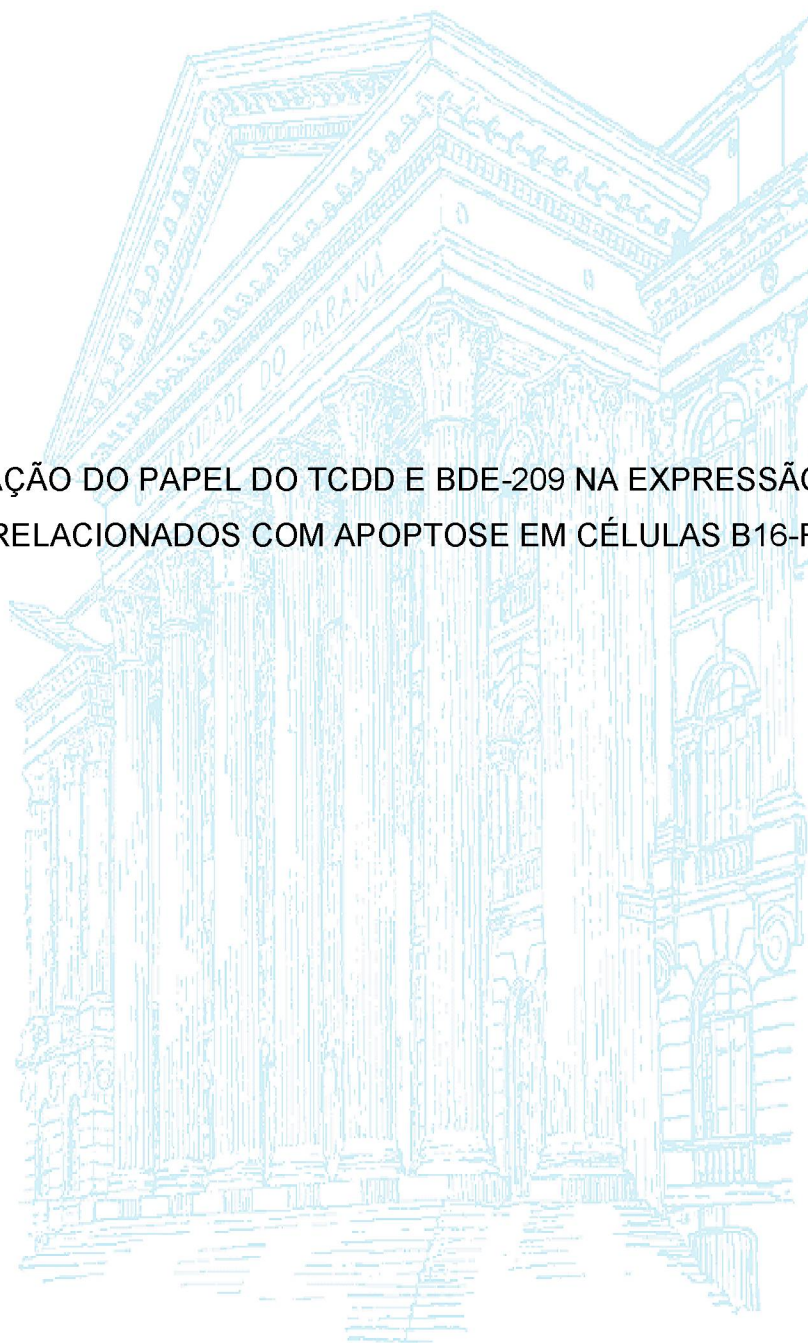


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ERICK LAURENT MOGGIO

INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DO TCDD E BDE-209 NA EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS COM APOPTOSE EM CÉLULAS B16-F1.



CURITIBA

2019

ERICK LAURENT MOGGIO

INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DO TCDD E BDE-209 NA EXPRESSÃO DE  
GENES RELACIONADOS A APOPTOSE EM CÉLULAS B16 F1.

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)

Moggio, Erick Laurent

Investigação do papel do TCDD e BDE-209 na expressão de genes relacionados com apoptose em células B16-F1. / Erick Laurent Moggio . – Curitiba, 2019.

77 p.: il.

Orientador: Ciro Alberto de Oliveira 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. Câncer 2. Melanoma 3. Poluentes orgânicos 4. Apoptose 5. Toxicologia I. Título II. Ribeiro, Ciro Alberto de Oliveira, 1960 III. Silva Filho, Benisio Ferreira da, 1980- IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 611.0181



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR 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 **ERICK LAURENT MOGGIO** intitulada: **Investigação do papel do TCDD e BDE-209 na expressão de genes relacionados com apoptose em células B16-F1**, após terem inquirido o aluno 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, 22 de Maio de 2019.

  
CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
MARIA CRISTINA LEME GODOY DOS SANTOS  
Avaliador Interno (UFPR)

  
LUIZA HELENA GREMSKI  
Avaliador Interno (UFPR)

## **AGRADECIMENTOS.**

Primeiramente a Deus, pois o Senhor tem me abençoado grandemente, concedendo a mim, não só as oportunidades, mas também a capacitação necessária para alcançar meus objetivos, por fazer de mim o homem que sou hoje, pelas pessoas que tens colocado na minha vida, pelo seu amor e benevolência, pela força que compartilha comigo nos momentos de dificuldade.

A minha família por me apoiar na minha trajetória, em especial a minha mãe Dileuza, a quem eu amo tanto e devo minha vida, por ter me mostrado o caminho correto a seguir, por ser essa pessoa guerreira a quem tomo como exemplo.

Ao meu pai Claudemir e meu irmão Douglas pelos momentos de descontração, por estarem presentes na minha vida, formando o maior alicerce de um homem que é a família.

Aos meus amigos e colegas, com os quais compartilho inúmeras experiências, mas com carinho especial ao meu melhor amigo e de longa data Elevelton, com o qual posso contar eternamente, amigo de todas as horas, seja nos momentos tristes ou alegres. A Micheli, minha grande amiga que tive o prazer de conhecer durante esses dois anos trabalhando e convivendo juntos, enfrentando as dificuldades inerentes da pesquisa científica e da vida.

Aos demais colegas de laboratório Fernanda, Jessica, Gislene e Aliciane por compartilharem seus conhecimentos e experiências. Ao Prof. Dr. Benisio Ferreira da Silva Filho pela coorientação, auxílio, dedicação e amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, pelos esforços empreendidos para realização da pesquisa científica, por ter me aceito e concedido a oportunidade de desenvolver esse trabalho, pela dedicação e disposição em resolver questões no decorrer do trabalho. Ao Prof Dr. Francisco Filipak Neto pela sua colaboração e auxílio referente a dúvidas na realização de experimentos e preparo de soluções.

Aos laboratórios de Biologia Molecular de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos e de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados do departamento de Biologia Celular, por partilharem de seus equipamentos, reagentes, técnicas e protocolos.

As agências fomentadoras, pela disposição de bolsas, tanto de mestrado como doutorado e iniciação científica. Por financiarem e acreditarem na pesquisa

científica brasileira. Aos demais colegas, professores, familiares que sempre me apoiaram e torceram por mim.

## RESUMO

A presença de poluentes ambientais nas últimas décadas é cada vez maior, dentre eles os poluentes orgânicos persistentes (POPs) constituem uma das principais classes destas moléculas sendo a maior parte de origem antrópica. A exposição do homem a essas substâncias favorece o surgimento de diversas enfermidades incluído o câncer, uma das patologias mais graves do século XXI, além de interferirem no prognóstico dessa doença. Dos tipos de câncer de pele o melanoma é o de menor incidência, no entanto, é altamente agressivo e de difícil tratamento, gerando dessa forma um pior prognóstico. Dados mais recentes do nosso grupo de pesquisa sugerem que a exposição aos xenobióticos TCDD e BDE-209 em determinadas concentrações são responsáveis por aumentar a proliferação de células tumorais. O TCDD, mesmo relatado como uma molécula carcinogênica, apresenta poucas informações quanto ao seu papel modulador de resistência ao estresse químico em células expostas em cultura. Em relação ao BDE-209 a literatura demonstra conhecer muito pouco a respeito de seu possível papel carcinogênico e efeito citotóxico. Com base nessas informações, o objetivo principal desse trabalho é, investigar se a exposição a estes xenobióticos é capaz de modular a expressão de genes relacionados com a resistência a morte celular em células neoplásicas melanocíticas murinas (B16-F1), levando a formação de um perfil celular mais maligno. De acordo com os resultados o TCDD, interfere no fenótipo dessas células, estimulando processos proliferativos de sobrevivência e formação de colônias, caracterizando assim alterações em seu perfil celular em determinadas concentrações. Já o BDE-209 apresenta menor interferência no perfil celular necessitando de concentrações maiores para gerar uma resposta celular mais evidente. Existem atualmente em nosso grupo de pesquisa, estudos em andamento que assim como este fornecem dados para uma melhor compreensão do papel dessas moléculas no mecanismo de morte e também na proliferação e migração celular.

**Palavras-chave:** TCDD, BDE-209, Poluentes Orgânicos, Apoptose, Melanoma, Toxicologia Celular.

## **ABSTRACT.**

The presence of environmental pollutants in recent decades is increasing, among them persistent organic pollutants (POPs) constitute one of the main classes of these molecules and most of them of anthropic origin. The exposure of men to these substances favors the emergence of several diseases including cancer, one of the most serious diseases of the 21st century, besides interfering in the prognosis of this disease. Of the types of skin cancer, melanoma has the lowest incidence; however, it is highly aggressive and difficult to treat, thus generating a worse prognosis. More recent data from our research group suggest that exposure to TCDD and BDE-209 xenobiotics at certain concentrations is responsible for increasing tumor cell proliferation. TCDD, even reported as a carcinogenic molecule, provides little information about its modulating role of resistance to chemical stress in cells exposed in culture. Regarding BDE-209, the literature shows little knowledge about its possible carcinogenic role and cytotoxic effect. Based on this information, the main objective of this work is to investigate whether exposure to these xenobiotics is able to modulate the expression of genes related to resistance to cell death in murine melanocytic neoplastic cells (B16-F1), leading to the formation of a most malignant cell profile. According to the results TCDD interferes in the phenotype of these cells, stimulating proliferative processes of survival and formation of colonies, thus characterizing changes in their cellular profile at certain concentrations. On the other hand, BDE-209 presents less interference in the cellular profile requiring higher concentrations to generate a more evident cellular response. There are currently in our research group ongoing studies that, like this one, provide data for a better understanding of the role of these molecules in the mechanism of death and also in cell proliferation and migration.

Keywords: TCDD, BDE-209, Organic Pollutants, Apoptosis, Melanoma, Cellular Toxicology.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Formula Química do BDE-209.....	18
FIGURA 2: Formula Química do TCDD.....	20
FIGURA 3: Via extrínseca da apoptose.....	24
FIGURA 4: Esquema base da via intrínseca da apoptose.....	25
FIGURA 5: Estrutura tridimensional da proteína Bax, 9 $\alpha$ hélices, regiões N e C terminais.....	26
FIGURA 6: Relação BAX/BCL2.....	27
FIGURA 7: Principais vias relacionadas a survivina.....	29
FIGURA 8: Via de Sinalização fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) .....	32
FIGURA 9: Relação p53 e apoptose.....	35
FIGURA 10: Células de melanoma murino B16-F1 em cultivo celular.....	39
FIGURA 11: Ensaio Clonogênico .....	54

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Controles utilizados no ensaio Cristal Violeta nas exposições de 24hrs e 15 dias ao TCDD e BDE-209.....	47
Gráfico 2: Cristal Violeta, avaliação da proliferação celular mediante exposição de 24 hrs a TCDD e BDE-209.....	48
Gráfico 3: Cristal Violeta, avaliação da proliferação celular mediante exposição de 15 dias a TCDD e BDE-209.....	49
Gráfico 4: Controles utilizados no ensaio Vermelho neutro nas exposições de 24hrs e 15 dias ao TCDD e BDE-209.....	49
Gráfico 5: Vermelho neutro, avaliação do sistema endolisossomal, mediante exposição de 24 hrs a TCDD e BDE-209.....	50
Gráfico 6: Vermelho neutro, avaliação do sistema endolisossomal, mediante exposição de 15 dias a TCDD e BDE-209.....	51
Gráfico 7: Controles utilizados no ensaio MTT, nas exposições de 24hrs e 15 dias a TCDD e BDE-209.....	51
Gráfico 8: MTT, avaliação do metabolismo mitocondrial, mediante exposição 24hrs a TCDD e BDE-209.....	52
Gráfico 9: MTT, avaliação do metabolismo mitocondrial, mediante exposição de 15 dias a TCDD e BDE-209.....	53
Gráfico 10: Expressão do gene BAX frente exposição aguda (24hrs) a TCDD e BDE-209.....	55
Gráfico 11: Expressão do gene BCL2 frente exposição aguda (24hrs) a TCDD e BDE-209.....	56
Gráfico 12: Expressão do gene BIRC5 frente exposição aguda (24hrs) a TCDD e BDE-209.....	57
Gráfico 13: Expressão do gene PI3KCA frente exposição aguda (24hrs) a TCDD e BDE-209.....	57
Gráfico 14: Expressão do gene TP53 frente exposição aguda (24hrs) a TCDD e BDE-209.....	58
Gráfico 15: Expressão do gene BAX frente exposição crônica (15 dias) a TCDD e BDE-209.....	59
Gráfico 16: Expressão do gene BCL2 frente exposição crônica (15 dias) a TCDD e BDE-209.....	59

Gráfico 17: Expressão do gene BIRC5 frente exposição crônica (15 dias) a TCDD e BDE-209.....	60
Gráfico 18: Expressão do gene PI3KCA frente exposição crônica (15 dias) a TCDD e BDE-209.....	61
Gráfico 19: Expressão do gene TP53 frente exposição crônica (15 dias) a TCDD e BDE-209.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classes de PI3Ks, genes e isoformas correspondente, bem como a relação subunidade catalítica e regulatória.....	31
Tabela 2: Genes e sequências dos nucleotídeos correspondentes.....	44
Tabela 3: Percentual de células marcada e não marcada pelo azul de Tripano.....	46
Tabela 4: Grupos analisados e percentual da área ocupada do poço no ensaio clonogênico.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

(ABETRE) - Associação de Empresas de Tratamento, Recuperação e Disposição de Resíduos Especiais

(AhR) - Receptor Aril-hidrocarboneto ou de hidrocarbonetos aromáticos.

(AKT) - Proteína quinase  $\beta$

(AKT 1) - Proteína Quinase  $\beta$  1

(APAF) - Fator de Ativação de Protease Apoptóticas

(ATCC) - American Type Culture Collection

(BCRJ) - Banco de Células do Rio de Janeiro

(BCL-2) - Família de Linfoma Leucêmico B2

(BDE-47) -Tetrabromodifenil Éter 47

(BDE-99) - Pentabromodifenil Éter 99

(BDE-153) - Hexabromodifenil Éter 153

(BDE- 209) - Decabromodifenil Éter 209

(BIRC5) - Gene da Survivina

(B16- F1) - Linhagem Estabelecida Melanoma Murino F1

(CAS) - Chemical Abstract Service

(CDKN2A) - lócus gênico (Ciclina Dependente de quinase)

(CDNA) - DNA Complementar

(DISC) - Complexo de Sinalização Indutor de Morte

(DMSO) - Dimetilsulfóxido

(DNA) - Ácido Desoxirribonucleico

(EIF4E) - Fator de Iniciação de Tradução Eucariótica

(FADD) - Domínio de Morte Associado a FAZ

(FAS) - Receptor de morte (apoptose)

(GPCRs) - Receptores Acoplados a Proteína G

(hFPECs) - Células Epiteliais Isoladas de Palatinas Humanas

(IAP) - Família de Proteínas Inibidoras da Apoptose

(IARC) - Agência Internacional de Pesquisa do Câncer

(IDA) - Ingestão Diária Aceitável

(INCA) - Instituto Nacional do Câncer

(Kb) - Quilobyte

(KDa) - Quilodaltons

(MAPK) - Proteína Ativada por Mitógeno  
(MDM2) - Minuto Duplo Murino 2  
(MDM4) - Minuro Duplo Murino 4  
(MIRs) - Micro RNAs  
(mTORC1) - Complexo Rampamicina 1 de Mamíferos  
(mTORC2) - Complexo Rampamicina 2 de Mamíferos  
(PBDEs) - Éteres Difenílicos Polibromados  
(PBS) - Tampão Fosfato-Salino  
(PCR) - Reação em Cadeia da Polimerase  
(PDK1) - Quinase 1 Dependente de Fosfoinosítídeos  
(PIP 3) - Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato  
(PI3K) - Fosfatidilinositol-3-quinase  
PI3K-AKT) - Via de sinalização PI3K-AKT  
(PI3KCA) - Gene Fosfatidilinositol-3-quinase C.A  
(POP) - Poluente orgânicos persistentes  
(PTEN) - Gene Fosfatase e homólogos de tensina  
(qPCR) – quantitative PCR (PCR quantitativa)  
(RNA) - Ácido Ribonucleico.  
(SGKs) - Quinases Reguladas por Glicocorticóides  
(S6K) - S6 quinase p70 Ribossômica  
(TCDD) - 2,3,7,8-Tetraclorodibenzeno-p-dioxina  
(TGFβ) - Fator de Crescimento Transformante β  
(TNF) - Fator de Necrose Tumoral

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1 DECABROMO DIFENIL ÉTER - BDE-209. ....	16
2.2 2,3,7,8-TETRACLORODIBENZENO-P-DIOXINA - TCDD. ....	17
2.3 PROBLEMAS AMBIENTAIS CAUSADOS PELO BDE-209 E TCDD .....	18
2.3.1 PROPRIEDADES QUÍMICAS, DISTRIBUIÇÃO E TOXICIDADE DO BDE-209 E TCDD	18
<b>2.4 O MELANOMA COMO MODELO DE ESTUDO</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5 MORTE CELULAR: GENES E PROTEÍNAS ASSOCIADAS</b> .....	<b>24</b>
Gene e Proteínas BAX e BCL2. ....	26
Proteína Survivina e Gene BIRC5.....	28
Gene PIK3CA/Via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). ....	31
Gene Tp53/ Proteína P53. ....	33
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>37</b>
<b>4 HIPÓTESE</b> .....	<b>38</b>
<b>5 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>39</b>
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	39
<b>6 METODOLOGIA</b> .....	<b>39</b>
6.1 MODELO DE ESTUDO .....	39
6.2 CULTIVO CELULAR .....	41
6.3 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS ANALISADOS – TEMPOS DE EXPOSIÇÃO E PREPARO DAS CONCENTRAÇÕES TESTE .....	42
6.4 AZUL DE TRIPAN.....	42
6.5 VERMELHO NEUTRO .....	43
6.6 ENSAIO MTT .....	43
6.7 CRISTAL VIOLETA .....	44
6.8 CLONOGÊNICO .....	44
6.9 DESENHO DOS <i>PRIMERS</i> PARA ANÁLISE DE QPCR.....	44
6.10 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E CONVERSÃO PARA CDNA.....	45
6.11 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA - QPCR .....	46
6.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA. ....	46
<b>7 RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
7.1 VIABILIDADE/CITOTOXICIDADE CELULAR. ....	47

Ensaio com Azul de Tripán:.....	47
Ensaio de Cristal Violeta: .....	47
Ensaio de Vermelho Neutro. ....	50
Ensaio MTT. ....	52
ENSAIO CLONOGÊNICO. ....	54
<b>8 DISCUSSÃO. ....</b>	<b>63</b>
<b>9 CONSIDERAÇÕES FINAIS. ....</b>	<b>69</b>
<b>10 PERSPECTIVAS FUTURAS. ....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS. ....</b>	<b>72</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Com a revolução industrial ocorrida no século XVIII e IX, associado ao atual aumento da demanda por novos produtos industrializados, ocorreu nesses períodos um aumento expressivo do lançamento de grandes quantidades de substâncias químicas nos ambientes naturais. Dentre a diversidade de moléculas liberadas no ambiente, uma das principais classes encontradas está associada a determinados compostos orgânicos, compreendendo um grupo de moléculas de grande variação tanto em tamanho como em interação com a biota.

Além desses compostos possuírem vários grupos funcionais, sendo essa uma das características que determina a funcionalidade da molécula, uma grande parte são persistentes no ambiente sendo classificados como poluentes orgânicos persistentes (POPs), definidos como substâncias químicas orgânicas sintéticas, possuindo combinações particulares de características físico-químicas. Dentre elas a resistência a degradação química, semi-volátil, bioacumulação, além de propriedades tóxicas associadas a diversos males dos quais alguns tipos de câncer se fazem inclusos. (FÂNG. et al., 2015. ALMEIDA. et al., 2007).

Alguns desses compostos são denominados de sensibilizadores celulares, podendo após algum tempo de exposição interferir com mecanismos que atuam sobre processos celulares como a proliferação, potencializando assim características tumorais (STEIL. 2016). Dentre essas moléculas encontramos o TCDD (2,3,7,8-Tetraclorodibenzeno-p-dioxina) e o BDE-209 (2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodifenil éter) as quais são considerados poluentes orgânicos persistentes onde ambos também apresentam características citotóxicas comprovadas interferindo com o metabolismo celular.

Um dos mecanismos envolvidos neste tema diz respeito à morte celular. Portanto, com o intuito de trazer luz para essa questão o presente estudo utilizará células de melanoma murino B16F1, que deverão ser expostas a diferentes concentrações dos xenobióticos BDE-209 e TCDD, para posteriormente avaliar alterações na expressão de genes principalmente associados com morte celular, mas também buscando entender características fenotípicas celulares.

Em resumo, estaremos avaliando e discutindo se os xenobióticos descritos acima podem alterar determinadas características dessas células, tornando-as mais resistentes ao estresse químico e, assim, verificar se são potencialmente capazes de interferir com os padrões tumorais celulares da linhagem de melanoma murino B16F1.

