

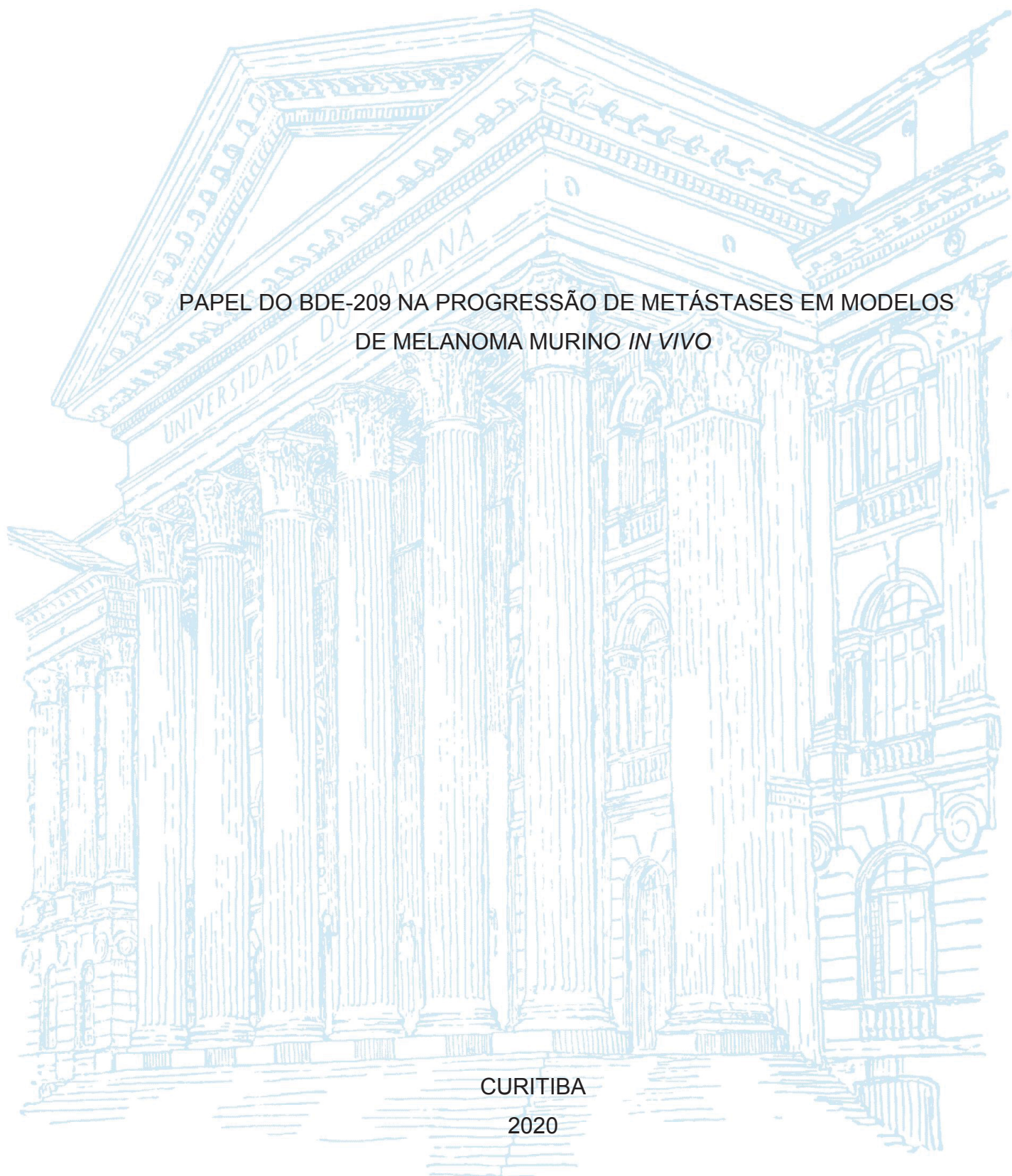
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRICIA ELENA MANUITT BRITO

PAPEL DO BDE-209 NA PROGRESSÃO DE METÁSTASES EM MODELOS
DE MELANOMA MURINO *IN VIVO*

CURITIBA

2020



PATRICIA ELENA MANUITT BRITO

PAPEL DO BDE-209 NA PROGRESSÃO DE METÁSTASES EM MODELOS
DE MELANOMA MURINO *IN VIVO*

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

Orientador: Prof. Dr. Ciro de Oliveira Ribeiro

Coorientador: Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade

CURITIBA
2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Brito, Patricia Elena Manuitt.

Papel do BDE-209 na progressão de metástases em modelos de melanoma murino *in vivo*. / Patricia Elena Manuitt Brito. – Curitiba, 2020.
110 f. : il.

Orientador: Ciro de Oliveira Ribeiro.
Coorientadora: Edvaldo da Silva Trindade.

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

1. Melanoma. 2. Quimioterapia. 3. Tumores. 4. Câncer. I. Título. II. Ribeiro, Ciro de Oliveira. III. Trindade, Edvaldo da Silva. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 616.99477



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de PATRICIA ELENA MANUITT BRITO Intitulada: **PAPEL DO BDE-209 NA PROGRESSÃO DE METÁSTASES EM MODELOS DE MELANOMA MURINO *IN VIVO***, sob orientação do Prof. Dr. CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO, que após terem Inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor 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, 16 de Junho de 2020.

Assinatura Eletrônica

17/06/2020 12:32:09.0

CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

01/07/2020 11:44:39.0

DANIEL BUSSOLARO

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

18/06/2020 19:05:59.0

ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

17/06/2020 14:19:25.0

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

Avallador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

02/07/2020 13:40:49.0

MARIANNA BOIA FERREIRA

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgbloce1@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 43494

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 43494

Dedico:

Aqueles que sempre seguem seus sonhos,
aos que chegam na meta e aos que ficam no caminho, mas nos ensinam a
nunca desistir....

Aquelas pessoinhas que não só nos impulsionam a continuar na frente cada
dia, também estão sempre ali e nos fazem crescer e ser melhores....

A tí mi AMADA VENEZUELA

AGRADECIMENTOS

A meu amado Brasil que nos acolheu e abriu as suas portas e corações para mim e a minha família. A minha amada Venezuela que no meio da crise me fez procurar outros caminhos... Porque: "Quando você pensa que achou o seu caminho a vida te joga em outra estrada".

Agradeço a Universidade Federal do Paraná, a OEA e a CAPES pelo apoio económico, aos meus Orientadores Professores Ciro de Oliveira Ribeiro e Edvaldo da Silva Trindade, pela aceitação como estudante de doutorado, pelos aprendizados, pela dedicação, o tempo, a paciência e até o carinho. A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, muito especialmente a Professora Andrea Senff Ribeiro quem foi a minha banca desde o início desse projeto com muita de dedicação. Aos Professores Sheila, Marianna, Anderson, Daniel e Kátia pela dedicação e os aportes, muito obrigado por aceitar ser a banca do meu trabalho admiro muito vocês quanto pessoas, pesquisadores e professores.

Aos Professores que sempre estiveram ali para me ajudar, Chico, Marco, Maritana, Claudia, Luisão, Fernanda, Magda, Célia, Lucélia, Lia, e todos do setor biológicas sempre dispostos para ajudar....

A gente não é mais três pessoas, somos uma só.... Estamos sempre junto, trabalhamos junto, a cada dia, a cada hora e cada segundo, com paciência, companheirismo, carinho, abraços, massagens, raivas, choros... Amo muito Oranys e Nicolás... Esse trabalho é nosso....

Aos meus pais que além de me dar a vida, estão ali sempre me apoiando e ensinando o mais importante da vida que são os valores, Maina e Henry sem vocês nunca ia conseguir esse meu sonho. Muito obrigada pelo amor sempre.... A minha família toda que esteve sempre me apoiando desde a distância com muito carinho, especialmente essa torcida: Tia Sonia, Tata, Mama Ro, Tio Arturo, Tio Freddy, Tia Elo, Tia Marlene a minha família toda.... Hermana "toda ponte tem duas pontas, e a mamãe teve duas filhas", obrigada pelo apoio incondicional e pelo melhor presenta da vida: minha amada e divertida Sabri.

As duas pessoas que abriram as portas da sua casa para me acolher, eternamente grata meus queridos Meira e Abdala... Também Andrés e Yuli pela amizade incondicional...

Aos meus amigos brasileiros, vocês abriram os seus corações para mim desde que eu cheguei aqui no Brasil, vocês não imaginam quanto amo e agradeço... Morgana, Michely, Sandy, Suelem, Valcineide, Magali, Nayana, Nilse, Maristela, Andressa, Marcelle, Gislaine, Juliana, Louise, Erick, Jessica, Yuri, Roberta, André, Julia, Tobias, Luiza, Natália, Carol, Zelinda, Débora, Samara (e companhia) todos vocês.....

Aqueles amigos além do carinho me ajudaram muito nesse projeto Mariliza, Melissa, Benisio, Silvia, Leticia, Daniel, Jenifer, Alex, Amanda, Giovanna muito obrigada.

Tem amigos, e esses amigos/irmãos que foram amigos, injetaram células, fizeram colheitas, ajudaram nas análises, vieram trabalhar final de semana, choraram junto, trouxeram comidas, aprenderam de metástases, fizeram fotos, fizeram gavagens, coraram lâminas.... Esse trabalho não existiria sem vocês Stellee, Amandia, Tug, Joelma (a minha irmã moçambicana), Aliciane, Elton, Amanda, Micheli, Daniel, Alex, Vanesa.

Um agradecimento muito especial para o Sr. Nino e a Eliane sempre dispostos para me ajudar, a Celene e Israel, pela ajuda gigante nas fotos e ao Olair do Hospital Veterinário pelas análises de sangue.

A essa torcida internacional: Leonor, Ana Maria, Carmen, Gladinex, Francia, Karem, Criseila, Leglys, Maritza, Ruth, Lily, Ori, Marvi, Ana, Gabi, Raquel, Katy, Meli, etc. Aos amigos do mundo que me acompanharam nesse caminho Zina, Aura, Elvis, Manuel, Denisse, Walter, Susel, Mario, Susana, Eileen, Maciel, Luis Zeballos, Luis Buchir, Anita, Pancho, Ricardo, Alfredo, Yohans, Ney, Ayla.... Muito especialmente aos amigos Sebastián Yatra, Danny Ocean e Juan Luis Guerra que me ajudaram a sobreviver e fizeram as tarefas mais divertidas...

RESUMO

Os PBDEs são compostos polibromados utilizados como retardantes de chama na fabricação de produtos, no entanto, são citotóxicos, persistentes e bioacumuláveis. O éter difenil polibromado (BDE-209) é o tipo de PBDE mais prevalente na atmosfera presente em plasma, cordão umbilical e leite materno humano. No presente estudo foram investigados os efeitos *in vivo* da exposição ao BDE-209 através de modelos de colonização tumoral em camundongos e o papel do poluente no tratamento quimioterápico. Camundongos *Black* da linhagem C57BL/6 machos e fêmeas foram pré-tratados com diferentes concentrações do BDE-209 (0,08; 0,8 e 8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) via gavagem a cada 5 dias até completar 9 doses (45 dias). Sequencialmente os animais foram submetidos à inoculação de células tumorais e tratados com mais 4 doses, até o dia 21. Os órgãos pulmão, fígado, rim, cérebro e ovários foram coletados e realizadas análises morfológicas e bioquímicas destes. Nos animais tratados com o BDE-209, ao comparados com os controles mostraram alterações hepáticas, metástases em cérebro, fígado, rins e gônadas. Para um segundo experimento foi escolhida a dose de 0,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de BDE-209, com o objetivo de investigar se há interferência do poluente no tratamento quimioterápico com Dacarbazina. Seguindo o mesmo desenho experimental os camundongos foram expostos ao BDE-209, mas posteriormente foram tratados com Dacarbazina (40 mg.kg^{-1}) com 6 aplicações ao longo dos 21 dias seguintes a inoculação das células tumorais. Os mesmos órgãos foram coletados e avaliada a condição de saúde dos animais, bem como a colonização das células tumorais nos pulmões, como um dado para avaliar a eficácia do tratamento quimioterápico. Os resultados anatômicos e histológicos comparados aos controles mostraram, novamente, um aumento da colonização das células tumorais nos animais expostos ao BDE-209. Quando avaliado o grupo tratado com a Dacarbazina, como esperado, houve diminuição da colonização pulmonar. No entanto, houve uma diminuição na eficácia do tratamento com o quimioterápico, quando os animais foram expostos previamente ao poluente. Com base nos dados obtidos verificou-se que a exposição ao BDE-209 leva a uma maior disseminação de metástases pelos órgãos do animal, ao mesmo tempo que diminui a eficácia do tratamento quimioterápico, interferindo negativamente com o prognóstico da doença.

Palavras-chave: BDE-209, melanoma, células B16-F10, C57BL/6, Dacarbazina.

ABSTRACT

PBDEs are polybrominated compounds used as flame retardants in the manufacture of products, however, they are cytotoxic, persistent and bioaccumulative. Polybrominated diphenyl ether (BDE-209) is the most prevalent type of PBDE in the atmosphere present in plasma, umbilical cord and human breast milk. In the present study, the *in vivo* effects of exposure to BDE-209 were investigated through tumor colonization models in mice and the role of the pollutant in chemotherapy treatment. Black mice of the C57BL/6 male and female strain were pre-treated with different concentrations of BDE-209 (0.08; 0.8 and 8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) via gavage every 5 days until 9 doses were completed (45 days). Sequentially the animals were subjected to the inoculation of tumor cells and treated with 4 more doses, until the 21st day. The tumor target organs were collected (lung, liver, kidneys, brain and gonads) and morphological and biochemical analyzes were performed. In animals treated with BDE-209, they showed liver changes, metastases in the brain, liver, kidneys and gonads. For a second experiment, the dose of 0.8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ of BDE-209 was chosen, with the objective of investigating whether there is interference of the pollutant in the chemotherapy treatment with Dacarbazine. Following the same experimental design, the mice were exposed to BDE-209, but were subsequently treated with Dacarbazine (40 mg.kg^{-1}) with 6 applications over the 21 days following tumor cell inoculation. The same organs were collected and the health condition of the animals was evaluated, as well as the colonization of tumor cells in the lungs, as a data to evaluate the effectiveness of chemotherapy treatment. The results visuals and histological again showed an increase in colonization of tumor cells in animals exposed to BDE-209. When the group treated with Dacarbazine was evaluated, as expected, there was a decrease in pulmonary colonization. However, there was a decrease in the effectiveness of treatment with chemotherapy, when the animals were previously exposed to the pollutant. Based on the data obtained, it was found that exposure to BDE-209 leads to a greater spread of metastases by the animal's organs, while decreasing the effectiveness of chemotherapy, negatively interfering with the disease's prognosis.

Keywords: BDE-209, melanoma, B16-F10 cells, C57BL/6, Dacarbazine.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DE ÉTER DIFENIL POLIBROMADO (PBDES) E ÉTER DECABROMODIFENIL (BDE-209).	20
FIGURA 2 – ESQUEMA GERAL DA DINÂMICA DAS METÁSTASES.	24
FIGURA 3– ESQUEMA ILUSTRATIVO DA PROGRESSÃO DO MELANOMA.	26
FIGURA 4 – DESENHO EXPERIMENTAL DA FASE I.	31
FIGURA 5 – DESENHO EXPERIMENTAL DA FASE II.	32
FIGURA 6. BIOMETRIC ANALYSIS OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209. ...	44
FIGURA 7 – BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN THE LUNGS OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209 AND INOCULATED WITH B16F10 CELLS.	46
FIGURA 8 – BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN THE LIVER OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209 AND INOCULATED WITH B16F10 CELLS.	46
FIGURA 9. INTEGRATED DATA FROM BIOCHEMICAL ANALYSES IN THE LUNG, LIVER AND KIDNEY, AND HISTOLOGICAL LOCALIZATION OF METASTASES IN C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209 AND INOCULATED WITH B16F10 CELLS.	47
FIGURA 10. LUNG CROSS SECTION OF C57BL/6 MICE PREVIOUSLY EXPOSED TO BDE-209 AND INOCULATED WITH B16-F10 CELLS.	49
FIGURA 11. OCCURRENCE OF METASTASES IN DIFFERENT ORGANS OF C57BL/6 MICE AFTER EXPOSURE TO BDE-209 AND INOCULATED WITH B16F10 CELLS.	51
FIGURA 12. INDEX OF DISSIMILARITY BETWEEN THE CONTROL AND BDE-209 EXPOSED GROUPS.	52
FIGURA 13. ILLUSTRATION OF THE CONCLUSIONS OF THE ARTICLE, SHOWING THE EFFECTS ON BLOOD, LIVER, LUNG AND OTHER TISSUES.	56
FIGURA 14. BIOMETRIC ANALYSIS OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.	71
FIGURA 15. BLOOD ANALYSES OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.	72
FIGURA 16. BIOCHEMICAL PROFILE OF THE BLOOD OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.	73

FIGURA 17. BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN THE LUNG C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.....	74
FIGURA 18. BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN THE LIVER OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.....	75
FIGURA 19. BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN THE KIDNEY OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.....	76
FIGURA 20. INTEGRATED DATA (RIB) OF BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN THE LUNG, LIVER AND KIDNEY OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.....	77
FIGURA 21. METASTASIS NODULES (BLACK SPOTS) OBSERVED IN THE LUNG OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.....	78
FIGURA 22. LUNG CROSS SECTIONS OF MICE C57BL/6 INOCULATED WITH B16F10 CELLS WITOUTH TREATMENT (A) AND TREATED WITH VEHICLE (B) AND DACARBAZINE (C AND D).	79
FIGURA 23. LUNG CROSS SECTIONS OF MICE C57BL/6 CHRONICALLY EXPOSED TO BDE-209 AND INOCULATED WITH B16F10 CELLS.	80
FIGURA 24. LUNG CROSS SECTIONS FROM MICE C57BL/6 CHRONICALLY EXPOSED TO BDE-209, INOCULATED WITH B16F10 CELLS AND POSTERIORLY TREATED WITH DACARBAZINE.....	81
FIGURA 25. ILLUSTRATION OF THE CONCLUSIONS OF THE ARTICLE, SHOWING THE EFFECTS ON BLOOD, LIVER, LUNG AND OTHER TISSUES.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

μL - Microlitro

μm - Micrômetro

μM - Micromolar

M - Molar

ABC – Transportadores de energia proveniente da hidrólise de ATP

AChE - Acetilcolinesterase

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APC - Proteína que nos seres humanos é codificada pelo gene APC

ATSDR - *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

BCRP – Proteínas de resistência a câncer de seio

BDE – Éteres difenil polibromados

BDE-209 – Decabromodifenil éter

cAMP - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CAT - Catalase

CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CD44 – Glicoproteína de membrana celular da interação

CEUA - Comitê de Ética do Uso de Animais

CSCs – Células tronco cancerígenas

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DTNB - 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético

EGFR – Receptor do fator de crescimento epidérmico

EROs - Espécies reativas de oxigênio

Fe - Ferro

FeSO₄.NH₄ - Sulfato ferroso amoniacal

g - Grama

GPx - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione reductase

GSH - Glutathione reduzida

GSSG - Glutathione oxidada

GST - Glutathione S-transferase

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ - Ácido sulfúrico
HCl - Ácido clorídrico
KRAS – Proteína que nos seres humanos é codificada pelo gene *KRAS*
kg - Quilograma
L - Litro
LPO - Peroxidação lipídica
MDR1 – Gene que codifica a Proteína P
MEC – Matriz extracelular
mg - Miligrama
mL - Mililitro
Mn-SOD - Manganês superóxido dismutase
MRP1 - Proteína 1 associada à resistência a múltiplas drogas
NaCl - Cloreto de sódio
NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NBT - Azul de nitrotetrazolio
NCI – National câncer institute
ng - Nanograma
nmol - Nanomolar
PBDEs – Éteres difenilos polibromados
POPs – Poluentes orgânicos persistentes
O₂•- - Radical superóxido
OH• - Radical hidroxila
ONOO-- - Peroxinitrito
P450ssc - Cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage
PCO - Carbonilação proteica
PIK3CA - Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase, PI 3-quinase.
PMSF - Phenylmethanesulfonyl fluoride
PTEN – Proteína que, em humanos, é codificada pelo gene *PTEN*
RIB - Resposta Integrada dos Biomarcadores
ROS - Espécies reativas de oxigênio
SOD - Superóxido dismutase
TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteinases
TNP - Tióis não proteicos

TP53 – Proteína de tumor

UFPR - Universidade Federal do Paraná

WHO - *World Health Organization*

TNF α - Fator de necrose tumoral α

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

© - marca registrada

Σ - somatório de números

°C - graus Celsius

π - pi

\pm - mais ou menos

α - alfa

β - beta

SUMÁRIO

RESUMO	8
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVAS	18
2 OBJETIVOS	19
Objetivo geral	19
Objetivos específicos	19
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 ANTECEDENTES	19
3.2 CÂNCER	22
3.3 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL	29
4.2 CÉLULAS E CAMUNDONGOS.....	33
4.3 MODELO DE METÁSTASE CELULAR EXPERIMENTAL	33
4.4 ANÁLISES DO SANGUE	34
4.5 ANÁLISES DA PROGRESSÃO DAS METÁSTASES	34
4.6 HISTOLOGIA	34
4.7 ANÁLISES DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	35
Concentração de tióis não proteicos (GSH)	35
Catalase	36
Peroxidação de lipídios (LPO).....	36
Glutathione S-transferase (GST).....	36
Superóxido Dismutase (SOD)	37
Resposta integrada dos biomarcadores (RIB).....	37
4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	37
5 RESULTADOS	39
CAPITULO I: EXPOSIÇÃO ORAL DE BDE-209 MODULA A DISSEMINAÇÃO DE METÁSTASES (B16-F10) EM CAMUNDONGOS C57BL/6	39
Introduction.....	39
Material and Methods	40
Experimental Design	40
Blood Analysis.....	41

Biochemical Biomarkers.....	41
Integrated response of biochemical biomarkers (IBR).....	42
Histological procedures	42
Cluster analyses to dissimilarity tests.....	43
Statistical Analyses	43
Results 43	
Mice health conditions.....	43
Oxidative stress.....	45
Morphological findings.....	48
Dissimilarity tests.....	52
Discussion	53
References	57
CAPITULO II: EXPOSIÇÃO ORAL DE BDE-209 AFETA O TRATAMENTO DE	
DACARBAZINA EM CAMUNDONGOS C57BL/6 APÓS INOCULAÇÃO DE	
CÉLULAS B16F10	
	66
Introduction.....	66
Material and Methods.....	67
Experimental Design	67
Procedures to blood Analysis	68
Procedures for biochemical biomarkers	68
Integrated response of biochemical biomarkers (RIB).....	70
Histological procedures	70
Statistical procedures	70
Results	71
Animal health conditions	71
Biochemical parameters.....	73
Metastasis nodules.....	77
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
7 CONCLUSÕES	100
8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	101
9 REFERÊNCIAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

Os éteres difenis polibromados (PBDE), assim como os bifenis polibromados (PBB), são moléculas com alta massa molecular, hidrofóbicas, tóxicas, bioacumuláveis e resistentes à degradação natural. Estes compostos são provenientes de fontes antrópicas e naturais sendo atualmente descritos como “*poluentes emergentes*”. No entanto, os aspectos referentes a sua toxicidade, risco de exposição e persistência no ambiente ainda não estão totalmente esclarecidos (Rocha-Gutiérrez et al., 2015).

Os PBDEs são compostos retardantes de chama bromados amplamente utilizados na fabricação de vários produtos industrializados (Dornbos et al., 2015). Devido ao desgaste destes materiais e a aplicação excessiva dessas moléculas, grandes quantidades de PBDEs tem sido liberados no ambiente (EPA, 2008). Como são moléculas que não encontram-se ligadas quimicamente aos materiais, podem migrar para o ambiente durante a produção, aplicação, disposição e processos de reciclagem desses materiais (Qu et al., 2017). No Brasil esses produtos têm sido quantificados em solo, poeira, lixiviado e água de poço próximo a um aterro sanitário. No entanto, são mais encontrados na poeira e no solo (Cristale et al., 2019).

A exposição a estas substâncias ocorre através da inalação, ingestão de alimentos e contato com a pele, podendo ocorrer em várias fases do ciclo de vida (Espina et al., 2015). Além disso, os PBDE's possuem a capacidade de se acumular em tecidos, sendo biomagnificados através da cadeia alimentar e de apresentar efeitos adversos à saúde humana (Ji et al., 2017), aumentando o risco de exposição bem como a necessidade de identificar e conhecer esses riscos.

A família dos PBDE's possui 209 congêneres de éteres difenis polibromados (BDE), os quais se classificam pelo número e posição dos átomos de bromo na estrutura química do anel (Pereira et al., 2017). O éter decabromodifenil (BDE-209) é o PBDE mais comum. Após a exposição, o BDE-209 já foi detectado no sangue, sêmen, tecido adiposo, leite materno, sangue do cordão umbilical e tecidos placentários em seres humanos (Besis et al., 2014a; Giordano et al., 2008; Li et al., 2012). Estudos realizados com alimentos na África mostraram altas taxas de BDE-99, 100, 153 e 47 em ovos, peixes, carnes, leite, nozes, óleos dentre outros tipos de alimento, mas foi constatada a presença do BDE-209 em todas as amostras envolvidas no estudo. Nesse caso a soma média dos PBDEs foi determinada na

faixa de 0,91 a 57 pg.g⁻¹ (Vaccher et al., 2020). No Brasil, muitos PBDE estão sendo usados atualmente durante a fabricação de vários produtos. Infelizmente, os PBDEs são facilmente liberados dos produtos originais, atingindo rapidamente o meio ambiente. O conhecimento sobre o poder toxicológico dessas substâncias ainda é limitado, o que impediu as autoridades reguladoras e ambientais de realizar avaliações de risco adequadas (Pereira et. al., 2016).

Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* sugerem que o desbalanço oxidativo em favor de espécies antioxidantes promovendo estresse oxidativo é um mecanismo comum encontrado pela exposição aos PBDEs (Giordano et al., 2008), onde o tratamento com antioxidantes podem atenuar o efeito tóxico dos PBDEs minimizando a geração do estresse oxidativo (Cai et al., 2011; Ji et al., 2017). Em referência á farmacocinética concentrações teciduais (% dose/g) foram normalizadas para a porcentagem de dose restante no corpo no dia 5, o impacto da excreção diferencial nas concentrações teciduais foi praticamente eliminado: pouca ou nenhuma diferença na concentração de gordura, pele, músculo, pulmão, ou rim foram observados entre os diferentes congêneres (Weijs et. al., 2012). A exposição ao BDE-209 está também relacionada com o aumento na incidência de granulomas hepáticos, hiperplasia das células foliculares da tireoide, ou adenomas e carcinomas de células foliculares da glândula tireoide (Aschebrook-Kilfoy et al., 2015). Segundo Ele et al. (2018), em estudo desenvolvido com populações humanas, foi observado uma correlação positiva entre a exposição ao BDE-209 e o desenvolvimento de câncer de mama. No entanto, apesar de algumas evidências da exposição a esse poluente e o desenvolvimento de câncer terem sido descritas, nada tem sido investigado se a exposição ao BDE-209 pode favorecer a progressão do tumor interferindo com o prognóstico do câncer.

Segundo Fidler et al. (2018), o aumento dos casos de câncer deve-se a uma consequência de alterações genéticas, do crescimento populacional, do envelhecimento e do desenvolvimento econômico que têm alterado o estilo de vida humano. Sendo assim, o presente estudo buscou investigar se a pré exposição crônica ao polibromado BDE-209 apresenta algum efeito no desenvolvimento e proliferação de metástases *in vivo* utilizando modelo de progressão tumoral, bem como se interfere com o tratamento quimioterápico.

1.1 JUSTIFICATIVAS

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo. Somente em 2018 ocorreram 9,6 milhões de mortes decorrentes de câncer, e acredita-se que das mortes que ocorrem no planeta por motivo de doença, uma em cada seis seja devido a esta doença (OMS, 2020). Os éteres difenispolibromados (PBDEs) são compostos utilizados como retardantes de chama, amplamente utilizados na fabricação de produtos industrializados, onde o éter decabromodifenil (BDE-209) é mais encontrado nos ambientes naturais e urbanos. No entanto, embora alguns estudos tenham sido realizados quanto ao potencial carcinogênico desses compostos, nada ainda foi investigado quanto à possibilidade desses atuarem em favor do desenvolvimento do câncer, alterando o prognóstico do mesmo.

Nos últimos anos o nosso grupo de pesquisa em Toxicologia Celular (UFPR), tem realizado diversos ensaios *in vitro*, utilizando células de melanoma murino, das linhagens B16-F1 e B16-F10, extraídas do camundongo *Mus musculus* (linhagem C57BL/6). Nesses estudos as células de melanoma (B16-F1 e B16-F10) foram expostas a diferentes concentrações do BDE-209, e foi observado que além de diminuir as taxas de morte celular via apoptose evidenciado em estudos de viabilidade, apresentaram características de maior agressividade em ensaios de proliferação e migração celular (*scratch*). Além disso, a pré exposição ao contaminante promoveu um efeito protetor a uma posterior exposição ao quimioterápico Dacarbazina em células B16-F1, sugerindo um aumento na resistência celular em relação ao quimioterápico utilizado (Marchi, 2019; Steil, 2016). Face ao exposto, o presente trabalho busca investigar se a exposição contínua ao poluente BDE-209 tem algum tipo de efeito sobre o desenvolvimento e a progressão do câncer. O objetivo é, portanto, avaliar se a exposição prévia e contínua ao BDE-209 interfere com a colonização de células tumorais, bem como sobre a sensibilidade ao tratamento quimioterápico, partindo de concentrações realísticas do poluente encontrado em tecidos humanos. Foi selecionado o modelo de colonização pulmonar de células de melanoma murino B16-F10, que quando injetadas na veia caudal de camundongos C57BL/6, colonizam o pulmão formando nódulos de melanoma visíveis e quantificáveis ((Francia et al., 2011).

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar se a exposição prévia e contínua de BDE-209 em camundongos da linhagem C57BL/6 afeta a proliferação e a colonização de células de melanoma levando ao desenvolvimento de metástases pulmonares, bem como, se interfere no tratamento com o quimioterápico Dacarbazina.

Objetivos específicos

Investigar os efeitos da exposição ao poluente BDE-209, a partir de doses realísticas, sobre o desenvolvimento de metástases pulmonares;

Avaliar, através de parâmetros hematológicos e somáticos, a condição de saúde dos animais expostos ao contaminante e ao tratamento quimioterápico;

Avaliar os efeitos da exposição ao BDE-209 através de biomarcadores bioquímicos em tecidos alvos;

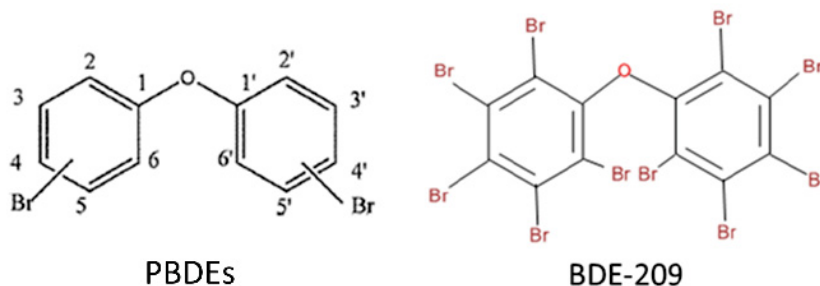
Avaliar se ocorrem mudanças no efeito do tratamento quimioterápico com a Dacarbazina associada ao poluente, sobre a proliferação das células de melanoma e o desenvolvimento das metástases em camundongos inoculados com células do melanoma murino B16-F10.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ANTECEDENTES

O decabromodifenil éter (BDE-209/C₁₂Br₁₀₀) de massa molecular de 959 g.mol⁻¹ é o PBDE mais comum encontrado no ambiente natural (Figura 1), representando mais de 90% do total da ingestão diária de PBDEs (Ji et al., 2017). Na Austrália o BDE-209 foi encontrado em uma grande diversidade de aparelhos eletroeletrônicos de uso doméstico como baterias, fritadeiras, “plugs” de aparelhos elétricos, microondas, secador de cabelo, fogões elétricos, torradeiras, aspiradores, alisadores de cabelo, meios audiovisuais, lava-louças, máquinas de lavar ou mesmo em produtos têxteis (algodões, poliéster, acrílicos, nylon) (English et al., 2016).

FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DE ÉTER DIFENIL POLIBROMADO (PBDES) E ÉTER DECABROMODIFENIL (BDE-209).



FONTE: Ji et al., (2017).

LEGENDA: ESTRUTURA MOLECULAR DOS PBDES E DO BDE-209, MOSTRANDO A MOLÉCULA TOTALMENTE BROMADA.

Sjödin et al. (2001) relataram a presença de BDE-209 em amostras de soro coletadas em doadores de sangue ($<1-35 \text{ pmol.g}^{-1}$), e posteriormente Schechter et al., (2003) reportaram concentrações do mesmo composto no leite materno ($0,0042-0,077 \text{ pmol.g}^{-1}$). O BDE-209 não só pode expor o feto atravessando a barreira placentária, mas também entra em contato com recém-nascidos diretamente através do leite materno durante a amamentação (Xu et al., 2015). Portanto, esse composto atinge fases do ciclo de vida do homem, e pode potencialmente ser a causa de uma grande diversidade de efeitos a curto e longo prazo afetando tanto o desenvolvimento, quanto o crescimento (Cai et al., 2011).

Morck et. al., (2003) administraram BDE-209 radiomarcado em ratos Sprague Dawley machos (via oral, dose única) e reportaram uma média de 90% e 91% de excreção nas fezes nos dias 3 e 7, respectivamente. Em ratos canulados com via biliar submetidos ao mesmo tratamento oral, uma média de 88% da dose foi excretada nas fezes e 9,5% na bile após 3 dias. Neste caso os tecidos-alvo mais importantes foram as glândulas adrenais, fígado, rim e coração, com uma bioacumulação de aproximadamente 9% da dose após 3 e 7 dias. Por outro lado, através de exposição intravenosa de BDE-209 em ratos, avaliados por El Dareer et al. (1987), foi observado que a maior parte da dose foi excretada como metabólitos nas fezes (74%).

Posteriormente, estudos revelaram a incidência de granulomas hepáticos, hiperplasia de células foliculares tireoidianas e carcinomas ratos expostos ao BDE-209 (EPA, 2008). Rice et al., (2007) avaliaram a atividade locomotora em grupos de camundongos machos e fêmeas, expostos a BDE-209, onde os machos se

mostraram mais hiperativos em comparação com os controles enquanto as fêmeas mostraram-se menos ativas. Outro estudo avaliou os efeitos sobre o comportamento e foi observada uma diminuição na locomoção dependente das doses para indivíduos expostos por 20 dias (Costa and Giordano, 2011). Eguchi et al., (2016) também observaram efeitos neurológicos após exposição a concentrações de 2 mg.kg⁻¹ de BDE-209 em camundongos.

Estudos mais recentes mostraram efeitos morfológicos na aorta abdominal e cardíaca induzidas pelo BDE-209 (Jing et al., 2019). Efeitos adversos sobre a saúde humana prejudicando a função fisiológica do epitélio em doenças das vias aéreas, foi descrito por Montalbano e colaboradores, comprometendo doenças como asma e câncer (Montalbano et al., 2020). O epitélio das vias aéreas é a primeira linha de defesa contra os contaminantes presentes no ar, onde os polibromados promovem processos degenerativos e danos no DNA, induzindo o mecanismo de apoptose em células epiteliais brônquicas, levando a doenças inflamatórias das vias aéreas. Nesse cenário, é possível imaginar que a inalação de polibromados como o BDE-209, é uma importante via de exposição ao poluente.

Outros estudos mostraram que os polibromados podem ser imunotóxicos. Os resultados revelaram que esses compostos aumentam a inflamação e induzem o estresse oxidativo levando a situações de morte por apoptose ou necrose em células leucocitárias (Gascon et al., 2013). Sabe-se que a exposição ao éter difenil polibromado gera estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo* e consequente dano celular por meio do desequilíbrio no mecanismo antioxidante (Giordano et al., 2008; Tagliaferri et al., 2010; Vagula et al., 2011).

A imunidade inata contribui para a defesa do hospedeiro imediatamente após a infecção onde células "*natural killer*", monócitos, macrófagos e neutrófilos polimórficos são os responsáveis por esse tipo de imunidade. Há indicações de que PBDEs influenciam negativamente a imunidade inata diminuindo o número de neutrófilos polimórficos e a formação de EROS (espécies reativas de oxigênio) em granulócitos neutrófilos (Leijts et al., 2009). Outros estudos mostraram que a exposição ao PBDE-209 induziu imunotoxicidade, não apenas inibindo a função imunológica, mas também altera a estrutura dos órgãos imunológicos com reflexo na proliferação de linfócitos e produção de anticorpos (Liu et al., 2012).

