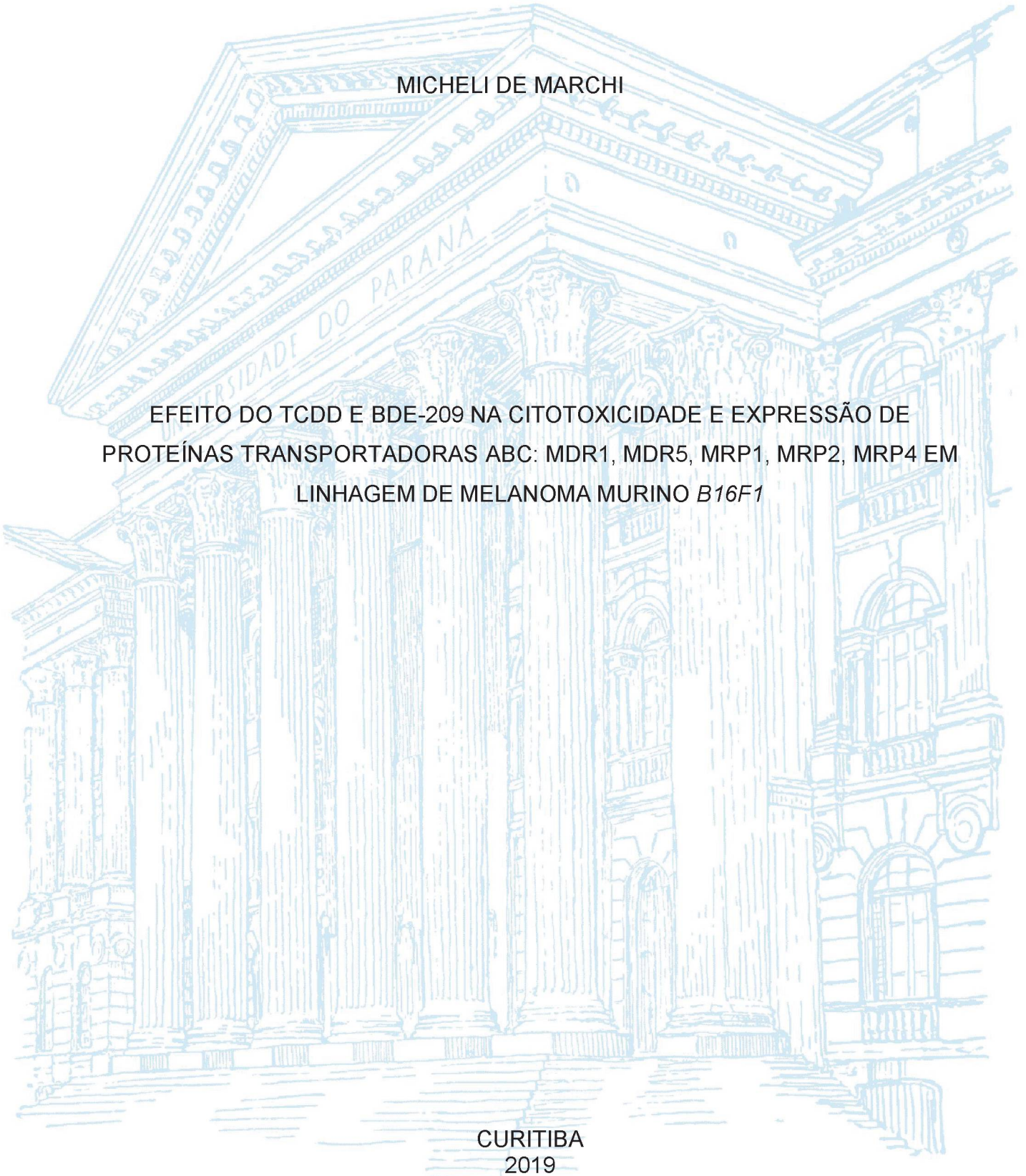


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELI DE MARCHI

EFEITO DO TCDD E BDE-209 NA CITOTOXICIDADE E EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS ABC: MDR1, MDR5, MRP1, MRP2, MRP4 EM
LINHAGEM DE MELANOMA MURINO *B16F1*

CURITIBA
2019



MICHELI DE MARCHI

EFEITO DO TCDD E BDE-209 NA CITOTOXICIDADE E EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS ABC: MDR1, MDR5, MRP1, MRP2, MRP4 EM
LINHAGEM DE MELANOMA MURINO *B16F1*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Coorientador: Prof. Dr. Benisio Ferreira da Silva Filho

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Marchi, Micheli de

Efeito do TCDD e BDE-209 na citotoxicidade e expressão de proteínas transportadoras ABC: MDR1, MDR5, MRP1, MRP2, MRP4 em linhagem de melanoma murino *B16F1*. / Micheli de Marchi. – Curitiba, 2019.

73 p.: il.

Orientador: Ciro Alberto de Oliveria Ribeiro

Coorientador: Benisio Ferreira da Silva Filho

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Melanoma 2. Poluentes orgânicos 3. Proteínas de transporte I. Título II. Ribeiro, Ciro Alberto de Oliveira, 1960- III. Silva Filho, Benisio Ferreira da IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 616.99477



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR – 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de MICHELI DE MARCHI intitulada: EFEITO DO TCDD E BDE-209 NA CITOTOXICIDADE E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS ABC: MDR1, MDR5, MRP1, MRP2, MRP4 EM LINHAGEM DE MELANOMA MURINO B16F1, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Março de 2019.

CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARIANNA BOIA FERREIRA

Avaliador Interno Pós-Doc (UFPR)

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar nessa trajetória, por ter concedido essa oportunidade e realização em minha vida, por me agradecer com muitas pessoas boas nesses últimos dois anos, por me ceder forças e resiliência para enfrentar as dificuldades.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira minha eterna gratidão por me receber e conceder a oportunidade de desenvolver esse trabalho; pelos seus ensinamentos técnicos, éticos, pela dedicação, paciência e a disposição para ajudar a resolver os imprevistos e pela confiança em mim depositada.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Benisio Ferreira da Silva Filho, a minha gratidão pela imensa disposição em ajudar e contribuir na realização e desenvolvimento do trabalho; pela paciência, ensinamentos e amizade no decorrer do mestrado.

Ao Prof. Dr. Francisco Filipak Neto, a minha admiração e gratidão pela excepcional contribuição para o andamento do trabalho. A Marianna Bóia pela ajuda e colaboração em meu trabalho. Aos professores do programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular; A todos os professores que contribuíram para a minha formação.

Aos laboratórios de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos e de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados do departamento de Biologia Celular e ao laboratório de Parasitologia Molecular do departamento de Patologia, que contribuíram com empréstimo de equipamentos e/ou reagente.

As agências fomentadoras, em especial ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa, que tornou possível a realização do mestrado.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Cultivo celular Jessica, Gisleine, Fernanda, Aliciane pelo apoio, ensinamentos, desabafos, pela nossa amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório; em especial ao meu colega e amigo Erick Moggio por todo apoio e auxílio no desenvolvimento do trabalho. Aos colegas e amigos do grupo de Toxicologia Celular Patrícia, Joelma, Tugstênio, Melissa, Amândia pela troca de conhecimento, brincadeiras, conversas e pelo apoio.

Aos meus pais Adair e Márcia e ao meu irmão Luan, minha eterna gratidão por proporcionarem tanto apoio em minhas decisões profissionais e pessoais, por todo amor, dedicação e cuidado; pela compreensão de minha ausência nesses últimos dois anos; pela educação, ensinamentos, ideais e valores a mim concedido;

por serem meus exemplos de vida, que me faz transbordar de orgulho e inspiração. Ao meu namorado Bruno, por todo apoio, compreensão, carinho, preocupação, paciência e por tornar os momentos difíceis mais leves.

In memoriam ao meu amado vózinho Luiz Nercí dos Santos, por sempre ter me proporcionado apoio, cuidado, carinho e muito incentivo aos meus estudos e por ser um exemplo de pessoa e alegria em minha vida. Aos meus queridos tios Clóvis, Jussara, Sônia e Dido, aos meus avós, amigos e primos, muito obrigada por todo apoio. Aos meus amigos da PIB e as meninas do pensionato, em especial as minhas amigas Daniela, Giovana, Marcione e Stefani.

Ao secretário Lucas do programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular; aos funcionários da UFPR, técnicos e administrativos; e a todos que de alguma forma contribuíram nessa trajetória tão importante da minha vida.

"Unless we change the way we think, we will not be able to solve the problems caused by the way we get used to seeing the world".

(Albert Einstein)

RESUMO

Os contaminantes ambientais 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) e 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodifenil éter (BDE-209), são poluentes denominados orgânico persistentes gerados principalmente durante atividades antrópicas e têm sido lançados constantemente no ambiente. Devido à sua capacidade lipofílica, a exposição a esses contaminantes é frequente, iniciando na fase fetal e se estendendo após o nascimento e pela fase adulta. O melanoma é um tipo de câncer de pele agressivo, em razão de sua capacidade metastática e rápida progressão. Sabe-se que durante o tratamento quimioterápico pode ocorrer uma diminuição dos efeitos dos medicamentos devido ao aumento na expressão e/ou ativação de proteínas transportadoras ABC (*ATP binding cassette*). Essas proteínas de membrana atuam reconhecendo diferentes compostos e promovem o efluxo de metabólitos celulares, secreção de hormônios, assim como o efluxo de xenobióticos para fora da célula. Essa propriedade faz com que os fármacos presentes no tratamento tenham seus efeitos minimizados exatamente pela ação dessas proteínas transportadoras. No presente estudo, utilizamos a linhagem de melanoma murino B16F1 como modelo experimental para avaliar o papel dos xenobióticos BDE-209 e TCDD nas proteínas de efluxo celular. As células foram cultivadas em meio DMEM com alta glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico e incubadas a 37°C e sob 5% de CO₂ em atmosfera umidificada. Os ensaios para a investigação de citotoxicidade dos contaminantes ambientais foram MTT, vermelho neutro, cristal violeta e clonogênico. Para a avaliação da atividade das proteínas de efluxo foram realizados o ensaio de MXR e análise da expressão gênica de MDR1; MDR5; MRP1; MRP2 e MRP4, genes de proteínas transportadoras ABC. Para os experimentos, as células foram expostas por 24 horas e 15 dias com o BDE-209 e TCDD, para as concentrações teste de 0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL. Os resultados indicam que o contaminante BDE-209, altera diferentes parâmetros em 24 horas de exposição como: metabolismo lisossomal (↑~20%), expressão gênica dos transportadores ABC: ABCB1 (↑~22%), ABCC1 (↑~10%), ABCC2 (↑~27%) e ABCC4 (↑~44%) e atividade das proteínas transportadoras (↓~29%). Com a exposição de 15 dias foi observada alteração dos seguintes parâmetros: metabolismo lisossomal (↓~13%), proliferação/adesão celular (↑~10%), expressão gênica de ABCB1(MDR1) (↓~3,5%); ABCB5(MDR5) (↑~2,5%); ABCC1(MRP1) (↑3,5%); ABCC2 (↑~1,2%); ABCC4 (~3,0%) e atividade das proteínas transportadoras (↑~30%). Já para o contaminante TCDD, os resultados também apresentaram alterações nos parâmetros em 24 horas de exposição como no metabolismo lisossomal (↑~22%), proliferação/adesão celular (↑~23%) e nos níveis de expressão gênica dos transportadores ABC: ABCB5 (↑~42%), ABCC1 (↑~20%), ABCC2 (↑~15%) e ABCC4 (↑~33%) enquanto para a exposição de 15 dias as alterações foram na proliferação/adesão celular (↓~11%) e expressão gênica de ABCB1 (↓~0,2%); ABCB5 (MDR5) (↓~1,3%); ABCC1(MRP1) (↑~1,2%); ABCC4 (MRP4) (↓~1,5%). Em geral, os dados apresentados sugerem que a exposição aos contaminantes BDE-209 e TCDD, podem estar potencializando a resistência das células do melanoma, tornando-as menos sensíveis ao tratamento quimioterápico, principalmente pela atividade e expressão gênica dos transportadores ABC:PGP e MRP. Esses dados reforçam a importância da busca pela compreensão do risco de exposição humana a xenobióticos.

Palavras Chaves: Poluentes orgânicos persistentes (POPs), Proteínas transportadoras ABC, PGP, MRP; Melanoma, B16F1.

ABSTRACT

Environmental contaminants 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and 2,2', 3,3', 4,4', 5,5', 6,6'-decabromodiphenyl ether (BDE-209), are denominated persistent organic pollutants generated primarily during anthropic activities and have been constantly released into the environment. Due to their lipophilic capacity, exposure to these contaminants is frequent, starting in the fetal phase and extending after birth and through adulthood. Melanoma is a type of aggressive skin cancer, featuring metastatic ability and rapid progression. It is known that during chemotherapy treatment there may be a decrease in the drugs effects due to increased expression and/or activation of ATP binding cassette proteins. These membrane proteins act by recognizing different compounds and promote the efflux of cellular metabolites, secretion of hormones, as well as efflux of xenobiotics out of the cell. This property makes the drugs present in the treatment have their effects minimized exactly by the action of these carrier proteins. In the present study, we used the B16F1 murine melanoma line as an experimental model to evaluate the role of the xenobiotics BDE-209 and TCDD in the cellular efflux proteins. The cells were cultured in high glucose DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotic and incubated at 37 ° C and 5% CO₂ in a humidified atmosphere. The assays for the cytotoxicity investigation of environmental contaminants were MTT, neutral red, crystal violet and clonogenic. To evaluate the activity of the efflux proteins were performed the assay MXR and analysis of gene expression the MDR1; MDR5; MRP1; MRP2 and MRP4, ABC carrier protein genes. For the experiments, the cells were exposed for 24 hours and 15 days with BDE-209 and TCDD, at concentrations of 0.01; 0.1 and 1.0 nM/mL. The results indicated that the BDE-209 changes different parameters in 24 hours of exposure, such as: lysosomal metabolism (↑~20%), gene expression of ABC transporters: ABCB1 (↑~22%), ABCC1 (↑~10%), ABCC2 (↑~27%) and ABCC4 (↑~44%) and activity of the ABC carrier proteins (↓~29%). With the exposure of 15 days, the following parameters were observed: lysosomal metabolism (↓~13%), cell proliferation / adhesion (↑~10%), gene expression of ABCB1 (MDR1) (↓~3.5%); ABCB5 (MDR5) (↑~2.5%); ABCC1 (MRP1) (↑~3.5%); ABCC2 (↑~1.2%); ABCC4 (~3.0%) and activity of the ABC carrier proteins (↑~30%). For the TCDD, the results also showed alterations in the parameters in 24 hours of exposure as in the lysosomal metabolism (↑~22%), cell proliferation/adhesion (↑ ~23%) and in the levels of ABC expression ABCB5 (↑~42%), ABCC1 (↑~20%), ABCC2 (↑~15%) and ABCC4 (↑~33%) while for the 15 day exposure the changes were in cell proliferation/adhesion (↓~11%) and ABCB1 gene expression (↓~0.2%); ABCB5 (MDR5) (↓~1.3%); ABCC1 (MRP1) (↑1.2%); ABCC4 (MRP4) (↓~1.5%). In general, the data presented suggest that exposure to BDE-209 and TCDD may be potentiating the resistance of melanoma cells, making them less sensitive to chemotherapeutic treatment, mainly due to the activity and gene expression of ABC: PGP and MRP transporters. These data reinforce the importance of the search for the understanding of the risk of human exposure to xenobiotics.

Keywords: Persistent organic pollutants (POPs), ATP-binding cassette (ABC), PGP, MRP; Melanoma, B16F1.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estrutura tridimensional da molécula do TCDD | 18 |
| Figura 2. Estrutura tridimensional do congênere BDE-209 | 19 |
| Figura 3. Células <i>B16F1</i> , melanoma murino. | 21 |
| Figura 4. Atividade da proteína transportadora ABC..... | 22 |
| Figura 5. Imagens do ensaio clonogênico, para a análise de formação de colônias. (A) Controle; (B) Veículo BDE; (C) Veículo TCDD; (D) 0,01 nM de BDE-209 (E) 0,1 nM de BDE-209; (F) 1,0 nM de BDE-209; (G) 0,01 nM de TCDD; (H) 0,1 nM de TCDD; (I) 1,0 nM de TCDD (escala = 200µm)..... | 38 |

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Teste da intensidade de fluorescência de Rodamina B, tempo 0, 10 e 20 minutos. * $p < 0.01$ 32
- Gráfico 2.** Valor relativo em relação ao controle da concentração utilizada do solvente DMSO, para diluir os contaminantes BDE-209-209 e TCDD. $p < 0,05$ 33
- Gráfico 3.** Conversão do MTT em formazan em células B16F1 após 24 e 15 dias a diferentes concentrações de BDE-209-209 E TCDD (0,01-1,0 nM/mL). Média de três experimentos independentes com seis replicatas por grupo. $p < 0,05$ 34
- Gráfico 4.** Valor relativo em relação ao controle da concentração utilizada do solvente DMSO, para diluir os contaminantes BDE-209-209 e TCDD. 35
- Gráfico 5.** Acúmulo do corante vermelho neutro pelo sistema endolisossomal em células B16F1 após 24 de exposição em diferentes concentrações de BDE-209-209 E TCDD (0,01-1,0 nM/mL). Média de três experimentos independentes com seis replicatas por grupo. * $p < 0,1$ 36
- Gráfico 6.** Acúmulo do corante vermelho neutro pelo sistema endolisossomal em células B16F1 após 15 dias de exposição aos contaminantes BDE-209-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01-1,0 nM/mL). Média de três experimentos independentes com seis replicatas por grupo. * $p < 0,1$ 36
- Gráfico 7.** Valor relativo em relação ao controle da concentração utilizada do solvente DMSO, para diluir os contaminantes BDE-209-209 e TCDD. 36
- Gráfico 8.** Proliferação celular após 24 e 15 dias de exposição a diferentes concentrações de BDE-209-209 e TCDD. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle $p < 0,05$ para TCDD na concentração de 0,1; e (*) para a concentração de TCDD 0,01 e 1,0 $p < 0,1$. Para o cristal violeta de 15 dias de exposição $p < 0,05$. Três experimentos independentes. 37
- Gráfico 9.** Níveis de expressão dos genes ABCB1 em células B16F1 após exposição de 24h ao BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações

- (0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL). Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle veículo; Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; *** $p < 0,001$. Três experimentos independentes.....39
- Gráfico 10.** Níveis de expressão gênica de ABCB1, em células *B16F1* após exposição de 15 dias ao BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL) em comparação com o controle veículo (DMSO); Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; * $p < 0,05$. Três experimentos independentes.40
- Gráfico 11.** Expressão gênica de ABCB5 em células *B16F1*, após exposição de 24 dias aos contaminantes BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL) em relação ao controle veículo; Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; $p < 0,05$; 0,1 nM de TCDD $p < 0,01$; A letra “b” representa a diferença significativa entre as concentrações 0,1 e 1,0nM de TCDD. Três experimentos independentes.41
- Gráfico 12.** Níveis de expressão gênica de ABCB5, em células *B16F1* após exposição de 15 dias ao BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL) em relação ao controle veículo; Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Três experimentos independentes.41
- Gráfico 13.** Expressão gênica do gene ABCC1 em células *B16F1*, após exposição de 24h com os contaminantes BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01; 1,1 e 1,0 nM/mL) em relação ao controle veículo. Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; “a” e “b” representam diferenças entre as concentrações; “#” representa a diferença entre o controle e o veículo TCDD $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Três experimentos independentes.42
- Gráfico 14.** Níveis de expressão gênica de ABCC1, em células *B16F1* após exposição de 15 dias ao BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL) em relação ao controle veículo; Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Três experimentos independentes.....43

- Gráfico 15.** Expressão gênica do alvo ABCC2 em células B16F1, após exposição de 24h com os contaminantes BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01; 1,1 e 1,0 nM/mL). (a) $p < p < 0,001$; (b) e (**)
 $p < 0,01$; (*a) $p < 0,05$. Três experimentos independentes.44
- Figura 16.** Níveis da expressão gênica de ABCC2, após exposição de 15 dias com os contaminantes BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01-1,0 nM/mL) em relação ao controle veículo. Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; ** $p < 0,01$44
- Gráfico 17.** Expressão gênica do alvo molecular ABCC4, após exposição de 24h com os contaminantes BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01-1,0 nM/mL) em relação ao controle veículo; Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; (**)
 $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$45
- Gráfico 18.** Níveis da expressão gênica de ABCC4, após exposição de 15 dias com os contaminantes BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01-1,0 nM/mL) em relação ao controle veículo. Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; ** $p < 0,01$45
- Gráfico 19.** Valor relativo em relação ao controle e verapamil; veículo BDE-209 e veículo BDE-209 + verapamil; veículo TCDD e veículo TCDD + verapamil. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$46
- Gráfico 20.** Efluxo de rodamina após 24 horas e 15 horas de exposição aos contaminantes BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01-1,0 nM/mL) em relação ao controle veículo. * $p < 0,05$47
- Gráfico 21.** Valor relativo entre o tempo 0' sem indometacina com o tempo 10' sem indometacina; valor relativo do tempo 0 com indometacina e tempo 10' com indometacina. * $p < 0,1$48
- Gráfico 22.** Atividade de proteínas MRP: intensidade da fluorescência dos grupos expostos a BDE-209 e TCDD por 24 horas em relação ao controle. * $p < 0,1$48

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Concentrações testadas para ambos os poluentes | 27 |
| Tabela 2. Organização dos grupos expostos..... | 28 |
| Tabela 3. Nome dos genes com seus respectivos pares de bases de cada amplicon. | 30 |
| Tabela 4. Tabela comparativa da expressão gênica e atividade das proteínas transportadoras ABC. Verde: aumento; vermelho: redução; cinza: não apresentou diferenças estatísticas em relação ao controle. | 50 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 23 |
| 4 HIPÓTESE | 24 |
| 5 OBJETIVO GERAL | 24 |
| 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 25 |
| 6 MATERIAIS E MÉTODOS | 26 |
| 6.1 ABORDAGEM EXPERIMENTAL | 26 |
| 6.2 CULTIVO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM <i>B16F1</i> | 26 |
| 6.3 CONCENTRAÇÕES DE POLUENTES TESTADAS E GRUPOS EXPERIMENTAIS | 27 |
| 6.4 ENSAIO MTT | 28 |
| 6.5 VERMELHO NEUTRO (RN)..... | 28 |
| 6.6 ENSAIO DE CRISTAL VIOLETA..... | 29 |
| 6.7 ENSAIO CLONOGÊNICO..... | 29 |
| 6.8 DESENHO DOS PRIMERS PARA ANÁLISE DE QPCR..... | 29 |
| 6.9 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E CONVERSÃO PARA CDNA..... | 30 |
| 6.10 EXPRESSÃO GÊNICA - QPCR..... | 31 |
| 6.11 ATIVIDADE DE TRANSPORTE DE RODAMINA B | 31 |
| 6.12 ATIVIDADE DE TRANSPORTE DE CALCEÍNA AM..... | 32 |
| 6.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 32 |
| 7 RESULTADOS | 33 |
| 7.1 ENSAIO MTT | 33 |
| 7.2 ENSAIO DO VERMELHO NEUTRO | 35 |
| 7.3 ENSAIO DE CRISTAL VIOLETA..... | 36 |
| 7.4 ENSAIO CLONOGÊNICO..... | 38 |
| 7.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA – QPCR | 39 |
| 7.5.1 Gene ABCB1 | 39 |
| 7.5.2 Gene ABCB5..... | 40 |
| 7.5.3 Gene ABCC1..... | 42 |
| 7.5.4 Gene ABCC2..... | 43 |
| 7.5.5 Gene ABCC4..... | 44 |
| 7.1 ATIVIDADE DE TRANSPORTE DE RODAMINA B | 46 |

| | |
|--|-----------|
| 7.2 ATIVIDADE DE TRANSPORTE DE CALCEÍNA AM..... | 47 |
| 7.3 COMPARAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO E ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS ABC: MDR (PGP) X MRP | 49 |
| 8 DISCUSSÃO | 51 |
| 9 CONCLUSÃO | 62 |
| 10 REFERÊNCIAS..... | 63 |

1 INTRODUÇÃO

Os poluentes orgânicos persistentes como o TCDD e BDE-209, são dificilmente degradados no ambiente principalmente pela sua natureza lipofílica e estão presentes em diversos extratos ambientais, sendo portanto, considerados onipresentes, aumentando potencialmente o risco de exposição à população humana desde os primeiros meses de vida. No entanto, há poucos estudos apresentados até o momento, que permita avaliar se alguns poluentes, como o TCDD e o BDE-209, são capazes de interferir com o fenótipo de células tumorais no sentido de torná-las mais agressivas e resistentes ao tratamento quimioterápico.