Além disso os resultados apresentados nesse estudo são parte de uma linha de pesquisa recente, desenvolvida pelo Laboratório de Toxicologia Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Outros projetos adotando metodologias *in vitro* estão sendo desenvolvidos e buscam investigar o papel dessas moléculas nos mecanismos de transporte molecular através das proteínas transportadoras *ABC-cassette* (famílias MDR e MRP) bem como nos mecanismos de invasão e malignidade; enquanto outra parte do projeto é a avaliação da proliferação e desenvolvimento de tumores nos estudos *in vivo*

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

O ser humano sempre encontrou na natureza os recursos necessários para sua sobrevivência. No entanto, com o desenvolvimento da sociedade foi necessário aprimorar formas de extrair e transformar esses recursos acabando por gerar, não só o produto desejado, mas também resíduos ou subprodutos oriundos da manipulação desses materiais. Começando com a revolução industrial e atualmente de forma mais

intensificada, o aumento da demanda por novos produtos fez com que nas últimas décadas houvesse um lançamento cada vez mais crescente e constante de um grande volume de substâncias químicas nos ambientes naturais. De acordo com *Chemical Abstract Service (CAS)*, até fevereiro de 2016 foram registradas cerca de 108,2 milhões de substâncias orgânicas e inorgânicas produzidas pelo homem.

A indústria nos seus mais variados segmentos, acaba por criar uma grande diversidade de materiais onde muitos desses altamente inflamáveis, o que tem colocado em risco o seu uso principalmente em utensílios caseiros de uso constante pelo homem. Face a esse risco, foi necessário o desenvolvimento ou aprimoramento de moléculas que fossem capazes de tornar esses produtos menos inflamáveis, surgindo assim uma nova classe de compostos químicos, os denominados retardantes de chamas (CAS, 2017, CHEN et al., 2016).

## 2.1 Decabromo difenil éter - BDE-209.

O mecanismo de ação dessas moléculas como retardantes de chama, mostra que são capazes de imobilizar os radicais livres provenientes dos primeiros eventos da combustão, os quais são responsáveis pela propagação do processo de queima, evitando assim sua propagação. Os PBDEs (éteres difenílicos polibromados) com atualmente 209 congêneres, dentre eles o BDE-209, são amplamente utilizados na indústria têxtil, em materiais de construção e principalmente em produtos eletrônicos os quais em geral são construídos com material sintético altamente inflamáveis (COVACI et al., 2011)

O emprego dessa classe de substâncias aumentou rapidamente e está dividida em compostos halogenados e bromados. Essas moléculas atenderam rapidamente o mercado industrial visto que uma das características mais importantes é o seu uso

como retardantes de chama mesmo em altas temperaturas. Os retardantes de chama são muito utilizados em produtos domésticos, principalmente em eletroeletrônicos, e por isso são facilmente encontrados nesses ambientes em altas concentrações como na poeira doméstica. Dentre essas moléculas que funcionam como eficientes ante chamas, encontram-se os PBDEs (éteres difenílicos polibromados). Devido à sua natureza lipofílica, essas moléculas atingem rapidamente a cadeia alimentar e hoje resíduos desses compostos podem ser detectados no tecido adiposo, soro e até mesmo no leite materno, além de estar presentes também na água, no ar e no solo em diferentes concentrações. Assim uma das principais vias de exposição aos PBDEs constitui a ingestão de alimentos com elevado teor lipídico (ALAE et al., 2003).

## 2.2 2,3,7,8-Tetraclorodibenzeno-p-dioxina - TCDD.

Uma outra classe de moléculas que surge especialmente em função da combustão de produtos industrializados, são as dioxinas que possuem em sua composição anéis tricíclicos aromáticos, anéis benzênicos, além de átomos de cloro, assim de forma semelhante com os PBDEs é possível a formação de uma grande diversidade de compostos tipo *dioxin-like* dependendo da posição que os átomos de cloro ocupam nos anéis benzênicos (ASSUNÇÃO, PESQUERO, 1999; CABRITA et al., 2003; WHO, 2014). As dioxinas são pertencentes à família dos organoclorados dentre as quais encontramos a 2,3,7,8-Tetraclorodibenzeno-p-dioxina (TCDD), cuja molécula é altamente tóxica, sendo gerada principalmente nos processos de produção industrial de pesticidas, cloração da água, fundição de metais, além de estar presente na fumaça gerada pela queima de produtos industrializados (IRIGARAY et al. 2007, MANNETJE. A, et al., 2015).

## 2.3 PROBLEMAS AMBIENTAIS CAUSADOS PELO BDE-209 E TCDD

Segundo a Associação Brasileira de Empresas de Tratamento Recuperação e Disposição de Resíduos Especiais (ABETRE), somente 600 mil toneladas dos cerca de 2,9 milhões dos resíduos industriais perigosos gerados anualmente no Brasil recebem tratamento adequado, sendo o excedente depositado em locais geralmente de forma inapropriada (NASCIMENTO e CRUZ, 2015).

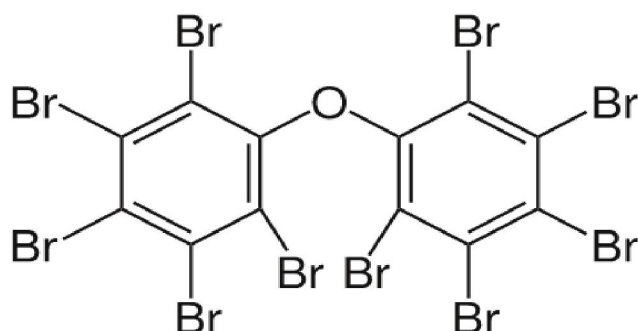
Tanto o BDE-209 quanto o TCDD podem ser encontrados facilmente dispersos nos ambientes naturais onde devido às suas propriedades químicas tem como destino comum a cadeia alimentar, se concentrando nos níveis tróficos superiores. Portanto, são compostos considerados contaminantes ambientais tóxicos visto que possuem características como persistência e capacidade bioacumulativa (PESATORI et al., 2009; FIORITO et al., 2017), onde a população humana encontra-se potencialmente exposta de forma crônica a esses compostos.

### 2.3.1 PROPRIEDADES QUÍMICAS, DISTRIBUIÇÃO E TOXICIDADE DO BDE-209 E TCDD

O BDE-209 (Figura 1) é um composto polibromado representante dos PBDEs que são considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs) devido às suas características como lipofilicidade, bioacumulação e persistência no ambiente. São, portanto, denominados de polibromados gerados em três formas distintas: pentaBDE, octaBDE e o decaBDE. Devido aos aspectos químicos da molécula, existem cerca de 209 variações possíveis de PBDEs, o que é definido pela posição do Br no duplo anel aromático da molécula. Dentre os diferentes grupos possíveis o decaBDE ou BDE-209 (2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-deca bromodifenil éter) é comercializado na forma de uma mistura de octa, nona e decaBDE. Essas moléculas podem no processo de

degradação natural gerar subprodutos com quantidade menor de bromos, como o penta e o triBDEs, os quais apresentam bioacumulação e toxicidade superiores às moléculas originais (KITAMURA et al., 2005, CHEN et al., 2016, AHN et al. 2006. DARNERU. 2003).

FIGURA 1 – Fórmula química do 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodifenil éter (BDE-209).



FONTE: (NTP, 2011)

A contaminação por PBDEs está associada principalmente à exposição de resíduos provenientes de centros urbanos através de matrizes abióticas ou bióticas. As fontes de contaminação em potencial são o escoamento de aterros sanitários, bem como o uso de lodo de esgoto em práticas agrícolas. O BDE-209 é a forma química mais encontradas nos ambientes naturais se distribuindo no ar, água e sedimento, se comparado com os seus congêneres. O fato de apresentar uma grande quantidade de átomos de bromo, essa molécula tende a ser fortemente ligada a outras moléculas, no entanto, pode ser degradada naturalmente gerando por exemplo o penta-PBDE que é facilmente particionado em sistemas aquáticos (NELSON et al., 2014). Além disso, o BDE-209 sofre degradação fotolítica e biológica o que favorece o surgimento de uma grande quantidade de substâncias polibromadas derivadas e muitas vezes sem o conhecimento do seu papel tóxico. (VIGANO. L, ROSCIOLI. C, GUZZELLA. L. 2011).

Recentemente foi publicado um método instrumental para detecção de PBDEs em amostras fecais. As amostras coletadas de crianças Australianas apresentaram o

BDE-209 como a molécula mais abundante dentre os congêneres procurados. Além disso, a concentração média de BDE-209 (8,7ng/g/peso corporal), representa 95,4% da concentração total de PBDEs nas fezes (ENGLISH et al., 2017). Esses dados mostram que além de presente no ambiente essas moléculas são biodisponíveis e constituem um risco constante para as populações humanas.

O caráter lipofílico do BDE-209, torna essa molécula um dos fatores determinantes para seu estudo em toxicologia celular. Dados mostram que o BDE-209 é encontrado no tecido sanguíneo humano, leite materno, cordão umbilical e placenta (HOOPER. & MCDONALD, 2000). De acordo com Chen et al. (2016), utilizando larvas de peixe-zebra para análise transcriptômica, foi observado que 304 genes foram diferentemente expressos após uma exposição aguda ao BDE-209, sendo que cerca de 70% sofreram *down-regulation*. Segundo os autores, os processos biológicos mais presentes estão relacionados com o metabolismo de substâncias orgânicas mediada por ligações intracelulares e atividade catalítica.

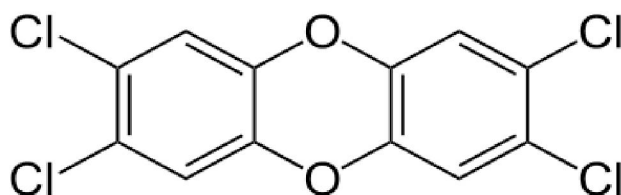
Os PBDEs podem modular aspectos relacionados com a apoptose celular, desencadeando efeitos como: encolhimento da célula, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e por fim formação dos corpos apoptóticos. Todos esses mecanismos parecem ser oriundos da ativação de proteases específicas das caspases (LEE et al., 2005). Além disso por meio da análise do ciclo celular, foi descrito que a exposição de células RTG-2 (*fibroblastic-like* da Truta Arco-íris) ao BDE-47 e BDE-209, ocorre um aumento da proporção de células estacionadas na fase sub-G1 do ciclo celular (JIN et al., 2010)

Os organoclorados (OCs) são moléculas utilizadas mais comumente como produtos da fabricação de defensores agrícolas e oriundas de processos industriais. Essas substâncias se propagam facilmente pelo ambiente através de correntes

atmosféricas e marítimas, pois são compostos que se volatilizam e complexam com material particulado, podendo assim migrar para outros ambientes distantes das suas fontes de emissão (XIUTING. H, et al., 2011).

Os OCs apresentam em geral uma grande estabilidade química, e portanto, persistem no ambiente natural por muitos anos dependendo do tipo de molécula. Além disso, são substâncias de baixa solubilidade na água e alta lipofilicidade. A grande família dos compostos organoclorados tem como destaque as dioxinas como um dos seus subgrupos, dentre as quais se destaca o 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina (TCDD) (Figura 2), a qual é conhecida como a de maior efeito tóxico para as células (MANNETJE. A, et al., 2015).

FIGURA 2 – Fórmula química do 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina (TCDD)



FONTE: (NTP, 2011).

As dioxinas consistem em uma classe de moléculas consideradas como contaminantes orgânicos persistentes podendo ter origem involuntária durante a combustão principalmente de produtos industrializados. O TCDD tem demonstrado várias formas de toxicidade para os organismos vivos como: teratogenicidade, toxicidade reprodutiva, disfunção imune, carcinogenicidade, além de distúrbios neurocomportamentais (FUJISAWA et al., 2017). Além disso, a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) em 1997 classificou o TCDD como um agente carcinogênico. Segundo a IARC ocorre uma correlação positiva da exposição ao TCDD com a ocorrência de sarcomas de partes mole, linfoma não-Hodkin e câncer



de pulmão. Sua classificação como carcinógeno de Grupo 1 (agente comprovadamente carcinogênico a humanos), assim como o tabaco, o vírus HIV e a radiação solar, tem por base dados que indicam a promoção do tumor principalmente pelos distúrbios descritos nos mecanismos de replicação celular e morte celular. Esses mecanismos parecem ter uma ação mediada pela ativação do receptor aril hidrocarboneto (Ahr) (CHANG et al., 2014).

Estudos recentes demonstraram que em células epiteliais isoladas de palatinas fetais humanas (hFPECs), o TCDD foi capaz de estimular a proliferação celular, promover a progressão das células da fase G1 para fase S, além de aumentar a quantidade de células que entram na fase G2/M. Outro fator relevante com relação a esse contaminante é a sua capacidade de ativar a cascata de sinalização PI3K/AKT. (GAO et al., 2016). O TCDD pode atuar de forma direta ou indiretamente no RNA e/ou expressão proteica de AP1, Bach-2, BCL-6, Pax5 e Blimp1, que por sua vez são reguladores da diferenciação em células B primárias de ratos e humanos. Além disso o TCDD estimula vias que incluem, adesão focal e regulação de actina, proteína importante na organização do citoesqueleto (KOVALOVA et al., 2016).

## **2.4 O MELANOMA COMO MODELO DE ESTUDO**

De acordo como a Agencia Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) estima-se que de forma global os casos de câncer aumentaram para 18,1 milhões e a mortalidade para 9,6 milhões em 2018, além disso a prevalência de pessoas vivas dentro de 5 anos com diagnóstico de câncer é cerca de 43,8 milhões.

Dentre os mais variados tipos de câncer, o câncer de pele é o que mais atinge a população brasileira, correspondendo a cerca de 30% dos tumores malignos registrado. Entre os tipos de câncer de pele o melanoma é o de menor incidência,

porém é o mais agressivo, resultando em um pior diagnóstico. Além dos fatores genéticos, a exposição à radiação ultravioleta contribui para o desenvolvimento desta patologia. Estima-se que cerca de 80% dos melanomas estejam associados a esse tipo de exposição, especialmente em pessoas de pele sensível com pele clara, que sofrem mais com a exposição ao sol. Sendo assim o oposto é verdadeiro, visto que indivíduos de pele escura possuem menor risco de desenvolver melanoma (INCA, 2018). Isso se confirma quanto é observado que no Paraná existe um grande número de casos de melanomas em relação aos demais estados do Brasil, onde a explicação pode ser a origem da população pela migração europeia. A estimativa para o Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), entre 2018 e 2019 é de 6.260 novos casos da doença (IBGE, 2017; INCA 2019).

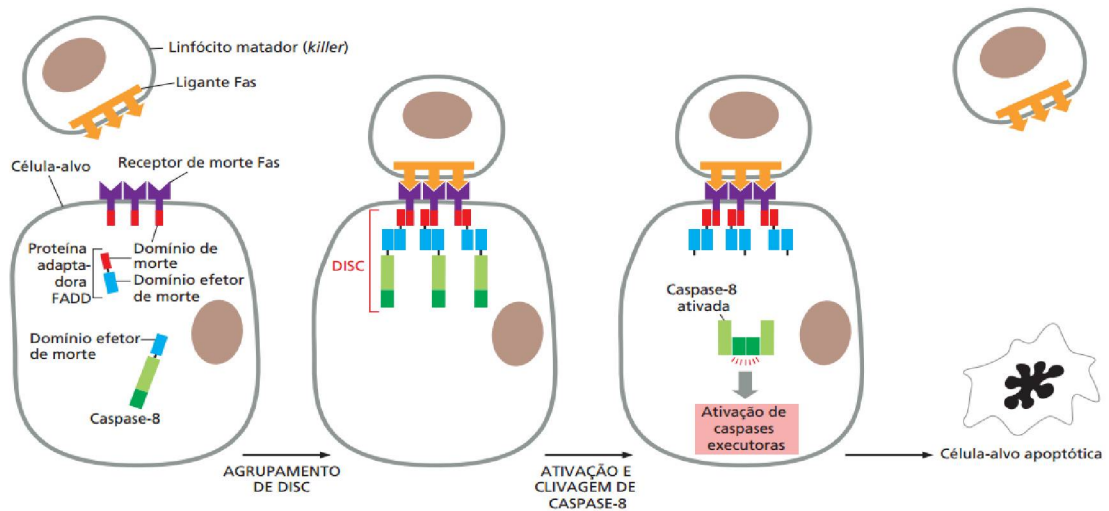
Como citado anteriormente, o ambiente é um dos fatores que interfere na incidência da doença. No presente estudo investigamos se o TCDD e o BDE-209 podem atuar sobre os mecanismos de morte celular causando particularmente um pior prognóstico desse tipo de câncer. Para isso estaremos utilizando células de melanoma murinho da linhagem B16-F1 umas das linhagens celulares mais bem descrita com relação ao método de cultivo. Assim, temos utilizado essa linhagem em diversos estudos no Laboratório de Toxicologia Celular, em parte pela sua excelente resposta mimética, além de ser empregada nos estudos tanto com métodos *in vitro* como *in vivo*. Além disso a linhagem B16 é tida como um modelo murino relevante na oncologia experimental, pois tipos celulares distintos como B16-F1 e B16-F10 advêm de uma mesma origem (camundongo *mus musculus*), onde a primeira é menos agressiva que a segunda. Dessa forma tais informações permitem uma comparação, não só entre os tipos celulares, mas também entre o método *in vivo* e o *in vitro*. (FERREIRA, M. B. 2014. OVERWIJK. W, W. RESTIFO. N, P. 2001).

## 2.5 MORTE CELULAR: GENES E PROTEÍNAS ASSOCIADAS.

A apoptose corresponde a um processo de morte celular natural e é evolutivamente conservado para a remoção de células senescentes, danificadas ou potencialmente perigosas, apresentando esse mecanismo um papel chave na fisiologia e homeostase dos tecidos (ALBERTS et al., 2017). Quando a célula entra em apoptose, ocorrem eventos morfológicos que são consequências de alterações moleculares como a perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, retração da célula, condensação da cromatina e formação de corpos apoptóticos. Essas alterações caracterizam morfológicamente este tipo de morte celular (GRIVICICH, I; REGNER, A; ROCHA. A, B. 2007, GAO et al., 2016).

De acordo com Alberts et al. (2017) são descritas duas vias de ativação da apoptose, a extrínseca e a intrínseca. A via extrínseca, ocorre mediante sinalização extracelular, ativando receptores de morte localizados na membrana plasmática pertencentes à família de proteínas conhecidas como Fator de Necrose Tumoral (TNF). O mecanismo mais conhecido é a ativação do receptor Fas pelo ligante Fas, presentes por exemplo na membrana de linfócitos, onde após a ativação a cauda citosólica do receptor recruta FADD (domínio de morte associado a Fas) gerando uma cascata bioquímica de ativação que culmina com a ativação de caspases. Portanto, cada proteína FADD aciona uma pró-caspase-8, e/ou pró-caspase-10, conhecidas como caspases iniciadoras que formam o DISC (Complexo de Sinalização Indutor de Morte). Quando ativadas no complexo DISC as caspases iniciadoras ativam diretamente pró-caspases efetoras (Caspases 3 ou 7), ou indiretamente através de eventos relacionados com as mitocôndrias com ativação de pró-caspase iniciadora (Caspase 9), levando a célula à morte celular por apoptose (ALBERTS. et al., 2017) (Figura 3).

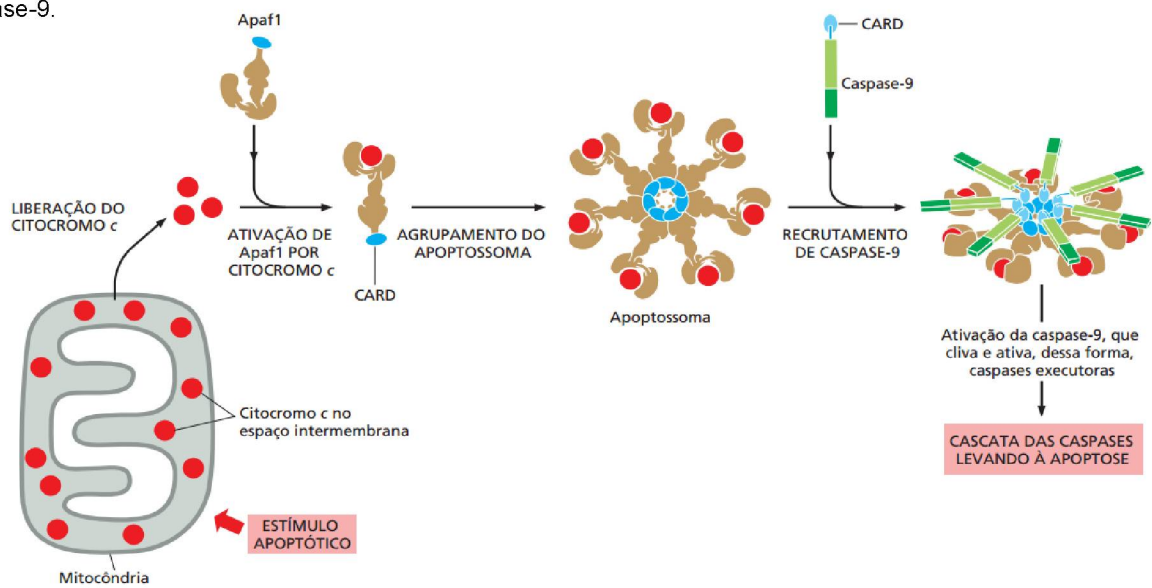
FIGURA 3: Ativação da via extrínseca da apoptose mediada por ligantes Fas.



FONTE: (ALBERTS *et al.*, 2017)

A via intrínseca por sua vez é ativada por mecanismos intracelulares, podendo ser uma resposta à falta de oxigênio, nutrientes ou mesmo pela quebra no DNA. Esses eventos podem dependendo a via culminar com modificações na permeabilidade da membrana externa das mitocôndrias, levando à liberação de proteínas e outras moléculas mitocondriais pró-apoptóticas para o citosol. Dentre essas moléculas encontra-se o citocromo c que se liga a uma proteína adaptadora Apaf 1 (fator-1 de ativação da protease apoptóticas) no citosol, formando uma estrutura denominada de apoptossomo que por sua vez, recruta pró-caspase-9 iniciadora que ativa as pró-caspases efetoras (Caspase 3 ou 7), induzindo a apoptose (ALBERTS. et al., 2017. JENG. et al., 2018) (Figura 4).