Entre os efeitos que levam ao dano tecidual causado pelo estresse oxidativo está a inflamação crônica, onde um aumento nos níveis de espécies reativas induz e

mantém uma alta produção e secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1, IL-6, IL-8 e CXCR4. Portanto, o estresse oxidativo induzido pela exposição ao BDE-209 e um consequente estado pró-inflamatório podem reduzir a barreira física representada pelo endotélio, facilitando a disseminação de células metastáticas para diferentes tecidos (Reuter et al., 2010).

De acordo com Neupane et al., (2018), a exposição aos polibromados pode alterar a distribuição da F-actina. A actina desempenha um papel vital na morfologia da membrana plasmática bem como no crescimento, diferenciação, locomoção e transporte celular. Células PC12 (medula suprarrenal), expostas a diferentes concentrações, mostraram diferenciação no crescimento de axônios, que foram afetados negativamente em concentrações de BDE-209 baixas.

3.2 CÂNCER

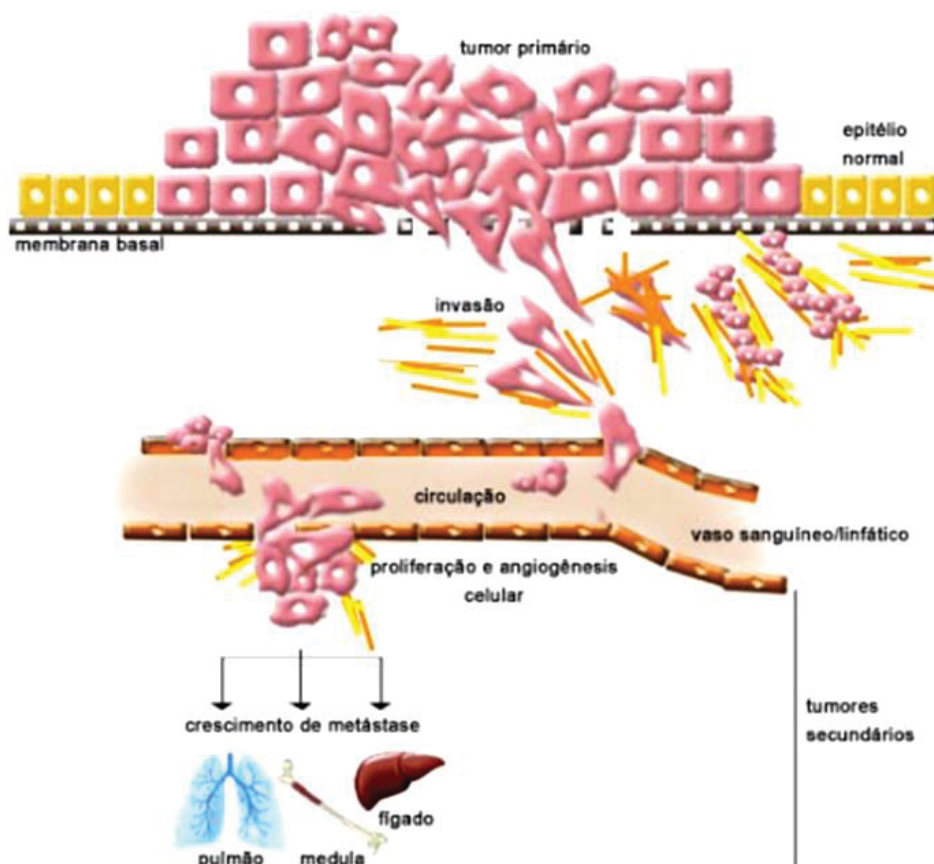
A carcinogênese é uma patologia que pode originar-se desde uma única célula, cuja linhagem acumula alterações epigenéticas (como metilação de DNA, modificação de histonas e remodelamento de cromatina) a alterações na molécula de DNA, não detectadas pelo sistema de reparo. Como consequência, ocorre uma ativação de oncogenes e/ou o silenciamento de supressores tumorais, induzindo a formação de um tumor. Uma vez formado o tumor, ocorre a angiogênese, que é a vascularização do tumor, cujo desenvolvimento é muitas vezes regulado pela hipóxia (Quail and Joyce, 2013). Essa patologia pode ser denominada benigna quando as células não invadem outros tecidos, e será considerado câncer somente se for maligno, onde as células adquirem a capacidade de invadir e colonizar tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, processo conhecido como metástase (Sudhakar, 2009). A metástase ocorre quando as células se separam da massa do tumor primário e se difundem mediante transporte, seja individualmente (homotipos) ou como êmbolos compostos de células tumorais e células hospedeiras (heterotipos) (Vaiopoulos et al., 2014).

As células tumorais circulantes que migram dos tumores primários visam um subconjunto bem definido de órgãos, específicos para cada tipo de tumor. As células endoteliais nos vasos de diferentes órgãos expressam diferentes receptores de superfície celular e quimiocinas específicas que são secretadas por células hospedeiras nos tecidos (Bersini et al., 2014). Estudos investigando metástases específicas de determinados órgãos mostraram fatores secretados pelo tumor que

podem aumentar a metástase, induzindo o extravasamento vascular e promovendo o recrutamento de células imunes pró-angiogênicas influenciando assim com o organotropismo dessas células (Cox et al., 2016). A comunicação bidirecional entre as células e o seu microambiente é crítica para a homeostase do tecido normal e para o crescimento do tumor. Em particular, as interações entre o tumor e as células do estroma associado são importantes e influenciam a evolução da doença como a iniciação, progressão e prognóstico do paciente (Quail and Joyce, 2013). A maioria das células tumorais estão sob estresse fisiológico, como hipóxia e privação nutricional, que regulam negativamente a tradução de RNAm em células normais, mas tornam-se desacoplados da regulação como parte do processo de transformação, estressando ainda mais a célula (Robichaud et al., 2019). Em muitos tipos de câncer foram reportadas mutações em genes que codificam proteínas-chave na sinalização celular ou afetam a tradução genética, incluindo PIK3CA, KRAS, PTEN, APC e EGFR, entre outros (Kandoth et al., 2013).

O processo metastático pode ser conceitualmente dividido em duas fases principais, a saber: (i) translocação física de células cancerígenas do tumor primário para locais distantes e (ii) sua colonização subsequente (Figura 2). Mais especificamente, várias etapas são sequenciais e inter-relacionadas e podem ser reconhecidas na fase anterior, incluindo perda de adesão celular, incrementando a invasividade e motilidade aumentadas devido a alterações genéticas e epigenéticas e indução da angiogênese tumoral levando à entrada no sistema circulatório ou linfático, um processo conhecido como intravasamento (Bersini et al., 2014). Após o intravasamento, as células que sobrevivem na circulação podem sofrer extravasamento, o que inclui várias etapas, como o aprisionamento de células em um vaso remoto ou aderência ao seu endotélio e transmigração para tecidos, para iniciar o desenvolvimento de um tumor secundário (Bersini et al., 2014).

FIGURA 2 – ESQUEMA GERAL DA DINÂMICA DAS METÁSTASES.



FONTE: Piacentini, A. B., Menezes, H. (2012).

LEGENDA: AS CÉLULAS CANCERÍGENAS CONSEGUEM SAIR DO TUMOR PRIMARIO (INTRAVASAMENTO) E CHEGAR NA CORRENTE SANGUÍNEA. AS CÉLULAS QUE SOBREVIVEM NA CORRENTE SANGUINEA PODEM COLONIZAR OUTROS TECIDOS (EXTRAVASAMENTO) GERANDO UM NOVO TUMOR OU CONJUNTO DE TUMORES SECUNDÁRIOS CONHECIDOS COMO METÁSTASE.

O papel do estresse oxidativo e da inflamação na progressão do câncer está amplamente relacionado aos passos iniciais da transformação maligna - promovendo danos nos tecidos e no DNA - e por uma modulação pró-tumoral das células associadas ao câncer no microambiente do tumor (Reuter et al. 2010). Na fase hematogênica das metástases, as interações envolvem contato mecânico e adesão transitória, mediada por selectinas endoteliais e seus ligantes nas células neoplásicas. Esse contato inicia com uma sequência de caminhos de ativação que envolve citocinas, fatores de crescimento, lipídeos bioativos e espécies reativas de oxigênio produzidas pela célula cancerosa ou endotélio. Essas moléculas provocam a expressão de integrinas, metaloproteinases da matriz e fatores quimiotáticos que

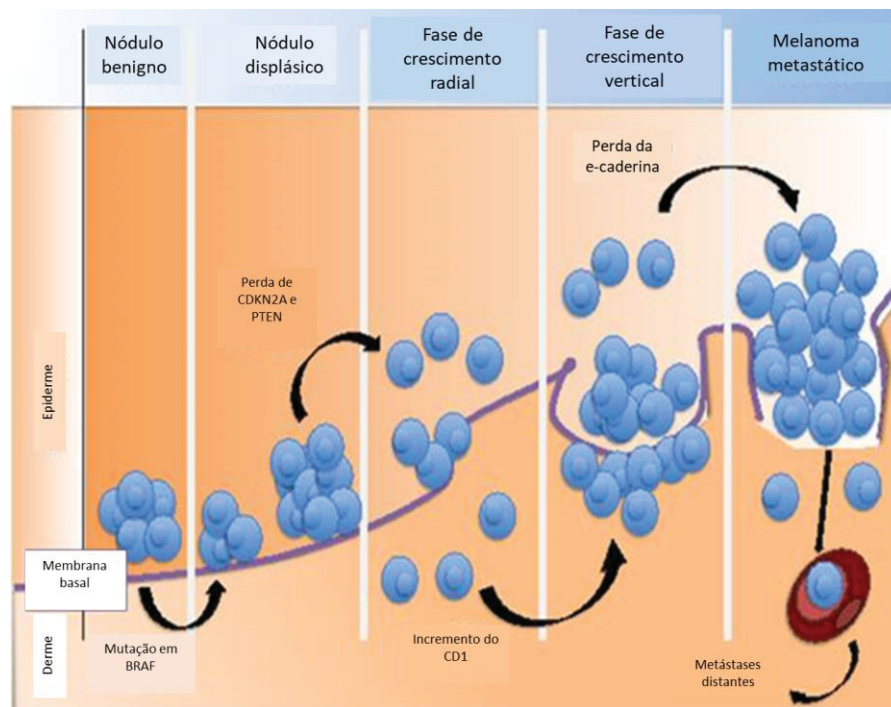
promovem a ligação de células tumorais aos vasos sanguíneos favorecendo a penetração vascular (Orr et al., 2000). O endotélio vascular desempenha um papel importante na passagem de macromoléculas e células inflamatórias do sangue para o tecido (Mittal et al., 2014). No processo inflamatório o estresse oxidativo leva à abertura de junções celulares endoteliais e facilita a migração de células inflamatórias através da barreira endotelial, as quais não apenas ajudam na depuração de patógenos e partículas estranhas, mas também levam a lesões nos tecidos desempenhando um papel central na formação de um nicho pré-metastático (Orr et al., 2000).

Para o ano 2018 foram estimados 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes por câncer em todo o mundo, e, em média, há um risco de cerca de 20% da população humana em desenvolver câncer antes dos 75 anos e 10% de morrer em decorrência da doença (Ferlay et al., 2019). No homem, o câncer de próstata é o tipo de câncer mais frequentemente diagnosticado, seguido pelo câncer de pulmão, câncer de pele não melanoma, de cavidade labial e oral e câncer de fígado; sendo o câncer de pulmão a causa mais frequente de morte por câncer. Nas mulheres, o câncer de mama foi o câncer mais frequentemente diagnosticado, exceto na África Oriental, onde predomina o câncer de colo de útero; porém ainda quando o câncer de mama também foi a causa mais frequente de morte, é seguido pelo câncer de pulmão (Ferlay et al., 2019). Porém, para o ano 2019, foi relatado que os 3 tipos de câncer mais prevalentes foram próstata, colo/reto e melanoma de pele entre os homens, enquanto em mulheres foram o câncer de mama, corpo uterino e intestino ou reto (Miller et al., 2019).

O melanoma da pele é bastante comum, estima-se que haverá 100.350 novos casos de melanoma da pele, equivalente ao 5,6% dos tipos de câncer, e cerca de 6.850 pessoas morrerão desta doença no ano 2020 no Brasil. Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil e corresponda a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país, o melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas do órgão. É o tipo mais grave, devido à sua alta possibilidade de provocar metástase (disseminação do câncer para outros órgãos); sendo mais comum em homens do que mulheres e entre indivíduos de pele clara e aqueles que foram expostos à luz solar natural ou artificial (como camas de bronzeamento) por longos períodos de tempo (NCI, 2020).

A progressão do tumor de melanoma com base no modelo de Clark et al., (1989) descreve uma progressão lenta, mas constante, dos nódulos melanocíticos benignos para o melanoma metastático. A progressão começa com uma proliferação controlada de melanócitos normais para produzir um nódulo benigno. A evolução continua com um crescimento anormal preexistente ou em um novo local, resultando em uma lesão pré-maligna com atípica na citologia, sendo referenciada a nódulos atípicos/displásicos. Com o tempo, os melanócitos adquirem a capacidade de proliferar horizontalmente na epiderme (crescimento radial) e mostram histologia atípica contínua (melanoma *in situ*) (Arrangoiz, 2016) (Figura 3).

FIGURA 3– ESQUEMA ILUSTRATIVO DA PROGRESSÃO DO MELANOMA.



Fonte: ARRANGOIZ (2016).

LEGENDA: PROGRESSÃO DO TUMOR DE MELANOMA COM BASE NO MODELO DE CLARK. A PROGRESSÃO COMEÇA COM UMA PROLIFERAÇÃO CONTROLADA DE MELANÓCITOS NORMAIS PARA PRODUZIR UM NÓDULO BENIGNO. A EVOLUÇÃO CONTINUA COM UM CRESCIMENTO ANORMAL DOS MELANÓCITOS, RESULTANDO EM LESÃO PRÉ-MALIGNA (NÓDULOS ATÍPICOS/DISPLÁSICOS). COM O TEMPO, OS MELANÓCITOS ADQUIREM O CAPACIDADE DE PROLIFERAR HORIZONTALMENTE NA EPIDERMIA. ALGUMAS CÉLULAS PODEM INVADIR A DERME PAPILAR E A MEMBRANA BASAL E PROLIFERAR VERTICALMENTE COMO NÓDULO EM EXPANSÃO COM POTENCIAL METASTÁTICO (CRESCIMENTO VERTICAL). OS MELANÓCITOS MALIGNOS SE ESPALHAM PARA OUTRAS ÁREAS DO CORPO,

A caderina-E ajuda a confinar as células intra-epidermicamente, mas algumas células podem invadir a derme papilar. Inúmeros eventos bioquímicos, incluindo a perda de E-caderina e a expressão de N-caderina, permitem que células malignas

invadam a membrana basal e proliferem verticalmente na derme como um nódulo em expansão com potencial metastático (crescimento vertical). Os melanócitos malignos se espalham para outras áreas do corpo, geralmente primeiro para os linfonodos e depois para a pele, tecidos moles subcutâneos, pulmões e cérebro (melanoma metastático) (Arrangoiz, 2016).

Recentemente foi proposta a teoria do microambiente tumoral ou nicho tumoral onde iniciam e promovem o desenvolvimento do câncer. As células cancerosas percebem sinais bioquímicos de componentes da matriz extracelular (MEC) e detectam características físicas, como rigidez da matriz e confinamento celular. A perda de mecanismos que controlam a produção, a degradação e a remodelação da MEC contribui para o crescimento do tumor ou a disseminação celular, afetando a contratilidade celular em resposta à rigidez da MEC e estimulando a dependência mecânica da ativação do fator de crescimento (Faurobot et al., 2015). Entretanto, tem sido proposto que para uma compreensão da patogênese de melanoma metastático é preciso estudar os passos posteriores da metástase, tais como, extravasamento, sobrevivência, persistência e proliferação em locais distantes. A disseminação das células malignas de um tumor primário é um evento bastante comum, mas a presença de células tumorais circulantes não prediz, necessariamente, se a metástase já ocorreu ou se ocorrerá (Damsky et al., 2014).

3.3 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Nos últimos anos, o tratamento do câncer tem sido focados a imunoterapia, estudando a ação dos principais reguladores do sistema imunológico que estimulam ou inibem suas ações e que os tumores podem usar para se proteger de ataques do sistema imunológico com ação monoclonais, conhecidos como checkpoints imunológicos, que pretendem restaurar a reposta dos anticorpos com uma função eficaz do sistema imunológico que pode combater diversos tipos de células tumorais (Sugie, 2018). Porém o tratamento quimioterápico, também chamada de "quimioterapia", é um dos procedimentos clínicos utilizados para tratar o câncer com o uso de drogas para eliminar células cancerígenas. Esse tratamento tem como alvo células que crescem e se dividem rapidamente, como é característico de células cancerígenas. Ao contrário da radiação ou cirurgia, que tem como alvo áreas específicas, a quimioterapia atua em todo o corpo. Sendo assim, pode afetar

algumas células saudáveis de crescimento rápido, como as da pele, cabelos, intestinos e medula óssea, ocasionando, dessa forma, alguns dos efeitos colaterais do tratamento (WebMD, 2020).

Nesses tratamentos o maior desafio tem sido a recorrência de tumores, resistência a medicamentos e metástases devido à presença de células-tronco cancerígenas (CSCs). Essas células resultam das mudanças epigenéticas que modificam a cromatina do genoma enquanto alguns genes responsáveis pela auto-renovação das células são superativados. Infelizmente, algumas quimioterapias podem criar um nicho favorável para a expansão e o enriquecimento das CSCs (Cristale et al., 2019). Além do efeito direto nas células tumorais, a quimioterapia também induz alterações pró-metastáticas mediadas pelo hospedeiro por meio da liberação sistêmica de citocinas e quimiocinas, imitando uma resposta semelhante a lesão, como normalmente detectada nos processos de cicatrização e inflamação (Shibue and Weinberg, 2017).

A eficácia do tratamento quimioterápico foca no controle da doença no local primário do tumor, e em vários casos não afeta a doença metastática, resultando na evidência de pacientes que desenvolvem metástases distantes, mas também pode ocultar efeitos prejudiciais mais amplos gerados pela quimioterapia (D'Alterio et al., 2019). Evidências sugerem que a quimioterapia induz mudanças intratumorais e sistêmicas que podem promover a sobrevivência/proliferação de células cancerígenas, promovendo assim a disseminação para órgãos distantes (Karagiannis et al., 2018). Além disso, pode ocorrer resistência extrínseca, frequentemente relacionada a estímulos do microambiente que ativam diretamente as vias de auto-renovação do CSC e/ou induzem a transição mesenquimal epitelial (EMT), fornecendo às células tumorais propriedades de disseminação aprimoradas, características do CSC e quimiorresistência (Garcia-Mayea et al., 2019; Shibue and Weinberg, 2017).

A transição epitelial para mesenquimal (EMT), um processo pelo qual as células epiteliais são estimuladas a se converter de epiteliais em células mesenquimais, pode promover metástase e resistência à terapia, alterando drasticamente o microambiente (Garcia-Mayea et al., 2019; Ma et al., 2019). As células que experimentam EMT são favorecidas pela aquisição de habilidades de migração e invasão. Um fator chave que modula o microambiente e a resistência ao medicamento é a hipóxia, que ativa vias de sinalização ativando a via

fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K/AKT), levando a cascata de ativação e à quimiorresistência. Esse processo é acompanhado pela ativação da expressão dos transportadores de drogas ABC, BCRP, MDR1 e MRP1 (Ma et al., 2019).

A Dacarbazina é um quimioterápico que foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* dos EUA (FDA) em 1975 para o tratamento do melanoma metastático como um agente único (Tawbi and Kirkwood, 2007). É um agente alquilante e um membro da família de derivados de imidazol carboxamida com semelhanças estruturais com algumas purinas, que causa a metilação das bases de DNA, sendo que essas lesões levam à morte celular, principalmente por apoptose (Christmann et al., 2011).

A Dacarbazina ((5-(3,3-Dimetil-1-triazenil)imidazol-4-carboxamida)) (DTIC), quimioterapia-padrão para o tratamento do melanoma avançado não cirúrgico e metastático até 2010, não modifica a sobrevida dos pacientes quando comparada aos cuidados paliativos (Eggermont e Kirkwood, 2004, Huncharek et al., 2001). Promove a inibição seletiva da mutação do gene B-raf proto-oncogene (BRAF), presente em aproximadamente 50% dos pacientes, possibilita o bloqueio da via de sinalização da proteína quinase ativada e, conseqüentemente, inibe o crescimento tumoral (Huncharek et al., 2001). No Brasil, continua a ser o medicamento mais utilizado para o tratamento de melanoma metastático (Corrêa, et. al., 2019). Embora o mecanismo exato de ação da Dacarbazina ainda não seja completamente conhecido, três hipóteses foram apresentadas até o momento: (a) inibição da síntese de DNA atuando como análogo da purina; (b) ação como agente alquilante e, (c) interação com grupos SH (Pourahmad et al., 2009). Um dos principais problemas do tratamento com a Dacarbazina está associado à sua citotoxicidade nas células normais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

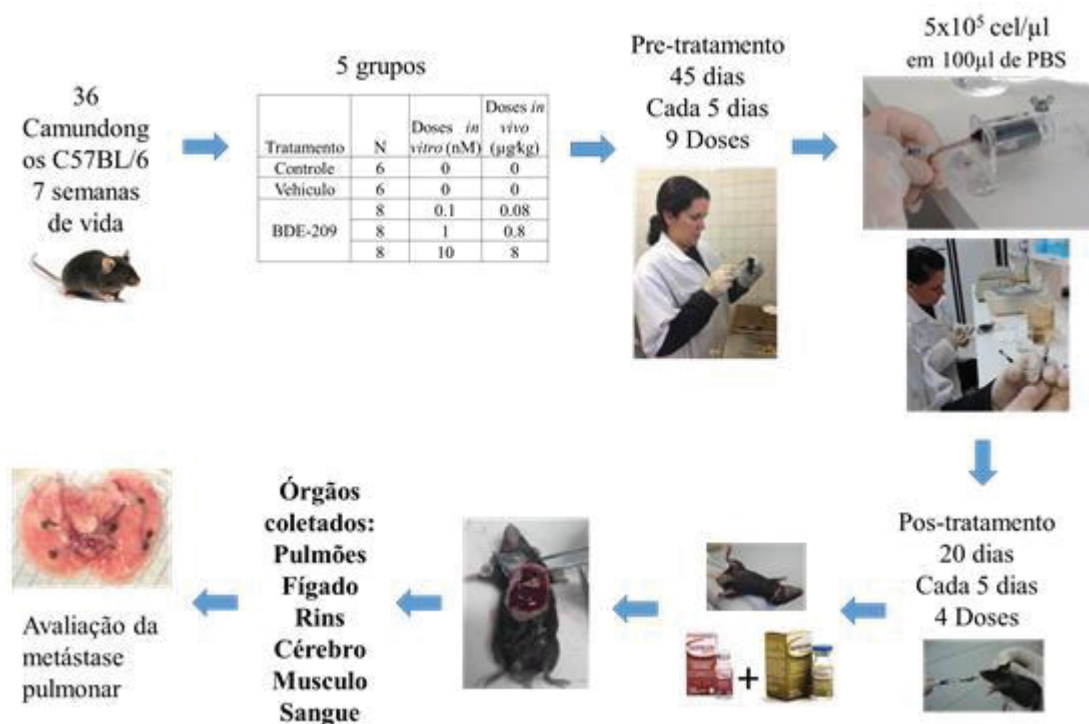
O projeto foi desenvolvido em duas fases. Na Fase I, foram testados efeitos da exposição a diferentes doses do BDE-209 sobre a proliferação da metástase pulmonar de células B16-F10. Na Fase II foi selecionada uma das concentrações estudadas na Fase I com a finalidade de avaliar a interferência do BDE-209 no tratamento quimioterápico com Dacarbazina, também com base na proliferação de

metástases a partir de células B16-F10 inoculadas nos animais após a pré exposição crônica ao BDE-209.

Fase I: Para este experimento foram utilizados um total de 36 camundongos (18 machos e 18 fêmeas) da linhagem C57BL/6, com 7 semanas de idade, divididos em três grupos de exposição a diferentes doses de BDE-209 (0,08; 0,8; 8,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), além de dois grupos controle (veículo e sem tratamento/não exposto) para avaliação da colonização e o desenvolvimento das metástases pulmonares. Essas doses foram selecionadas de acordo com dados de estudos previamente realizados no Laboratório de Toxicologia Celular/UFPR com ensaios *in vitro* e células da linhagem de melanoma murino B16-F1 (Steil, 2016), correspondentes a (0,1; 1 e 10nM) bem como em valores encontrados no plasma e sangue de pessoas expostas ao poluente entre 0,05 e 35 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de peso (Sjodin et al. 2001; Schechter et. al. 2003). Os animais foram separados em grupos de 8 indivíduos (4 machos e 4 fêmeas) para os tratamentos e 6 (3 machos e 3 fêmeas) animais para os grupos controles. Os grupos experimentais foram expostos às concentrações teste de BDE-209 durante 45 dias por meio de gavagens a cada 5 dias (baseados no tempo de excreção). Entretanto, os animais utilizados como controle do experimento, não foram expostos ao contaminante, nem o veículo; outro grupo de animais receberam o veículo (óleo de milho) para o controle dos tratamentos. Após esse tempo foram injetadas células de melanoma da linhagem B16-F10 (5×10^5 cel em 100 μL de PBS) via veia caudal e continuado os tratamentos por mais 21 dias.

Após o período de exposição, os animais foram anestesiados pela injeção intraperitoneal de ketamina/xilazina (100 e 20 mg.kg^{-1} respectivamente) e eutanasiados por deslocamento cervical. Após o óbito, foi coletado o sangue para análises hematológicas para avaliação da saúde dos animais, além dos pulmões, fígado, rim, cérebro e gônadas para as análises de quantificação das metástases tumorais. Esses órgãos foram também coletados para avaliações histológicas e bioquímicas (estresse oxidativo), enquanto o músculo esquelético foi amostrado para análise de neurotoxicidade (atividade de acetilcolinesterase). A comparação estatística entre esses dois tipos de grupo controle será avaliada, se forem iguais será utilizado os dados do grupo veículo como controle para análise dos dados. O desenho experimental da Fase I é demonstrado na Figura 4.

FIGURA 4 – DESENHO EXPERIMENTAL DA FASE I.



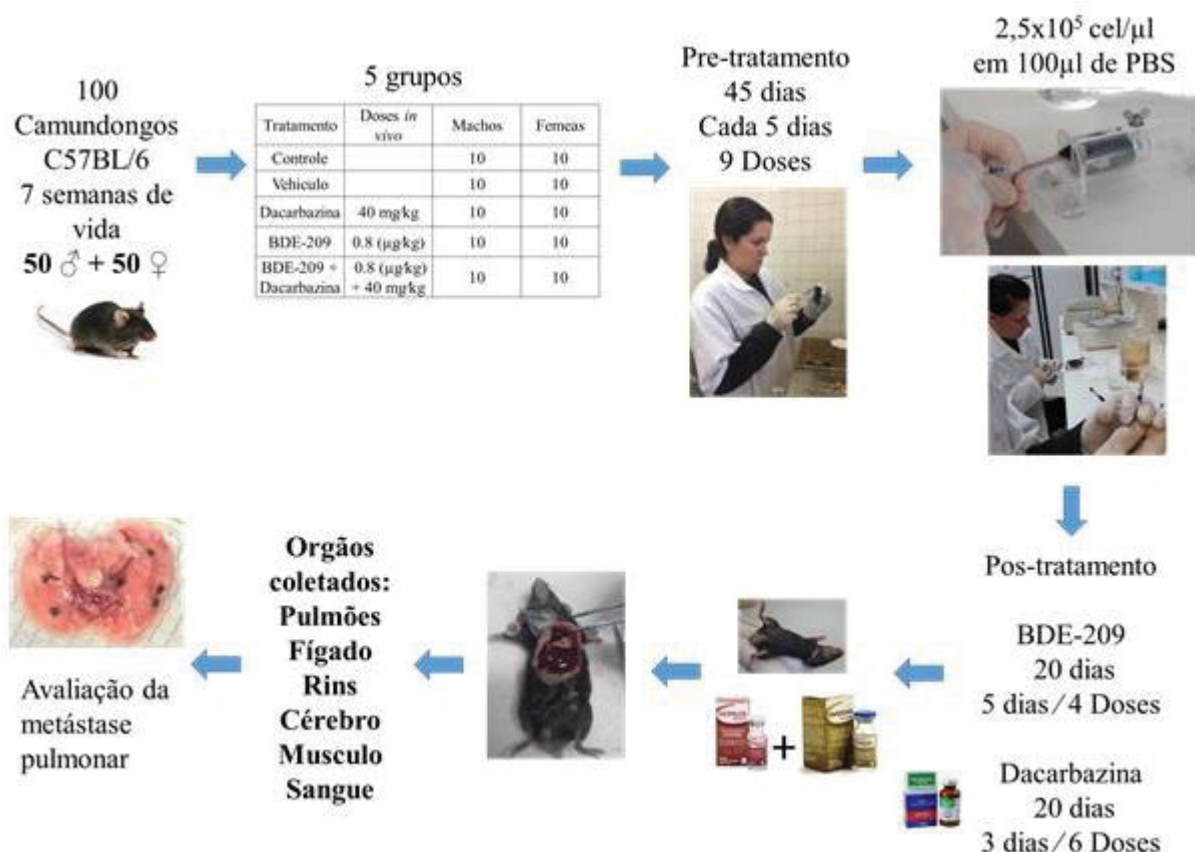
FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO DESENHO DOS EXPERIMENTOS DA FASE I *IN VIVO*.

Fase II: O objetivo dessa fase foi avaliar os possíveis efeitos do BDE-209 sobre o tratamento com o agente quimioterápico Dacarbazina na colonização e desenvolvimento das metástases. Para isso foi selecionada a dose de 0,8 µg.kg⁻¹ de BDE-209, a partir dos resultados obtidos com os experimentos provenientes da Fase I (maior efeito). No novo desenho experimental, um grupo de 50 camundongos machos e 50 camundongos fêmeas da linhagem C57Bl/6 com 7 semanas de idade foi utilizado. Os animais foram separados em grupos de 10 animais por sexo, formando os seguintes grupos experimentais: controle (sem exposição); veículo (óleo de milho); BDE-209 (0,8 µg.kg⁻¹); Dacarbazina (40 mg.kg⁻¹) e BDE-209+Dacarbazina (0,8 µg. kg⁻¹ + 40mg. kg⁻¹, respectivamente). O grupo controle veículo e aqueles tratados com BDE-209 foram expostos aos seus respectivos tratamentos, via gavagem, a cada 5 dias, pelo período de 45 dias (nove doses). Entretanto, os grupos contendo o tratamento com Dacarbazina permaneceram sem exposição até o dia 45. Após esse tempo foram injetadas células de melanoma da linhagem B16-F10 (2,5 x 10⁵ cel em 100 µL de PBS) via veia caudal e continuado os

tratamentos por mais 21 dias. Após a injeção das células os animais foram mantidos e tratados como anteriormente, porém, iniciando o tratamento quimioterápico com os grupos contendo Dacarbazina, BDE-209 e a mistura BDE-209+Dacarbazina. O tratamento com a Dacarbazina foi administrado através de injeção intraperitoneal na dose de 40mg.kg⁻¹ a cada 3 dias pelo período de 20 dias (6 doses). Após esse novo período de exposição, todos os animais foram eutanasiados e os tecidos foram coletados para a realização das análises. Da mesma forma que na Fase I, também foram coletados os tecidos para as avaliações hematológicas, histopatológicas e bioquímicas com o objetivo de avaliar a saúde dos animais utilizados no experimento. O desenho experimental da Fase II é demonstrado na Figura 5.

FIGURA 5 – DESENHO EXPERIMENTAL DA FASE II.



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO DESENHO DOS EXPERIMENTOS DA FASE II *IN VIVO*.

Todas as práticas previstas no presente estudo foram aprovadas pela Comissão de ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO- UFPR) (Parecer número 1040/2017).

4.2 CÉLULAS E CAMUNDONGOS

Células de melanoma murino da linhagem B16-F10 obtidas no Banco de células do Rio de Janeiro (American Type Culture Collection – Manassas, EUA) (Giavazzi & Garofalo, 2001) foram cultivadas em meio DMEM (Lonza Bio Whittaker – Basel, Suíça) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Thermo Fisher Scientific, Grand Island, EUA) e 0,1 Molar (M) de HEPES (Lonza Bio Whittaker) mais antibiótico (0,25 µg/mL penicillina-streptomycina 0,85% salina). As culturas das células foram mantidas em condições livres de endotoxinas e rotineiramente testadas para a ausência de contaminação com micoplasmas pelo teste MycoAlert™ mycoplasma detection kit (Lonza) ou por marcação com DAPI seguida de análise microscópica. Camundongos da linhagem C57BL/6, de 7 semanas de idade, foram adquiridos no Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), e mantidos no biotério da Universidade Federal do Paraná, seguindo e respeitando todos os critérios previstos na Lei Federal Nº 6.638, publicada em 5 de Novembro de 1979, para o manejo científico de animais. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, com 3-5 indivíduos por caixa, com temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo circadiano controlados (12/12 horas, claro e escuro) e alimentados com ração e água *ad libidum*. Para enriquecimento ambiental foram disponibilizadas caixas de papelão para elaboração de ninhos.

4.3 MODELO DE METÁSTASE CELULAR EXPERIMENTAL

A colonização pulmonar das células de melanoma em camundongos foi descrita por Welch (1997). Resumidamente, culturas de células B16-F10, com confluência de 80-90% foram desaderidas por tratamento enzimático com tripsina, ressuspendidas em meio de cultura com 10% de SFB e lavadas por 2 vezes com PBS. As células foram contadas em câmara de Neubauer e administradas via intravenosa (veia caudal), injetando em cada camundongo 5×10^5 células em 100µl de PBS para o experimento Fase I e $2,5 \times 10^5$ células em 100µl de PBS nos animais do experimento Fase II. Todos os camundongos injetados com B16-F10 foram eutanasiados após 21 dias da injeção das células. Primeiramente os animais foram anestesiados com xilazina (DCB 09207) (20 mg.kg^{-1}) e ketamina (DCB 01936) (100 mg.kg^{-1}) e posteriormente mortos por deslocamento cervical.

4.4 ANÁLISES DO SANGUE

As análises do sangue foram utilizadas com o objetivo de avaliar a condição de saúde dos animais utilizados no experimento. Após anestesia o sangue foi imediatamente coletado pela via intracardíaca. Após a coleta, o sangue foi encaminhado no mesmo dia para o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR), para a realização de um hemograma completo (CBC) (total de leucócitos, glóbulos vermelhos, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, segmentado, hastes, eosinófilos e linfócitos). Além disso, o plasma foi obtido após centrifugação sanguínea a $3000 \times g$ por 10 min; essas amostras foram usadas para determinar o perfil bioquímico (alanina aminotransferase - ALT, aspartato aminotransferase - AST, fosfatase alcalina, colesterol, triglicerídeos, creatinina e uréia). Esses parâmetros foram detectados usando um analisador químico (Mindray BS-200), de acordo com as instruções do fabricante (Kovalent, Reagelabor).

4.5 ANÁLISES DA PROGRESSÃO DAS METÁSTASES

Após a coleta do sangue os animais foram dissecados e coletados cérebro, pulmão, fígado, rim e gônadas. Uma vez coletados, os órgãos foram avaliados e fotografados. Após o registro fotográfico, um lóbulo pulmonar e parte do fígado e cérebro e rim foram preservados para histologia. A outra parte do órgão foi subdividida em duas partes sendo uma preservada a -80°C para as análises bioquímicas.

Nas imagens obtidas dos pulmões foram contabilizados e analisados todos os pontos escuros encontrados nos órgãos considerados, os quais correspondem a metástases independentes. Portanto, segundo o modelo, o maior número de metástases no tecido corresponde a uma maior colonização das células tumorais injetadas.

4.6 HISTOLOGIA

Os pulmões foram preservados em paraformaldeído 4% (EMS – Hatfield, EUA) diluído em PBS por 4 horas, enquanto os tecidos cérebro, fígado, e rim foram fixados em ALFAC (70% etanol, 4% formaldeído e 5% ácido acético glacial) por 12 horas. Após o período de fixação, todos os tecidos foram desidratados com etanol

em bateria com concentrações crescentes até chegar à 100%, seguida por diafanização com xilol, inclusão e emblocagem em Resina Paraplast (Merck – Darmstadt, Alemanha) segundo Oliveira Ribeiro et al. (2012).

