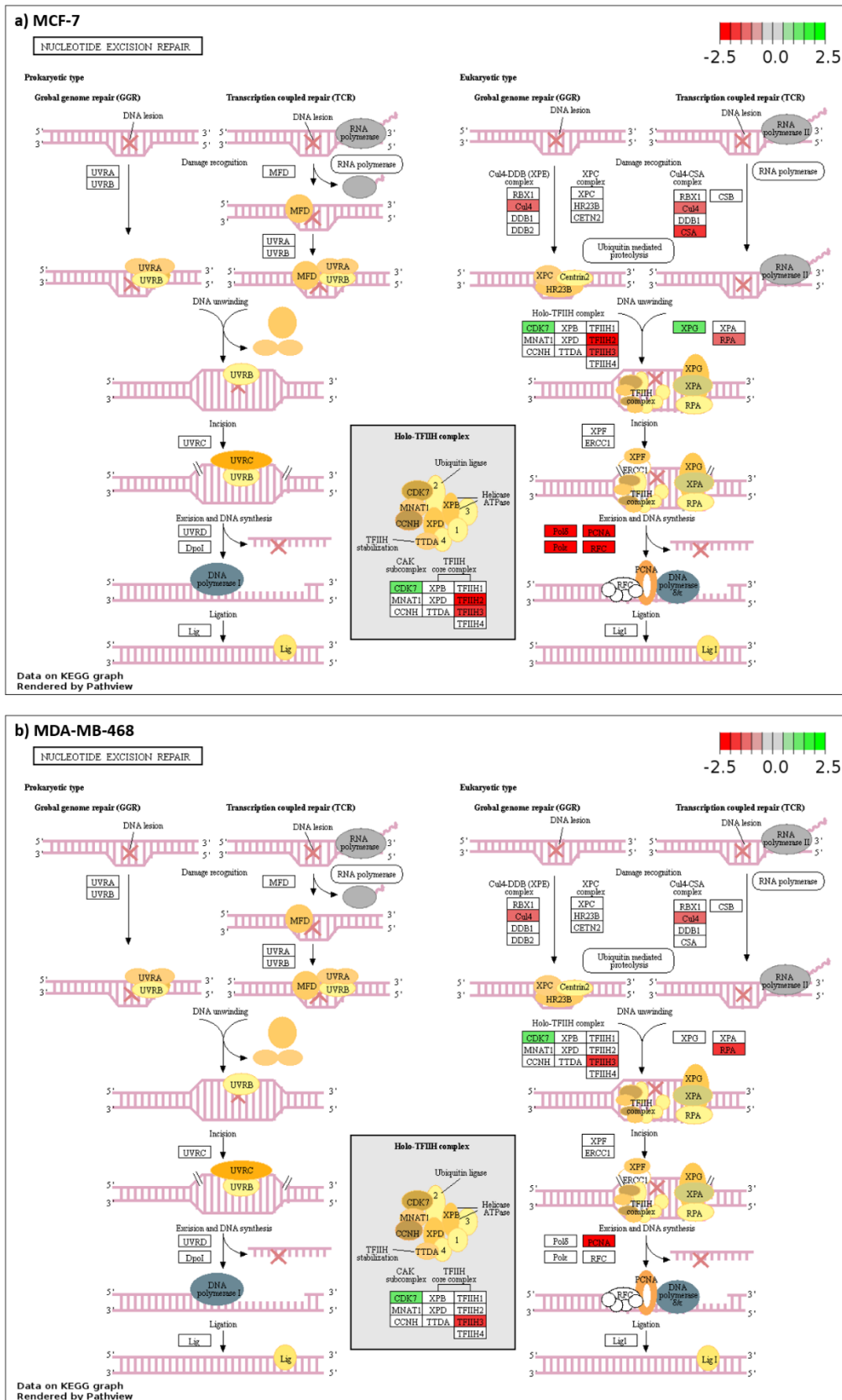


Fig. 4 Nucleotide excision repair altered by Roundup treatment in a) MCF-7 and b) MDA-MB-468.