O TCDD é o congênera mais tóxico das dioxinas e apresenta diversos efeitos biológicos, assim como no sistema imunológico, nervoso, altera também funções do sistema reprodutor e órgãos como o fígado e o pâncreas (Brulport *et al.*, 2017). A fonte de dioxinas ocorre principalmente pela atividade antrópica, através de subprodutos de diversas reações químicas utilizadas na indústria como na produção de pesticidas ou no branqueamento de papel e celulose ou mesmo pela combustão de produtos industrializados. Além disso, esse composto pode ser liberado através de eventos naturais como erupções vulcânicas e incêndios florestais (Assunção, Pesquero, 1999; Cabrita *et al.*, 2003; Who, 2014).

O BDE-209 é uma molécula amplamente utilizada como aditivo retardante de chama (Darnerud *et al.*, 2001; McDonald, 2002), já foi detectado no leite materno e também em diversos componentes da dieta humana. A sua ampla dispersão deve-se ao seu uso em larga escala e sua persistência no ambiente. É uma molécula amplamente utilizada na composição de diversos itens como: dispositivos eletrônicos, mobiliários, materiais de construção, polímeros, materiais plásticos, têxteis, tintas, no entanto a poeira doméstica é uma das principais fontes de exposição (Meng *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2016; Zhai *et al.*, 2016).

Como essas substâncias podem ser encontradas nos mais diversos extratos do ambiente e à grande diversidade de fontes de exposição humana, faz-se necessário uma melhor compreensão do risco de exposição a essa molécula. Estudos recentes do nosso Grupo de Pesquisa mostraram evidências de que alguns poluentes orgânicos podem de algum modo alterar o padrão de malignidade de células tumorais. Esses resultados chamou a atenção, pois é esperado de uma maneira geral, e os dados da literatura mostram isso, de que os xenobióticos levam ao desgaste celular interferindo negativamente com a integridade da célula ou do

tecido. Esse paradigma levou à criação de uma hipótese a qual passou a ser testada, e sendo esse estudo uma parte dessa investigação. A hipótese que se criou foi se tais moléculas seriam capazes de interferir com o fenótipo de células tumorais ao ponto de aumentar sua malignidade e com isso afetando negativamente o tratamento quimioterápico. Isso poderia estar diminuindo a sensibilidade das células tumorais o que favoreceria o agravamento da doença.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os poluentes orgânicos persistentes (POPs), são contaminantes ambientais facilmente bioacumuláveis pela sua característica lipofílica e persistência no ambiente. Esses poluentes são resistentes à degradação natural podendo persistir no ambiente por décadas (Cerniglia, 1992; Martin *et al.*, 2004; Scheringer, M. *et al.*, 2004; Macdonald *et al.*, 2005). Além disso, muitos dos poluentes orgânicos persistentes apresentam a capacidade de migrar por longas distâncias e alcançar regiões do planeta distantes das suas fontes de emissão e com isso acumulando-se mesmo em locais onde não são produzidos ou utilizados (Wania, Mackay, 1996; Pozo *et al.*, 2006).

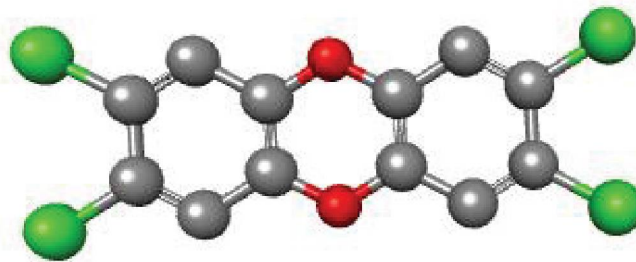
Avaliar os efeitos da exposição à esses tipos de poluentes como a classe dos Éteres de Difenil Polibromados (PBDEs) e os Bifens Policlorados (PCBs), constituem um desafio de grande proporção tanto ambiental como para a saúde pública. Estudos tem demonstrado o grande potencial tóxico desses contaminantes em organismos vivos cronicamente expostos, mesmo em baixíssimas concentrações. Em geral os POPs afetam os sistemas endócrino, imunológico, nervoso e reprodutivo (Ikonomou *et al.*, 2005; Carpenter Do, 2013; La Merrill *et al.*, 2013).

O composto orgânico clorado 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (Figura 1) é considerado o membro mais tóxico da família das dioxinas (Pesatori *et al.*, 2009). Essa substância é um composto aromáticos tricíclico, onde os átomos de cloro se ligam aos anéis benzênicos, possibilitando a formação de um grande número de congêneres. Essas moléculas são dificilmente degradadas no ambiente e podem se dispersar alcançando regiões muito distantes da sua fonte de emissão. Além disso, são moléculas altamente lipofílicas o que facilita sua bioacumulação e biomagnificação, acumulando-se principalmente no tecido adiposo de animais (NTP, 2011).

A origem das dioxinas pode ser através de subprodutos de diversas reações químicas utilizadas na produção industrial, e é liberada naturalmente pelas erupções vulcânicas e incêndios florestais (Assunção, Pesquero, 1999; Cabrita *et al.*, 2003; Who, 2014). A meia-vida do TCDD é em torno de 8 dias no ar, 6 meses na água e mais de 100 anos no solo e nos sedimentos (Sinkkonen, Paasivirta, 2000).

A exposição humana à dioxina decorre 90% pela alimentação através de itens da dieta ricas em gordura contaminada com o poluente como carne, peixes e produtos lácteos, o restante ocorre através da pele ou inalação o que gera um problema de saúde pública (Roeder *et al.*, 1998; NTP, 2006). Os efeitos da exposição humana ao TCDD tem sido relatado no desenvolvimento, reprodução, sistema imune além de apresentar efeitos carcinogênicos, neuronais e vasculares (NTP, 2006; XU *et al.*, 2017; Pelc T *et al.*, 2018).

Figura 1. Estrutura tridimensional da molécula do TCDD



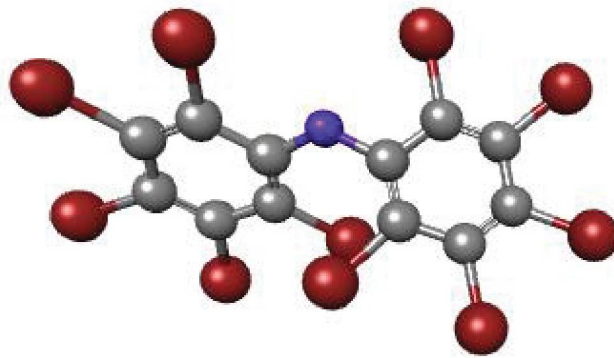
Fonte: A Autora (2019).

O contaminante ambiental 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-deca bromodifenil éter (BDE-209) (Figura 2), também é uma substância de grande persistência ambiental, apresenta característica lipofílica, e tem sido frequentemente encontrado em tecidos humanos (Gao *et al.*, 2015; Haraguchi *et al.*, 2016). O BDE-209 contém 10 átomos de hidrogênio e pode apresentar em diferentes posições de 1 a 10 átomos de bromo. A possibilidade de qualquer átomo de hidrogênio ser trocado pelo bromo resulta em 209 possíveis congêneres da molécula (Alaee *et al.*, 2003).

Esse composto pertence à classe dos éteres de difenil polibromados (PBDEs), o qual tem sido o composto mais comercializado desde o final da década de 1970 (Hale *et al.*, 2006). Atualmente o BDE-209, vem sendo amplamente utilizado como retardante de chamas em produtos eletrônicos, plásticos, automóveis, espumas, têxteis e mobiliários (McDonald 2002; Stapleton *et al.*, 2009; Stasinska *et*

al., 2013, e portanto, são empregados abundantemente em utensílios de uso diário no ambiente doméstico (Wit, 2002; Sjödin *et al.*, 2003; Basis; Samara, 2012). Os PBDEs são encontrados também, no ambiente natural como o ar, água e solo. Esses compostos podem ser liberados durante a manipulação industrial, pela queima de plásticos ou mesmo pelo descarte ou reciclagem de produtos contendo essas moléculas na sua composição (Webster, 2004; Usepa, 2015).

Figura 2. Estrutura tridimensional do congênere BDE-209



Fonte: A autora (2019).

Segundo Hooper e McDonald (2000), a população humana entra em contato ou são expostas aos PBDEs através principalmente, da ingestão de alimentos que contêm alto teor de gordura, isso devido ao seu acúmulo que ocorre pela cadeia trófica. Law e colaboradores (2003) descrevem a presença dos PBDEs em uma grande diversidade de espécies animais. Estudos realizados no Japão mostraram um aumento do nível de bioacumulação de PBDEs no tecido adiposo humano, onde os níveis de congêneres de PBDEs relatados em 2003 à 2004, foram relativamente mais elevados que o encontrado no ano de 2000 (Kunisue *et al.*, 2007). Quanto ao potencial tóxico dos PBDEs, essas substâncias podem agir como hepatotóxicos, provocar alterações no sistema imunológico, apresentar neurotoxicidade, distúrbios endócrinos e podem ainda promover o desenvolvimento de câncer (Zhou *et al.*, 2001; Us Epa, 2006; Hoffman *et al.*, 2017).

O fato dessas moléculas de interesse no presente estudo apresentarem uma distribuição ambiental diversificada e em concentrações relativamente altas, possibilita uma exposição diária e constante à população humana. Embora o potencial tóxico dessas moléculas seja já relativamente bem descritos, há poucos dados na literatura que relacione as mesmas com a mudança do fenótipo de células

tumorais, favorecendo sua malignidade pela diminuição da sensibilidade dessas células ao tratamento quimioterápico. Dessa forma, com base na literatura e resultados prévios do Grupo de Pesquisa em Toxicologia Celular, decidimos avaliar se o TCDD ou o BDE-209 poderiam alterar a atividade de efluxo celular via família de proteínas transportadoras de membrana (*ATP-binding cassette*).

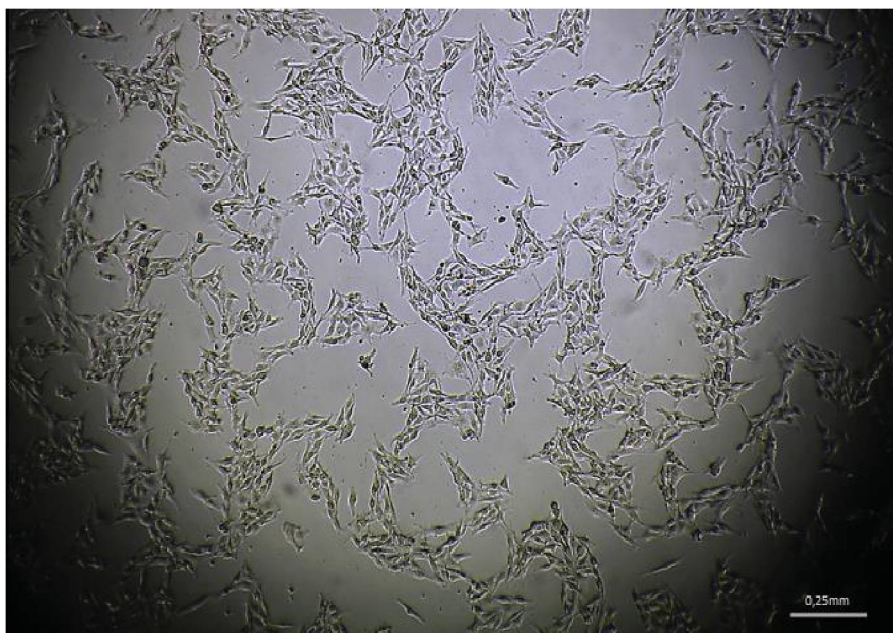
O alvo de estudo restringe-se às células de melanomas cutâneos, as quais o melanoma é a neoplasia de pele primária que tem origem nos melanócitos (Slingluff *et al.*, 2011), sendo que esse tipo de tumor pode se desenvolver em qualquer tipo de tecido onde encontram-se os melanócitos, que são células pigmentadas encontrados em quase todos os organismos vivos (Bush, 2003). O melanoma, quando diagnosticado em estágios tardios, costuma ser de alta mortalidade por ser um tumor agressivo promovendo metástases, e sua incidência tem aumentado nos últimos anos, constituindo um importante problema para a saúde humana (Balch *et al.*, 2009; Inca, 2016).

Existem vários fatores ambientais que favorecem o surgimento e o desenvolvimento do melanoma onde o de maior destaque é a exposição solar. Os indivíduos de pele clara, ou pouco pigmentada, apresentam desvantagem quanto ao desenvolvimento do melanoma devido à pouca quantidade de melanina, e conseqüentemente são mais expostas aos raios solares. Mesmo que a exposição solar seja relevante, de acordo com Houghton e Polsky (2002), os fatores genéticos e ambientais também são importantes para o desenvolvimento do melanoma.

Nesse contexto, os contaminantes ambientais podem também interferir no desenvolvimento de melanomas, visto que algumas moléculas podem induzir ou promover alterações nas células iniciando um processo de carcinogênese. Comprovadamente, alguns contaminantes apresentam essa propriedade e dentre eles destacamos os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais tóxicos (ex. cádmio, cobalto e chumbo), diversas classes de pesticidas (ex. aldrin, dicloro-difenil-tricloroetano - DDT e o toxifeno) bem como os bifenis policlorados ou polibromados (Irigaray *et al.*, 2007; Glahn *et al.*, 2008; Rusyn; Corton, 2012).

Para testar a nossa hipótese de que BDE-209 e TCDD podem alterar o fenótipo de células tumorais, utilizamos no nosso modelo de estudo as células de melanoma murino da linhagem *B16F1* (Figura 3). Essas células são originadas de células epiteliais da espécie *Mus musculus* as quais apresentam características de células aderentes, fusiformes e também capazes de produzir melanina *in vitro* (BCRJ, 2014). Existem diversos modelos experimentais para estudos de melanoma, abrangendo diferentes sublinhagens de células B16. De acordo com ATCC (2016), todas as linhagens B16F0, B16F1 e B16F10, podem ser transfectadas para experimentos *in vivo*, contribuindo assim para a concessão de futuros experimentos.

Figura 3. Células *B16F1*, melanoma murino.



Fonte: A autora (2019).

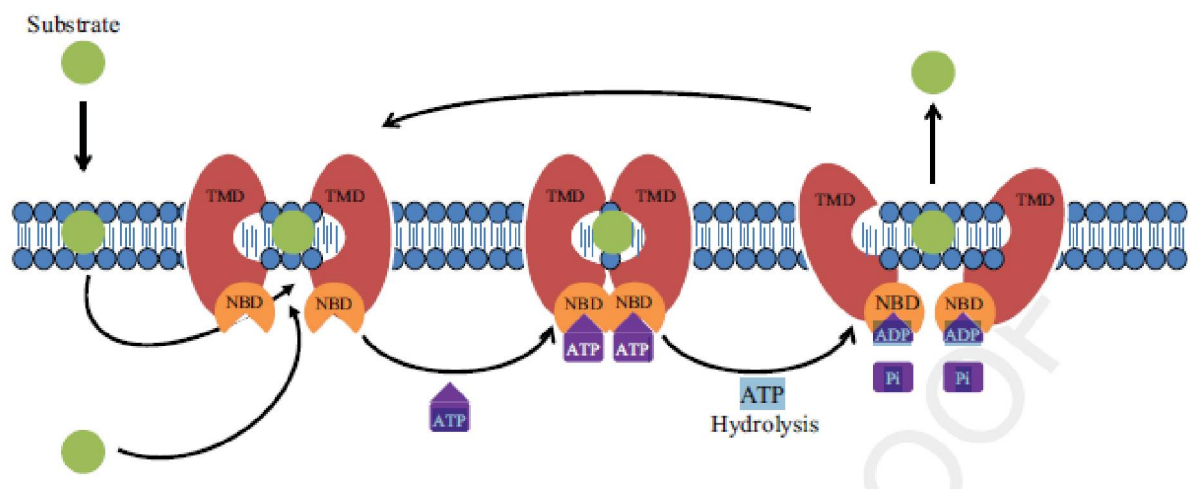
Existem diversos estudos utilizando as células B16 e dentre eles destacamos o trabalho realizado por Nordenberg *et al.* (1994), os quais avaliaram a expressão de proteínas de transporte do tipo MDR. Outros estudos mostraram resultados de estresse químico através de avaliações citotóxicas, genotóxicas e de resposta antioxidante (KUMAR *et al.*, 2009). Além disso, Overwijk e Restifo (2001) descrevem a linhagem B16 como um bom modelo para estudos de melanoma humano. Face a isso, acreditamos que as células *B16F1* constituem um modelo eficaz para o tipo de investigação proposta no presente estudo. Essas células apresentam um fenótipo menos agressivo em relação as células B16F10, o que

possibilitará observar um possível aumento da malignidade dessas células, frente a exposição aos contaminantes como proposto. Além disso, é um modelo celular conhecido e com metodologias de cultivo bem descritas e padronizadas.

O índice de óbito para muitos tipos de cânceres continua elevado, mesmo com o desenvolvimento de diferentes drogas quimioterápicas pela indústria farmacêutica (Almeida *et al.*, 2005). Essa circunstância muitas vezes é consequência do tratamento ineficaz, podendo estar relacionada com a resistência das células tumorais ao tratamento (Tentori *et al.*, 2013). Um dos mecanismos mais estudados e que se sabe possuir uma forte contribuição para aumentar a resistência das células tumorais a múltiplas drogas, é o aumento na expressão de bombas de efluxo de drogas dependentes de ATP, conhecidas como proteínas transportadoras pertencentes à superfamília ABC (*ATP-binding cassette*) (Lopes, 2011), caracterizando o fenótipo MDR (*multidrug resistance*) como primeiramente descrito por Levine *et al.* (1993).

As proteínas transportadoras ABC (Figura 4), são constituídas de uma estrutura comum agrupada em duas regiões transmembranares (TMDs). Essas possuem o papel de ligar e translocar substratos através da bicamada lipídica, da mesma forma que possuem também dois domínios hidrofílicos de ligação nucleotídica (NBDs), onde ocorre a ligação e hidrólise de ATP (Ter Beek; Guskov; Slotboom, 2014).

Figura 4. Atividade da proteína transportadora ABC.



Fonte: Z. Chen *et al./Cancer Letters* (2015).

Nesse trabalho, com o intuito de conhecer a resposta celular após a exposição ao TCDD e ao BDE-209 no sistema de resistência a múltiplas drogas, fornecidas pelas proteínas transportadoras ABC, foram selecionados como alvos moleculares cinco genes pertencentes à duas subfamílias distintas de proteínas ABC (PGP e MRP), que conferem a resistência das células à exposição a múltiplas drogas: PGP1/MDR1, PGP5/MDR5, MRP1, MRP2 e MRP4, constituídas pelos seguintes genes respectivamente ABCCB1, ABCB5, ABCC1, ABCC2 e ABCC4. Os alvos moleculares foram selecionados à partir de estudos que descrevem o papel dessas proteínas na eliminação de compostos citotóxicos em células de mamíferos (Gillet; Efferth; Remacle, 2007; Kaspar P Locher, 2016); e também pela evidente expressão desses genes em células de melanoma humano (Chen *et al.*, 2009; Heimerl *et al.*, 2011).

As proteínas transportadoras ABC, da subfamília P-gp (também conhecida como glicoproteína P, MDR1 - ABCB) em humanos, são constituídas por 1260 resíduos de aminoácidos, distribuídos em dois domínios de 610 aminoácidos e ligadas por um pequeno segmento de 60 aminoácidos (Loo; Clarke, 1999; Jones; George, 2000). São compostas por doze regiões transmembranares e dois domínios de ligação do ATP (Chen *et al.*, 1983). A PGP apresenta 170 kDa e é N-glicosilada, mas o seu nível de glicosilação varia entre as espécies (Teodori *et al.*, 2006). A PGP exporta uma grande variedade de diferentes classes de drogas, devido ao seu amplo espectro de substratos, funcionando na proteção celular contra os xenobióticos (Matheny *et al.*, 2011; Loo *et al.*, 2013).

As proteínas transportadoras ABC, da subfamília MRP (ABCC), estão associados à resistência a múltiplos fármacos, visto que se mostraram eficientes no transporte de drogas em modelo experimental, ou estão relacionadas à secreção de metabólitos e hormônios (Borst *et al.*, 2000; Johnson; Chen, 2017). A MRP (MRP1). É uma proteína de 190 kDa constituída de 1531 aminoácidos que são distribuídos em três domínios e possui 17 hélices transmembranares, de modo que as hélices 10, 11, 16 e 17 fazem o reconhecimento das drogas a serem translocadas (Daoud *et al.*, 2001).

3 JUSTIFICATIVA

Os poluentes orgânicos persistentes como o BDE-209 e TCDD, são considerados onipresentes, apresentam grande dispersão ambiental percorrendo

longas distâncias desde a sua fonte de emissão. Devido à ampla dispersão e lipofílicidade desses compostos, a população humana está frequentemente exposta a esses poluentes iniciando com os primeiros estágios da vida intrauterina, na amamentação e durante toda a vida do indivíduo através principalmente pelo alimento.

Dessa forma, é importante conhecer o potencial tóxico dessas moléculas, mas também avaliar outras formas de interações biológicas. Estudos recentes em nosso grupo de pesquisa mostraram que células tumorais quando expostas a determinados poluentes orgânicos aumentam sua viabilidade em cultivo. Esse fato levantou a hipótese de que esses poluentes poderiam estar interferindo com o prognóstico do câncer.

Fundamentado nas informações de que a expressão das proteínas de transporte de membrana ABC, poderia ser modulada pela presença de moléculas xenobióticas na célula, levando as células a um estado de menor sensibilidade química, decidimos estudar o fenótipo dessas células após exposição ao BDE-209 e ao TCDD, com base na expressão e atividade das proteínas ABC.

Pretendemos assim, avaliar se os poluentes interferem com esse mecanismo aumentando a malignidade das células e dessa forma alterando negativamente o tratamento quimioterápico. Esse tipo de abordagem é totalmente inovador e se demonstrado abre um imenso campo de pesquisa, podendo inclusive interferir com a mudança de políticas de saúde pública.