Para os estudos de histopatologia do cérebro, fígado e rim foram realizados cortes de 5 µm e coletado um corte a cada 10 cortes realizados (aproximadamente a cada 50 µm) e depositados sobre lâminas histológicas previamente tratadas com albumina. Posteriormente, os cortes foram corados em Hematoxilina e Eosina. Após a coloração foi montada a lâmina permanente e os cortes foram analisados para quantificar a presença de metástases nos tecidos coletados no Microscópio de Epifluorescência Motorizado Axio Imager Z2 Zeiss, equipado com um scanner automatizado Metafer 4/Slide do Centro de Tecnologia Avançada de Fluorescência da UFPR - CETAF (Oliveira Ribeiro et al., 2012).

4.7 ANÁLISES DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Fragmentos de aproximadamente 200 mg dos tecidos coletados foram considerados para as análises bioquímicas e imediatamente preservadas (-80°C). Os tecidos foram homogeneizados em tampão Tris HCl 20mM, EDTA 0,1M, PMSF 1mM pH 7,4 (volume final de 2 ml) para fígado, rim e pulmão e tampão fosfato de potássio 0,1M pH7,5 para cérebro e músculo. Em seguida as amostras foram centrifugadas (12.000 g a 4° C) durante 30 minutos. O sobrenadante foi aliquoteado em diferentes tubos tipo “eppendorf”, diluídas de acordo com o método a ser utilizado, a fim de alcançar uma faixa de concentração de proteínas desejada (1mg de proteínas/ml para a atividade das enzimas). As amostras de cérebro e músculo esquelético foram submetidas às análises de atividade da acetilcolinesterase, enquanto pulmão, fígado e rim às análises de estresse oxidativo.

Concentração de tióis não proteicos (GSH)

A concentração de tióis não proteicos foi determinada a partir da reação com o DTNB 2,5 mM (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico). Para precipitar proteínas das amostras foi adicionado TCA (ácido tricloroacético) para chegar a uma concentração final 10%. A mistura foi centrifugada e 50 µl do sobrenadante pipetado na microplaca seguido de 230 µl de tampão tris-base a 0,4M, pH8,9 e 20 µL de DTNB 2,5mM. A leitura foi realizada a 415 nm.

Catalase

A atividade da catalase foi medida de acordo com o método descrito por Aebi (1974), com base na relação direta entre a atividade da enzima e o desaparecimento do seu substrato peróxido de hidrogênio. O desaparecimento de peróxido de hidrogênio é monitorado pela diminuição na absorbância a 240 nm. A medição foi realizada numa solução contendo 10 µl da amostra e mais 290 µl de tampão de fosfato (80 mM, pH = 7) e peróxido de hidrogênio (150 mM).

Peroxidação de lipídios (LPO)

Os danos causados nos lipídios foram avaliados de acordo com o Método FOX (Jiang et al., 1991, 1992). O princípio do método se baseia na rápida oxidação do Fe^{+2} mediada por óxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{+3} - laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve luz a um comprimento de onda de 550-570 nm. Em um microtubo de 2 mL foram pipetados 200 µL da amostra centrifugada concentrada acrescida de 1800 µL do meio de reação, composto de metanol 100%, Xilenol Laranja 100 µM, H_2SO_4 25 mM, hidroxitolueno butilado 4mM e $FeSO_4.NH_4$ 25 µM. Após 20 minutos de reação à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 9.000g. Para a leitura, 300 µL do sobrenadante foram pipetados em microplacas e a absorbância foi medida a 550-570 nm em um espectrofotômetro de microplaca.

Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da enzima GST foi mensurada de acordo com a formação de um tioéter a partir da reação do substrato CNDB com o GSH, catalizada pela GST (Keen et al., 1976, com modificações). Na microplaca foram adicionados 20 µL de amostra, acrescidos de 180 µL do meio de reação com uma pipeta multicanal. O meio de reação foi preparado a partir de tampão fosfato a 0,1M pH 6,5; solução de GSH a 3mM (Sigma Aldrich) e solução de CNDB a 3mM (Sigma Aldrich). A absorbância foi medida em um comprimento de onda de 340 nm durante 5 min em intervalos de 1 minuto. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o delta absorbância no intervalo de 5 minutos.

Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da enzima foi medida através do método que baseia-se na capacidade da SOD em inibir a redução do NBT (nitroazul de tetrazólio para azul Formazan pelo O_2^- gerado pela hidroxilamina em solução alcalina, sendo que a redução do NBT é medida espectrofotometricamente a 560 nm. Baseado em Crouch et. al. 1978. Foram utilizados 30 μ l de amostra normalizada para 1 mg proteína.mL⁻¹, pipetados em triplicata, em placas de 96 poços. Em seguida foram adicionados 70 μ l de NBT e 100 μ l de hidroxilamina, obtendo as concentrações finais de 100 μ M e 36,85 mM, respectivamente. Após, foi realizada a leitura a 560 nm em leitor de placas no tempo de 30 min de incubação.

Resposta integrada dos biomarcadores (RIB)

Para avaliar a resposta integrada dos biomarcadores foi utilizada a metodologia descrita por Beliaeff and Burgeot, (2002) modificada por Sanchez et al., (2013). Os resultados obtidos através da análise dos biomarcadores de cada grupo experimental utilizado foram divididos pelo grupo controle correspondente, seguido de uma logaritimização para redução da variância. A partir dos dados logaritimizados (Y_i) foi calculada a média (μ) e o desvio padrão (s) para todas os dados. Em seguida, foi aplicada a fórmula $Z_i = (Y_i - \mu)/s$ para cada tratamento, sendo a diferença entre o grupo tratado e controle utilizada para obter o valor de A – que corresponde ao resultado integrado para cada biomarcador utilizado. Após, estes resultados foram plotados em um gráfico do tipo radar, onde é indicado o estímulo ou inibição de determinado biomarcador em relação ao grupo controle. Por fim, para o cálculo do índice RIB de cada grupo, os valores foram convertidos em números absolutos e somados.

4.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Para cada variável, foi realizada a ANOVA de uma via após verificação da normalidade e homocedasticidade das variâncias. Não houve diferenças nos grupos controle e veículo e, portanto, apenas o grupo veículo é mostrado nos resultados como o grupo controle para todos os experimentos. Para comparações entre os grupos, foi realizado o teste a posteriori de Tukey. Para os resultados das metástases em outros tecidos foram realizadas testes de dissimilaridade SIMPER e um Cluster análises, que permitem separar os grupos a partir de análises

multivariadas, considerando junto os tecidos que apresentaram metástase entre os diferentes tratamentos.

5 RESULTADOS

CAPITULO I: EXPOSIÇÃO ORAL DE BDE-209 MODULA A DISSEMINAÇÃO DE METÁSTASES (B16-F10) EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Nesse capítulo apresentamos os resultados na forma de manuscrito obtidos com os experimentos correspondentes à Fase I do projeto. O manuscrito foi submetido para a revista *Chemosphere* (FI=5,1) em 16/03/2020

Introduction

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are high molecular weight, hydrophobic, toxic, bioaccumulative and persistent molecules, largely used as brominated flame retardants in the manufacture of various products (Dornbos et al., 2015). There are 209 PBDEs congeners, classified according to the number and position of bromine atoms in their chemical structure (Pereira et al., 2017). Large amounts of PBDEs are released to the environment during the production, application, disposal and recycling processes (Qu et al., 2017; EPA, 2008). According to Espina et al., (2015), human populations are exposed to PBDEs through inhalation, ingestion and skin contact, at different stages of the life cycle. Due to their lipophilicity, these compounds can accumulate along the food chain, increasing the risk of human exposure (Ji et al., 2017).

The decabromodiphenil ether BDE-209 is the most common PBDE in the environment (atmosphere, sediment, soil and domestic dust) (La Guardia et al., 2007), and represents more than 90% of the total daily intake of PBDEs by humans (Ji et al., 2017). Consequently, BDE-209 has been detected in human blood (1-35 pmol.g⁻¹; Sjödin et al., 2008), semen, fat, breast milk (0.077-0.0042 pmol.g⁻¹; Schechter et al., 2003), umbilical cord and placental tissues (Besis et al., 2014b; Giordano et al., 2008; Zhi et al., 2018).

Among the reported effects of BDE-209 are the incidence of hepatic granulomas, hyperplasia of thyroid follicular cells, stomach ulcers (Aschebrook-Kilfoy et al., 2015), and the risk of breast, ovarian and cervical cancer (Li et al. 2012). However, there is no information about the role of BDE-209 in *in vivo* metastatic dissemination of cancer cells, which could interfere with cancer development.

The cancer is a pathology originated from a single cell that accumulates genetic and epigenetic changes due to fail of cell repair systems (Quail and Joyce, 2013) and generally involves the formation of metastasis, a process in which cells invade and colonize neighboring or distant organs and tissues (Sudhakar, 2009; Vaiopoulos et al., 2014). Bidirectional communication between cells and their microenvironment is fundamental for normal tissue homeostasis and tumor growth, while interactions between the tumor and stromal cells are important in evolution, progression and prognosis (Quail and Joyce, 2013). Melanoma is a highly metastatic form of skin cancer, resulting from the uncontrolled proliferation of transformed melanocytes, dendritic-shaped cells, which are located in the basal layer of the epidermis (Silva et al, 2013). Despite treatment improvement in recent years, metastatic melanoma has a poor prognosis, with an average patient survival of 4 months (Domingues et al., 2018).

Previous and unpublished *in vitro* studies from our group reported that B16-F10 and B16-F1 cell strains from C57BL/6 mice exposed to BDE-209 presented reduced cell death rates by necrosis. Additionally, malignancy related traits such as proliferation, migration and gene expression of ABC-Cassette family carriers (ABCB1, ABCB5, ABCC1, ABCC2 and ABCC4) are modulated by BDE-209 under realistic levels of exposure. In order to investigate the role of BDE-209 on metastasis and melanoma development, *in vivo* studies were performed after chronic exposure of mice (C57BL/6 strain) to the brominated pollutant. The aim of the current study is to assess whether the exposure to BDE-209 affects the dissemination of tumor cells and metastasis formation in the lung or other non-target organs, and consequently discuss if interferes with cancer progression.

Material and Methods

Experimental Design

C57BL/6 mice (18 males and 18 females, 7-week old) were maintained according to ethical principles established by the Experimental Brazilian Animal Council (CONCEA). The experimental design was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation at Federal University of Parana (certificate no. #1040/2017). The animals were separated in five groups (at least 7 animals per group): three groups exposed to BDE-209 (0.08; 0.8; 8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ in corn oil) for 45

days by gavage every five days (9 doses), and two control groups, one exposed corn oil (vehicle) and a second group without any treatment (control).

B16-F10 murine melanoma cells (American Type Culture Collection - Manassas, USA) (Giavazzi and Garofalo, 2001) were cultured in DMEM (Lonza Bio Whittaker - Basel, Switzerland) supplemented with 0.1 M of HEPES (Lonza Bio Whittaker) 0,25 µg/mL penicillin-streptomycin in 0,85% saline, 3.7 g/L sodium bicarbonate at 37 °C in 5% CO₂ in humidified atmosphere. Cell cultures were maintained in endotoxin-free conditions, and routinely tested for the absence of mycoplasma contamination by the MycoAlert™ mycoplasma detection kit (Lonza) or by DAPI labeling followed by microscopy analysis.

After the treatment (9 doses of BDE-209), B16-F10 cells (5×10^5 viable cells in 100 µL of PBS) were injected via caudal vein in all C57BL/6 mice. After the injection, the individuals from the five groups previously exposed to BDE-209 received four additional doses of BDE-209 every five days until the end of the experiment (20 days). Then, the mice were anesthetized (10 mg.kg⁻¹ of xylazine and 100 mg.kg⁻¹ of ketamine), the blood was sampled from cava vein with heparinized syringes, and the animals were euthanized by cervical dislocation for posterior sampling of the lung, liver, kidney, brain and gonads, which were preserved for both biochemical and histological analyses.

Blood Analysis

Blood was sampled via intracardiac route for a complete blood count (CBC), including total leukocytes, red blood cells, hemoglobin, hematocrit, platelets, segmented, stems, eosinophils, and lymphocytes (Veterinary Clinical Pathology Laboratory at Federal University of Parana). The plasma obtained after blood centrifugation (3000 g for 10 min at 4°C) was used to determine the biochemical profile (alanine aminotransferase-ALT, aspartate aminotransferase-AST, alkaline phosphatase, cholesterol, triglycerides, creatinine, and urea) using Mindray BS-200 chemistry analyzer.

Biochemical Biomarkers

Samples of approximately 200 mg of lung, liver and kidney were sampled and stored at -80°C. For the analyses, samples were homogenized in 2 mL of Tris-buffer (20 mM HCl, 0.1 M EDTA, 1 mM PMSF, pH 7.4) and centrifuged (9,000 g for 30 min

at 4 °C). The supernatant was recovered, and total protein concentration was determined according to Bradford, (1976) method. For enzymatic activities, protein concentration was normalized to 1 mg/mL.

Biomarkers of oxidative stress: The following biochemical biomarkers Non-protein thiols (NPT) (Sedlak and Lindsay, 1968); Catalase (CAT) (Aebi, 1974); Lipid peroxidation (LPO) (Jiang et al., 1992); Glutathione S-transferase (GST) (Keen et al., 1976) and Superoxide Dismutase (SOD) (Crouch et al., 1978), were developed according to described in details by Filipak Neto et al. (2008) and Bussolaro et al. (2010).

Integrated response of biochemical biomarkers (IBR)

The data from biomarkers corresponding to tested doses and control group were firstly transformed to logarithm to reduce the variance. These data (Y_i), the mean (μ) and standard deviation (s) were calculated from all analyzed samples. The formula $Z_i = (Y_i - \mu)/s$ was applied for each treatment, and the difference between the treated and control group was used to obtain the value of A (corresponding to the integrated result for each biomarker) (Beliaeff and Burgeot, 2002; modified by Sanchez et. al., 2013). Then, these results were plotted on a radar-type graph, where values above or below zero (control) indicate the stimulus or inhibition of a given biomarker. Finally, to calculate the IBP index from each experimental group, the values of A were converted in absolute numbers (S) and added together according to Severo (2017).

Histological procedures

The target organs (lung) and non-target organs (liver, brain and kidney) were preserved in ALFAC (80% ethanol, 10% formaldehyde and 5% acetic acid) for 12 h. Then samples were dehydrated in ethanol graded series, diaphanized in xylol and embedded in Paraplast Plus (Merck - Darmstadt, Germany). Serial 5- μ m thick sections (one section every 100 μ m) were processed and stained with Hematoxylin-Eosin. Images were obtained using motorized Axio Imager Z2 epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Jena, DE), equipped with an automated scanning Metafer 4/VSlide (Metasystems, Altussheim, DE) for metastasis identification.

Cluster analyses to dissimilarity tests

PRIMER 6 (Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research) was adapted from multivariate routines for arrays analyses of species-by-samples data from community ecology to evaluate the dissimilarity of every pair of presence or absence of metastasis in different organs. Clustering and ordination techniques are then able to represent the relationships between the samples identifying the discrimination between two observed sample clusters. The similarity percentages routine (SIMPER) identify variables that contribute most to the difference between two groups. A logarithmic transformation metastasis presence or absence in the mice organs (liver, kidney, brain and gonads) was developed to evaluate the Bray Curtis dissimilarity tests by multivariate analyses SIMPER. This kind of data permits to establish the dissimilarity index among experimental groups and to determine the proximity of results meaning the percentage of contribution from each organ.

Statistical Analyses

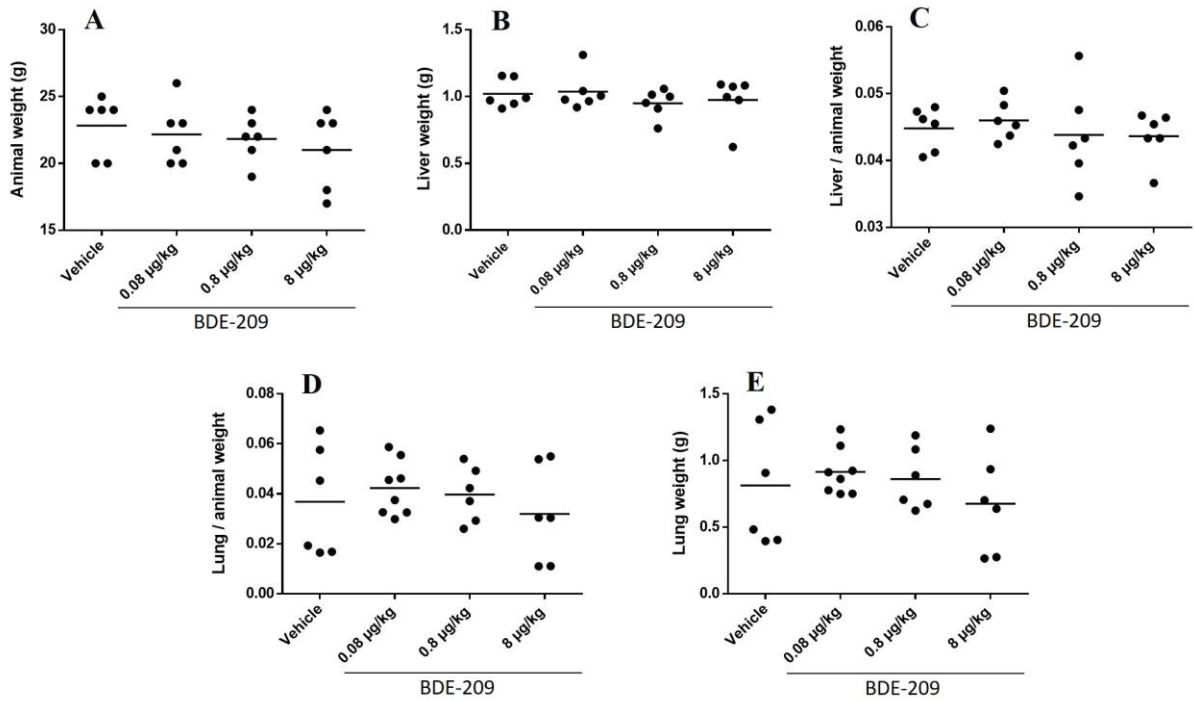
For each variable, one-way ANOVA were performed after checking the normality and homoscedasticity of the variances. There was no differences of the control and the vehicle groups and so only the vehicle group is shown in the results. For comparisons among groups Dunn's a posteriori test was performed. For the analysis of metastases in brain, liver, kidney and ovaries, chi-square test were performed.

Results

Mice health conditions

According to biometric parameters (total body, lung and liver weight), hepatosomatic and lung-somatic indexes no difference in individuals from tested and control groups were observed (Figure 6). The Table 1 resumes all blood parameters investigated including biochemical profile and complete blood count. Except for alanine aminotransferase (ALT) ($p < 0.02$) and aspartate aminotransferase (AST) ($p < 0.01$), there were no differences between control and tested groups. The ALT activity was slightly higher in individuals exposed to BDE-209 when compared with the control and vehicle groups. Similarly, the activity of AST was slightly higher in individuals exposed to the higher dose of BDE-209 and control vehicle.

FIGURA 6. BIOMETRIC ANALYSIS OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209.



FONTE: O Autor (2019)

LEGENDA: (A) LIVER WEIGHT, (B) HEPATOSOMATIC INDEX, (C) HEPATOSOMATIC INDEX, (D) LUNG WEIGHT AND (E) LUNG /ANIMAL WEIGHT RATIO.

TABLE 1. ANALYSIS OF THE COMPLETE BLOOD CELLS COUNT AND BIOCHEMICAL PROFILE PARAMETERS OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209 FOR 65 DAYS (GAVAGE EVERY 5 DAYS) AND POSTERIORLY INOCULATED WITH B16F10 CELLS OF MELANOMA MURINE FOR 20 DAYS.

Complete Blood Count	Control	Vehicle	BDE-209 0,08 µg/Kg	BDE-209 0,8 µg/Kg	BDE-209 8 µg/Kg	p value
White blood cell (WBC) x10 ³ uL ⁻¹	3.13 ± 1.41	2.88 ± 0.82	4.46 ± 0.87	3.13 ± 1.18	3.88 ± 1.17	0.22
Red blood cell (RBC) x10 ⁶ uL ⁻¹	238.75 ± 131.81	430.36 ± 233.65	143.58 ± 33.48	328.93 ± 190.57	478.9 ± 147.76	0.22
Hemoglobin (HGB) g.dL ⁻¹	9.75 ± 0.46	10.75 ± 1.47	10.36 ± 0.36	9.76 ± 0.81	10.74 ± 0.33	0.23
Hematocrit (HCT) (%)	31.5 ± 2.47	34.51 ± 5.07	33.66 ± 1.14	31.53 ± 2.47	34.76 ± 1.94	0.24
Plates (PLT) x10 ³ uL ⁻¹	371.5 ± 63.8	454.16 ± 100	441.16 ± 73.97	411.16 ± 148.8	447.8 ± 58.64	0.27
Lymphocytes (x10 ³ uL ⁻¹)	2.1 ± 1.16	1.66 ± 0.59	3.33 ± 0.81	2.08 ± 0.95	2.3 ± 0.87	0.16
Monocytes (x10 ³ uL ⁻¹)	0.066 ± 0.047	0.083 ± 0.037	0.083 ± 0.038	0.083 ± 0.039	0.06 ± 0.048	0.76
Granulocytes (x10 ³ uL ⁻¹)	0.96 ± 0.38	1.13 ± 0.24	2.1 ± 0.45	0.96 ± 0.36	1.52 ± 0.70	0.33

Biochemical profile	Control	Vehicle	BDE-209 0,08 µg/Kg	BDE-209 0,8 µg/Kg	BDE-209 8 µg/Kg	p value
ALT (U.L ⁻¹)	29.28 ± 6.21	31.91 ± 4.72	41.85 ± 16.17	95.06 ± 39.67	51.78 ± 17.98	0.02
AST (U.L ⁻¹)	238.75 ± 131.81	430.36 ± 233.65	143.58 ± 33.48	328.93 ± 190.57	478.9 ± 147.76	0.01
Creatinina (mg.dL ⁻¹)	0.38 ± 0.037	0.43 ± 0.047	0.41 ± 0.037	0.43 ± 0.094	0.46 ± 0.048	0.32
Urea (mg.dL ⁻¹)	46.7 ± 4.05	49.24 ± 6.50	45.13 ± 3.16	43.91 ± 7.58	52.74 ± 5.55	0.14
Cholesterol (mg.dL ⁻¹)	69.95 ± 7.77	81.21 ± 11.40	73.11 ± 5.17	73.7 ± 4.78	84.28 ± 10.8	0.11
Triglycerids (mg.dL ⁻¹)	82.85 ± 12.50	89.2 ± 26.01	80.16 ± 14.59	67.31 ± 8.24	71.76 ± 11.92	0.28
VLDL-col (mg.dL ⁻¹)	16.56 ± 2.50	17.85 ± 5.22	16.05 ± 2.92	113.45 ± 1.65	14.36 ± 2.39	0.25

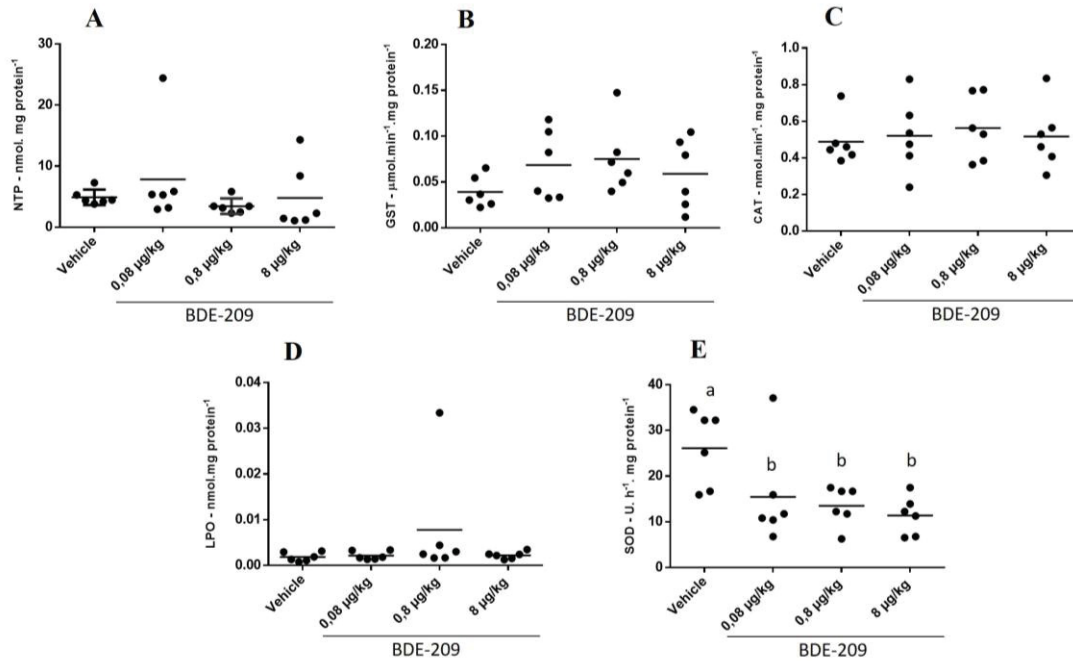
FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: BOLD DATA = P<0.05 CONSIDERED TO STATISTICAL DIFFERENCES.

Oxidative stress

Comparatively, the kidney was less affected by oxidative stress than the lung and liver. For the kidney, there were no effects on any biochemical biomarker. For the lung, only a decrease of SOD activity was observed in BDE-209 exposed mice (Figure 7). Conversely, for the liver, increases of the concentrations of non-protein thiols and lipid peroxidation occurred in BDE-209 exposed mice (Figure 8).

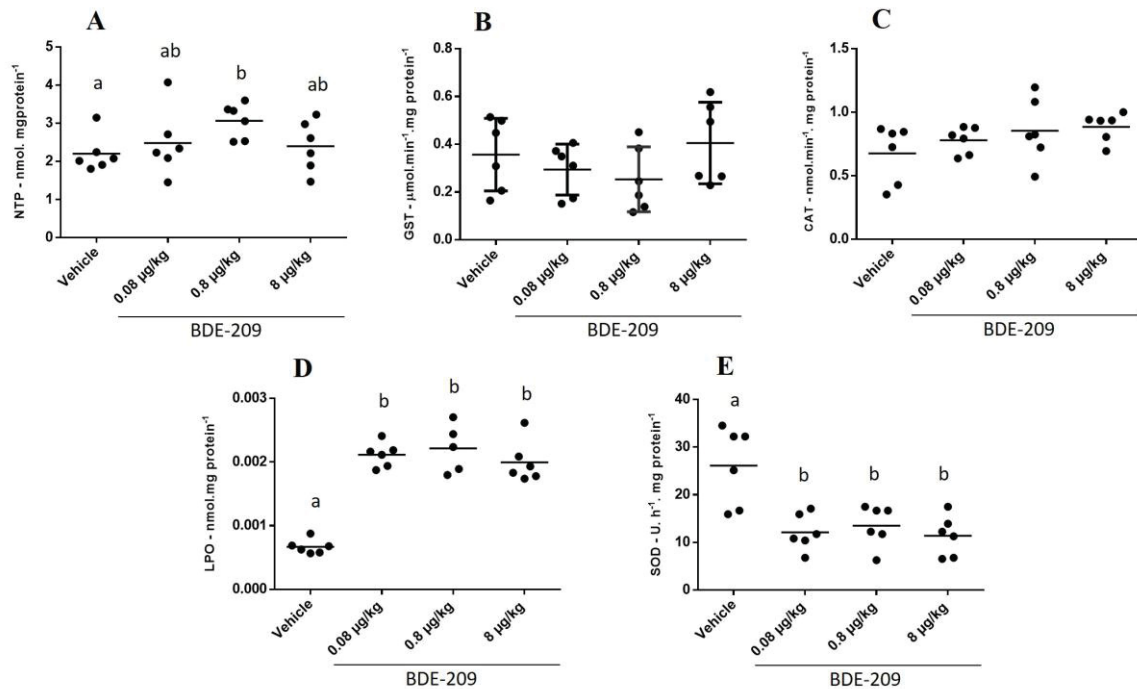
FIGURA 7 – BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN THE LUNGS OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209 AND INOCULATED WITH B16F10 CELLS.



FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: (A) NON-PROTEIN THIOLS, (B) GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ACTIVITY, (C) CATALASE ACTIVITY, (D) LIPID PEROXIDATION, (E) SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD). DIFFERENT LETTERS MEAN STATISTICAL DIFFERENCES (P<0.05).

FIGURA 8 – BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN THE LIVER OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209 AND INOCULATED WITH B16F10 CELLS.

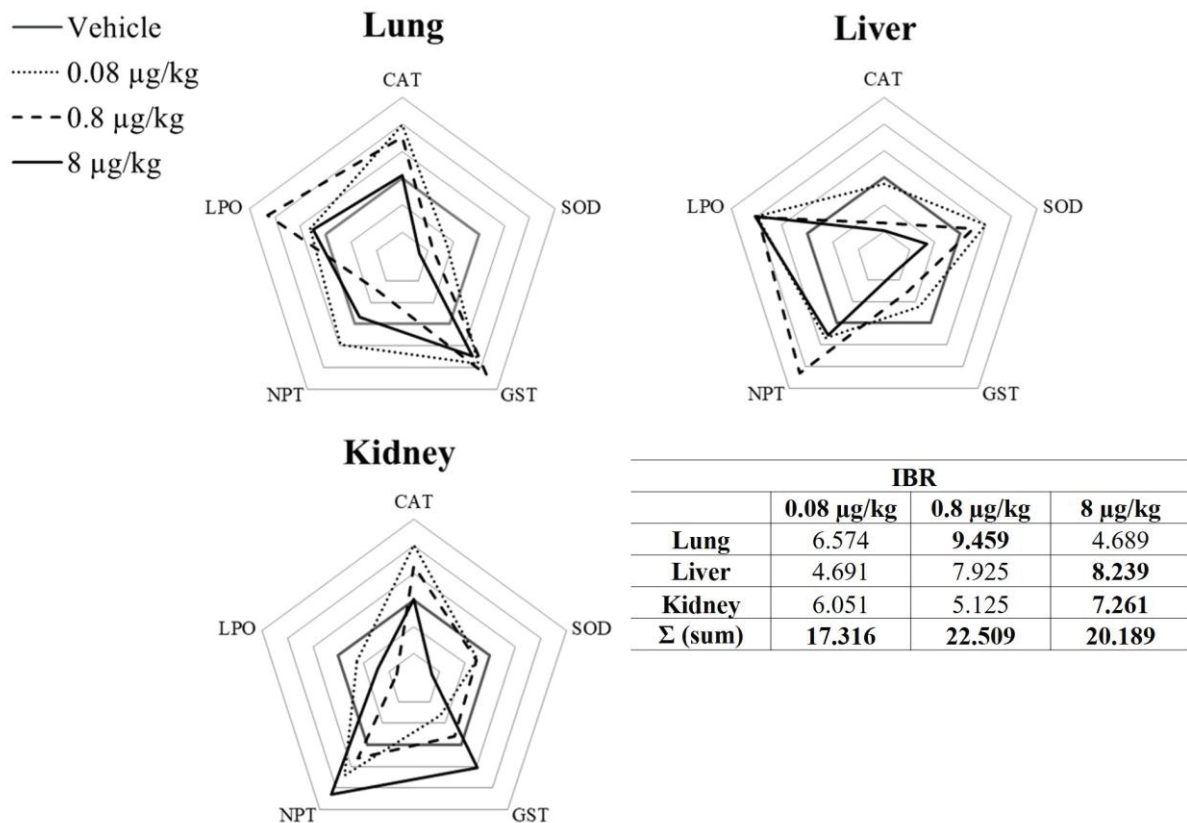


FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: (A) NON-PROTEIN THIOLS, (B) GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ACTIVITY, (C) CATALASE ACTIVITY, (D) LIPID PEROXIDATION, (E) SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD). DIFFERENT LETTERS MEAN STATISTICAL DIFFERENCES (P<0.05).

The integration of biochemical biomarkers (IBR) (Figure 9) showed that the lung was more affected by the intermediated doses, the liver was affected by the intermediated and highest doses, and the kidney was more sensitive to the highest dose of BDE-209. According to the same model, the increase of lipid peroxidation (liver) and the decrease of superoxide dismutase activity (lung) were more relevant to the results, as expected. If the IBR from all organs were considered together, the observed effects were more related to the intermediate dose of BDE-209.

FIGURA 9. INTEGRATED DATA FROM BIOCHEMICAL ANALYSES IN THE LUNG, LIVER AND KIDNEY, AND HISTOLOGICAL LOCALIZATION OF METASTASES IN C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209 AND INOCULATED WITH B16F10 CELLS.



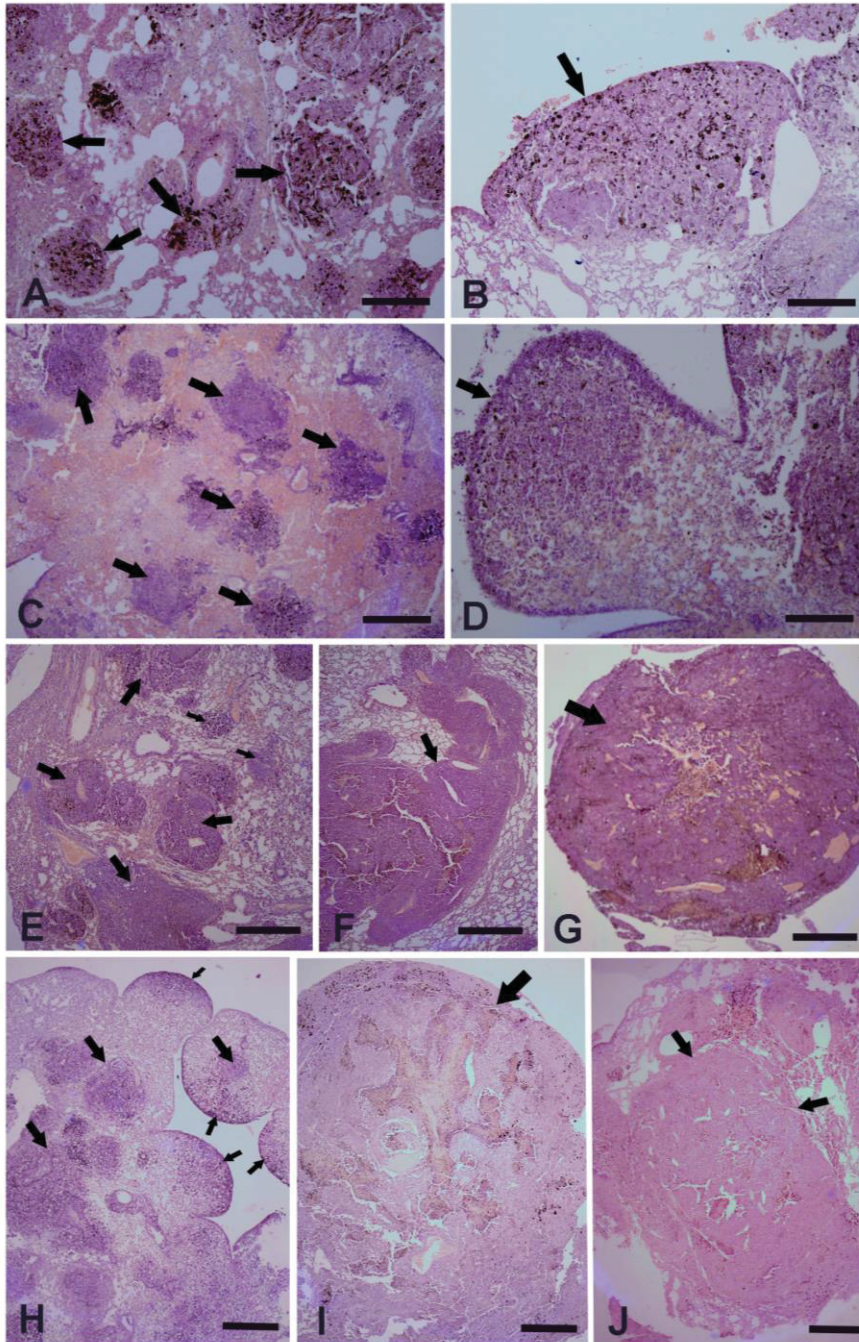
FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: (A) METASTASIS (ARROWS) IN THE LUNG (BAR = 500 MM). (B) METASTASIS (ARROWS) IN THE BRAIN (BAR = 500 MM, D1 BAR = 20 MM, D2 BAR = 50 MM AND D3 BAR = 100 MM). METASTASES WERE FOUND IN THE PERIPHERY (D1 AND D3) AND INNER BRAIN TISSUES (D2). THE IMAGES ARE REPRESENTATIVE OF 8 ANIMALS PER GROUP.