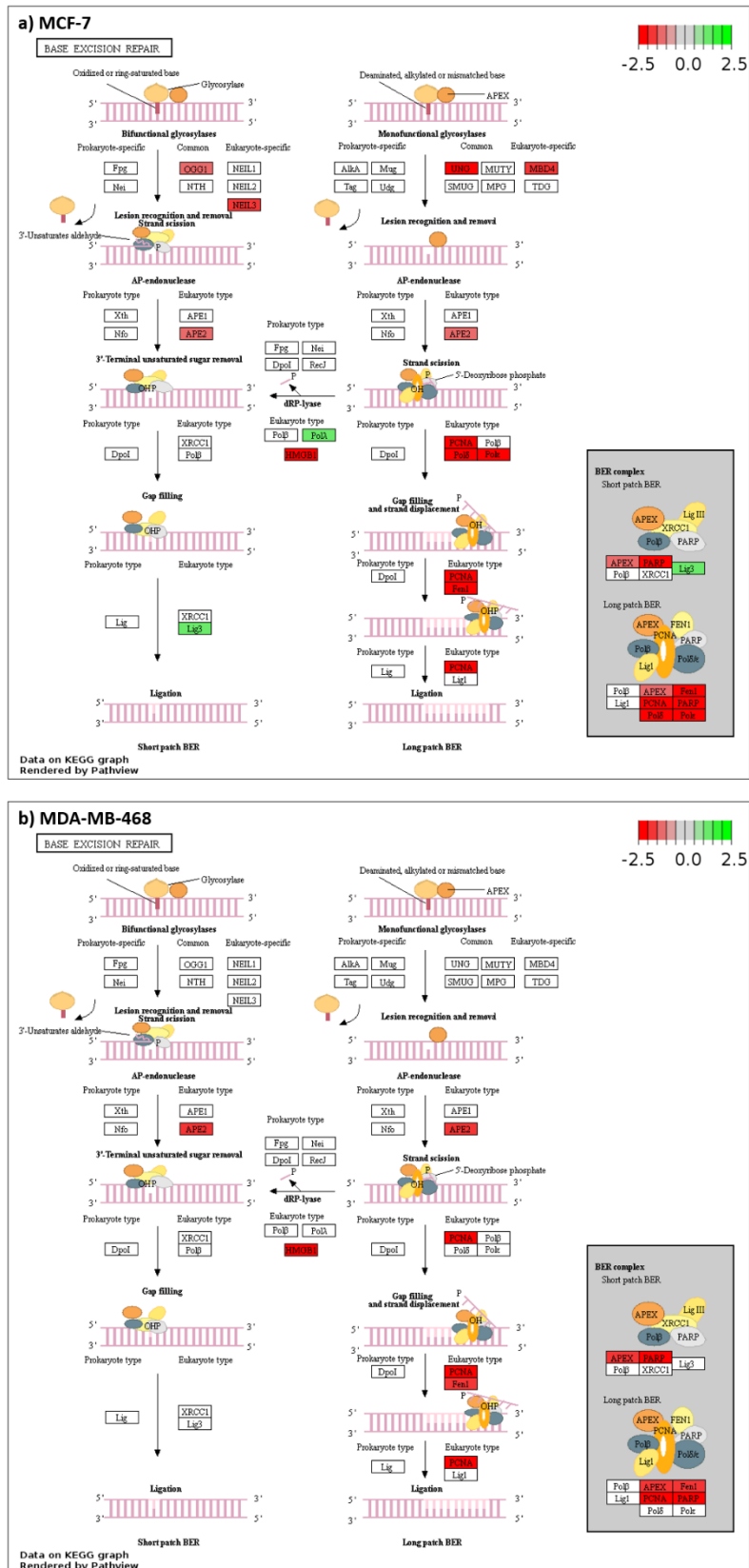


Fig. 5 Base excision repair altered by Roundup treatment in a) MCF-7 and b) MDA

5. CONCLUSÃO

5.1 Densidade mamária e câncer de mama

Discute-se há anos que a alta DM é um dos principais fatores de risco para o CM, mas os mecanismos moleculares até hoje, não estão muito claros. Este fato pode se dar devido à complexidade da relação entre os fatores de risco e da forma como atuam em conjunto na carcinogênese mamária.

Com o estudo epidemiológico feito a partir de mamografias de mais de 11 mil mulheres foi possível demonstrar as associações entre DM e idade, menopausa, número de filhos e IMC, assim como a influência conjunta destes fatores de risco no desenvolvimento de lesões mamárias tanto benignas como malignas.

5.2 Efeito do Roundup® e AMPA em linhagens celulares de câncer de mama

Apesar da ampla literatura sobre o uso de herbicidas e seu possível efeito carcinogênico, tal relação ainda continua controversa.

No CM, bem como em outros tecidos em que a regulação é baseada no funcionamento hormonal, há ainda mais discussão, visto que o glifosato é conhecido como um potente desregulador endócrino.

Este estudo buscou demonstrar o efeito do Roundup®, bem como de seu metabólito, o AMPA nas alterações de funcionamento celular, com estudos de proliferação e expressão gênica. Foram observadas diversas alterações, sendo as mais significantes aquelas advindas do tratamento com Roundup®. Tal composto alterou tanto os processos de ciclo celular como os de reparo de DNA, hipóxia e ainda em vias de metabolismo celular.

Apesar das pesquisas estarem mais voltadas ao efeito do glifosato em linhagens RE+, este estudo demonstrou que tanto o Roundup® como o AMPA têm efeito também sobre a linhagem RE-. Este dado mostra que o papel citotóxico do Roundup® não está apenas relacionado ao fato de ser um potente desregulador endócrino e que as alterações moleculares aqui encontradas, de forma dose-dependente, podem levar a alterações na proliferação celular e na expressão gênica de linhagens de CM independentemente do padrão de expressão do RE.

6. REFERÊNCIAS

ABDOLELL, M. et al. Utility of relative and absolute measures of mammographic density vs clinical risk factors in evaluating breast cancer risk at time of screening mammography. **Br J Radiol**, v. 89, n. 1059, p. 1-6, 2016.

ACS- American Cancer Society. **American Cancer Society Guidelines for the Early Detection of Cancer**, 2017a. Disponível em : < <https://www.cancer.org/healthy/find-cancer-early/cancer-screening-guidelines/american-cancer-society-guidelines-for-the-early-detection-of-cancer.html>>. Acesso em: 01 out. 2017.

_____. **Cancer Facts & Figures 2017**, 2017b. Disponível em: < <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2017.html>>. Acesso em: 03 out. 2017.

NEW HEALTH ADVISOR. **Invasive ductal carcinoma**. 2017. Disponível em: <<http://www.newhealthadvisor.com/Invasive-Ductal-Carcinoma.html>>. Acesso em: 01 out. 2017.

AESROY, R.; CLYNE, C. D.; CHAND, A. L. Insights into Orphan Nuclear Receptors as Prognostic Markers and Novel Therapeutic Targets for Breast Cancer. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 6, p. 115, 2015.

ALAVANJA, M. C. et al. Use of agricultural pesticides and prostate cancer risk in the Agricultural Health Study cohort. **Am J Epidemiol**, v. 157, n. 9, p. 800-14, 2003.

ALAVANJA, M. C. et al. The Agricultural Health Study. **Environ Health Perspect**, v. 104, n. 4, p. 362-9, 1996.

ALBERT, M. et al. The relationship of breast density in mammography and magnetic resonance imaging in high-risk women and women with breast cancer. **Clin Imaging**, v. 39, n. 6, p. 987-92, 2015.

AMADOU, A. et al. Serum 25-Hydroxyvitamin D3 and Mammography Density among Mexican Women. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0161686, 2016.

ANDERSON, D. D.; STOVER, P. J. SHMT1 and SHMT2 are functionally redundant in nuclear de novo thymidylate biosynthesis. **PLoS One**, v. 4, n. 6, p. e5839, 2009.

ANDERSON, W. F. et al. How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more? **J Natl Cancer Inst**, v. 106, n. 8, 2014.