FIGURA 4: Esquema básico da via intrínseca da apoptose via liberação de citocromo c e ativação de pró-caspase-9.

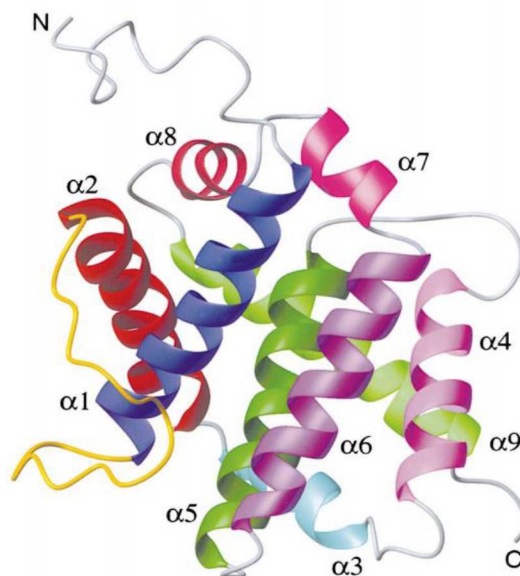


FONTE: (ALBERTS *et al.*, 2017).

### *Gene e Proteínas BAX e BCL2.*

A família de proteínas BCL-2 (Família de linfoma leucêmico B2), é responsável por controlar o mecanismo de morte celular, principalmente através da via intrínseca mediada pela mitocôndria. Dentro dessa família existem proteínas que funcionam como anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. A proteína BAX (pró-apoptótica) (Figura 5) quando ativada promove eventos apoptóticos, por meio de uma transição estrutural, ou seja, translocação do citosol para a mitocôndria. Posteriormente no mecanismo ocorre a homo-oligomerização oriunda de mudanças conformacionais na estrutura da proteína, possibilitando sua ação na membrana externa da mitocôndria, o que aumenta a permeabilidade da mesma. Em contraponto os membros anti-apoptóticos da família BCL-2, como BCLX, MCL1, BCL-W e BCL2, onde na ausência de estímulos apoptóticos, se ligam às proteínas pró-apoptóticas, por exemplo BAX e BAK, realizando sua inativação na membrana externa mitocondrial (TAYLOR, R.C. CULLEN, S.P. MARTIN. S.J. 2008).

FIGURA 5: Estrutura tridimensional da proteína Bax, apresentando 9  $\alpha$  hélices bem como regiões N e C terminais.



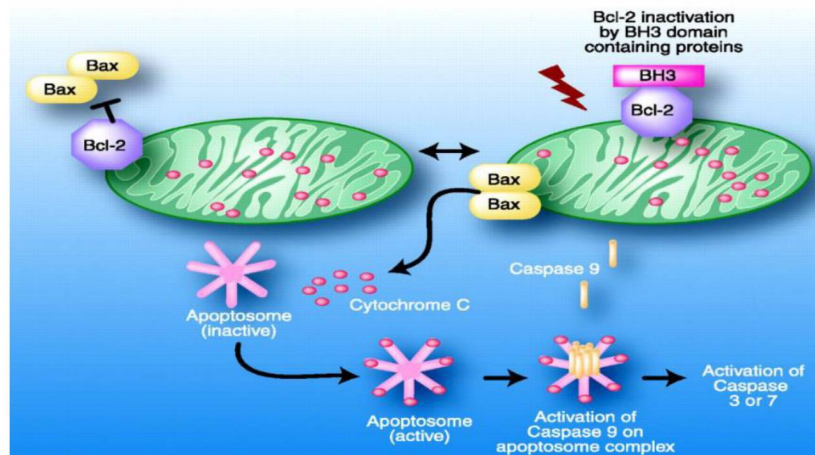
FONTE: (SUZUKI, M., YOULE, R. J., TJANDRA, N. 2000).

Esse grupo de proteínas é bastante expresso em células tumorais, principalmente em leucemias, onde devido ao estresse oncogênico há uma elevação nos níveis de proteínas pró-apoptóticas. Porém com o intuito de garantir a sobrevivência celular, as proteínas anti-apoptóticas são reguladas para neutralizar as proteínas pró-apoptóticas como BAX, BAK, BIM e BID (EDLICH. F. 2017; ROBIN et al., 2018).

Quando se trata de células não tumorais, existe um equilíbrio entre as duas classes de proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. A caracterização dessas proteínas, bem como o seu papel dentro do mecanismo de morte está associado aos domínios BH, que consistem em quatro domínios homólogos presentes de forma variada no conjunto das proteínas BCL2 e BCLX (anti-apoptóticas). Essas possuem os quatros domínios BH1,2,3 e BH4, diferentemente de BAX e BAK, que contém apenas os domínios BH1,2 e BH3 em sua estrutura. O domínio BH3 é comum a todos os membros da família BLC-2, no entanto algumas proteínas conhecidas como pró-

apoptóticas (BAD, BIM, BID, PUMA e NOXA) possuem apenas o domínio BH3. Dessa forma é claro o papel desses domínios homólogos com a atividade pró-apoptótica desempenhada pelas proteínas dentro da via intrínseca (ALBERTIS et al., 2017. JENG et al., 2018). Estudos com mamíferos mostraram que as alterações na taxa de expressão de BAX e BCL2 promovem a saída do citocromo c presente no espaço intermembrana das mitocôndrias para o citosol, exatamente quando os níveis de BAX aumentam em relação à BCL2. Nesse caso ocorre a indução da apoptose pela formação do apoptossoma (MARTINOU e YOULE 2011, PEPPER et al., 1997). (Figura 6).

FIGURA 6: Relação dos níveis de BAX/BCL2 em células não tumorais.



FONTE: 6: RAJENDRAN. R, R. & KAO. G, D. (2007).

### *Proteína Survivina e Gene BIRC5*

A família de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), possuem membros que desempenham um papel importante na homeostase celular, além de controlar diversos processos biológicos fundamentais como: respostas inflamatórias, divisão, proliferação e diferenciação celular (ESTORNES. Y, BERTRAND. M. J. M. 2014). As IAPs humanas consistem em um grupo de oito proteínas, dentre elas as XIAP, IAP1

celular, IAP2 e a survivina presentes em uma diversidade de vias de sinalização intracelular. Dentre elas se destacam a via do receptor de necrose tumoral (TNFR), assim como do fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Uma das características dessas proteínas são seus domínios conservados de repetições IAP baculoviral (BIR), responsáveis pela interação com as caspases bloqueando o papel das mesmas, além de apresentarem moduladores negativos como as proteínas mitocondriais citocromo c e smac/diablo (BIRBAUM. M. J, CLEM. R. J, MILLER. L. K. 1994, BUDHIDARMO.R. & DAY. C. L. 2014).

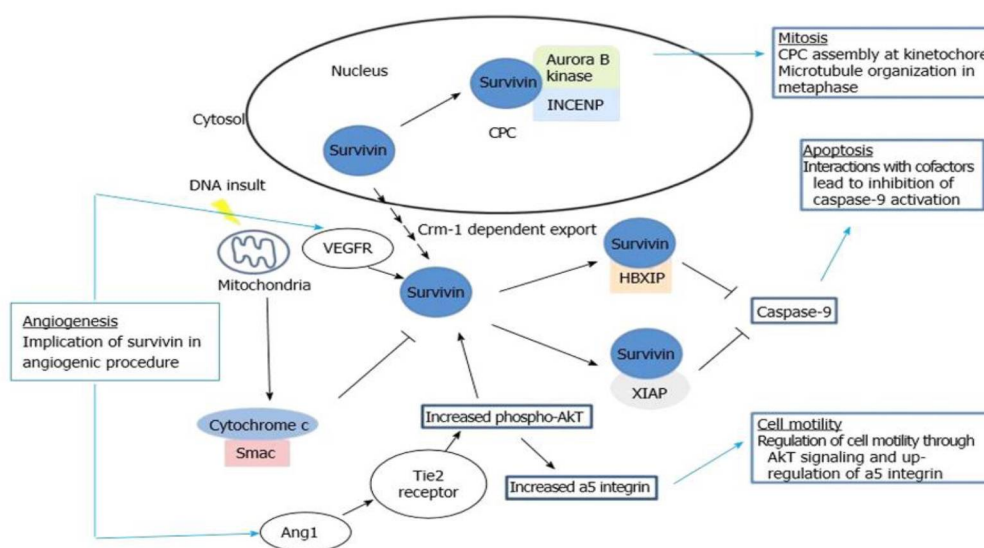
A survivina é o menor membro da família das IAPs, mas apresenta um papel reconhecido na inibição da apoptose, bem como no processo de divisão celular. Portanto, essa proteína encontra-se em níveis elevados em praticamente todos os tipos de células tumorais. Como a presença da proteína está diretamente associada a estruturas como centrossomas e microtúbulos do fuso mitótico, interagindo com a Aurora B quinase e com a proteína interna do centrômero (INCENP) (WANG. et al., 2003), essa proteína apresenta um papel importante não só na sobrevivência celular mas também na regulação da mitose em células tumorais, ganhando destaque como alvo importante na terapia do câncer (Figura 7) (CHAO et al., 2013). Além disso, a proteína participa também na angiogênese e na tolerância de células tumorais a drogas interferindo com o mecanismo de morte celular (O'CONNOR. D, S. et al., 2000. WANG. et al., 2013). O gene que expressa para a proteína survivina tem 15 kb e encontra-se localizado no cromossomo 17, o qual contém quatro exons e três introns, tendo como produto uma proteína composta de 142 aminoácidos com peso molecular de 16,2 kDa (LI et al., 2015). A *over-regulation* da proteína está atrelada ao surgimento de uma terceira cópia desse cromossomo, especialmente em tumores avançados,



mas também está diretamente associada com a ativação de proteínas da família de fatores de transcrição (E2F) (ECKERLE, I. et. al., 2009).

A expressão das IAPs e sua ubiquitinação são rigidamente reguladas, além disso algumas IAPs possuem o domínio RING, que contribui para a autoubiquitinação bem como para a degradação proteossomal. Em alguns tipos de tumores pode ocorrer alterações na expressão dessas proteínas interferindo com o mecanismo de controle da morte celular. Assim a *over-regulation* ou a *dow-regulation*, não só das IAPs, mas de seus antagonistas é correlacionada com a progressão tumorigênica (FELTHAM. R. et al., 2011, DUBREZ L, BERTHELET J, GLORIAN V., 2013).

FIGURA 7: Principais vias relacionadas com o papel da proteína survivina.



FONTE: (SANI. R, M. et al., 2019).

O gene BIRC5 é altamente expresso em tecidos embrionários, porém sua expressão é insignificante em tecidos normais maduros a ponto de não ser facilmente rastreada (SANI. R, M. et al., 2019). Isso possibilitou a utilização da expressão desse gene como um marcador importante no diagnóstico do câncer. Estudos desenvolvidos por Sing et al. (2015), Altieri (2001) e Li (2005) demonstraram que a expressão desse gene em tumores juntamente com suas variantes de *splicing* sendo uma delas

survivina- $\Delta$ Ex3 que detecta danos na molécula de DNA em células tumorais, é muito específica e distinto quando comparadas com células normais.

*Gene PIK3CA/Via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K).*

A via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) é normalmente desregulada na maioria das células cancerosas, desempenha papel crucial na progressão e no desenvolvimento de tumores. Através da indução tanto extrínseca como intrínseca, essa via é responsável por regular múltiplas características celulares associadas à sobrevivência, proliferação, metástase e angiogênese. Desse modo a hiperativação da via PI3K, representa um aumento da aptidão biológica no sentido de promover o sucesso replicativo, o que confere vantagens para as células pré-malignas e/ou transformadas. Outro ponto relevante dessa via é sua capacidade de conferir resistência a terapias antineoplásicas, como a quimioterapia não seletivas, antiangiogênicas e imunoterapias (BROWN. K. K, TOKER. A. 2015. OKKENHAUG. K, GRAUPERA. M, VANHAESEBROECK. B. 2016. FRUMAN. et al., 2017).

Existem três classes de PI3Ks (Tabela 1), no entanto, as proteínas da classe I (PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$ , PI3K $\gamma$  e PI3K $\delta$ ) são reconhecidamente associadas ao câncer. Sua ativação fisiológica é equilibrada por fosfatases e homólogos de tensina, normalmente codificados pelo gene PTEN que por sua vez está deletado do cromossomo 10 em grande parte das células tumorais. Do grupo de genes das subunidades presentes na classe I dessas proteínas, apenas o PI3KCA normalmente apresenta mutação em cânceres humanos. Além disso a via PI3K em alguns tipos de câncer pode ser ativada de forma aberrante, devido a mutações ativadoras de amplificações e alterações no gene PIK3CA, que codifica para a subunidade catalítica p110 $\alpha$ , a qual desencadeia a cascata de reações intracelular acabando por ativar a proteína quinase  $\beta$  (AKT).

Assim, as alterações no gene PIK3CA altera não só a expressão de AKT1 mas também o modulador negativo PTEN (COURTNEY.K. D, CORCORAN. R. B, ENGELMAN. J. A. 2010, DYSON. J, M. et al., 2018, PEARSON. et al., 2008).

TABELA 1: Classes de PI3Ks, genes e isoformas correspondente, bem como a relação subunidade catalítica e regulatória.

<i>Classes de PI3Ks</i>	<i>Subunidade catalítica</i>		<i>Subunidade Regulatória</i>	
	<i>Isoforma</i>	<i>Gene</i>	<i>Isoforma</i>	<i>Gene</i>
<i>I</i>	p110 $\alpha$	PIK3CA	p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$ *	PIK3R1
	p110 $\beta$	PIK3CB	P85 $\beta$	PIK3R2
	p110 $\delta$	PIK3CD	p55 $\gamma$	PIK3R3
	p110 $\gamma$	PIK3CG	p101	PIK3R5
<i>II</i>			p87	PIK3R6
	PI3K-C2 $\alpha$	PIK3C2A		
	PI3K-C2 $\beta$	PIK3C2B		
	PI3K-C2 $\gamma$	PIK3C2G		
<i>III</i>	VPS34	PIK3C3	vps15	PIK3R4

\* *variantes de splicing*

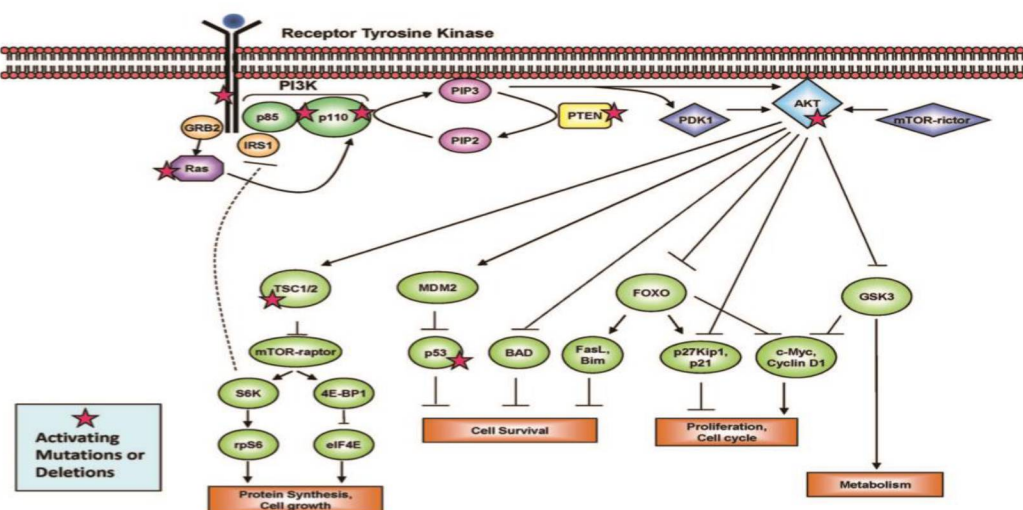
FONTE: (PARK. S. et al.,2018)

Na cascata de reações PI3K (Figura 8) a proteína é responsável pela ativação de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), após ativação de receptores de tirosina-quinase (RTKs), (ativados por hormônios como insulina e por fatores de crescimento), na membrana plasmática. Porém de acordo com Barouki. et. al. (2007), existe a possibilidade de PI3K ser modulada pela ativação do receptor citoplasmático Aryl hidrocarboneto ou receptor de hidrocarbonetos aromáticos (AhR), que ativa quinase de adesão focal (FAK), a qual ativa PIK3 naturalmente (KRANP. G. 2005).

Após ativação da P13K, a proteína PIP3 recruta quinase 1 dependente de fosfoinosítídeos (PDK1) e AKT. A quinase PDK1 ativa a quinase AKT por fosforilação, ocorrendo na sequência uma segunda fosforilação de AKT pelo complexo rapamicina 2 de mamífero (mTORC2). Isso desencadeia numerosas respostas, como

proliferação, sobrevivência celular e síntese proteica, mediante ativação de vários tipos de sinalizadores proteicos, como a S6 quinase p70 ribossômica (S6K), a proteína fator de iniciação da tradução eucariótica 4E (eIF4E), a glicogênio sintase quinase  $\beta$  entre outras (PARK et al., 2018).

FIGURA 8: Via de Sinalização fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)



FONTE: (BASELGA. 2011).

### *Gene Tp53/ Proteína P53.*

Após sua descoberta ao final da década de 70, o gene Tp53 foi estabelecido como um proto-oncogene, pois o mesmo apresenta funções na manutenção da integridade genômica, paradas transitórias do ciclo celular para reparo de quebras na fita do DNA, além de estar associado com senescência e morte celular. A proteína P53 apresenta papel importante na apoptose, isso se deve à sua capacidade de regulação transcricional de genes relacionados a esse mecanismo, além de apresentar ação direta sobre determinadas proteínas envolvidas no mesmo processo (PETITJEAN. et al., 2007, REINHARDT. H. C. & SCHUMACHER. B. 2012.). Um dos papéis na morte celular é a sua capacidade de migrar para o núcleo em situações de estresse celular, onde regula a transcrição de fatores pró-apoptóticos como PUMA,

BAX, BAK, BID e NOXA, se associando à região promotora dos genes que codificam para essas proteínas (NAKANO. K. VOUSDEN. K. H. 2001, RILEY. T. SONTAG. E. CHEN. P. LEVINE. A. 2008).

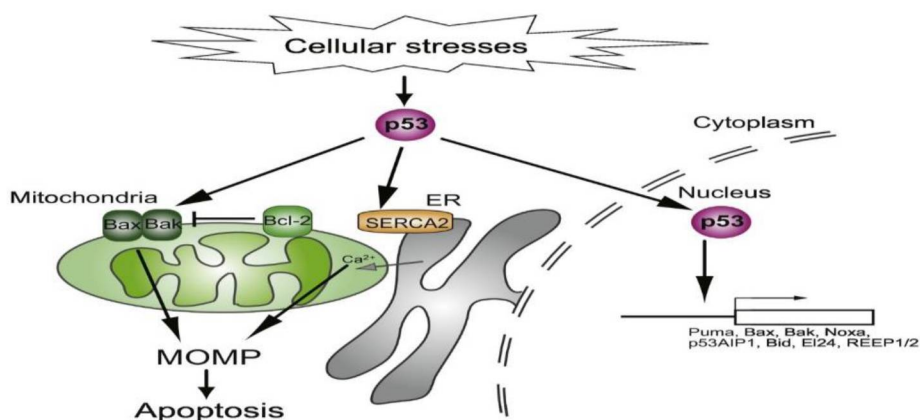
Uma vez que interfere diretamente com fatores pró-apoptóticos, a P53 está associada com o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa, que mesmo podendo ser inativada por MCL-1(anti-apoptótica) em condições de estresse celular, induz a ativação de BAK (pró-apoptótica). Além disso, danos no DNA promovem sua ligação com a proteína *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium* ATPase 2 (SERCA2) e a canais de cálcio presentes na membrana do retículo endoplasmático, as quais sofrem alterações conformacionais, levando a um aumento do influxo de  $Ca^{2+}$  intracelular. Esses eventos culminam com um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa promovendo a liberação do citocromo c para o citosol, iniciando uma cascata de eventos que terminam com a ativação das caspases efetoras no processo de apoptose (YAMADA. K.& YOSHIDA K., 2019).

Concomitante a isso a proteína P53 impede a ação de proteínas anti-apoptóticas como a BCL-2 e BCLxL, responsáveis por inativação de fatores pró-apoptóticos. Em muitos tipos de câncer a correlação da expressão de BCL-2 é inversa a de P53, onde estudos sugerem que a expressão de BCL-2 pode vir a ser regulada por P53 de forma pós-traducional ou agir de forma direta sobre a BCL-2 através do seu domínio de ligação com o DNA. Outro fator importante é a regulação de P53 para os microRNAs (MIRs), miR-15 e miR-16-1 principais responsáveis por suprimir BCL-2. Esses microRNAs comportam-se como supressores tumorais, os quais são negativamente regulados juntamente com a *over-regulation* de BCL-2 e mutações em Tp53 em vários tipos de câncer (YAMADA. K.& YOSHIDA K., 2019) (Figura 9). De

acordo com Lu et al. (2014), o gene Tp53 possui um índice de mutação diferenciado entre os diferentes tipos de câncer. Em 95% dos casos, o câncer de ovário apresenta mutação de Tp53 mas apenas 50-70% dos cânceres de pulmão e cólon respectivamente apresentam a mesma mutação. Já com relação ao melanoma humano, o Tp53 se diferencia com um percentual menor ainda, entre 10 a 20% de mutações, existem ainda diversas interpretações com relação aos seus níveis de expressão, não existindo um padrão uniforme na expressividade de p53 no melanoma. Alguns estudos associam o aumento da expressão a um pior prognóstico: Tchernev G, Orfanos C, E. (2007); Yamamoto, et al. (1995). Karjalainen. et al. (1999). Enquanto outros não encontraram tal relação, Alonso et al. (2004); Hieken. et al., (1999) e Lu et al. (2014).