Morphological findings

Metastases were present in individuals injected with B16-F10 cells (vehicle and exposed to BDE-209), but not observed in the animals from control group (not treated). All B16-cells injected animals, as expected, presented a high number of lung metastases, represented at the organ surface by nodules, which made counting and measuring difficult. However, the histological evaluation revealed a dose-dependent increase of the number and size of metastasis. . For the brain ($p < 0.01$), liver ($p < 0.05$) and ovary ($p < 0.01$), chi square test indicated there is a significant relation between BDE-209 exposure and the increased incidence of metastasis. In the group exposed to the lowest dose of BDE-209, the metastasis occurrence is similar with control and vehicle groups (Figures 10A and B), while for intermediate and highest doses the size of metastasis are clearly larger (Figures 10C to J). Individuals exposed to the highest dose presented larger metastasis than those of the intermediate dose, as well as more nodules (Figure 10H). Metastases were occupying most of the organ in some animals (Figures 10I and J).

FIGURA 10. LUNG CROSS SECTION OF C57BL/6 MICE PREVIOUSLY EXPOSED TO BDE-209 AND INOCULATED WITH B16-F10 CELLS.

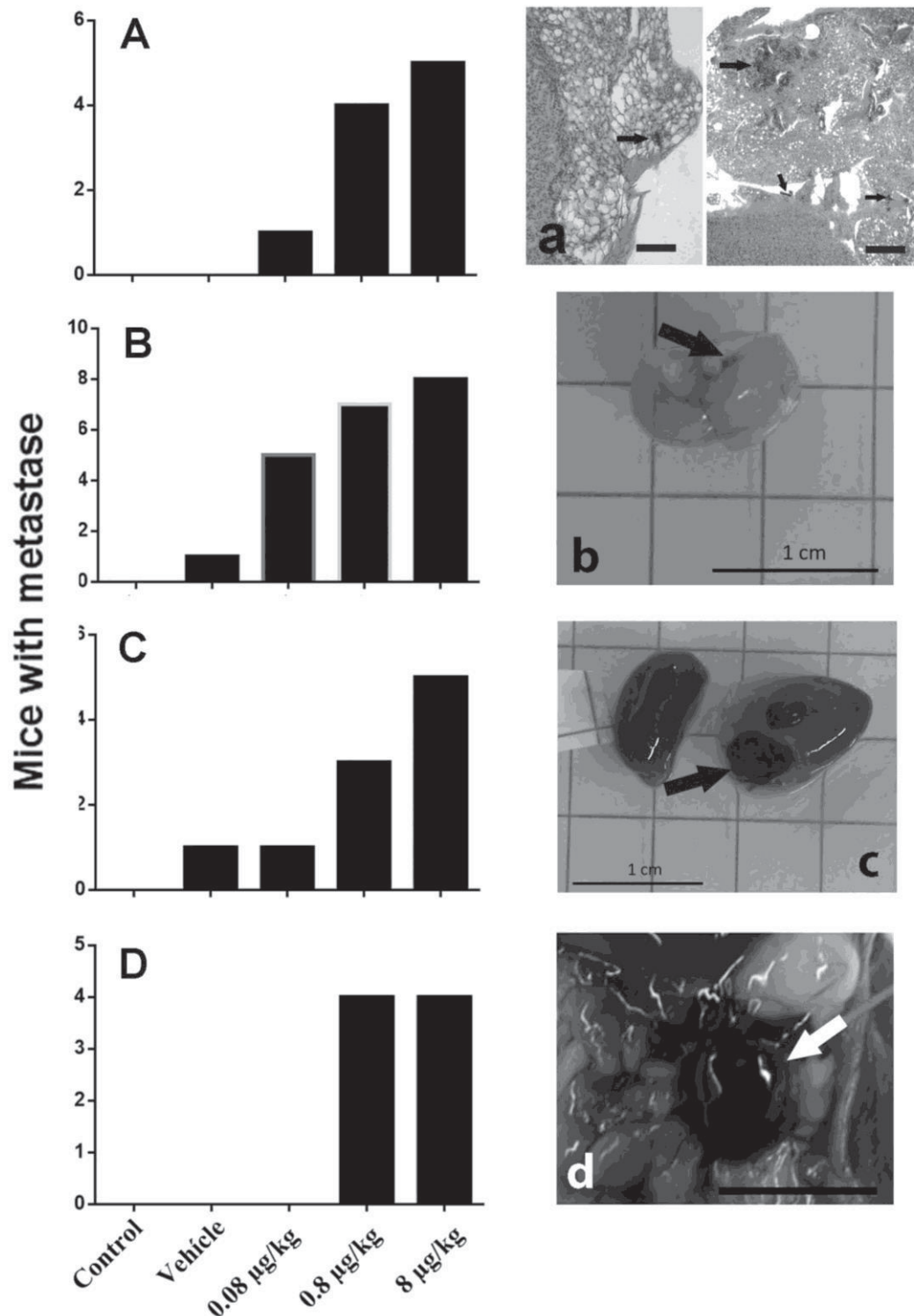


FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: (A) CONTROL GROUP. ARROWS SHOW THE OCCURRENCE OF METASTASIS AND IN (B) THE PRESENCE OF A TUMOR NODULE. SCALE BAR = 200 MM. (C) LOWEST DOSE OF BDE-209 GROUP (0.08 MG/KG). THE ARROWS INDICATE THE METASTASIS AND IN (D) IS OBSERVED A WELL-DEVELOPED NODULE (ARROW). SCALE BAR = 500 AND 200 MM, RESPECTIVELY. € INTERMEDIATE DOSE OF BDE-209 GROUP (0.8 MG/KG). THE ARROWS POINT TO THE METASTASIS, SOME WELL-DEVELOPED (LARGE ARROWS), WHILE IN (F) AND (G) THEY HIGHLIGHT THE INCIDENCE OF LARGE METASTASIS (ARROWS). SCALE BAR = 500, 200 AND 200 MM, RESPECTIVELY. (H) HIGHEST DOSE OF BDE-209 GROUP (8 MG/KG) SHOWING LARGE METASTASIS (LARGE ARROWS) AND NUMEROUS NODULES (SMALL ARROWS), WHILE (I) AND (J) REPRESENT METASTASIS OCCUPYING MOST OF THE ORGAN (ARROWS). SCALE BAR = 500 MM. HEMATOXILIN AND EOSIN STAIN.

The results showed that metastases were also found in the liver, kidney, ovary and brain of mice. In the liver, the nodules are not visible externally, but the histological images revealed the presence of metastases in the organ of individuals exposed to BDE-209 (Figure 11A). For the brain, more than 50% of individuals presented nodules in all BDE-209 exposed groups (Figure 11B), while in the gonads (ovary) and kidney, this increased incidence of metastases occurred only in individuals of the intermediate and highest doses of BDE-209 (Figures 11C and D). Despite of the changes in Alanine Transaminase (AST) and Aspartate Aminotransferase (ALT) activities, no significant damage and histopathological findings were observed in the liver of individuals exposed to BDE-209, even when metastases were found in that organ (Table 1).

FIGURA 11. OCCURRENCE OF METASTASES IN DIFFERENT ORGANS OF C57BL/6 MICE AFTER EXPOSURE TO BDE-209 AND INOCULATED WITH B16F10 CELLS.



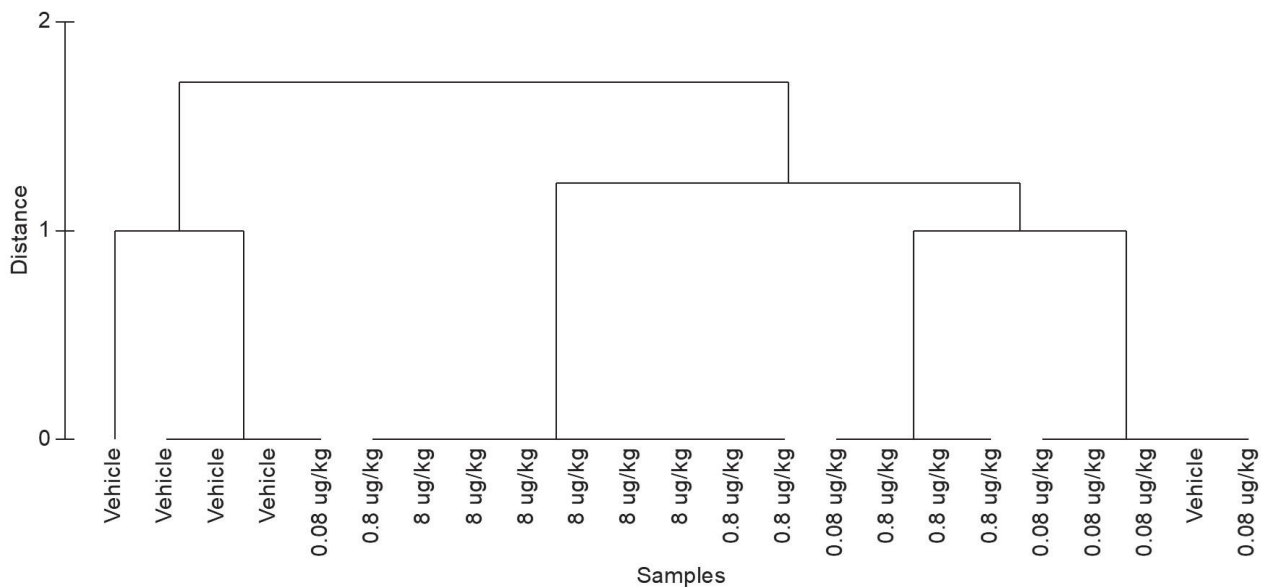
FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: A. REPRESENT THE INCIDENCE OF METASTASES IN THE LIVER (ARROWS). SCALE BAR = 100 AND 200 MM, RESPECTIVELY. HEMATOXILIN AND EOSIN STAIN. IN B, C AND D ARE OBSERVED NODULES RESPECTIVELY IN BRAIN, KIDNEY AND OVARY. THE IMAGES ARE REPRESENTATIVE OF 8 ANIMALS PER GROUP.

Dissimilarity tests

The metastasis incidence showed that the liver, kidney and brain contributed to increase the index of dissimilarity between the control and BDE-209-exposed groups, but animals from the control group presented a high similar distribution of metastasis. The individuals exposed to both intermediate and highest doses of BDE-209 and 50% of individuals exposed to the lowest dose showed higher similarities between themselves, while individuals exposed to vehicle presented some similarity only with individuals from the group exposed to lowest dose of BDE-209 (Figure 12). In addition, these findings demonstrated the role of each organ in the dissimilarity index. The metastases found in the brain, liver and kidney can explain the dissimilarity between control and treated groups, while the metastases in the kidney explain the dissimilarity between the vehicle and lowest dose groups. Another finding was the absence of dissimilarity between male and female individuals from the control and tested groups, but in this case the presence of metastases in the ovary is more representative.

FIGURA 12. INDEX OF DISSIMILARITY BETWEEN THE CONTROL AND BDE-209 EXPOSED GROUPS.



FONTE: O Autor (2020).

Discussion

The spread of metastases in cancer is a relevant aspect for the severity of the disease and the choice of therapy. It is well-described that the health of patients and some environmental conditions can modulate the development of cancer, but no studies have reported the role of BDE-209 in cancer prognosis. The current study showed that BDE-209 can increase the spontaneous dissemination of metastatic melanoma cells (B16-F10) in C57BL/6 mice after oral and chronic exposure. Foremost, BDE-209 exposure can increase the incidence of metastases in the brain, liver, kidney and gonads of mice, even though caudal injection of B16-F10 cells is a well-established experimental model for lung metastases (Francia et al., 2011). The occurrence of metastasis in periphery and inside the brain revealed that the exposure to BDE-209 interferes drastically with the spread of metastases.

The biometric findings in the present study showed no differences in corporal and organs weight between BDE-209 exposed and control groups, as well as no differences in the hepatosomatic indexes. Feng et al., (2015) reported an increase of 30% in the weight of livers in mice exposed to 800 mg.kg⁻¹ of BDE-209 for 2 years via gavage every 2 days. However, other studies in the literature using approaches more similar to ours, i.e. lower doses of BDE-209 and other PBDEs for shorter periods of exposure, reported no corporal weight increase and hepatosomatic indexes alterations (McIntyre et al., 2015), corroborating our results.

The blood analyses reinforce the low systemic toxicity of BDE-209 to the mice, since slight increases of plasma levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were the only significant alterations observed in individuals exposed to BDE-209. Increased transaminase activities in the plasma indicate hepatotoxicity in mice (Swaim et al. 1985) and so some toxicity of BDE-209 to the liver may have occurred. Indeed, alteration of blood endpoints (Zhu et al., 2019) and hepatotoxicity (Liang et al., 2019; Milovanovic et al., 2018) have been reported for BDE-209.

In general, caudal inoculation of B16-F10 melanoma cells in mice is a well-known model for metastases in the lung (Francia et al., 2011). However, the atypical incidence of metastasis in other organs such as the liver, kidney, brain and gonads is an important finding and should be better investigated. We hypothesized that (i) pro-inflammatory state, (ii) modulation of the expression of adhesion proteins and (iii)

immune system suppression are likely situations in mice chronically exposed to BDE-209, and could play a role in the atypical distribution of metastases.

The oxidative stress may explain many cell effects including a pro-inflammatory state that favor inflammation-associated diseases, including cancer (Montalbano et al., 2020). According to (Giordano et al., 2008; Tagliaferri et al., 2010; Vagula et al., 2011), polybrominated diphenyl esters exposure is known to generate *in vitro* and *in vivo* oxidative stress and consequent tissue damage through an imbalance of pro and anti-oxidative mechanisms. In the present study, the liver showed a pro-oxidant state revealed by the increase of lipid peroxidation after exposure to BDE-209. In these terms, a consequence of oxidative stress is the induction and persistence of pro-inflammatory cytokines and chemokines secretion, such as TNF, IL-1, IL-6, IL-8 and CXCR4 (Chiurchiù and MacCarrone, 2011). According to Reuter et al., (2011) and (Sosa et al., 2013), the inflammation can favor the cancer progression mainly in the initial steps by a pro-tumoral modulation in the tumor microenvironment. These findings may help the understanding of the high incidence of metastases observed in the liver.

The integrate responses of oxidative stress through IBR model (Beliaeff and Burgeot, 2002) showed changes in the individuals exposed to the intermediate dose of BDE- 209 ($0.8 \mu\text{g.kg}^{-1}$) in the lung, while the liver was more affected by the intermediate and high doses ($0.8 \mu\text{g.kg}^{-1}$ and $8 \mu\text{g.kg}^{-1}$) highlighting here the importance of the pro-oxidant state in the organ, favoring the dissemination of metastases, as hypothesized before.

Other important aspect to understand the metastasis dissemination to organs other than the lung is the cell interaction with the microenvironment. Recently, Zhi et al., (2018) described that BDE-209 exposure increased the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in monocytes, leading to dose-dependent increases in monocyte–endothelial cell adhesion. However, those molecular cues also play a pivotal role in the formation of a pre-metastatic niche: in a similar manner to leucocyte transmigration, cancer cells interact with endothelium cells by surface adhesion molecules, such as integrins and selectins, to promote extravasation (Mierke, 2008; Orr et al., 2000). According to Liou and Storz, (2010) and Mittal et al., (2014), the oxidative stress and inflammation promote the activation of the nuclear factor- $\kappa\beta$ and the activating protein-1, increasing the expression of adhesion molecules such as ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin. In addition, a decrease of

endothelium integrity by reduced tightness of the junctional barrier enhances the arrest and extravasation of cancer cells. Hence, the observed oxidative stress induced by BDE-209 and a consequent pro-inflammatory state could be reducing the physical barrier represented by the endothelium and facilitating the dissemination of metastatic cells in liver and other different organs.

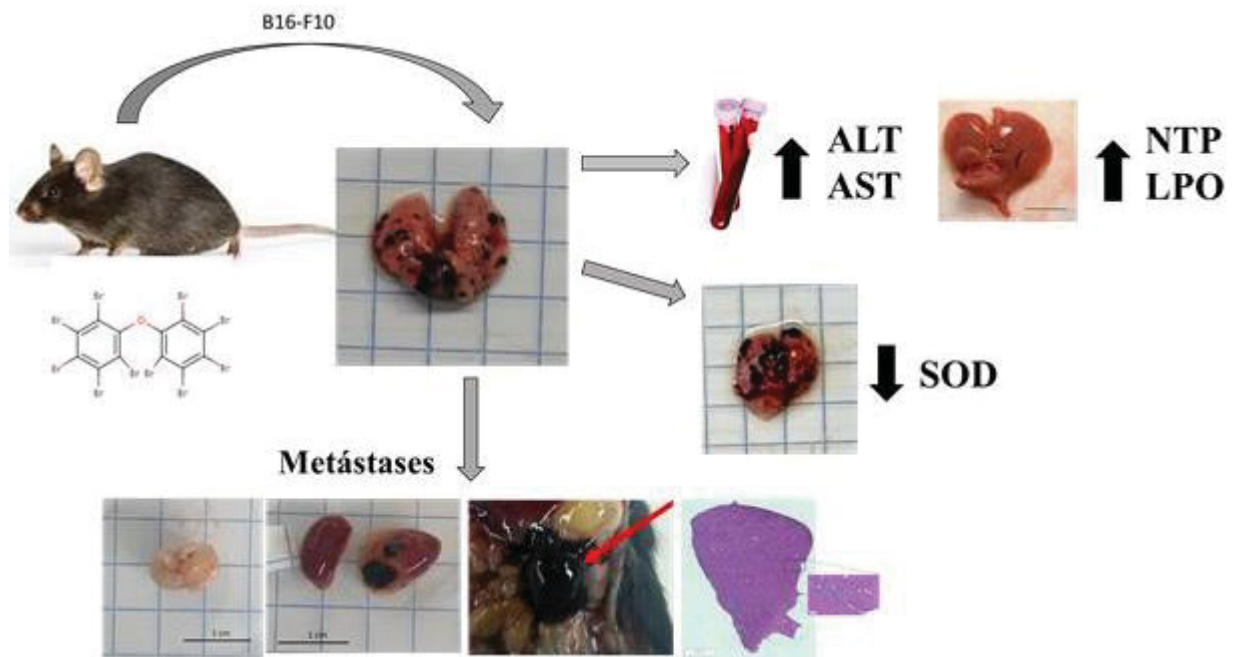
Melanoma is a type of cancer with high propensity to metastasize to the brain. More than 20% of patients are found to have brain metastasis when they are diagnosed with metastatic melanoma, and more than 50% of patients will develop brain metastases in the course of the disease (Vosoughi et al., 2018). According to Sperduto et al., (2017) brain metastasis is related to 20 to 54% of melanoma related deaths, representing an extremely poor prognosis. This finding reveals a clinical complication of cancer disease (Francia et al., 2011). As the oxidative stress was not investigated in the brain of mice exposed to BDE-209 in the current study, no correlation with metastasis dissemination could be conducted with a pro-oxidant state. Despite of that the histopathological analysis showed the presence of metastases in both outside and inside of the brain of BDE-209 exposed mice. These findings revealed the increased susceptibility of the organ to metastasis dissemination after exposure to all tested doses of BDE-209. This is a critical and alarming finding, and the mechanisms involved in this modulation should be further investigated.

A large group of organic pollutants can negatively affect the innate immunity provided by natural killer (NK) cells, monocytes, macrophages, and polymorphic neutrophils. It is well-described that stimulation of the immune system can help to eliminate cancer cells, showing that the control of metastasis dissemination depends also on the integrity of immune system. Particularly, natural killer cells play an important role in fighting cancer by recognizing and eliminating the cancer cell and so inhibiting metastasis. According to Liu et al., (2012) the exposure to BDE-209 decreases the population of cluster of differentiation cells including NK cells, and the levels of IgG and IgM in the serum, interrupting the interaction between innate immune mechanism and adaptive immunoreactions. Additionally, Kawashiro et al., (2009) described a decrease in the activity of NK cells by PBDE exposure, while Desforges et al. (2014) reported a suppression of IL-2, important to activate the NK cells. The pro-inflammatory state caused by oxidative stress, as observed in the liver, could also be related to the impairment of NK cell activity, since IL-6 and IL-8 inhibit NK cell activity. According to Wu et al., (2019) IL-6 and IL-8 secreted by tumor cells

impair the function of NK cells via the STAT3 pathway in esophageal squamous cell carcinoma.

Overall, the high incidence of metastases in different organs of mice exposed to BDE-209 was an unexpected finding, considering the experimental model used in the current study. Thus, our data strongly suggest that exposure to BDE-209, even under low doses, can lead to a singular state of animal health where a set of alterations may favor metastatic spread of melanoma. Humans are exposed to BDE-209 by several routes, and if the same happen to them, it may lead to poor cancer prognosis.

FIGURA 13. ILLUSTRATION OF THE CONCLUSIONS OF THE ARTICLE, SHOWING THE EFFECTS ON BLOOD, LIVER, LUNG AND OTHER TISSUES.



Fonte: A autora (2020).

LEGEND: CHRONIC EXPOSURE TO LOW, REALISTIC DOSES OF THE POLYCHROME POLLUTANT BDE-209 AFFECTS THE PROGRESSION OF LUNG METASTASIS IN C57BL/6 MICE INOCULATED WITH B16-F10 CELLS. THERE IS A GREATER SENSITIZATION OF THE ORGANISM TO THE PROLIFERATION AND THE DEVELOPMENT OF METASTASES IN OTHER ORGANS (BRAIN, LIVER, KIDNEYS AND OVARIES) CONSIDERED NON-TARGETS BY THE MODEL USED.

References

- Aebi, H., 1974. Catalase. *Methods Enzym. Anal.* 673–684. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3>
- Almeida, A.S., Faleiros, A.C.G., Teixeira, D.N.S., Cota, U.A., Chica, J.E.L., 2008. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 44, 429–432. <https://doi.org/10.1590/s1676-24442008000600006>
- Arrangoiz, R., 2016. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. *J. Cancer Treat. Res.* 4, 1. <https://doi.org/10.11648/j.jctr.20160401.11>
- Aschebrook-Kilfoy, B., Dellavalle, C.T., Purdue, M., Kim, C., Zhang, Y., Sjodin, A., Ward, M.H., 2015. Polybrominated diphenyl ethers and thyroid cancer risk in the prostate, colorectal, lung, and ovarian cancer screening trial cohort. *Am. J. Epidemiol.* 181, 883–888. <https://doi.org/10.1093/aje/kwu358>
- Ayuko Hoshino, Bruno Costa-Silv, Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Mark, M.T., Molina, H., Kohsaka, S., Giannatale, A. Di, Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplod, N., Uryu, K., Pharmer, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A.E., Ararso, Y., Zhang, T., Zhang, H., Hernandez, J., Weiss, J.M., Dumont-Cole, V.D., Kramer, K., Wexler, L.H., Narendran, A., Schwartz, G.K., Healey, J.H., Sandstrom, P., Labori, K.J., Kure, E.H., Grandgenett, P.M., Hollingsworth, M.A., Sousa, M. de, Kaur, S., Jain, M., Mallya, K., Batra, S.K., Jarnagin, W.R., Brady, M.S., Fodstad, O., Muller, V., Pantel, K., Minn, A.J., Bissel, M.J., Garcia, B.A., Kang, Y., Rajasekhar, V.K., Ghajar, C.M., Matei, I., Peinado, H., Bromberg, J., Lyden, D., 2015. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329–335. <https://doi.org/doi:10.1038/nature15756>. Tumour
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1316–1322. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>
- Bersini, S., Jeon, J.S., Moretti, M., Kamm, R.D., 2014. In vitro models of the metastatic cascade: from local invasion to extravasation. *Drug Discov. Today* 19, 735–742. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.12.006>
- Besis, A., Katsoyiannis, A., Botsaropoulou, E., Samara, C., 2014a. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in central air-conditioner filter dust and relevance of non-dietary exposure in occupational indoor environments in Greece. *Environ. Pollut.* 188, 64–70. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2014.01.021>
- Besis, A., Katsoyiannis, A., Botsaropoulou, E., Samara, C., 2014b. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in central air-conditioner filter dust and relevance of non-dietary exposure in occupational indoor environments in Greece. *Environ. Pollut.* 188, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.021>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cai, Y., Zhang, W., Hu, J., Sheng, G., Chen, D., Fu, J., 2011. Characterization of maternal transfer of decabromodiphenyl ether (BDE-209) administered to pregnant Sprague–Dawley rats. *Reprod. Toxicol.* 31, 106–110. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2010.08.005>
- Chiurchiù, V., MacCarrone, M., 2011. Chronic inflammatory disorders and their redox control: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants Redox Signal.* 15, 2605–2641. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3547>

- Christmann, M., Verbeek, B., Roos, W.P., Kaina, B., 2011. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: Enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1816, 179–190. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2011.06.002>
- Clark, W.H., Elder, D.E., Guerry, D., Braitman, L.E., Trock, B.J., Schultz, D., Synnestvedt, M., Halpern, A.C., 1989. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 1893–1904. <https://doi.org/10.1093/jnci/81.24.1893>
- Costa, L.G., Giordano, G., 2011. Is decabromodiphenyl ether (BDE-209) a developmental neurotoxicant? *Neurotoxicology* 32, 9–24. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2010.12.010>
- Cox, K., Weeks, J., Mills, P., Chalmers, R., Devalia, H., Fish, D., Sever, A., 2016. Contrast-Enhanced Ultrasound Biopsy of Sentinel Lymph Nodes in Patients with Breast Cancer: Implications for Axillary Metastases and Conservation. *Ann. Surg. Oncol.* 23, 58–64. <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4606-0>
- Crawford, J., 2018. Cancer cachexia: Are we ready to take a step forward? *Cancer* 124, 456–458. <https://doi.org/10.1002/cncr.31126>
- Cristale, J., Aragão Belé, T.G., Lacorte, S., de Marchi, M.R.R., Jing, L., Sun, Y., Wang, Y.Y., Liang, B., Chen, T.T., Zheng, D., Zhao, X., Zhou, X., Sun, Z., Shi, Z., Montalbano, A.M., Albano, G.D., Anzalone, G., Moscato, M., Gagliardo, R., Di Sano, C., Bonanno, A., Ruggieri, S., Cibella, F., Profita, M., Wang, Y.Y., Chen, T.T., Sun, Y., Zhao, X., Zheng, D., Jing, L., Zhou, X., Sun, Z., Shi, Z., Vaccher, V., Ingenbleek, L., Adegboye, A., Hossou, S.E., Koné, A.Z., Oyedele, A.D., Kisito, C.S.K.J., Dembélé, Y.K., Hu, R., Abdel Malak, I., Cariou, R., Vénisseau, A., Veyrand, B., Marchand, P., Eyangoh, S., Verger, P., Dervilly-Pinel, G., Leblanc, J.C., Le Bizec, B., Estill, C.F., Slone, J., Mayer, A., Chen, I.C., La Guardia, M.J., Rivière, G., Jean, J., Gorecki, S., Hulin, M., Kolf-Clauw, M., Feidt, C., Picard-Hagen, N., Vasseur, P., Le Bizec, B., Sirot, V., Chu, Z., Li, Y., Han, X., Wang, Y.Y., Chen, T.T., Wilson, M.J., Pan, F., Wu, X., Rui, C., Chen, D.D., Tang, Q., Wu, W., Neupane, B.B., Jin, T., Gu, Z., Ligler, F.S., Wang, G., Литвинов, К., Zhai, J., Geng, X., Ding, T., Li, J., Tang, J., Chen, D.D., Cui, L., Wang, Q., 2019. Cardiovascular toxicity of decabrominated diphenyl ethers (BDE-209) and decabromodiphenyl ethane (DBDPE) in rats. *Environ. Int.* 135, 64–78. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3784-2>
- Crouch, R., Kimsey, G., Priest, D.G., Sarda, A., Buse, M.G., 1978. Effect of streptozotocin on erythrocyte and retinal superoxide dismutase. *Diabetologia* 15, 53–57. <https://doi.org/10.1007/BF01219329>
- D'Alterio, C., Scala, S., Sozzi, G., Roz, L., Bertolini, G., 2019. Paradoxical effects of chemotherapy on tumor relapse and metastasis promotion. *Semin. Cancer Biol.* 60, 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.019>
- Damsky, W.E., Theodosakis, N., Bosenberg, M., 2014. Melanoma metastasis: New concepts and evolving paradigms. *Oncogene* 33, 2413–2422. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.194>
- de Oliveira Júnior, R.G., Bonnet, A., Braconnier, E., Groult, H., Prunier, G., Beaugéard, L., Grougnet, R., da Silva Almeida, J.R.G., Ferraz, C.A.A., Picot, L., 2019. Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* 125, 549–561. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.013>
- de Wit, C.A., Herzke, D., Vorkamp, K., 2010. Brominated flame retardants in the

- Arctic environment - trends and new candidates. *Sci. Total Environ.* 408, 2885–2918. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.08.037>
- Domingues, B., Lopes, J., Soares, P., Populo, H., 2018. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther.* Volume 7, 35–49. <https://doi.org/10.2147/itt.s134842>
- Dornbos, P., Chernyak, S., Rutkiewicz, J., Cooley, T., Strom, S., Batterman, S., Basu, N., 2015. Hepatic polybrominated diphenyl ether (PBDE) levels in Wisconsin river otters (*Lontra canadensis*) and Michigan bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). *J. Great Lakes Res.* 41, 222–227. <https://doi.org/10.1016/J.JGLR.2014.12.023>
- Eguchi, A., Miyaso, H., Mori, C., 2016. The effects of early postnatal exposure to a low dose of decabromodiphenyl ether (BDE-209) on serum metabolites in male mice. *J. Toxicol. Sci.* 41, 667–675. <https://doi.org/10.2131/jts.41.667>
- English, K., Toms, L.M.L., Gallen, C., Mueller, J.F., 2016. BDE-209 in the Australian Environment: Desktop review. *J. Hazard. Mater.* 320, 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.032>
- EPA, 2008. Toxicological Review of Decabromodiphenyl Ether. Support Summ. Inf. Integr. Risk Inf. Syst. 1–126. <https://doi.org/http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0070tr.pdf>
- Espina, C., Straif, K., Friis, S., Kogevinas, M., Saracci, R., Vainio, H., Schüz, J., 2015. European Code against Cancer 4th Edition: Environment, occupation and cancer. *Cancer Epidemiol.* 39, S84–S92. <https://doi.org/10.1016/J.CANEP.2015.03.017>
- Faurobert, E., Bouin, A.P., Albiges-Rizo, C., 2015. Microenvironment, tumor cell plasticity, and cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 27, 64–70. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000154>
- Fearon, K.C., Voss, A.C., Hustead, D.S., 2006. Definition of cancer cachexia: Effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 1345–1350. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1345>
- Feng, Y., Hu, Q., Meng, G., Wu, X., Zeng, W., Zhang, X., Yu, Y., Wang, Y., 2015a. Simulating long-term occupational exposure to decabrominated diphenyl ether using C57BL/6 mice: Biodistribution and pathology. *Chemosphere* 128, 118–124. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2015.01.012>
- Feng, Y., Hu, Q., Meng, G., Wu, X., Zeng, W., Zhang, X., Yu, Y., Wang, Y., 2015b. Simulating long-term occupational exposure to decabrominated diphenyl ether using C57BL/6 mice: Biodistribution and pathology. *Chemosphere* 128, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.012>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F., 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* 144, 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Fernando Nunes da Silva, C., Pasqual Melo, G., Santos Bernardes, S., Armani Cecchini, A., 2013. Experimental models of in vivo murine melanoma. *Biosaúde* 15, 73–80.
- Ferrari de Andrade, L., Mozeleski, B., Leck, A.R., Rossi, G., da Costa, C.R.V., de Souza Fonseca Guimarães, F., Zotz, R., Fialho do Nascimento, K., Camargo de Oliveira, C., de Freitas Buchi, D., da Silva Trindade, E., 2016. Inhalation therapy with M1 inhibits experimental melanoma development and metastases in mice. *Homeopathy* 105, 109–118. <https://doi.org/10.1016/J.HOMP.2015.08.007>

- Fidler, M.M., Bray, F., Soerjomataram, I., 2018. The global cancer burden and human development: A review. *Scand. J. Public Health* 46, 27–36. <https://doi.org/10.1177/1403494817715400>
- Francia, G., Cruz-Munoz, W., Man, S., Xu, P., Kerbel, R.S., 2011. Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 11, 135–141. <https://doi.org/10.1038/nrc3001>
- Garcia-Mayea, Y., Mir, C., Masson, F., Paciucci, R., LLeonart, M.E., 2019. Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance. *Semin. Cancer Biol.* 60, 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.022>
- Gascon, M., Morales, E., Sunyer, J., Vrijheid, M., 2013. Effects of persistent organic pollutants on the developing respiratory and immune systems: A systematic review. *Environ. Int.* 52, 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.11.005>
- Giordano, G., Kavanagh, T.J., Costa, L.G., 2008. Neurotoxicity of a polybrominated diphenyl ether mixture (DE-71) in mouse neurons and astrocytes is modulated by intracellular glutathione levels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 161–168. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2008.06.018>
- Gomez-Cuadrado, L., Tracey, N., Ma, R., Qian, B., Brunton, V.G., 2017. Mouse models of metastasis: Progress and prospects. *DMM Dis. Model. Mech.* 10, 1061–1074. <https://doi.org/10.1242/dmm.030403>
- Han, X., Wang, Y., Chen, T., Wilson, M.J., Pan, F., Wu, X., Rui, C., Chen, D., Tang, Q., Wu, W., 2019. Inhibition of progesterone biosynthesis induced by decabrominated diphenyl ether (BDE-209) in mouse Leydig tumor cell (MLTC-1). *Toxicol. Vit.* 60, 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.05.016>
- Humphrey, K.M., Pandey, S., Martin, J., Hagoel, T., Grand'Maison, A., Ohm, J.E., 2019. Establishing a role for environmental toxicant exposure induced epigenetic remodeling in malignant transformation. *Semin. Cancer Biol.* 57, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.11.002>
- Hurley, S., Goldberg, D., Park, J.S., Petreas, M., Bernstein, L., Anton-Culver, H., Neuhausen, S.L., Nelson, D.O., Reynolds, P., 2019. A breast cancer case-control study of polybrominated diphenyl ether (PBDE) serum levels among California women. *Environ. Int.* 127, 412–419. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.043>
- Ji, X., Ding, J., Xie, X., Cheng, Y., Huang, Y., Qin, L., Han, C., 2017. Pollution Status and Human Exposure of Decabromodiphenyl Ether (BDE-209) in China. *ACS Omega* 2, 3333–3348. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00559>
- Jiang, Z.Y., Hunt, J. V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202, 384–389. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N)
- Jing, L., Sun, Y., Wang, Y., Liang, B., Chen, T., Zheng, D., Zhao, X., Zhou, X., Sun, Z., Shi, Z., 2019. Cardiovascular toxicity of decabrominated diphenyl ethers (BDE-209) and decabromodiphenyl ethane (DBDPE) in rats. *Chemosphere* 223, 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.115>
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., Leiserson, M.D.M., Miller, C.A., Welch, J.S., Walter, M.J., Wendl, M.C., Ley, T.J., Wilson, R.K., Raphael, B.J., Ding, L., 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333–339. <https://doi.org/10.1038/nature12634>
- Karagiannis, G.S., Condeelis, J.S., Oktay, M.H., 2018. Chemotherapy-induced metastasis: mechanisms and translational opportunities. *Clin. Exp. Metastasis*