4 HIPÓTESE

Os contaminantes ambientais TCDD e BDE-209 aumentam a expressão e/ou atividade de proteínas de resistência a múltiplas drogas, potencializando a resistência das células de melanoma e interferindo, assim, no prognóstico do câncer.

5 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a exposição prévia ao TCDD e BDE-209 modula a expressão e/ou ativação das proteínas transportadoras ABC (*ATP-Binding Cassette*) em células de melanoma murino (*B16F1*).

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Investigar se a exposição aos contaminantes TCDD e BDE-209 interfere com a viabilidade das células *B16F1* após exposição aguda de 24h e crônica de 15 dias;
- II. Avaliar a atividade das proteínas transportadoras ABC nas células *B16F1*, utilizando a Rodamina B e a Calceína AM como substratos após exposição aos contaminantes;
- III. Investigar os níveis de expressão de genes relacionados aos transportadores ABC, MDR e MRP: ABCB1, ABCB5, ABCC1, ABCC2, ABCC4, após exposição aguda (24h) e crônica (15 dias) aos xenobióticos TCDD e BDE-209, nas células *B16F1*.
- IV. Discutir face aos resultados, se os contaminantes TCDD e BDE-209 nas concentrações testadas em células *B16F1*, podem modular a sensibilidade dessas células tornando-as mais resistentes.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 ABORDAGEM EXPERIMENTAL

Esse projeto se inicia a partir de dados obtidos de pesquisas recentes do nosso Grupo de Pesquisa em Toxicologia Celular, *in vitro* e *in vivo* que mostraram um possível papel modulador no mecanismo de resistência a quimioterápicos com a exposição de células à poluentes orgânicos.

Sendo assim, estaremos investigando *in vitro* os parâmetros de citotoxicidade através dos ensaios MTT (metabolismo mitocondrial) e vermelho neutro (integridade do sistema endossoma lisossoma); proliferação/adesão celular pelo ensaio cristal violeta; e a capacidade das células na formação de colônias através do ensaio clonogênico.

Além disso, análise da expressão gênica de alvos moleculares relacionados às proteínas transportadoras ABC (ABCB1; ABCB2; ABCC1; ABCC2; ABCC4), bem como a atividade das proteínas transportadoras ABC, por meio do ensaio MXR utilizando o substrato fluorescente Rodamina B (MDR/MRP) e Calceína AM (MRP). Para isso, as células foram expostas a diferentes concentrações do TCDD e BDE-209 (0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL) pelo período de 24h e 15 dias.

6.2 CULTIVO DAS CÉLULAS DA LINHAGEM B16F1

As células de melanoma murino foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 40µg/mL de Gentamicina, mantidas a 37°C em incubadora com atmosfera umidificada e 5% de CO₂. Foram utilizadas células entre 7 e 12 passagens. As células foram expostas durante dois tempos diferentes de 24 horas e 15 dias. Para os ensaios de 24 horas de exposição, foram plaqueadas 6×10^3 células/poço (de acordo com o ensaio), em microplaca de 96 poços, cada poço com 200 µl de meio DMEM.

Em seguida, após 24 horas para a adesão das células, foi realizada a exposição aos contaminantes BDE-209 ou TCDD, nas concentrações 0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL por 24 horas. Após o tempo de exposição os diferentes ensaios, como descritos a seguir, foram processados. Nos ensaios de 15 dias de exposição foram plaqueadas 1×10^5 em garrafas médias, com 10 mL de meio DMEM, com os contaminantes BDE-209 ou TCDD nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL. As trocas de meio foram realizadas a cada 3 dias, com os devidos contaminantes nas

concentrações estabelecidas, desse modo, refletindo em exposições cumulativas. Foram realizados de 3 à 4 subcultivos durante a exposição de 15 dias. No 15º dia de exposição, as células foram soltas das garrafas com tripsina e plaqueadas 6×10^3 células/poço (de acordo com o ensaio), em microplaca de 96 poços, cada poço com 200µl de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Esperava-se 24 horas para adesão das células na placa de 96 poços e então executava-se o protocolo dos diferentes experimentos. Os experimentos foram realizados no mínimo de triplicatas e três experimentos independentes.

6.3 CONCENTRAÇÕES DE POLUENTES TESTADAS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

A escolha das concentrações foram baseadas em dados encontrados na literatura, onde a concentração de cada um dos poluentes utilizados foi detectada no soro humano nas seguintes concentrações: BDE-209 1,0 nM e TCDD 0,1 nM (ATSDR, 1998 *apud* EGELAND *et al.*, 1994; MAZDAI *et al.*, 2003). Portanto, selecionamos concentrações próximas aos valores reais para ambos os poluentes, possibilitando assim comparar o papel de cada um deles. Essas mesmas concentrações foram utilizadas em estudos prévios no Laboratório de Toxicologia Celular, o que reforçou o uso das mesmas pelos resultados apresentados possibilitando também, a continuidade dos estudos. Concentrações que foram testadas para ambos os poluentes (Tabela 1):

Tabela 1. Concentrações testadas para ambos os poluentes

| Concentrações Utilizadas | [nM] |
|--------------------------|------|
| Concentração I | 0,01 |
| Concentração II | 0,1 |
| Concentração III | 1,0 |

Fonte: A Autora (2019)

As soluções-estoque dos contaminantes foram preparadas em DMSO e mantidas em frascos de vidro âmbar estéreis, a -20°C. A concentração final de DMSO no grupo controle e nos grupos expostos ao TCDD e BDE-209 foi de 0,1%.

Para ambos os tempos de exposição foram mantidos dois grupos controles em paralelo, o grupo controle (células sem exposição) e o controle veículo (DMSO), com a concentração utilizada para solubilizar os contaminantes. A análise da resposta aos contaminantes foi organizada em grupos, conforme a tabela abaixo:

Tabela 2. Organização dos grupos expostos

| | Controle | | Controle DMSO | |
|------------------------------|----------|--------|---------------|--------|
| Concentrações BDE-209 | 0,01 nM | 0,1 nM | 0,01 nM | 1,0 nM |
| Concentrações TCDD | 0,01 nM | 0,1 nM | 0,01 nM | 1,0 nM |

Fonte: A Autora (2018).

6.4 ENSAIO MTT

O MTT é um dos ensaios para avaliar a citotoxicidade, que baseia-se na capacidade de células viáveis reduzirem o MTT (3 - [4,5-dimetil-2-il] -2, brometo de 5-difenil tetrazólio), através das desidrogenases formando cristais de formazan que possuem cor roxa característica ao serem dissolvidos em DMSO, possibilitando quantificação por espectrofotometria (REILLY *et al.*, 1998).

Após o período de incubação e exposição o meio foi retirado e adicionado 200µL de (MTT), incubado por 3 horas a 5% de CO₂ e 37°C. O MTT foi removido dos poços e lavado com PBS, e os cristais intracelulares solubilizados com 100µL DMSO, e então foi realizando a leitura em 550nm (BORENFREUD; BABICH; MARTIN-ALUACIL, 1988; MOSMANN, 1983; POSKUS, 2009).

6.5 VERMELHO NEUTRO (RN)

O ensaio de vermelho neutro avalia a captação e posterior acúmulo do corante nos endossomos e lisossomos. O ensaio baseia-se na ligação do vermelho neutro, um corante supravital fracamente catiônico, à matriz lisossômica de células viáveis após sua incubação com agentes tóxicos (BABICH; BORENFREUND, 1990).

Após o período de exposição aos contaminantes, foi retirado o meio DMEM, e adicionado um total de 200µL de solução de NR (50µg/mL) em cada poço e incubado a 37°C durante 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas com formol 0,5% e cálcio 0,1% em água. Posteriormente foi adicionado uma solução de ácido acético 1%, etanol 50%. As células ficaram em repouso por 15 minutos, na

sequência foi homogeneizado o conteúdo dos poços, aguardado por 5 minutos e em seguida foi realizado a leitura a 540nm em espectrofotômetro (BORENFREUD; BABICH; MARTIN-ALUACIL, 1988; FOTAKIS; TMBRELL, 2006; MACHANA *et al.*, 2011).

6.6 ENSAIO DE CRISTAL VIOLETA

O ensaio do cristal violeta (cloreto de pararosanilina) é um corante básico também conhecido como violeta de Genciana, que cora o núcleo das células, de forma que a taxa de crescimento celular/quantidade de células aderidas é refletida pela determinação colorimétrica das células coradas (GILLIES *et al.*, 1986; VEGA-AVILA e PUGSLEY, 2011).

Após o período de tratamento as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol por 30 minutos em temperatura de - 8°C, coradas com 100µL da solução de cristal violeta (0,25 mg/ml) em água durante 15 minutos a temperatura ambiente, e em seguida lavadas com água destilada. Fez-se a eluição do corante utilizando uma solução de ácido acético 33%, sob agitação constante, por 30 minutos; a leitura foi feita em 570nm em espectrofotômetro.

6.7 ENSAIO CLONOGÊNICO

O ensaio clonogênico é utilizado para a análise da capacidade das células na formação de colônias. Após 15 dias de exposição aos contaminantes nas garrafas de cultivo celular, as células foram soltas e plaqueadas 250 células por poço em placas de 24 poços e incubadas por 7 dias. O meio foi descartado, as células fixadas com metanol 2% em PBS durante 30 min, coradas com cristal violeta 0,5% por 15 min e as colônias contadas em microscópio invertido e fotografadas. Para o cálculo do fator de sobrevivência (FS), considera-se o tamanho e a quantidade de colônias observadas (>50 células); quanto mais colônias e maiores, maior a capacidade de proliferação e crescimento celular (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005).

6.8 DESENHO DOS PRIMERS PARA ANÁLISE DE qPCR

Os primers foram desenhados baseados no próprio mRNA, após download das sequências de mRNA e do gene a ser estudado. Iniciou-se a obtenção dos possíveis primers no programa primer 3 a partir da sequência do mRNA. No programa GeneRunner foi introduzido a sequência do gene e testado a hibridização

dos primers, observando o tamanho do amplicon formado. Realizou-se o mesmo procedimento, observando o amplicon gerado pela sequência de mRNA. Essa etapa tem como objetivo, identificar se há diferenças do amplicon do gene e do mRNA. Essa diferença é necessária para identificar uma possível contaminação de DNA genômico na amostra de cDNA. Após a confirmação de diferenciação do primer (amplicon do cDNA diferente do amplicon do gene), foi realizado comparações dos primers contra o GenBank.

Os primers foram validados por BLASTx e após suas sínteses através de PCR convencional, em que as bandas correspondiam ao tamanho em pares de base de cada amplicon previsto nos testes *in silico*. Por fim, foi realizado o desempenho em reação de qPCR com SYBRgreen. A concentração ideal de 6 picomol de primers e concentração do cDNA (5 μ M) foram utilizadas.

Tabela 3. Nome dos genes com seus respectivos pares de bases de cada amplicon.

| | |
|-------------------------------------|--|
| BETA2MICROBLOBULIN (amplicon 110pb) | F 5' CGAGACATGTGATCAAGCATC 3' R 5' GCTATTTCTTTCTGCGTGAT 3' |
| ABCB1 (amplicon 116pb) | F 5' CATTGCTGGTTTTGATGGTG 3' R 5' CAATTTCAATTCCTGCTGTCTG 3' |
| ABCB5 (amplicon 104pb) | F 5' CTTTATGAATGGAGCCTA 3' R 5' TCACACTGAAGAAAACAGCAAGA 3' |
| ABCC1 (amplicon 103pb) | F 5' GAACCTCCCACACTGAATGG 3' R 5' GGGCTGACAGCAGAGATGAC 3' |
| ABCC2 (amplicon 101pb) | F 5' GCCTCTTTTACTTGGGACC 3' R 5' AGCCTACAGTGCCACACAG 3' |
| ABCC4 (amplicon 117pb) | F 5' GGCTTCAAGGCCTACAAGAA 3' R 5' AAGCCACCAGTCCTGAAGAA 3'. |

Fonte: A Autora (2019).

6.9 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E CONVERSÃO PARA cDNA

A extração do RNA total das amostras foram efetuada através do kit Purelink RNA mini Kit (Applied Biosystems – Thermo Fisher) utilizando protocolo recomendado pelo fabricante. Apresentou RNAtotal de ótima qualidade, confirmado pela quantificação em espectrofotômetro através da razão de absorção A260/A280, na qual, a razão mostrou um valor médio de 1,628, o que justifica o material limpo. Em seguida o material foi convertido em cDNA total utilizando kit Superscript IV

(Applied Biosystems – Thermo Fisher). Os procedimentos moleculares, foram realizados no Laboratório de Patologia da UFPR.

6.10 EXPRESSÃO GÊNICA - qPCR

A análise da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real (qPCR) utilizando como gene endógeno a beta-actina murino como descrito em literatura, estabelecendo assim comparações nos níveis de expressão entre diferentes amostras antes e após a exposição aos contaminantes do trabalho. As reações foram realizadas em termociclador *Step one fast system (Applied Biosystems)*, utilizando o SYBRGreen PCR Master Mix para cada reação. Termociclagem de acordo com o recomendado pelo fabricante para o kit utilizado (40 ciclos – 94°C para desnaturar seguida da temperatura de ligação dos primers a 60°C).

6.11 ATIVIDADE DE TRANSPORTE DE RODAMINA B

O método se baseia no efluxo de rodamina B pelos transportadores do sistema MXR (MDR e MRP), visto que a rodamina atravessa a membrana plasmática entrando na célula de forma passiva, e então é efluxada ativamente pelo sistema de transporte celular. Sendo assim quanto maior a fluorescência, maior a atividade desses transportadores, enquanto, o inverso representa uma inibição do sistema.

Após a exposição das células, o meio de cultura presente nos poços foi substituído por 200 µl de solução contendo 1 µM de rodamina B em PBS para determinação das atividades da glicoproteína-P (P-gp). Após período de 30 min de incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS para garantir que resquícios de corante sejam removidos. Em seguida, foi adicionado 200 µl de PBS em cada poço e incubado por 10 minutos.

Após o período de incubação foi transferido o sobrenadante para uma microplaca preta e realizado a leitura no espectrofotômetro no tempo 0 e 10 minutos. Mensura-se a intensidade de fluorescência em espectrofluorímetro (λ de excitação = 485 nm; λ de emissão = 530 nm). Os procedimentos foram realizados evitando a exposição à luz para evitar perda de fluorescência.

Para confirmar a atividade da P-gp foi adicionado o verapamil a 60 µM durante 24h antes da incubação com rodamina B, um bloqueador do transportador, ou um competidor de substrato, para o controle positivo. (Cornwall et al., 1995;

Pessatti et al., 2002; Liebel et al., 2015). O tempo de incubação foi determinado a partir de testes realizados, e escolheu-se o tempo de 10 minutos, que apresentou maior efluxo (Gráfico 1).

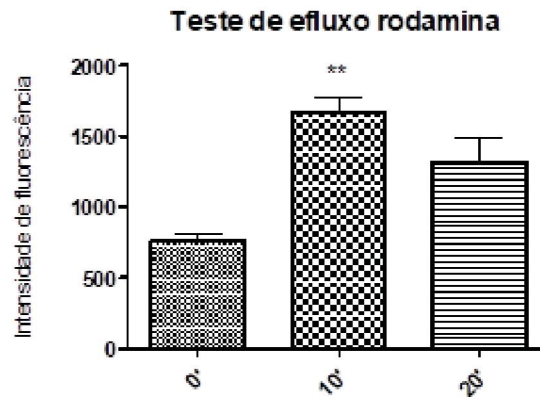


Gráfico 1. Teste da intensidade de fluorescência de Rodamina B, tempo 0, 10 e 20 minutos. * $p < 0.01$.

6.12 ATIVIDADE DE TRANSPORTE DE CALCEÍNA AM

Os ensaios foram realizados segundo Luckenbach (2008) com modificações. A calceína-AM é um substrato não fluorescente tanto da P-gp quanto da MRP. Uma vez no interior da célula, a calceína-AM é hidrolizada por esterases citosólicas para a forma química fluorescente, a calceína. A forma fluorescente é transportada somente pela MRP. A alta fluorescência extra-celular da calceína representa alta atividade das proteínas transportadoras.

Após a exposição aos contaminantes, as células foram incubadas com calceína AM a $0,5\mu\text{M}$, por uma hora. Em seguida as células foram lavadas com PBS e na sequência adicionado $200\mu\text{l}$ de PBS, e transferiu-se o sobrenadante para uma microplaca preta de 96 poços. Procedeu-se então a medida da intensidade de fluorescência no tempo zero e 10 minutos (λ de excitação = 488 nm; λ de emissão = 530 nm). Para confirmar a atividade da MRP foi adicionado a indometacina a $200\mu\text{M}$ durante uma hora antes da incubação com calceína AM, na qual, manteve-se após a incubação com calceína AM, usado como controle positivo.

6.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os ensaios *in vitro*, foram realizados três experimentos independentes para cada ensaio, com pelo menos três replicatas por grupo. Os dados representam as médias das pseudoréplicas de cada grupo experimental, num total de 3 valores

por grupo experimental (equivalente aos 3 experimentos independentes) foram analisados através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguidos pelo pós-teste de Dunns, quando aplicável para comparação dos grupos expostos *versus* controle (veículo DMSO).

A análise por qPCR apresenta seu resultado de comparação dos níveis de mRNA dos alvos por $\Delta\Delta CT$, em relação ao controle endógeno, seguido da análise pelo teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunns* quando aplicável, para comparação dos níveis de mRNA dos grupos expostos *versus* controle (veículo DMSO). Nos gráficos os controles são equivalentes ao valor de 1, sendo que, são observadas as diferenças relativas em relação ao controle, porém, no texto foram mencionados os valores em porcentagem, para facilitar o entendimento do leitor.

7 RESULTADOS

7.1 ENSAIO MTT

Para esse ensaio, a concentração de DMSO, utilizada para diluir os contaminantes na exposição de 24 horas e de 15 dias, não apresentou alterações significativas, quando comparado com o grupo controle sem o veículo DMSO (Gráfico 2 A-B).

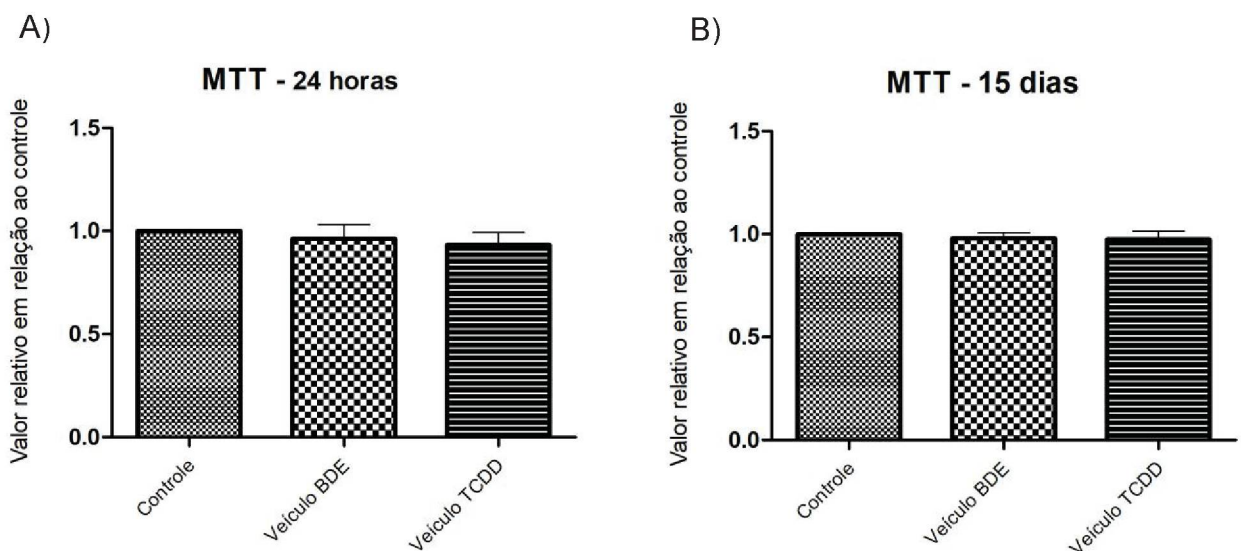


Gráfico 2. Valor relativo em relação ao controle da concentração utilizada do solvente DMSO, para diluir os contaminantes BDE-209-209 e TCDD. $p < 0,05$.

O mesmo foi observado quando as células foram expostas aos xenobióticos BDE-209 e TCDD tanto após 24 horas (Gráfico 3 A-B) como em 15 dias (Gráfico 3 C-D), visto que não houve diferenças significativas na capacidade das células converterem MTT em cristais de formazan quando comparado com o grupo controle.

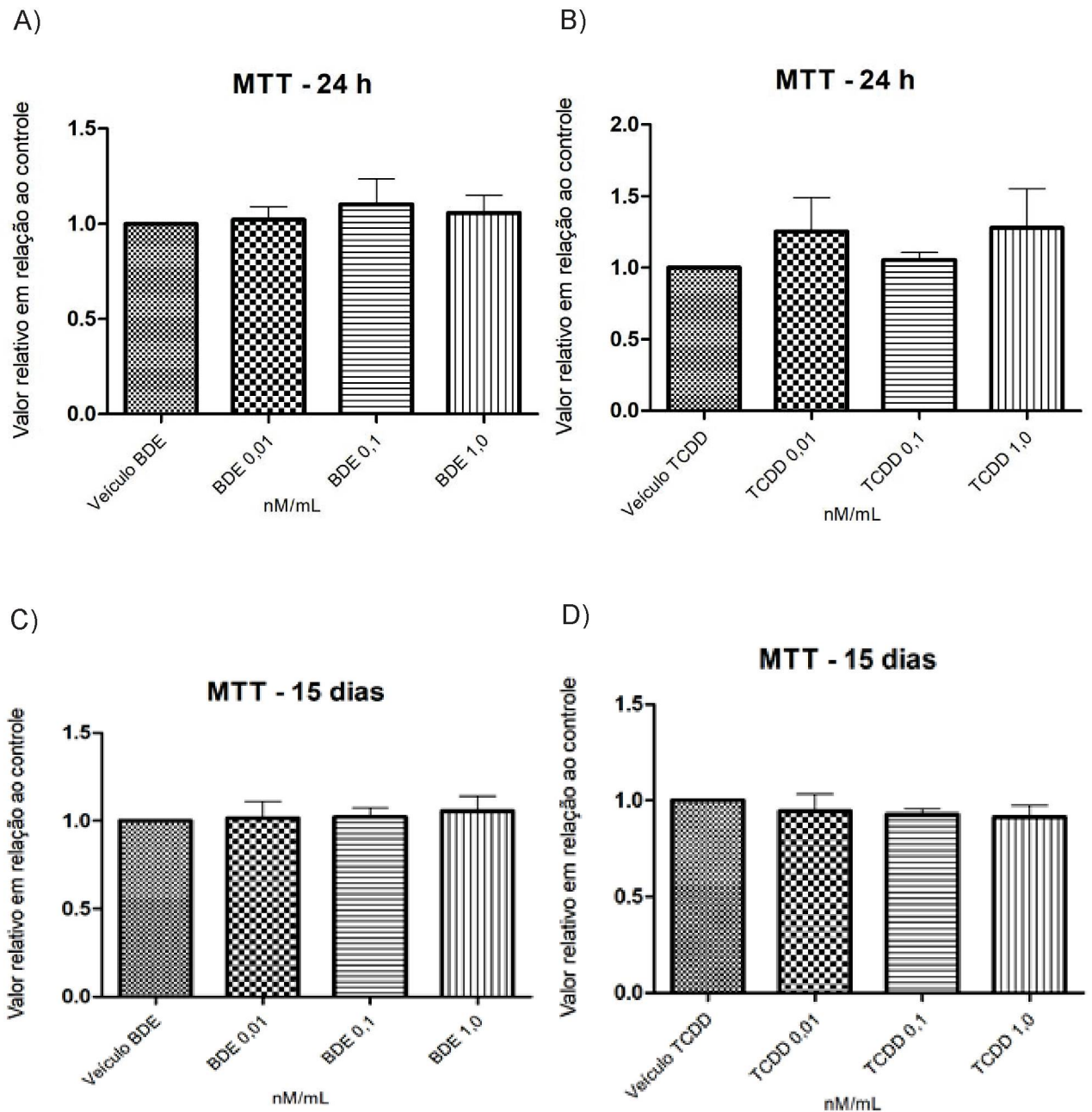


Gráfico 3. Conversão do MTT em formazan em células B16F1 após 24 e 15 dias a diferentes concentrações de BDE-209-209 E TCDD (0,01-1,0 nM/mL). Média de três experimentos independentes com seis replicatas por grupo. $p < 0,05$.