ANDREOTTI, G. et al. Agricultural pesticide use and pancreatic cancer risk in the Agricultural Health Study Cohort. **Int J Cancer**, v. 124, n. 10, p. 2495-500, 2009.

ATKINSON, C. et al. **Glyphosate: 104 week dietary carcinogenicity study in mice**. Inveresk Research International, Tranent, EH33 2NE, Scotland. IRI Project No. 438618. April 7, 1993. MRID 49631702. Estudo não publicado.

ATKINSON, C.; STRUTT, A.; HENDERSON, W. **104-Week Chronic Feeding/Oncogenicity study in rats with 52-week interim kill.**, . MRID No. 49631701 1993. Estudo não publicado.

AXLUND, S. D. et al. Progesterone-inducible cytokeratin 5-positive cells in luminal breast cancer exhibit progenitor properties. **Horm Cancer**, v. 4, n. 1, p. 36-49, 2013.

BAE, S. Y. et al. Poor prognosis of single hormone receptor- positive breast cancer: similar outcome as triple-negative breast cancer. **BMC Cancer**, v. 15, p. 138, 2015.

BAI, S. H.; OGBOURNE, S. M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 23, n. 19, p. 18988-9001, 2016.

BALUZ, K.; DO CARMO, M., G.T; ROSAS, G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 4, p. 597-607, 2002.

BANE, A. Ductal carcinoma in situ: what the pathologist needs to know and why. **Int J Breast Cancer**, v. 2013, p. 914053, 2013.

BANSAL, G. J.; SANTOSH, D.; DAVIES, E. L. Selective magnetic resonance imaging (MRI) in invasive lobular breast cancer based on mammographic

density: does it lead to an appropriate change in surgical treatment? **Br J Radiol**, v. 89, n. 1060, p. 20150679, 2016.

BENACHOUR, N. et al. Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 53, n. 1, p. 126-33, 2007.

BERTHEAU, P. et al. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. **Breast**, v. 22 Suppl 2, p. S27-9, 2013.

BERTOZZI, N. et al. Tissue expansion for breast reconstruction: Methods and techniques. **Ann Med Surg (Lond)**, v. 21, p. 34-44, 2017.

BOYD, N. F. et al. Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. **N Engl J Med**, v. 356, n. 3, p. 227-36, 2007.

BOYD, N. F. et al. Mammographic breast density as an intermediate phenotype for breast cancer. **Lancet Oncol**, v. 6, n. 10, p. 798-808, 2005.

BOZORGI, A.; KHAZAEI, M.; KHAZAEI, M. R. New Findings on Breast Cancer Stem Cells: A Review. **J Breast Cancer**, v. 18, n. 4, p. 303-12, 2015.

BRAMMER. Glyphosate Acid: **Two Year Dietary Toxicity and Oncogenicity Study in Wistar Rats**. Central Toxicology Laboratory, Alderley Park Macclesfield, Cheshire, UK: Syngenta. MRID 49704601. 2001. Estudo não publicado.

BURNETT, P.; BORDERS, J.; KUSH, J. **Report to Monsanto Company: Two Year Chronic Oral Toxicity Study with CP- 76100 in Albino Rats: IBT No. 8560-08924**. 1979. Estudo não publicado.

BUSANA, M. C. et al. Impact of type of full-field digital image on mammographic density assessment and breast cancer risk estimation: a case-control study. **Breast Cancer Res**, v. 18, n. 1, p. 96, 2016.

BUYUKPINARBASILI, N. et al. p53 expression and relationship with MDM2 amplification in breast carcinomas. **Ann Diagn Pathol**, v. 21, p. 29-34, 2016.

CAGLAYAN, E. K. et al. Factors Associated with Mammographic Density in Postmenopausal Women. **J Menopausal Med**, v. 21, n. 2, p. 82-8, 2015.

CANTOR, K. P. et al. Pesticides and other agricultural risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men in Iowa and Minnesota. **Cancer Res**, v. 52, n. 9, p. 2447-55, 1992.

CAVALIERI, E. et al. Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations. **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 27, p. 75-93, 2000.

CHAUFAN, G.; COALOVA, I.; RIOS DE MOLINA MDEL, C. Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient. **Int J Toxicol**, v. 33, n. 1, p. 29-38, 2014.

CIRQUEIRA, M. B. et al. Subtipos moleculares do câncer de mama. **Feminina**, v. 39, n. 10, p. 5, 2011.

CIRUELOS GIL, E. M. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer. **Cancer Treat Rev**, v. 40, n. 7, p. 862-71, 2014.

COLE, K.; TABERNERO, M.; ANDERSON, K. S. Biologic characteristics of premalignant breast disease. **Cancer Biomark**, v. 9, n. 1-6, p. 177-92, 2010.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST, C. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. **Lancet Oncol**, v. 13, n. 11, p. 1141-51, 2012.

CURWIN, B. D. et al. Urinary pesticide concentrations among children, mothers and fathers living in farm and non-farm households in Iowa. **Ann Occup Hyg**, v. 51, n. 1, p. 53-65, 2007.

CUZICK, J. et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: extended long-term follow-up of the IBIS-I breast cancer prevention trial. **Lancet Oncol**, v. 16, n. 1, p. 67-75, 2015.

DAI, X. et al. Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes. **J Cancer**, v. 7, n. 10, p. 1281-94, 2016.

DARUICH, J.; ZIRULNIK, F.; GIMENEZ, M. S. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. **Environ Res**, v. 85, n. 3, p. 226-31, 2001.

DE AVILA, R. I. et al. In vitro assessment of skin sensitization, photosensitization and phototoxicity potential of commercial glyphosate-containing formulations. **Toxicol In Vitro**, 2017.

DE MARCHI, T. et al. Endocrine therapy resistance in estrogen receptor (ER)-positive breast cancer. **Drug Discov Today**, v. 21, n. 7, p. 1181-8, 2016.

DE ROOS, A. J. et al. Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the Agricultural Health Study. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 1, p. 49-54, 2005.

DE ROOS, A. J. et al. Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. **Occup Environ Med**, v. 60, n. 9, p. E11, 2003.