- 35, 269–284. <https://doi.org/10.1007/s10585-017-9870-x>
- Kawashiro, Y., Fukata, H., Sato, K., Aburatani, H., Takigami, H., Mori, C., 2009. Polybrominated diphenyl ethers cause oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 28, 703–713. <https://doi.org/10.1177/0960327109350669>
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183–6188.
- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E., 2007. Evidence of debromination of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in biota from a wastewater receiving stream. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6663–6670. <https://doi.org/10.1021/es070728g>
- Lee, S., Kim, W.J., Jeon, Y., Lim, C.H., Sun, K., 2018. Specification of subject sex in oncology-related animal studies. *Acute Crit. Care* 33, 178–184. <https://doi.org/10.4266/acc.2017.00444>
- Leijds, M.M., Koppe, J.G., Olie, K., Van Aalderen, W.M.C., De Voogt, P., Ten Tusscher, G.W., 2009. Effects of dioxins, PCBs, and PBDEs on immunology and hematology in adolescents. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7946–7951. <https://doi.org/10.1021/es901480f>
- Li, Z.H., Liu, X.Y., Wang, N., Chen, J.S., Chen, Y.H., Huang, J.T., Su, C.H., Xie, F., Yu, B., Chen, D.J., 2012. Effects of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in regulation of growth and apoptosis of breast, ovarian, and cervical cancer cells. *Environ. Health Perspect.* 120, 541–546. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104051>
- Liang, Y., Zhang, H., Song, X., Yang, Q., 2019. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Semin. Cancer Biol.* 60, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.012>
- Liou, G.Y., Storz, P., 2010. Reactive oxygen species in cancer, *Free Radical Research*. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
- Liu, X., Zhan, H., Zeng, X., Zhang, C., Chen, D., 2012. The PBDE-209 exposure during pregnancy and lactation impairs immune function in rats. *Mediators Inflamm.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/692467>
- Ma, B., Wells, A., Clark, A.M., 2019. The pan-therapeutic resistance of disseminated tumor cells: Role of phenotypic plasticity and the metastatic microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* 60, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.021>
- Marchi, M., 2019. No Title Efeito do TCDD e BDE-209 na citotoxicidade e expressão de proteínas transportadoras ABC, MDR1, MDR5, MRP1, MRP2, MRP4 em linhagem de melanoma murino B16F10. Universidade Federal do Paraná.
- McIntyre, R.L., Kenerson, H.L., Subramanian, S., Wang, S.A., Kazami, M., Stapleton, H.M., Yeung, R.S., 2015. Polybrominated diphenyl ether congener, BDE-47, impairs insulin sensitivity in mice with liver-specific Pten deficiency. *BMC Obes.* 2, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40608-014-0031-3>
- Mierke, C.T., 2008. Role of the Endothelium during Tumor Cell Metastasis: Is the Endothelium a Barrier or a Promoter for Cell Invasion and Metastasis? *J. Biophys.* 2008, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2008/183516>
- Miller, K.D., Nogueira, L., Mariotto, A.B., Rowland, J.H., Yabroff, K.R., Alfano, C.M., Jemal, A., Kramer, J.L., Siegel, R.L., 2019. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* 69, 363–385. <https://doi.org/10.3322/caac.21565>
- Milovanovic, V., Buha, A., Matovic, V., Curcic, M., Vucinic, S., Nakano, T.,

- Antonijevic, B., 2018. Oxidative stress and renal toxicity after subacute exposure to decabrominated diphenyl ether in Wistar rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 7223–7230. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5921-5>
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology*. 2014 Apr 1;27:16-25. *Curr Opin Immunol* 27, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>.New
- Montalbano, A.M., Albano, G.D., Anzalone, G., Moscato, M., Gagliardo, R., Di Sano, C., Bonanno, A., Ruggieri, S., Cibella, F., Profita, M., 2020. Cytotoxic and genotoxic effects of the flame retardants (PBDE-47, PBDE-99 and PBDE-209) in human bronchial epithelial cells. *Chemosphere* 245. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125600>
- MORCK, A., 2003. Decabromodiphenyl ether in the rats-absorption, distribution, metabolism and excretion. *Drug Metab. Dispos.* 31, 900–908.
- Neupane, B.B., Jin, T., Gu, Z., Ligler, F.S., Wang, G., 2018. Polybrominated diphenyl ethers perturb axonal growth and actin distribution. *Bibechana* 16, 64–78. <https://doi.org/10.3126/bibechana.v16i0.21103>
- Orr, F.W., Wang, H.H., Lafrenie, R.M., Scherbarth, S., Nance, D.M., 2000. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J. Pathol.* 190, 310–329. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(200002\)190:3<310::AID-PATH525>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<310::AID-PATH525>3.0.CO;2-P)
- Peng, C., Chen, X., 2018. CD147 Is a Novel Chemotherapy or Prevention Target in Melanoma. *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.* 19, S91–S93. <https://doi.org/10.1016/j.jisp.2018.10.001>
- Pereira, L.C., Souza, A.O., Tasso, M.J., Oliveira, A.M.C., Duarte, F. V., Palmeira, C.M., Dorta, D.J., 2017. Exposure to decabromodiphenyl ether (BDE-209) produces mitochondrial dysfunction in rat liver and cell death. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* 80, 1129–1144. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1357370>
- Pourahmad, J., Amirmostofian, M., Kobarfard, F., Shahraki, J., 2009. Biological reactive intermediates that mediate dacarbazine cytotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65, 89–96. <https://doi.org/10.1007/s00280-009-1007-8>
- Qu, R., Li, C., Pan, X., Zeng, X., Liu, J., Huang, Q., Feng, J., Wang, Z., 2017. Solid surface-mediated photochemical transformation of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in aqueous solution. *Water Res.* 125, 114–122. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2017.08.033>
- Quail, D.F., Joyce, J.A., 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 19, 1423–1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>
- Renaud, H.J., Cui, J.Y., Khan, M., Klaassen, C.D., 2011. Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome p450 mRNAs in mice. *Toxicol. Sci.* 124, 261–277. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr240>
- Reuter, S., Gupta, S., Chaturvedi, M., Bharat aggarval, 2011. Oxidative stress, inflammation, and cancer. *Free Radic Biol Med* 49, 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.Oxidative
- Rice, D.C., Reeve, E.A., Herlihy, A., Thomas Zoeller, R., Douglas Thompson, W., Markowski, V.P., 2007. Developmental delays and locomotor activity in the C57BL6/J mouse following neonatal exposure to the fully-brominated PBDE, decabromodiphenyl ether. *Neurotoxicol. Teratol.* 29, 511–520. <https://doi.org/10.1016/J.NTT.2007.03.061>
- Robichaud, N., Sonenberg, N., Ruggero, D., Schneider, R.J., 2019. Translational

- control in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032896>
- Rocha-Gutiérrez, B.A., Peralta-Pérez, M. del R., Zavala-Díaz de la Serna, F.J., 2015. Revisión global de los contaminantes emergentes PBDE y el caso particular de México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 31, 311–320.
- Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J.M., 2013. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 2721–2725. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>
- Schechter, A., Pavuk, M., Pöpke, O., Ryan, J.J., Birnbaum, L., Rosen, R., 2003. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in U.S. mothers’ milk. *Environ. Health Perspect.* 111, 1723–1729. <https://doi.org/10.1289/ehp.6466>
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman’s reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)
- Severo, 2017. Análise de biomarcadores em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos in situ como uma ferramenta de avaliação ambiental. Universidade federal de santa maria.
- Shibue, T., Weinberg, R.A., 2017. EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, 611–629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>
- Sjödin, A., Pöpke, O., McGahee, E., Focant, J.-F., Jones, R.S., Pless-Mulloli, T., Toms, L.-M.L., Herrmann, T., Müller, J., Needham, L.L., Patterson, D.G., 2008. Concentration of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in household dust from various countries. *Chemosphere* 73, S131–S136. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2007.08.075>
- Skvortsova, I., 2019. Special Issue “Enigmatic tumor properties associated with metastatic spread” seminars in cancer biology, volume XX. *Semin. Cancer Biol.* 60. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.10.021>
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., LLeonart, M.E., 2013. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res. Rev.* 12, 376–390. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>
- Sperduto, P.W., Yang, T.J., Beal, K., Pan, H., Brown, P.D., Bangdiwala, A., Shanley, R., Yeh, N., Gaspar, L.E., Braunstein, S., Sneed, P., Boyle, J., Kirkpatrick, J.P., Mak, K.S., Shih, H.A., Engelman, A., Roberge, D., Arvold, N.D., Alexander, B., Awad, M.M., Contessa, J., Chiang, V., Hardie, J., Ma, D., Lou, E., Sperduto, W., Mehta, M.P., 2017. Estimating survival in patients with lung cancer and brain metastases an update of the graded prognostic assessment for lung cancer using molecular markers (Lung-molGPA). *JAMA Oncol.* 3, 827–831. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.3834>
- Steil, G., 2016. Efeitos do TCDD (2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-P-dioxina) e BDE-209 (Decabromodifenil éter) na malignidade de células de melanoma murino B16F1 in vitro. Universidad Federal do Paraná.
- Sudhakar, A., 2009. *J Cancer Sci Ther* 1, 1–4. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2.History>
- SUN, R.B., SHANG, S., ZHANG, W., LIN, B.C., WANG, Q., SHI, Y., XI, Z.G., 2018. Endocrine Disruption Activity of 30-day Dietary Exposure to Decabromodiphenyl Ethane in Balb/C Mouse. *Biomed. Environ. Sci.* 31, 12–22. <https://doi.org/10.3967/bes2018.002>
- Tagliaferri, S., Caglieri, A., Goldoni, M., Pinelli, S., Alinovi, R., Poli, D., Pellacani, C., Giordano, G., Mutti, A., Costa, L.G., 2010. Low concentrations of the brominated

- flame retardants BDE-47 and BDE-99 induce synergistic oxidative stress-mediated neurotoxicity in human neuroblastoma cells. *Toxicol. Vitro*. 24, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.08.020>
- Tawbi, H.A., Kirkwood, J.M., 2007. Management of Metastatic Melanoma. *Semin. Oncol.* 34, 532–545. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINONCOL.2007.09.008>
- Trinh, V.A., 2008. Current management of metastatic melanoma. *Am. J. Heal. Pharm.* 65, 3–9. <https://doi.org/10.2146/ajhp080460>
- Vaccher, V., Ingenbleek, L., Adegboye, A., Epiphane, S., Zié, A., Dada, A., Sika, C., Kisito, K.J., Koreissi, Y., Hu, R., Adbel, I., Cariou, R., Vénisseau, A., Veyrand, B., Marchand, P., Eyangoh, S., Verger, P., Dervilly-pinel, G., 2020. Levels of persistent organic pollutants (POPs) in foods from the first regional Sub-Saharan Africa Total Diet Study. *Environ. Int.* 135, 105413. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105413>
- Vagula, M.C., Kubeldis, N., Nelatury, C.F., 2011. Effects of BDE-85 on the Oxidative Status and Nerve Conduction in Rodents. *Int. J. Toxicol.* 30, 428–434. <https://doi.org/10.1177/1091581811411109>
- Vaiopoulos, A.G., Kostakis, I.D., Gkioka, E., Athanasoula, K.C., Pikoulis, E., Papalambros, A., Christopoulos, P., Gogas, H., Kouraklis, G., Koutsilieris, M., 2014. Detection of circulating tumor cells in colorectal and gastric cancer using a multiplex PCR assay. *Anticancer Res.* 34, 3083–3092.
- Vosoughi, E., Lee, J.M., Miller, J.R., Nosrati, M., Minor, D.R., Abendroth, R., Lee, J.W., Andrews, B.T., Leng, L.Z., Wu, M., Leong, S.P., Kashani-Sabet, M., Kim, K.B., 2018. Survival and clinical outcomes of patients with melanoma brain metastasis in the era of checkpoint inhibitors and targeted therapies. *BMC Cancer* 18, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4374-x>
- Wang, Y., Sun, Y., Chen, T., Shi, Z., Zhou, X., Sun, Z., Zhang, L., Li, J., 2018. Determination of polybrominated diphenyl ethers and novel brominated flame retardants in human serum by gas chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1099, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.015>
- WebMD, 2020. Chemotherapy: How It Works and How You'll Feel [WWW Document]. URL <https://www.webmd.com/cancer/chemotherapy-what-to-expect#1> (accessed 2.23.20).
- Wu, J., Wu, D., Zhang, L., Lin, C., Liao, J., Xie, R., Li, Z., Wu, S., Liu, A., Hu, W., Xi, Y., Bu, S., Wang, F., 2019. NK cells induce hepatic ER stress to promote insulin resistance in obesity through osteopontin production. *J. Leukoc. Biol.* 1–8. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MA1119-173R>
- Xu, L., Huo, X., Zhang, Y., Li, W., Zhang, J., Xu, X., 2015. Polybrominated diphenyl ethers in human placenta associated with neonatal physiological development at a typical e-waste recycling area in China. *Environ. Pollut.* 196, 414–422. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2014.11.002>
- Zhai, J., Geng, X., Ding, T., Li, J., Tang, J., Chen, D., Cui, L., Wang, Q., 2019. An increase of estrogen receptor α protein level regulates BDE-209-mediated blood-testis barrier disruption during spermatogenesis in F1 mice. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 4801–4820. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3784-2>
- Zhang, W., Gao, J., Cheng, C., Zhang, M., Liu, W., Ma, X., Lei, W., Hao, E., Hou, X., Hou, Y., Bai, G., 2020. Cinnamaldehyde enhances antimelanoma activity through covalently binding ENO1 and exhibits a promoting effect with dacarbazine. *Cancers (Basel)*. 12, 1–15. <https://doi.org/10.3390/cancers12020311>

- Zhi, H., Wu, J.P., Lu, L.M., Li, Y., Chen, X.Y., Tao, J., Mai, B.X., 2018. Decabromodiphenyl ether (BDE-209) enhances foam cell formation in human macrophages via augmenting Toll-like receptor 4-dependent lipid uptake. *Food Chem. Toxicol.* 121, 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.024>
- Zhu, Y., Li, X., Liu, J., Zhou, G., Yu, Y., Jing, L., Shi, Z., Zhou, X., Sun, Z., 2019. The effects of decabromodiphenyl ether on glycolipid metabolism and related signaling pathways in mice. *Chemosphere* 222, 849–855. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.003>

CAPITULO II: EXPOSIÇÃO ORAL DE BDE-209 AFETA O TRATAMENTO DE DACARBAZINA EM CAMUNDONGOS C57BL/6 APÓS INOCULAÇÃO DE CÉLULAS B16F10

Nesse capítulo apresentamos os resultados na forma de manuscrito obtidos com os experimentos correspondentes à Fase II do projeto. O manuscrito será submetido para a revista *Environmental International* (FI=7,9) em 05/2020

Introduction

Human exposure to environment toxicants has been a worldwide issue but is still challenging to extrapolate data to human population. According to Humphrey et al., (2019) the main reasons are the variability of exposure routes, complexity of the mixtures, biotransformation and metabolic processing or human lifestyle. A high diversity of toxicants is described in the modulation of DNA damage posing a potential allow for cell proliferation, but how chemicals may favor the progression of cancer is not investigated.

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are a class of synthetic brominated chemicals introduced in 1970s as flame retardants to a large variety of plastic products (EPA, 2008). Decabromodiphenyl ether (BDE-209) is spread throughout in the environment representing more than 90% of the total daily intake of PBDEs (Ji et al., 2017). According to Sjödin et al., (2008) these compounds can easily migrate from the combined products and prevailing in the atmosphere, sediments, soil or domestic dust (La Guardia et al., 2007) and accumulate in the food chain due to its high lipophilicity and environmental persistency (de Wit et al., 2010). Studies in Africa showed that BDE-209 is present in eggs, fish, meat, milk, nuts, oils and others foods (Cristale et al., 2019) showing that the human exposure is mainly by food or domestic dust ingestion, already detected in blood, semen, adipose tissue, breast milk, umbilical cord blood and placental tissues (Besis et al., 2014a; Giordano et al., 2008; Li et al., 2012).

BDE-209 can induce hepatotoxicity (Wang et al., 2018; Zhu et al., 2019), thyroid (Sun et al., 2018) and cardiovascular dysfunction (Cristale et al., 2019), bronchial epithelial cells damage (Montalbano et al, 2020) or progesterone secretion attenuation (Han et al., 2019). In addition, the carcinogenic potential of PBDEs has been described (Aschebrook-Kilfoy et al., 2015; Costa and Giordano, 2011), although

they have not been evaluated for carcinogenicity by the International Agency for Research on Cancer, IARC (Hurley et al., 2019). Hurley et al. (2019) detected 2.6 to 14.1 ng/g of PBDE in blood lipids of a women population in California with breast cancer historical, but they suggest no relation of PBDEs with breast cancer risk. Additionally, malignancy related traits such as proliferation, migration and gene expression of ABC-Cassette family carriers (ABCB1, ABCB5, ABCC1, ABCC2 and ABCC4) are modulated by BDE-209 under realistic levels of exposure (De Marchi et al. 2020).

Melanoma is one of the most aggressive and lethal type of cancer in the world. According to Peng and Chen, (2018), there are about 140,000 new cases diagnosed annually and approximately 50,000 deaths per year. Metastatic melanoma is associated with poor prognosis, median survival of 6 and 9 months and 5-year survival of 15% (Trinh, 2008). The conventional treatment for melanoma uses the alkylating agents as Dacarbazine (de Oliveira Júnior et al., 2019; Zhang et al., 2020), which was approved by the FDA in 1975 (Tawbi and Kirkwood, 2007). Dacarbazine inhibits DNA synthesis by acting as a purine analogue alkylating agent or making interaction with SH groups (Pourahmad et al., 2009). It leads to methylation of DNA bases inducing cell death mainly via apoptosis (Christmann et al., 2011).

In the current study we investigated the effects of BDE-209 in mice injected with B16F10 murine melanoma cells and treated with dacarbazine. This approach was used to address whether BDE-209 can interfere with melanoma treatment and lead to a poorer prognosis. This was based on the observation that BDE-209 exposure can increase the incidence of melanoma metastases in different organs of mice injected with B10F10 cells (submitted data).

Material and Methods

Experimental Design

The experimental design was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation at Federal University of Parana (certificate no. #1040/2017). Seven week old C57BL/6 mice (50 males and 50 females) were maintained 4 animals per cage) and received gavages with either water (controls), corn oil (vehicle) or BDE-209 ($0.8 \mu\text{g.Kg}^{-1}$) every 5 days for 45 days (nine doses). Then, all the mice were injected with B16F10 cells (2.5×10^5 in 100 μL of PBS) via caudal vein. Beginning at

47th day they race 66th day mice from one of the control groups and one BDE-209 exposed groups were treated with 40mg/kg of Dacarbazine every 5 days (six doses, intraperitoneal injections). The experiment was performed with a total of five groups (>10 animals per group): control (without gavage), vehicle (gavage with corn oil), dacarbazine (gavage with water and treatment with dacarbazine), BDE-209 (gavage with BDE-209) and BDE-209+dacarbazine (gavage with BDE-209 and treatment with dacarbazine). Finally, at 76th day, the mice were anesthetized and euthanized (10 mg.kg⁻¹ of xylazine, 100 mg.kg⁻¹ of ketamine), and the blood, lung, liver and kidney were weighed and sampled for the analyses.

B16F10 mouse melanoma cells (American Type Culture Collection - Manassas, USA) (Giavazzi and Garofalo, 2001) were cultured in DMEM (Lonza Bio Whittaker - Basel, Switzerland) culture medium, supplement with 0.1M of HEPES (Lonza Bio Whittaker) and gentamicin (50µl/L) and fetal bovine serum (10%). Mycoplasma contamination was routinely tested.

Procedures to blood Analysis

Blood was sampled via intracardiac route and a complete blood cells counting (CBC) was performed (total leukocytes, red blood cells, hemoglobin, hematocrit, platelets, segmented, stems, eosinophil, and lymphocytes) (Veterinary Clinical Pathology Laboratory at Federal University of Parana). The plasma was centrifuged (3,000g for 10 min) and utilized for biochemical profile determination (alanine aminotransferase-ALT, aspartate aminotransferase-AST, alkaline phosphatase, cholesterol, triglycerides, creatinine, and urea) using a Mindray BS-200.

Procedures for biochemical biomarkers

Lung, liver and kidney were sampled and stored at -82°C. Then, 0.2g of each organ were homogenized in 2 mL of Tris-buffer (20 mM HCl, 0.1 M EDTA, 1 mM PMSF, pH 7.4) and centrifuged at 12,000 g (4°C) for 30 min. The supernatant was recovered and the total protein concentration was determined according to Bradford (1976).

Non-protein thiols (NPT) was measured in supernatants after protein precipitation with 10% trichloroacetic acid and centrifugation (1,000 x g for 15 min and 4°C). Supernatant (50 µL) and 230 µL of Tris (0.4 M, pH 8.9) were placed in a 96-well microplate, followed by addition of 20 µL of 2.5 mM DTNB [5, 5'-dithiobis (2-

nitrobenzoic acid) in 25% methanol]. Absorbances were determined at 415 nm and NPT concentration was calculated by comparison with the standard curve for GSH (Sedlak and Lindsay, 1968).

Superoxide Dismutase (SOD) activity was measured in supernatants (1.0 mg protein/mL) after addition of ethanol (1:5) and new centrifugation (9,000 g, 4°C for 30 min). Supernatant (20 µL) and 35 µL of 572 µM NBT chloride in 0.1 mM EDTA were mixed in a 96-well microplate. The reaction was initiated through addition of 145 µL of 51 mM hydroxylamine chloride in 0.5 M sodium carbonate (pH 10.2). The reduction of NBT by $O_2^{\cdot-}$ to blue formazan was measured spectrophotometrically as a constant increase of absorbance at 560 nm for 30 min. The rate of NBT reduction in the absence of sample was used as the reference rate. One unit of SOD was defined as the enzymatic activity able to inhibit the reduction of NBT to 50% of the reference rate (Crouch et al., 1981).

Catalase activity was measured in supernatants (1.0 mg protein/mL). Supernatant (10 µL) was mixed with reaction medium (290 µL, 20 mM H_2O_2 , 50 mM Tris-base, 0.25 mM EDTA, pH 8.0, 25°C) in UV-star™ 96-well microplates (Greiner Bio-One) and absorbance decrease was immediately measured at 240 nm for 1 min. Molar extinction coefficient for H_2O_2 of $40 M^{-1}.cm^{-1}$ was used to calculate catalase activity (Aebi, 1984).

Glutathione S-transferase (GST) was measured in supernatants (1.0 mg protein/mL). Supernatant (50 µL) was placed in 96-well microplate, immediately followed by reaction medium (100 µL, 1.5 mM GSH (glutathione), 2.0 mM CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene), 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.5). Absorbance increase was measured at 340 nm for 2 min and the molar extinction coefficient for CDNB of $9.6 mM^{-1}.cm^{-1}$ was used to calculate the activity (Keen et al., 1976).

Lipid peroxidation (LPO) was measured by ferrous oxidation-xylenol (FOX) assay (Jiang et al., 1991, 1992). From cell homogenates, 50 µL were separated for protein quantification and to the remaining volume (450 µL), an equal volume of methanol was added. After centrifugation (1,000 g for 10 min at 4°C), 30 µL of supernatant and 270 µL reaction solution (0.1 mM xylenol orange, 25 mM H_2SO_4 , 4.0 mM BHT (butylated hydroxytoluene) and 0.25 mM $FeSO_4.NH_4$ (ammonium ferrous sulfate) in 90% methanol) were mixed in a 96-well microplate. Samples were incubated at room temperature for 30 min, centrifuged (1,000 g, room temperature for 5 min), 250 µL of supernatant were added to 96-well microplates and absorbance

was measured at 570 nm. To determine the hydroperoxides concentration, the apparent molar extinction coefficient for H₂O₂ and cumene hydroperoxide of 4.3x10⁴ M⁻¹.cm⁻¹ was used.

Integrated response of biochemical biomarkers (RIB)

The data from biomarkers corresponding to tested doses and control group were firstly transformed to logarithm to reduce the variance. These data (Y_i), the mean (μ) and standard deviation (s) were calculated from all analyzed samples. The formula $Z_i = (Y_i - \mu)/s$ was applied for each treatment, with the difference between the treated and control group was used to obtain the value of A (corresponding to the integrated result for each biomarker) (Beliaeff and Burgeot, 2002; modified by Sanchez et al., 2013). Then, these results were plotted on a radar-type graph, where values above and below zero (control) indicate the stimulus and inhibition of a given biomarker, respectively. Finally, to calculate the RIB index from each experimental group, the values of A were converted in absolute numbers (S) and added together according to Severo (2017).

Histological procedures

The target organ (lung) was chemically preserved in paraformaldehyde aquatic solution (4%), pH 7.2 – 7.4 for 4 h and washed in alcohol (70%). Then samples were dehydrated in ethanol graded series, diaphanized in xylol and embedded in Paraplast Plus resin (Merck® - Darmstadt, Germany). The samples of tissue from five individuals from each studied group were processed in cuts of 5 μm thickness and stained with Hematoxylin-Eosin. The images were obtained using motorized Axio Imager Z2 epifluorescence microscope (Carl Zeiss, Jena, DE), equipped with an automated scanning Metafer 4/VSlide (Metasystems, Altlusheim, DE) for metastasis analyzes.

Statistical procedures

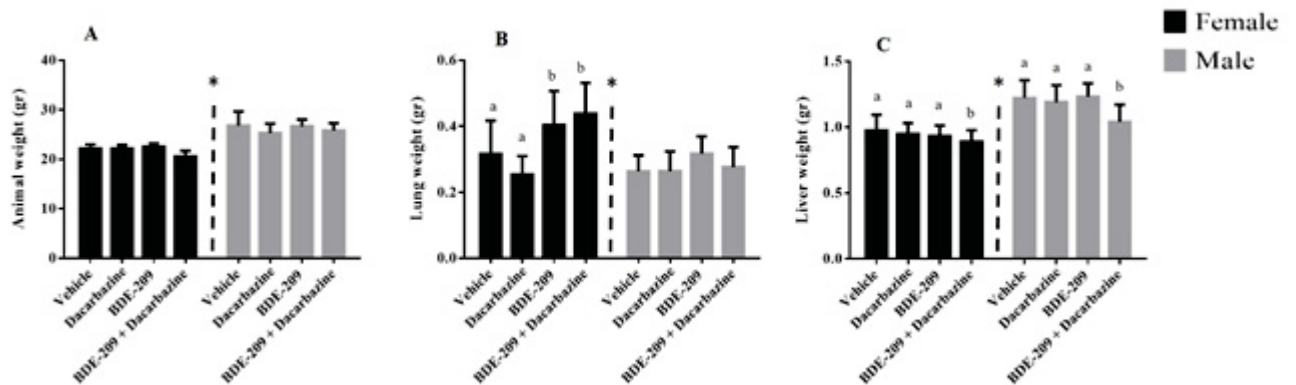
The control and vehicle groups were compared using the Test t and there were no statistical differences between them, so that only the vehicle group is shown in the results. For all comparisons, two-way ANOVA was performed, considering sex and treatment, with posterior Tukeys tests. Comparisons between treatments by sex were performed using ANOVA with Tukeys as posteriori test.

Results

Animal health conditions

According to biometric parameters, the total body and liver weight were higher in male individuals than females (Figure 14A, 14C), but the opposite occurred for lung weight (Figure 14B). Exposure to BDE-209, with and without treatment with dacarbazine, had no effects on body weight (Figure 14A), but led to increases of lung weight in female mice (Figure 14B). Conversely, exposure to BDE-209 followed by treatment with dacarbazine led to decreases of liver weight in both male and female mice (Figure 14C).

FIGURA 14. BIOMETRIC ANALYSIS OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.

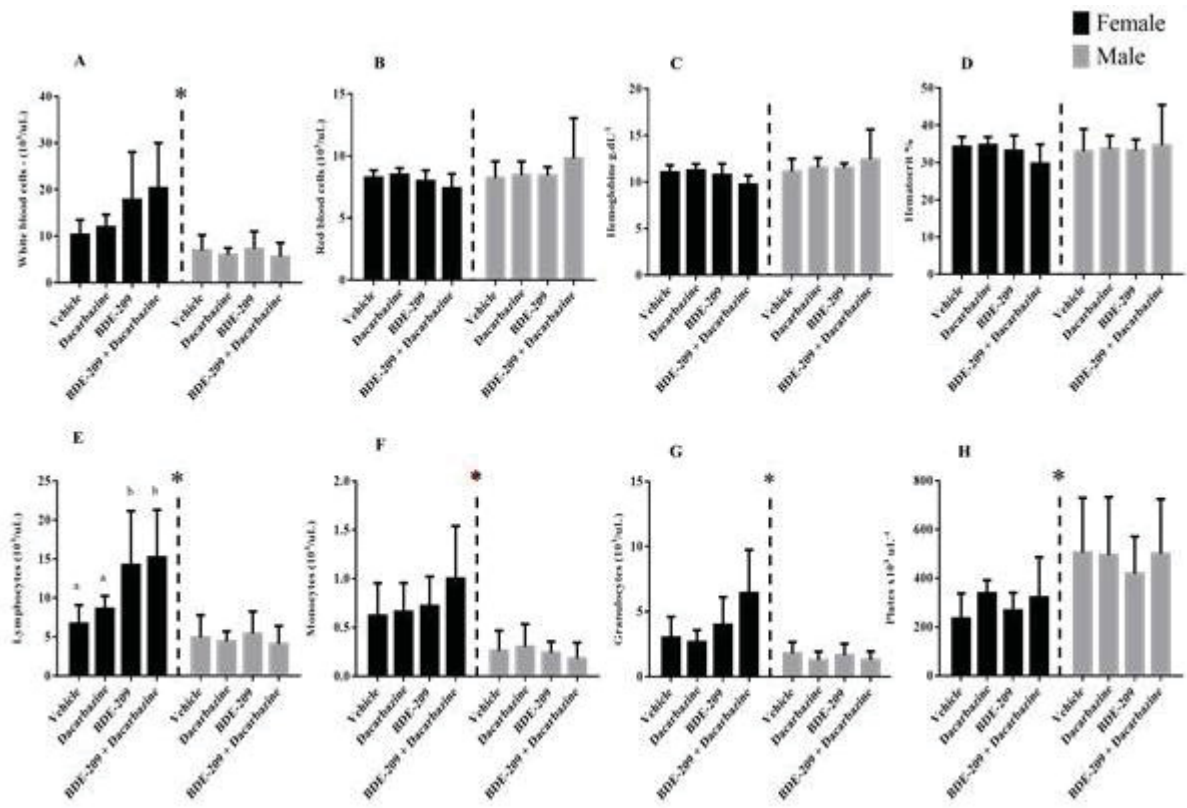


FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: (A) BODY WEIGHT, (B) LUNG WEIGHT AND (C) LIVER WEIGHT. ANOVA, $P < 0.05$. * INDICATES DIFFERENCES BETWEEN SEX, WHILE DIFFERENT LETTERS INDICATE DIFFERENCES BETWEEN TREATMENTS.

For the blood analyses, sex difference was observed, with higher number of white blood cells, lymphocytes, monocytes, and granulocytes in females and platelets in males, without effects of exposure to BDE-209 (Figure 15). However, exposure to BDE-209, with and without treatment with dacarbazine, led to increases of the number of lymphocytes in females, but not in male mice (Figure 15E).

FIGURA 15. BLOOD ANALYSES OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.

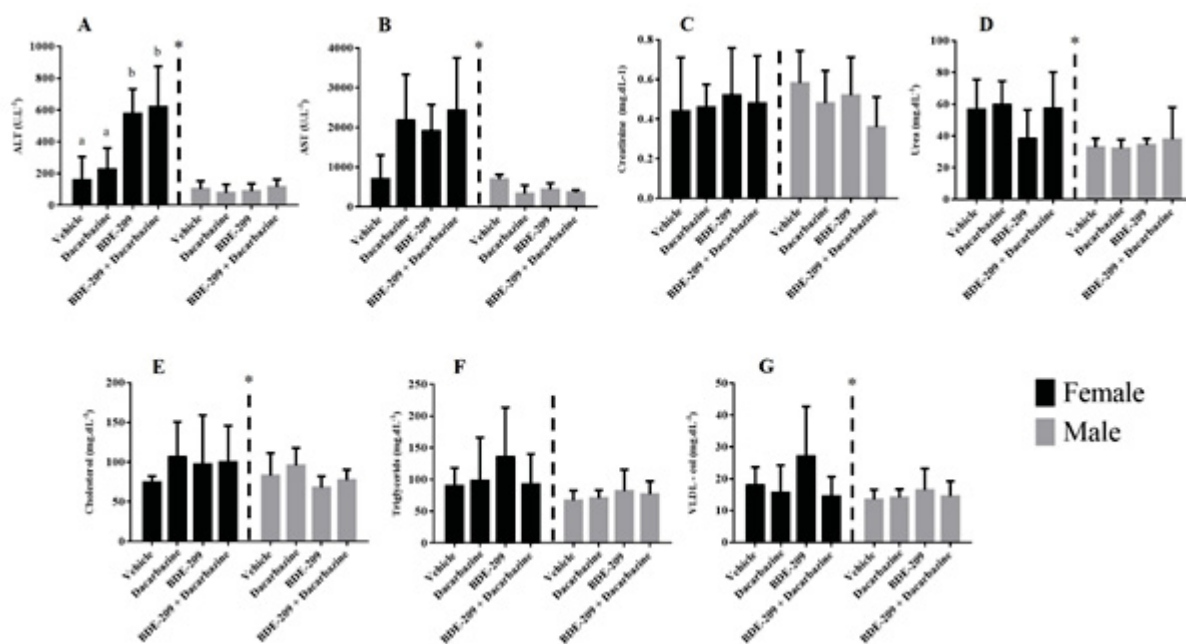


FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: (A) WHITE BLOOD CELLS, (B) RED BLOOD CELLS, (C) HEMOGLOBIN, (D) HEMATOCRIT, (E) LYMPHOCYTES, (F) MONOCYTES, (G) GRANULOCYTES, (H) PLATELETS. ANOVA, $P < 0.05$. * INDICATES DIFFERENCES BETWEEN SEX, WHILE LETTERS INDICATE DIFFERENCES BETWEEN TREATMENTS.

The biochemical profile of the blood showed increases of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activity, urea, cholesterol and VLDL-cholesterol levels in the female individuals comparatively to males (Figure 16). For the treatments, ALT activity was higher in female individuals exposed to BDE-209, with and without treatment with dacarbazine (Figure 16A). For the other blood biochemical parameters, there was no effects of BDE-209 and dacarbazine (Figure 16).

FIGURA 16. BIOCHEMICAL PROFILE OF THE BLOOD OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.



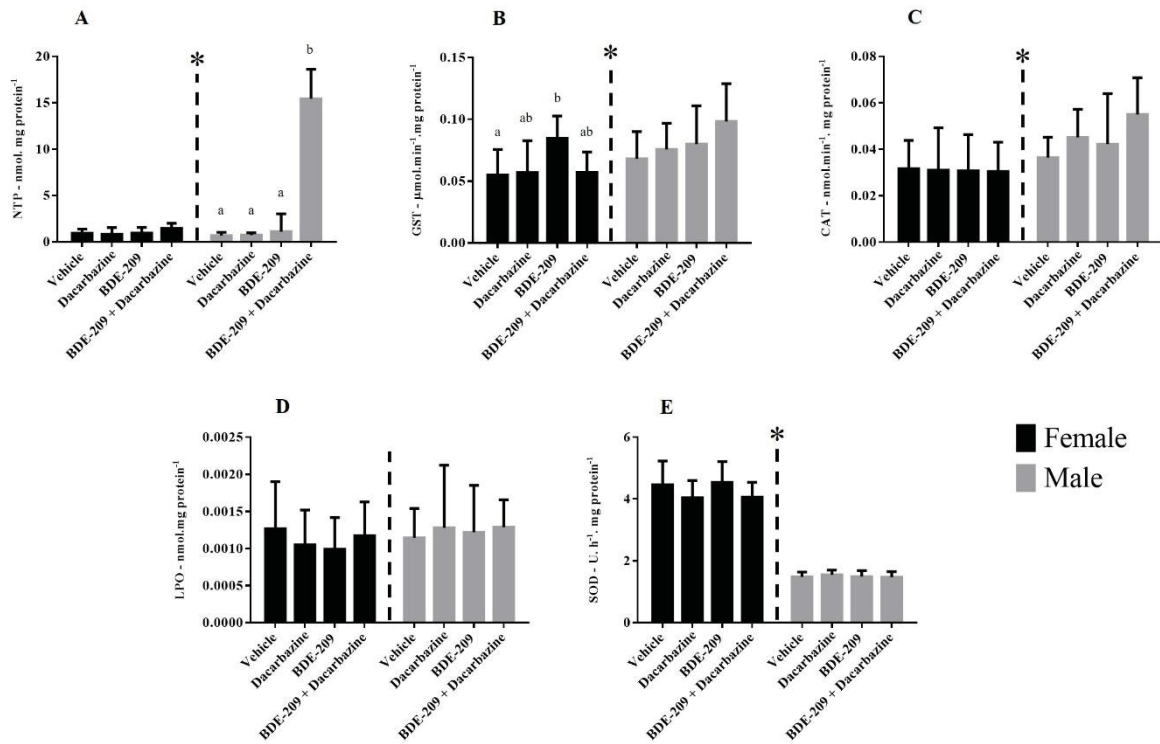
FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: (A) ALANINE AMINOTRANSFERASES, ALT, (B) ASPARTATE AMINOTRANSFERASES, AST, (C) CREATININE, (D) UREA, (E) CHOLESTEROL, (F) TRIGLYCERIDES, (G) VERY LOW-DENSITY LIPOPROTEINS (VLDL-COL). ANOVA, P < 0.05. * INDICATES DIFFERENCES BETWEEN SEX, WHILE LETTERS INDICATE DIFFERENCES BETWEEN TREATMENTS.

