

-UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISLEINE JARENKO STEIL

EFEITOS DO TCDD (2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO-P-DIOXINA) E BDE-
209 (DECABROMODIFENIL ÉTER) NA MALIGNIDADE DE CÉLULAS DE
MELANOMA MURINO B16-F1 *in vitro*

CURITIBA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISLEINE JARENKO STEIL

EFEITOS DO TCDD (2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO-P-DIOXINA) E BDE-
209 (DECABROMODIFENIL ÉTER) NA MALIGNIDADE DE CÉLULAS DE
MELANOMA MURINO B16-F1 *in vitro*

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA

2016

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

Steil, Gisleine Jarenko.

Efeitos do TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) e BDE-209
(decabromodifenil éter) na malignidade de células de melanoma murino B16-
F1 *in vitro*. / Gisleine Jarenko Steil – Curitiba, 2016.
98 f. : il.

Orientador: Francisco Filipak Neto.

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

1. Melanoma. 2. Toxicologia. 3. Células cancerosas. 4. Câncer –
Pesquisa. 5. Pele – Câncer. 6. Tumores. I. Título. II. Filipak Neto, Francisco.
III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 616.5

Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
PARECER



A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Orientador e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer
Universidade Federal do Paraná

Prof. Dr. Rodrigo de Cássio da Silva
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Suplente:

Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Universidade Federal do Paraná

Após arguir a mestrand **Gisleine Jarenko Stell**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Efeitos do TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) e BDE-209 (decabromodifenil éter) na malignidade de células de melanoma murino B16-F1 *in vitro*", os membros da banca examinadora são de parecer favorável à APROVAÇÃO..... da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de Março de 2016

Prof. Dr. Ciro Alberto da Oliveira Ribeiro
Coord. do Programa de Pós-Graduação
Em Biologia Celular e Molecular
Matr./UFPR 104132

Centro Politécnico
Rua Heráclito Domingos dos Santos s/n | Jardim das Américas
Caixa Postal: 19031 | CEP: 81.531-980 | Curitiba | Paraná | Brasil
Fone: 55.41.3361-1676

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Filipak Neto, por todas as orientações no presente trabalho e na minha vida acadêmica, pelo sublime apoio e compreensão sempre.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná por todo apoio ofertado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e o Ministério da Educação pela concessão da bolsa durante todo o período de realização do meu mestrado.

Ao Laboratório de Toxicologia Celular e respectivos professores e colegas pelo acolhimento desde o ano de 2012.

Aos colegas da seleção de Mestrado e Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular com entrada 1º/2014 pelo companheirismo e troca de experiências durante todo o período do curso.

Aos meus familiares: vó que sempre pode me oferecer uma boa educação; mãe que sempre me apoiou nas decisões pessoais e profissionais mais importantes; assim como tios e tias, primo e primas, irmãs, obrigada por existirem e por todo o amor.

Ao meu pai, sei que está orgulhoso da sua filha mais velha. Onde quer que você esteja, sei que você foi fundamental para eu chegar onde cheguei e sempre será importante para as futuras conquistas.

Aos amigos verdadeiros que posso contar nos dedos, mas posso contar sempre. Que os anos sempre nos forneçam motivos para comemorar e sorrir.

“*Omnis cellula e cellula*’. Toda célula procede de outra célula. Toda célula nasce de uma que a antecede, que se formou a partir de uma anterior. A vida procede da vida (...)”

A culpa é das estrelas, John Green, 2012.

RESUMO

Apesar de a quimioterapia ser o principal tratamento utilizado para tumores, em muitos casos ocorre resistência das células tumorais ao tratamento, piorando o prognóstico. O melanoma é a forma mais letal de câncer de pele, sendo altamente metastático e uma linhagem utilizada para estudos relacionados é B16-F1 que é metastática e pode ser utilizada para estudos *in vitro* e *in vivo*. O surgimento de alguns tipos de cânceres apresenta relação com fatores ambientais como, por exemplo, contaminantes ambientais. O TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina) e o BDE-209 (decabromodifenil éter) são contaminantes que podem bioacumular nos estoques de gordura do organismo e ser disponibilizados quando há utilização destes estoques, sendo assim, surge a questão se esses contaminantes poderiam aumentar a agressividade de células tumorais, interferirem no tratamento e piorar o prognóstico da doença. Portanto, o objetivo do presente trabalho é avaliar se a exposição ao TCDD e BDE-209 afeta a malignidade de células tumorais utilizando a linhagem B16-F1 *in vitro*. As células foram cultivadas e expostas às concentrações: 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 nM dos dois contaminantes durante 24 horas. Houve redução da retenção do corante vermelho neutro (relacionado com integridade do sistema endomembranas) e proliferação (com 10% de SBF) nas maiores concentrações de BDE-209, além de aumento do metabolismo do MTT na concentração de 10 nM, sugerindo maior estresse celular nessas concentrações. Ocorreu maior citotoxicidade na concentração de 0,01 nM (BDE-209) e 0,1 nM (TCDD). Não ocorreu alteração nos parâmetros de atividade de transportadores de efluxo de drogas e produção de espécies reativas de oxigênio. Houve aumento da proliferação celular de forma dependente da concentração para a maioria das concentrações de ambos os contaminantes em células expostas utilizando 2% de SFB. Houve alterações nas fases do ciclo celular: o TCDD aumentou a quantidade de células na fase S (0,001 nM) e diminuiu a quantidade de células na fase G2/M (10 nM); já o BDE-209 diminuiu a quantidade de células na fase G1 (0,01 nM) e aumentou a quantidade de células na fase S (0,1 nM). No grupo exposto a 1 nM de BDE-209 houve maior fechamento do risco no ensaio *scratch*. A viabilidade e a proliferação de células expostas ao contaminante BDE-209 e posteriormente ao quimioterápico dacarbazina foram aumentadas na maioria dos grupos expostos. Já para o contaminante TCDD houve aumento de viabilidade apenas na concentração de 0,1 nM e, apesar de apresentar um aumento de proliferação de forma concentração-dependente, apenas na concentração de 10 nM foi significativa. Como conclusão, para algumas concentrações de ambos os contaminantes utilizados, as células tumorais B16-F1 apresentaram características que permitem considerá-las mais agressivas, como aumento de resistência ao quimioterápico dacarbazina, proliferação e fechamento de *scratch*, sendo condizentes com a hipótese do presente trabalho.