DEMAYO, F. J. et al. Mechanisms of action of estrogen and progesterone. **Ann N Y Acad Sci**, v. 955, p. 48-59; discussion 86-8, 396-406, 2002.

DENNIS, L. K. et al. Pesticide use and cutaneous melanoma in pesticide applicators in the agricultural health study. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 6, p. 812-7, 2010.

DESANTIS, C. E. et al. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. **CA Cancer J Clin**, 2017.

DUKE, S. O. et al. Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosate-resistant crops. **J Agric Food Chem**, v. 60, n. 42, p. 10375-97, 2012.

ENEMOTO, K. HR-001: 24-Month Oral Chronic Toxicity and Oncogenicity Study in Rats. Vol. 1. The Institute of Environmental Toxicology, Kodaira-shi, Tokyo, Japan, Arysta Life Sciences, Study No.: IET 94-0150. MRID 50017104, 50017105, 5001703. 1997. Estudo não publicado.

ENGEL, L. S. et al. Pesticide use and breast cancer risk among farmers' wives in the agricultural health study. **Am J Epidemiol**, v. 161, n. 2, p. 121-35, 2005.

EPA- Environmental Protection Agency. **Glyphosate Issue Paper: Evaluation of carcinogenic potential**: 227 p. 2016.

ERIKSSON, M. et al. Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis. **Int J Cancer**, v. 123, n. 7, p. 1657-63, 2008.

FJELDHEIM, F. N. et al. Polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene (ESR1), daily cycling estrogen and mammographic density phenotypes. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 776, 2016.

FRIESS, J. et al. Fingolimod alters the transcriptome profile of circulating CD4+ cells in multiple sclerosis. **Sci Rep**, v. 7, p. 42087, 2017.

GALEA, M. Benign breast disorders. **Surgery (Oxford)**, v. 34, n. 1, p. 19-24, 2016.

GASNIER, C. et al. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, n. 3, p. 184-91, 2009.

GEORGE, J.; SHUKLA, Y. Emptying of Intracellular Calcium Pool and Oxidative Stress Imbalance Are Associated with the Glyphosate-Induced Proliferation in Human Skin Keratinocytes HaCaT Cells. **ISRN Dermatol**, v. 2013, 2013.

GOEN, T. et al. Efficiency control of dietary pesticide intake reduction by human biomonitoring. **Int J Hyg Environ Health**, v. 220, n. 2 Pt A, p. 254-260, 2017.

GOMES, M. P. et al. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. **J Exp Bot**, v. 65, n. 17, p. 4691-703, 2014.

GOSS, P. E. et al. Extending Aromatase-Inhibitor Adjuvant Therapy to 10 Years. **N Engl J Med**, v. 375, n. 3, p. 209-19, 2016.

GYORFFY, B. et al. Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future. **Breast Cancer Res**, v. 17, p. 11, 2015.

HADI, N. I.; JAMAL, Q. "OMIC" tumor markers for breast cancer: A review. **Pak J Med Sci**, v. 31, n. 5, p. 1256-62, 2015.

HAN, H. et al. Target-site EPSPS Pro-106 mutations: sufficient to endow glyphosate resistance in polyploid *Echinochloa colona*? **Pest Manag Sci**, v. 72, n. 2, p. 264-71, 2016.

HAN, J. et al. Determination of glyphosate and its metabolite in emergency room in Korea. **Forensic Sci Int**, v. 265, p. 41-6, 2016.

HARTMAN, T. J. et al. Dietary Energy Density and Postmenopausal Breast Cancer Incidence in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort. **J Nutr**, v. 146, n. 10, p. 2045-2050, 2016.

HASSAN, H. E. et al. Regulation of gene expression in brain tissues of rats repeatedly treated by the highly abused opioid agonist, oxycodone: microarray profiling and gene mapping analysis. **Drug Metab Dispos**, v. 38, n. 1, p. 157-67, 2010.

HELDRING, N. et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. **Physiol Rev**, v. 87, n. 3, p. 905-31, 2007.

HICKEY, T. E. et al. Minireview: The androgen receptor in breast tissues: growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene? **Mol Endocrinol**, v. 26, n. 8, p. 1252-67, 2012.

HOKANSON, R. et al. Alteration of estrogen-regulated gene expression in human cells induced by the agricultural and horticultural herbicide glyphosate. **Hum Exp Toxicol**, v. 26, n. 9, p. 747-52, 2007.

IARC. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**: International Agency for Research on Cancer. 112: 464 p. 2017.

IBAMA. **Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos - Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil. Boletins 2009 - 2014**, Brasília, 2016. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorio-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>>. Acesso em: 04 out. 2017.

INCA, Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA: 122 p. 2015.

INOUE, K.; FRY, E. A. Novel Molecular Markers for Breast Cancer. **Biomark Cancer**, v. 8, p. 25-42, 2016.

INWALD, E. C. et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. **Breast Cancer Res Treat**, v. 139, n. 2, p. 539-52, 2013.

JAIN, M. et al. Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. **Science**, v. 336, n. 6084, p. 1040-4, 2012.

JOHN, F. **N-phosphonomethyl-glycine phytotoxicant compositions, 1974. Disponível em:** < <https://www.google.com/patents/US3799758>:. Acesso em: 03 set. 2017.

KACHURI, L. et al. Multiple pesticide exposures and the risk of multiple myeloma in Canadian men. **Int J Cancer**, v. 133, n. 8, p. 1846-58, 2013.

KNEZEVICH, A. L.; HOGAN, G. K. **A chronic feeding study of glyphosate in mice.** Report No. 77-2011. 1983. Estudo não publicado.

KOMIVES, T.; SCHRÖDER, P. On glyphosate. **Ecocycles**, v. 2, n. 2, p. 1-8, 2016.

KOS, Z.; DABBS, D. J. Biomarker assessment and molecular testing for prognostication in breast cancer. **Histopathology**, v. 68, n. 1, p. 70-85, 2016.

KWIATKOWSKA, M. et al. The Impact of Glyphosate, Its Metabolites and Impurities on Viability, ATP Level and Morphological changes in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0156946, 2016.