Biochemical parameters

For the lung, exposure to BDE-209 and dacarbazine had no effects on superoxide and catalase activities, and lipid peroxidation (Figure 17). However, higher concentration of non-protein thiols was observed in male mice exposed to BDE-209 and treated with dacarbazine (Figure 17A). Likewise, glutathione S-transferase activity was higher in female mice exposed to BDE-209 than the vehicle (Figure 17B). Male and female mice had differences for all biochemical parameters, except for lipid peroxidation (Figure 17).

FIGURA 17. BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN THE LUNG C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.

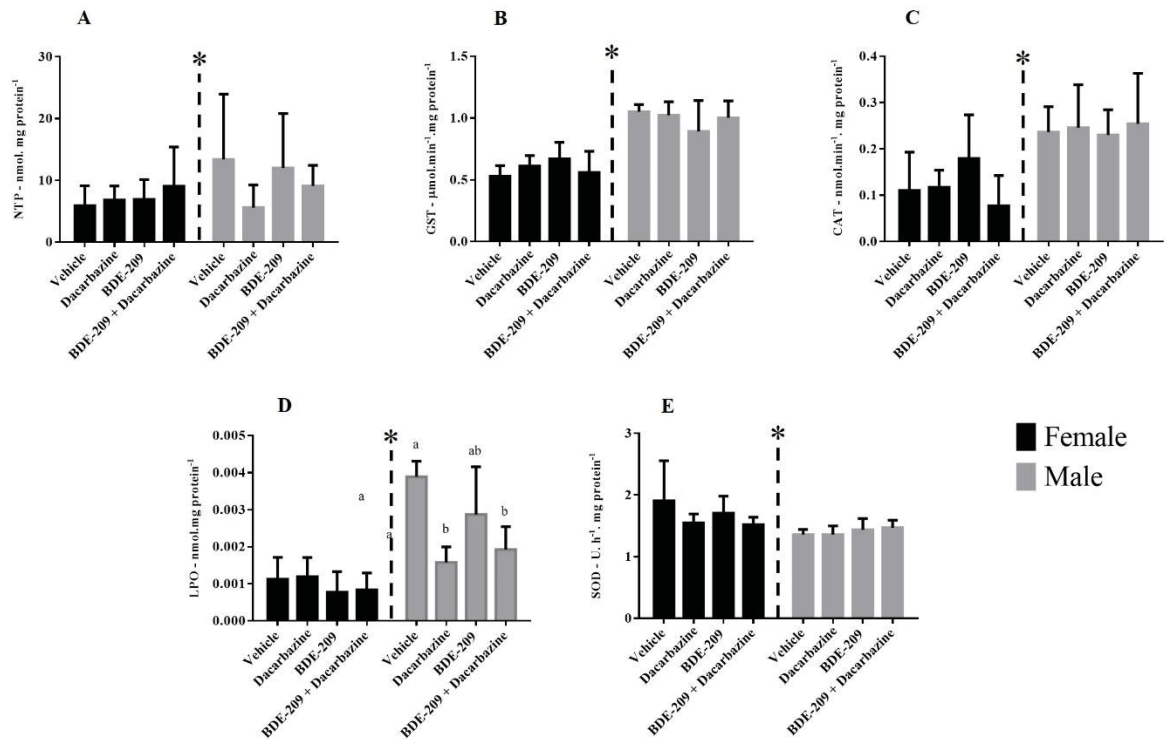


FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: (A) NON-PROTEIN THIOLS, (B) GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ACTIVITY, (C) CATALASE ACTIVITY, (D) LIPID PEROXIDATION, (E) SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) ACTIVITY. ANOVA, P<0.05. * INDICATES DIFFERENCES BETWEEN SEX, WHILE DIFFERENT LETTERS INDICATE DIFFERENCES BETWEEN TREATMENTS.

For the liver, dacarbazine and BDE-209 exposure followed by dacarbazine treatment led to decreased lipid peroxidation in male mice (Figure 18D), whereas no effects were observed for non-protein thiols, superoxide dismutase, catalase and glutathione S-transferase activities (Figure 18). Male and female mice had differences for all biochemical parameters (Figure 18).

FIGURA 18. BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN THE LIVER OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.

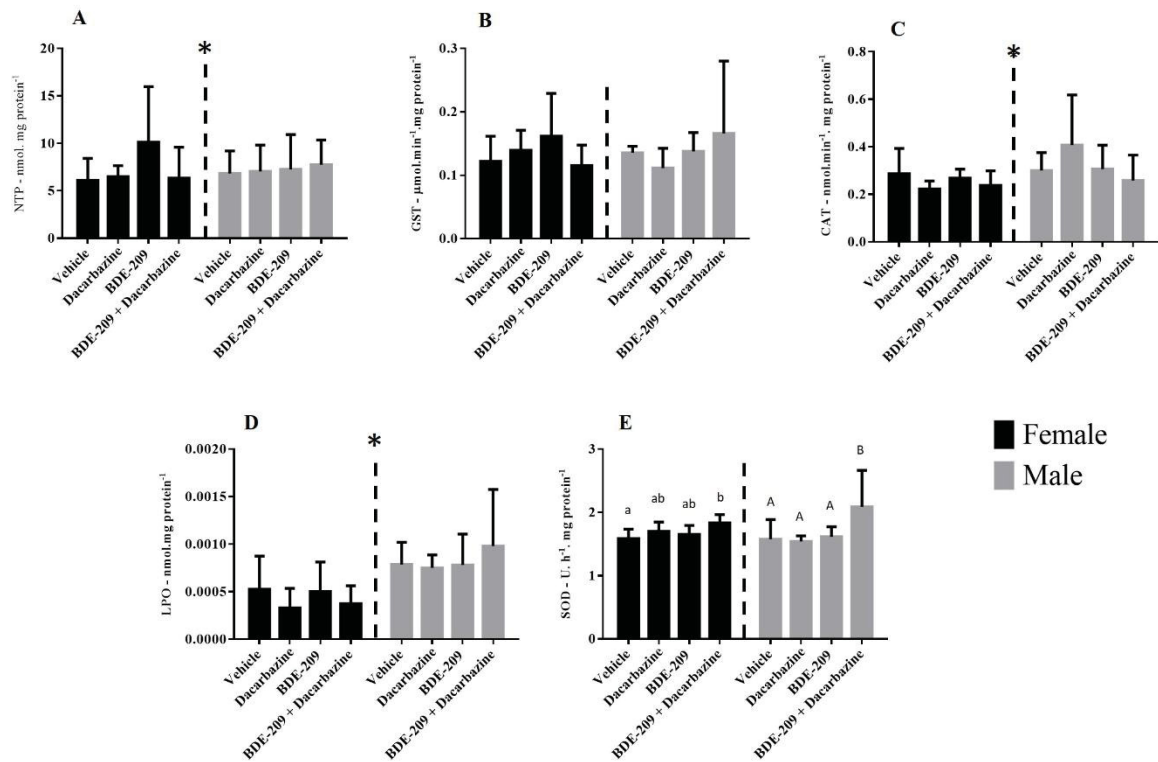


FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: (A) NON-PROTEIN THIOLS, (B) GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ACTIVITY, (C) CATALASE ACTIVITY, (D) LIPID PEROXIDATION, (E) SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD). ANOVA, $P < 0.05$. * INDICATES DIFFERENCES BETWEEN SEX, WHILE DIFFERENT LETTERS INDICATE DIFFERENCES BETWEEN TREATMENTS.

For the kidney, exposure to BDE-209 followed by treatment with dacarbazine led to increase of superoxide dismutase activity in both male and female mice (Figure 19E), whereas no effects were observed for non-protein thiols, lipid peroxidation, catalase and glutathione S-transferase activities (Figure 19). Male and female mice had differences for non-protein thiols, lipid peroxidation and catalase activity (Figure 19).

FIGURA 19. BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN THE KIDNEY OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.

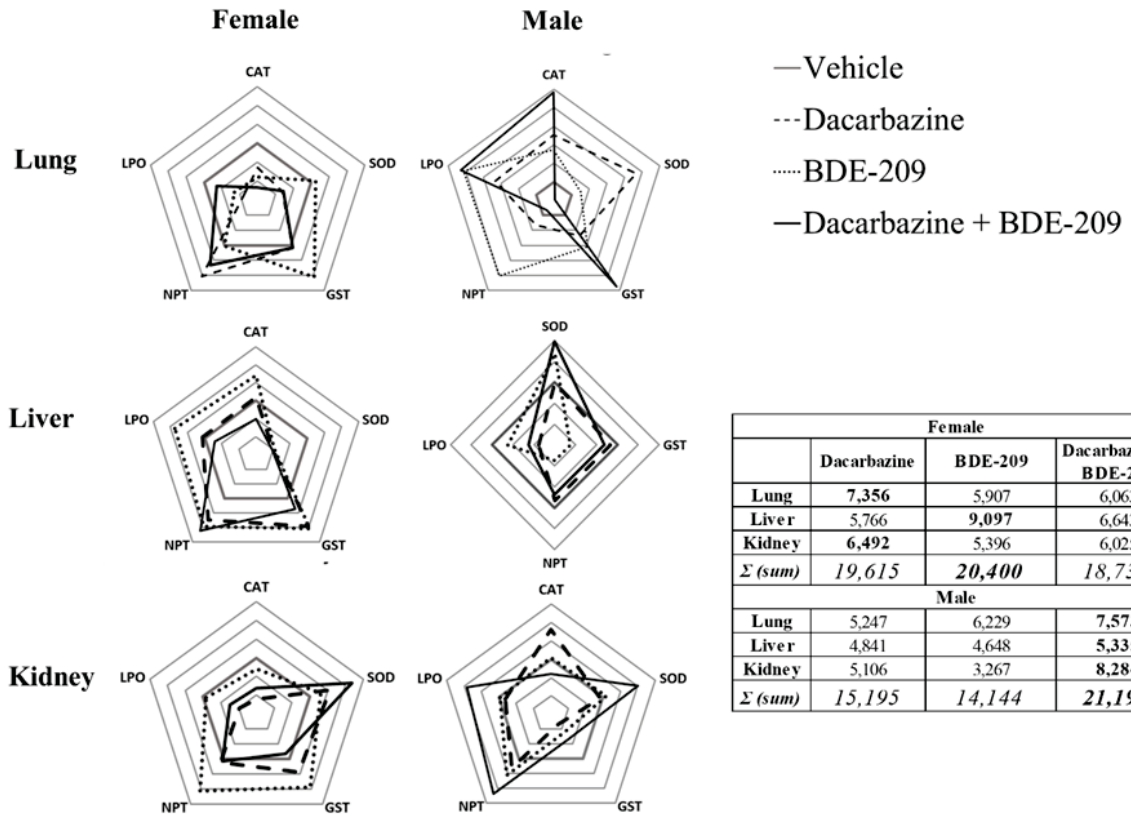


FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: (A) NON-PROTEIN THIOLS, (B) GLUTATHIONE S-TRANSFERASE ACTIVITY, (C) CATALASE ACTIVITY, (D) LIPID PEROXIDATION, (E) SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD). ANOVA, P <0.05. * INDICATES DIFFERENCES BETWEEN SEX, WHILE DIFFERENT LETTERS INDICATES DIFFERENCES BETWEEN TREATMENTS.

The integration of biochemical biomarkers (RIB) showed that the lung, liver and kidney of male individuals were more affected by BDE-209 exposure followed by dacarbazine treatment, while the lung and kidney were more affected by dacarbazine treatment and the liver by BDE-209 exposure in female mice (Figure 20).

FIGURA 20. INTEGRATED DATA (RIB) OF BIOCHEMICAL BIOMARKERS IN THE LUNG, LIVER AND KIDNEY OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.

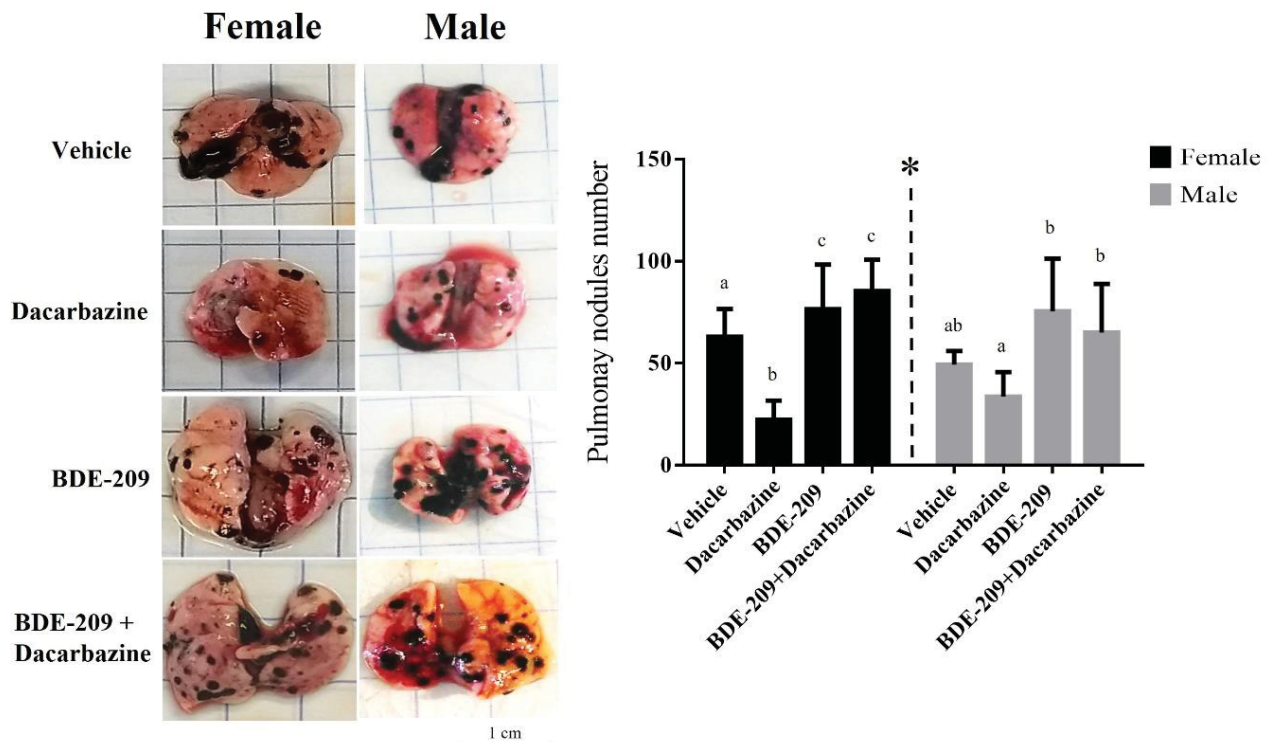


FONTE: O Autor (2020).

Metastasis nodules

The number of pulmonary nodules was higher in female mice than males, and in mice exposed to BDE-209 (Figure 21). Dacarbazine treatment was efficient in reducing the number of metastasis nodules, particularly in female mice (Figure 21). However, the prior and concomitant exposure to BDE-209 can impair the treatment with dacarbazine, completely blocking the benefits of the treatment, as observed by the higher number of metastases in BDE-209+dacarbazine groups in comparison to dacarbazine group (Figure 21).

FIGURA 21. METASTASIS NODULES (BLACK SPOTS) OBSERVED IN THE LUNG OF C57BL/6 MICE EXPOSED TO BDE-209, INJECTED WITH B16F10 CELLS AND TREATED WITH DACARBAZINE.

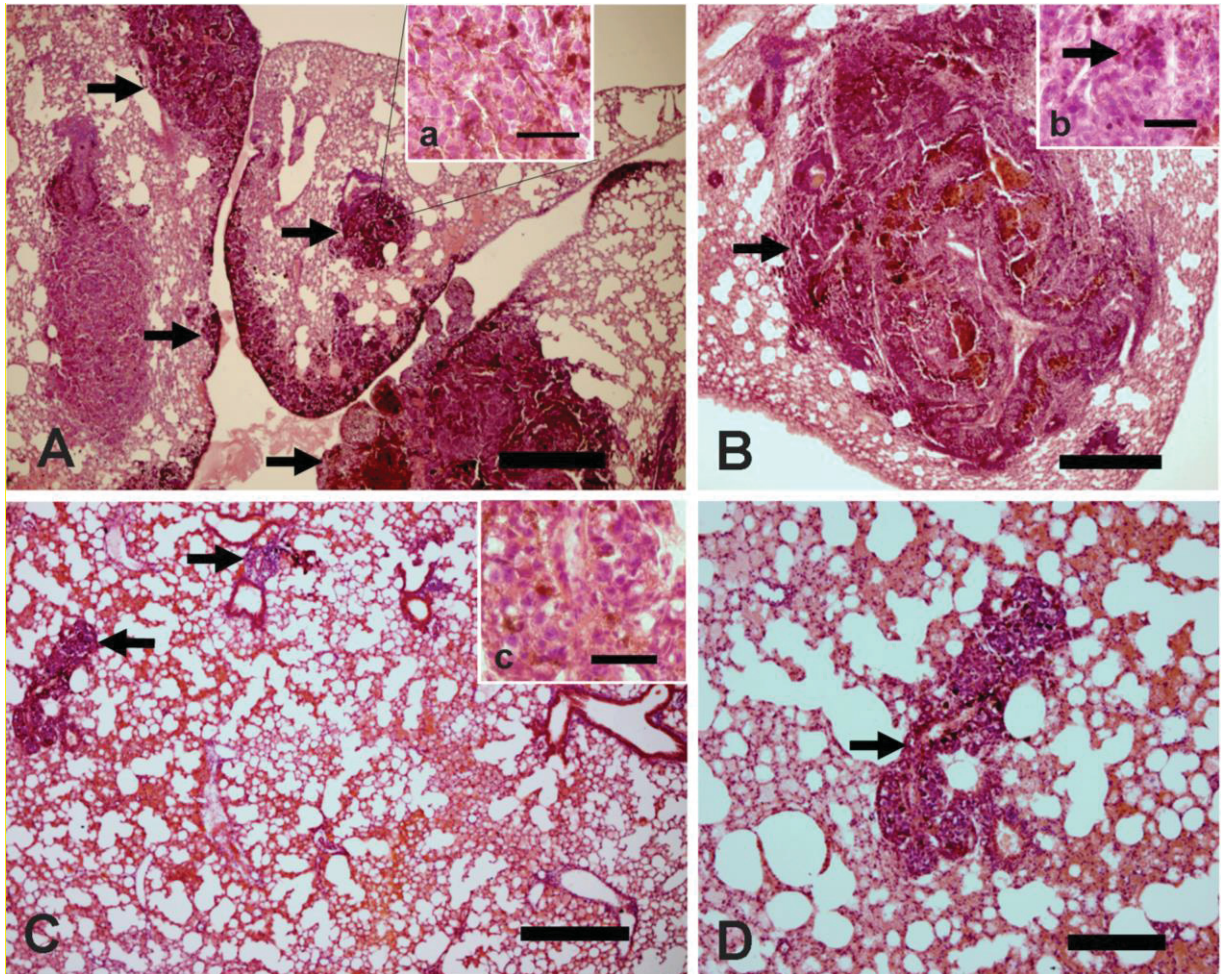


FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: (A) IMAGENS OF PULMONARY NODULES IN THE LUNG AND (B) QUANTIFICATION OF PULMONARY NODULES. ANOVA, $P < 0.05$. * INDICATES DIFFERENCES BETWEEN SEX, WHILE LETTERS INDICATE DIFFERENCES BETWEEN TREATMENTS.

The histological analyzes showed tumors in lung of all individuals from the studied groups, located in the periphery and internally in the organ. The frequency of tumors in lung of individuals treated with dacarbazine was clearly lower comparatively with the other experimental groups (Figures 22C and D) as control and vehicle that present a well-developed tumor (Figures 22A and B). Comparatively the condition of tumors is more developed in individuals from control and vehicle groups (Figures 22a and b), but very different of tumors observed in individuals treated with dacarbazine, showing cells less actives and morphologically distinct (Figure 22c).

FIGURA 22. LUNG CROSS SECTIONS OF MICE C57BL/6 INOCULATED WITH B16F10 CELLS WITHOUT TREATMENT (A) AND TREATED WITH VEHICLE (B) AND DACARBAZINE (C AND D).

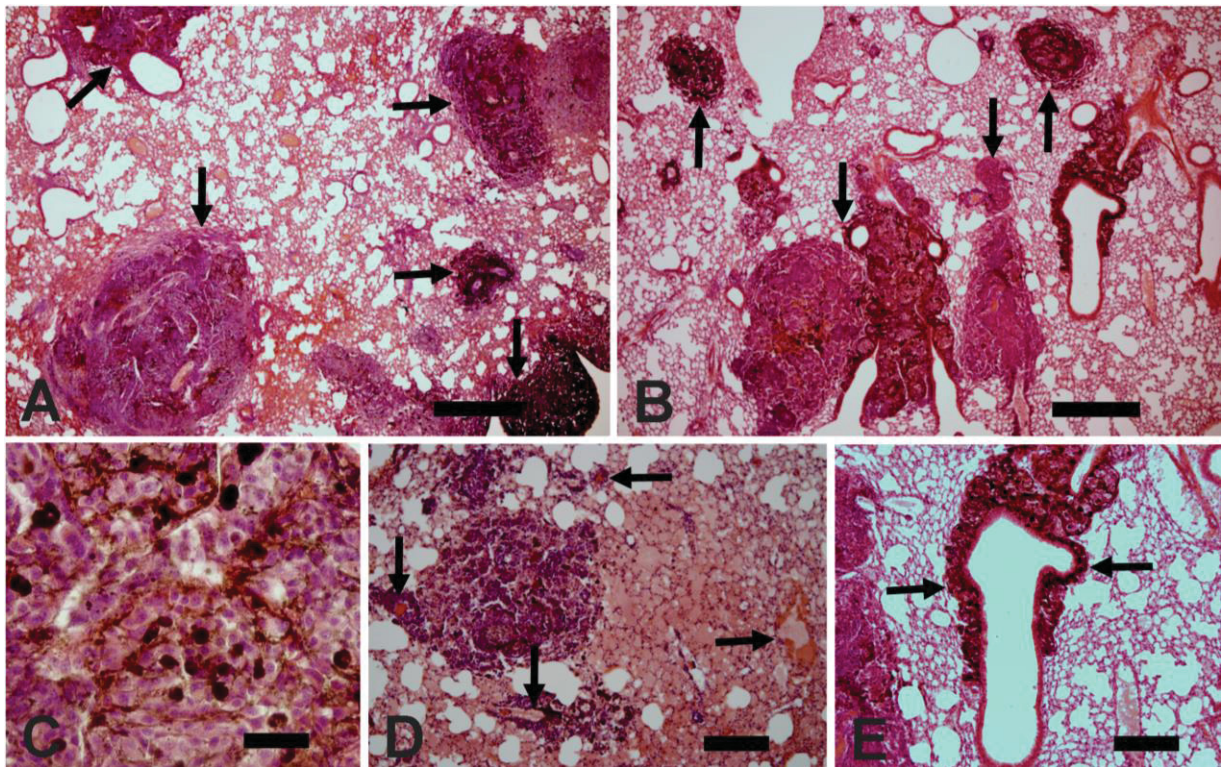


FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: A AND B. THE CELLULAR ASPECT OF TUMOR (ARROWS) FROM CONTROL AND VEHICLE GROUPS RESPECTIVELY. C AND D. ANIMALS TREATED WITH DACARBAZINE SHOWING A SIGNIFICANT DECREASE OF TUMORS (ARROWS). IN DETAIL THE CELLULAR ASPECT OF TUMORS. A, B AND C SCALE BAR = 500µM; D SCALE BAR = 200 µM; a, b AND c SCALE BAR = 50 µM. HEMATOXYLIN AND EOSIN STAIN.

The lungs of animals chronically pre-treated with BDE-209 showed a large number of pulmonary nodules, at different stages of development, but most of them are well developed (Figures 23A and B). In addition, multiple blood vessels were observed in the peripheries of the tumors seen in all sections (Figures 23D and E).

FIGURA 23. LUNG CROSS SECTIONS OF MICE C57BL/6 CHRONICALLY EXPOSED TO BDE-209 AND INOCULATED WITH B16F10 CELLS.

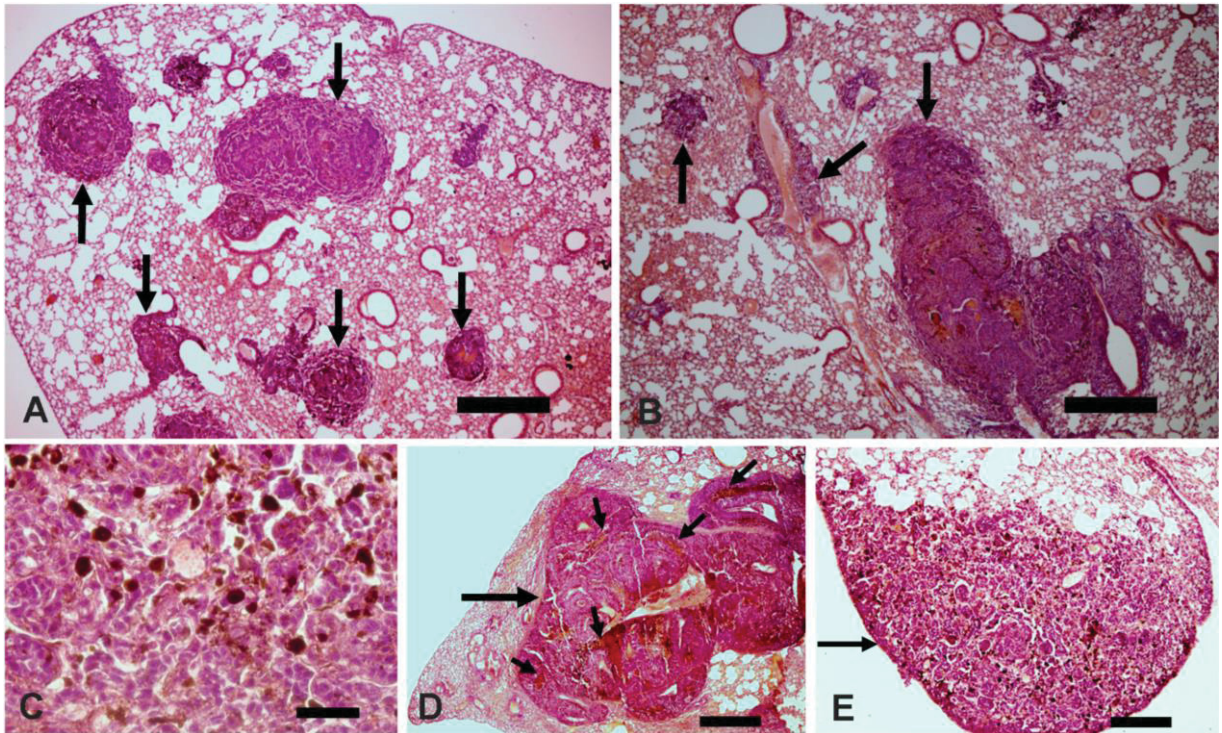


FONTE: O Autor (2020).

LEGENDA: A AND B, SHOW AN OVERVIEW OF TUMORS IN DIFFERENT STAGES OF DEVELOPMENT (ARROWS). SCALE BAR = 500 μ M. IN (C). SHOW A DETAIL OF TUMOR ORGANIZATION, OBSERVE THE HIGH INCIDENCE OF MELANOCYTIC (BROWN CELLS). SCALE BAR = 50 μ M. IN (D) IS OBSERVED THE PRESENCE OF BLOOD AND VESSELS AROUND THE TUMOR (ARROWS). SCALE BAR = 500 μ M; WHILE IN (E) THE DEVELOPMENT OF TUMOR AROUND THE VESSEL IS OBSERVED (ARROWS). SCALE BAR = 200 μ M. HEMATOXYLIN AND EOSIN STAIN.

The lungs of animals pre-exposed with the BDE-209 and posteriorly treated with dacarbazine showed a higher numbers of lung nodules and tumors in different stages of development, presenting a well irrigated tissue with blood vessels (Figures 24A and B), where curiously the chemotherapy effect is not observed. These tumors show many melanomas cells inside (Figure 24C), and a very well-developed tumors are present in lung of individuals from this group (Figures 24D and E).

FIGURA 24. LUNG CROSS SECTIONS FROM MICE C57BL/6 CHRONICALLY EXPOSED TO BDE-209, INOCULATED WITH B16F10 CELLS AND POSTERIORLY TREATED WITH DACARBAZINE.



FONTE: O Autor (2020).

LEGEND: THE PICTURES A AND B SHOW THE OCCURRENCE OF TUMORS IN DIFFERENT STAGES OF DEVELOPMENT (ARROWS). SCALE BAR = 500 μ M. IN (C) IS OBSERVED A DETAIL OF TUMOR ORGANIZATION. OBSERVE THE INCIDENCE OF MELANOCYTIC (BROWN CELLS). SCALE BAR = 50 μ M. D. SHOW THE OCCURRENCE OF A WELL-DEVELOPED TUMOR (ARROWS). SCALE BAR = 500 μ M; WHILE IN (E) IS OBSERVED A WELL DEVELOPED PERIFHERICAL NODULE (ARROW). SCALE BAR = 200 μ M. HEMATOXYLIN AND EOSIN STAIN.

Discussion

It is well described that both the health of patients and environmental conditions can modulate the development of the cancer, but no studies reported yet the role of pollutants in cancer prognosis or their effects on cancer treatment efficacy. Previously (Manuitt-Brito et. al. 2020) was demonstrated an increase of metastatic spread of melanoma in the brain, liver and gonads of C57BL/6 mice exposed to BDE-209. These findings represent a novelty in terms of PBDEs toxicity mainly if related with the treatment of cancer disease. Here, we described for the first time that exposure to low doses of BDE-209 can impair the chemotherapy treatment with dacarbazine in mice, favoring the cancer development. This finding reveals new clinical conditions that must be more investigated.

In the current study, the biometric parameters, blood cell counting and blood biochemical profile indicate generally good experimental conditions and homogeneity of health conditions of the tested animals. In addition, the data revealed that low doses of BDE-209 exposure and Dacarbazine treatment were not able to pose visible and significant health effects. The lung mass is an estimated parameter to evaluate the degree of commitment of the lung by metastases in the caudal injection of tumor cells model (Ferrari de Andrade et al., 2016). Although Crawford, (2018) described a decrease of lung weight after treatment with dacarbazine in mice, which was not confirmed in the current study, female individuals exposed to BDE-209 and BDE-209 + dacarbazine showed an increase of lung weight comparatively to Dacarbazine and vehicle groups. These results may be associated with the higher number of tumor nodules, as well as a pro-inflammatory condition in the organ, may corroborate an increase of white blood cells counting and lymphocyte number in individuals exposed to BDE-209. Indeed, a signaling cascade of pro-inflammatory factors and edema in the organ (Fearon et al., 2006) could explain these differences. Conversely, decrease of liver weight was observed only in the BDE-209 + Dacarbazine groups. According to Feng et al., (2015b) the weight of liver increased after 2-year exposure to a thousand higher dose of BDE-209 in C57BL/6 mice, but we did not observe these effects at realistic dose utilized in the current study (0.8 mg.kg^{-1}). The liver metabolizes organic compounds and this condition could be affected by BDE-209 exposure, as observed by the increased ALT activity in the blood.

Redox unbalance may explain many cell effects including a pro-inflammatory state that may favor inflammation-associated diseases, including cancer (Montalbano

et al., 2020). According to Giordano et al. (2008), Tagliaferri et al. (2010) and Vagula et al. (2011), PBDEs exposure is known to generate *in vitro* and *in vivo* oxidative stress and consequent tissue damage due to a pro-oxidant state of cells. In the present study, the lung, liver and kidney did not suffer a pro-oxidant condition after exposure to BDE-209 and treatment with dacarbazine, with only punctual alterations of some antioxidants and lipid peroxidation biomarkers. One consequence of oxidative stress is an induction of pro-inflammatory cytokines and chemokines secretion (Chiurchiù and MacCarrone, 2011). According to Reuter et al., (2010) and Sosa et al., (2013), the inflammation can favor the cancer progression mainly in the initial steps by a pro-tumoral modulation in the tumor microenvironment. Although this was not a condition observed in here, no pro-inflammatory markers were evaluated to test this hypothesis.

The integration of the biochemical biomarkers related to redox unbalance revealed the susceptibility of different organs of mice exposed to BDE-209 and sex differences. According to RIB analysis, BDE-209 exposure affected mainly the liver of female mice, and the lung and kidney of males. Additionally, the results revealed that the combination BDE-209 + dacarbazine led to harsher effects on male organs. The use of integrative analysis such as RIB is appropriated only if the physiological significance of the changes is well-known a priori (Beliaeff and Burgeot, 2002), and it revealed that the *in vivo* studies with C57BL/6 mice model must consider both male and female animals and inform it during publications, as highlighted by Lee et al., (2018).

The development of metastases in the lung was easily quantifiable. Each tumor nodule found is considered as an independent tumor or metastasis (Ferrari de Andrade et al., 2016). The present study shows that BDE-209 can interfere with the development of metastasis in C57BL/6 mice after injection of B16F10 cells, increasing the incidence of number of metastasis in lung. This effect was more prominent in female mice. How BDE-209 can favor the metastatic spread of melanoma cells is still an open question. Recently we demonstrated that the role of BDE-209 exposure in inflammatory condition, immunomodulation and protein adhesion expression should be considered as routes of investigation (submitted data). According to Zhai et al., (2019) BDE-209 can induce the expression of estrogen receptor α (ER α) in a time- and concentration-dependent manner. Additionally, Oliveira Júnior et al., (2019) described that PBDEs exposure is a risk for

breast cancer in women population of California, highlighting the estrogenic role of brominated compounds, a very favorable condition also to melanoma development.

Chemotherapy treatment with dacarbazine decreased the number of tumor nodules in the lung, but it was more effective in female than male mice. In principle, sex differences in the drug toxicokinetics and differences in the tumor microenvironment may affect the sensitivity of tumor cells for the treatment (Skvortsova, 2019). Indeed, dacarbazine is a pro-drug that is bioactivated in humans by CYP1A1, CYP1A2 and CYP2E1 (Reid *et al.*, 1999), and there are differences in the expression of many CYPs between male and female mice (Renaud *et al.*, 2011). In addition, many anticancer drugs, including methotrexate, paclitaxel, fluorouracil, capecitabine, gemcitabine, topotecan, and etoposide have sex differences in their clearance (Huang *et al.*, 2007, Wang & Huang, 2007). Foremost, BDE-209 not only favored the metastatic spread of melanoma in the lung of mice (i.e. increased number of tumor nodules), but it impaired dacarbazine beneficial effects on metastatic melanoma treatment. On this way, two highlights are important to consider, the role of BDE-209 on cancer prognosis and the higher sensitivity of female mice to Dacarbazine treatment and effects of BDE-209. These findings are of high concern for clinical treatment of cancer and confirm that human life style is vital for cancer treatment efficacy.