Palavras-chave: Melanoma. Toxicologia. *in vitro*. Malignidade tumoral. Resistência tumoral.

SUMMARY

Although chemotherapy is the main treatment used for tumors, in many cases there is resistance of tumor cells to the treatment, worsening the prognosis. Melanoma is the most lethal form of skin cancer, being highly metastatic and a strain used for related studies is B16-F1 which is metastatic and can be used for in vitro and in vivo studies. The emergence of some types of cancer is related to environmental factors such as environmental contaminants. TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) and BDE-209 (decabromodiphenyl ether) are contaminants that can bioaccumulate in the body's fat stores and become available when these stores are used. The question whether these contaminants could increase the aggressiveness of tumor cells, interfere with the treatment and worsen the disease's prognosis. Therefore, the aim of the present work is to evaluate whether exposure to TCDD and BDE-209 affects the malignancy of tumor cells using the B16-F1 lineage in vitro. Cells were cultured and exposed to concentrations: 0.001; 0.01; 0.1; 1 and 10 nM of the two contaminants for 24 hours. There was a reduction in the retention of neutral red dye (related to the integrity of the endomembrane system) and proliferation (with 10% SBF) at the highest concentrations of BDE-209, in addition to an increase in MTT metabolism at a concentration of 10 nM, suggesting greater cell stress at these concentrations. There was greater cytotoxicity at concentrations of 0.01 nM (BDE-209) and 0.1 nM (TCDD). There was no change in the activity parameters of drug efflux transporters and production of reactive oxygen species. There was a concentration-dependent increase in cell proliferation for most concentrations of both contaminants in cells exposed using 2% FCS. There were changes in cell cycle phases: TCDD increased the number of cells in the S phase (0.001 nM) and decreased the number of cells in the G2/M phase (10 nM); BDE-209, on the other hand, decreased the number of cells in the G1 phase (0.01 nM) and increased the number of cells in the S phase (0.1 nM). In the group exposed to 1 nM of BDE-209, there was greater risk closure in the scratch assay. The viability and proliferation of cells exposed to the contaminant BDE-209 and later to the chemotherapeutic drug dacarbazine were increased in most exposed groups. As for the TCDD contaminant, there was an increase in viability only at the concentration of 0.1 nM and, despite showing an increase in proliferation in a concentration-dependent manner, only at the concentration of 10 nM it was significant. In conclusion, for some concentrations of both contaminants used, the B16-F1 tumor cells presented characteristics that allow us to consider them more aggressive, such as increased resistance to the chemotherapeutic drug dacarbazine, proliferation and scratch closure, which are consistent with the hypothesis of the present work.

Palavras-chave: Melanoma. Toxicology. in vitro. Malignancy. Tumor resistance.

SUMÁRIO

1. Introdução	7
2. Revisão Bibliográfica	8
2.1. Aspectos sobre o câncer	8
2.2. Contaminantes ambientais e câncer	18
2.2.1. A Tetraclorodibenzo-p-dioxina (tcdd)	20
2.2.2. O Decabromodifenil éter (bde-209)	24
2.3. Modelo experimental	28
3. Problema	30
4. Hipótese	30
5. Justificativa	30
6. Objetivos	31
6.1. Objetivo geral	31
6.2. Objetivos específicos e metas	31
7. Material e métodos	32
7.1. Desenho experimental	32
7.2. Exposição aos xenobióticos	32
7.3. Determinação das concentrações e diluição dos contaminantes	33
7.4. Análise da morfologia celular	34
7.5. Viabilidade celular e citotoxicidade	34
7.5.1. Ensaio do Vermelho Neutro	34
7.5.2. Ensaio do MTT	35
7.5.3. Ensaio da Anexina V/PI	35
7.6. Ensaio do Cristal Violeta	36
7.7. Espécies reativas de oxigênio (sonda DCF)	36
7.8. Atividade de transportadores de efluxo de drogas	37
7.9. Ensaio com o quimioterápico dacarbazina	37
7.9.1. Seleção da concentração de dacarbazina	38
7.9.2. Viabilidade com quimioterápico – Vermelho Neutro	38
7.9.3. Proliferação celular com quimioterápico – Cristal Violeta	39
7.10. Determinação do ciclo celular	39
7.11. Ensaio <i>scratch</i>	40
7.12. Ensaio clonogênico	41
7.13. Análises estatísticas	41
8. Resultados	42
8.1. Morte celular	42
8.2. Ensaio do vermelho neutro e de proliferação celular com 10% de SBF	44
8.3. Ensaio do MTT	46
8.5. Atividade de transportadores de efluxo de drogas	47
8.6. Produção de EROS	48

8.7. Ensaio de proliferação celular com 2% de SFB.....	49
8.8. Ciclo celular.....	50
8.9. Ensaio <i>scratch</i>	51
8.10. Ensaio com o quimioterápico.....	54
8.10.1 Determinação da concentração de dacarbazina	54
8.10.2. Viabilidade com quimioterápico – vermelho neutro	54
8.10.3. Proliferação celular com quimioterápico	56
8.11. Ensaio clonogênico.....	57
8.12. Resumo dos resultados.....	57
9. Discussão	59
9.1. Exposição ao TCDD	59
9.2. Exposição ao BDE-209	75
10. Conclusões	84
11. Perspectivas futuras	85
12. Referências	87

1. INTRODUÇÃO

A cura de muitos tipos de câncer é um desafio atual para pesquisadores das áreas da saúde e tecnologia. Uma das grandes dificuldades para o êxito nesta questão é a ocorrência das diferentes respostas farmacológicas de cada paciente ao tratamento da doença (ZORNIG *et al.*, 2001).