7.2 ENSAIO DO VERMELHO NEUTRO

A concentração de DMSO, utilizada para diluir os contaminantes na exposição aguda de 24 horas e crônica de 15 dias, não apresentou alterações significativas, quando comparado com o grupo controle (Gráfico 4 A-B).

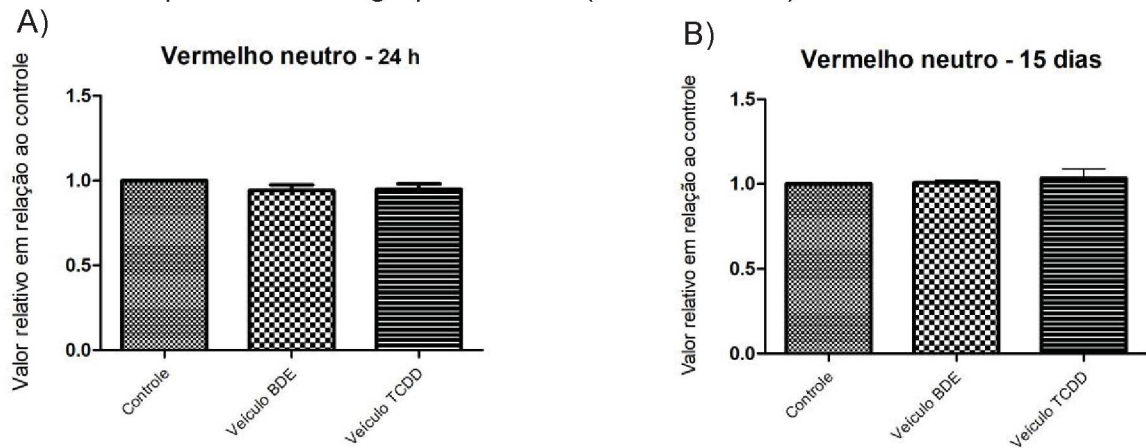


Gráfico 4. Valor relativo em relação ao controle da concentração utilizada do solvente DMSO, para diluir os contaminantes BDE-209-209 e TCDD.

No ensaio do vermelho neutro após a exposição por 24 horas, os resultados mostraram um aumento significativo na atividade do sistema endossoma lisossoma, caracterizado pela retenção do corante, na concentração de BDE-209 0,01 nM/mL (~20%) (Gráfico 5 A) e nas concentrações do TCDD 0,1 e 1,0 nM/mL (~22%) (Gráfico 5 B). No entanto, para a exposição crônica de 15 dias houve uma redução da retenção do corante pelo sistema após as exposições ao BDE-209 1,0 (~13%) (Gráfico 6 A), enquanto para as concentrações do TCDD, não foram observadas alterações da retenção do corante vermelho em relação ao controle (Gráfico 6 B).

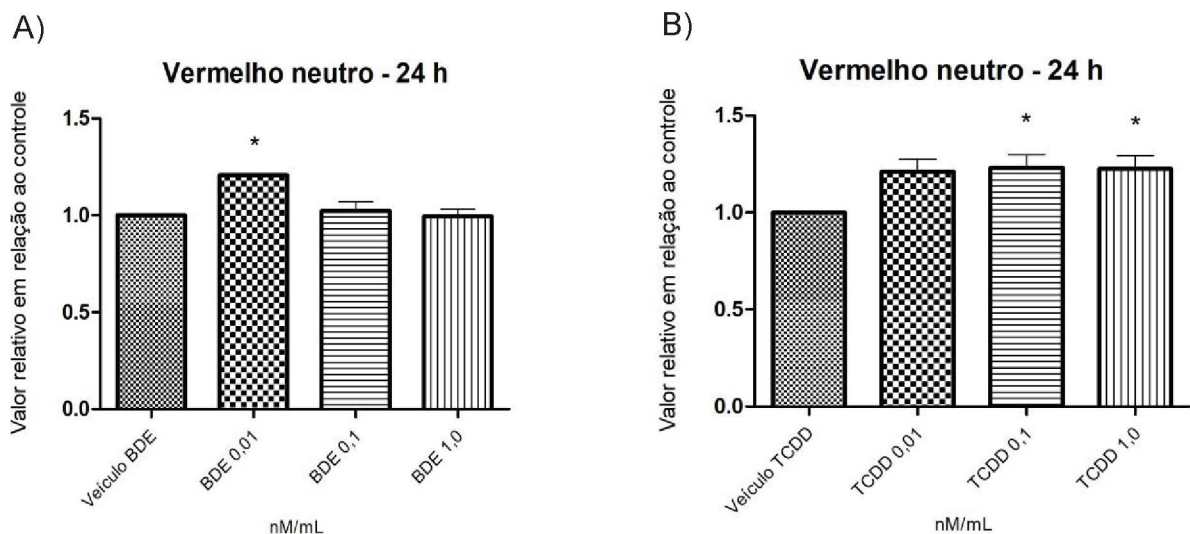


Gráfico 5. Acúmulo do corante vermelho neutro pelo sistema endolisossomal em células B16F1 após 24 de exposição em diferentes concentrações de BDE-209-209 E TCDD (0,01-1,0 nM/mL). Média de três experimentos independentes com seis replicatas por grupo. * $p < 0,1$.

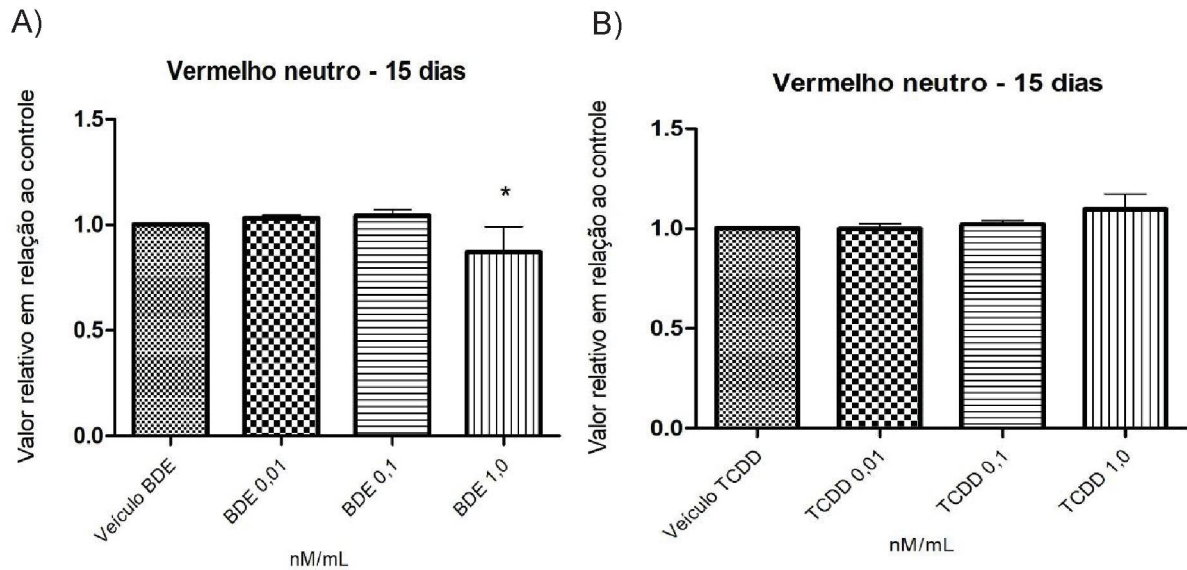


Gráfico 6. Acúmulo do corante vermelho neutro pelo sistema endolisossomal em células B16F1 após 15 dias de exposição aos contaminantes BDE-209-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01-1,0 nM/mL). Média de três experimentos independentes com seis replicatas por grupo. * $p < 0,1$.

7.3 ENSAIO DE CRISTAL VIOLETA

A concentração de DMSO, utilizada para diluir os contaminantes na exposição aguda de 24 horas (Gráfico 7 A) e crônica de 15 dias (Gráfico 7 B), não apresentou alterações significativas, quando comparado com o grupo controle.

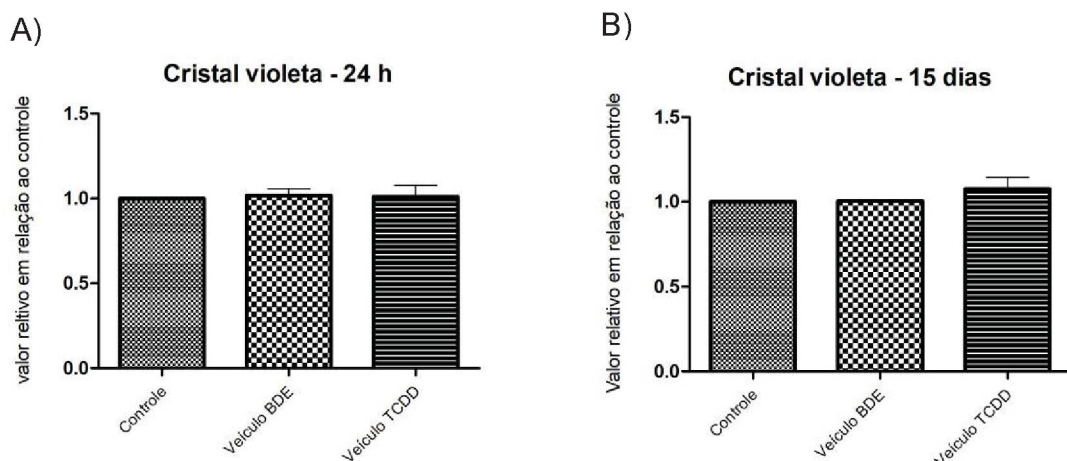


Gráfico 7. Valor relativo em relação ao controle da concentração utilizada do solvente DMSO, para diluir os contaminantes BDE-209-209 e TCDD.

Através do ensaio de cristal violeta, não foram identificadas alterações na proliferação e/ou adesão celular em células expostas por 24 horas às diferentes concentrações de BDE-209 (Gráfico 8 A), no entanto, quando expostas às diferentes concentrações de TCDD foi observado um aumento significativo na proliferação/adesão celular (~23%) para todas as concentrações testadas (Gráfico 8 B). Contrário ao observado para os experimentos agudos, nos ensaios de 15 dias, foi observado nas células expostas à concentração 0,01 de BDE-209 um aumento dos níveis de proliferação/adesão celular em ~10% (Gráfico 8 C), enquanto houve uma redução desses mesmos níveis nas células expostas à concentração de TCDD 0,1 em ~11% (Gráfico 8 D).

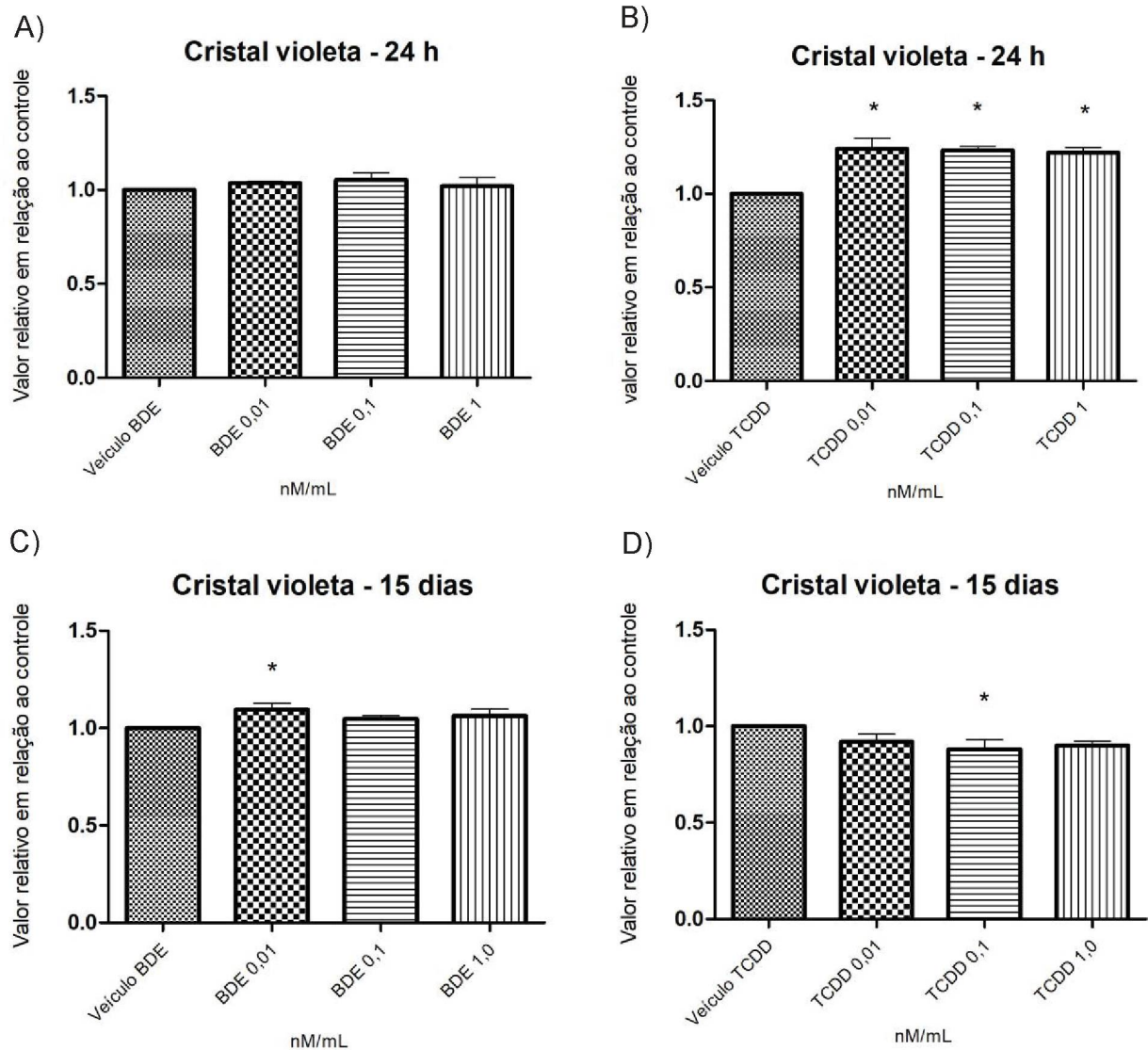


Gráfico 8. Proliferação celular após 24 e 15 dias de exposição a diferentes concentrações de BDE-209-209 e TCDD. Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao grupo controle $p < 0,05$ para TCDD na concentração de 0,1; e (*) para a concentração de TCDD 0,01 e 1,0 $p < 0,1$. Para o cristal violeta de 15 dias de exposição $p < 0,05$. Três experimentos independentes.

7.4 ENSAIO CLONOGÊNICO

O ensaio clonogênico possibilita avaliar a capacidade de formação de colônias e no presente estudo foi realizado após a exposição de 15 dias aos contaminantes. Em relação ao espaço ocupado pelas células, não foi observada diferença estatística, quando comparado as diferentes concentrações de BDE-209 e TCDD com o controle do veículo. No entanto, é possível verificar na imagem (Figura 5), a formação de colônias nos respectivos grupos controles: (A) Controle; (B) Veículo BDE; (C) Veículo TCDD. Enquanto apresenta a formação de colônias menores das células comparativamente aos grupos controles, encontrada nas placas contendo as diferentes concentrações testadas de ambos os poluentes (Figuras 5 D-I).

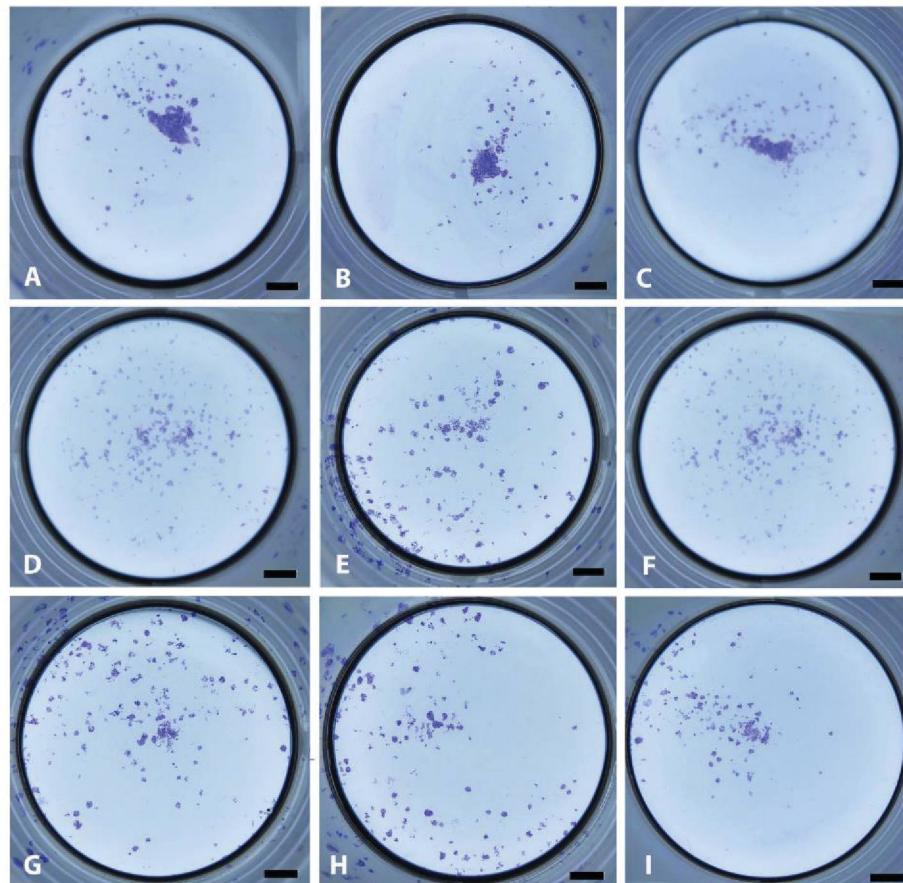


Figura 5. Imagens do ensaio clonogênico, para a análise de formação de colônias. (A) Controle; (B) Veículo BDE; (C) Veículo TCDD; (D) 0,01 nM de BDE-209 (E) 0,1 nM de BDE-209; (F) 1,0 nM de BDE-209; (G) 0,01 nM de TCDD; (H) 0,1 nM de TCDD; (I) 1,0 nM de TCDD (escala = 200µm).

7.5 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA – qPCR

Nos resultados de expressão gênica, foram analisados os genes: ABCB1, ABCB5, ABCC1, ABCC2, ABCC4, alvos moleculares relacionados às proteínas da superfamília de transportadores ABC, da subfamília MDR e MRP, responsáveis pelo efluxo de drogas e resistência a múltiplos fármacos.

7.5.1 Gene ABCB1

Para a exposição de 24 horas ao contaminante BDE-209, a expressão gênica de ABCB1(MDR1), apresentou um aumento significativo dos níveis de expressão gênica na concentração de 1,0 nM em relação ao veículo DMSO (~ 22%) (Gráfico 9 A). Para a exposição com TCDD, não foram observadas mudanças significativas na expressão desse gene (Gráfico 9 B).

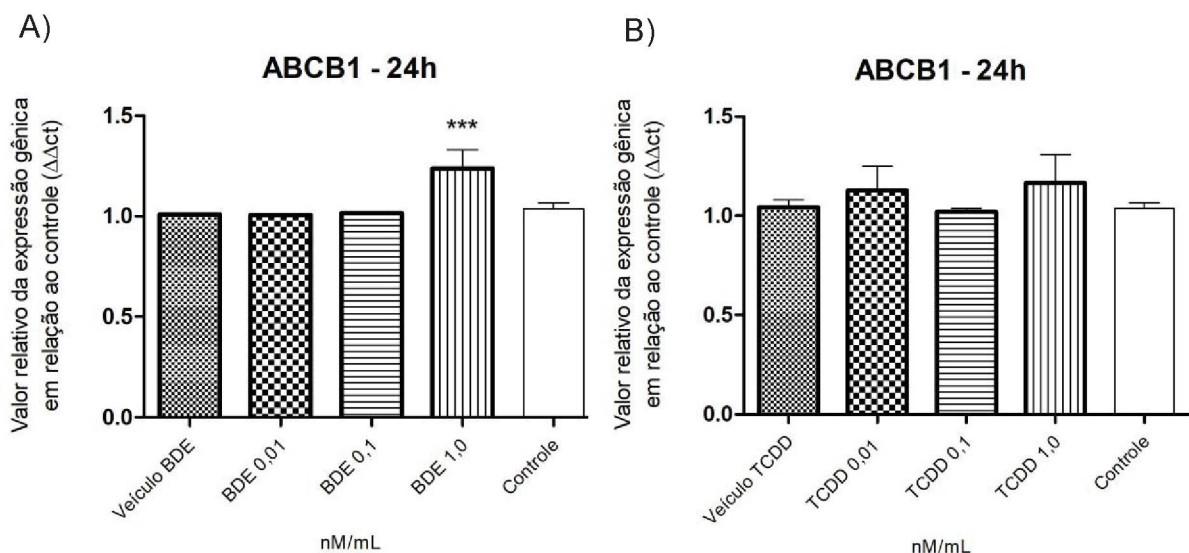


Gráfico 9. Níveis de expressão dos genes ABCB1 em células *B16F1* após exposição de 24h ao BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL). Asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle veículo; Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; *** $p < 0,001$. Três experimentos independentes.

Quando as células foram expostas por 15 dias ao contaminante BDE-209, observou-se uma diminuição nos níveis de expressão gênica de ABCB1 (MDR1), na concentração de 1,0nM em relação ao controle (veículo BDE) (Gráfico 10 A). Na exposição ao TCDD também foi observado uma diminuição na expressão, mas, na menor concentração (0,01nM) em relação ao controle (veículo TCDD) (Gráfico 10 B).