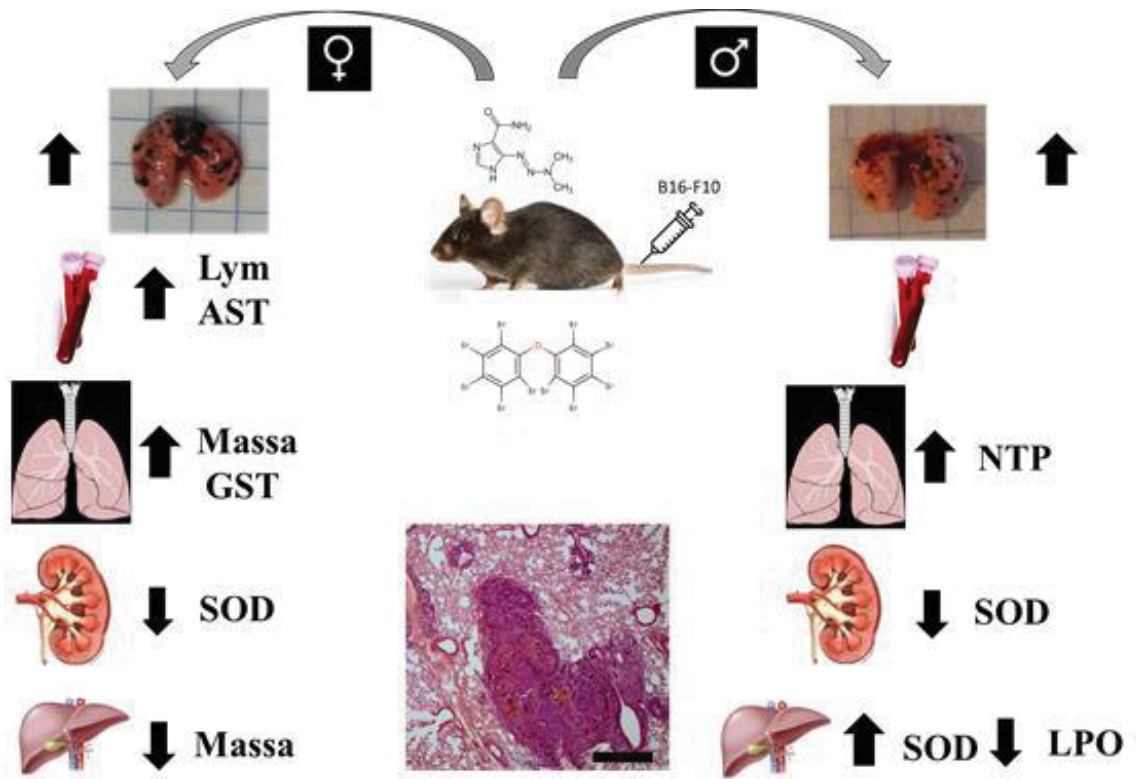
The histological analyzes showed how the lungs of animals treated with dacarbazine showed fewer tumors and less developed tumors, due to apoptotic and antiangiogenic effects (Soengas & Lowe, 2003; Triozzi, *et. al.* 2012). The animals pretreated with BDE-209 showed larger lung tumors in the same time that the exposure lead to a diversity of developed tumors differently from observed in control of vehicle groups. These tumors showed many melanocytic cells and a well-developed blood vessel around them, also not evident in control groups. The tumors observed in control groups are well-developed while that observed in pretreated individuals with BDE-209 were found different stages of development. These findings revealed that the brominated pollutant can modulate the intensity of tumors in the lung of mice. However, the animals pre-treated with BDE-209 and then with dacarbazine presented a greater number of tumors with similar characteristic of that observed to individuals exposed to BDE-209 but not treated with dacarbazine. The high amount of blood vessels seems to indicate that pre-exposure to BDE-209 leads to changes in the pre-tumor environment and so modifying the antiangiogenic effect

of dacarbazine, described by Triozzi, et. al. (2012). On this way the histological findings confirm internally the results observed externally in lung of tested groups.

Concluding, at least three aspects should be investigated to explain the role of BDE-209 in the melanoma treatment with Dacarbazine: (i) phenotypic changes of melanoma cells with increased malignancy due to BDE-209 exposure, (ii) toxicological interactions with activation/inactivation of biochemical pathways related to toxicokinetics of dacarbazine by BDE-209, and (iii) immune modulation by BDE-209. The first aspect has been recently investigated (data not published) and was observed alterations on the expression of metalloproteinases and their inhibitors (TIMPs), or in the activity of ABC-cassette protein family, responsible for the efflux of xenobiotics, in B16F1 melanoma cells exposed to BDE-209 *in vitro*.

Overall, we showed that BDE-209 can increase the number of metastasis nodules in the lung of mice and impair the chemotherapy treatment with Dacarbazine, including important sex differences between male and female mice. These findings are particularly important because human population is exposed to BDE-209 through different routes, such as the dust or food, so that BDE-209 has been detected in the human blood, breast milk and umbilical cord. The current results showed that the risk of pollutants to increase cancer progression and impair chemotherapy treatment in human population should not be neglected.

FIGURA 25. ILLUSTRATION OF THE CONCLUSIONS OF THE ARTICLE, SHOWING THE EFFECTS ON BLOOD, LIVER, LUNG AND OTHER TISSUES.



Fonte: A autora (2020).

LEGEND: O PAPEL DO BDE-209 É EVIDENTE DIMINUINDO O SUCESSO DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO COM DACARBAZINA, SENDO QUE ESSE EFEITO É MAIS PROEMINENTE EM GRUPOS FÊMEAS QUE EM GRUPOS MACHOS.

References

- Aebi, H., 1974. Catalase. *Methods Enzym. Anal.* 673–684. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3>
- Almeida, A.S., Faleiros, A.C.G., Teixeira, D.N.S., Cota, U.A., Chica, J.E.L., 2008. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 44, 429–432. <https://doi.org/10.1590/s1676-24442008000600006>
- Arrangoiz, R., 2016. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. *J. Cancer Treat. Res.* 4, 1. <https://doi.org/10.11648/j.jctr.20160401.11>
- Aschebrook-Kilfoy, B., Dellavalle, C.T., Purdue, M., Kim, C., Zhang, Y., Sjodin, A., Ward, M.H., 2015. Polybrominated diphenyl ethers and thyroid cancer risk in the prostate, colorectal, lung, and ovarian cancer screening trial cohort. *Am. J. Epidemiol.* 181, 883–888. <https://doi.org/10.1093/aje/kwu358>
- Ayuko Hoshino, Bruno Costa-Silv, Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Mark, M.T., Molina, H., Kohsaka, S., Giannatale, A. Di, Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplol, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A.E., Ararso, Y., Zhang, T., Zhang, H., Hernandez, J., Weiss, J.M., Dumont-Cole, V.D., Kramer, K., Wexler, L.H., Narendran, A., Schwartz, G.K., Healey, J.H., Sandstrom, P., Labori, K.J., Kure, E.H., Grandgenett, P.M., Hollingsworth, M.A., Sousa, M. de, Kaur, S., Jain, M., Mallya, K., Batra, S.K., Jarnagin, W.R., Brady, M.S., Fodstad, O., Muller, V., Pantel, K., Minn, A.J., Bissel, M.J., Garcia, B.A., Kang, Y., Rajasekhar, V.K., Ghajar, C.M., Matei, I., Peinado, H., Bromberg, J., Lyden, D., 2015. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329–335. <https://doi.org/doi:10.1038/nature15756>. Tumour
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1316–1322. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>
- Bersini, S., Jeon, J.S., Moretti, M., Kamm, R.D., 2014. In vitro models of the metastatic cascade: from local invasion to extravasation. *Drug Discov. Today* 19, 735–742. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.12.006>
- Besis, A., Katsoyiannis, A., Botsaropoulou, E., Samara, C., 2014a. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in central air-conditioner filter dust and relevance of non-dietary exposure in occupational indoor environments in Greece. *Environ. Pollut.* 188, 64–70. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2014.01.021>
- Besis, A., Katsoyiannis, A., Botsaropoulou, E., Samara, C., 2014b. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in central air-conditioner filter dust and relevance of non-dietary exposure in occupational indoor environments in Greece. *Environ. Pollut.* 188, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.021>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cai, Y., Zhang, W., Hu, J., Sheng, G., Chen, D., Fu, J., 2011. Characterization of maternal transfer of decabromodiphenyl ether (BDE-209) administered to pregnant Sprague–Dawley rats. *Reprod. Toxicol.* 31, 106–110. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2010.08.005>
- Chiurchiù, V., MacCarrone, M., 2011. Chronic inflammatory disorders and their redox control: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants Redox Signal.* 15, 2605–2641. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3547>

- Christmann, M., Verbeek, B., Roos, W.P., Kaina, B., 2011. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: Enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1816, 179–190. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2011.06.002>
- Clark, W.H., Elder, D.E., Guerry, D., Braitman, L.E., Trock, B.J., Schultz, D., Synnestvedt, M., Halpern, A.C., 1989. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 1893–1904. <https://doi.org/10.1093/jnci/81.24.1893>
- Costa, L.G., Giordano, G., 2011. Is decabromodiphenyl ether (BDE-209) a developmental neurotoxicant? *Neurotoxicology* 32, 9–24. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2010.12.010>
- Cox, K., Weeks, J., Mills, P., Chalmers, R., Devalia, H., Fish, D., Sever, A., 2016. Contrast-Enhanced Ultrasound Biopsy of Sentinel Lymph Nodes in Patients with Breast Cancer: Implications for Axillary Metastases and Conservation. *Ann. Surg. Oncol.* 23, 58–64. <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4606-0>
- Crawford, J., 2018. Cancer cachexia: Are we ready to take a step forward? *Cancer* 124, 456–458. <https://doi.org/10.1002/cncr.31126>
- Cristale, J., Aragão Belé, T.G., Lacorte, S., de Marchi, M.R.R., Jing, L., Sun, Y., Wang, Y.Y., Liang, B., Chen, T.T., Zheng, D., Zhao, X., Zhou, X., Sun, Z., Shi, Z., Montalbano, A.M., Albano, G.D., Anzalone, G., Moscato, M., Gagliardo, R., Di Sano, C., Bonanno, A., Ruggieri, S., Cibella, F., Profita, M., Wang, Y.Y., Chen, T.T., Sun, Y., Zhao, X., Zheng, D., Jing, L., Zhou, X., Sun, Z., Shi, Z., Vaccher, V., Ingenbleek, L., Adegboye, A., Hossou, S.E., Koné, A.Z., Oyedele, A.D., Kisito, C.S.K.J., Dembélé, Y.K., Hu, R., Abdel Malak, I., Cariou, R., Vénisseau, A., Veyrand, B., Marchand, P., Eyangoh, S., Verger, P., Dervilly-Pinel, G., Leblanc, J.C., Le Bizec, B., Estill, C.F., Slone, J., Mayer, A., Chen, I.C., La Guardia, M.J., Rivière, G., Jean, J., Gorecki, S., Hulin, M., Kolf-Clauw, M., Feidt, C., Picard-Hagen, N., Vasseur, P., Le Bizec, B., Sirot, V., Chu, Z., Li, Y., Han, X., Wang, Y.Y., Chen, T.T., Wilson, M.J., Pan, F., Wu, X., Rui, C., Chen, D.D., Tang, Q., Wu, W., Neupane, B.B., Jin, T., Gu, Z., Ligler, F.S., Wang, G., Литвинов, K., Zhai, J., Geng, X., Ding, T., Li, J., Tang, J., Chen, D.D., Cui, L., Wang, Q., 2019. Cardiovascular toxicity of decabrominated diphenyl ethers (BDE-209) and decabromodiphenyl ethane (DBDPE) in rats. *Environ. Int.* 135, 64–78. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3784-2>
- Crouch, R., Kimsey, G., Priest, D.G., Sarda, A., Buse, M.G., 1978. Effect of streptozotocin on erythrocyte and retinal superoxide dismutase. *Diabetologia* 15, 53–57. <https://doi.org/10.1007/BF01219329>
- D'Alterio, C., Scala, S., Sozzi, G., Roz, L., Bertolini, G., 2019. Paradoxical effects of chemotherapy on tumor relapse and metastasis promotion. *Semin. Cancer Biol.* 60, 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.019>
- Damsky, W.E., Theodosakis, N., Bosenberg, M., 2014. Melanoma metastasis: New concepts and evolving paradigms. *Oncogene* 33, 2413–2422. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.194>
- de Oliveira Júnior, R.G., Bonnet, A., Braconnier, E., Groult, H., Prunier, G., Beaugéard, L., Grougnet, R., da Silva Almeida, J.R.G., Ferraz, C.A.A., Picot, L., 2019. Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* 125, 549–561. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.013>
- de Wit, C.A., Herzke, D., Vorkamp, K., 2010. Brominated flame retardants in the

- Arctic environment - trends and new candidates. *Sci. Total Environ.* 408, 2885–2918. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.08.037>
- Domingues, B., Lopes, J., Soares, P., Populo, H., 2018. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther.* Volume 7, 35–49. <https://doi.org/10.2147/itt.s134842>
- Dornbos, P., Chernyak, S., Rutkiewicz, J., Cooley, T., Strom, S., Batterman, S., Basu, N., 2015. Hepatic polybrominated diphenyl ether (PBDE) levels in Wisconsin river otters (*Lontra canadensis*) and Michigan bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). *J. Great Lakes Res.* 41, 222–227. <https://doi.org/10.1016/J.JGLR.2014.12.023>
- Eguchi, A., Miyaso, H., Mori, C., 2016. The effects of early postnatal exposure to a low dose of decabromodiphenyl ether (BDE-209) on serum metabolites in male mice. *J. Toxicol. Sci.* 41, 667–675. <https://doi.org/10.2131/jts.41.667>
- English, K., Toms, L.M.L., Gallen, C., Mueller, J.F., 2016. BDE-209 in the Australian Environment: Desktop review. *J. Hazard. Mater.* 320, 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.032>
- EPA, 2008. Toxicological Review of Decabromodiphenyl Ether. Support Summ. Inf. Integr. Risk Inf. Syst. 1–126. <https://doi.org/http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0070tr.pdf>
- Espina, C., Straif, K., Friis, S., Kogevinas, M., Saracci, R., Vainio, H., Schüz, J., 2015. European Code against Cancer 4th Edition: Environment, occupation and cancer. *Cancer Epidemiol.* 39, S84–S92. <https://doi.org/10.1016/J.CANEP.2015.03.017>
- Faurobert, E., Bouin, A.P., Albiges-Rizo, C., 2015. Microenvironment, tumor cell plasticity, and cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 27, 64–70. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000154>
- Fearon, K.C., Voss, A.C., Hustead, D.S., 2006. Definition of cancer cachexia: Effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 1345–1350. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1345>
- Feng, Y., Hu, Q., Meng, G., Wu, X., Zeng, W., Zhang, X., Yu, Y., Wang, Y., 2015a. Simulating long-term occupational exposure to decabrominated diphenyl ether using C57BL/6 mice: Biodistribution and pathology. *Chemosphere* 128, 118–124. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2015.01.012>
- Feng, Y., Hu, Q., Meng, G., Wu, X., Zeng, W., Zhang, X., Yu, Y., Wang, Y., 2015b. Simulating long-term occupational exposure to decabrominated diphenyl ether using C57BL/6 mice: Biodistribution and pathology. *Chemosphere* 128, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.012>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F., 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* 144, 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Fernando Nunes da Silva, C., Pasqual Melo, G., Santos Bernardes, S., Armani Cecchini, A., 2013. Experimental models of in vivo murine melanoma. *Biosaúde* 15, 73–80.
- Ferrari de Andrade, L., Mozeleski, B., Leck, A.R., Rossi, G., da Costa, C.R.V., de Souza Fonseca Guimarães, F., Zotz, R., Fialho do Nascimento, K., Camargo de Oliveira, C., de Freitas Buchi, D., da Silva Trindade, E., 2016. Inhalation therapy with M1 inhibits experimental melanoma development and metastases in mice. *Homeopathy* 105, 109–118. <https://doi.org/10.1016/J.HOMP.2015.08.007>

- Fidler, M.M., Bray, F., Soerjomataram, I., 2018. The global cancer burden and human development: A review. *Scand. J. Public Health* 46, 27–36. <https://doi.org/10.1177/1403494817715400>
- Francia, G., Cruz-Munoz, W., Man, S., Xu, P., Kerbel, R.S., 2011. Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 11, 135–141. <https://doi.org/10.1038/nrc3001>
- Garcia-Mayea, Y., Mir, C., Masson, F., Paciucci, R., LLeonart, M.E., 2019. Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance. *Semin. Cancer Biol.* 60, 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.022>
- Gascon, M., Morales, E., Sunyer, J., Vrijheid, M., 2013. Effects of persistent organic pollutants on the developing respiratory and immune systems: A systematic review. *Environ. Int.* 52, 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.11.005>
- Giordano, G., Kavanagh, T.J., Costa, L.G., 2008. Neurotoxicity of a polybrominated diphenyl ether mixture (DE-71) in mouse neurons and astrocytes is modulated by intracellular glutathione levels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 161–168. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2008.06.018>
- Gomez-Cuadrado, L., Tracey, N., Ma, R., Qian, B., Brunton, V.G., 2017. Mouse models of metastasis: Progress and prospects. *DMM Dis. Model. Mech.* 10, 1061–1074. <https://doi.org/10.1242/dmm.030403>
- Han, X., Wang, Y., Chen, T., Wilson, M.J., Pan, F., Wu, X., Rui, C., Chen, D., Tang, Q., Wu, W., 2019. Inhibition of progesterone biosynthesis induced by decabrominated diphenyl ether (BDE-209) in mouse Leydig tumor cell (MLTC-1). *Toxicol. Vitro.* 60, 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.05.016>
- Humphrey, K.M., Pandey, S., Martin, J., Hagoel, T., Grand'Maison, A., Ohm, J.E., 2019. Establishing a role for environmental toxicant exposure induced epigenetic remodeling in malignant transformation. *Semin. Cancer Biol.* 57, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.11.002>
- Hurley, S., Goldberg, D., Park, J.S., Petreas, M., Bernstein, L., Anton-Culver, H., Neuhausen, S.L., Nelson, D.O., Reynolds, P., 2019. A breast cancer case-control study of polybrominated diphenyl ether (PBDE) serum levels among California women. *Environ. Int.* 127, 412–419. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.043>
- Ji, X., Ding, J., Xie, X., Cheng, Y., Huang, Y., Qin, L., Han, C., 2017. Pollution Status and Human Exposure of Decabromodiphenyl Ether (BDE-209) in China. *ACS Omega* 2, 3333–3348. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00559>
- Jiang, Z.Y., Hunt, J. V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202, 384–389. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N)
- Jing, L., Sun, Y., Wang, Y., Liang, B., Chen, T., Zheng, D., Zhao, X., Zhou, X., Sun, Z., Shi, Z., 2019. Cardiovascular toxicity of decabrominated diphenyl ethers (BDE-209) and decabromodiphenyl ethane (DBDPE) in rats. *Chemosphere* 223, 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.115>
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., Leiserson, M.D.M., Miller, C.A., Welch, J.S., Walter, M.J., Wendl, M.C., Ley, T.J., Wilson, R.K., Raphael, B.J., Ding, L., 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333–339. <https://doi.org/10.1038/nature12634>
- Karagiannis, G.S., Condeelis, J.S., Oktay, M.H., 2018. Chemotherapy-induced metastasis: mechanisms and translational opportunities. *Clin. Exp. Metastasis*

- 35, 269–284. <https://doi.org/10.1007/s10585-017-9870-x>
- Kawashiro, Y., Fukata, H., Sato, K., Aburatani, H., Takigami, H., Mori, C., 2009. Polybrominated diphenyl ethers cause oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 28, 703–713. <https://doi.org/10.1177/0960327109350669>
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183–6188.
- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E., 2007. Evidence of debromination of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in biota from a wastewater receiving stream. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6663–6670. <https://doi.org/10.1021/es070728g>
- Lee, S., Kim, W.J., Jeon, Y., Lim, C.H., Sun, K., 2018. Specification of subject sex in oncology-related animal studies. *Acute Crit. Care* 33, 178–184. <https://doi.org/10.4266/acc.2017.00444>
- Leijds, M.M., Koppe, J.G., Olie, K., Van Aalderen, W.M.C., De Voogt, P., Ten Tusscher, G.W., 2009. Effects of dioxins, PCBs, and PBDEs on immunology and hematology in adolescents. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7946–7951. <https://doi.org/10.1021/es901480f>
- Li, Z.H., Liu, X.Y., Wang, N., Chen, J.S., Chen, Y.H., Huang, J.T., Su, C.H., Xie, F., Yu, B., Chen, D.J., 2012. Effects of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in regulation of growth and apoptosis of breast, ovarian, and cervical cancer cells. *Environ. Health Perspect.* 120, 541–546. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104051>
- Liang, Y., Zhang, H., Song, X., Yang, Q., 2019. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Semin. Cancer Biol.* 60, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.012>
- Liou, G.Y., Storz, P., 2010. Reactive oxygen species in cancer, *Free Radical Research*. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
- Liu, X., Zhan, H., Zeng, X., Zhang, C., Chen, D., 2012. The PBDE-209 exposure during pregnancy and lactation impairs immune function in rats. *Mediators Inflamm.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/692467>
- Ma, B., Wells, A., Clark, A.M., 2019. The pan-therapeutic resistance of disseminated tumor cells: Role of phenotypic plasticity and the metastatic microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* 60, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.021>
- Marchi, M., 2019. No Title Efeito do TCDD e BDE-209 na citotoxicidade e expressão de proteínas transportadoras ABC, MDR1, MDR5, MRP1, MRP2, MRP4 em linhagem de melanoma murino B16F10. Universidade Federal do Paraná.
- McIntyre, R.L., Kenerson, H.L., Subramanian, S., Wang, S.A., Kazami, M., Stapleton, H.M., Yeung, R.S., 2015. Polybrominated diphenyl ether congener, BDE-47, impairs insulin sensitivity in mice with liver-specific Pten deficiency. *BMC Obes.* 2, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40608-014-0031-3>
- Mierke, C.T., 2008. Role of the Endothelium during Tumor Cell Metastasis: Is the Endothelium a Barrier or a Promoter for Cell Invasion and Metastasis? *J. Biophys.* 2008, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2008/183516>
- Miller, K.D., Nogueira, L., Mariotto, A.B., Rowland, J.H., Yabroff, K.R., Alfano, C.M., Jemal, A., Kramer, J.L., Siegel, R.L., 2019. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* 69, 363–385. <https://doi.org/10.3322/caac.21565>
- Milovanovic, V., Buha, A., Matovic, V., Curcic, M., Vucinic, S., Nakano, T.,

- Antonijevic, B., 2018. Oxidative stress and renal toxicity after subacute exposure to decabrominated diphenyl ether in Wistar rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 7223–7230. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5921-5>
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology*. 2014 Apr 1;27:16-25. *Curr Opin Immunol* 27, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>.New
- Montalbano, A.M., Albano, G.D., Anzalone, G., Moscato, M., Gagliardo, R., Di Sano, C., Bonanno, A., Ruggieri, S., Cibella, F., Profita, M., 2020. Cytotoxic and genotoxic effects of the flame retardants (PBDE-47, PBDE-99 and PBDE-209) in human bronchial epithelial cells. *Chemosphere* 245. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125600>
- MORCK, A., 2003. Decabromodiphenyl ether in the rats-absorption, distribution, metabolism and excretion. *Drug Metab. Dispos.* 31, 900–908.
- Neupane, B.B., Jin, T., Gu, Z., Ligler, F.S., Wang, G., 2018. Polybrominated diphenyl ethers perturb axonal growth and actin distribution. *Bibechana* 16, 64–78. <https://doi.org/10.3126/bibechana.v16i0.21103>
- Orr, F.W., Wang, H.H., Lafrenie, R.M., Scherbarth, S., Nance, D.M., 2000. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J. Pathol.* 190, 310–329. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(200002\)190:3<310::AID-PATH525>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<310::AID-PATH525>3.0.CO;2-P)
- Peng, C., Chen, X., 2018. CD147 Is a Novel Chemotherapy or Prevention Target in Melanoma. *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.* 19, S91–S93. <https://doi.org/10.1016/j.jisp.2018.10.001>
- Pereira, L.C., Souza, A.O., Tasso, M.J., Oliveira, A.M.C., Duarte, F. V., Palmeira, C.M., Dorta, D.J., 2017. Exposure to decabromodiphenyl ether (BDE-209) produces mitochondrial dysfunction in rat liver and cell death. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* 80, 1129–1144. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1357370>
- Pourahmad, J., Amirmostofian, M., Kobarfard, F., Shahraki, J., 2009. Biological reactive intermediates that mediate dacarbazine cytotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65, 89–96. <https://doi.org/10.1007/s00280-009-1007-8>
- Qu, R., Li, C., Pan, X., Zeng, X., Liu, J., Huang, Q., Feng, J., Wang, Z., 2017. Solid surface-mediated photochemical transformation of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in aqueous solution. *Water Res.* 125, 114–122. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2017.08.033>
- Quail, D.F., Joyce, J.A., 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 19, 1423–1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>
- Renaud, H.J., Cui, J.Y., Khan, M., Klaassen, C.D., 2011. Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome p450 mRNAs in mice. *Toxicol. Sci.* 124, 261–277. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr240>
- Reuter, S., Gupta, S., Chaturvedi, M., Bharat aggarval, 2011. Oxidative stress, inflammation, and cancer. *Free Radic Biol Med* 49, 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.Oxidative
- Rice, D.C., Reeve, E.A., Herlihy, A., Thomas Zoeller, R., Douglas Thompson, W., Markowski, V.P., 2007. Developmental delays and locomotor activity in the C57BL6/J mouse following neonatal exposure to the fully-brominated PBDE, decabromodiphenyl ether. *Neurotoxicol. Teratol.* 29, 511–520. <https://doi.org/10.1016/J.NTT.2007.03.061>
- Robichaud, N., Sonenberg, N., Ruggero, D., Schneider, R.J., 2019. Translational

- control in cancer. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032896>
- Rocha-Gutiérrez, B.A., Peralta-Pérez, M. del R., Zavala-Díaz de la Serna, F.J., 2015. Revisión global de los contaminantes emergentes PBDE y el caso particular de México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 31, 311–320.
- Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J.M., 2013. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 2721–2725. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>
- Schechter, A., Pavuk, M., Pöpke, O., Ryan, J.J., Birnbaum, L., Rosen, R., 2003. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in U.S. mothers’ milk. *Environ. Health Perspect.* 111, 1723–1729. <https://doi.org/10.1289/ehp.6466>
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman’s reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)
- Severo, 2017. Análise de biomarcadores em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos in situ como uma ferramenta de avaliação ambiental. Universidade federal de santa maria.
- Shibue, T., Weinberg, R.A., 2017. EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, 611–629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>
- Sjödin, A., Pöpke, O., McGahee, E., Focant, J.-F., Jones, R.S., Pless-Mulloli, T., Toms, L.-M.L., Herrmann, T., Müller, J., Needham, L.L., Patterson, D.G., 2008. Concentration of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in household dust from various countries. *Chemosphere* 73, S131–S136. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2007.08.075>
- Skvortsova, I., 2019. Special Issue “Enigmatic tumor properties associated with metastatic spread” seminars in cancer biology, volume XX. *Semin. Cancer Biol.* 60. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.10.021>
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., LLeonart, M.E., 2013. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res. Rev.* 12, 376–390. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>
- Sperduto, P.W., Yang, T.J., Beal, K., Pan, H., Brown, P.D., Bangdiwala, A., Shanley, R., Yeh, N., Gaspar, L.E., Braunstein, S., Sneed, P., Boyle, J., Kirkpatrick, J.P., Mak, K.S., Shih, H.A., Engelman, A., Roberge, D., Arvold, N.D., Alexander, B., Awad, M.M., Contessa, J., Chiang, V., Hardie, J., Ma, D., Lou, E., Sperduto, W., Mehta, M.P., 2017. Estimating survival in patients with lung cancer and brain metastases an update of the graded prognostic assessment for lung cancer using molecular markers (Lung-molGPA). *JAMA Oncol.* 3, 827–831. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.3834>
- Soengas, M. S., & Lowe, S. W. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*, 22(20), 3138-3151.
- Steil, G., 2016. Efeitos do TCDD (2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-P-dioxina) e BDE-209 (Decabromodifenil éter) na malignidade de células de melanoma murino B16F1 in vitro. Universidad Federal do Paraná.
- Sudhakar, A., 2009. *J Cancer Sci Ther* 1, 1–4. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.100000e2.History>
- Sugie, T. (2018). Immunotherapy for metastatic breast cancer. *Chinese clinical oncology*, 7(3), 28.
- SUN, R.B., SHANG, S., ZHANG, W., LIN, B.C., WANG, Q., SHI, Y., XI, Z.G., 2018. Endocrine Disruption Activity of 30-day Dietary Exposure to Decabromodiphenyl

- Ethane in Balb/C Mouse. *Biomed. Environ. Sci.* 31, 12–22. <https://doi.org/10.3967/bes2018.002>
- Tagliaferri, S., Caglieri, A., Goldoni, M., Pinelli, S., Alinovi, R., Poli, D., Pellacani, C., Giordano, G., Mutti, A., Costa, L.G., 2010. Low concentrations of the brominated flame retardants BDE-47 and BDE-99 induce synergistic oxidative stress-mediated neurotoxicity in human neuroblastoma cells. *Toxicol. Vitro* 24, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.08.020>
- Tawbi, H.A., Kirkwood, J.M., 2007. Management of Metastatic Melanoma. *Semin. Oncol.* 34, 532–545. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINONCOL.2007.09.008>
- Trinh, V.A., 2008. Current management of metastatic melanoma. *Am. J. Heal. Pharm.* 65, 3–9. <https://doi.org/10.2146/ajhp080460>
- Triozzi, P. L., Achberger, S., Aldrich, W., Singh, A. D., Grane, R., & Borden, E. C. (2012). The association of blood angioregulatory microRNA levels with circulating endothelial cells and angiogenic proteins in patients receiving dacarbazine and interferon. *Journal of translational medicine*, 10(1), 241.
- Vaccher, V., Ingenbleek, L., Adegboye, A., Epiphane, S., Zié, A., Dada, A., Sika, C., Kisito, K.J., Koreissi, Y., Hu, R., Adbel, I., Cariou, R., Vénisseau, A., Veyrand, B., Marchand, P., Eyangoh, S., Verger, P., Dervilly-pinel, G., 2020. Levels of persistent organic pollutants (POPs) in foods from the first regional Sub-Saharan Africa Total Diet Study. *Environ. Int.* 135, 105413. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105413>
- Vagula, M.C., Kubeldis, N., Nelatury, C.F., 2011. Effects of BDE-85 on the Oxidative Status and Nerve Conduction in Rodents. *Int. J. Toxicol.* 30, 428–434. <https://doi.org/10.1177/1091581811411109>
- Vaiopoulos, A.G., Kostakis, I.D., Gkioka, E., Athanasoula, K.C., Pikoulis, E., Papalambros, A., Christopoulos, P., Gogas, H., Kouraklis, G., Koutsilieris, M., 2014. Detection of circulating tumor cells in colorectal and gastric cancer using a multiplex PCR assay. *Anticancer Res.* 34, 3083–3092.
- Vosoughi, E., Lee, J.M., Miller, J.R., Nosrati, M., Minor, D.R., Abendroth, R., Lee, J.W., Andrews, B.T., Leng, L.Z., Wu, M., Leong, S.P., Kashani-Sabet, M., Kim, K.B., 2018. Survival and clinical outcomes of patients with melanoma brain metastasis in the era of checkpoint inhibitors and targeted therapies. *BMC Cancer* 18, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4374-x>
- Wang, Y., Sun, Y., Chen, T., Shi, Z., Zhou, X., Sun, Z., Zhang, L., Li, J., 2018. Determination of polybrominated diphenyl ethers and novel brominated flame retardants in human serum by gas chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1099, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.015>
- WebMD, 2020. Chemotherapy: How It Works and How You'll Feel [WWW Document]. URL <https://www.webmd.com/cancer/chemotherapy-what-to-expect#1> (accessed 2.23.20).
- Wu, J., Wu, D., Zhang, L., Lin, C., Liao, J., Xie, R., Li, Z., Wu, S., Liu, A., Hu, W., Xi, Y., Bu, S., Wang, F., 2019. NK cells induce hepatic ER stress to promote insulin resistance in obesity through osteopontin production. *J. Leukoc. Biol.* 1–8. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MA1119-173R>
- Xu, L., Huo, X., Zhang, Y., Li, W., Zhang, J., Xu, X., 2015. Polybrominated diphenyl ethers in human placenta associated with neonatal physiological development at a typical e-waste recycling area in China. *Environ. Pollut.* 196, 414–422. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2014.11.002>
- Zhai, J., Geng, X., Ding, T., Li, J., Tang, J., Chen, D., Cui, L., Wang, Q., 2019. An

- increase of estrogen receptor α protein level regulates BDE-209-mediated blood-testis barrier disruption during spermatogenesis in F1 mice. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 4801–4820. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3784-2>
- Zhang, W., Gao, J., Cheng, C., Zhang, M., Liu, W., Ma, X., Lei, W., Hao, E., Hou, X., Hou, Y., Bai, G., 2020. Cinnamaldehyde enhances antimelanoma activity through covalently binding ENO1 and exhibits a promoting effect with dacarbazine. *Cancers* (Basel). 12, 1–15. <https://doi.org/10.3390/cancers12020311>
- Zhi, H., Wu, J.P., Lu, L.M., Li, Y., Chen, X.Y., Tao, J., Mai, B.X., 2018. Decabromodiphenyl ether (BDE-209) enhances foam cell formation in human macrophages via augmenting Toll-like receptor 4-dependent lipid uptake. *Food Chem. Toxicol.* 121, 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.024>
- Zhu, Y., Li, X., Liu, J., Zhou, G., Yu, Y., Jing, L., Shi, Z., Zhou, X., Sun, Z., 2019. The effects of decabromodiphenyl ether on glycolipid metabolism and related signaling pathways in mice. *Chemosphere* 222, 849–855. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.003>

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em modelos murinos de metástase estabelecidos com células B16-F10, é descrito de forma característica a formação de nódulos pulmonares (Nunes da Silva et al., 2013). Portanto, a ocorrência incomum em outros órgãos sugere que o contaminante testado possa estar alterando a condição fisiológica dos animais favorecendo uma maior proliferação das células tumorais pelo corpo. O modelo utilizado foi satisfatório para o estudo que se propôs realizar, onde já foram bem descritos os alvos de colonização tumoral baseados na inoculação das células tumorais através da veia caudal, ou seja a relação desse método com o desenvolvimento de nódulos pulmonares (Gomez-Cuadrado et al., 2017). Nos modelos de metástase em camundongos, têm sido fundamentados nas interações tumor-hospedeiro necessárias para a colonização em locais metastáticos. Isso é baseado no papel das propriedades intrínsecas da célula cancerosa, como genes e vias de regulação da colonização, levando ao direcionamento do organotropismo (Ayuko Hoshino et al., 2015). Sendo assim, os resultados onde várias metástases tenham sido encontradas em outros órgãos é muito interessante pois o modelo do estudo utilizado foi para o desenvolvimento de nódulos pulmonares.

O melanoma é o câncer que tem a mais alta propensão a gerar metástase no cérebro, e a suscetibilidade biológica subjacente para isso é mal compreendida. Em quase metade de todos os pacientes com melanoma, as metástases cerebrais se desenvolverão em algum momento no curso de sua doença, e as metástases cerebrais são a causa da morte em 20% a 54% dos pacientes com melanoma. Essa é uma complicação tardia do câncer na clínica (Francia et al., 2011). Todos esses resultados reportados no nosso primeiro experimento em conjunto revelam que embora as metástases pulmonares não tenham apresentado um quadro significativamente pior nos indivíduos expostos ao poluente, há indícios de que os aspectos gerais da doença nos animais tratados com o poluente mostram-se piores, agravado possivelmente pela presença de metástases em outros órgãos não esperados pelo modelo de colonização das células tumorais utilizado. Se a ocorrência de câncer em outros tecidos é um agravamento da doença, a exposição ao BDE-209, particularmente pode ser um fator a mais que possa agravar o quadro e de forma mais precoce favorecer essa disseminação dos tumores, corroborando a hipótese do presente estudo, mas agora dentro de uma outra perspectiva, ou seja a

sensibilização do animal frente à proliferação das metástases, o que, junto as alterações das análises sanguíneas, e das enzimas de estresse oxidativo tanto no pulmão, quanto no fígado mostram uma piora na saúde geral dos animais.

Nos experimentos realizados na Fase II foram obtidos os nódulos pulmonares esperados sendo que cada nódulo tumoral encontrado no pulmão é tecnicamente um tumor “primário” independente, e não uma verdadeira metástase, apesar da metástase pulmonar ser o termo empregado neste modelo (Ferrari de Andrade et al., 2016). Nossos animais não apresentaram perda de peso importante (significativa) ao decorrer do experimento como é prevalente em pacientes com câncer de pulmão avançado, que reportam uma perda de peso de aproximadamente 5% (Crawford, 2018). Embora não houvesse diferenças entre os parâmetros biométricos, a condição geral dos animais sugere uma deterioração da condição de saúde além do câncer nos animais tratados com o poluente BDE-209.