LANKAS, G., P. A Lifetime Study of Glyphosate in Rats. Report No. 77-2062 prepared by Bio Dynamics, Inc. EPA Accession. No. 247617 – 247621. MRID 00093879. 1981. Estudo não publicado.

LANNIN, D. R.; WANG, S. Are Small Breast Cancers Good because They Are Small or Small because They Are Good? **N Engl J Med**, v. 376, n. 23, p. 2286-91, 2017.

LAUBY-SECRETAN, B.; LOOMIS, D.; STRAIF, K. Breast-Cancer Screening--Viewpoint of the IARC Working Group. **N Engl J Med**, v. 373, n. 15, p. 1479, 2015.

LEE, W. J. et al. Agricultural pesticide use and adenocarcinomas of the stomach and oesophagus. **Occup Environ Med**, v. 61, n. 9, p. 743-9, 2004.

LEE, W. J. et al. Pesticide use and colorectal cancer risk in the Agricultural Health Study. **Int J Cancer**, v. 121, n. 2, p. 339-46, 2007.

LI, Q. et al. Glyphosate and AMPA inhibit cancer cell growth through inhibiting intracellular glycine synthesis. **Drug Des Devel Ther**, v. 7, p. 635-43, 2013.

LIANG, J.; SHANG, Y. Estrogen and cancer. **Annu Rev Physiol**, v. 75, p. 225-40, 2013.

LIU, J.; ZHANG, C.; FENG, Z. Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, v. 46, n. 3, p. 170-9, 2014.

MAKKI, J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. **Clin Med Insights Pathol**, v. 8, p. 23-31, 2015.

MALHOTRA, G. K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biol Ther**, v. 10, n. 10, p. 955-60, 2010.

MANSANO-SCHLOSSER, T. C.; CEOLIM, M. F.; VALERIO, T. D. Poor sleep quality, depression and hope before breast cancer surgery. **Appl Nurs Res**, v. 34, p. 7-11, 2017.

MARC, J. et al. Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. **Toxicol Sci**, v. 82, n. 2, p. 436-42, 2004.

MARC, J. et al. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. **Chem Res Toxicol**, v. 15, n. 3, p. 326-31, 2002.

MARTINI, C. N.; GABRIELLI, M.; VILA MDEL, C. A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. **Toxicol In Vitro**, v. 26, n. 6, p. 1007-13, 2012.

MASCIADRI, N.; FERRANTI, C. Benign breast lesions: Ultrasound. **J Ultrasound**, v. 14, n. 2, p. 55-65, 2011.

MC CORMACK, O. et al. Role of the progesterone receptor (PR) and the PR isoforms in breast cancer. **Crit Rev Oncog**, v. 13, n. 4, p. 283-301, 2007.

MCCART REED, A. E. et al. Invasive lobular carcinoma of the breast: morphology, biomarkers and 'omics. **Breast Cancer Res**, v. 17, p. 12, 2015.

MCDUFFIE, H. H. et al. Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 10, n. 11, p. 1155-63, 2001.

MCQUEEN, H.; CALLAN, A. C.; HINWOOD, A. L. Estimating maternal and prenatal exposure to glyphosate in the community setting. **Int J Hyg Environ Health**, v. 215, n. 6, p. 570-6, 2012.

MESNAGE, R. et al. Evaluation of estrogen receptor alpha activation by glyphosate-based herbicide constituents. **Food Chem Toxicol**, v. 108, n. Pt A, p. 30-42, 2017.

MILLER, A. et al. **Glyphosate Technical Fact Sheet**. National Pesticide. Oregon, Information Center, Oregon State University Extension Services. 2010. Disponível em: < <http://npic.orst.edu/factsheets/glyphotech.pdf>. >. Acesso em: 05 out. 2017.

MINK, P. J. et al. Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: a review. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 63, n. 3, p. 440-52, 2012.

MITRI, Z.; CONSTANTINE, T.; O'REGAN, R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. **Chemother Res Pract**, v. 2012, p. 743193, 2012.

MONSANTO. **Roundup**. 2017. Disponível em: < http://www.roundup.com.br/quem_somos.php >. Acesso em: 10 out 2017.

MYERS, J. P. et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. **Environ Health**, v. 15, p. 19, 2016.

NCBI. **ATM ATM serine/threonine kinase [Homo sapiens (human)]**. 2017a. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/472> >. Acesso em: 03 out 2017.

_____. **BRCA1 BRCA1, DNA repair associated [Homo sapiens (human)]**. 2017b. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672> >. Acesso em: 03 out 2017.

_____. **BRIP1 BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1 [Homo sapiens (human)]**. 2017c. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/83990> > Acesso em: 03 out 2017.

_____. **CDH1 cadherin 1 [Homo sapiens (human)]**. 2017d. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/999> >. Acesso em: 03 out 2017.

_____. **PALB2 partner and localizer of BRCA2 [Homo sapiens (human)]**. 2017e. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79728> >. Acesso em: 03 out 2017.

_____. **PTEN phosphatase and tensin homolog [Homo sapiens (human)]**. 2017f. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5728>>. Acesso em: 03 out 2017.

_____. **RAD51 RAD51 recombinase [Homo sapiens (human)]**. 2017g. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5888> >. Acesso em: 03 out 2017.

_____. **TP53 tumor protein p53 [Homo sapiens (human)]**. 2017h. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157>>. Acesso em: 03 out 2017.

NELSON, L. R.; BULUN, S. E. Estrogen production and action. **J Am Acad Dermatol**, v. 45, n. 3 Suppl, p. S116-24, 2001.

NIC. Genetics of Breast and Gynecologic Cancers (PDQ(R)): Health Professional Version. In: (Ed.). **PDQ Cancer Information Summaries**. Bethesda (MD), 2002.

NIELSEN, J. B.; NIELSEN, F.; SORENSEN, J. A. Defense against dermal exposures is only skin deep: significantly increased penetration through slightly damaged skin. **Arch Dermatol Res**, v. 299, n. 9, p. 423-31, 2007.