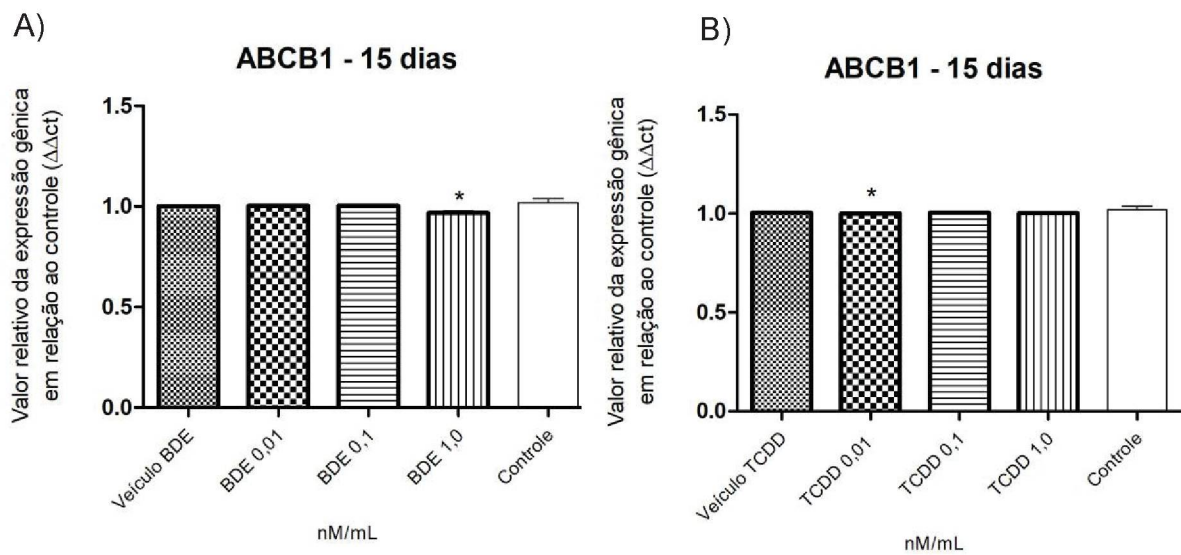


Gráfico 10. Níveis de expressão gênica de ABCB1, em células *B16F1* após exposição de 15 dias ao BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL) em comparação com o controle veículo (DMSO); Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; * $p < 0,05$. Três experimentos independentes.

7.5.2 Gene ABCB5

Após exposição de 24 horas ao contaminante BDE-209, a expressão gênica de ABCB5 (MDR5), não apresentou mudanças significativas nas diferentes concentrações em relação ao veículo BDE, porém, houve um aumento dos níveis de expressão comparando o veículo BDE com o controle (sem exposição) (Gráfico 11 A). No entanto, quando as células foram expostas ao TCDD foi observado um aumento dos níveis de expressão do gene ABCB5 para a menor e maior concentração de 0,01nM (~37%) e 1,0nM (~48%) em relação ao controle (veículo DMSO). Também foi observada diferença significativa entre as concentrações de 0,1 e 1,0nM de TCDD (~48%) (Gráfico 11 B).

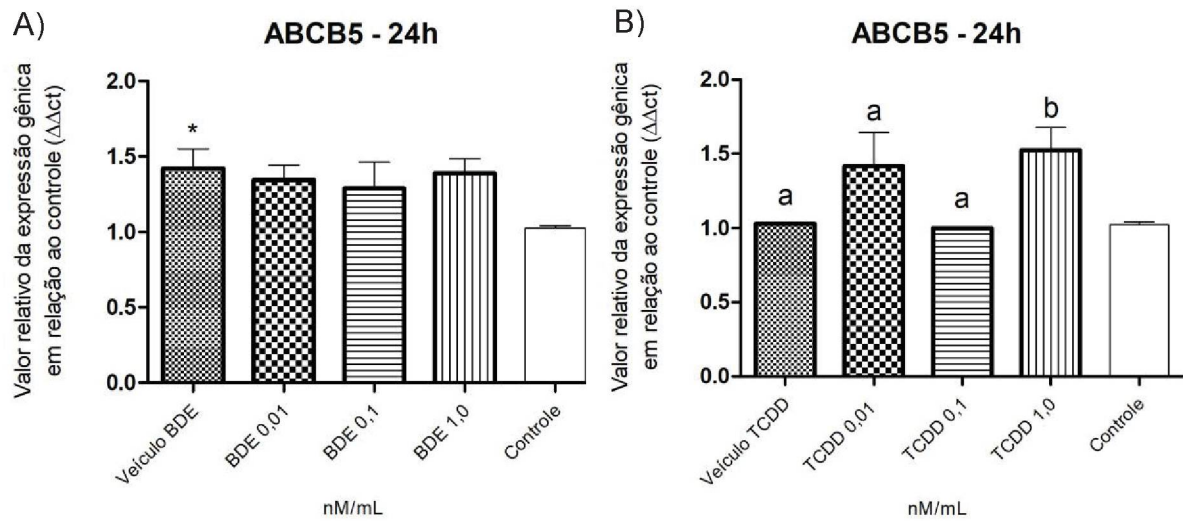


Gráfico 11. Expressão gênica de ABCB5 em células *B16F1*, após exposição de 24 dias aos contaminantes BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL) em relação ao controle veículo; Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; $p < 0,05$; 0,1 nM de TCDD $p < 0,01$; A letra “b” representa a diferença significativa entre as concentrações 0,1 e 1,0nM de TCDD. Três experimentos independentes.

Para a exposição de 15 dias ao contaminante BDE-209, as células apresentaram um aumento nos níveis de expressão gênica de ABCB5 (MDR5), na concentração de 0,01 e 1,0nM em relação ao controle (veículo BDE) (Gráfico 12 A). No entanto, com a exposição ao TCDD à concentração de 1,0nM foi observada uma redução significativa na expressão do gene ABCB5, em relação ao controle (veículo TCDD) (Gráfico 12 B).

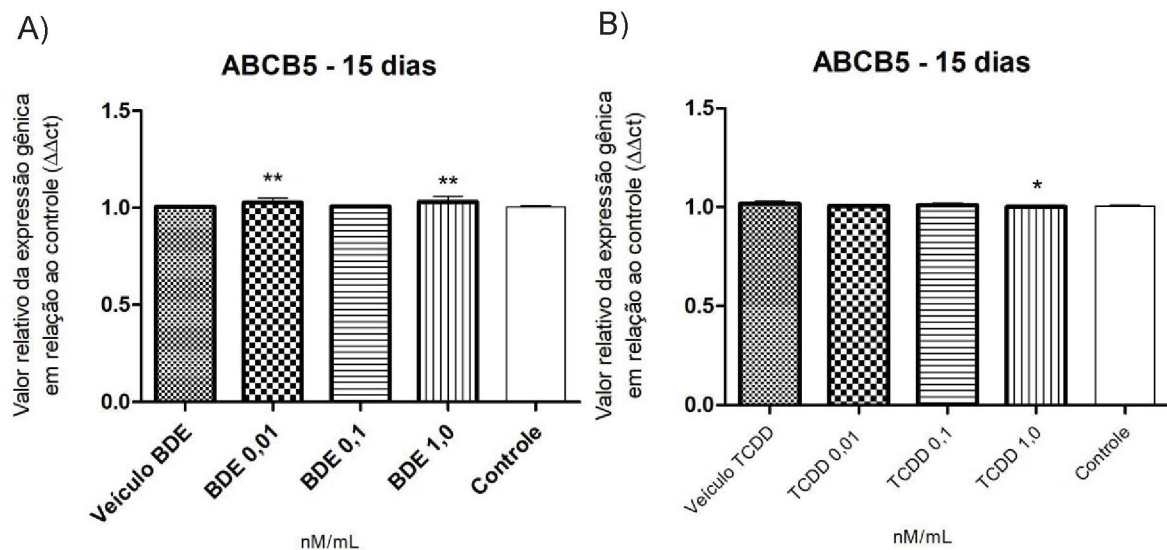


Gráfico 12. Níveis de expressão gênica de ABCB5, em células *B16F1* após exposição de 15 dias ao BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL) em relação ao controle

veículo; Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Três experimentos independentes.

7.5.3 Gene ABCC1

Com a exposição de 24 horas ao xenobiótico BDE-209, foi observado um aumento na expressão do gene ABCC1 entre os grupos veículo e controle, enquanto as células expostas ao BDE-209 1,0nM mostrou um aumento em àquelas expostas a 0,1nM (~10%) (Gráfico 13 A). Com a exposição ao TCDD também por 24 horas, observou-se um aumento da expressão do gene ABCC1 na concentração de 0,1nM (20%) em relação ao grupo controle veículo, bem como uma diferença significativa entre as concentrações de 0,1 e 1,0nM com maior expressão para TCDD 0,1nM (~20%) e entre o grupo veículo e o grupo controle (Gráfico 13 B).

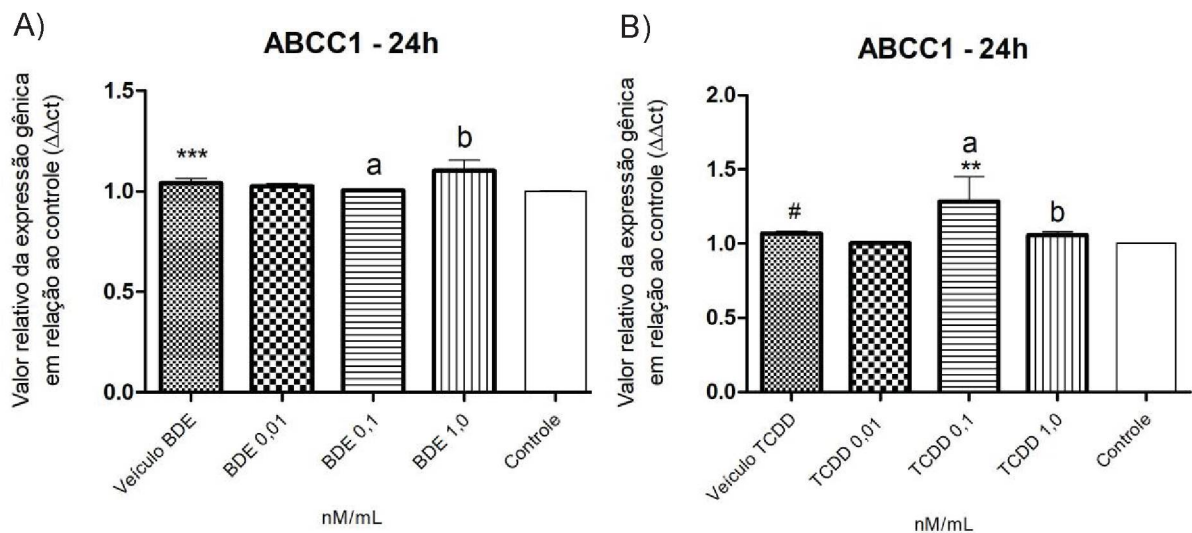


Gráfico 13. Expressão gênica do gene ABCC1 em células B16F1, após exposição de 24h com os contaminantes BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01; 1,1 e 1,0 nM/mL) em relação ao controle veículo. Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; “a” e “b” representam diferenças entre as concentrações; “#” representa a diferença entre o controle e o veículo TCDD $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Três experimentos independentes.

Diferente do observado para 24 horas de exposição, o gene ABCC1 (MRP1) após exposição de 15 dias ao BDE-209 nas diferentes concentrações testadas, apresentou aumento significativo da expressão do gene em relação ao grupo veículo (Gráfico 14 A). O mesmo foi observado quando as células foram expostas ao TCDD, apresentando aumento nos níveis de expressão do gene ABCC1 para todas as concentrações testadas se comparado ao controle (veículo TCDD) (Gráfico 14 B).

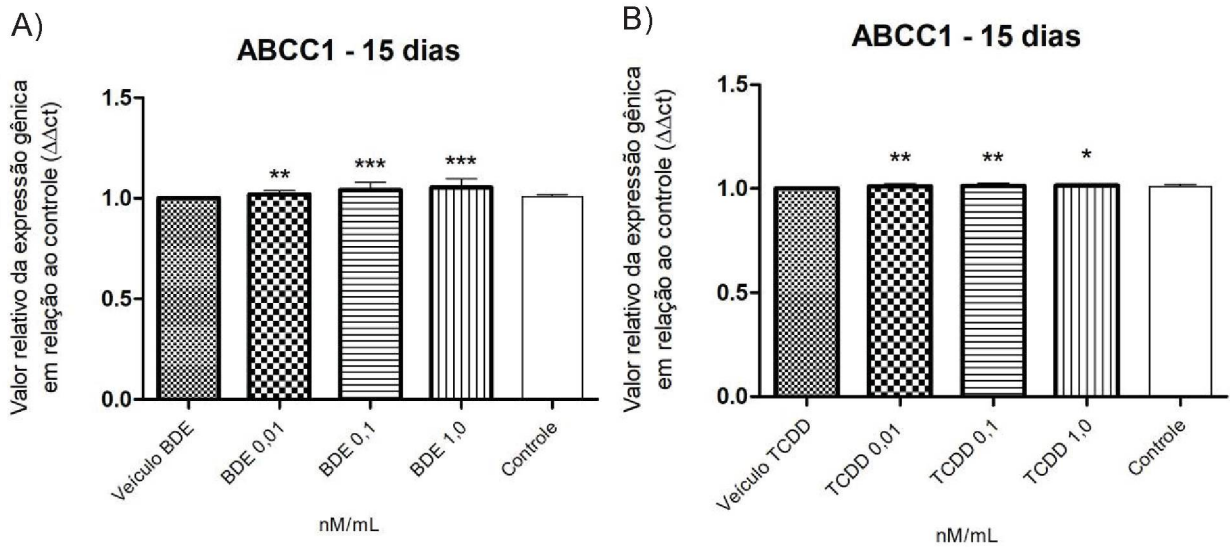


Gráfico 14. Níveis de expressão gênica de ABCC1, em células *B16F1* após exposição de 15 dias ao BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL) em relação ao controle veículo; Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Três experimentos independentes.

7.5.4 Gene ABCC2

A expressão do gene ABCC2 (MRP2), após exposição de 24 horas ao BDE-209 nas diferentes concentrações testadas, apresentou aumento nas células expostas à concentração de 1,0nM em relação ao veículo BDE (~27%). Também foi observado um aumento dos níveis de expressão gênica na maior concentração (1,0nM) em relação às demais concentrações de BDE-209 (~27%) (Gráfico 15 A). No entanto, para a exposição ao TCDD, foi observada um aumento significativo nos níveis de expressão do gene ABCC2 na concentração de 1,0nM, apenas quando comparado com a menor concentração testada (0,01nM) (~15%) (Gráfico 15 B).

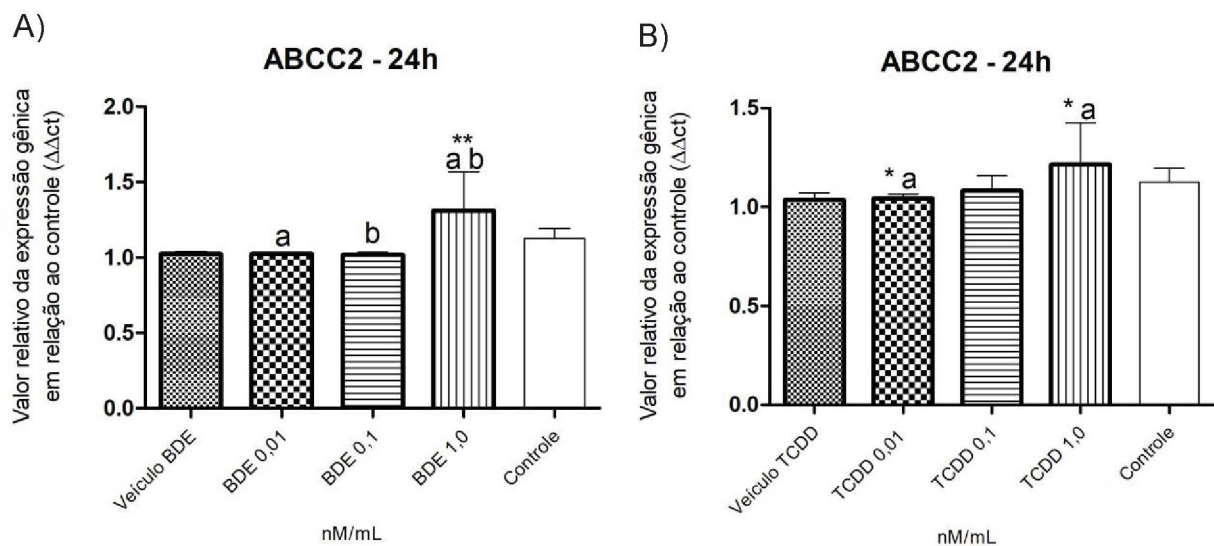


Gráfico 15. Expressão gênica do alvo ABCC2 em células B16F1, após exposição de 24h com os contaminantes BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01; 1,1 e 1,0 nM/mL). (a) $p < 0,001$; (b) e (**) $p < 0,01$; (*a) $p < 0,05$. Três experimentos independentes.

Diferentemente do observado para 24 horas de exposição, o gene ABCC2 (MRP2) mostrou uma diminuição na concentração teste de 0,1nM após a exposição de 15 dias ao BDE-209 (Figura 16 A); enquanto as células expostas ao TCDD, nas mesmas condições, não apresentou diferenças entre os grupos (Figura 16 B).

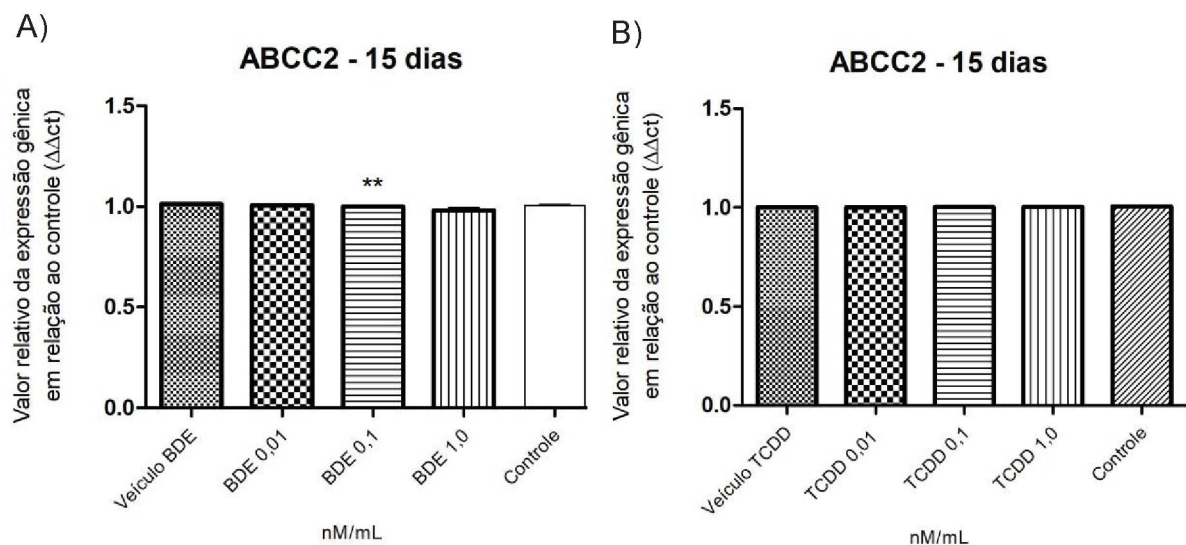


Figura 16. Níveis da expressão gênica de ABCC2, após exposição de 15 dias com os contaminantes BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01-1,0 nM/mL) em relação ao controle veículo. Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; ** $p < 0,01$.

7.5.5 Gene ABCC4

Quando observada a expressão do gene ABCC4, para as células expostas por 24 horas aos contaminantes BDE-209 e TCDD, foram observadas mudanças significativas na expressão do gene. Neste caso a expressão do aumentou na maior concentração (1,0nM) (~44%) de BDE-209 em relação ao grupo veículo, bem como para o grupo de células expostas ao TCDD também na maior concentração (~33%) nas mesmas condições (Gráfico 17 A-B).

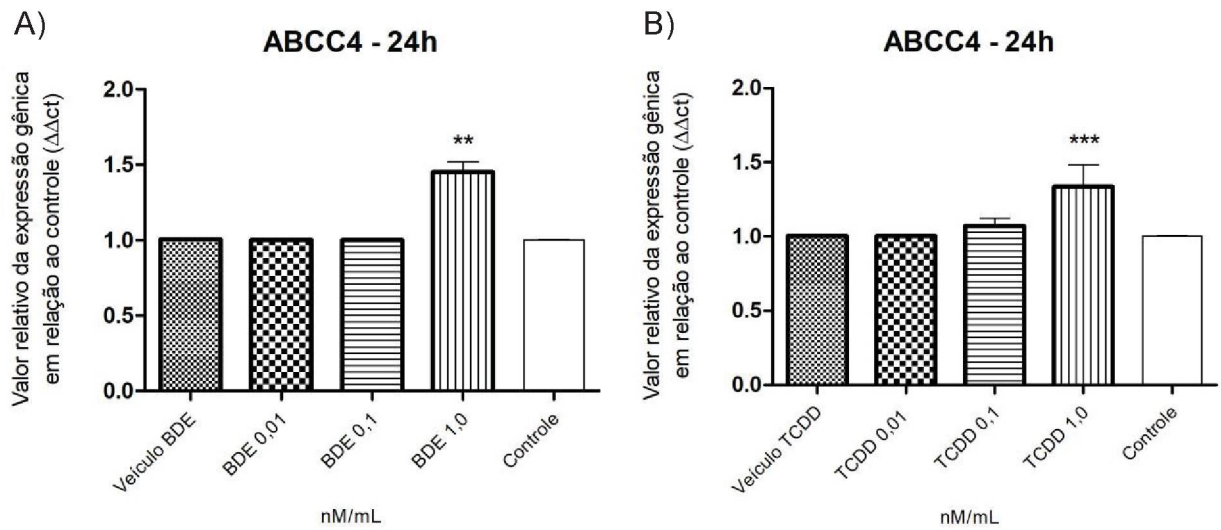


Gráfico 17. Expressão gênica do alvo molecular ABCC4, após exposição de 24h com os contaminantes BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01-1,0 nM/mL) em relação ao controle veículo; Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

Os resultados de expressão do gene ABCC4 após exposição de 15 dias aos contaminantes BDE-209 e TCDD foram também observadas mudanças significativas na expressão gênica. No entanto, diferente do observado em 24 horas de exposição o aumento na expressão foi após à menor exposição (0,01nM) para o BDE-209 (Gráfico 18 A), enquanto uma diminuição da expressão na mesma concentração foi observada para as células expostas ao TCDD (Gráfico 18 B).