Nas análises visuais dos pulmões, na hora da coleta do segundo experimento, os nódulos pulmonares foram bem visíveis e quantificáveis, como estabelece o modelo de metástase pulmonar (Nunes da Silva et al., 2013; Ferrari de Andrade et al., 2016). Os resultados mostram que os animais tratados com o BDE-209 apresentaram um maior número de metástases, tanto em machos, quanto em fêmeas. Nos machos os tratamentos com o BDE-209 e BDE-209 + Dacarbazina apresentaram número de metástases similares, sendo bem maiores aos reportados nos tratamentos controle e com a Dacarbazina sozinha. Nas fêmeas, observamos uma diminuição significativa dos nódulos pulmonares nos animais tratados com a dacarbazina, em relação aos controles; mais um incremento significativo também no número de nódulos (metástases) nos animais tratados com o BDE-209 e com os dois tratamentos juntos de BDE-209 e dacarbazina.

Nas análises histológicas foi mostrado que os animais tratados com a dacarbazina apresentaram um menor número de nódulos pulmonares como esperado pelo efeito do tratamento quimioterápico. No caso da dacarbazina, exibe um efeito citotóxico pela indução a apoptose das células tumorais (Soengas e Lowe, 2003), e tem atividade antiangiogênica diminuindo microRNAs pró-angiogênicos (miR-199^a e miR-126), e aumentando antiangiogênico (miR-106 e miR-16). Esses efeitos são restritos a células endoteliais regulando a integridade vascular e a angiogênese (Triozi, et. al., 2012). Os animais pre-tratados com o BDE-209 mostraram nódulos pulmonares bem mais desenvolvidos e diferentes estágios de

desenvolvimento de tumores em comparação aos grupos controles e dacarbazina, além de vasos sanguíneos mais desenvolvidos na periferia dos tumores. Porém, o grupo pre-tratado com BDE-209 e depois com a dacarbazina, apresentaram os maiores nódulos pulmonares, em um estágio bem avançado de desenvolvimento e muitos vasos sanguíneos tanto nas periferias, quanto no interior dos tumores. No entanto, de forma curiosa, esses achados revelam pela primeira vez na toxicologia dos polibromados que a exposição prévia ao BDE-209 diminui os efeitos tanto apoptóticos quanto antiangiogênicos da dacarbazina (Soengas e Lowe, 2003; Triozzi, et. al., 2012).

Esses dados são observados tanto externamente com o internamente nos pulmões, mostrando que o BDE-209 interfere aumentando muito os nódulos pulmonares internos comparado com os controles, enquanto o grupo tratado com a dacarbazina apresentou apenas alguns vestígios de metástases. Finalmente, o grupo previamente tratado com BDE-209 e depois com a dacarbazina apresentou um maior número de metástases e tumores similares aos indivíduos expostos com BDE-209, mas sem o tratamento com o agente quimioterápico, demonstrando que o poluente interfere diretamente no tratamento clínico do melanoma.

Esse é um dado particularmente importante pois parece apontar que a exposição ao poluente antes e durante a doença altera a condição fisiológica do animal, tornando o organismo mais sensível à proliferação das células cancerosas ao mesmo tempo que interfere no tratamento quimioterápico. A combinação desses dois parâmetros evidencia o papel negativo da exposição ao BDE-209 no prognóstico e no tratamento da doença. Nas fêmeas, foi reportado um menor número de nódulos pulmonares nos indivíduos tratados com a Dacarbazina como esperado, no entanto, quando comparadas com os animais expostos ao BDE-209 observou-se um maior número de nódulos, o que leva a pensar de que em fêmeas o efeito antitumoral da Dacarbazina é maior, mas a interferência sobre o tratamento gerada pelo BDE-209 é mais evidente que em machos. A condição humoral em fêmeas com a circulação de hormônios pode ser um fator que possa estar relacionado com as condições apresentadas para esse grupo em especial, mas são questões que precisariam ser melhor avaliadas.

As análises de parâmetros hematológicos não mostraram diferenças significativas entre os grupos tratado e controle para a os testes realizados, apesar dos altos valores observados para colesterol e triglicérides quando comparados

com os valores de referência relatados para camundongos saudáveis (Almeida et al., 2008). Nas fêmeas foram reportadas diferenças significativas na quantificação de linfócitos nos grupos tratados com a Dacarbazina o que leva a pensar que corresponde a um efeito mais devido ao tratamento quimioterápico do que ao tratamento com o BDE-209.

Com os dados até o presente, observa-se claramente que a exposição crônica prévia e contínua ao poluente BDE-209 afeta consideravelmente a condição fisiológica dos animais favorecendo a disseminação de metástases, favorece o crescimento tumoral e interfere negativamente com o tratamento quimioterápico. Claramente, portanto, a exposição ao BDE-209 é capaz de interferir com o desenvolvimento do melanoma sob condições experimentais realísticas em um primeiro momento favorecendo a disseminação, depois o desenvolvimento do tumor e finalmente com o tratamento da doença, o que é minimamente uma questão preocupante de saúde pública e toxicologia ambiental.

7 CONCLUSÕES

- A exposição crônica a doses baixas e realísticas ao poluente polibromado BDE-209 afeta o desenvolvimento da metástase pulmonar em camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F10;

- Nessas mesmas condições, ocorre uma maior sensibilização do organismo à proliferação e ao desenvolvimento das metástases em outros órgãos (cérebro, fígado e rins) considerados não alvos pelo modelo empregado;

- O papel do BDE-209 é evidente diminuindo o sucesso do tratamento quimioterápico com Dacarbazina, sendo que esse efeito é mais proeminente em grupos fêmeas, que em grupos machos;

- O uso de doses baixas e realísticas ao poluente BDE-209 sugere fortemente que populações expostas a esse poluente podem estar mais sensibilizadas ao desenvolvimento da doença e resistentes ao tratamento quimioterápico, piorando o estado de saúde dos pacientes;

8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos com o presente estudo abrem uma série de novos questionamentos quanto ao papel dos contaminantes no prognóstico do câncer. Essa é uma abordagem inovadora, onde nenhum estudo foi realizado com o intuito de avaliar se poluentes orgânicos, e em especial os polibromados, podem interferir com o desenvolvimento da doença ou mesmo com o tratamento clínico do câncer. Nesse trabalho verificamos que o organismo exposto cronicamente a doses realísticas de BDE-209 é fisiologicamente sensibilizado favorecendo a disseminação das metástases. No entanto, precisaríamos avaliar se uma mudança no fenótipo das células tumorais expostas ao BDE-209 poderia interferir favorecendo a malignidade dessas células e o quanto isso implicaria no desenvolvimento da doença. Nesse caso, poderiam ser utilizadas células B16-F1, com fenótipo menos agressivo comparativamente com a linhagem B16-F10 utilizadas nesse estudo, para posteriormente serem inoculadas e avaliados os mesmos parâmetros através de metodologias como as utilizadas no presente estudo.

Outra abordagem importante seria a avaliação do papel do BDE-209 no sistema imunológico inato, responsável pelo controle de metástases no organismo, nas proteínas de adesão celular ou mesmo na alteração da composição de matriz extracelular. Esses fatores podem, segundo os dados apresentados, estar favorecendo a disseminação e/ou o desenvolvimento das metástases.

Além disso, avaliar o risco de exposição a outros contaminantes persistes no ambiente como os pesticidas, metais tóxicos e organoclorados para a populações humanas, constitui um vasto campo de trabalho que poderia delinear uma nova linha de pesquisa com grande interesse em saúde pública.

9 REFERÊNCIAS

- Aebi, H., 1974. Catalase. *Methods Enzym. Anal.* 673–684. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3>
- Almeida, A.S., Faleiros, A.C.G., Teixeira, D.N.S., Cota, U.A., Chica, J.E.L., 2008. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. *J. Bras. Patol. e Med. Lab.* 44, 429–432. <https://doi.org/10.1590/s1676-24442008000600006>
- Arrangoiz, R., 2016. Melanoma Review: Epidemiology, Risk Factors, Diagnosis and Staging. *J. Cancer Treat. Res.* 4, 1. <https://doi.org/10.11648/j.jctr.20160401.11>
- Aschebrook-Kilfoy, B., Dellavalle, C.T., Purdue, M., Kim, C., Zhang, Y., Sjodin, A., Ward, M.H., 2015. Polybrominated diphenyl ethers and thyroid cancer risk in the prostate, colorectal, lung, and ovarian cancer screening trial cohort. *Am. J. Epidemiol.* 181, 883–888. <https://doi.org/10.1093/aje/kwu358>
- Ayuko Hoshino, Bruno Costa-Silv, Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Mark, M.T., Molina, H., Kohsaka, S., Giannatale, A. Di, Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplop, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A.E., Ararso, Y., Zhang, T., Zhang, H., Hernandez, J., Weiss, J.M., Dumont-Cole, V.D., Kramer, K., Wexler, L.H., Narendran, A., Schwartz, G.K., Healey, J.H., Sandstrom, P., Labori, K.J., Kure, E.H., Grandgenett, P.M., Hollingsworth, M.A., Sousa, M. de, Kaur, S., Jain, M., Mallya, K., Batra, S.K., Jarnagin, W.R., Brady, M.S., Fodstad, O., Muller, V., Pantel, K., Minn, A.J., Bissel, M.J., Garcia, B.A., Kang, Y., Rajasekhar, V.K., Ghajar, C.M., Matei, I., Peinado, H., Bromberg, J., Lyden, D., 2015. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329–335. <https://doi.org/doi:10.1038/nature15756>. Tumour
- Beliaeff, B., Burgeot, T., 2002. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1316–1322. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>
- Bersini, S., Jeon, J.S., Moretti, M., Kamm, R.D., 2014. In vitro models of the metastatic cascade: from local invasion to extravasation. *Drug Discov. Today* 19, 735–742. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.12.006>
- Besis, A., Katsoyiannis, A., Botsaropoulou, E., Samara, C., 2014a. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in central air-conditioner filter dust and relevance of non-dietary exposure in occupational indoor environments in Greece. *Environ. Pollut.* 188, 64–70. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2014.01.021>
- Besis, A., Katsoyiannis, A., Botsaropoulou, E., Samara, C., 2014b. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in central air-conditioner filter dust and relevance of non-dietary exposure in occupational indoor environments in Greece. *Environ. Pollut.* 188, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.021>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cai, Y., Zhang, W., Hu, J., Sheng, G., Chen, D., Fu, J., 2011. Characterization of maternal transfer of decabromodiphenyl ether (BDE-209) administered to pregnant Sprague–Dawley rats. *Reprod. Toxicol.* 31, 106–110. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2010.08.005>
- Chiurchiù, V., MacCarrone, M., 2011. Chronic inflammatory disorders and their redox

- control: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants Redox Signal.* 15, 2605–2641. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3547>
- Christmann, M., Verbeek, B., Roos, W.P., Kaina, B., 2011. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: Enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1816, 179–190. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2011.06.002>
- Clark, W.H., Elder, D.E., Guerry, D., Braitman, L.E., Trock, B.J., Schultz, D., Synnestvedt, M., Halpern, A.C., 1989. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 1893–1904. <https://doi.org/10.1093/jnci/81.24.1893>
- Costa, L.G., Giordano, G., 2011. Is decabromodiphenyl ether (BDE-209) a developmental neurotoxicant? *Neurotoxicology* 32, 9–24. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2010.12.010>
- Cox, K., Weeks, J., Mills, P., Chalmers, R., Devalia, H., Fish, D., Sever, A., 2016. Contrast-Enhanced Ultrasound Biopsy of Sentinel Lymph Nodes in Patients with Breast Cancer: Implications for Axillary Metastases and Conservation. *Ann. Surg. Oncol.* 23, 58–64. <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4606-0>
- Crawford, J., 2018. Cancer cachexia: Are we ready to take a step forward? *Cancer* 124, 456–458. <https://doi.org/10.1002/cncr.31126>
- Cristale, J., Aragão Belé, T.G., Lacorte, S., de Marchi, M.R.R., Jing, L., Sun, Y., Wang, Y.Y., Liang, B., Chen, T.T., Zheng, D., Zhao, X., Zhou, X., Sun, Z., Shi, Z., Montalbano, A.M., Albano, G.D., Anzalone, G., Moscato, M., Gagliardo, R., Di Sano, C., Bonanno, A., Ruggieri, S., Cibella, F., Profita, M., Wang, Y.Y., Chen, T.T., Sun, Y., Zhao, X., Zheng, D., Jing, L., Zhou, X., Sun, Z., Shi, Z., Vaccher, V., Ingenbleek, L., Adegboye, A., Hossou, S.E., Koné, A.Z., Oyedele, A.D., Kisito, C.S.K.J., Dembélé, Y.K., Hu, R., Abdel Malak, I., Cariou, R., Vénisseau, A., Veyrand, B., Marchand, P., Eyangoh, S., Verger, P., Dervilly-Pinel, G., Leblanc, J.C., Le Bizec, B., Estill, C.F., Slone, J., Mayer, A., Chen, I.C., La Guardia, M.J., Rivière, G., Jean, J., Gorecki, S., Hulin, M., Kolf-Clauw, M., Feidt, C., Picard-Hagen, N., Vasseur, P., Le Bizec, B., Sirot, V., Chu, Z., Li, Y., Han, X., Wang, Y.Y., Chen, T.T., Wilson, M.J., Pan, F., Wu, X., Rui, C., Chen, D.D., Tang, Q., Wu, W., Neupane, B.B., Jin, T., Gu, Z., Ligler, F.S., Wang, G., Литвинов, K., Zhai, J., Geng, X., Ding, T., Li, J., Tang, J., Chen, D.D., Cui, L., Wang, Q., 2019. Cardiovascular toxicity of decabrominated diphenyl ethers (BDE-209) and decabromodiphenyl ethane (DBDPE) in rats. *Environ. Int.* 135, 64–78. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3784-2>
- Crouch, R., Kimsey, G., Priest, D.G., Sarda, A., Buse, M.G., 1978. Effect of streptozotocin on erythrocyte and retinal superoxide dismutase. *Diabetologia* 15, 53–57. <https://doi.org/10.1007/BF01219329>
- D'Alterio, C., Scala, S., Sozzi, G., Roz, L., Bertolini, G., 2019. Paradoxical effects of chemotherapy on tumor relapse and metastasis promotion. *Semin. Cancer Biol.* 60, 351–361. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.019>
- Damsky, W.E., Theodosakis, N., Bosenberg, M., 2014. Melanoma metastasis: New concepts and evolving paradigms. *Oncogene* 33, 2413–2422. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.194>
- de Oliveira Júnior, R.G., Bonnet, A., Braconnier, E., Groult, H., Prunier, G., Beaugeard, L., Grougnet, R., da Silva Almeida, J.R.G., Ferraz, C.A.A., Picot, L., 2019. Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* 125, 549–561.

- <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.013>
- de Wit, C.A., Herzke, D., Vorkamp, K., 2010. Brominated flame retardants in the Arctic environment - trends and new candidates. *Sci. Total Environ.* 408, 2885–2918. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.08.037>
- Domingues, B., Lopes, J., Soares, P., Populo, H., 2018. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther.* Volume 7, 35–49. <https://doi.org/10.2147/itt.s134842>
- Dornbos, P., Chernyak, S., Rutkiewicz, J., Cooley, T., Strom, S., Batterman, S., Basu, N., 2015. Hepatic polybrominated diphenyl ether (PBDE) levels in Wisconsin river otters (*Lontra canadensis*) and Michigan bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). *J. Great Lakes Res.* 41, 222–227. <https://doi.org/10.1016/J.JGLR.2014.12.023>
- Eguchi, A., Miyaso, H., Mori, C., 2016. The effects of early postnatal exposure to a low dose of decabromodiphenyl ether (BDE-209) on serum metabolites in male mice. *J. Toxicol. Sci.* 41, 667–675. <https://doi.org/10.2131/jts.41.667>
- English, K., Toms, L.M.L., Gallen, C., Mueller, J.F., 2016. BDE-209 in the Australian Environment: Desktop review. *J. Hazard. Mater.* 320, 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.032>
- EPA, 2008. Toxicological Review of Decabromodiphenyl Ether. Support Summ. Inf. Integr. Risk Inf. Syst. 1–126. <https://doi.org/http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0070tr.pdf>
- Espina, C., Straif, K., Friis, S., Kogevinas, M., Saracci, R., Vainio, H., Schüz, J., 2015. European Code against Cancer 4th Edition: Environment, occupation and cancer. *Cancer Epidemiol.* 39, S84–S92. <https://doi.org/10.1016/J.CANEP.2015.03.017>
- Faurobert, E., Bouin, A.P., Albiges-Rizo, C., 2015. Microenvironment, tumor cell plasticity, and cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 27, 64–70. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000154>
- Fearon, K.C., Voss, A.C., Hustead, D.S., 2006. Definition of cancer cachexia: Effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 1345–1350. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1345>
- Feng, Y., Hu, Q., Meng, G., Wu, X., Zeng, W., Zhang, X., Yu, Y., Wang, Y., 2015a. Simulating long-term occupational exposure to decabrominated diphenyl ether using C57BL/6 mice: Biodistribution and pathology. *Chemosphere* 128, 118–124. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2015.01.012>
- Feng, Y., Hu, Q., Meng, G., Wu, X., Zeng, W., Zhang, X., Yu, Y., Wang, Y., 2015b. Simulating long-term occupational exposure to decabrominated diphenyl ether using C57BL/6 mice: Biodistribution and pathology. *Chemosphere* 128, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.01.012>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F., 2019. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* 144, 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Ferrari de Andrade, L., Mozeleski, B., Leck, A.R., Rossi, G., da Costa, C.R.V., de Souza Fonseca Guimarães, F., Zotz, R., Fialho do Nascimento, K., Camargo de Oliveira, C., de Freitas Buchi, D., da Silva Trindade, E., 2016. Inhalation therapy with M1 inhibits experimental melanoma development and metastases in mice. *Homeopathy* 105, 109–118. <https://doi.org/10.1016/J.HOMP.2015.08.007>
- Fidler, M.M., Bray, F., Soerjomataram, I., 2018. The global cancer burden and human

- development: A review. *Scand. J. Public Health* 46, 27–36. <https://doi.org/10.1177/1403494817715400>
- Francia, G., Cruz-Munoz, W., Man, S., Xu, P., Kerbel, R.S., 2011. Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 11, 135–141. <https://doi.org/10.1038/nrc3001>
- Garcia-Mayea, Y., Mir, C., Masson, F., Paciucci, R., LLeonart, M.E., 2019. Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance. *Semin. Cancer Biol.* 60, 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.022>
- Gascon, M., Morales, E., Sunyer, J., Vrijheid, M., 2013. Effects of persistent organic pollutants on the developing respiratory and immune systems: A systematic review. *Environ. Int.* 52, 51–65. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.11.005>
- Giordano, G., Kavanagh, T.J., Costa, L.G., 2008. Neurotoxicity of a polybrominated diphenyl ether mixture (DE-71) in mouse neurons and astrocytes is modulated by intracellular glutathione levels. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 161–168. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2008.06.018>
- Gomez-Cuadrado, L., Tracey, N., Ma, R., Qian, B., Brunton, V.G., 2017. Mouse models of metastasis: Progress and prospects. *DMM Dis. Model. Mech.* 10, 1061–1074. <https://doi.org/10.1242/dmm.030403>
- Han, X., Wang, Y., Chen, T., Wilson, M.J., Pan, F., Wu, X., Rui, C., Chen, D., Tang, Q., Wu, W., 2019. Inhibition of progesterone biosynthesis induced by decabrominated diphenyl ether (BDE-209) in mouse Leydig tumor cell (MLTC-1). *Toxicol. Vit.* 60, 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.05.016>
- Humphrey, K.M., Pandey, S., Martin, J., Hagoel, T., Grand'Maison, A., Ohm, J.E., 2019. Establishing a role for environmental toxicant exposure induced epigenetic remodeling in malignant transformation. *Semin. Cancer Biol.* 57, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.11.002>
- Hurley, S., Goldberg, D., Park, J.S., Petreas, M., Bernstein, L., Anton-Culver, H., Neuhausen, S.L., Nelson, D.O., Reynolds, P., 2019. A breast cancer case-control study of polybrominated diphenyl ether (PBDE) serum levels among California women. *Environ. Int.* 127, 412–419. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.043>
- Ji, X., Ding, J., Xie, X., Cheng, Y., Huang, Y., Qin, L., Han, C., 2017. Pollution Status and Human Exposure of Decabromodiphenyl Ether (BDE-209) in China. *ACS Omega* 2, 3333–3348. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00559>
- Jiang, Z.Y., Hunt, J. V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202, 384–389. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N)
- Jing, L., Sun, Y., Wang, Y., Liang, B., Chen, T., Zheng, D., Zhao, X., Zhou, X., Sun, Z., Shi, Z., 2019. Cardiovascular toxicity of decabrominated diphenyl ethers (BDE-209) and decabromodiphenyl ethane (DBDPE) in rats. *Chemosphere* 223, 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.115>
- Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., Leiserson, M.D.M., Miller, C.A., Welch, J.S., Walter, M.J., Wendl, M.C., Ley, T.J., Wilson, R.K., Raphael, B.J., Ding, L., 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502, 333–339. <https://doi.org/10.1038/nature12634>
- Karagiannis, G.S., Condeelis, J.S., Oktay, M.H., 2018. Chemotherapy-induced metastasis: mechanisms and translational opportunities. *Clin. Exp. Metastasis* 35, 269–284. <https://doi.org/10.1007/s10585-017-9870-x>

- Kawashiro, Y., Fukata, H., Sato, K., Aburatani, H., Takigami, H., Mori, C., 2009. Polybrominated diphenyl ethers cause oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 28, 703–713. <https://doi.org/10.1177/0960327109350669>
- Keen, J.H., Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6183–6188.
- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E., 2007. Evidence of debromination of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in biota from a wastewater receiving stream. *Environ. Sci. Technol.* 41, 6663–6670. <https://doi.org/10.1021/es070728g>
- Lee, S., Kim, W.J., Jeon, Y., Lim, C.H., Sun, K., 2018. Specification of subject sex in oncology-related animal studies. *Acute Crit. Care* 33, 178–184. <https://doi.org/10.4266/acc.2017.00444>
- Leijds, M.M., Koppe, J.G., Olie, K., Van Aalderen, W.M.C., De Voogt, P., Ten Tusscher, G.W., 2009. Effects of dioxins, PCBs, and PBDEs on immunology and hematology in adolescents. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7946–7951. <https://doi.org/10.1021/es901480f>
- Li, Z.H., Liu, X.Y., Wang, N., Chen, J.S., Chen, Y.H., Huang, J.T., Su, C.H., Xie, F., Yu, B., Chen, D.J., 2012. Effects of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in regulation of growth and apoptosis of breast, ovarian, and cervical cancer cells. *Environ. Health Perspect.* 120, 541–546. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104051>
- Liang, Y., Zhang, H., Song, X., Yang, Q., 2019. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. *Semin. Cancer Biol.* 60, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.012>
- Liou, G.Y., Storz, P., 2010. Reactive oxygen species in cancer, *Free Radical Research*. <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>
- Liu, X., Zhan, H., Zeng, X., Zhang, C., Chen, D., 2012. The PBDE-209 exposure during pregnancy and lactation impairs immune function in rats. *Mediators Inflamm.* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/692467>
- Ma, B., Wells, A., Clark, A.M., 2019. The pan-therapeutic resistance of disseminated tumor cells: Role of phenotypic plasticity and the metastatic microenvironment. *Semin. Cancer Biol.* 60, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.021>
- Marchi, M., 2019. No Title Efeito do TCDD e BDE-209 na citotoxicidade e expressão de proteínas transportadoras ABC, MDR1, MDR5, MRP1, MRP2, MRP4 em linhagem de melanoma murino B16F10. Universidade Federal do Paraná.
- McIntyre, R.L., Kenerson, H.L., Subramanian, S., Wang, S.A., Kazami, M., Stapleton, H.M., Yeung, R.S., 2015. Polybrominated diphenyl ether congener, BDE-47, impairs insulin sensitivity in mice with liver-specific Pten deficiency. *BMC Obes.* 2, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40608-014-0031-3>
- Mierke, C.T., 2008. Role of the Endothelium during Tumor Cell Metastasis: Is the Endothelium a Barrier or a Promoter for Cell Invasion and Metastasis? *J. Biophys.* 2008, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2008/183516>
- Miller, K.D., Nogueira, L., Mariotto, A.B., Rowland, J.H., Yabroff, K.R., Alfano, C.M., Jemal, A., Kramer, J.L., Siegel, R.L., 2019. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* 69, 363–385. <https://doi.org/10.3322/caac.21565>
- Milovanovic, V., Buha, A., Matovic, V., Curcic, M., Vucinic, S., Nakano, T., Antonijevic, B., 2018. Oxidative stress and renal toxicity after subacute exposure

- to decabrominated diphenyl ether in Wistar rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 7223–7230. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5921-5>
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology*. 2014 Apr 1;27:16-25. *Curr Opin Immunol* 27, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>.New
- Montalbano, A.M., Albano, G.D., Anzalone, G., Moscato, M., Gagliardo, R., Di Sano, C., Bonanno, A., Ruggieri, S., Cibella, F., Profita, M., 2020. Cytotoxic and genotoxic effects of the flame retardants (PBDE-47, PBDE-99 and PBDE-209) in human bronchial epithelial cells. *Chemosphere* 245. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125600>
- Morck, A., 2003. Decabromodiphenyl ether in the rats-absorption, distribution, metabolism and excretion. *Drug Metab. Dispos.* 31, 900–908.
- Nunes da Silva, C., Pasqual Melo, G., Santos Bernardes, S., Armani Cecchini, A., 2013. Experimental models of in vivo murine melanoma. *Biosaúde* 15, 73–80.
- Neupane, B.B., Jin, T., Gu, Z., Ligler, F.S., Wang, G., 2018. Polybrominated diphenyl ethers perturb axonal growth and actin distribution. *Bibechana* 16, 64–78. <https://doi.org/10.3126/bibechana.v16i0.21103>
- Orr, F.W., Wang, H.H., Lafrenie, R.M., Scherbarth, S., Nance, D.M., 2000. Interactions between cancer cells and the endothelium in metastasis. *J. Pathol.* 190, 310–329. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(200002\)190:3<310::AID-PATH525>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<310::AID-PATH525>3.0.CO;2-P)
- Peng, C., Chen, X., 2018. CD147 Is a Novel Chemotherapy or Prevention Target in Melanoma. *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.* 19, S91–S93. <https://doi.org/10.1016/j.jisp.2018.10.001>
- Pereira, L. C., de Souza, A. O., Meireles, G., Franco-Bernardes, M. F., Tasso, M. J., Bruno, V., ... & de Oliveira, D. P. (2016). Comparative Study of Genotoxicity Induced by Six Different PBDE s. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 119(4), 396-404.
- Pereira, L.C., Souza, A.O., Tasso, M.J., Oliveira, A.M.C., Duarte, F. V., Palmeira, C.M., Dorta, D.J., 2017. Exposure to decabromodiphenyl ether (BDE-209) produces mitochondrial dysfunction in rat liver and cell death. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* 80, 1129–1144. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1357370>
- Pourahmad, J., Amirmostofian, M., Kobarfard, F., Shahraki, J., 2009. Biological reactive intermediates that mediate dacarbazine cytotoxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65, 89–96. <https://doi.org/10.1007/s00280-009-1007-8>
- Qu, R., Li, C., Pan, X., Zeng, X., Liu, J., Huang, Q., Feng, J., Wang, Z., 2017. Solid surface-mediated photochemical transformation of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in aqueous solution. *Water Res.* 125, 114–122. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2017.08.033>
- Quail, D.F., Joyce, J.A., 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 19, 1423–1437. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>
- Renaud, H.J., Cui, J.Y., Khan, M., Klaassen, C.D., 2011. Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome p450 mRNAs in mice. *Toxicol. Sci.* 124, 261–277. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr240>
- Reuter, S., Gupta, S., Chaturvedi, M., Bharat Aggarwal, 2011. Oxidative stress, inflammation, and cancer. *Free Radic Biol Med* 49, 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.Oxidative
- Rice, D.C., Reeve, E.A., Herlihy, A., Thomas Zoeller, R., Douglas Thompson, W.,

- Markowski, V.P., 2007. Developmental delays and locomotor activity in the C57BL6/J mouse following neonatal exposure to the fully-brominated PBDE, decabromodiphenyl ether. *Neurotoxicol. Teratol.* 29, 511–520. <https://doi.org/10.1016/J.NTT.2007.03.061>
- Robichaud, N., Sonenberg, N., Ruggero, D., Schneider, R.J., 2019. Translational control in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032896>
- Rocha-Gutiérrez, B.A., Peralta-Pérez, M. del R., Zavala-Díaz de la Serna, F.J., 2015. Revisión global de los contaminantes emergentes PBDE y el caso particular de México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 31, 311–320.
- Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J.M., 2013. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 2721–2725. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>
- Schechter, A., Pavuk, M., Pöpke, O., Ryan, J.J., Birnbaum, L., Rosen, R., 2003. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in U.S. mothers’ milk. *Environ. Health Perspect.* 111, 1723–1729. <https://doi.org/10.1289/ehp.6466>
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman’s reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)
- Severo, 2017. Análise de biomarcadores em jundiás (*Rhamdia quelen*) expostos in situ como uma ferramenta de avaliação ambiental. Universidade federal de santa maria.
- Shibue, T., Weinberg, R.A., 2017. EMT, CSCs, and drug resistance: The mechanistic link and clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, 611–629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>
- Sjödin, A., Pöpke, O., McGahee, E., Focant, J.-F., Jones, R.S., Pless-Mulloli, T., Toms, L.-M.L., Herrmann, T., Müller, J., Needham, L.L., Patterson, D.G., 2008. Concentration of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in household dust from various countries. *Chemosphere* 73, S131–S136. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2007.08.075>
- Skvortsova, I., 2019. Special Issue “Enigmatic tumor properties associated with metastatic spread” seminars in cancer biology, volume XX. *Semin. Cancer Biol.* 60. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.10.021>
- Soengas, M. S., & Lowe, S. W. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*, 22(20), 3138-3151.
- Sosa, V., Moliné, T., Somoza, R., Paciucci, R., Kondoh, H., LLeonart, M.E., 2013. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res. Rev.* 12, 376–390. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.10.004>
- Sperduto, P.W., Yang, T.J., Beal, K., Pan, H., Brown, P.D., Bangdiwala, A., Shanley, R., Yeh, N., Gaspar, L.E., Braunstein, S., Sneed, P., Boyle, J., Kirkpatrick, J.P., Mak, K.S., Shih, H.A., Engelman, A., Roberge, D., Arvold, N.D., Alexander, B., Awad, M.M., Contessa, J., Chiang, V., Hardie, J., Ma, D., Lou, E., Sperduto, W., Mehta, M.P., 2017. Estimating survival in patients with lung cancer and brain metastases an update of the graded prognostic assessment for lung cancer using molecular markers (Lung-molGPA). *JAMA Oncol.* 3, 827–831. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.3834>
- Steil, G., 2016. Efeitos do TCDD (2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-P-dioxina) e BDE-209 (Decabromodifenil éter) na malignidade de células de melanoma murino B16F1 in vitro. Universidad Federal do Paraná.
- Sudhakar, A., 2009. *J Cancer Sci Ther* 1, 1–4.

5956.100000e2.History

- Sun, R.B., Shang, S., Zhang, W., Lin, B.C., Wang, Q., Shi, Y., Xi, Z.G., 2018. Endocrine Disruption Activity of 30-day Dietary Exposure to Decabromodiphenyl Ethane in Balb/C Mouse. *Biomed. Environ. Sci.* 31, 12–22. <https://doi.org/10.3967/bes2018.002>
- Tagliaferri, S., Caglieri, A., Goldoni, M., Pinelli, S., Alinovi, R., Poli, D., Pellacani, C., Giordano, G., Mutti, A., Costa, L.G., 2010. Low concentrations of the brominated flame retardants BDE-47 and BDE-99 induce synergistic oxidative stress-mediated neurotoxicity in human neuroblastoma cells. *Toxicol. Vitro.* 24, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.08.020>
- Tawbi, H.A., Kirkwood, J.M., 2007. Management of Metastatic Melanoma. *Semin. Oncol.* 34, 532–545. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINONCOL.2007.09.008>
- Trinh, V.A., 2008. Current management of metastatic melanoma. *Am. J. Heal. Pharm.* 65, 3–9. <https://doi.org/10.2146/ajhp080460>
- Triozi, P. L., Achberger, S., Aldrich, W., Singh, A. D., Grane, R., & Borden, E. C. (2012). The association of blood angioregulatory microRNA levels with circulating endothelial cells and angiogenic proteins in patients receiving dacarbazine and interferon. *Journal of translational medicine*, 10(1), 241.
- Vaccher, V., Ingenbleek, L., Adegboye, A., Epiphane, S., Zié, A., Dada, A., Sika, C., Kisito, K.J., Koreissi, Y., Hu, R., Adbel, I., Cariou, R., Vénisseau, A., Veyrand, B., Marchand, P., Eyangoh, S., Verger, P., Dervilly-pinel, G., 2020. Levels of persistent organic pollutants (POPs) in foods from the first regional Sub-Saharan Africa Total Diet Study. *Environ. Int.* 135, 105413. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105413>
- Vagula, M.C., Kubeldis, N., Nelatury, C.F., 2011. Effects of BDE-85 on the Oxidative Status and Nerve Conduction in Rodents. *Int. J. Toxicol.* 30, 428–434. <https://doi.org/10.1177/1091581811411109>
- Vaiopoulos, A.G., Kostakis, I.D., Gkioka, E., Athanasoula, K.C., Pikoulis, E., Papalambros, A., Christopoulos, P., Gogas, H., Kouraklis, G., Koutsilieris, M., 2014. Detection of circulating tumor cells in colorectal and gastric cancer using a multiplex PCR assay. *Anticancer Res.* 34, 3083–3092.
- Vosoughi, E., Lee, J.M., Miller, J.R., Nosrati, M., Minor, D.R., Abendroth, R., Lee, J.W., Andrews, B.T., Leng, L.Z., Wu, M., Leong, S.P., Kashani-Sabet, M., Kim, K.B., 2018. Survival and clinical outcomes of patients with melanoma brain metastasis in the era of checkpoint inhibitors and targeted therapies. *BMC Cancer* 18, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4374-x>
- Wang, Y., Sun, Y., Chen, T., Shi, Z., Zhou, X., Sun, Z., Zhang, L., Li, J., 2018. Determination of polybrominated diphenyl ethers and novel brominated flame retardants in human serum by gas chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1099, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.09.015>
- WebMD, 2020. Chemotherapy: How It Works and How You'll Feel [WWW Document]. URL <https://www.webmd.com/cancer/chemotherapy-what-to-expect#1> (accessed 2.23.20).
- Weijs, L., Covaci, A., Yang, R. S., Das, K., & Blust, R. (2012). Computational toxicology: Physiologically based pharmacokinetic models (PBPK) for lifetime exposure and bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in marine mammals. *Environmental pollution*, 163, 134-141.
- Wu, J., Wu, D., Zhang, L., Lin, C., Liao, J., Xie, R., Li, Z., Wu, S., Liu, A., Hu, W., Xi, Y., Bu, S., Wang, F., 2019. NK cells induce hepatic ER stress to promote insulin

- resistance in obesity through osteopontin production. *J. Leukoc. Biol.* 1–8. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MA1119-173R>
- Xu, L., Huo, X., Zhang, Y., Li, W., Zhang, J., Xu, X., 2015. Polybrominated diphenyl ethers in human placenta associated with neonatal physiological development at a typical e-waste recycling area in China. *Environ. Pollut.* 196, 414–422. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2014.11.002>
- Zhai, J., Geng, X., Ding, T., Li, J., Tang, J., Chen, D., Cui, L., Wang, Q., 2019. An increase of estrogen receptor α protein level regulates BDE-209-mediated blood-testis barrier disruption during spermatogenesis in F1 mice. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 4801–4820. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3784-2>
- Zhang, W., Gao, J., Cheng, C., Zhang, M., Liu, W., Ma, X., Lei, W., Hao, E., Hou, X., Hou, Y., Bai, G., 2020. Cinnamaldehyde enhances antimelanoma activity through covalently binding ENO1 and exhibits a promoting effect with dacarbazine. *Cancers (Basel)* 12, 1–15. <https://doi.org/10.3390/cancers12020311>
- Zhi, H., Wu, J.P., Lu, L.M., Li, Y., Chen, X.Y., Tao, J., Mai, B.X., 2018. Decabromodiphenyl ether (BDE-209) enhances foam cell formation in human macrophages via augmenting Toll-like receptor 4-dependent lipid uptake. *Food Chem. Toxicol.* 121, 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.024>
- Zhu, Y., Li, X., Liu, J., Zhou, G., Yu, Y., Jing, L., Shi, Z., Zhou, X., Sun, Z., 2019. The effects of decabromodiphenyl ether on glycolipid metabolism and related signaling pathways in mice. *Chemosphere* 222, 849–855. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.003>