Dentre os inibidores da proteína P53 os mais conhecidos são os MDM2 (*minuto duplo murino 2*) e MDMX, posteriormente definido como MDM4 convenientemente *over-regulated* nos tumores em geral. Essas proteínas desempenham uma importante função nessa via, pois podem se ligar ao domínio transcricional N-terminal da proteína inibindo sua atividade transcricional, bem como agindo como ubiquitinas ligase através dos domínios RING-E3. A inativação do gene Tp53 no melanoma também pode ser realizada através de uma deleção ou mutação do *locus* gênico CDKN2A (Ciclina dependente de quinase 2 ou INK4 $\alpha$ /ARF), que codifica para P14ARF e P16INK4 que impedem a ativação de P53 pela via MDM2. Isso acontece porque a inibição da MDM2 de responsabilidade da P14ARF não ocorre. Alterações como mutação ou deleção de Tp53, amplificação de MDM2 e MDM4, deleção de CDKN2A, ocorre em 55% dos casos de melanoma, o que faz esse mecanismo relevante para esse tipo de tumor (LU. M. MILLER. P. LU. X. 2014, SHADFAN. M PAJARES. V. L, YUAN. Z. 2012).

FIGURA 9: Relação entre a proteína p53 e mecanismos de apoptose.



FONTE: (YAMADA. K.& YOSHIDA K. 2019).

Sendo assim, os genes citados e considerados para esse estudo, são fortes candidatos a sofrerem alterações durante o processo neoplásico ou responderem de forma intracelular à presença de moléculas presente no ambiente. A exposição pode então desencadear repostas celulares de ordem fenotípica ou genotípica, pois a literatura demonstra que esses genes modulam diversos mecanismo intracelulares associados com mecanismos de proliferação e sobrevivência celular.

Atualmente existem diversos estudos que retratam o potencial carcinogênico de muitas substâncias químicas presentes no ambiente, dentre elas as moléculas de origem antrópica. No entanto, muito pouco se sabe sobre a ação dessas moléculas em células tumorais, o que inclui esse estudo dentro de uma nova abordagem toxicológica que é a alteração do fenótipo de células tumorais pela exposição a poluentes orgânicos, alterando o perfil celular elevando a malignidade e assim interferindo com o prognóstico do câncer.

### 3 JUSTIFICATIVA

De uma forma geral, vários estudos têm descrito o papel carcinogênico de várias moléculas xenobióticas com potencial para induzir o câncer em populações humanas. No entanto, até o momento na literatura pesquisada, nenhum trabalho foi encontrado com o intuito de investigar se esses xenobióticos podem interferir alterando o fenótipo de células tumorais gerando um perfil celular mais maligno

Trabalhos recentes do Laboratório de Toxicologia Celular mostraram que após a exposição de células tumorais a poluentes orgânicos, em determinadas concentrações foram observadas alterações como o aumento do metabolismo mitocondrial e lisossomal, bem como na proliferação celular. Segundo os autores a consequência desses dados foi uma diminuição observada nos padrões de morte celular das células em cultura (LIEBEL et al., 2016). Isso levantou um questionamento, onde possivelmente alterações no mecanismo de apoptose utilizado para garantir a manutenção das células tumorais, pode estar sendo modulado pela exposição aos xenobióticos, levando estas moléculas a modular alterações fenotípicas e moleculares e com isso aumentando a malignidade dessas células, interferindo com o prognóstico da doença.

Dessa forma buscamos investigar diferentes vias associadas com a apoptose para compreender se o BDE-209 e o TCDD são capazes de modular o mecanismo de morte celular favorecendo a condição proliferativa da célula. Duas vias foram consideradas no estudo, a extrínseca e a intrínseca. Para a via extrínseca avaliamos a expressão do gene PI3KCA (proteína PI3K) devido ao seu envolvimento na ativação e sinalização intracelular da proteína Kinase  $\beta$ , essa quando ativada regula mecanismos de crescimento e proliferação celular através de cascatas fosforilativas. Ao avaliar a expressão da P13K, imaginamos uma modulação dos xenobióticos na



ativação do receptor de membrana tirosina quinase ou mesmo nos mecanismos de transdução do sinal.

Pela via intrínseca, decidimos avaliar um dos mecanismos mais conhecidos na indução da apoptose que é o balanço entre as proteínas BCL2 e BAX (respectivamente anti- e pró-apoptótica). Tanto BCL2 quanto BAX fazem parte de uma família específica de proteínas, responsáveis por controlar o mecanismo de morte celular. Um aumento na expressão de BCL2 impede a oligomerização da proteína BAX impedindo a mesma de aumentar a permeabilidade da membrana externa das mitocôndrias, o que despertaria um mecanismo indutor de apoptose pela formação do apoptossoma. O gene da SURVIVINA, o menor membro da família das IAPs (Proteínas inibidoras da apoptose) está associada a estruturas como centrossomas e microtúbulos do fuso mitótico, e estando, portanto, envolvida na sobrevivência celular e também na regulação da mitose. Outro gene considerado no estudo dos mecanismos intrínsecos da morte celular é o Tp53. Esse gene possui um papel importante na regulação do ciclo celular, no reparo do DNA, além de estar relacionado à indução da apoptose em condições de stress celular.

#### **4 HIPÓTESE.**

A pré exposição ao TCDD e BDE-209 induz o aumento da expressão de genes PI3KCA, BCL2, BIRC5 (SURVIVINA) e diminuição de BCL2 associada a proteína X (BAX), modulando assim negativamente o mecanismo de morte celular por apoptose em células do melanoma murino B16-F1 e favorecendo sua malignidade tornando-as menos sensíveis ao estresse químico.

## 5 OBJETIVO GERAL

Investigar através da exposição aguda (24h) e crônica (15 dias) se o TCDD e BDE-209 modulam alterações inibindo a expressão de genes associados com a morte celular em células neoplásicas melanocíticas murinas B16-F1.

### 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar se a exposição ao TCDD e BDE-209 altera mecanismos como a morte celular e a proliferação de células B16F1;
2. Investigar a expressão de genes relacionados com mecanismos anti e pró-apoptóticos: PI3KCA, BCL2, BCL2 associada a proteína X (BAX), BIRC5 (SURVIVINA) e Tp53 após exposição ao TCDD e BDE-209;
3. Relacionar os dados de expressão gênica, viabilidade e proliferação celular com o papel dos contaminantes na sensibilização de células tumorais B16-F1 ao estresse químico.

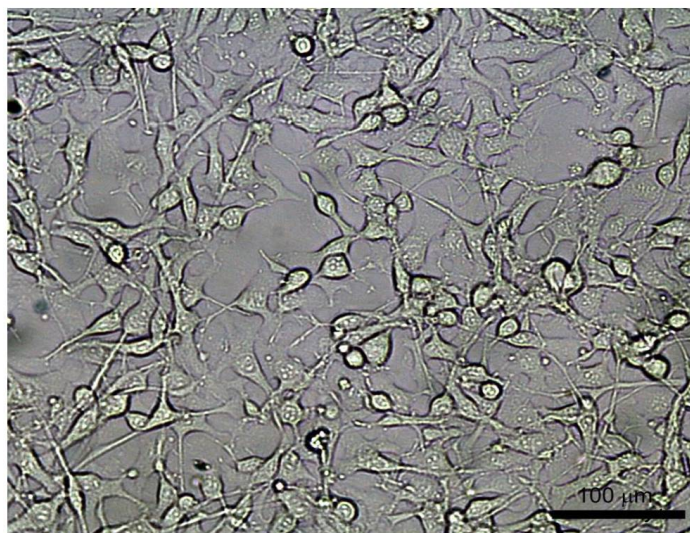
## 6 METODOLOGIA

### 6.1 MODELO DE ESTUDO

Para o desenvolvimento desse estudo foram utilizadas células de melanoma murinho da linhagem B16F1 (ATCC® - *American Type Culture Collection*) adquiridas do BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro) (Figura 10). As células serão expostas aos contaminantes ambientais TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) e ao BDE-209 (2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter) obedecendo o desenho experimental proposto. Posteriormente à exposição, serão observados parâmetros pré-

estabelecidos para avaliar se as células B16F1 apresentam alterações no seu fenótipo. Adicionalmente, os ensaios *in vitro* buscam simular situações que possam se aproximar aos eventos que ocorrem *in vivo*.

FIGURA 10: Células de melanoma murino B16-F1 em cultivo celular.



FONTE: (STEIL. 2016).

A seleção das concentrações teste foi realizada com base em estudos anteriores onde determinada concentração de cada composto foi detectada no soro humano (BDE-209 1,0nM e TCDD 0,1nM). Tais trabalhos foram selecionados dos trabalhos da *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR, 1998 apud EGELAND et al. 1994) para o TCDD (soro sanguíneo) e de Mazdai et al. (2003) para o BDE-209 ( $\Sigma$ PBDEs soro materno). Sendo assim, as concentrações utilizadas foram 0,01nM, 0,1nM e 1nM tanto de TCDD quanto para o BDE-209 para fins comparativos. Tecnicamente o TCDD se apresenta como um controle comparativo em relação ao BDE-209, visto que o primeiro é tido como citotóxico e carcinogênico, porém pouco se sabe a respeito do segundo. Além disso, os resultados de um *screening* de concentração realizado tanto para o BDE-209 como para o TCDD, auxiliaram na

escolha das concentrações teste utilizadas, partindo das inicialmente encontradas no soro (STEIL, 2016).

Em relação ao tempo de exposição, a seleção ocorreu mediante alguns resultados encontrados não só na literatura, mas também de viabilidade realizados em nosso laboratório. Existem na literatura experimentos de exposição crônica de células a poluentes desde meses (BAIRD et al, 2016), 14 e 18 dias (LEHNERT et al, 1991) e até mesmo extremos com exposição de um ano (RAJA et al 2016). No entanto, optamos por realizar uma exposição de 24h, com o intuito de observar uma resposta aguda, em especial com relação a expressão dos genes de interesse. A exposição crônica foi estabelecida por um período de 15 dias, pois possibilita a formação de populações celulares mais homogêneas, visando uma resposta mais próxima da *in vivo*, além disso motivos operacionais, condições e questões de segurança contra contaminações ao cultivo de células auxiliaram a estabelecer esse como o melhor período de exposição.

. Sendo assim buscamos identificar o que ocorre em células B16F1, nas várias concentrações de BDE-209 e TCDD, em períodos de 24h e 15 dias, para avaliar se as respostas poderiam influenciar alterações no fenótipo e/ou genótipo que pudesse ser relacionado com a malignidade celular. Todos os dados são originados de três experimentos independentes onde para cada grupo foram consideradas pelo menos uma triplicata.

## 6.2 CULTIVO CELULAR

As células de melanoma murino B16F1 foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 40µg/mL de gentamicina. As linhagens celulares foram mantidas a 37°C em incubadora com atmosfera umidificada

e 5% de CO<sub>2</sub>. Para os ensaios que exigiam a análise em espectrofotômetro, foram plaqueadas 6.000 células por poço em microplacas de 96 poços (ensaios de viabilidade 24 hrs). Para ensaios de 15 dias foram plaqueadas cerca de 70.000 células em garrafas médias de cultivo celular, bem como para os ensaios de expressão gênica. Os subcultivos foram realizados a cada 3 dias, visando o controle da confluência celular.

### 6.3 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS ANALISADOS – TEMPOS DE EXPOSIÇÃO E PREPARO DAS CONCENTRAÇÕES TESTE

Os poluentes foram diluídos em PBS e DMSO, gerando assim as soluções mães e acondicionadas em vidro âmbar a -20°C. A concentração final de DMSO no grupo veículo e nos grupos expostos ao TCDD e BDE foi de 0,05%, sendo esse percentual aceito e amplamente utilizado para ensaios citotxicológicos (LIEBEL et al., 2016). Foram realizadas trélicas independentes (diferentes descongelamentos) tanto nos ensaios de viabilidade como nos de expressão gênica 24 hrs e 15 dias.

### 6.4 AZUL DE TRIPAN.

Para os experimentos crônicos, esses foram realizados em garrafas médias de cultivo plaqueadas com  $7 \times 10^4$  células em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 15 dias de exposição aos contaminantes as células foram desaderidas do fundo das garrafas com 2ml de solução contendo tripsina 0,25% e EDTA 0,02%. O conteúdo das garrafas foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o *pellet* de células ressuspendido em meio DMEM 2:1 Azul de Tripán 0,4%. Após 2 min, as células foram contadas (100 Cél) em câmara de *Neubauer*. Células coradas em azul foram consideradas como não viáveis. O experimento foi executado em triplicata.

## 6.5 VERMELHO NEUTRO

As células foram expostas aos dois contaminantes nos dois períodos, 24 hrs e 15 dias. (Posteriormente reincubadas a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C por 24 horas, somente no caso crônico). Após esse período o meio foi removido e um total de 200µL de solução de vermelho neutro (40µg/mL) foi adicionado em cada poço, permanecendo em incubação por 24 horas a 37°C. As células foram então lavadas com uma mistura de Cloreto de Cálcio 1% e formaldeído 0,5%. Foi acrescido uma solução de ácido acético 1% e etanol 50% que após agitação por 10 minutos em temperatura ambiente foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 540nm. Os controles foram realizados com o meio e o veículo e o experimento executado em triplicata. Esse ensaio possui como principal aspecto avaliar a atividade do sistema endossoma lisossoma das células em questão (REPETTO; PESO; ZURITA, 2008).

## 6.6 ENSAIO MTT

. As células foram expostas aos dois contaminantes nos dois períodos, 24 hrs e 15 dias. (Posteriormente reincubadas a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C por 24 horas, somente no caso crônico). Após o tempo de exposição foi adicionado uma solução de meio DMEM suplementado com 10% de SFB contendo 0,5 mg/ml de MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*). As células foram incubadas com o reagente durante 30 min, o conteúdo dos poços foi retirado integralmente, foi adicionado 100 µl de DMSO em cada poço, o material foi homogeneizado e a absorbância foi medida em seguida a 560 nm (MOSMANN, 1983, com modificações). A leitura foi realizada com espectrofotômetro em 560nm. Os grupos controle foram realizados com o meio e o veículo, e o experimento executado em triplicata. O presente ensaio tem por objetivo analisar a atividade de enzimas (desidrogenases) mitocondriais, podendo assim avaliar o metabolismo mitocondrial (MOSMANN, 1983).

## 6.7 CRISTAL VIOLETA

Após o período de tratamento as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos em temperatura de 2 - 8°C, coradas com 100µL da solução de cristal violeta 0,2% em água durante 15 minutos, e em seguida lavadas com água. A eluição do corante foi realizada utilizando uma solução de ácido acético 33%, sob agitação constante, por 30 minutos e leitura efetuada em espectrofotômetro a 570nm. Os grupos controle foram realizados com o meio e o veículo, e o experimento executado em triplicata. O cristal violeta visa avaliar a proliferação celular mediante retenção do corante pelas células (VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011).

## 6.8 CLONOGÊNICO

Após exposição, foram plaqueadas 250 células por poço em placas de 24 poços e incubadas (37°C e 5% CO<sub>2</sub>) com meio DMEM 10% SBF durante 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) em relação ao espaço ocupado no poço quanto mais colônias e maiores, maior a capacidade de formação de colônias, proliferação e crescimento celular a contagem bem como o percentual em relação a área ocupada do poço, foi realizada com auxílio do software ImageJ. (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005. RASBAND, W.S, 2018).

## 6.9 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 desenhados após *download* das sequencias de todos os alvos depositados no *GenBank*, devidamente alinhadas e submetidas aos softwares *GeneRunner* e *Primer3*. Os *primers* foram validados através de PCR convencional, em que as bandas correspondiam ao tamanho em pares de base de cada *amplicon* e por fim o desempenho em reação de qPCR com *SYBRgreen*. Foram utilizadas a concentração ideal de 6 picomol de *primers* e 5µM de cDNA.

TABELA 2: Genes e sequências dos nucleotídeos correspondentes

<i>GENE</i>	<i>SEQUÊNCIA</i>
<i>BAX (amplicon 114pb)</i>	F 5´ CTGGTGCTCAAGGCCCTGTG 3´ R 5´ GCCACCCTGGTCTTGGAT 3´
<i>BCL-2 (amplicon 109pb)</i>	F 5´ TGGTGGAGGAACTCTTCAGG 3´ R 5´ AGGGGTGACATCTCCCTGTT 3´
<i>BETA2 ENDÓGENO (amplicon 110pb)</i>	F 5´ CGAGACATGTGATCAAGCATC 3´ R 5´ GCTATTTCTTTCTGCGTGCAT 3´
<i>BIRC5 (amplicon 106pb)</i>	F 5´ GACTGCAAAGACTACCCGTCA 3´ R 5´ ATGCGTGGCTTAGATGTGG 3´
<i>PIK3CA (amplicon 109pb)</i>	F 5´ TGACCTTCGGCTTTTTCAAC 3´ R 5´ GGCATGCCAATAACAAAACC 3´
<i>TP53 (amplicon 100pb)</i>	F 5´ GGCGTAAACGCTTCGAGAT 3´ R 5´ CTGGAGTGAGCCCTGCTG 3´

FONTE: O Autor (2019).

## 6.10 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E CONVERSÃO PARA CDNA

As extrações do RNA total das amostras foram efetuadas através de kits específicos para amostras de cultura de células (Purelink RNA mini Kit - Applied



Biosystems, Thermo Fisher) empregando o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a extração foi realizada imediatamente a conversão para cDNA, sendo este o material a ser quantificado. Conversão realizada usando o kit *Superscript IV* (Applied Biosystems – Thermo Fisher). Os resultados apresentaram cDNA total 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 (grau de pureza). 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.

#### 6.11 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA - QPCR

A análise da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real (qPCR) utilizando como controle o gene endógeno  $\beta$ 2-Microglobulina murino, podendo assim estabelecer comparações nos níveis de expressão entre diferentes amostras antes e após a exposição aos contaminantes nas diferentes concentrações. As reações foram realizadas em termociclador *Step one fast system* (Applied Biosystems), utilizando o *SYBRGreen PCR Master Mix* para cada reação.

#### 6.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Para os ensaios in vitro, foram realizados três experimentos independentes para cada ensaio, com pelo menos três replicatas por grupo. Para a análise estatística, os valores médios de cada experimento foram empregados para comparação entre controle e todas as concentrações de BDE-209 e TCDD bem como para a análise por qPCR que apresenta seu resultado de comparação dos níveis de mRNA dos alvos por  $\Delta\Delta$ CT já incluso no software do termociclador. Assim os dados seguiram para a análise quando aplicável. Os valores de  $p < 0.1$ ,  $p < 0.05$  e  $p < 0,01$  serão considerados

estatisticamente para efeito de discussão, em última análise todos os dados foram submetidos ao software Graph Pad Prisma 5, one-way ANOVA Kruskal- Wallis post test: Dunns (© 1995-2017 GraphPad Software, Inc. All rights reserved).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 VIABILIDADE/CITOTOXICIDADE CELULAR.

#### *Ensaio com Azul de Tripán:*

De acordo com o ensaio de azul de Tripán (Tabela 3), após exposição crônica aos contaminantes BDE-209 e TCDD, o percentual de células viáveis não apresentou alterações significativas quando comparado ao grupo controle.

TABELA 3: Percentual de células marcada e não marcada pelo azul de Tripán

<i>Grupos de Exposição (15 DIAS)</i>	<i>Cél. Viáveis (%)</i>	<i>Cél. Marcadas pelo azul de Tripán (%)</i>
<i>Controle</i>	99%	<b>1%</b>
<i>Controle D. TCDD</i>	98%	<b>2%</b>
<i>Controle D. BDE-209</i>	99%	<b>1%</b>
<i>BDE 0,01nM</i>	98%	<b>2%</b>
<i>BDE 0,1nM</i>	97%	<b>3%</b>
<i>BDE 1nM</i>	98%	<b>2%</b>
<i>TCDD 0,01nM</i>	98%	<b>2%</b>
<i>TCDD 0,1nM</i>	98%	<b>2%</b>
<i>TCDD 1nM</i>	98%	<b>2%</b>

Fonte: O Autor (2019)

#### *Ensaio de Cristal Violeta:*

Em relação à média estatística das células controles, utilizadas como comparação durante o ensaio de Cristal Violeta, o qual avalia a proliferação celular, foi observado que não houve alterações significativas (Gráfico 1) entre as células do grupo controle e aquelas dos grupos expostas ao veículo (DMSO).

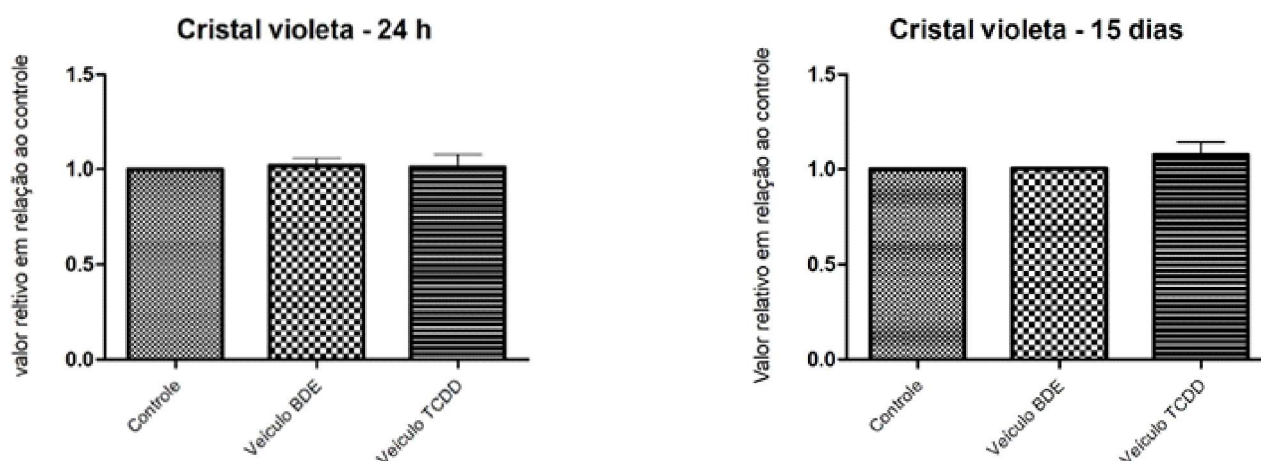


Gráfico 1: Controles utilizados no ensaio Cristal Violeta nas exposições de 24hrs e 15 dias ao TCDD e BDE-209.