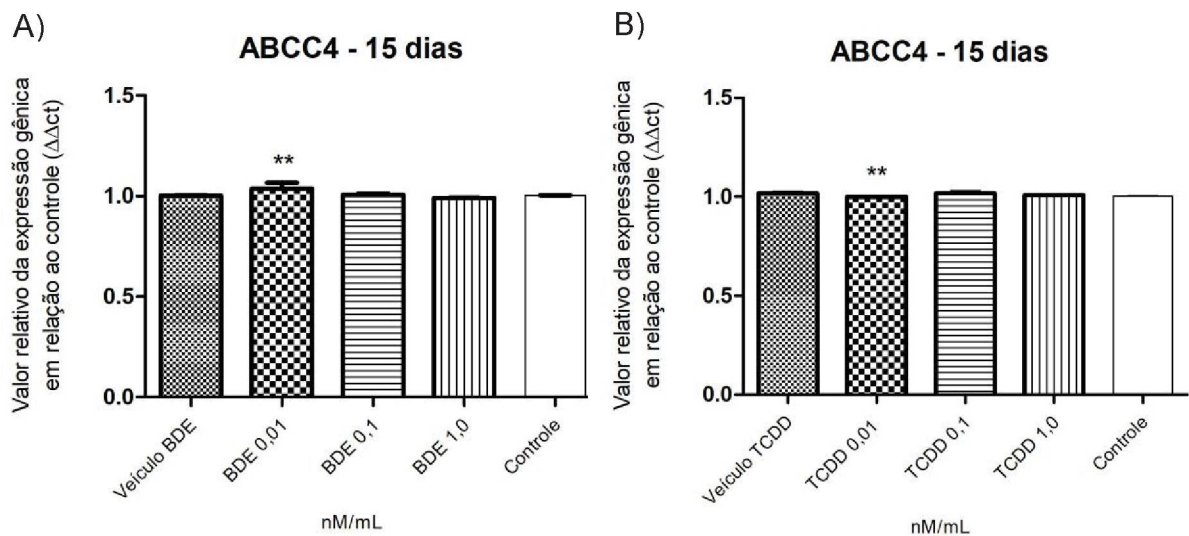


Gráfico 18. Níveis da expressão gênica de ABCC4, após exposição de 15 dias com os contaminantes BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01-1,0 nM/mL) em relação ao controle veículo. Controle: níveis da expressão gênica das células sem exposição; ** $p < 0,01$.

7.1 ATIVIDADE DE TRANSPORTE DE RODAMINA B

Para o teste do controle positivo, para verificar o funcionamento das bombas de efluxo (proteínas transportadoras ABC) foi utilizado o verapamil, para inibição da atividade das proteínas PGP. Quando utilizado o substrato rodamina B, houve apenas alterações significativas quando comparados os grupos experimentais e controle para as exposições de 15 dias. Nesse caso ocorreu um aumento significativo do efluxo dos contaminantes quando as células foram expostas ao verapamil mais o veículo DMSO, tanto para BDE-209, quanto para TCDD. Dessa forma, os resultados mostraram a necessidade de testes de outras concentrações para uma possível inibição do mecanismo de efluxo, porém, não haverá um bloqueio total, pois, existem as outras diferentes proteínas de efluxo, na qual o verapamil não tem papel inibidor (Gráfico 19).

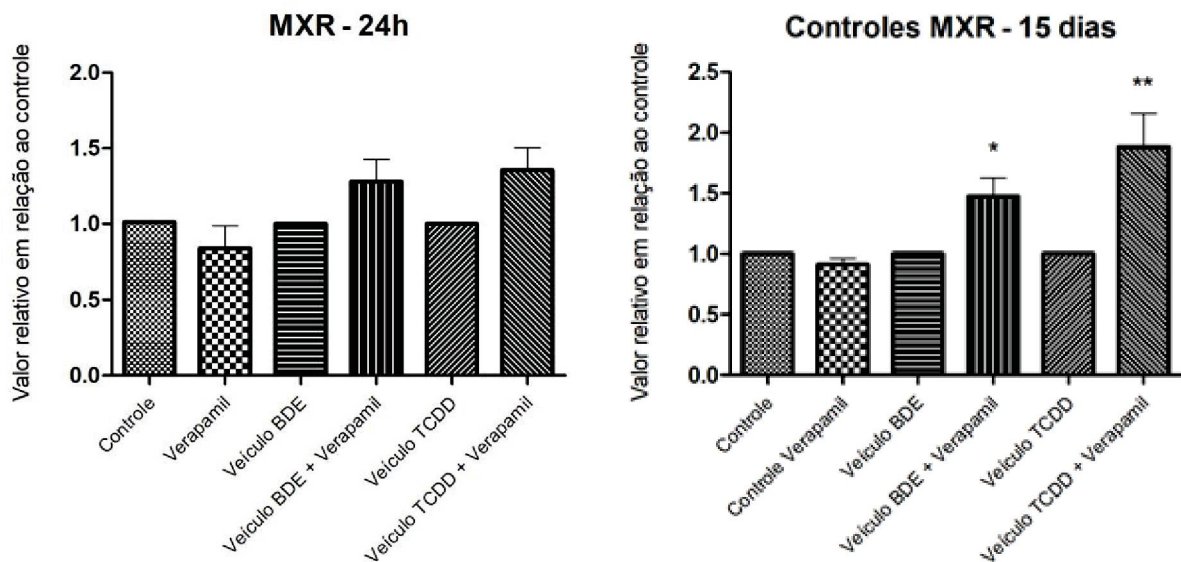


Gráfico 19. Valor relativo em relação ao controle e verapamil; veículo BDE-209 e veículo BDE-209 + verapamil; veículo TCDD e veículo TCDD + verapamil. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Após a exposição por 24 horas aos contaminantes não foi observada alterações significativas do efluxo de rodamina B (Gráfico 20 A-B). No entanto, quando as células foram expostas pelo período de 15 dias a atividade das proteínas MDR/MRP aumentou em relação ao controle somente na maior concentração de BDE-209 (~30%) (Gráfico 20 C). Porém, não apresentou alterações significativas quando expostas ao TCDD (Gráfico 20 D).

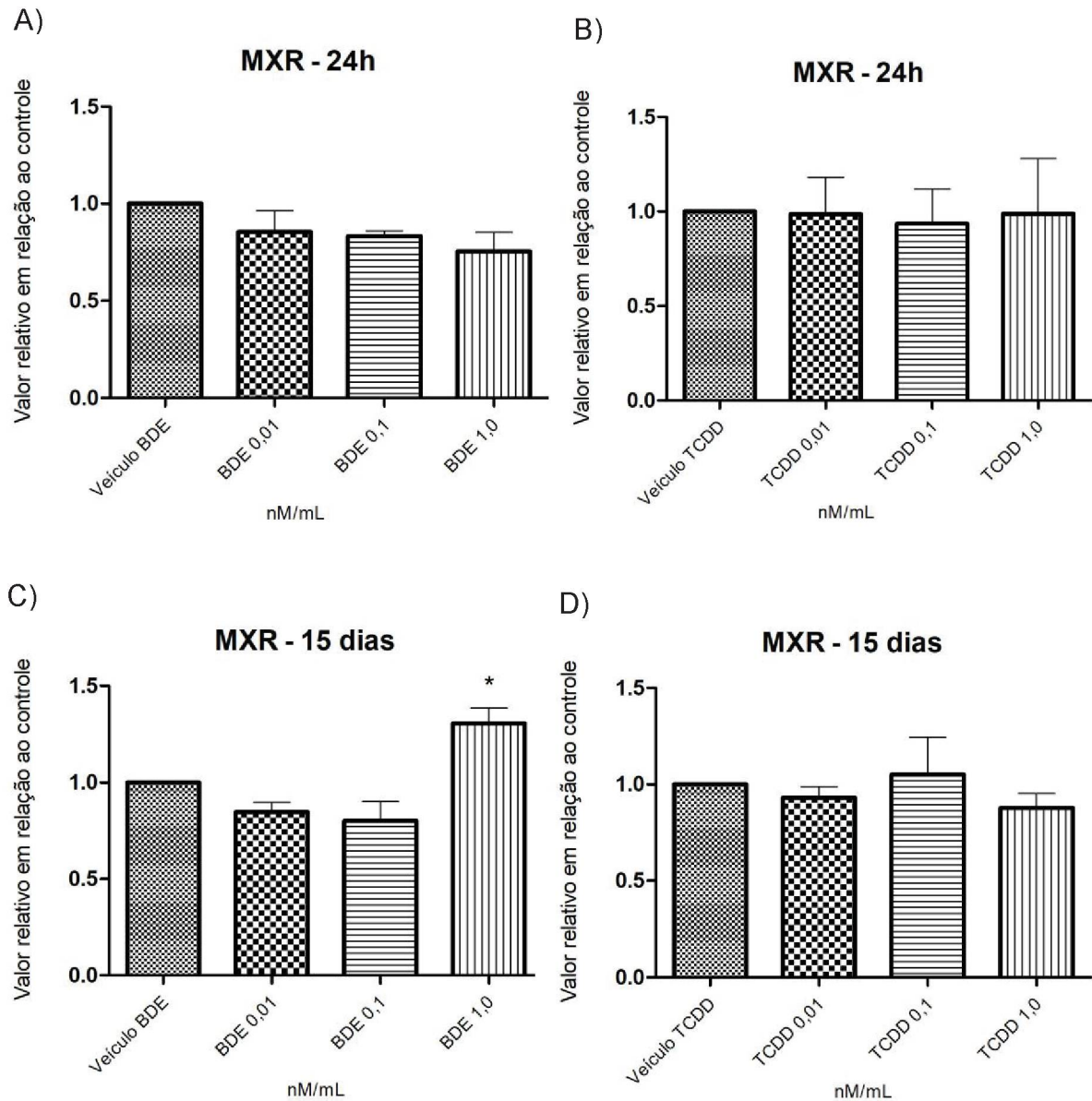


Gráfico 20. Efluxo de rodamina após 24 horas e 15 horas de exposição aos contaminantes BDE-209 e TCDD em diferentes concentrações (0,01-1,0 nM/mL) em relação ao controle veículo. *p < 0,05.

7.2 ATIVIDADE DE TRANSPORTE DE CALCEÍNA AM

Para o teste do controle positivo, para verificar o funcionamento da atividade das proteínas MRP, foi utilizado a indometacina que apresentou uma redução no efluxo de calceína em relação ao grupo sem o inibidor indometacina (~30%) (Gráfico 21).

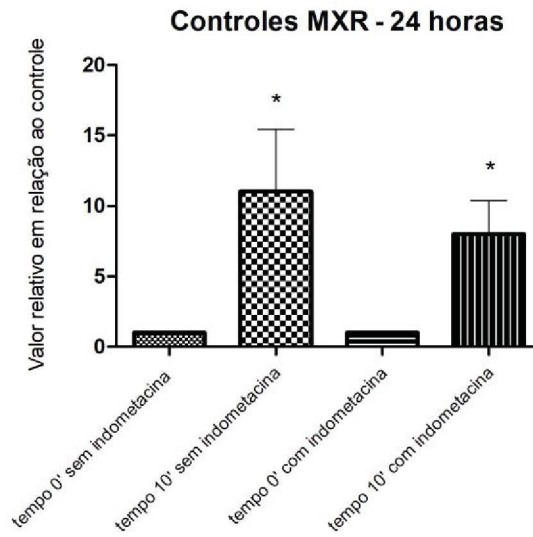


Gráfico 21. Valor relativo entre o tempo 0' sem indometacina com o tempo 10' sem indometacina; valor relativo do tempo 0 com indometacina e tempo 10' com indometacina. * $p < 0,1$.

No entanto, após 24h de exposição foi observada uma redução do efluxo de calceína pelas proteínas MRP, quando as células foram expostas na maior concentração de BDE-209 em relação ao controle (~29%) (Gráfico 22 A). O mesmo não foi observado para as células expostas ao TCDD (Gráfico 22 B).

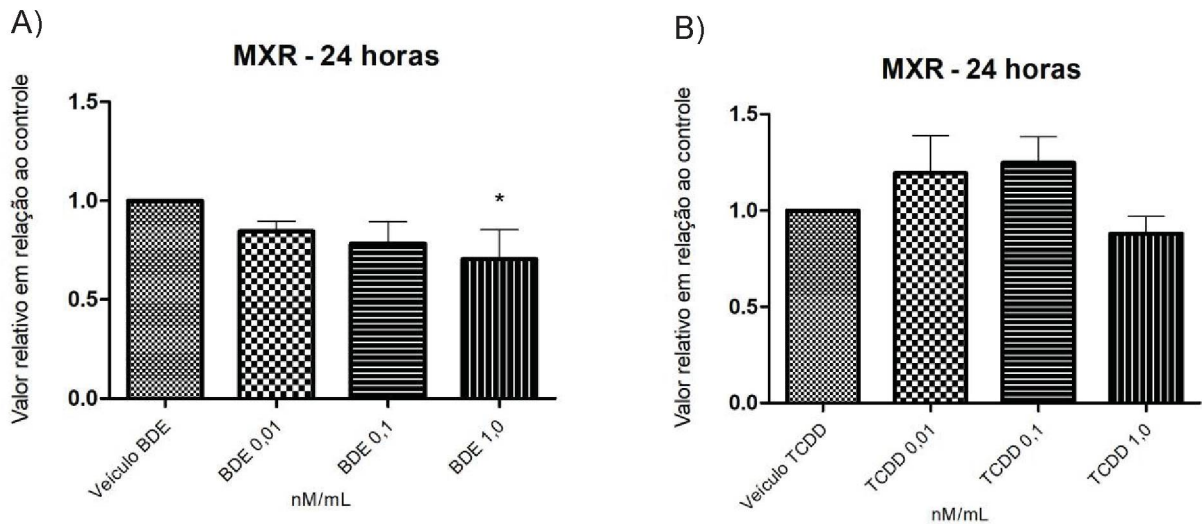


Gráfico 22. Atividade de proteínas MRP: intensidade da fluorescência dos grupos expostos a BDE-209 e TCDD por 24 horas em relação ao controle. * $p < 0,1$.

7.3 COMPARAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO E ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS ABC: MDR (PGP) X MRP

Para os resultados de expressão gênica dos alvos moleculares relacionados ao efluxo de drogas, observamos na exposição aguda (24h) ao BDE-209, um aumento dos níveis de expressão gênica em relação ao controle e redução da atividade das proteínas MRP. No entanto, para a exposição crônica (15 dias) observamos uma redução dos níveis de expressão gênica quando comparado com a exposição aguda ao mesmo tempo que ocorre um aumento da atividade das proteínas MDR(PGP) e MRP nesse mesmo período (Tabela 4).

Esse efeito não é acompanhado para as células expostas ao TCDD, no entanto, os resultados mostram que a exposição aos contaminantes, tanto BDE-209 como o TCDD, alteram a expressão dos genes estudados no período crônico de exposição, apesar dos valores serem mais expressivos em 24 horas que em 15 dias de exposição.

De uma maneira geral, para a exposição aguda (24h) ao TCDD os resultados de expressão gênica dos alvos moleculares relacionados ao efluxo de drogas apresentou um aumento dos níveis de expressão gênica em relação ao controle. No entanto, para a exposição crônica (15 dias) observamos uma diminuição dos níveis da expressão gênica quando comparado com a exposição aguda (Tabela 4).

Tabela 4. Tabela comparativa da expressão gênica e atividade das proteínas transportadoras ABC. Verde: aumento; vermelho: redução; cinza: não apresentou diferenças estatísticas em relação ao controle. Fonte: A autora (2019).

| Expressão gênica | Tempo de exposição – 24h | | | Expressão gênica | Tempo de exposição – 15 dias | | |
|--------------------------------|--------------------------|-----|-----|-------------------------------|------------------------------|------|------|
| | Concentrações nM BDE-209 | | | | Concentrações nM BDE-209 | | |
| | 0,01 | 0,1 | 1,0 | | 0,01 | 0,1 | 1,0 |
| ABCB1 | | | 22% | ABCB1 | | | 3,5% |
| ABCB5 | | | | ABCB5 | 2,0% | | 2,5% |
| ABCC1 | | | 10% | ABCC1 | 1,8% | 3,8% | 5% |
| ABCC2 | | | 27% | ABCC2 | | 1,2% | |
| ABCC4 | | | 44% | ABCC4 | 3% | | |
| Atividade das proteínas | | | | Atividade de proteínas | | | |
| MDR/MRP | | | | MDR/MRP | | | 30% |
| MRP | | | 29% | MRP | | | |

| Expressão gênica | Tempo de exposição – 24h | | | Expressão gênica | Tempo de exposição – 15 dias | | |
|--------------------------------|--------------------------|-----|-----|--------------------------------|------------------------------|------|------|
| | Concentrações nM - TCDD | | | | Concentrações nM - TCDD | | |
| | 0,01 | 0,1 | 1,0 | | 0,01 | 0,1 | 1,0 |
| ABCB1 | | | | ABCB1 | 0,2% | | |
| ABCB5 | 37% | | 48% | ABCB5 | | | 1,3% |
| ABCC1 | | 20% | | ABCC1 | 1,0% | 1,2% | 1,3% |
| ABCC2 | | | 15% | ABCC2 | | | |
| ABCC4 | | | 33% | ABCC4 | 1,5% | | |
| Atividade das proteínas | | | | Atividade das proteínas | | | |
| MDR/MRP | | | | MDR/MRP | | | |
| MRP | | | | MRP | | | |

8 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho confirmam que é salutar uma nova abordagem no estudo dos riscos de exposição a agentes e produtos químicos, aos quais estamos de forma cotidiana expostos. Isso significa que não somente a busca pelos efeitos diretos ou indiretos da exposição são suficientes, é preciso avaliar também o papel dessas moléculas xenobióticas no prognóstico de doenças graves e de difícil controle, como o câncer. O modo de vida da sociedade moderna deixa a população humana a cada dia mais vulnerável, e a busca incessante por novas tecnologias voltadas principalmente para o bem-estar do homem, paradoxalmente é uma das principais causas para o risco presente no nosso cotidiano. O reflexo é a enorme diversidade de moléculas químicas produzidas pela principalmente pela atividade antrópica que expõe nossas células a constantes desafios químicos e biológicos.

A discussão dos dados que foram gerados, por se tratar de uma nova abordagem no campo da saúde, as questões muitas vezes superam a compreensão, fazendo com que a explicação para os fatos relatados aqui seja ainda incipiente e merecem cuidado. Mesmo assim, observamos que ambos os poluentes selecionados para a continuidade desse tipo de abordagem toxicológica, surpreendentemente deixam evidências de que a exposição química pode ter um papel importante no tratamento de doenças como o câncer, que não deveriam ser negligenciadas. Liebel *et al.*, (2015) levantou essa questão quando observou que a exposição de uma cianotoxina (cilindrospermopsina) em células hepáticas modificadas, provenientes de carcinomas hepáticos, apresentam aumento nos parâmetros de viabilidade celular, sem demonstrar citotoxicidade como observado em células normais.

Posteriormente, Salgado *et al.*, (2018) e colaboradores mostraram que a mistura de pesticidas (herbicidas) apresentava comportamento semelhante em células B16F1. Esses resultados, ambos provenientes de estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, motivaram a busca por mais informações. Os dados do presente trabalho revelam que essa condição parece ser confirmada quando observamos a citotoxicidade através do ensaio MTT, a atividade principalmente das desidrogenases mitocondriais não encontram-se alteradas nem pelo BDE-209 ou pelo TCDD em todas as concentrações e tempos testados. No entanto, outros parâmetros indicam que a exposição ao composto polibromado BDE-209 altera

discretamente o sistema endossoma lisossoma, aumentando a captação e retenção do corante vermelho neutro, após 24 horas de exposição na menor concentração testada de 0,01 nM.

Isso, no entanto, não é confirmado após a exposição crônica (15 dias) onde um declínio da atividade lisossomal é observado nas células expostas apenas à maior concentração de BDE-209. A diferença observada nesse tipo de resposta celular demonstra que a molécula em baixas concentrações induz um tipo de resposta não encontrado em concentrações maiores, contrariando aparentemente a hipótese de que haveria uma ativação concentração dependente na viabilidade celular. Supostamente, a exposição inicial provoque tais alterações que com o passar do tempo sejam minimizadas por adaptação e seleção de células geração após geração.

Por outro lado, esses dados podem também indicar que uma concentração mais alta poderia, em 24 horas de exposição, apresentar um efeito tóxico, o que parece ser confirmado para períodos de exposição mais longos como o de 15 dias. Esse é um tipo de resposta importante, pois os efeitos sob baixas concentrações podem ser mais representativos do ponto de vista toxicológico, visto que se aproximam mais de uma condição real de exposição. Quando o tempo de exposição aumenta, esse tipo de resposta se manifesta de outra maneira, e aparentemente nesse caso demonstrando o papel citotóxico do polibromado sobressaindo, principalmente na maior concentração testada, da mesma forma que cessa o efeito da alteração de resposta nas duas concentrações maiores testadas na exposição por 24 horas ao BDE-209. Esse resultado coincide com outras moléculas de BDE (47 e 32) quando células hepáticas humanas são expostas (Saquib *et al.*, 2016; Liu, X. *et al.*, 2015).

Na exposição crônica, a concentração de 0,01 de BDE-209 induziu o aumento da proliferação/adesão celular, o que corrobora de certa forma com o resultado apresentado pelo ensaio de vermelho neutro, onde não é observada toxicidade nas baixas concentrações. Esse tipo de resultado pode estar relacionado com o papel do BDE-209 no ciclo celular, induzindo a fase S ou G2/M, como descrito por Zhi-Hua Li *et al.* (2012). Nesse caso, foi observado pelos autores que a exposição ao BDE-209 levou a um aumento na viabilidade e proliferação das linhagens celulares tumorais de câncer de mama MCF-7 e MCF-7/ADR, câncer

cervical HeLa, câncer de ovário OVCAR-3 e células normais de ovário de hamster chinês (CHO).

O TCDD é uma molécula conhecidamente tóxica para a célula, no entanto, foi observado que a exposição aguda (24h) nas duas maiores concentrações induz um aumento no funcionamento do sistema endossoma lisossoma, evidenciado pela capacidade das células *B16F1* em reter o corante vermelho neutro. Essa condição é mais favorável do que o observado para o BDE-209 se considerarmos que poderia estar favorecendo de forma concentração dependente nas primeiras horas de exposição.

Embora essa condição não apresente resultados semelhantes após 15 dias, fica claro que o TCDD já em 24 horas de exposição é capaz de modificar o fenótipo das células *B16F1*, dados esses corroborados pelos resultados de proliferação/adesão no mesmo tempo de exposição, onde é observado um aumento da quantificação de células aderidas em todas as concentrações testadas. Esses dados sugerem que o TCDD pode estar provocando alterações no ciclo celular mesmo em um curto tempo de exposição (24 horas) pela indução da fase S ou fase G2/M.

Segundo Gao et al. (2016) um aumento da capacidade de proliferação celular foi observado em células expostas ao TCDD. Os autores revelam que ocorre um aumento no avanço da fase G1 para S, em células epiteliais fetais do palato humano (hFPECs), bem como um aumento de volume celular que iniciam a fase G2/M, quando expostas ao TCDD. O estímulo da proliferação induzida pelo TCDD, já foi descrita na literatura também por Fujisawa et al. (2017) enquanto Harvey et al. (2016) e colaboradores mostram um aumento tanto da proliferação como da ativação de células hepática humana LX-2 quando expostas ao TCDD, dados esses que corroboram com nossos resultados.

A proliferação e crescimento celular também foi evidente em queratinócitos epidérmicos humanos normais (NHEKs) quando expostos ao TCDD. Nesse caso o efeito se relaciona com um aumento da expressão dos ligantes do receptor de fator de crescimento epidérmico (Campion et al., 2016). Segundo Haarmann-Stemmann et al. (2009), o TCDD está envolvido na regulação de processos celulares comuns como por exemplo proliferação celular, adesão celular e interação com matriz extracelular (MEC). Além disso, mais de 50% dos pacientes com melanoma

metastático possuem uma mutação específica na BRAF serina / treonina quinase, resultando na ativação constitutiva da via cinase RAS-RAF-MEK-ERK-MAP, que promove o crescimento celular descontrolado (Xião *et al.*, 2018).