Apesar do avanço da indústria farmacêutica no desenvolvimento de numerosas drogas quimioterápicas, a taxa de mortalidade para vários tipos de cânceres mantém-se alta (ALMEIDA *et al.*, 2005; INCA, 2014c; IARC, 2008; 2014). Este fato pode ocorrer quando com o tratamento existente não há um resultado satisfatório ou não ocorre uma resposta por uma longa duração ao tratamento, sugerindo, portanto, o desenvolvimento de resistência de células tumorais (GRAY-SHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; INDRAN *et al.*, 2011; TENTORI; LACAL; GRAZIANI, 2013).

Essa última ponderação é destaque neste trabalho, já que pesquisas demonstram que o aumento da resistência das células tumorais a tratamentos - como a quimioterapia - representam um pior prognóstico da doença podendo levar o paciente ao óbito (GRAY-SHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007); (TENTORI; LACAL; GRAZIANI, 2013). Contudo, há poucos estudos correlacionando o aumento da resistência de células tumorais à citotoxicidade de quimioterápicos em virtude da exposição a contaminantes ambientais. Esta questão é explorada no presente trabalho com o emprego de células de melanoma murino B16-F1 cultivadas *in vitro* e expostas aos contaminantes 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) e 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodifenil éter (BDE-209).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos sobre o câncer

Características das células tumorais

As características que distinguem as células tumorais das células normais é que determinam a complexidade desta doença e permitem a diversidade dos tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O processo de carcinogênese ou formação de tumor é normalmente dividido em três estágios. No estágio de iniciação, as células sofrem mutações espontâneas ou decorrentes do efeito de agentes carcinogênicos químicos, físicos ou biológicos que alteram genes importantes no controle da divisão e morte celular. No estágio de promoção, células iniciadas que forem viáveis proliferam mais que as células normais, adquirindo alterações genéticas ou epigenéticas adicionais. Por último, no estágio de progressão as células transformadas proliferam de forma descontrolada, formando um tumor (FIGURA1) (ALMEIDA *et al.*,2005; INCA, 2014b).

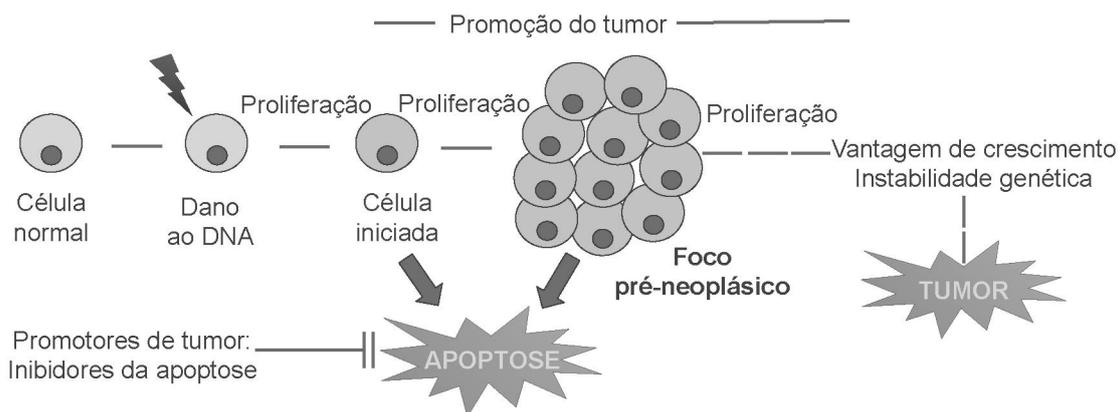


FIGURA 1. Processo simplificado de um processo carcinogênico. Fonte: BOELSTERLI (2007) com adaptações feitas pela autora.

A característica mais fundamental do câncer envolve, portanto, a capacidade aumentada de proliferação, ao contrário dos tecidos normais que

apresentam um controle eficiente sobre o crescimento e divisão celulares (ALBERTS *et al.*, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011; Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2014a).

Outra característica importante das células tumorais é o emprego de diferentes mecanismos para contornar ou limitar a apoptose, como a expressão de reguladores anti-apoptóticos ou de sinais de sobrevivência; a indução da angiogênese, necessária para o fornecimento de nutrientes e oxigênio, e para excreção de resíduos metabólicos das células tumorais; além da capacidade de invasão e metástase (FIGURA 2), que está associada com a perda da adesão célula-célula e com a matriz extracelular, relacionadas com a perda da E-caderina que é uma molécula de adesão celular (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Portanto, a patogenicidade dessa doença está relacionada com esses processos, já que as células alteradas evoluem de forma progressiva até um estado neoplásico (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