$p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)

Referente à proliferação frente a exposição aguda por 24hrs aos contaminantes nas concentrações testadas (Gráfico 2), somente o TCDD nas três concentrações apresentou aumento significativo na proliferação, diferentemente do BDE-209 que demonstrou não interferir na taxa proliferativa das células expostas. O TCDD 0,01 TCDD 0,1 e TCDD 1nM, apresentaram respectivamente 20,8 %, 15,3 % e 17,7 % de aumento com relação a absorbância do corante cristal violeta, indicando que o TCDD estimula a proliferação celular, principalmente na menor concentração.

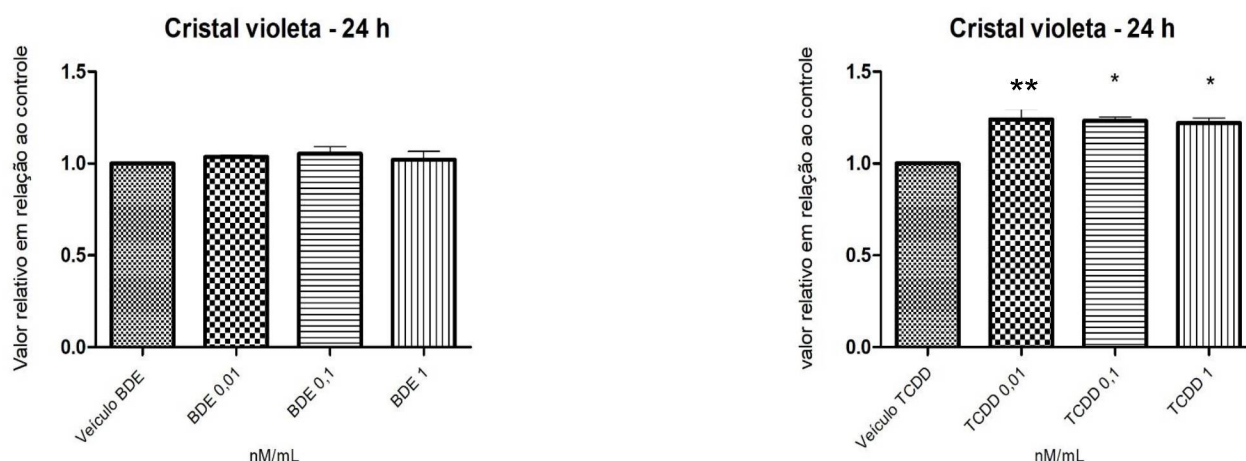


Gráfico 2: Cristal Violeta, avaliação da proliferação celular mediante exposição de 24 hrs a TCDD e BDE-209 em diferentes concentrações  $p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)

Em comparativo com a exposição de 24 hrs é possível notar um comportamento bem diferenciado das células, referente a exposição crônica (15 dias).

O primeiro ponto importante está associado ao fato do TCDD 0,1 nM que antes em 24 hrs estimulava a proliferação, agora ocorre inibição desse parâmetro em cerca de 8%, comparado ao controle (veículo TCDD). As demais concentrações também apresentam redução parcial.

Outro dado interessante se apresenta nas concentrações de BDE, visto que após 15 dias de exposição (Gráfico 3) o mesmo tende a estimular a proliferação das células B16-F1, diferentemente do que ocorria em 24 hrs de exposição. Com destaque para o BDE-209 0,01 nM que apresentou aumento de aproximadamente 8% em relação ao controle (veículo BDE), regulando de forma positiva a proliferação de células B16-F1.

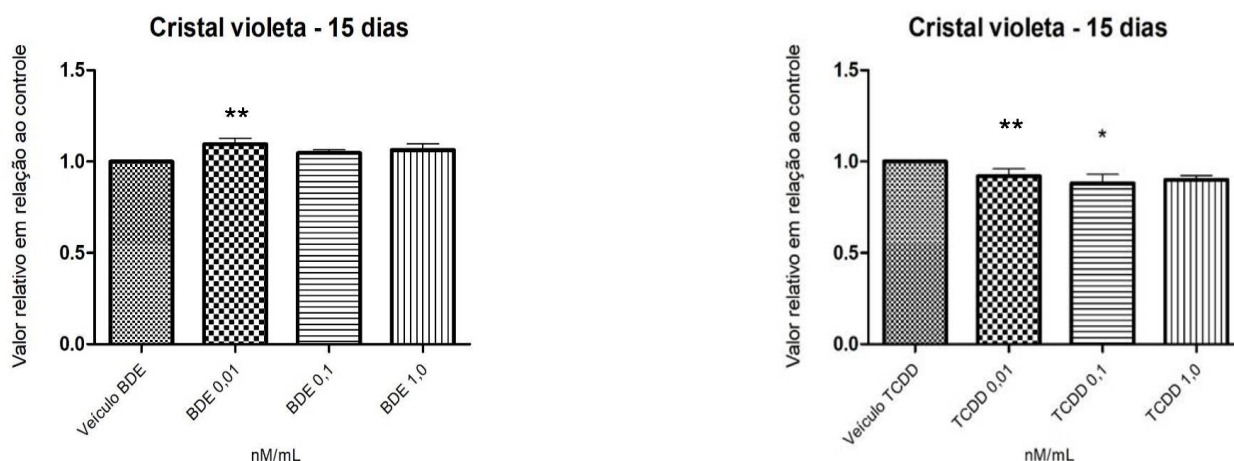


Gráfico 3: Cristal Violeta, avaliação da proliferação celular mediante exposição de 15 dias a TCDD e BDE-209 em diferentes concentrações  $p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)

#### *Ensaio de Vermelho Neutro.*

O ensaio de Vermelho Neutro não apresentou diferença estatística entre seus respectivos controles, tanto para os ensaios de exposição aguda (24hrs) como para os ensaios crônicos (15dias), semelhante ao que ocorre no ensaio de Cristal Violeta. (Gráfico 1). Sendo assim os controles demonstram não alterar a atividade do sistema endolissoma lisossoma das células B16-F1.

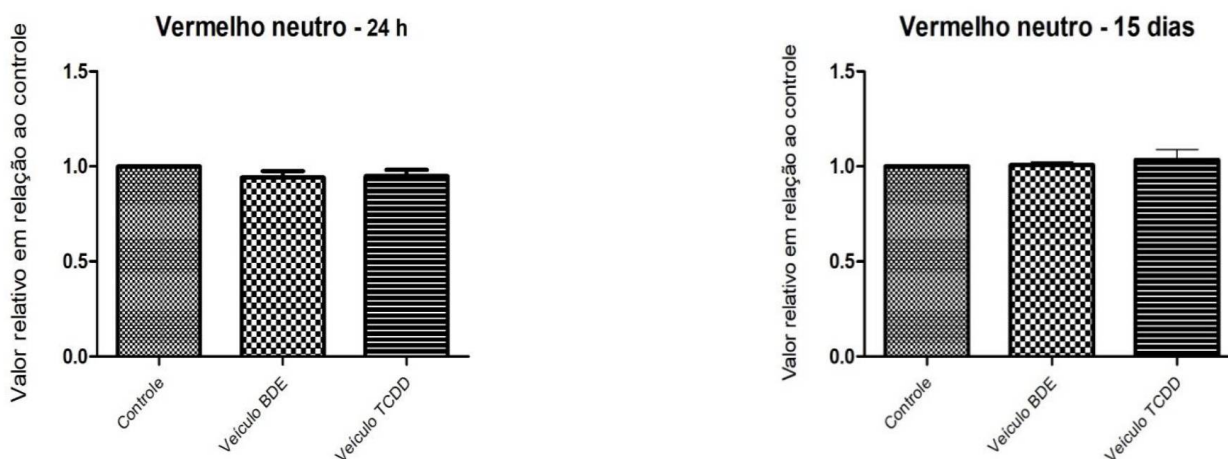


Gráfico 4: Controles utilizados no ensaio Vermelho neutro nas exposições de 24hrs e 15 dias ao TCDD e BDE-209,  $p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)

Com a atividade do sistema endossoma lisossoma observada durante a exposição de 24hs não é possível concluir estatisticamente que os contaminantes são capazes de influenciar esse mecanismo. No entanto, em determinadas concentrações de exposição ao BDE-209 0,01nM, TCDD 0,1 e 1,0nM, pode-se notar um leve aumento da atividade, respectivamente 15,2%, 17% e 19,6%. Além disso, as concentrações de TCDD citadas apresentam correlação com o ensaio de proliferação (Gráfico 2).

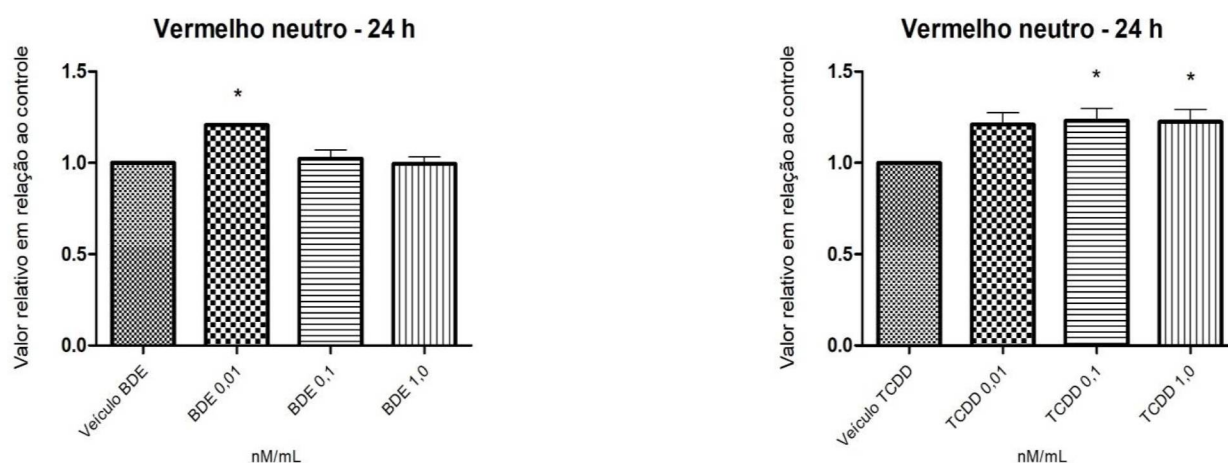


Gráfico 5: Vermelho neutro, avaliação do sistema endolisossomal, mediante exposição de 24 hrs a TCDD e BDE-209 em diferentes concentrações  $p < 0.1$  (\*)  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)).

A atividade do sistema endossoma lisossoma após exposição de 15 dias, apresenta homogeneidade nos dados para os dois contaminantes, não demonstrando alterações significativas em relação ao controle, principalmente com relação ao TCDD, diferentemente do que foi visto na exposição aguda 24hrs. A exceção ocorre no grupo exposto ao BDE-209 na concentração intermediária de 1,0nM, que tende a diminuir a atividade do sistema em cerca de 7%. Os dados mostram, portanto que

aparentemente os mecanismos envolvidos com o sistema endossoma lisossoma respondem melhor quando sob estresse celular agudo.

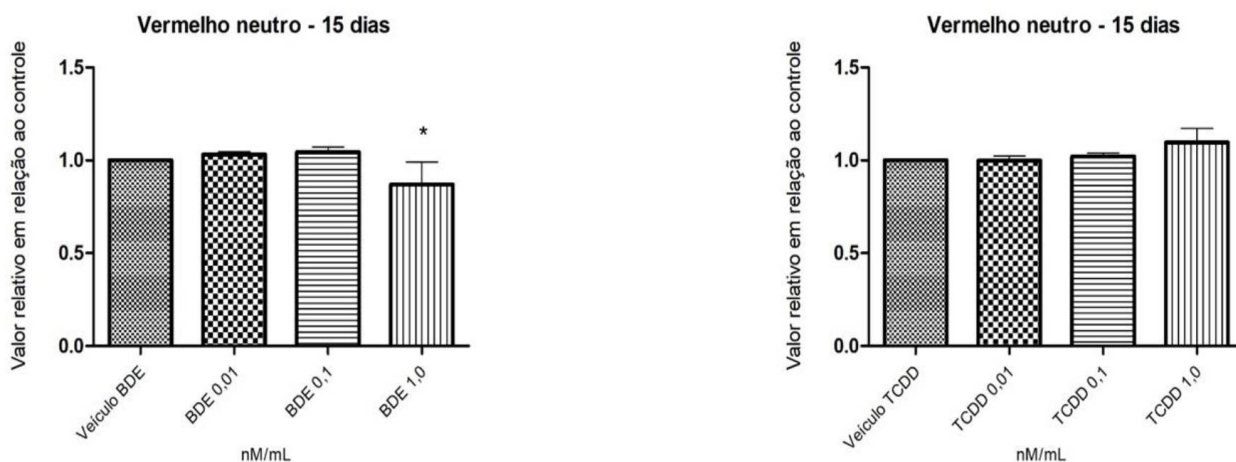


Gráfico 6: Vermelho neutro, avaliação do sistema endolisossomal, mediante exposição de 15 dias a TCDD e BDE-209 em diferentes concentrações  $p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)

### Ensaio MTT.

Assim como os demais ensaios voltados a viabilidade celular, o ensaio de MTT que busca avaliar o metabolismo mitocondrial, não apresentou diferença estatística em relação aos controles utilizados (Gráfico 7).

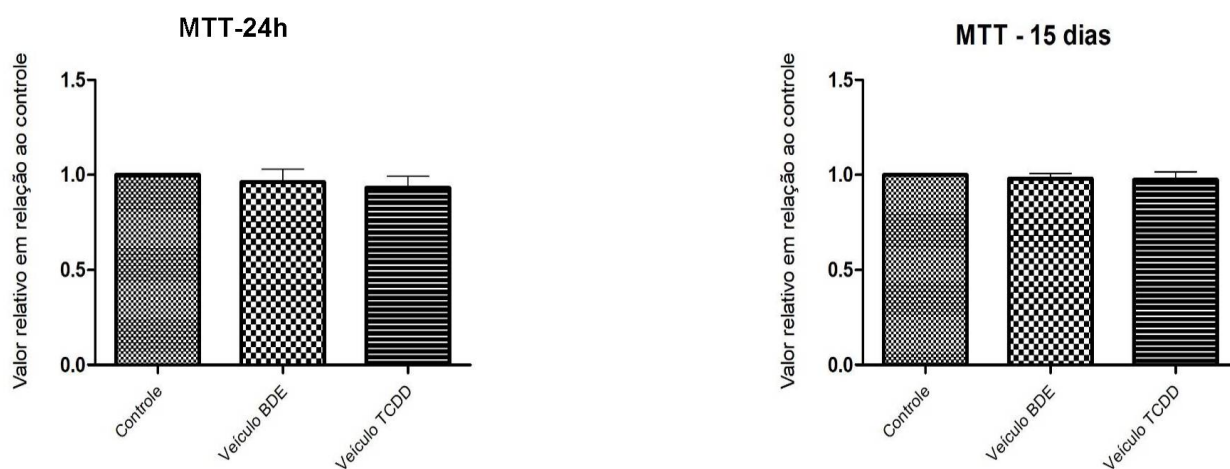


Gráfico 7: Controles utilizados no ensaio MTT, nas exposições de 24hrs e 15 dias a TCDD e BDE-209  $p < 0.1$  (\*)  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)

O ensaio MTT na exposição aguda (24hr) aos contaminantes nas diferentes concentrações, demonstrou que tanto o BDE-209 quanto o TCDD não interferem significativamente no metabolismo mitocondrial. Referente ao BDE-209 é possível notar homogeneidade nas concentrações testadas, o que não ocorre no TCDD, onde existe uma maior flutuação dos dados.

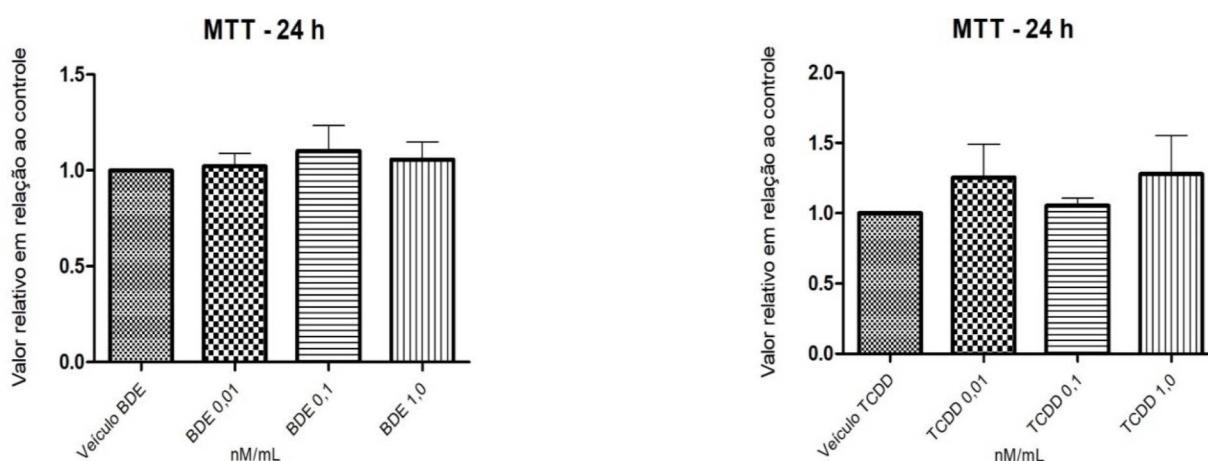


Gráfico 8: MTT, avaliação do metabolismo mitocondrial, mediante exposição 24hrs a TCDD e BDE-209 em diferentes concentrações  $p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)

Já durante a exposição crônica (15dias) os dois contaminantes apresentam dados homogêneos, indicando que ambos não interferem no metabolismo mitocondrial nas concentrações testadas, semelhante ao que ocorre em 24 hrs de exposição (Gráfico 9). Dessa forma não havendo diferença estatística nos dois casos.



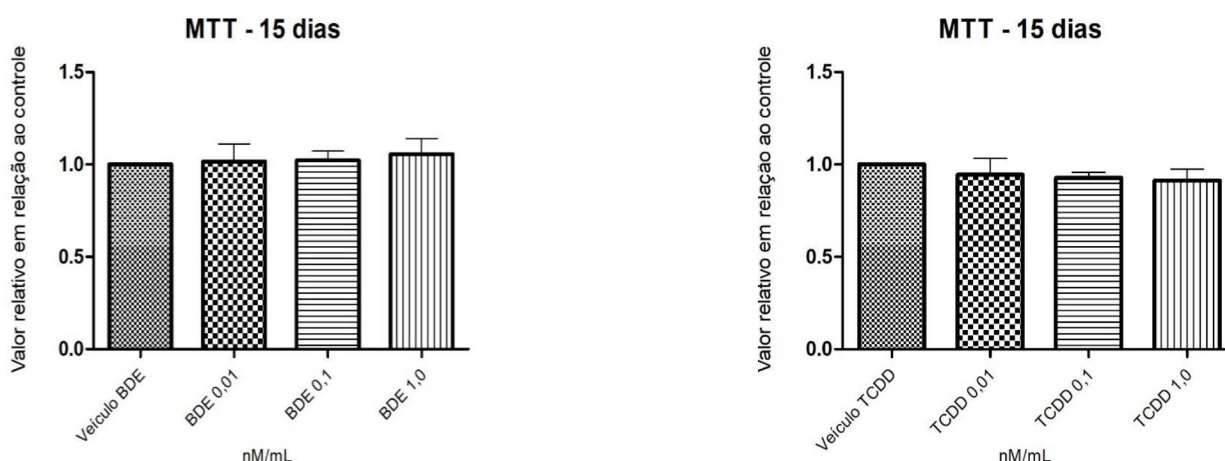


Gráfico 9: MTT, avaliação do metabolismo mitocondrial, mediante exposição de 15 dias a TCDD e BDE-209 em diferentes concentrações  $p < 0.1$  (\*)  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)

### ENSAIO CLONOGÊNICO.

O ensaio clonogênico (figura 11) possibilita avaliar a capacidade de formação de colônias após exposição crônica (15 dias) das células nas concentrações testadas dos dois contaminantes. Com relação ao espaço ocupado pelas células (Tabela 4), não houve diferença percentual significativa quando comparada as concentrações dos dois contaminantes com seus respectivos controles.

TABELA 4: Grupos analisados e percentual da área ocupada do poço no ensaio clonogênico.