Por outro lado, nossos dados mostram uma redução da proliferação/adesão celular após exposição crônica ao TCDD, o que pode estar associado à perda da capacidade de adesão das células quando expostas à longo prazo ao TCDD, interferindo nas proteínas de adesão celular, como integrinas e e-caderinas. Essa hipótese é reforçada pelos resultados do ensaio clonogênico após 15 dias de exposição tanto aos contaminantes BDE-209 e TCDD nas diferentes concentrações.

Na qual, através do ensaio clonogênico, foi observado a formação de colônias menores das células, sugerindo que a exposição aos contaminantes, pode estar interferindo da adesão célula-célula, possivelmente favorecendo a migração celular. Corroborando com os nossos resultados, dados recentes do grupo de pesquisa, com estudos *in vivo* têm demonstrado que a exposição ao BDE-209 por mais de 30 dias e a posterior inoculação de tumores, leva a uma dispersão significativamente maior das células tumorais para outros tecidos como cérebro, rins e peritônio ainda não notificados para *B16F1* quando inoculadas de maneira intravenal.

Os transportadores ABC representam uma das maiores e mais antigas famílias de proteínas membranares, existentes em todos os filios, tendo como principal função bombear uma diversidade de substratos, como os compostos tóxicos através da membrana celular (Kathawala *et al.*, 2015). A proteínas glicoproteína-P (MDR1/ABCBB1) e a proteína associada a múltiplas drogas 1 (MRP1/ABCC1), são os principais transportadores de efluxo de drogas associados ao fracasso do tratamento do câncer (Lu *et al.*, 2017).

Nossos dados mostraram alterações em diferentes níveis de expressão gênica na exposição aguda e crônica, tanto para o contaminante BDE-209, como para o TCDD em todos os alvos moleculares selecionados, o que evidencia a potencialidade dessas moléculas em modificar a resposta celular na expressão desses genes. Para o contaminante BDE-209 na exposição por 24 horas, foi observado o aumento dos níveis de expressão do gene ABCB1(MDR1) (\uparrow ~21%). Já na exposição crônica ao mesmo contaminante os níveis de expressão gênica foram reduzidos em relação ao controle para a maior concentração testada (\downarrow ~3,5%), onde o mesmo foi observado para as células expostas ao TCDD na menor concentração

testada ($\downarrow \sim 0,2\%$). Na literatura a proteína PGP(MDR1) é relacionada com o transporte de uma ampla gama de substratos incluindo drogas quimioterápicas, inibidores de protease do HIV, agentes imunossupressores, antiarrítmicos, bloqueadores dos canais de cálcio, analgésicos, anti-histamínicos, antibióticos, produtos naturais, corantes fluorescentes e pesticidas, entre muitos outros, onde funciona na proteção contra xenobióticos e tóxicos celulares (Matheny *et al.*, 2001; Morrissey *et al.*, 2012; Loo *et al.*, 2013).

Mais especificamente para o gene ABCB1, esse está relacionado com a diminuição das concentrações de fármacos além de atuar no transporte molecular na barreira hematoencefálica. Os dados apresentados para esse gene sugere que o contaminante BDE-209 na sua maior concentração interfere alterando a expressão do gene, em ambas os tempos de exposição à molécula, evidenciando a possível capacidade do xenobiótico em diminuir a sensibilidade das células *B16F1* ao tratamento quimioterápico.

Essa informação vem de encontro à hipótese testada no presente estudo, o que é corroborado também pelo aumento da atividade das proteínas MDR/MRP na mesma concentração após 15 dias de exposição. Nesse caso, a diferença entre expressão e atividade pode estar relacionado com o tempo necessário para a síntese e os devidos controles pós transcricionais da proteína após a síntese do mRNA até sua ativação, bem como, resultado da meia-vida longa das proteínas transportadoras ABC que é descrita na literatura com aproximadamente 5 dias (Wakabayashi *et al.*, 2006). Como a expressão do gene e a atividade da proteína não foram medidas em nenhum intervalo de tempo entre as 24 horas e os 15 dias de exposição, essa ativação poderia estar ocorrendo já na exposição aguda e permanecendo em atividade após a exposição crônica, visto que o gene continua sendo expresso mesmo após os 15 dias de exposição.

Diferente do observado para o BDE-209, para o TCDD não há expressão significativa para o gene ABCB1 nas primeiras horas, no entanto o gene se expressa na menor concentração após 15 dias de exposição. Esse resultado em um primeiro momento expressa comparativamente que o TCDD interfere menos que o BDE-209 na expressão dos genes relacionados com o sistema ABC, mas por outro lado, pode também sugerir que esses resultados devem-se ao seu alto potencial tóxico para a célula, como relatado na literatura (Pesatori *et al.*, 2009).

A expressão do gene ABCB5 é descrita na literatura em células de melanoma e está relacionado com a resistência dessas células ao tratamento com dacarbazina (principal quimioterápico utilizado no tratamento desse tipo de câncer). Além disso, as proteínas PGP5(MDR5) estão relacionadas com a resistência a outros fármacos e quimioterápicos para o melanoma como a doxorrubicina e temozolomida (Frank *et al.*, 2005; Linley *et al.*, 2012; Chartrain *et al.*, 2012). As células quando expostas ao BDE-209 mostraram um aumento na expressão do gene ABCB5 somente após 15 dias de exposição.

Comparativamente, os resultados da expressão gênica de ABCB5 são similares entre os dois contaminantes estudados, exceto que após 24h para a maior concentração de TCDD, a qual apresenta uma diferença de expressão maior ($\uparrow\sim 42\%$) inclusive entre os grupos expostos a concentrações menores. No entanto, em 15 dias esses dados não se evidenciam. O que poderia estar ocorrendo é que para o gene ABCB5 especificamente, as células de melanoma não estejam sob efeito do contaminante BDE-209, dada a alguma especificidade dessas moléculas com os fatores de controle da expressão gênica.

A expressão do gene ABCC1, apresentou um aumento na exposição aguda tanto para o BDE-209 como para o TCDD. Porém, a expressão do gene ABCC1 foi mais evidente para ambos os contaminantes na exposição crônica, onde todas as concentrações testadas aumentaram significativamente. Esse gene está associado com proteínas de transporte multiespecífico de ânion orgânico. Em geral participa no transporte de sais biliares, hormônios esteroides, glutathiona reduzida e conjugados com glutathiona.

Sendo assim, a variação na expressão do gene que observamos para ambos os contaminantes no caso, podem estar envolvidos com o papel dessas moléculas na ativação do sistema P450. Os compostos orgânicos de uma forma geral, mas especificamente o TCDD via receptor Ahr, são potentes ativadores desse sistema de detoxificação celular (Oliveira *et al.*, 2015), o que pode ser um mecanismo complementar na diminuição da sensibilidade celular, favorecendo a biotransformação e eliminação dos quimioterápicos.

Para o contaminante BDE-209 na exposição por 24 horas, foi observado um aumento dos níveis de expressão do gene ABCC2 (MRP2) ($\uparrow\sim 27\%$) na maior concentração não observado após a exposição crônica em relação ao controle. Na exposição aguda, quando expostas ao TCDD a maior variação na expressão do

gene ocorreu também na maior concentração ($\uparrow \sim 15\%$). A proteína MRP2, possivelmente tem múltiplos locais de ligação ao substrato (Borst *et al.*, 2006), pois a atividade de transporte pode ocorrer de maneira cooperativa, na qual o transporte do substrato é estimulado pela presença de outros substratos.

Essa proteína, possui portanto, uma facilidade de transporte para uma ampla variedade de substratos quimioterápicos, como metotrexato, antraciclinas (doxorubicina, epirrubicina), mitoxantrona, cisplatina e etoposídeo (Borst *et al.*, 2000; Slot *et al.*, 2011). Além disso são conhecidas como transportadores de ânion orgânico multiespecífico canalicular (cMOAT) e tem ampla especificidade de substrato que inclui tanto compostos endógenos, como metabólitos de bilirrubina e epinefrina, e compostos exógenos como irinotecano e metotrexato (Nies e Keppler, 2007).

Os dados obtidos com o estudo mostram que ambos os poluentes modulam a expressão gênica de ABCC2 na exposição aguda, o que não se reflete na atividade da proteína no mesmo período. Esse é no entanto, um resultado esperado visto que é necessário um tempo para a síntese e ativação pós transcricional da proteína, o que não foi possível avaliar isoladamente a atividade das MRPs, visto que os resultados para 15 dias relacionados com o transporte de Calceína AM não foram obtidos a tempo. Mas, foi demonstrado o aumento da atividade das proteínas MDR e MRP através do transporte de Rodamina B, que é substrato para ambas as proteínas.

A proteína MRP4 se destaca, pois, pode ser encontrado tanto na membrana basal ou apical em células polarizadas. O gene ABCC4 responsável pela expressão dessa proteína, tem a função de exportar substratos endógenos, incluindo AMPc, urato e prostaglandina PGE2 (Chen *et al.*, 2001; Van Aubel *et al.*, 2005; Reid *et al.*, 2003). O transporte de tais moléculas sinalizadoras sugere que o ABCC4 pode desempenhar um papel regulador chave na sinalização celular, além do transporte de drogas.

Também, foi observado na exposição aguda ao BDE-209 e ao TCDD um aumento dos níveis de expressão do gene ABCC4 (MRP4) ($\uparrow \sim 44\%$ e $\uparrow \sim 33\%$ respectivamente) ambos na maior concentração. Esses resultados no entanto, não são observados para a exposição crônica, onde houve um aumento na exposição ao BDE-209 para a menor concentração e uma redução para a exposição ao TCDD também na menor concentração testada. Esses resultados são semelhantes ao

observado para a expressão do gene ABCC2, o que mostra um padrão de expressão das MRPs quando expostas aos contaminantes testados. Da mesma forma que discutido acima, essa modulação se reflete em um aumento da atividade das proteínas transportadoras após a exposição crônica.

Em conjunto, as funções das proteínas transportadoras ABC, justificam o aumento da expressão dos alvos relacionados ao efluxo de drogas. De modo que, os dados do presente estudo mostram uma resposta mais evidente após 24 horas de exposição. No entanto, para a exposição crônica onde as células sofrem picos de exposições aos contaminantes, conseqüentemente, refletindo em uma exposição cumulativa, as alterações ocorrem em níveis menos acentuados na expressão de genes relacionados com o efluxo de drogas. Particularmente, para esse tipo de evento celular fica evidente que há um estímulo celular no sentido de aumentar a atividade de transporte de membrana via as proteínas transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*), o que se configura posteriormente com o aumento da atividade das proteínas MDR e MRP, após a exposição crônica.

Não há até o momento nenhum relato na literatura consultada relacionando PBDEs e expressão gênica dos transportadores do sistema ABC (*ATP-binding cassette*). No entanto, são encontrados na literatura os possíveis reguladores da expressão gênica dessas proteínas. Em células humanas e de roedores, os transportadores de drogas, também são alvos de receptores nucleares (Staudinger *et al.*, 2003). A ativação do receptor PXR (*pregnane X receptor*), responsável pelo metabolismo de xenobióticos e hormônios, induz a expressão de PGP's em células intestinais (Geick *et al.*, 2001) e aumenta os níveis de MRP2 em hepatócitos humanos primários.

O receptor CAR (*constitutive androstane receptor*), é outro receptor nuclear que funciona como um sensor para substâncias endobióticas e xenobióticas, também está implicado na regulação de MRP2 em hepatócitos humanos primários (Kast *et al.*, 2002) e MRP4 em fígado de camundongo (WAGNER *et al.*, 2005). Além disso, uma possível explicação para os resultados encontrados na expressão gênica das células expostas ao TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) é que essa molécula é um forte ativador do receptor de hidrocarboneto de arila (AhR), resultando na alteração da expressão gênica para a ativação do sistema de detoxificação celular. Portanto, uma avaliação desses novos alvos moleculares pode

ser a chave para a compreensão dos mecanismos associados com a regulação da expressão dos genes responsáveis pelo funcionamento do sistema de transporte ABC, nas membranas biológicas das células *B16F1*.

Nesse estudo, como citado anteriormente foram analisadas a atividade das proteínas MDR e MRP com o intuito de avaliar se as variações nos níveis de expressão gênica estariam relacionadas com a atividade de efluxo das proteínas transportadora ABC. Os resultados mostram que a exposição tanto aguda como crônica ao BDE-209 altera a atividade das proteínas transportadoras ABC. Em um estudo recente, foi demonstrado que o BDE-47 não afetou a atividade da MDR, no entanto, o seu metabólito 6-OH-BDE-47 inibiu a atividade da P-gp em MDR1-BCRP humano (Marchitti et al., 2017).

Em nossos resultados na exposição aguda foi observada uma inibição da atividade das proteínas MRPs, porém, na exposição crônica a atividade das proteínas MDR/MRP aumentou em 30% também após exposição ao BDE-209 na maior concentração (1,0nM). Estudos descritos por Mazur et al. (2012, 2014) mostraram que algumas substâncias químicas ambientais e seus metabólitos, incluindo o fungicida agrícola propiconazol e o bisfenol-A (BPA), interagem com os transportadores ABC, agindo como potenciais substratos ou inibidores. Isso é evidenciando também na ativação de P-gp (MDR/P-glicoproteína) e BCRP (Proteína Resistente ao Câncer de Mama), que são transportadores de efluxo ligados à membrana que transportam múltiplas classes químicas, No entanto, de acordo com Marchitti et al. (2017), muito pouco se conhece sobre o papel dos PBDEs sobre o funcionamento dos transportadores ABC.

Como demonstrado nesse estudo a exposição aguda aos contaminantes BDE-209 e TCDD, induz a expressão gênica para a síntese das proteínas transportadoras do sistema ABC. Isso pode ser um mecanismo de defesa das células contra os próprios contaminantes, o que conseqüentemente pode levar a um aumento da resistência celular ao tratamento quimioterápico. Embora essa abordagem se baseie apenas na exposição aguda, os dados obtidos com um tempo crônico de exposição, mostra que há indícios de uma maior diversidade de genes modulados pela exposição aos contaminantes.

Isso reforça a hipótese que essas moléculas podem alterar a expressão gênica de proteínas transportadoras ABC, podendo interferir não somente com o transporte de xenobióticos, mas também de metabólitos celulares importantes para o

funcionamento de vários órgãos. Há, no entanto, uma vasta opção de estudos que podem emergir desses resultados, e seria minimamente imprudente apontar alguma conclusão nesse sentido com base apenas nos resultados obtidos até o momento. Dessa forma, os dados indicam uma proteção significativa das proteínas transportadoras ABC em exposição a longo prazo de BDE-209. Parece razoável portanto, inferir que essa substância, nas concentrações testadas, pode modificar o sistema de transporte ABC pelo aumento da expressão de genes chaves para o funcionamento do mesmo. Comparativamente, o mesmo parece não ser tão evidente para o TCDD.

Assim, os resultados apresentados no presente estudo indicam que a exposição ao BDE-209 pode potencializar a resistência das células de melanoma (*B16F1*) ao tratamento quimioterápico, tornando-as menos sensíveis e favorecendo o desenvolvimento da doença. No entanto, faz-se necessário uma avaliação de outros alvos moleculares que possam desvendar o mecanismo de ação dessa molécula nos processos de expressão gênica, como por exemplo os receptores nucleares que podem ser ativados pela presença da molécula BDE-209.

Em termos gerais, foi verificado que a exposição aos contaminantes BDE-209 e TCDD apresentam evidências de que podem, em diferentes níveis e vias, modular o fenótipo das células *B16F1* favorecendo um comportamento mais resistente, podendo interferir negativamente no tratamento quimioterápico. As bases para tais argumentos são os resultados de integridade da membrana do sistema endossoma lisossoma, proliferação/adesão, clonogênico e pela atividade e expressão de genes responsáveis pela síntese de proteínas transportadoras do tipo ABC.

Os dados do aumento de expressão gênica dos alvos moleculares relacionados com o efluxo de drogas na exposição aguda e o aumento da atividade das proteínas transportadoras ABC na exposição crônica, aliados ao fato de que praticamente não é observado eventos claros de citotoxicidade nas baixas concentrações testadas, apesar do potencial citotóxico das moléculas em questão serem conhecidas, reforça a hipótese de que essas células se beneficiam da presença dos contaminantes no sentido de se tornarem células mais resistentes e portanto, apresentarem um quadro de malignidade maior que o observado para as células que não foram expostas.

Dessa forma, os resultados obtidos com esse estudo corroboram nossa hipótese inicial, embora muitas questões ainda precisam ser elucidadas para uma compreensão mais global dessa investigação. Finalmente, os resultados dão suporte a uma linha de pesquisa inovadora dentro de uma nova abordagem toxicológica, pois apontam várias questões que merecem ser investigadas, onde os poluentes ambientais potencialmente são capazes de interferir com o fenótipo de células tumorais, interferindo com sua malignidade e portanto, podendo alterar o tratamento da doença.

9 CONCLUSÃO

- Os contaminantes ambientais TCDD e BDE-209, são capazes de alterar o fenótipo das células B16 F1 (metabolismo lisossomal, proliferação/adesão celular e a capacidade de formação de colônias).
- O BDE-209 interfere na atividade das proteínas transportadoras ABC (P-gp e MRP), inibindo MRP na exposição aguda e estimulando P-gp e MRP na exposição crônica.
- O TCDD bem como o BDE-209, modificam a expressão gênica dos transportadores ABC (ABCB1, ABCB5, ABCC1, ABCC2 e ABCC4), principalmente após a exposição aguda.
- A expressão dos genes para a síntese das proteínas MDR/MRP após 24 horas de exposição, refletem a maior atividade para essas proteínas após a exposição crônica;
- Em conjunto, os dados principalmente da atividade das proteínas transportadoras ABC que são responsáveis pelo tratamento ineficaz de diversos tipos de câncer, bem como a alteração da expressão gênica, pela exposição aos contaminantes TCDD e BDE-209 nas condições experimentais utilizadas, sugerem o aumento da resistência das células B16F1 ao tratamento quimioterápico. No entanto, essas informações precisariam ser confirmadas em um sistema *in vivo*.
- Comparativamente os parâmetros analisados apontam para o BDE-209 como a molécula que mais se aproxima da hipótese formulada nesse estudo.

10 REFERÊNCIAS

- ALAE, M.; ARIAS, P.; SJODIN, A.; BERGMAN, A. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. **Environment International**, vol. 29 p. 683-689, 2003.
- ALMEIDA V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B; MONTANARI C.A.; DONNICI C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, vol. 28 n°1 p.118-129, 2005.
- ASSUNÇÃO, J.V.; PESQUERO, C.R. Dioxinas e furanos: origem e riscos. **Rev. Saúde Pública**, 33 (5):523-30, 1999.
- ATCC; B16-F0 – Disponível em: <<http://www.atcc.org/products/all/CRL-6322.aspx>>. Acesso em: 07/2017.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for Chlorinated Dibenz-P-Dioxins**, Atlanta, GA., 1998.
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. *Applications of the neutral red cytotoxicity assay to in vitro toxicology*. **ATLA**, v.18, p. 129-44, Nov. 1990.
- BALCH, C.M.; GERSHENWALD, J.E.; SOONG, S.J.; THOMPSON, J.F.; ATKINS, M.B.; BYRD, D.R, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. **J Clin Oncol**. 2009; 27(36):6199-206.
- BESIS A, SAMARA C (2012) Polybrominated diphenyl ethers (PBDE-209s) in the indoor and outdoor environments — a review on occurrence and human exposure. **Environ Pollut** 169:217–229.
- BCRJ; B16-F1 – Disponível em: < bcrj.org.br/catalogo/cellprint/?celula=B16F1-Melanoma...pdf >. Acesso em: 03/2018.
- BIRCSAK KM, RICHARDSON JR, ALEKSUNES LM. Inhibition of human MDR1 and BCRP transporter ATPase activity by organochlorine and pyrethroid insecticides. **J Biochem Mol Toxicol**. 2013 Feb;27(2):157-64. doi: 10.1002/jbt.21458. PubMed PMID: 23169446; PubMed Central PMCID: PMC4001733. eng.
- BORST, P, EVERS, R, KOOL, M, WIJNHOLDS, J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. **J. Natl Cancer Inst**. 92, 1295–1302 (2000).
- BORST P, ZELCER N, VAN DE WETERING K AND POOLMAN B (2006) On the putative co-transport of drugs by multidrug resistance proteins. **FEBS Lett** 580:1085-1093.
- Inst.** 92 (2000) 1295–1302.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **A situação do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2006.

- BRULPORT, AXELLE, LE CORRE, LUDOVIC, CHAGNON, MARIE-CHRISTINE, Chronic exposure of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces an obesogenic effect in C57BL/6J mice fed a high fat diet. *Toxicology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2017.07.017>
- BUSH, J.Á.; Li, G. The role of Bcl-2 family members in the progression of cutaneous Melanoma. **Clin Exp Metastases**. 2003; 20:531-9.
- BUCHER S, LE VEE M, JOUAN E, et al. Regulation of hepatic drug transporter activity and expression by organochlorine pesticides. **J Biochem Mol Toxicol**. 2014 Mar;28(3):119-28. doi: 10.1002/jbt.21543. PubMed PMID: 24464585; eng.
- CABRITA, I.; GULYURTLU, I.; PINTO, F.; BOAVIDA, D.; COSTA, P.; RACHA, L. Formação e Destruição de Dioxinas em Processos de Combustão e Co-Combustão. **RFML** 2003; Série III; 8 (4): 225-235.
- CAMPION, C.M., LEON, CARRION S., MAMIDANNA, G., SUTTER, C.H., SUTTER, T.R., COLE, J.A. Role of EGF receptor ligands in TCDD-induced EGFR down-regulation and cellular. **Chemico-Biological Interactions** 253 (2016) 38 e 47.
- CARPENTER DO. Effects of Persistent and Bioactive Organic Pollutants on Human Health. **Wiley: Hoboken**, New Jersey, 2013.
- CERNIGLIA, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydro-carbons. **Biodegradation** 3, 351±368.
- CHARTRAIN M, RIOND J, STENNEVIN A, VANDENBERGHE I, GOMES B, LAMANT L, et al. Melanoma chemotherapy leads to the selection of ABCB5-expressing cells. **PLoS One**. 2012;7(5):e36762.
- CHEN, C.J. *et al.* Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in *Mdr-1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. **Cell** 47, 371–380(1986).
- CHEN ZS, LEE K AND KRUIH GD (2001) Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. **J Biol Chem** 276:33747-33754.
- CHEN, K.G.; VALENCIA, J.C.; GILLET, J.P.; HEARING, V.J.; GOTTESMAN, M.M. Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**. 2009; 22; 740–749.
- CORNWALL, R.; TOOMEY, B. H.; BARD, S.; BACON, C.; JARMAN, W.M. e EPEL, D. Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. **Aquat. Toxicol.**, v. 3, p. 277-296, 1995.
- DARNERUD, P.O; ERIKSEN, G.S; JOHANNESSON, T; LARSEN, P.B; VILUKSELA, M. Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. **Environ Health Perspect** 2001; 109 Suppl 1: 49-68.