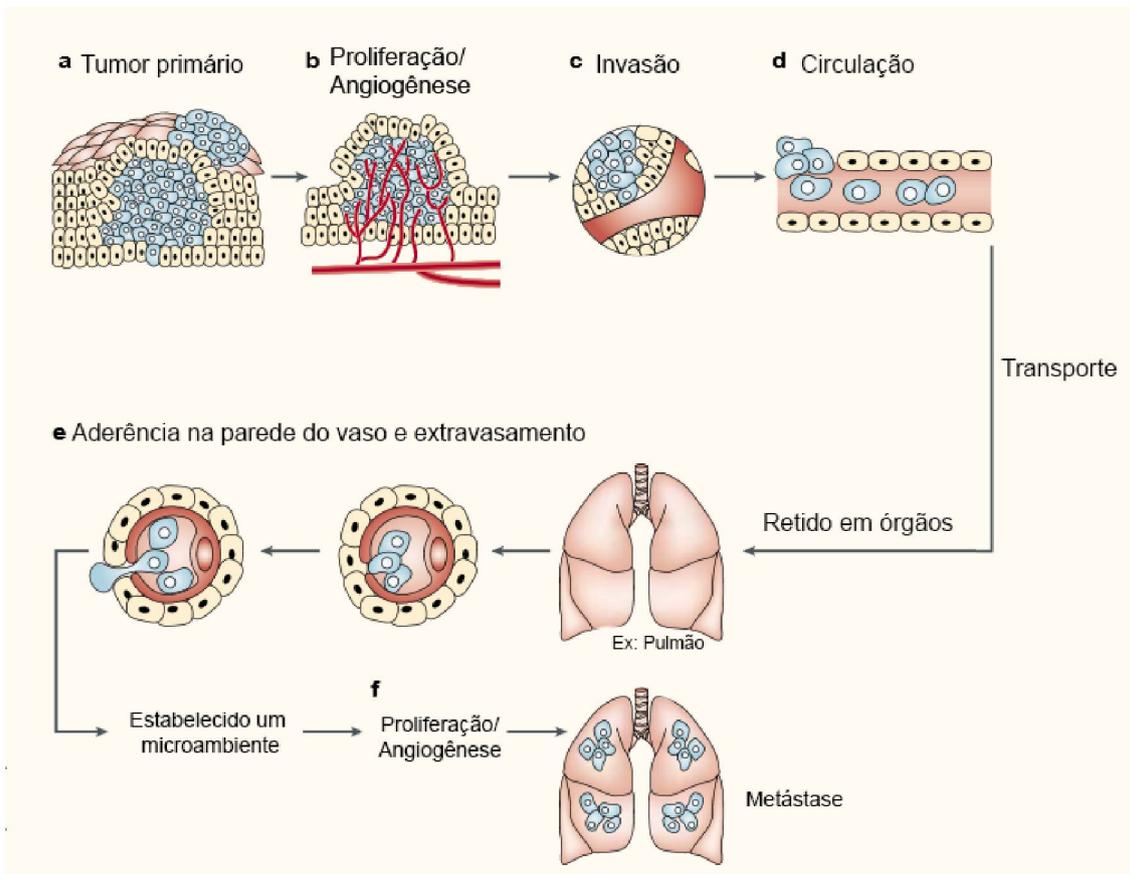


FIGURA 2. Etapas para a formação da metástase. a) transformação celular e crescimento do tumor; b) Aumento da vascularização e aumento do tumor; c) invasão e migração por perda de adesão celular; d) destacamento e acesso da célula tumoral ao vaso sanguíneo – através deste, a célula tumoral que sobrevive na circulação pode atingir outros órgãos e tecidos; e) saída da célula tumoral através do vaso sanguíneo; f) proliferação no órgão/tecido completa o processo metastático, um microambiente é estabelecido e inicia-se novamente um processo de vascularização. Essas células podem novamente invadir outros órgãos e tecidos, gerando metástases adicionais. Fonte: FIDLER (2003), com adaptações feitas pela autora.

Causas e incidência do câncer

O câncer é a maior causa de morbidade e mortalidade na Terra, representando cerca de 14 milhões de novos casos e 8 milhões de mortes notificados em 2012 (IARC, 2015). No Brasil, a previsão para 2016 é de 596 mil novos casos, sendo o câncer de pele o principal tipo (INCA, 2015). Até o ano de 2030, estima-se mais 27 milhões de novos casos no planeta (IARC, 2008).

Os agentes capazes de promover a iniciação ou progressão da carcinogênese são denominados carcinógenos. Os carcinógenos podem ser químicos, ambientais, genéticos e maus hábitos alimentares (ALMEIDA *et al.*, 2005), sendo os fatores ambientais relacionados com 80% a 90% dos casos de câncer (IARC, 2008). Contaminantes químicos, ao entrarem em contato com o organismo, podem ser armazenados, metabolizados (processo de biotransformação) ou prontamente excretados (ALMEIDA *et al.*, 2005). Em todos os casos, o potencial carcinogênico do composto ou dos produtos de seu metabolismo dependerá da natureza química do composto e do organismo em questão.

Câncer de pele

O câncer de pele é o tipo de câncer mais frequente no Brasil (25% dos cânceres registrados no país; INCA, 2016) e a exposição frequente e prolongada à radiação ultravioleta (UV), proveniente do Sol, corresponde a um fator ambiental de risco para esse tipo de câncer (MILLER; MIHM, 2006). Existem dois tipos de câncer de pele: o tipo não-melanoma é mais comum e apresenta menor taxa de letalidade; e o tipo melanoma, que representa 4% do total de incidência dos cânceres de pele (MILLER; MIHM, 2006; INCA, 2016) com cerca de 160 mil novos casos diagnosticados a cada ano em humanos no Planeta (USHER-SMITH *et al.*, 2014), sendo a previsão para o ano de 2016 no Brasil de cerca de 5.670 casos de cânceres de pele (INCA, 2016).