NORDSTROM, M. et al. Occupational exposures, animal exposure and smoking as risk factors for hairy cell leukaemia evaluated in a case-control study. **Br J Cancer**, v. 77, n. 11, p. 2048-52, 1998.

NUNEZ-ENRIQUEZ, J. C. et al. Gene Expression Profiling of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children with Very Early Relapse. **Arch Med Res**, v. 47, n. 8, p. 644-655, 2016.

OKUMURA, T. et al. Proteasome 26S subunit PSMD1 regulates breast cancer cell growth through p53 protein degradation. **J Biochem**, 2017.

OLDENBURG, R. A. et al. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 63, n. 2, p. 125-49, 2007.

ONSTAD, M.; STUCKEY, A. Benign breast disorders. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v. 40, n. 3, p. 459-73, 2013.

ORSI, L. et al. Occupational exposure to pesticides and lymphoid neoplasms among men: results of a French case-control study. **Occup Environ Med**, v. 66, n. 5, p. 291-8, 2009.

PATHOLOGY OUTLINES. WHO classification of breast tumors. 2016.

Disponível em:

<<http://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmalignantwhoclassification.html>

>. Acesso em: 05 out. 2017.

PALMER, J. R. et al. Parity, lactation, and breast cancer subtypes in African American women: results from the AMBER Consortium. **J Natl Cancer Inst**, v. 106, n. 10, 2014.

PINK, J. J. et al. An estrogen-independent MCF-7 breast cancer cell line which contains a novel 80-kilodalton estrogen receptor-related protein. **Cancer Res**, v. 55, n. 12, p. 2583-90, 1995.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **J Clin Invest**, v. 117, n. 11, p. 3155-63, 2007.

RAKHA, E. A.; GREEN, A. R. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. **Pathology**, v. 49, n. 2, p. 111-119, 2017.

RAUSCH, L. K. et al. The Linkage between Breast Cancer, Hypoxia, and Adipose Tissue. **Front Oncol**, v. 7, p. 211, 2017.

REDDY, K. N.; NANDULA, V. K. Herbicide resistant crops: History, development and current technologies. **Indian Journal of Agronomy**, v. 57, n. 1, p. 7, 2012.

REDDY, K. N.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 16, p. 5139-43, 2004.

REYNA, M. S.; GORDON, D. E. **18-Month Carcinogenic Study with CP67573 in Swiss White Mice: IBT No. B569**. (Unpublished study, including sponsor's validation report dated Feb 1, 1978, received Jun 21, 1978 under 524-308; prepared by Industrial Bio-Test Laboratories, Inc., submitted by Monsanto Co., Washington, D.C.; CDL:234136-G). MRID 00061113. 1978. Estudo não publicado.

RICE, M. S. et al. Mammographic density and breast cancer risk: a mediation analysis. **Breast Cancer Res**, v. 18, n. 1, p. 94, 2016.

RICHARD, S. et al. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 6, p. 716-20, 2005.

RUDER, A. M. et al. Gliomas and farm pesticide exposure in men: the upper midwest health study. **Arch Environ Health**, v. 59, n. 12, p. 650-7, 2004.

RYERSON, A. B.; MASSETTI, G. M. CDC's Public Health Surveillance of Cancer. **Prev Chronic Dis**, v. 14, p. E39, 2017.

SAMAVAT, H.; KURZER, M. S. Estrogen metabolism and breast cancer. **Cancer Lett**, v. 356, n. 2 Pt A, p. 231-43, 2015.

SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate, pathways to modern diseases III: Manganese, neurological diseases, and associated pathologies. **Surg Neurol Int**, v. 6, p. 45, 2015.

SCHON, K.; TISCHKOWITZ, M. Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53. **Breast Cancer Res Treat**, 2017.

SIBBERING, M.; COURTNEY, C. A. Management of breast cancer: basic principles. **Surgery (Oxford)**, v. 34, n. 1, p. 25-31, 2016.

SONG, F. et al. ER-positive breast cancer patients with more than three positive nodes or grade 3 tumors are at high risk of late recurrence after 5-year adjuvant endocrine therapy. **Onco Targets Ther**, v. 10, p. 4859-4867, 2017.

SORAHAN, T. Multiple myeloma and glyphosate use: a re-analysis of US Agricultural Health Study (AHS) data. **Int J Environ Res Public Health**, v. 12, n. 2, p. 1548-59, 2015.

SPRAGUE, B. L. et al. Circulating sex hormones and mammographic breast density among postmenopausal women. **Horm Cancer**, v. 2, n. 1, p. 62-72, 2011.

STEINRUCKEN, H. C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 94, n. 4, p. 1207-12, 1980.

STOUT, L. D.; RUECKER, P. A. **Chronic Study of Glyphosate Administered in Feed to Albino Rats**. MRID No. 41643801; Historical Controls. MRID 41728700.1990. Estudo não publicado.

SUGIMOTO, K. **HR-001: 18-Month Oral Oncogenicity Study in Mice**. Vol. 1 and 2. The Institute of Environmental Toxicology, 2-772, Suzuki-cho, Kodaira-shi, Tokyo, 187, Japan, Study No.: IET 94-0151. MRID 50017108, 50017109. 1997. Estudo não publicado.

SURESH, T. P. Mutagenicity-Micronucleus Test In Swiss Albino Mice. Rallis India Limited. Study No: TOXI: 889-MUT.MN. May 6, 1993. MRID 49987407. 1993. Estudo não publicado.

SZÉKÁCS, A.; DARVAS, B. Forty Years with Glyphosate. In: HASANEEN, M. N. (Ed.). **Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds**: InTech, 2012. cap. Forty Years with Glyphosate, p.248-294.

TANG, P.; TSE, G. M. Immunohistochemical Surrogates for Molecular Classification of Breast Carcinoma: A 2015 Update. **Arch Pathol Lab Med**, v. 140, n. 8, p. 806-14, 2016.

THONGPRAKASANG, S. et al. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. **Food Chem Toxicol**, v. 59, p. 129-36, 2013.

TOSS, A.; CRISTOFANILLI, M. Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 17, p. 60, 2015.