GRUPOS ANALISADOS	ÁREA OCUPADA DO POÇO (%)
Veículo D. TCDD	2,69%
TCDD 0,01nM	2,49%
TCDD 0,1nM	2,57%
TCDD 1nM	2,54%
Veículo D. BDE-209	2,68%
BDE 0,01nM	2,70%
BDE 0,1nM	2,49%
BDE 1nM	2,55%
CONTROLE	2,68%

FONTE: O Autor (2019)

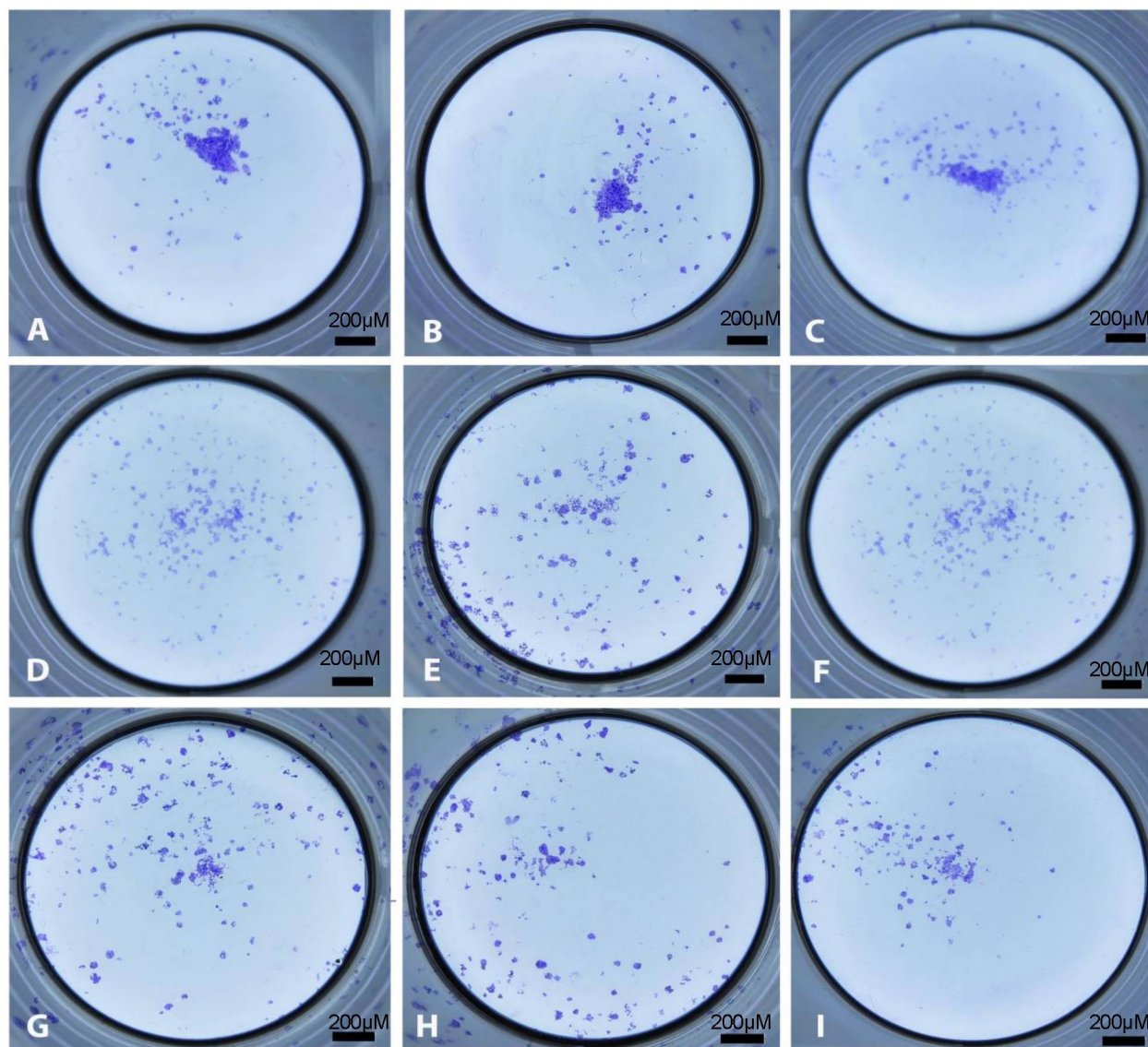


FIGURA 11. Fotografias representando a ação dos contaminantes na formação de colônias. Ensaio Clonogênico exposição crônica (15 dias) células B16-F1; Em (A) células controle (B) veículo DMSO-BDE-209, (C) veículo DMSO-TCDD. (D), (E) e (F), respectivamente BDE-209 0,01nM, 0,1nM, e 1nM. Em (G) TCDD 0,01nM, (H) TCDD 0,1nM, e (I) TCDD 1nM. FONTE: O Autor (2019).

Embora a área ocupada pelas células não seja estatisticamente diferente, o ensaio mostra que o BDE-209 assim como o TCDD, possuem a capacidade de diminuir o tamanho das colônias, pois visualmente, a exposição crônica (15 dias) aos contaminantes, deixa as colônias menores e mais distantes entre si diferentemente do que ocorre nos respectivos controles.

### Resultados de exposição aguda:

Para análise de expressão gênica foram selecionados determinados genes associados com a progressão tumoral e indução ou inibição da apoptose de acordo com a literatura. Um grupo de genes codifica para proteínas pró-apoptóticas como a BAX, que mediante a exposição aguda (24hrs), demonstrou que a maioria das concentrações dos contaminantes não influencia na expressão do gene, porém a concentração BDE 1nM tende a modular positivamente a expressão, com aumento de 28%.

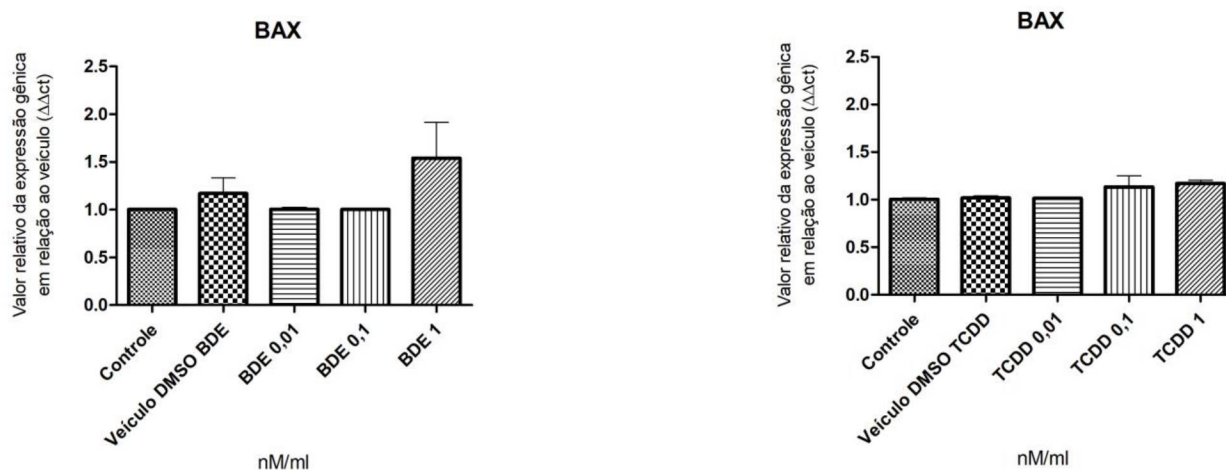


Gráfico 10: Expressão do gene BAX frente exposição aguda (24hrs) a TCDD e BDE-209 nas concentrações de 0.01, 0.1 e 1 nM, comparado aos veículos DMSO-TCDD e DMSO-BDE respectivamente, por  $\Delta\Delta CT$   $p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)

Outro gene importante dentro da via intrínseca da apoptose é o gene BCL2 que codifica a proteína de mesmo nome, com papel anti-apoptótico. O gene demonstra não sofrer alterações em sua expressão nas menores concentrações de ambos os contaminantes, no entanto a concentração de 1nM principalmente para o TCDD apresenta grande elevação, visto que a expressão dobrou em relação ao veículo.

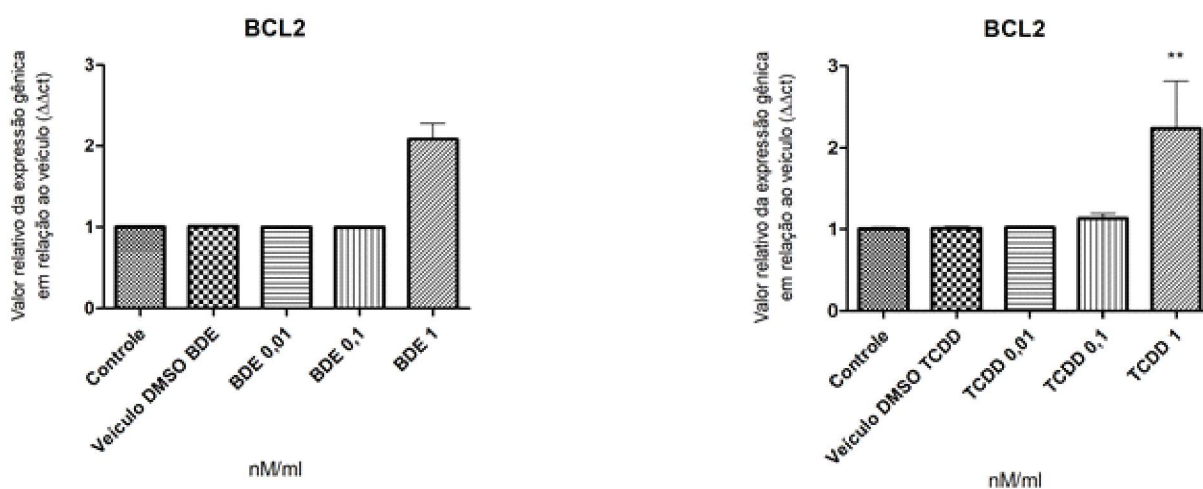


Gráfico 11: Expressão do gene BCL2 frente exposição aguda (24hrs) a TCDD e BDE-209 nas concentrações de 0.01, 0.1 e 1 nM, comparado aos veículos DMSO-TCDD e DMSO-BDE respectivamente, por  $\Delta\Delta CT$   $p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)

O gene BIRC5 correspondente à expressão da proteína survivina um dos tipos de IAPs, também relacionada com a via intrínseca do mecanismo de morte celular. Nesse caso a exposição aguda (24hrs) apresenta expressão uniforme, não variando em relação ao veículo, principalmente nas concentrações de TCDD, enquanto das concentrações de BDE-209 testadas, somente a de 1nM indica elevação (36%).

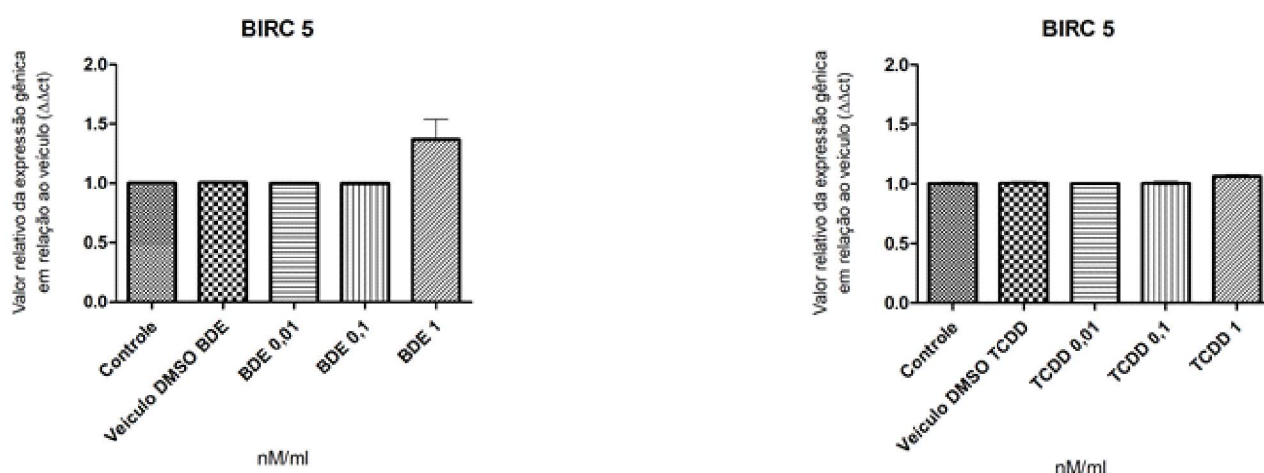


Gráfico 12: Expressão do gene BIRC5 frente exposição aguda (24hrs) a TCDD e BDE-209 nas concentrações de 0.01, 0.1 e 1 nM, comparado aos veículos DMSO-TCDD e DMSO-BDE respectivamente, por  $\Delta\Delta CT$   $p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)

O gene PI3KCA é responsável por codificar o fosfatidilinositol-3-quinase mais precisamente a subunidade catalítica p110 $\alpha$ . As concentrações de TCDD mostram aparentemente uma situação de dose dependência em comparação ao veículo, já nas concentrações de BDE-209 testadas a expressão do gene se mantém uniforme, com exceção para BDE-209 1nM, onde um aumento de 37% é observado.

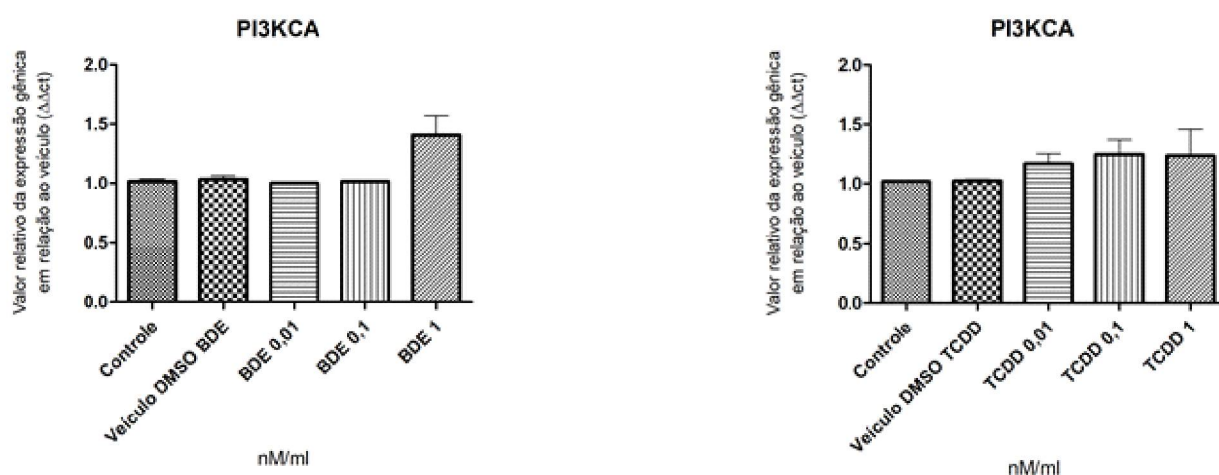


Gráfico 13: Expressão do gene PI3KCA frente exposição aguda (24hrs) a TCDD e BDE-209 nas concentrações de 0.01, 0.1 e 1 nM, comparado aos veículos DMSO-TCDD e DMSO-BDE respectivamente, por  $\Delta\Delta CT$   $p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)

Referente ao gene TP53 nota-se que tanto a exposição ao BDE-209 como ao TCDD, não influenciaram drasticamente na expressão desse gene após exposição aguda (24hrs). No entanto, ocorre um aumento de 6,15% na expressão do gene após exposição ao TCDD 01nM.

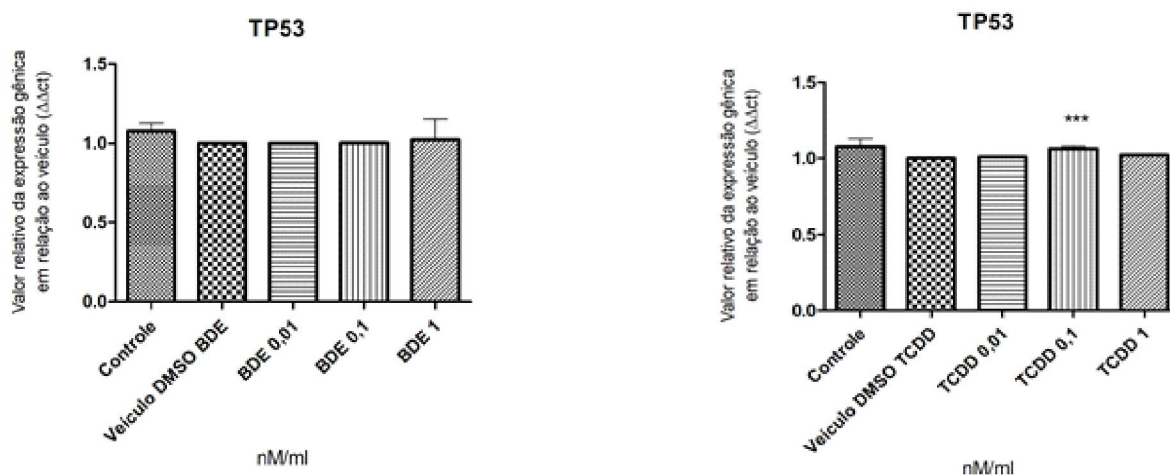


Gráfico 14: Expressão do gene TP53 frente exposição aguda (24hrs) a TCDD e BDE-209 nas concentrações de 0.01, 0.1 e 1 nM, comparado aos veículos DMSO-TCDD e DMSO-BDE respectivamente, por  $\Delta\Delta CT$   $p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)

#### *Resultados da exposição crônica:*

A análise da expressão gênica foi também realizada após exposição crônica (15 dias) aos poluentes nas mesmas concentrações. Foi observado que após a exposição prolongada ao contaminante, a expressão de BAX tende a se manter equiparada ao veículo nas concentrações testadas (Gráfico 15), mesmo na concentração de BDE-209 1nM, a qual demonstrava sinais de alteração (Gráfico 10).

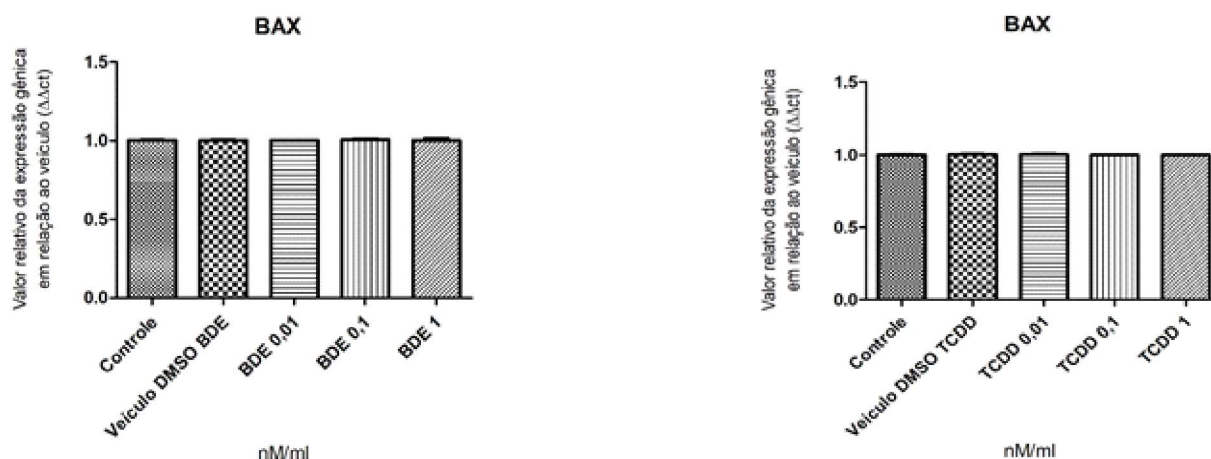


Gráfico 15: Expressão do gene BAX frente exposição crônica (15 dias) a TCDD e BDE-209 nas concentrações de 0.01, 0.1 e 1 nM, comparado aos veículos DMSO-TCDD e DMSO-BDE respectivamente, por  $\Delta\Delta CT$   $p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)

A expressão do gene BCL2 aparentemente não demonstrou alteração após exposição crônica (15 dias), sendo assim o nível de expressão tende a manter-se semelhante ao controle veículo; diferente do observado na exposição aguda (Gráfico 11), onde as maiores concentrações modulam positivamente a expressão do gene.

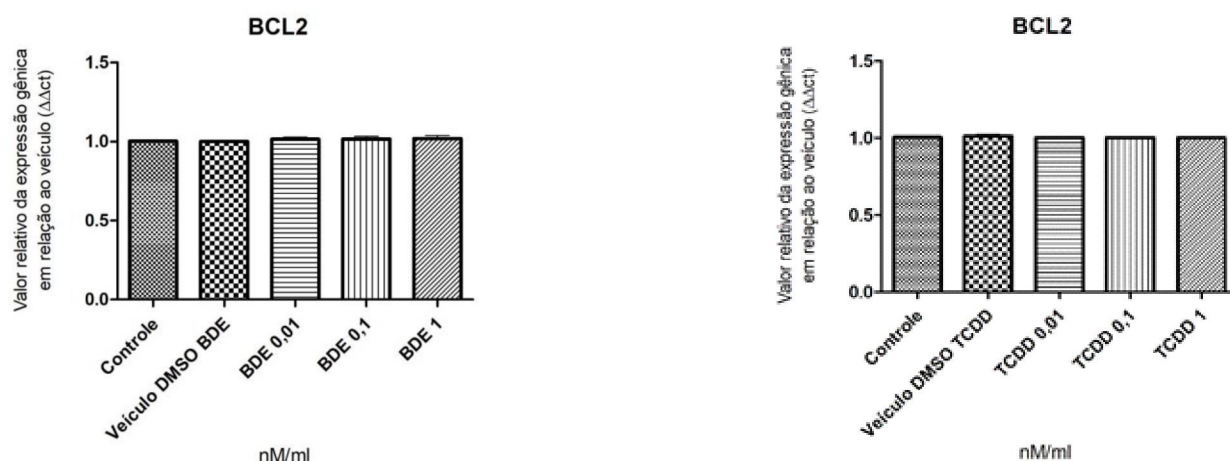


Gráfico 16: Expressão do gene BCL2 frente exposição crônica (15 dias) a TCDD e BDE-209 nas concentrações de 0.01, 0.1 e 1 nM, comparado aos veículos DMSO-TCDD e DMSO-BDE respectivamente, por  $\Delta\Delta CT$   $p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)

A expressão do gene BIRC5, após exposição crônica (15 dias) aos dois contaminantes não apresenta variações significativas quando comparadas com o grupo controle veículo (Gráfico 17).