O aparecimento de casos de câncer do tipo melanoma vem aumentando de maneira uniforme, principalmente em alguns países da Europa e Estados Unidos (SEER, 2015; BAY *et al.*, 2015; AUSTIN *et al.*, 2013; JEMAL *et al.*,

2011), sugerindo um aumento de incidência global. A incidência do melanoma é maior em homens do que em mulheres, em brancos do que negros (SEER, 2012). Ainda, de acordo com levantamento de dados realizado pelo *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER, 2012) na população dos Estados Unidos, a incidência do melanoma aumentou em ambos os sexos desde o início da análise a partir de 1975. Ainda, foram estimados 73.870 casos e 9.940 mortes por melanoma no planeta em 2015 (SEER, 2015).

O tipo melanoma apresenta alta letalidade devido à sua grande capacidade metastática, sendo responsável por 80% das mortes relacionadas ao câncer de pele, e apenas 14% dos pacientes com melanoma sobrevivem por até cinco anos após o diagnóstico (MILLER; MIHM, 2006).

O surgimento do melanoma ocorre pela transformação progressiva dos melanócitos (MILLER; MIHM, 2006), que são células pigmentares especializadas localizadas principalmente na pele (GRAY-SHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). Os melanócitos são células que produzem melanina, cuja função normal é proteger os queratinócitos da pele da radiação UV proveniente do sol (GORANTLA; KIRKWOOD, 2014). E pela presença desta radiação, a proliferação e produção de melanina pelos melanócitos é regulada (GRAY-SHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

Existem dois tipos de radiação emitidas pelos raios solares UV: UV-A e UV-B. A exposição excessiva a essas radiações pode danificar diretamente o DNA e podem envolver a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SANDER *et al.*, 2003). Há indícios que a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) aumenta a migração de células de melanoma e este processo

– que está relacionado com maior malignidade da doença – portanto, pode ser desencadeado pela radiação ultravioleta (CHENG *et al.*, 2004).

O desequilíbrio nos níveis de EROs e capacidade de defesa antioxidante da célula podem também levar a um estresse oxidativo, causando danos em biomoléculas como, por exemplo, nos lipídios (peroxidação lipídica) e o DNA (SANDER *et al.*, 2003). Portanto, deve haver um equilíbrio celular entre a produção de EROs contrabalanceados por mecanismos de defesa antioxidante. Na pele estas defesas podem incluir enzimas como por exemplo a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), as quais estão envolvidas nesta homeostase (SANDER *et al.*, 2003).

Tratamento

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia. Podem ser utilizados de forma isolada ou combinada, dependendo da origem celular e do grau de malignidade das células tumorais (ALMEIDA *et al.*, 2005; NIJENHUIS *et al.*, 2014).

Em um tratamento quimioterápico podem ser utilizadas diversas drogas combinadas e o paciente pode sofrer severos efeitos colaterais como fraqueza, diarreia, perda ou aumento de massa corpórea, feridas na boca, queda de cabelo ou outros pelos do corpo, náusea, vômito e tonturas (INCA, 2014c).

A perda de massa corporal é um sintoma comum nos pacientes com câncer, o que está associado ao crescimento tumoral e aparecimento de metástases (SILVA, 2006). Nos casos de desnutrição em função do câncer, a principal perda de massa é pela metabolização do tecido adiposo e conseqüentemente perda de gordura (SILVA, 2006). Ainda, pacientes que

apresentam perda de peso normalmente diminuem a resposta ao tratamento, o que é inversamente relacionado com a sobrevida e a qualidade de vida do paciente (SILVA, 2006).

O tratamento mais indicado e utilizado para o câncer do tipo não-melanoma, que é menos agressivo e complexo, é cirurgia para a remoção do tumor (ALMEIDA *et al.*, 2005). Nas fases iniciais do câncer tipo melanoma também é possível este tratamento, porém ao progredir para o estado metastático o sucesso do tratamento diminui (GRAY-SHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). Sendo assim, a quimioterapia é o tratamento mais utilizado para câncer do tipo melanoma. Nesse tratamento são utilizados medicamentos citotóxicos para células tumorais, sendo que a maioria dessas drogas atua induzindo morte celular por apoptose (GRAY-SHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

A droga quimioterápica mais utilizada para o tratamento do melanoma é a Dacarbazina. Esta droga é classificada como inespecífica no ciclo celular, ou seja, afeta vários eventos durante todo o ciclo celular. Na fase S, previne a células de sintetizar DNA e RNA por inibição da síntese de ácidos nucleicos; na fase G2, a droga previne o desenvolvimento de elementos necessários para a mitose (como, por exemplo, as topoisomerases); na fase M, previne que a célula realize a mitose (WILKES; BARTON-BURKE, 2015). Em relação a efeitos colaterais, náuseas e vômitos ocorrem em 90% dos pacientes tratados com dacarbazina e podem ocorrer de forma moderada à severa, entretanto estes sintomas diminuem com dias consecutivos de administração da droga. A diarreia é incomum, porém a anorexia é comum, ocorrendo em 90% dos pacientes (WILKES; BARTON-BURKE, 2015).

Quimioterápicos e resistência tumoral

Além dos efeitos colaterais e nocivos que os quimioterápicos podem causar em pacientes durante o tratamento, o principal problema que afeta o prognóstico da doença é, em alguns casos, a elevada resistência das células tumorais aos agentes quimioterápicos (GRAY-SHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). Os agentes antineoplásicos são efetivos ao interferirem com o ciclo celular, resultando em morte celular. Porém quando células malignas sofrem mutação e ativam mecanismos para escapar da morte celular programada, podem não se tornar mais sensíveis à (s) droga (s), e a resistência surge (WILKES; BARTON-BURKE, 2015). O aperfeiçoamento de alguns destes mecanismos pode incluir o aumento da expressão de proto-oncogenes, permitindo que as células cancerosas resistam e sobrevivam a diferentes tratamentos em diversos tipos de câncer (ZORNING *et al.*, 2001; INDRAN *et al.*, 2011).