UJI, K. et al. Significance of TP53 mutations determined by next-generation "deep" sequencing in prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer. **Cancer Lett**, v. 342, n. 1, p. 19-26, 2014.

VRTACNIK, P. et al. The many faces of estrogen signaling. **Biochem Med (Zagreb)**, v. 24, n. 3, p. 329-42, 2014.

WEIGELT, B.; REIS-FILHO, J. S. Back to the basis: breast cancer heterogeneity from an etiological perspective. **J Natl Cancer Inst**, v. 106, n. 8, 2014.

WELCH, H. G. et al. Breast-Cancer Tumor Size, Overdiagnosis, and Mammography Screening Effectiveness. **N Engl J Med**, v. 375, n. 15, p. 1438-1447, 2016.

WESTER, R. C.; QUAN, D.; MAIBACH, H. I. In vitro percutaneous absorption of model compounds glyphosate and malathion from cotton fabric into and through human skin. **Food Chem Toxicol**, v. 34, n. 8, p. 731-5, 1996.

WHO/FAO. **Pesticides residues in food 2016**. Rome: World Health Organization/ Food And Agriculture Organization Of The United Nations: 123 p. 2016.

WOLIN, K. Y.; CARSON, K.; COLDITZ, G. A. Obesity and cancer. **Oncologist**, v. 15, n. 6, p. 556-65, 2010.

WOOD, E. et al. **Glyphosate Technical: Dietary Carcinogenicity Study in the Mouse**. Harlan Laboratories Limited, Shardlow Business Park, Shardlow, Derbyshire DE72 2GD, UK. Study No. 2060-011. MRID 49957402. 2009a. Estudo não publicado.

WOOD, E. et al. **Glyphosate Technical: Dietary Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Study in the Rat**. Harlan Laboratories Limited, Shardlow Business Park, Shardlow, Derbyshire DE72 2GD, UK. Study No. 2060-012. MRID 49957404. 2009b. Estudo não publicado.

YADAV, B. S.; CHANANA, P.; JHAMB, S. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. **World J Clin Oncol**, v. 6, n. 6, p. 252-63, 2015.

YAGHJYAN, L. et al. Adolescent fiber intake and mammographic breast density in premenopausal women. **Breast Cancer Res**, v. 18, n. 1, p. 85, 2016.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. **Glifosato, herbicida com singular modo de ação: efeitos secundários e implicações fisiológicas e agrônômicas**. São Pedro: POTAFOS, 2004.

YAO, Y. et al. Data for the gene expression profiling and alternative splicing events during the chondrogenic differentiation of human cartilage endplate-derived stem cells under hypoxia. **Data Brief**, v. 7, p. 1438-1442, 2016.

YOUSEF, M. I. et al. Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. **J Environ Sci Health B**, v. 30, n. 4, p. 513-34, 1995.

YUAN, P. et al. Ki-67 expression in luminal type breast cancer and its association with the clinicopathology of the cancer. **Oncol Lett**, v. 11, n. 3, p. 2101-2105, 2016.

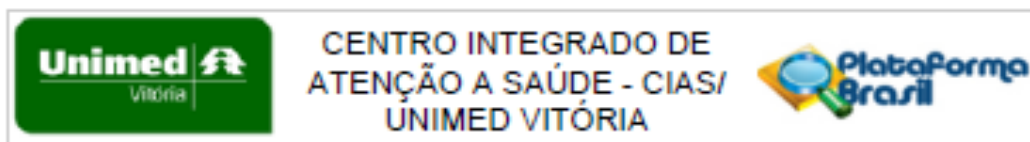
ZABALZA, A. et al. The pattern of shikimate pathway and phenylpropanoids after inhibition by glyphosate or quinate feeding in pea roots. **Pestic Biochem Physiol**, v. 141, p. 96-102, 2017.

ZHAI, H. et al. Skin decontamination of glyphosate from human skin in vitro. **Food Chem Toxicol**, v. 46, n. 6, p. 2258-60, 2008.

ZIEMBICKI, S. et al. The Association between Alcohol Consumption and Breast Density: A Systematic Review and Meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 26, n. 2, p. 170-178, 2017.

ZOUAOUI, K. et al. Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: about 13 cases of acute intoxication. **Forensic Sci Int**, v. 226, n. 1-3, p. e20-5, 2013.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Epidemiologia de características da mama em mulheres do Espírito Santo: Fatores de risco e prevalência de marcadores histológicos

Pesquisador: LAUZIENE ANDRADE SOARES

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 55963616.1.0000.5061

Instituição Proponente: DNALAB CONSULTORIA GENETICA E EXAMES LABORATORIAIS LTDA - ME

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.683.709

Apresentação do Projeto:

Este trabalho pretende identificar fatores envolvidos no desenvolvimento de lesões, sejam elas benignas ou malignas e ainda criar um modelo de características Inicopatológicas que possam auxiliar em diagnósticos mais precoces, melhor

delineamento do tratamento e ainda prever o prognóstico da paciente em questão, levando a uma maior chance de cura para a as pacientes.

Este é um estudo retrospectivo, onde serão analisados prontuários, com método de amostragem não aleatória do tipo intencional. Os dados serão coletados no serviço de radiologia do CDI Mulher/Vitória-es e no Cecon (Centro Capixaba de Oncologia).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Verificar a possível relação de fatores ambientais e características físicas específicas das pacientes com densidade mamária através da análise de mamografias realizadas entre os anos de 2015 e 2016. Além disso, serão analisados prontuários de pacientes diagnosticadas com lesões malignas na mama e seus respectivos receptores hormonais, como ER+ e ER-, supressor tumoral P53, oncoproteína c-erbB-2 e marcador de

Endereço: Rua Marina Alvarino, 385

Bairro: Ipaném

CEP: 29.047-680

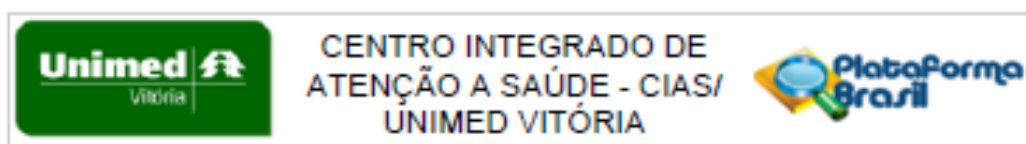
UF: ES

Município: VITÓRIA

Telefone: (27)3335-5348

Fax: (27)3335-5331

E-mail: cep@unimedvx.com.br



Continuação do Parecer: 1.603.709

proliferação Ki67 e suas correlações com o tipo histológico e grau do tumor.