- DAOUD, R.; JULIENS, M.; GROSS, P. AND GEORGES, E. (2001) **J. Biol. Chem.**, 276, 12324-12330.
- DEWICK, P. M.; Medicinal Natural Products, a Biosynthetic Approach, 3rd ed., Wiley: United Kingdom, 2009.
- EGELAND, G. M.; SWEENEY M. G., FINGERHUT M. A; WILLE, K. K.; SCHNORR, T. M.; HALPERIN, W. E. Total serum testosterone and gonadotropins in workers exposed to dioxins. **American Journal of Epidemiology**, vol. 139 p. 272-281, 1994.
- FRANK NY, MARGARYAN A, HUANG Y, SCHATTON T, WAAGA-GASSER AM, GASSER M, SAYEGH MH, SADEE W, FRANK MH. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. **Cancer Res.** 2005; 65(10):4320–33.
- FORREST, M.; KIEVIT, A.; FREDDY, Y.; WANG, A.; FANG, A.C.; KUI WANG, K.; SILBER, J.R.; ELLENBOGEN, R.G.; ZHANG, M. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro. **J Control Release.** 2011; 30;152:76-83.
- FUJISAWA, N., YOSHIOKA, W., YANAGISAWA, H. Roles of cytosolic phospholipase A2 α in reproductive and systemic toxicities in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-exposed mice. 2017 **Arch Toxicol.**
- GAO, S., WAN, Y., ZHENG, G., LUO, K., KANNAN, K., GIESY, J.P., LAM, M.H.W., HU, J. Organobromine compound profiling in human adipose: assessment of sources of bromophenol. **Environ. Pollut.** 2015; 204, 81-89.
- GAO ZHAN, YONGJUN BU, GUOFU ZHANG, XIAOZHUAN LIU , XUGANG WANG, SHIBIN DING, ERHUIWANG , RULING SHI , QIAOYUN LI , JIANHONG FU , ZENGLI YU. Effect of TCDD on the fate of epithelial cells isolated from human fetal palatal shelves (hFPECs). **Toxicology and Applied Pharmacology** 305 (2016) 186–193.
- GEICK A, EICHELBAUM M, BURK O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. **J Biol Chem.** 2001 May 4;276(18):14581-7. doi: 10.1074/jbc.M010173200. PubMed PMID: 11297522; eng.
- GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Anal Biochem**, v. 159, n. 1, p. 109-13, Nov 1986. ISSN 0003-2697.
- GLAHN, F. et al. Cadmium, cobalt and lead cause stress response, cell cycle deregulation and increased steroid as well as xenobiotic metabolism in primary normal human bronchial epithelial cells which is coordinated by at least nine transcription factors. **Arch Toxicol.** 2008; 82:513–524.
- GOTTESMAN, M. Multidrug Resistance During Chemical Carcinogenesis: A Mechanism Revealed?. **Editorial.** Vol. 80, No. 17, November 2, 1988.
- HAARMANN-STEMMANN, T., BOTHE, H., ABEL, J., 2009. Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. **Biochem. Pharmacol.** 77, 508–520.

- HALE, R. C., M. J. LA GUARDIA, E. HARVEY, M. O. GAYLOR, AND T. M. MAINOR. 2006. Brominated flame retardant concentrations and trends in abiotic media. **Chemosphere** 64:181–186. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.12.006
- HARAGUCHI, K., ITO, Y., TAKAGI, M., FUJII, Y., HARADA, K.H., KOIZUMI, A. Levels, profiles and dietary sources of hydroxylated PCBs and hydroxylated and methoxylated PBDE-209s in Japanese women serum samples. **Environ. Int.** 2016: 97, 155-162.
- HARVEY, W. A. JURGENSEN, K. PU, X. LAMB, C. L. CORNELL, K. A. CLARK, R. J. KLOCKE, C. MITCHELL, K. A. Exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) increases human hepatic stellate cell activation. **Toxicology.** 2016: 344–346, 26–33.
- HEIMERL, S.; BOSSERHOFF, A.K.; LANGMANN, T.; ECKER, J.; SCHMITZ, G. Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells. **Melanoma Research:** 2007, Vol 17 No 5.
- HOFFMAN, K. *et al.* Exposure to flame retardant chemicals and occurrence and severity of papillary thyroid cancer: a case–control study. **Environ. Int.** 107, 235–242 (2017)
- HOOPER, H. & MCDONALD, T.A. 2000. The PBDE-209s: an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs. **Environmental Health Perspectives**, 108(5): 387-392.
- HOUGHTON, A.N.; POLSKY, D. Focus on melanoma. **Cancer Cell.** v. 2, p. 275-278, 2002.
- HUBER, P.C.; MARUIAMA, C.H. and ALMEIDA, Wanda P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química. Nova.** 2010, vol.33, n.10, pp. 2148-2154. ISSN 0100-4042.
- INCA. **Como é o processo de carcinogênese?** Rio de Janeiro: INCA; 2016. Acesso em: 26 de março de 2017. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319>.
- INCA. **O que é câncer?** Rio de Janeiro: INCA; 2016. Acesso em: 26 de março de 2017. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>.
- INCA. **Tipos de Câncer: Pele Melanoma.** Rio de Janeiro: INCA; 2016. Acesso em: 26 de março de 2017. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao2012>.
- IKONOMOU, M.G.; KELLEY, B.C. & STERN, G.A. 2005. Spatial and temporal trends of PBDE-209s in biota from the Canadian Arctic marine environment. **Organohalogen Compounds**, 67: 950-953.
- IRIGARAY, P.; NEWBY, J.A.; CLAPP, R.; HARDELL, L.; HOWARD, V.; MONTAGNIER, L.; EPSTEIN, S.; BELPOMME, D. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer, p. An overview. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, n. 10, p. 640-658, 2007.

- JEAN-PIERRE GILLET, THOMAS EFFERTH, JOSÉ REMACLE. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. **Biochimica et Biophysica Acta** 1775 (2007) 237–262.
- JEDLITSCHKY G, LEIER I, BUCHHOLZ U, BARNOUIN K, KURZ G AND KEPPLER D (1996) Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. **Cancer Res** 56:988-994.
- JIGOREL, E. et al. Differential Regulation of Sinusoidal and Canalicular Hepatic Drug Transporter Expression by Xenobiotics Activating Drug-Sensing Receptors in Primary Human Hepatocytes. **Drug Metabolism and Disposition**. 34:1756–1763, 2006.
- JONES, P. M; GEORGE, A. M. (2000) **Eur. J. Biochem.**, 267, 5298-5305.
- JOHNSON, Z.L., AND CHEN, J. (2017). **Cell** 168, this issue, 1075–1085.
- KASPAR P LOCHER. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. **Nature structural & molecular biology**. vol, 23. n° 6, (2016).
- KAST HR, GOODWIN B, TARR PT, et al. Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid Xactivated receptor, and constitutive androstane receptor. **J Biol Chem**. 2002 Jan 25;277(4):2908-15. doi: 10.1074/jbc.M109326200. PubMed PMID: 11706036; eng
- KATHAWALA, R. J., *et al.* The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade, **Drug Resist. Updat**. 18C (2015) 1–17.
- KOVALOVA, NATALIA, NAULT, RANCE, CRAWFORD, ROBERT, ZACHAREWSKI, TIMOTHY R., KAMINSKI, NORBERT E. Comparative analysis of TCDDinduced AhR-mediated gene expression in human, mouse and rat primary B cells, **Toxicology and Applied Pharmacology** (2016), doi: 10.1016/j.taap.2016.11.009
- KUNISUE, T.; TAKAYANAGI, N.; ISOBE, T.; TAKAHASHI, S.; NOSE, M.; YAMADA, T.; KOMORI, H.; ARITA, N.; UEDA, N.; TANABE, S. Polybrominated diphenyl ethers and persistent organochlorines in Japanese human adipose tissues. **Environment International** 33 (2007) 1048–1056.
- KUMAR, M.R.S.; AITHAL, K.; RAO, B.N.; UDUPA, N.; RAO, B.S.S. Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. **Toxicology in Vitro** 23 (2009) 242–250.
- LACHER SE, SKAGEN K, VEIT J, et al. P-Glycoprotein Transport of Neurotoxic Pesticides. **J Pharmacol Exp Ther**. 2015 Oct;355(1):99-107. doi: 10.1124/jpet.115.226373. PubMed PMID: 26272936; PubMed Central PMCID: PMC4576670. eng
- LA MERRILL M, EMOND C, KIM MJ, ANTIGNAC JP, LE BIZEC B, CLEMENT K, ET AL. Toxicological function of adipose tissue: focus on persistent organic pollutants. **Environmental Health Perspectives**. 2013;121(2):162-9.

- LANDERS, J.P.; BUNCE, N.J. The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity, **Biochem. J.** 276 (1991) 273–287.
- LEIER I, JEDLITSCHKY G, BUCHHOLZ U, COLE SP, DEELEY RG AND KEPPLER D (1994) The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. **J Biol Chem** 269:27807-27810
- LEIER I, JEDLITSCHKY G, BUCHHOLZ U, CENTER M, COLE SP, DEELEY RG AND KEPPLER D (1996) ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. **Biochem J** 314 (Pt 2):433-437.
- LEVINE, E. A.; HOLZMAYER, T. A.; BONINSON, I. B.; GUPTA T. K. MDR-1 Expression in Metastatic Malignant Melanoma. **Journal of surgical research**, vol. 54 p. 621-624, 1993.
- LIEBEL, S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; SILVA, R.C.; et al. Cellular responses of Prochilodus lineatus hepatocytes after cylindrospermopsin exposure. **Toxicology in vitro**, v. 25, n. 7, p. 1493–500, 2011.
- LIEBEL, S.; RIBEIRO, C.A.O.; MAGALHÃES, V.F.; DA SILVA, R.C.; ROSSI, S.C.; RANDI, M.A.F.; FILIPAK NETO, F., Low concentrations of cylindrospermopsin induce increases of reactive oxygen species levels, metabolism and proliferation in human hepatoma cells (HepG2), **Toxicology in Vitro**, Volume 29, Issue 3, April 2015, Pages 479-488, ISSN 0887-2333.
- LINLEY AJ, MATHIEU MG, MILES AK, REES RC, MCARDLE SE, REGAD T. The helicase HAGE expressed by malignant melanoma-initiating cells is required for tumor cell proliferation in vivo. **J Biol Chem.** 2012;287(17):13633–43.
- LONGLEY, D.B.; JOHNSTON, P.G. Molecular mechanisms of drug resistance. **J Pathol.** 2005; 205(2):275-92.
- LOO, T. W. AND CLARKE, D. M. (1999) *Biochem. Cell Biol.*, 77, 11-23.
- LOO, T.W., BARTLETT, M.C., CLARKE, D.M., Human P-glycoprotein contains a greasy ball-and-socket joint at the second transmission interface, **J. Biol. Chem.** 288 (2013) 20326–20333.
- LOPES, J.C. Efflux Pumps Modulation in Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines: The Role of Nuclear Medicine. **Journal of Cancer Therapy** 02, 408-417 (2011).
- LU, J. F *et al.* A novel mechanism governing the transcriptional regulation of ABC transporters in MDR cancer cells. **Drug Deliv. and Transl. Res.** (2017) 7:276–285.
- MACDONALD, R.W., HARNER, T., FYFE, J., 2005. Recent climate change in the Arctic and its impact on contaminant pathways and interpretation of temporal trend data. *Sci. Total Environ.* 342, 5e86.
- MARCHITTI S. A., et al. Inhibition of the Human ABC Efflux Transporters P-gp and BCRP by the BDE-209-47 Hydroxylated Metabolite 6-OH-BDE-209-47: Considerations for Human Exposure. **Toxicological Sciences**, 0(0), 2017, 1–13.
- MARTIN, M., LAM, P. K. & RICHARDSON, B. J. *MAR. Pollut. Bull.* 49, 375–382 (2004).

- MATHENY, C.J., LAMB, M.W., BROUWER, K.R., POLLACK G.M. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation, **Pharmacotherapy** 21 (2001) 778–796.
- MAZDAI, A.; DODDER N.G.; ABERNATHY M. P., HITES R. A.; BIGSBY R.M. Polybrominated Diphenyl Ethers in Maternal and Fetal Blood Samples **Environmental Health Perspectives**, n° 9, vol. 111, p. 1249-1252, 2003.
- MAZUR, C. S., MARCHITTI, S. A., DIMOVA, M., KENNEKE, J. F., LUMEN, A., AND FISHER, J. (2012). Human and rat ABC transporter efflux of bisphenol A and bisphenol A glucuronide: Interspecies comparison and implications for pharmacokinetic assessment. **Toxicol. Sci.** 128, 317–325.
- MAZUR, C. S., MARCHITTI, S. A., AND ZASTRE, J. (2014). P-glycoprotein inhibition by the agricultural pesticide propiconazole and its hydroxylated metabolites: Implications for pesticide-drug interactions. **Toxicol. Lett.** 232, 37–45.
- MCDONALD, T. 2002. A perspective on the potential health risks of PBDE-209s. **Chemosphere** 46:745–755. doi:10.1016/S0045-6535(01)00239-9.
- MENG, G., NIE, Z., FENG, Y., WU, X., YIN, Y., WANG, Y., 2016. Typical halogenated persistente organic pollutants in indoor dust and the associations with childhood asthma in Shanghai, China. **Environ. Pollut.** 211, 389-398.
- MILLER, A.J.; MIHM, JR MC. Melanoma. **New England Journal of Medicine** 2006; 355:51-65.
- MORRISSEY, K.M, WEN, C.C, JOHNS, S.J, ZHANG, L, HUANG, S.M, GIACOMINI, K.M, The UCSF-FDA TransPortal: a public drug transporter database, **Clin. Pharmacol. Ther.** 92 (2012) 545–546.
- MULLER M, MEIJER C, ZAMAN GJ, BORST P, SCHEPER RJ, MULDER NH, DE VRIES EG AND JANSEN PL (1994) Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. **Proc Natl Acad Sci U S A** 91:13033-13037.
- NIES AT AND KEPLER D (2007) The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). **Pflugers Arch** 453:643-659.
- NIKOALOU V, STRATIGOS AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. **British Journal of Dermatology.** 2014; 170:11-9.
- J. NORDENBERG, J. KORNFELD, L. WASSERMAN, M. SHAFRAN, E. HALABE, E. BEERY, O. LANDAU, A. NOVOGRODSKY, Y. SIDI. Novobiocin modulates colchicine sensitivity in parental and multidrug-resistant B16 melanoma cells. **J Cancer Res Clin Oncol** (1994)120:599-604.
- NTP – NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Studies of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in female Harlan sprague-dawley rats. **Toxicology and Carcinogenesis** n° 06-4468, 2006.

- NTP – NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, **Report of Carcinogens**, 12a edição, 2011.
- PELC T et al., Diabetes, cardiovascular disorders and 2,3,7,8-tcdd body burden in czech patients 50 years after the intoxication. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 123(3), 356–359. (2018) doi:10.1111/bcpt.13013.
- PESATORI, A.C.; CONSONNI, D.; RUBAGOTTI, M.; GRILLO, P.; BERTAZZI, P.A. Cancer incidence in the population exposed to dioxin after the “Seveso accident”: twenty years of follow up. **Environmental Health**. 2009, 8:39.
- PESSATTI, M. L.; et al. Variability of filtration and food assimilation rates, respiratory activity and multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in the mussel *Perna perna* under lead influence. **Braz. J. Biol.**, v. 62, n. 4A, p. 651-656, 2002.
- POLAND, A.; KNUTSON, J.C. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. **Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.** 22 (1982) 517–554.
- POZO, K., HARNER, T., WANIA, F., MUIR, D.C.G., JONES, K.C., BARRIE, L.A., 2006. Toward a global network for persistent organic pollutants in air: results from the GAPS study. **Environ.Sci. Technol.** 40, 4867– 4873.
- REID G, WIELINGA P, ZELCER N, VAN DER HEIJDEN I, KUIL A, DE HAAS M, WIJNHOLDS J AND BORST P (2003) The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Proc Natl Acad Sci U S A** 100:9244-9249.
- REILLY, T. P. et al. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapson. **Biochem Pharmacol**, v. 55, n. 6, p. 803-10, Mar 1998. ISSN 0006-2952.
- ROEDER, R.A., GARBER, M.J. , SCHELLING, G.T., 1998. Assessment of dioxins in foods from animal origins. **J Anim Sci.** 76, 142-151.
- RUSYN, I.; CORTON, J.C. Mechanistic considerations for human relevance of cancer hazard of di(2-ethylhexyl) phthalate. **Mutation Research-Reviews in Mutation Research**, v. 750(2), p. 141-158, 2012.
- SAQUIB, Q., et al. Hazards of low dose flame-retardants (BDE-47 and BDE-32): Influence on transcriptome regulation and cell death in human liver cells. **Journal of Hazardous Materials.** S0304-3894(16)30024-3. 2016.
- SCHERINGER, M. *et al.* **Environ. Sci. Pollut. R.** 11, 41–48 (2004).
- SINKKONEN, S., PAASIVIRTA, J., 2000. Degradation half-life times of PCDDs, PCDFs and PCBs for environmental fate modeling. **Chemosphere.** 40, 943-949.

- SJÖDIN, A., PATTERSON, G.D., BERGMAN, A., 2003. A review on human exposure to brominated flame retardants-particularly polybrominated diphenyl ether. **Environment International** 29, 829 e 839.
- SLINGLUFF, JR CL.; FLAHERTY, K.; ROSENBERG, SA, READ PW. **Cutaneous Melanoma**. In: DeVita Jr VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. Cancer, Principles and Practice of Oncology. 9th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2011.
- SLOT, A.J, MOLINSKI, S.V, COLE, S.P Cole, Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs), **Essays Biochem.** 50 (2011) 179–207
- STAPLETON, H. M., S. M. KELLY, R. PEI, R. J. LETCHER, AND C. GUNSCH. 2009. Metabolism of polybrominated diphenyl ethers (PBDE-209s) by human hepatocytes. **Environ. Health Persp.** 117:197–202. doi:10.1289/ehp.11807.
- STASINSKA, A., A. REID, A. HINWOOD, G. STEVENSON, A. CALLAN, J. ODLAND, AND J. HEYWORTH. 2013. Chemosphere Concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDE-209s) in residential dust samples from Western Australia. **Chemosphere** 91:187–193. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.12.044.
- STAUDINGER JL, MADAN A, CAROL KM, et al. Regulation of drug transporter gene expression by nuclear receptors. *Drug Metab Dispos.* 2003 May;31(5):523-7. PubMed PMID: 12695338; eng.
- STEIL et al., 2016. Efeitos do tcdd (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) e BDE-209-209 (decabromodifenil éter) na malignidade de células de melanoma murino b16-f1 in vitro.
- TENTORI, L.; LACAL, P.M.; GRAZIANI, G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. **Trends in Pharmacological Sciences**, vol. 34 n° 12, 2013.
- TEODORI, E. DEI.S, MARTELLI C. SCAPECHI, S, GUALTIERI, F. The functions and structure of ABC transporters: implications for the design of new inhibitors of Pgp and MRP1 to control multidrug resistance (MDR). **Current Drug Targets** 7: 893-909, 2006.
- TER BEEK, J; GUSKOV, A; SLOTBOOM, D.J. Structural diversity of ABC transporters, **J. Gen. Physiol.** 143 (2014) 419–435.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDE-209s) Project Plan, Office of Research and Development**, 2006.
- USEPA, 2015. Biomonitoring | Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDE-209s). <https://www.epa.gov/ace/biomonitoring-polybrominated-diphenyl-ethers-pbde-209s> (accessed 2018.03.28).
- VAN AUBEL RA, SMEETS PH, VAN DEN HEUVEL JJ AND RUSSEL FG (2005) Human organic anion transporter MRP4 (ABCC4) is an efflux pump for the purine end metabolite urate with multiple allosteric substrate binding sites. **Am J Physiol Renal Physiol** 288:F327-333.

- VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proc West Pharmacol Soc**, v. 54, p. 10-4, 2011. ISSN 0083-8969.
- X. LIU, J. WANG, C. LU, C. ZHU, B. QIAN, Z. LI, C. LIU, J. SHAO, J. YAN. The role of lysosomes in BDE 47-mediated activation of mitochondrial apoptotic pathway in HepG2 cells, *Chemosphere* 124 (2015) 10-21, doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.10.054.
- XIAO, X., et al. Effect of decabromodiphenyl ether (BDE-209-209) on lung tissues of pregnant maternal and offspring rats. **Int J Clin Exp Pathol** 2016;9(11):12068-12078.
- XIAO et al. Differential expression of ABCB5 in BRAF inhibitor-resistant melanoma cell lines. **BMC Cancer** (2018) 18:675.
- XU, T., et al., Dioxin induces expression of hsa-miR-146b-5p in human neuroblastoma cells, **J. Environ. Sci.** (2017).
- ZHAI, J.X., et al. Research progress of health effect of polybrominated diphenyl ethers. **Chinese Journal of Preventive Medicine** 01 Jun 2016,50(6):559-562.
- ZHI-HUA LI et al. Effects of Decabrominated Diphenyl Ether (PBDE-209-209) in Regulation of Growth and Apoptosis of Breast, Ovarian, and Cervical Cancer Cells. **Environmental Health Perspectives**; volume 120; number 4. April 2012.
- ZHOU, T.; ROSS, D.G.; DE VITO, M.J.; CROFTON, K.M. Effects of short-term *in vivo* exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats. **Toxicol Sci** 2001;61:76- 82.
- WAGNER M, HALILBASIC E, MARSCHALL HU, et al. CAR and PXR agonists stimulate hepatic bile acid and bilirubin detoxification and elimination pathways in mice. *Hepatology*. 2005 Aug;42(2):420-30. doi: 10.1002/hep.20784. **PubMed** PMID:15986414; eng
- WALKER, J.M. *Multi-Drug Resistance in Cancer*. **Life Sciences** 57-65 (Human Press: New York, 2010).doi:10.1007/978-1-60761-416-6.
- WAKABAYASHI, Y.; KIPP, H.; ARIAS, I.M. Transporters on demand: intracellular reservoirs and cycling of bile canalicular abc transporters. **J. Biol. Chem.** 2006, 281:27669-27673. doi: 10.1074/jbc.R600013200 originally published online May 31, 2006.
- WANG, M.C. BOHMANN, D., JASPER, H. JNK signaling confers tolerance to oxidative stress and extends lifespan in *Drosophila*. **Dev. Cell**. v. 5, n.5, p. 811--816, 2003.
- WANIA, F., MACKAY, D., 1996. Tracking the distribution of persistent organic pollutants. **Environ. Sci. Technol.** 30, A390-A396.
- WEBSTER, P. 2004. **Toxicology**: Exposure to Flame Retardants on the Rise. *Science*, 304: 1730-1730.

WHITLOCK J.R, J.P.; OKINO, S.T.; DONG, L.; KO, H.P.; CLARKE-KATZENBERG, R.; MA, W.; LI, H.; Induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription, **FASEB** **10** (1996) 809–818.

WIJNHOLDS J, EVERS R, VAN LEUSDEN MR, MOL CA, ZAMAN GJ, MAYER U, BEIJNEN JH, VAN DER VALK M, KRIMPENFORT P AND BORST P (1997) Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. **Nature medicine** 3:1275-1279.

WIT, C.A. 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. **Chemosphere**, 46(5):583-624.

WHO - World Health Organization. **Dioxins and Their Effect on Human Health**. WHO, Fact sheet n° 225, Geneva, 2014.