Muitas células de cânceres agressivos apresentam como principal mecanismo de resistência o aumento da expressão e da atividade de transportadores de efluxo de drogas pertencentes à superfamília ABC, caracterizando o fenótipo MDR (*multidrug resistance*) (LEVINE *et al.*, 1993). O gene MDR-1 codifica para a uma glicoproteína transmembrana, a glicoproteína-P (PgP), que por sua vez atua como uma bomba de efluxo dependente de ATP que bombeia agentes xenobióticos¹ para fora da célula (LEVINE *et al.*, 1993), resultando em um menor acúmulo intracelular de quimioterápicos, diminuindo a

¹ Xenobióticos: do grego *xeno* (estrangeiro) e *biótico* (relativo à vida). "Xenobióticos são compostos estranhos ao funcionamento do organismo ou não fazem parte do seu metabolismo ou nutrição normal. Exemplos de xenobióticos incluem fármacos, aditivos alimentares e poluentes ambientais" ISSX, (2016).

toxicidade destas drogas nas células tumorais e conseqüentemente diminuindo a mortalidade.

O fenótipo MDR ocorre intrinsecamente ou pode ser adquirido pela exposição a drogas antitumorais durante a quimioterapia (PERSIDIS, 1999), já que os tumores malignos apresentam populações de células heterogêneas e a quimioterapia induz apoptose primeiramente em células cancerosas mais sensíveis. Isto resulta em uma seleção das células mais resistentes, que eventualmente podem se tornar a maioria das células no tumor, tornando a quimioterapia ineficiente. Em função disso, o fenótipo MDR pode ser relacionado com uma menor sobrevida de pacientes com câncer (PERSIDIS, 1999).

Outra forma de resistência envolve mutações relacionadas com o gene BRAF (também conhecido como proto-oncogene B-Raf), estando presentes em aproximadamente 50-70% dos melanomas (NIJENHUIS *et al.*, 2013). Nas células normais, a ativação de BRAF promove a divisão celular, porém sua ativação excessiva causada por mutações pode levar ao crescimento tumoral (NIJENHUIS *et al.*, 2013). Cerca de 20% dos pacientes com melanoma contendo o gene BRAF mutado não respondem aos tratamentos quimioterápicos, o que demonstra resistência (NIJENHUIS *et al.*, 2013). As drogas quimioterápicas atualmente utilizadas para conter o crescimento das células com BRAF mutado são eficientes em alguns casos, porém as respostas podem ser temporárias, havendo reincidência da doença (NIJENHUIS *et al.*, 2013), demonstrando resistência tumoral.

Além disso, a supressão de proteínas pró-apoptóticas como a *Bax* (INDRAN *et al.*, 2011) também fornece resistência a células tumorais. O gene

que codifica para *Bax* é frequentemente suprimido ou mutado em cânceres, sendo que a mutação leva à perda de função, resultando na inibição da via intrínseca da apoptose mediada pela mitocôndria. Portanto, o silenciamento de genes que codificam para proteínas relacionadas com morte celular, bem como a regulação negativa causada por mutações destes pode proteger células cancerosas da morte celular (ZORNIG *et al.*, 2001; INDRAN *et al.*, 2011).

Outros mecanismos de resistência podem também envolver o aumento da expressão de proteínas *c-Flip* (proteína inibidora de FLICE) (regula a apoptose) e receptores *Decoy* (receptores do fator de necrose tumoral), que competem com receptores de indução de apoptose, inibindo a transdução do sinal de morte celular e assim tornando as células mais resistentes (INDRAN *et al.*, 2011).

Ainda, em muitos tipos de cânceres, o gene supressor de tumor p53 ou outros componentes da sua via estão mutados (ALBERTS *et al.*, 2010). A concentração da proteína p53 é aumentada principalmente quando ocorre lesão no DNA, sendo que nestes casos esta proteína pode induzir apoptose à célula lesionada ou parar o ciclo celular até que o DNA seja reparado (ALBERTS *et al.*, 2010). Os defeitos em vias de sinalização do p53 envolvem mecanismos de resistência em células cancerosas: a perda da função de supressão de tumor pela mutação do gene p53 pode levar ao desenvolvimento e progressão do câncer. A modulação dos reguladores de p53 também pode contribuir para instabilidade do genoma e resistência a apoptose (INDRAN *et al.*, 2011).

No caso do melanoma, mesmo com as diferentes drogas utilizadas no tratamento, a maioria dos pacientes doentes não obtém um benefício clínico de

longa duração, sugerindo o desenvolvimento de resistência neste tipo de células cancerosas (TENTORI; LACAL; GRAZIANI, 2013). Neste caso, o prognóstico dos pacientes piora consideravelmente quando o tumor se espalha além da epiderme, sendo a sobrevida média nesses casos de seis a nove meses (TENTORI; LACAL; GRAZIANI, 2013). Um fato que indica a relação com a elevada resistência do câncer tipo melanoma é que mesmo os melanócitos normais presentes na pele apresentam baixos níveis de apoptose em comparação com outras células humanas (GRAY-SHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007), por isso talvez células de melanoma tenham maior vantagem para escapar de mecanismos apoptóticos, resultando em uma maior sobrevivência e persistência destas células no organismo.