Objetivo Secundário:

- Realizar a caracterização epidemiológica através da análise de mamografias, independente do resultado obtido e relacionar os dados de densidade

mamária com características individuais da paciente como peso e altura (IMC), idade, paridade, menopausa, uso de hormônios, cirurgias e histórico familiar; -Verificar a frequência dos diferentes graus de densidades mamárias;-Demonstrar o potencial da

alta densidade mamária para o desenvolvimento de lesões.-Buscar a relação dos marcadores de ER+, ER-, c-erbB-2, p53 e Ki67 com carcinoma ductal Invasivo e carcinoma ductal in situ, especificando diferentes graus e tipos histológicos;-Verificar como características individuais como idade, histórico familiar, invasão metastática, menarca e paridade influenciam no surgimento e evolução de lesões malignas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A relação risco-benefício a que expõe os indivíduos é favorável, não sendo previstos riscos potenciais significativos para os participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é prevista para ser realizada no CDI mulher e Cecon, que apresentam condições técnicas para o desenvolvimento da mesma e que apresenta condições técnicas para o desenvolvimento da mesma. Inclui, adicionalmente, a respectiva declaração de Infraestrutura e currículo(s) do(s) pesquisador (es) responsável (is) e equipe, o(s) qual (is) é (são) condizente (s) com o projeto pretendido.

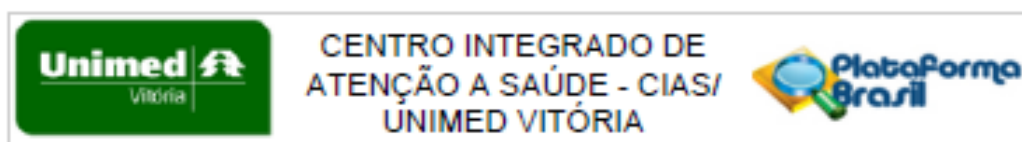
O delineamento do projeto é adequado, em nossa análise, parece conter todos os dispositivos necessários para garantir a exploração dos objetivos definidos na pesquisa.

O cronograma previsto é adequado e detalha claramente as etapas do projeto a serem seguidas.

O número de indivíduos será de 15 mil em todo o estudo. A amostra da pesquisa foi devidamente calculada. Os critérios de definição da amostra encontram-se explicitados no projeto e são adequados.

Os pacientes não pertencem a grupos especiais tais como índios, crianças, ou outros grupos

Endereço: Rua Marina Alvarino, 385
 Bairro: Ibararé CEP: 29.047-880
 UF: ES Município: VITÓRIA
 Telefone: (27)3335-5348 Fax: (27)3335-5331 E-mail: cep@unimedvi.com.br



Continuação do Parecer: 1.603.709

susceptíveis.

Crêterios de seleção equitativa de participantes não são aplicáveis ao presente projeto devido a sua natureza, objetivos e delimitamento.

Os cr terios de inclusão foram explicitados no projeto e são condizentes com o desenho da pesquisa.

Não há período de wash-out previsto no estudo.

O projeto traz descrito procedimento de monitoramento dos dados de segurança durante sua condu o, o que se encontra claramente definido.

O tratamento e avalia o dos dados são definidos no projeto e apresenta-se coerente com objetivos e delimitamento propostos.

A referência bibliográfica apresentada   suficiente e adequada, denotando que na elabora o do projeto, o(s) pesquisador (es) avaliou (aram) com profundidade o tema de investiga o proposto.

Considera es sobre os Termos de apresenta o obrigatória:

O presente estudo dispensa o uso de TCLE.

Recomenda es:

Não se aplica



Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequa es:

O projeto inicial avaliado sob parecer consubstanciado n  1.598.356 data em 20 de junho de 2016, apresentou algumas pendências e considera es a serem corrigidas. Após os autores da pesquisa apresentarem ementas de corre es, o colegiado aprova este trabalho.

Considera es Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Marins Alvarino, 385
 Bairro: Ibaré CEP: 29.047-880
 UF: ES Municipio: VITORIA
 Telefone: (27)3335-5348 Fax: (27)3335-5331 E-mail: cep@unimedvx.com.br

	CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE - CIAS/ UNIMED VITÓRIA	
---	---	---

Continuação do Parecer: 1.693.709

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PI-INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_710425.pdf	02/08/2016 20:33:00		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DECLARACAIONFRA.pdf	02/08/2016 20:32:37	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO0528.pdf	02/08/2016 20:32:14	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Outros	RESPOSTASPENDENCIAS.pdf	02/08/2016 20:27:59	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Outros	EMENDAS.pdf	02/08/2016 20:22:16	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMOSIGILOLAUZIENE.pdf	02/08/2016 20:21:38	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMOSIGILOIURI.pdf	02/08/2016 20:21:25	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOPT.pdf	03/05/2016 17:15:48	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Outros	CECCON.pdf	03/05/2016 17:11:24	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Outros	CDI.pdf	03/05/2016 17:08:27	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	03/05/2016 16:57:26	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito
Folha de Rosto	Images.pdf	03/05/2016 16:50:01	LAUZIENE ANDRADE SOARES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VITÓRIA, 17 de Agosto de 2016

Assinado por:
Joelmar Barbosa Furla
(Coordenador)

Endereço: Rua Marina Alvarino, 365		CEP: 29.047-880
Bairro: Ibaré	Município: VITÓRIA	
UF: ES		
Telefone: (27)3335-5348	Fax: (27)3335-5331	E-mail: cep@unimedvi.com.br