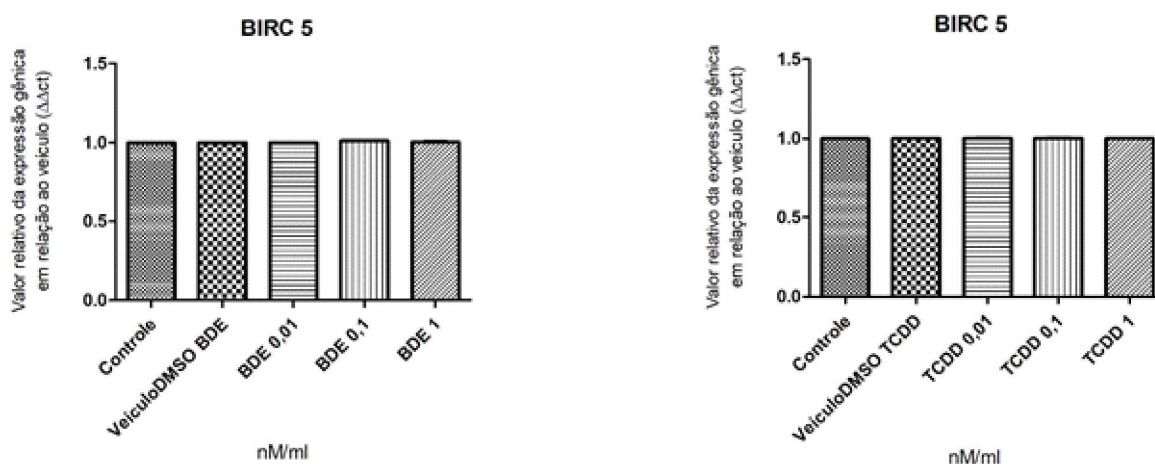


Gráfico 17: Expressão do gene BIRC5 frente exposição crônica (15 dias) a TCDD e BDE-209 nas concentrações de 0.01, 0.1 e 1 nM, comparado aos veículos DMSO-TCDD e DMSO-BDE respectivamente, por  $\Delta\Delta CT$   $p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0.01$  (\*\*\*)

A expressão do gene PI3KCA durante o ensaio agudo (Gráfico 13) apresenta variações que sugerem uma elevação da expressão do gene após exposição ao BDE-209 1nM, e aparentemente dose dependente nas concentrações testadas de TCDD, no entanto, nenhuma diferença ou alteração significativa é observada quando as células são expostas durante 15 dias (Gráfico 18).



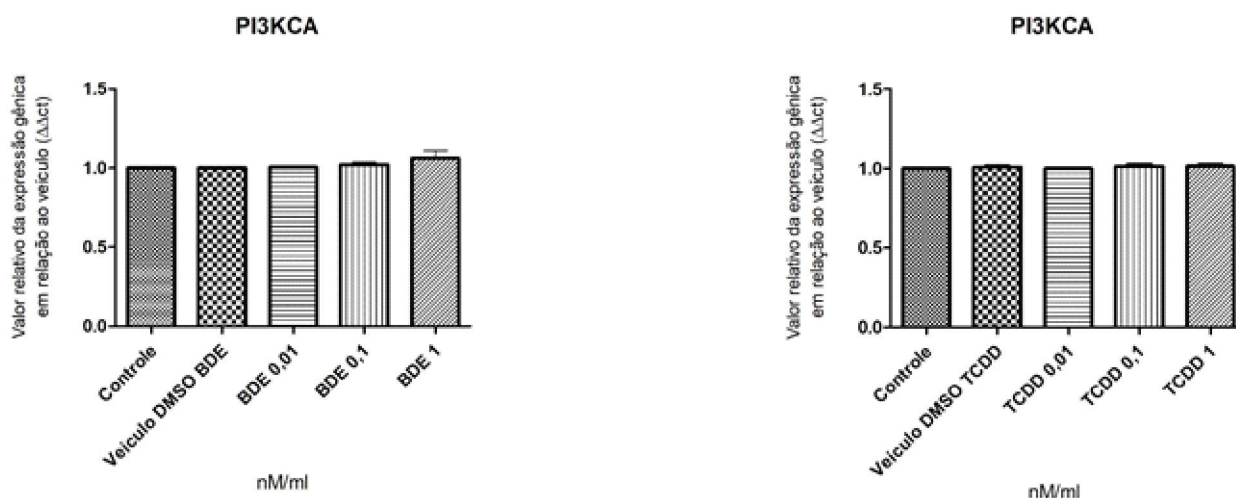


Gráfico 18: Expressão do gene PI3KCA frente exposição crônica (15 dias) a TCDD e BDE-209 nas concentrações de 0.01, 0.1 e 1 nM, comparado aos veículos DMSO-TCDD e DMSO-BDE respectivamente, por  $\Delta\Delta CT$   $p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)).

Com relação a expressão do gene TP53, mediante exposição crônica aos contaminantes BDE-209 e TCDD, nota-se que a expressão tende a manter-se parecida com a do veículo (Gráfico 19). Desse modo apresenta tecnicamente o mesmo perfil encontrado no ensaio agudo (Gráfico 14).

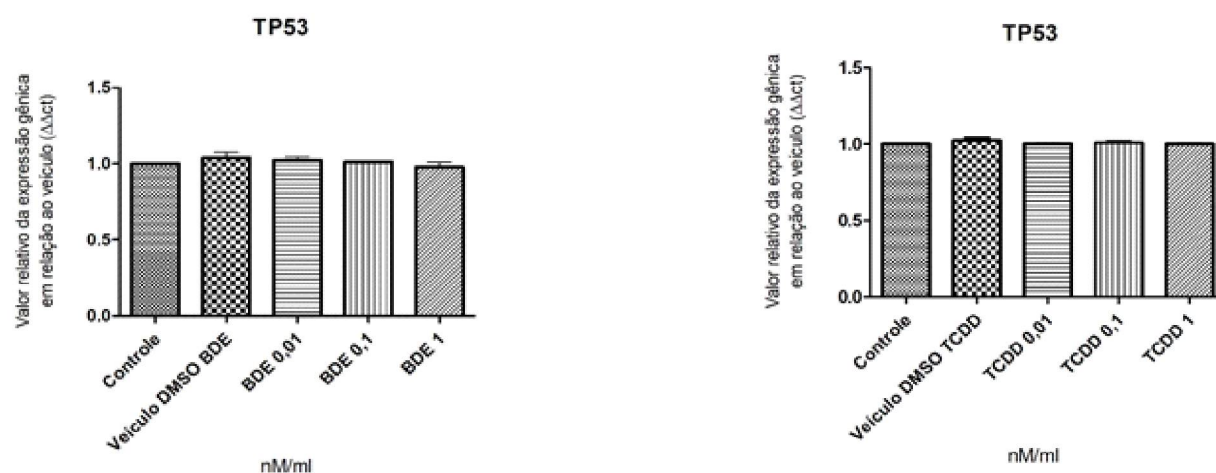


Gráfico 19: Expressão do gene TP53 frente exposição crônica (15 dias) a TCDD e BDE-209 nas concentrações de 0.01, 0.1 e 1 nM, comparado aos veículos DMSO-TCDD e DMSO-BDE respectivamente, por  $\Delta\Delta CT$   $p < 0.1$  (\*),  $p < 0.05$  (\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*\*)).

## 8 DISCUSSÃO.

Os resultados de exposição ao TCDD demonstraram que essa molécula interfere com a proliferação de células B16-F1, principalmente nas concentrações de 0,01nM e 0,1nM em exposição aguda e crônica respectivamente. Esses dados vão de encontro ao descrito por Gao et al. (2016), com relação a exposição aguda, onde foi demonstrado que o TCDD induz o aumento de proteínas dependentes de quinase (CDK-ciclinas), bem como estimula a progressão da fase G1 para a S em células epiteliais isoladas do palato fetal humano (hFPECs). Por outro lado, uma possível depleção é observada após exposição crônica, o que provavelmente deve-se às características citotóxicas da molécula. Os mesmos autores descrevem que a via PI3K/AKT é ativada pela exposição ao TCDD, sem, no entanto, apresentar dados que demonstrem qual é o mecanismo responsável. No presente estudo, foi observada uma possível modulação positiva dose dependente na expressão de PI3KCA mediante exposição aguda ao TCDD. Juntamente com os resultados de viabilidade celular, principalmente em relação a proliferação. Esses dados sugerem que a molécula pode estar modulando essa via (PI3K/AKT) pelo próprio controle da expressão da proteína

Os testes de avaliação do sistema endossoma lisossoma das células B16-F1, como observado pelos dados de proliferação parece responder melhor ao estresse químico agudo, ou seja, o sistema é mais ativado após exposição de 24hrs, principalmente nas concentrações 0,1nM e 1nM. Esses resultados também estão associados a um aumento no número de células. De acordo com Dever and Opanasuk (2012) e Pierre et al. (2011), outros tipos de células tumorais também apresentaram aumento na taxa proliferativa após exposição ao TCDD, como as células de hepatocarcinoma humano (HePG2) e do meduloblastoma (MB). De acordo com os

autores, essa resposta vem sendo associada ao receptor Ahr responsável por regular mecanismos como proliferação e migração celular, além de proteínas da família citocromo p450 (CYP450). Outro dado importante que auxilia no entendimento desse estímulo proliferativo, mediado pelo TCDD, está atrelado aos baixos níveis de expressão do gene BAX, que não apresenta alterações significativas e pela over expressão do gene BCL2, onde após exposição aguda (24hrs) na concentração de 1nM a exposição ao contaminante foi capaz de dobrar o nível de expressão do gene. A capacidade do TCDD de alterar a expressão de BCL2, como visto nas células B16-F1, também foi descrita em células endometriais humanas (RL95-2) principalmente em concentrações mais elevadas (10nM) (TANAKA. et. al., 2007). O fato do TCDD em concentrações 10 vezes mais baixa poder induzir a expressão de proteínas antiapoptóticas como a BCL2, é um argumento a mais que vai de encontro à hipótese de que essa molécula pode favorecer a resistência da célula tumoral ao tratamento quimioterápico. Essa evidência fica mais forte quando Hanlon et al. (2005) descrevem que o TCDD também age aumentando a expressão de BCL2 em células de fibroblastos (C3H10T1/2), e nesse caso foi demonstrado que a regulação desse gene foi independente da regulação oriunda da família dos fatores de crescimento epidérmico (EGF).

Alguns aspectos relacionados com a adesão celular e que apresentaram algum tipo de alteração pela exposição ao TCDD tem sido demonstrado nos mecanismos de adesão focal e regulação do citoesqueleto de actina. Esses resultados são recentes em nosso grupo mas mostram o envolvimento da molécula no processo de transição mesenquimal epitelial (EMT), devido à sua eficácia em modular negativamente e-caderina,  $\beta$ -catenina, e positivamente vimentina, fibronectina e actina. A regulação dessas moléculas realizada pela exposição ao TCDD vai de encontro com a inibição

do processo de formação de colônias em células de melanoma murino (B16-F1) revelados pelos testes clonogênicos no presente estudo. Nesse caso, embora ainda inconclusivo, há evidências de que o contaminante também é capaz de estimular a proliferação, culminando em alterações fenotípicas da célula que sugere um envolvimento da molécula com a progressão tumoral e o processo metastático (KOVALOVA et al., 2016, LEE. H. M, WANG. K. A. CHOI K. C. 2016).

Alguns autores mostraram que a exposição aguda ao TCDD é capaz de induzir a morte celular em células de tumor pituitário (AtT-20) e em células de tumor adrenal medular (PC12) de ratos. De acordo com os estudos, esses mecanismos estão associados principalmente ao supressor tumoral P53 devido sua capacidade de ativar fatores pró-apoptóticos celulares quando danos no DNA são irreparáveis. No entanto as células B16-F1 se mantiveram viáveis após exposição, mesmo diante da modulação positiva de Tp53, com destaque para a concentração de 0,1nM. Dessa forma, associado aos ensaios de viabilidade/citotoxicidade, pode-se afirmar que um pequeno aumento na expressão desse gene, mesmo com relevante significância estatística, não é capaz de induzir a apoptose em curto espaço de tempo (24 horas), pois as células, não só se mantem viáveis, como também ocorre estímulo proliferativo. Após a exposição crônica (15 dias) a expressão observada pode ser explicada pela adaptação celular frente ao contaminante visto que a mesma se mantem semelhante ao controle. (REINHARDT. H. C. & SCHUMACHER. B., 2012, SÁNCHEZ-MARTÍN et al., 2010).

Diferente do observado para o TCDD, a exposição ao BDE-209 parece não interferir com as células do melanoma nos mesmos padrões descritos para o poluente organoclorado. A exposição ao BDE-209 mostra que a molécula polibromada não interfere com a proliferação/nº de células B16-F1 aderidas após 24 horas. No entanto,

após a exposição crônica (15dias), é observado um estímulo desse tipo de resposta, em especial na concentração de 0,01nM. Embora muito pouco tenha sido descrito para explicar como o BDE-209 pode atuar sobre o mecanismo de proliferação celular; de acordo com Song et al. (2009) o BDE-47 não atua de forma significativa sobre o receptor Ahr, sugerindo que o papel proliferativo e de indução da migração em células de carcinoma adrenocortical humano (H295R), sejam por outra via. Ainda assim, segundo Wahl et al. (2010) algumas variantes de PBDEs podem interagir com esse receptor de uma forma mais branda em comparação às dioxinas. Além disso os PBDEs aumentam a expressão de um gene repórter ao AhR, em células de hepatocarcinoma humano (HEPG2). No conjunto, apesar de alguns desses fatores ainda precisem ser investigados e conhecidos, há indícios de que os polibromados, e mais especificamente o BDE-209 possam estar interferindo aumentando a proliferação/nº de células aderidas, em células B16-F1, após exposição crônica.

Além disso o mesmo tipo celular exposto a baixas concentrações de BDE-209 por 24hrs não sofreu diminuição na proliferação celular nem na atividade mitocondrial (PEREIRA et. al., 2016). No entanto em células de carcinoma mamário humano (MCF-7), ocorre estímulo proliferativo mediada pela exposição aguda a determinados PBDEs em baixas concentrações. Segundo Ferrari, R. S. (2017), somente nas maiores concentrações (10µM e 25µM) o BDE-209 induziu apoptose e necrose.

Em relação a atividade lisossomal o BDE-209 induz uma resposta inicial, somente na menor concentração, como visto na exposição aguda (24hrs) (0,01nM) estimulando esse mecanismo; já na exposição crônica, o contaminante apresenta uma relação de citotoxicidade observado na maior concentração. Existem poucos dados a respeito da exposição crônica aos PBDEs, porém essa atividade lisossomal inicial mais elevada pode estar associada a processos autofágicos como descrito por

Pereira et. al., 2017 onde células de hepatocarcinoma humano (HEPG2), apresentaram elevação da atividade lisossomal após exposição ao BDE-100 no período de 24 e 48hrs.

Ainda em exposição aguda (24hrs) o BDE-209 predispõe um aumento da expressão de quase todos os genes selecionados na concentração de 1nM, com exceção do TP53, em células B16-F1. Isso pode estar associado especificamente a essa concentração de BDE-209 que possui potencial genotóxico, como relatado por Pereira et. al. (2016) em células de hepatocarcinoma humano (HEPG2). No entanto, em concentrações inferiores não é observada genotoxicidade e as células apresentaram um índice de viabilidade acima de 90% pelo método azul de tripan em todas as concentrações testadas mesmo após exposição crônica (15dias).

Outro ponto relevante diz respeito a expressão de BAX e BCL2. De acordo com Barber et. al. (2006), baixas concentrações de PBDEs podem gerar dano ao DNA (se tratando de um estímulo a ativação e/ou inibição além de síntese dessas proteínas), em células de carcinoma mamário humano (MCF-7), porém não modulam a expressão desses genes, após 24 hrs de exposição. Além da proteína BAX e BCL2, o gene BIRC5 também apresenta o mesmo perfil de expressão nas células B16-F1 após exposição aguda, possivelmente dependente de concentrações mais elevadas do contaminante, visto que na maior concentração testada o contaminante tende a iniciar uma modulação positiva na expressão dos três genes. A expressão do gene BIRC5 está relacionado também com a proliferação celular, através do componente CPC (*chromosomal passenger complex*), que regula aspectos chaves da mitose, incluindo a estrutura do cromossomo e do fuso mitótico, bem como correções de erros nas conexões entre os microtúbulos e o cinetócoro (Papini et al., 2015). Nesse caso, é possível que a exposição ao BDE-209 possa influenciar nas primeiras horas a

ativação de mecanismos de proliferação celular. Por outro lado, os mesmos genes não apresentam perfil semelhante após exposição de 15 dias, o que pode significar também que a expressão das proteínas nas primeiras horas seja suficiente para manter a proliferação, como sugerido nos dados clonogênico e cristal violeta. Embora seja um argumento mais especulativo, pode fazer sentido visto que após 15 dias de exposição ao BDE-209 as colônias encontram-se mais espalhadas e não tendem a formar grandes aglomerados, sugerindo um comportamento mais metastático. Segundo Wang et al. (2015) o BDE-99 induziu a migração e invasão em células epiteliais de carcinoma do colorretal humano (HCT 116), principalmente na concentração de 10 $\mu$ M e 72hrs de exposição. Nesse caso a indução foi de 1,5 e 1,7 vezes maior em relação ao controle. Esses dados corroboram a hipótese de que a exposição a PBDEs pode induzir a proliferação em células tumorais, favorecendo um fenótipo mais agressivo dessas células. Embora existam poucas informações a respeito da ação de PBDEs sobre esse tipo de mecanismo, os mesmos autores demonstraram que o BDE-99 está associado com o aumento de motilidade por atuar na expressão de proteínas como a cofilina e  $\beta$ -actina. Além disso, foi observado ainda que essa molécula modulou positivamente a expressão de genes associado com a transição mesenquimal epitelial (EMT), SNAIL (*zinc finger*) repressor de transcrição de e-caderinas e de proteínas antiapoptóticas. Esse conjunto de informações reforça a hipótese do presente estudo ao mesmo tempo que revela, como observado para o congênere BDE-99, que também o BDE-209 quando exposto às células B16-F1 induz mudanças que podem ser interpretadas como um aumento na malignidade dessas células, principalmente pelos resultados do clonogênico e de expressão do gene responsável pela proteína antiapoptótica BCL2 na maior concentração, ressaltando que os PBDEs podem modular aspectos da apoptose celular, desencadeando

diversos efeitos, encolhimento da célula, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e por fim formação dos corpos apoptóticos. (LEE et al., 2005). Foi observado ainda que a exposição ao BDE-99 interfere na via de sinalização PI3K/AKT/SNAIL, desencadeando por meio desta a EMT, o que corrobora com a expressão de PI3KCA do presente estudo após exposição aguda (24hrs) na maior concentração de BDE-209. Essa parece ser portanto, uma via a ser explorada em futuros experimentos com os PBDEs (WANG. F, RUAN. X. J, & ZHANG, H. Y. 2015).

Mais recentemente, resultados com expressão de metaloproteases após exposição *in vitro* e de estudos *in vivo* utilizando inoculação de células tumorais B16F1 em camundongos após exposição crônica de 30 dias ao BDE-209, mostraram que essas células são muito mais agressivas e se distribuem por diversos tecidos nos grupos expostos previamente ao poluente. Esses dados, corroboram os resultados apresentados nesse estudo, onde apesar dos mecanismos estarem interligados aparentemente os PBDEs atuam de forma mais clara sobre a proliferação celular do que diretamente sobre apoptose, que foi o principal objetivo desse trabalho. Apesar disso, outros estudos são necessários e importantes para a compreensão dos efeitos de PBDEs tanto nos mecanismos de citotoxicidade como de alteração do fenótipo de células tumorais como a B16F1.

## **9 CONSIDERAÇÕES FINAIS.**

De acordo com os resultados apresentados a exposição ao TCDD nas primeiras horas não interfere diretamente com o mecanismo de apoptose, mas é capaz de desencadear respostas celulares na linhagem B16F1 como a proliferação celular em baixas concentrações, ao mesmo tempo que é citotóxico em concentrações mais altas. Na exposição crônica ao contaminante ocorre uma inibição na formação de



colônias em células de melanoma murino, o que poderia ser explicado em parte pela literatura onde sua ação sobre proteínas de adesão célula-célula vai de encontro com a ativação da transição epitelial mesenquimal (EMT).

A atuação do TCDD sobre os genes investigados no presente estudo é diversificada, pois enquanto em baixas concentrações não há evidências de modulação da expressão dos genes considerados (BCL-2, PIK3CA e TP53), esses tendem a uma modulação positiva mediante exposição aguda. No entanto, após um período crônico de exposição o que é observado difere do descrito para 24 horas, pois nenhuma diferença ou mesmo alteração no padrão de expressão desses genes é observada. Esses dados sugerem que o papel dessa molécula não se aplica diretamente ao mecanismo de morte celular investigado, mas apresenta indícios de interferir tanto no genótipo como no fenótipo dessas células, modulando positivamente processos proliferativos de sobrevivência e migração celular. Portanto, por se tratarem de células tumorais o contaminante parece estimular a progressão tumoral em determinadas concentrações, o que necessariamente precisaria ser confirmado com outros estudos tanto *in vitro* como *in vivo*.

O outro contaminante também considerado no presente estudo foi o composto polibromado BDE-209. Em um primeiro momento foi observado que a exposição ao poluente não interfere na proliferação das células B16-F1, mas o sistema endossoma lisossoma sofre modulação positiva após o estresse químico agudo, enquanto após exposição crônica ocorre um estímulo do processo proliferativo, juntamente com a manutenção da viabilidade celular. De uma maneira geral os dados convergem para uma interferência no processo de adesão célula-célula e possivelmente com os mecanismos de transição epitelial mesenquimal, como descrito para o TCDD.

Além disso a exposição ao composto polibromado tende a interferir com a expressão dos genes investigados somente na maior concentração em exposição aguda, curiosamente não mostra nenhuma alteração após 15 dias de exposição.

Desse modo o BDE-209 parece agir apenas após exposição a concentrações mais altas, sendo necessário, portanto, maiores investigações a respeito da ação desse composto não só sobre o mecanismo de morte, mas também sobre a proliferação e migração celular, visto que esses mecanismos estão associados com a progressão tumoral e interação entre si.

## **10 PERSPECTIVAS FUTURAS.**

Os dados apresentados nessa dissertação instigam várias questões e abrem novas possibilidades de estudo dentro da linha de pesquisa proposta, auxiliando a continuidade dessa linha investigativa e complementando outros resultados proveniente de trabalhos em andamento.