2.2. Contaminantes ambientais e câncer

Existem quase 110 milhões de substâncias químicas registradas atualmente (CAS - *Chemical Abstracts Service*, 2016). Dentre estas, algumas podem apresentar características de substâncias persistentes (resistentes à degradação no meio ambiente), podem apresentar capacidade de bioacumulação (acumulam em tecidos de organismos), podem ser potencialmente tóxicos, podendo causar vários danos à saúde dos indivíduos e ao meio ambiente e carcinogênicas, podendo causar alterações celulares e levar ao aparecimento de cânceres. Muitas substâncias químicas tóxicas – como contaminantes ambientais - podem alcançar longas distâncias afetando diferentes lugares do globo através do ar e da água, contaminando os solos e atingindo os alimentos (NTP, 2011).

Na União Europeia desde 2006 há um regulamento denominado *REACH* (*Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemical substances*),

com o objetivo de proteção da saúde humana e do meio ambiente em relação aos possíveis riscos que podem ser causados por produtos químicos, considerando aos conhecimentos da toxicologia (RIBEIRO-SANTOS, PINEHIRO, 2008; ECHA, 2016). Essa regulamentação envolve diversos processos como registros, autorizações, avaliações, restrições, legislação e jurisprudência e é considerado atualmente como um modelo a ser seguido por outros países, inclusive em relação ao controle de produção, distribuição e transporte de substâncias químicas (RIBEIRO-SANTOS, PINEHIRO, 2008; ECHA, 2016).

Já no Brasil, existe menor regulamentação em relação a substâncias químicas, muitas relacionadas com a legislação. De acordo com o a Lei Complementar Nº 140, de 8 de dezembro de 2011 “controlar a produção, a comercialização e o emprego de técnicas, métodos e substâncias que comportem risco para a vida, a qualidade de vida e o meio ambiente, na forma da lei” são ações administrativas da União, dos Estados e dos Municípios.

Um outro exemplo de regulamentação relacionada com a legislação é a Portaria Interministerial 19, de 29 de janeiro de 1981, qual estabelece proibição da fabricação, comercialização e uso de PCBs em todo território nacional, porém permite que os equipamentos já instalados continuem em funcionamento até a sua substituição integral ou troca do fluído dielétrico por produto isento de PCBs (BRASIL, 1981).

Para que a população brasileira fique mais ciente em relação a produção de substâncias químicas, na página da ABIQUIM (Associação Brasileira da Indústria Química) há uma ferramenta de busca chamada “*Brazilian Chemicals* – Produtos Químicos Brasileiros” onde é possível encontrar os fabricantes de

qualquer substância química de uso industrial produzida no Brasil (ABIQUIM, 2016). A existência desta ferramenta demonstra uma maior preocupação e transparência à respeito da produção destes produtos no país.

Ainda, a relação entre alguns tipos de contaminantes e o surgimento de diversos tipos de câncer é bem documentada, porém pouco se sabe sobre a influência da exposição a esses contaminantes no prognóstico de indivíduos com câncer. Por isso a importância do presente trabalho, onde foram selecionados dois contaminantes ambientais que pertencem a duas classes distintas: o TCDD e o BDE-209. Ambos têm distribuição global, são persistentes e com capacidade de bioacumulação.

2.2.1. A tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)

O 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD; FIGURA 3) é a molécula mais tóxica da classe das dioxinas. É classificado como agente em primeiro lugar do Grupo 1 “cancerígeno a humanos”, havendo evidências epidemiológicas suficientes da relação deste poluente com todos os tipos de cânceres (IARC, 2009). Sua toxicidade está relacionada com as moléculas de cloro nas posições 2, 3, 7 e 8 (*United Nations Environment Programme – UNEP, 2008; National Toxicology Program - NTP, 2011; World Health Organization – WHO, 2014*).

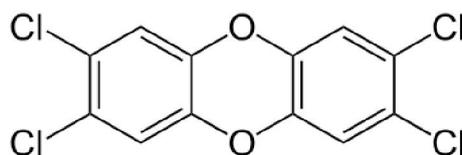


FIGURA 3. Fórmula química do TCDD (NTP, 2011)

O TCDD é um Poluente Orgânico Persistente (POP). Os POPs não degradam facilmente no meio ambiente, podem alcançar longas distâncias a partir do local de emissão e geralmente apresentam característica de bioacumulação na cadeia trófica por serem altamente lipofílicos, podendo acumular no tecido adiposo de animais (UNEP, 2008; NTP, 2006; 2011).

Esta substância química é popularmente conhecida como constituinte do desfolhante “Agente Laranja” utilizado na Guerra do Vietnã, embora também tenha sido utilizado na época como pesticida e herbicida (NTP, 2011). Atualmente não é mais fabricado comercialmente, exceto para pesquisas científicas (NTP, 2006; UNEP, 2008). Contudo, o TCDD continua sendo produzido como subproduto de processos industriais, como na fabricação de clorofenois e herbicidas, cloro para branqueamento de papel e fundições. Além disso, o TCDD pode ser gerado naturalmente em erupções vulcânicas e incêndios florestais (WHO, 2014).

Apesar de todas as classificações e comprovações de toxicidade, há uma exposição generalizada da população mundial ao TCDD, já que a exposição pode ocorrer através da ingestão, inalação e contato com a pele. É estimado que 90% da exposição humana ocorram através dos alimentos contaminados com o poluente; o restante é através da pele ou inalação (NTP, 2006). Ainda, de acordo com o *National Toxicology Program* (2006), estima-se que a ingestão diária de alimentos contaminados com dioxinas - incluindo o TCDD - em adultos é cerca de 25 pg por dia, sendo as principais fontes de contaminação humana os produtos lácteos (incluindo o leite materno), carne e peixes (UNEP, 2008; NTP, 2011; WHO, 2014). Para complementar, pesquisas recentes (IARC, 2015) incluíram o consumo de carnes vermelhas e

processadas como “potencialmente carcinogênicas” e “carcinogênicas”, respectivamente. Acredita-se que a presença de substâncias químicas como o TCDD é o que aumenta o potencial carcinogênico desses alimentos (DOMINGO; NADAL, 2016).