Esse foi o primeiro estudo realizado com o objetivo de avaliar se poluentes orgânicos como o BDE-209 e o TCDD, podem alterar o fenótipo de células tumorais interferindo assim com o prognóstico do câncer. Mais especificamente, observamos que dentro dos parâmetros utilizados no estudo, essas moléculas tendem mais a alterar o estado proliferativo que propriamente atuarem como moduladores dos mecanismos de morte celular, direcionado assim os futuros estudos para essas questões elencadas.

## REFERÊNCIAS

- A DIVISION OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (CAS). Database counter. Disponível em < <http://www.cas.org/content/counter>>. Acesso em 07/11/2017
- ALAE, M. et al. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment international*, v. 29, n. 6, p. 683–9, set. 2003.
- ALMEIDA, F. V & CENTENO, A. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 8, 2007.
- ALONSO, S. R., ORTIZ, P., POLLÁN, M., PÉREZ-GÓMEZ, B., SÁNCHEZ, L., ACUNA, M. J., ... & RODRÍGUEZ-PERALTO, J. L. (2004). Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *The American journal of pathology*, 164(1), 193-203.
- ALTIERI, D.C. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy, *Trends Mol. Med.* 7 (12) (2001) 542–547
- ASSUNÇÃO, J.V.; PESQUERO, C.R. Dioxinas e furanos: origem e riscos. *Rev. Saúde Pública*, 33 (5):523-30, 1999
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for Chlorinated Dibenzo-P-Dioxins, Atlanta, GA., 1998.
- BAIRD A-M, GRAY SG, RICHARD DJ, O'BYRNE KJ. Promotion of a cancer-like phenotype, through chronic exposure to inflammatory cytokines and hypoxia in a bronchial epithelial cell line model. *Scientific Reports*. 2016;6:18907.
- BARBER, J. L., WALSH, M. J., HEWITT, R., JONES, K. C., & MARTIN, F. L. (2006). Low-dose treatment with polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) induce altered characteristics in MCF-7 cells. *Mutagenesis*, 21(5), 351-360.
- BAROUKI. R. COUMOULA. X. SALGUERO. P. M. F. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Letters Volume 581, Issue 19, 31 July 2007, Pages 3608-3615.*
- BASELGA. J. Targeting the Phosphoinositide-3(PI3) Kinase Pathway in Breast Cancer. *THE ONCOLOGIST*. Massachusetts General Hospital Cancer Center, Boston, Massachusetts, USA. 2011.
- BIRNBAUM MJ, CLEM RJ, MILLER LK. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *JVirol* 1994; 68:2521–8
- BROWN, K.K TOKER, A. The phosphoinositide 3-kinase pathway and therapy resistance in cancer, *F1000, Prime Rep* 7 (2015) 13.
- BUDHIDARMO R, DAY CL. IAPs: modular regulators of cell signalling. *Semin Cell Dev Biol* 2014, pii:S1084-9521(14)00324-3.
- CABRITA, I.; GULYURTLU, I.; PINTO, F.; BOAVIDA, D.; COSTA, P.; RACHA, L. Formação e Destrução de Dioxinas em Processos de Combustão e Co-Combustão. *RFML* 2003; Série III; 8 (4): 225-235.
- CHAO. Y, ZHANG. R, WANG. X, et al. Is survivin a novel pathway for the treatment and pathogenesis of keloid? Elsevier. 2013.
- CHANG. Y, C, KUAN. Y, H, OU. Y, C. et al. Autophagy contributes to gefitinib-induced glioma cell growth inhibition. Elsevier. 2014.

- CHEN LIANGUO, ZHU BIRAN, GUO YONGYONG, XU TAO, JAE-SEONG LEE, PEI-YUAN QIAN, BINGSHENG ZHOU. High-throughput transcriptome sequencing reveals the combined effects of key e-waste contaminants, decabromodiphenyl ether (BDE-209) and lead, in zebrafish larvae. *Environmental Pollution* 214, 2016, 324e333
- COURTNEY.K. D, CORCORAN. R. B, ENGELMAN. J The PI3K pathway as drug target in human cancer, *J Clin Oncol* 28 (2010) 1075–1083
- COVACI, A. et al. Novel brominated flame retardants: a review of their analysis, environmental fate and behaviour. *Environment international*, v. 37, n. 2, p. 532–56, fev. 2011.
- DEVER, D.P. OPANASHUK. L.A. The aryl hydrocarbon receptor contributes to the proliferation of human medulloblastoma cells *Mol. Pharmacol.*, 81 (2012), pp. 669-678
- DYSON, J.M. FEDELE, C.G. DAVIES, E.M. BECANOVIC, J. MITCHELL, C.A. PARKETAL. S. *BBA - Reviews on Cancer* 1870 (2018) 198–206 203
- DUBREZ L, BERTHELET J, GLORIAN V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. *Onco Targets Ther* 2013;9: 1285–304.
- ECKERLE, I., MUTH, D., BATZLER, J., HENRICH, K. O., LUTZ, W., FISCHER, M., ... & WESTERMANN, F. (2009). Regulation of BIRC5 and its isoform BIRC5-2B in neuroblastoma. *Cancer letters*, 285(1), 99-107.
- EDLICH F, BANERJEE S, SUZUKI M, CLELAND MM, ARNOULT D, WANG C, NEUTZNER A, TJANDRA N, YOULE RJ: Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 2011, 145:104-116.
- 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.
- ENGLISH K; CHEN Y; TOMS L; JAGALS P; WARE R. S; MULLER J. F; SLY P. D Polybrominated diphenyl ether flame retardant concentrations in faeces from young children in Queensland, Australia and associations with environmental and behavioural factors. 2017.
- ESTORNES Y, BERTRAND M.J. IAPs, regulators of innate immunity and inflammation. *Semin Cell Dev Biol* 2014, pii:S1084-9521(14)00073-1.
- FÅNG, J., NYBERG, E., WINNBERG, U., BIGNERT, A., & BERGMAN, Å. (2015). Spatial and temporal trends of the Stockholm Convention POPs in mothers' milk—a global review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(12), 8989-9041.
- FELTHAM R, BETTJEMAN B, BUDHIDARMO R, MACE PD, SHIRLEY S, CONDON SM, et al. Smac mimetics activate the E3 ligase activity of cIAP1 protein by promoting RING domain dimerization. *J Biol Chem* 2011;286:17015–28.
- FERRARI, R. S. (2016). Quantificação de PBDEs em amostras de sedimentos de Ribeirão Preto e avaliação da toxicidade do BDE-209 em células HepG2 sob influência de indução autofágica (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- FERREIRA, M. B. (2014). Avaliação do papel da proteína TCTP em melanoma murino (B16-F1 e B16-F10).
- FIORITO F., IOVANE V., MARULLO A, COSTAGLIOLA A, GRANATO G. E. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin influences bovine herpesvirus 1 replication through upregulation of SIRT3 and cytoskeletal Reorganization. 2017 *Vet Res Commun*.
- FROMME, HERMANN & HILGER, B & KOPP, E & MISEROK, M & VÖLKEL, WOLFGANG. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), hexabromocyclododecane (HBCD) and "novel" brominated flame retardants in house dust in Germany. *Environment international*. 2013 64C. 61-68. 10.1016/j.envint 2013

FRUMAN, D.A. CHIU, H., HOPKINS, B.D. BAGRODIA, SCANTLEY, L. CABRAHAM, R.T. The PI3K pathway in human disease, *Cell* 170 (2017) 605–635.

FUJISAWA, N., YOSHIOKA, W., YANAGISAWA, H. Roles of cytosolic phospholipase A2 $\alpha$  in reproductive and systemic toxicities in 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed mice. 2017 *Arch Toxicol*.

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.

GraphPad Software, Inc. All rights reserved 1995-2017. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

GRIVICICH, I; REGNER, A; ROCHA, A, B. Morte Celular por Apoptose; Revisão de Literatura; Revista Brasileira de Cancerologia; p.335. 2007. Disponível em: [www.inca.gov.br/rbc/n\\_53/v03/pdf/revisao4](http://www.inca.gov.br/rbc/n_53/v03/pdf/revisao4)

HANLON P. ZHENG W. KO A. JEFCOATE C. SEE FEWER. Identification of novel TCDD-regulated genes by microarray analysis *Toxicology and Applied Pharmacology*. Volume 202, Issue 3, 1 February 2005, Pages 215-228 (2005).

HIEKEN, T. J., RONAN, S. G., FAROLAN, M., SHILKAITIS, A. L., & DAS GUPTA, T. K. (1999). Molecular prognostic markers in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 85(2), 375-382.

HOOPER, H. & MCDONALD, T. A. The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs. *Environmental Health Perspectives*, 108(5): 387-392. 2000.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. PAS - Pesquisa Anual de Serviços, 2017. [Online] Disponível na internet via <https://www.ibge.gov.br/>

IARC - The International Agency for Research on Cancer-Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018

INCA - Instituto Nacional do Câncer -. Tipos de Câncer: Pele Melanoma. Rio de Janeiro: INCA; 2017. Acesso em: 17 de junho de 2019. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-brasil-consolidado.asp>

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. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 61, n. 10, p. 640-658, 2007.

JENG, P. S AKANE INOUE-YAMAUCHI , JAMES J HSIEH AND EMILY H CHENG BH3-dependent and independent activation of BAX and BAK in mitochondrial apoptosis

JIN S; YANG F; HUI Y; XU Y; LU Y; LIU J; Cytotoxicity and apoptosis induction on RTG-2 cells of 2,20 ,4,40 -tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) and decabrominated diphenyl ether (BDE-209) 2010.

KARJALAINEN, J. M., ESKELINEN, M. J., KELLOKOSKI, J. K., REINIKAINEN, M., ALHAVA, E. M., & KOSMA, V. M. (1999). P21 WAF1/CIP1 expression in stage I cutaneous malignant melanoma: its relationship with p53, cell proliferation and survival. *British journal of cancer*, 79(5), 895.

KOVALOVA, NATALIA, NAULT, RANCR, CRAWFOR, ROBERT, ZACHAREWSKI, TIMOTHYT R., KAMINSKI, NOBERT E., Comparative analysis of TCDD-induced AhR-mediated gene expression in human, mouse and rat primary B cells, *Toxi-cology and Applied Pharmacology* (2016),

KRANP. G., *Biologia Celular e Molecular; conceitos e experimentos* Editora Manole Ltda, 2005 ISBN 8520415938, 9788520415931 pág.656.

LEHNERT M, WILLIAM S. D, DENISE R, SCOTT E, AND SYDNEY E. Synergistic Inhibition by Verapamil and Quinine of P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance in a Human Myeloma Cell Line Model. *Blood*, Vol77, No 2 (January 15), 1991: pp 348-354

LEE, H.J., WANG, C.J., KUO, H.C., CHOU, F.P., JEAN, L.F., TSUI, H.T. Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 203,124–131.2005

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.

LI, F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis, *Br. J. Cancer* 92 (2) (2005) 212–216.

LI, J. Y. J. SHI, J.F. SANG, Y.Z. YAO, X.C. WANG, L. SU, Role of survivin in the pathogenesis of papillary thyroid carcinoma, *Genet. Mol. Res.: GMR* 14 (4) (2015) 15102–15111.

LU. M, MILLER. P, LU. X. Restoring the tumour suppressive function of p53 as a parallel strategy in melanoma therapy- Ludwig Institute for Cancer Research, Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, Oxford OX3 7DQ, UK- 2014.

MANNETJE ANDREA, ENG AMANDA, WALLS CHRIS, DRYSON EVAN, DOUWES JEROEN, PIER BERTAZZIC, SIMON RYDER-LEWISD, DAVID SCOTTE, COLLIN BROOKSA, DAVE MCLEANNA, SOO CHENGA, NEIL PEARCEF Morbidity in New Zealand pesticide producers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Environment International* (2017), (in press).

MARTINOU JC, YOULE RJ: Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell* 2011, 21:92-101.

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

MIMURA J, YAMASHITA K, NAKAMURA K et al (1997) Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 2(10):645–654

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *The Journal of Immunology*, vol. 65 p.55–63, 1983.

MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R. E. Clonogenic Cell Survival Assay. **Chemosensitivity vol. 1: *In vitro Assays***. Blumenthal, vol. 110 p. 21-28, 2005.

NAKANO. K., K.H. VOUSDEN, PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53, *Molecular cell*, 7 (2001) 683-694

NASCIMENTO C., CRUZ M. Resíduos industriais e a invisibilidade de seus riscos socioambientais. *Revista da Associação Nacional de Pós-graduação e Pesquisa em Geografia (Anpege)*. p.257-279, V.11, n.15, jan-jun.2015.

NELSON C. DROUILLARD K. CHENG K. ELLIOT J. ISMAIL N. Accumulation of PBDEs in an urban river otter population and an unusual finding of BDE-209. 2014

NTP- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM: Study of 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzeno-p-dioxin (TCDD) in female Harlan Sprague-dawley rats. *Toxicology and Carcinogenesis* n° 06-4468, 2006.

O'CONNOR, D.S. J.S. SCHECHNER, C. ADIDA, M. MESRI, A.L. ROTHERMEL, F. LI, et al., Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells, *Am. J. Pathol.* 156 (2) (2000) 393–398.

OKKENHAUG, K GRAUPERA, M. VANHAESEBROECK, B. Targeting PI3K in cancer: impact on tumor cells, their protective estroma, angiogenesis and immunotherapy, *Cancer Discov* 6 (2016) 1090–1105.

OVERWIJLK. W, W., RESTIFO. N, P. B16 As a Mouse Model for Human Melanoma. *Current protocols in immunology* / edited by John E Coligan 2001; CHAPTER: Unit-20.1.

PAPINI D, LANGEMEYER L, ABAD MA, KERR A, SAMEJIMA I, EYERS PA, ET AL. TD-60 links Ra1A GTPase function to the CPC in mitosis. *Nat Commun* (2015) 6:7678. doi:10.1038/ncomms8678

PARK, S, YOUNG SIK KIM, DAVIS YEON KIM, INSUK SO, JU-HONG JEON PI3K pathway in prostate cancer: All resistant roads lead to PI3K – *BBA - Reviews on Cancer* – 2018.

PEARSON, HB. LI, J. V.S. MENIEL, C.M. FENNEL, P. WARING, K.G. MONTGOMERY, R.J.REBELLO,A.A.MACPHERSON,S.KOUSHYAR,L.FURIC,C.CULLINANE,R.W.CLARKSON, M.J. SMALLEY, K.J. SIMPSON, T.J. PHESSSE, P.R. SHEPHERD, P.O. HUMBERT, O.J. SANSOM, W. A. WEE S., WIEDERSCHAIN, D. S.M. MAIRA, A. LOO, C. MILLER, R. DE BEAUMONT, F.STEGMEIER, Y.M. YAO,C. LENGAUER, PTEN-deficient cancers depend on PIK3CB, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 13057–13062.

PEPPER, C. HOY, T. BENTLEY, P. Elevated Bcl-2/Bax are a consistent feature of apoptosis resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia and are correlated with in vivo chemoresistance, *Leuk. Lymphoma* 28 (3-4) (1998) 355–361.

PEREIRA, L. C. Avaliação dos congêneres BDE-100 e BDE-153 de éteres difenílicos polibromados sobre a linhagem celular HepG2 e linfócitos humanos: efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo) (2016).

PEREIRA, L. C., DUARTE, F. V., VARELA, A. T. I. F., ROLO, A. P., PALMEIRA, C. M. M., & DORTA, D. J. (2017). An autophagic process is activated in HepG2 cells to mediate BDE-100-induced toxicity. *Toxicology*, 376, 59-65.

PETITJEAN, A. E. MATHE, S. KATO, C. ISHIOKA, S.V. TAVTIGIAN, P.HAINAUT, M. OLIVIER Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database *Hum. Mutat.*, 28 (2007), pp. 622-629

PIERRE, S. BATS A.S., CHEVALLIER A., BUI L.C., AMBOLET-CAMOIT, A. GARLATTI M., AGGERBECK M., BAROUKI R., COUMOUL. X. Induction of the Ras activator son of sevenless 1 by environmental pollutants mediates their effects on cellular proliferation *Biochem. Pharmacol.*, 81 (2011), pp. 304-313

PHILLIPS, Identification of Pik3ca mutation as a genetic driver of prostate cancer that cooperates with Pten loss to accelerate progression and Ccastration-resistant growth, *Cancer Discov* 8 (2018) 764–779.

RAJENDRAN. R, R & KAO. G, D. “No Turning Bax” in the Combined Battle against Prostate Cancer” *The Biology Behind. Clinical Cancer Research; American Association for Cancer Research* (2007).

RASBAND, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.

REINHARDT, H.C. SCHUMACHER. B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer *Trends Genet.*, 28 (2012), pp. 128-136

REPETTO, G.; PESO, A. D.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, vol. 3 p. 1125-1131, 2008

RILEY. T, E. SONTAG, P. CHEN, A. LEVINE, Transcriptional control of human p53-regulated genes, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9 (2008) 402-412

ROBIN, ADELINE Y. SWETA IYER, RICHARD W. BIRKINSHAW, JARROD SANDOW, AHMAD WARDAK, CINDY S. LUO, MELISSA SHI, ANDREW I. WEBB, PETER E. CZABOTAR, RUTH M.

KLUCK, AND PETER M. COLMAN WALTER AND ELIZA HALL Institute of Medical Research, 1G Royal Parade, Parkville, VIC 3052, Australia 2018.

SÁNCHEZ-MARTÍN, F. J., FERNÁNDEZ-SALGUERO, P. M., & MERINO, J. M. (2010). 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces apoptosis in neural growth factor (NGF)-differentiated pheochromocytoma PC12 cells. *Neurotoxicology*, 31(3), 267-276.

SANI. M. R, ALGHASI. A, BOROJENI. S. A, JALALI. A, JAMSHIDI. M, KHODADAD. A. Survivin as a diagnostic and therapeutic marker for thyroid cancer *Pathology - Research and Practice*. 2019.

SHADFAN, M PAJARES, V. L, AND YUAN. Z. M, MDM2 and MDMX: Alone and together in regulation of p53 1Department of Cellular and Structural Biology and Department of Radiation Oncology, University of Texas Health Science Center San Antonio, San Antonio, TX, USA 2Harvard University, Boston, MA, USA Published in final edited form as: *Transl Cancer Res*. 2012 August ; 1(2): 88–89.

SONG, R., DUARTE, T. L., ALMEIDA, G. M., FARMER, P. B., COOKE, M. S., ZHANG, W., ... & JONES, G. D. (2009). Cytotoxicity and gene expression profiling of two hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in human H295R adrenocortical carcinoma cells. *Toxicology letters*, 185(1), 23-31.

STEIL, G. J. Efeitos do TCDD (2,3,7,8- Tetraclorodibenzeno-P-Dioxina) e BDE-209 (Decabromodifenil Éter) na Malignidade de Células de Melanoma Murino B16F1 in vitro. Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. 2016.

SUZUKI, M., YOULE, R. J., TJANDRA, N. Structure of Bax: Coregulation of Dimer Formation and Intracellular Localization *Cell* Volume 103, Issue 4, 10 November 2000, Pages 645-65

TANAKA, J., YONEMOTO, J., ZAHA, H., KIYAMA, R., SONE, H. Estrogen-responsive genes newly found to be modified by TCDD exposure in human cell lines and mouse systems *Molecular and Cellular Endocrinology*, Volume 272, Issue 1-2, 30 June 2007. *Cell Biol*. 9 (3) (2008) 231–241.

TAYLOR, R.C. CULLEN, S.P. MARTIN, S.J Apoptosis: controlled demolition at the cellular level, *Nat. Rev. MolTanaka, J., Yonemoto, J., Zaha, H., Kiyama, R., Sone, H.Hide details*.

TCHERNEV, G., & ORFANOS, C. E. (2007). Downregulation of cell cycle modulators p21, p27, p53, Rb and proapoptotic Bcl-2-related proteins Bax and Bak in cutaneous melanoma is associated with worse patient prognosis: preliminary findings. *Journal of cutaneous pathology*, 34(3), 247-256.

THE INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. Acesso em: 09 de fevereiro de 2019. Disponível em: [https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263\\_E.pdf](https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263_E.pdf).

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M.K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society Journal*, vol.54 p. 10–14. 2011.

VIGANO.L, ROSCIOLI. C, GUZZELLA. L. Decabromodiphenyl ether (BDE 209) enters the food web of the River Po and is metabolically debrominated in resident cyprinid fishes *Sci Total Environ*, 409 (2011), pp. 4966-4972.

XIUTING. H. XIANGPINGi. N. WANG. Z. et al. Assessment of typical pollutants in waterborne by combining active biomonitoring and integrated biomarkers response

YAMADA. K. & YOSHIDA K. Mechanical in sights in to the regulation of programmed cell death by p53 via mitochondria- Department of Biochemistry, The Jikei University School of Medicine, 3-25-8 Nishi-Shinbashi, Minato-ku, Tokyo105-8461, Japan *BBA - Molecular Cell Research*- 2019

YAMAMOTO, M., TAKAHASHI, H., SAITOH, K., HORIKOSHI, T., & TAKAHASHI, M. (1995). Expression of the p53 protein in malignant melanomas as a prognostic indicator. *Archives of dermatological research*, 287(2), 146-151.



WAHL, M., GUENTHER, R., YANG, L., BERGMAN, A., STRAEHLE, U., STRACK, S., WEISS, C. HIDE Polybrominated diphenyl ethers and arylhydrocarbon receptor agonists: Different toxicity and target gene expression *Toxicology Letters*, Volume 198, Issue 2, October 2010

WANG F, RUAN XJ AND ZHANG HY: BDE-99 (2,2',4,4',5-pentabromo-diphenyl ether) triggers epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells via PI3K/Akt/Snail signaling pathway. *Tumori*. 101:238–245. 2015. View Article : Google Scholar : PubMed/NCBI

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.

WANG, Y.X. M.L. LI, LIU C.M. YU SG, Y. HAN, The association between the Survivin A9194G exon polymorphisms and papillary thyroid carcinoma risk in the Han Chinese population, *Pathol. Res. Pract.* 209 (3) (2013) 151–154.