Após a ingestão, o TCDD é armazenado principalmente no fígado e em menor quantidade no tecido adiposo na forma original do composto. É eliminado principalmente pelas fezes e, em menor quantidade, pela urina (POLAND; KNUTSON, 1982 *apud* ROSE *et al.*, 1976). A biodisponibilidade do TCDD através da ingestão foi observada em fígado de ratos após ingestão de três amostras de solo contaminados e foi estimada em $43\pm 4\%$ (SHU *et al.*, 1988-a), e a biodisponibilidade através da pele foi aproximadamente 60% após 24 h de contato com o TCDD (SHU *et al.*, 1988-b).

A meia-vida do TCDD em humanos é de 5,8 a 11,3 anos. Em função de uma meia-vida relativamente longa, é sugerido que as respostas biológicas induzidas pelo TCDD ocorreriam em seres humanos após uma exposição prolongada a doses diárias baixas, para que assim desencadeasse respostas semelhantes às observadas em animais experimentais (NTP, 2011).

Alguns efeitos tóxicos do TCDD incluem alterações no desenvolvimento e reprodução, imunotoxicidade, teratogenicidade, carcinogenicidade e letalidade. Além disso, alguns estudos demonstram que o TCDD provoca câncer em humanos de maneira dose-dependente (NTP, 2006).

É demonstrado que as respostas bioquímicas e toxicológicas em animais de laboratório e seres humanos ocorrem por mecanismos de ação semelhantes (NTP, 2011), uma vez que tanto em humanos como em roedores, o mecanismo de toxicidade do TCDD envolve a ligação ao receptor Aril

Hidrocarbono (AHR), para o qual o TCDD apresenta uma alta afinidade. O receptor AHR possui também funções fisiológicas independentes da exposição a xenobióticos, como, por exemplo, na regulação do ciclo celular e apoptose.

A ligação específica entre o TCDD e o AHR causa dissociação da hsp90 e outras proteínas, resultando na translocação do AHR para o núcleo da célula. Ocorre, então, a heterodimerização com o ARNT (translocador nuclear do AHR) e ligação ao elemento de resposta à dioxina (DRE), permitindo que este complexo se ligue em seqüências de reconhecimento no DNA (FIGURA 4). Este processo resulta na ativação e transcrição de vários genes, que podem induzir aumento da produção de espécies reativas de oxigênio além das várias outras respostas celulares relacionadas à toxicidade do TCDD (NEBERT *et al.*, 2000; NTP, 2011; BOELSTERLI, 2007; MANDAL, 2005).

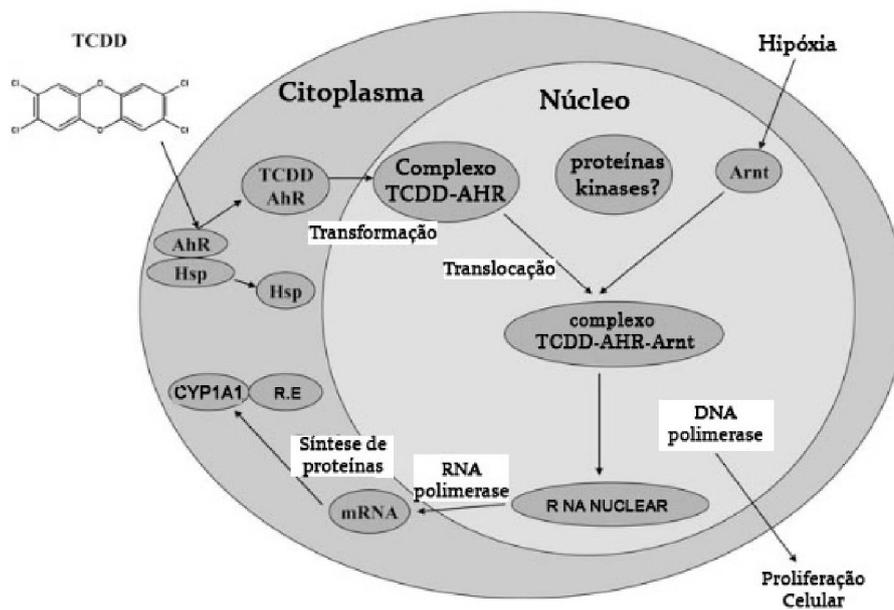


FIGURA 4. Modelo simplificado do mecanismo da toxicidade do TCDD via receptor AHR. R.E.= retículo endoplasmático; CYP1A1= Citocromo P450; AHR = receptor Aril Hidrocarbono; HSP = *heat shock protein*; ARNT = receptor de translocação nuclear; mRNA = RNA mensageiro. Fonte: MANDAL, 2005, traduzida pela autora.

Portanto, através da ligação ao receptor AHR, o TCDD causa várias respostas biológicas relacionadas com o desenvolvimento de cânceres, como mudanças na expressão gênica, alteração do metabolismo da célula e alterações no crescimento e diferenciação celular (PAAJARVI *et al.*, 2005). Além disso, o TCDD pode ter um papel na promoção de tumores, impedindo, por exemplo, a expressão do gene p53, gene supressor de tumor que na maioria dos tumores humanos está mutado (PAAJARVI *et al.*, 2005). Assim, o TCDD diminui a resposta dependente de p53 contra agentes capazes de causar danos ao DNA, aumentando a taxa de mutações que levam a formação de células cancerosas, ou diminuindo o número de células apoptóticas. Em conjunto, os efeitos tóxicos e carcinogênicos do TCDD podem ser relacionados com aumento da incidência de danos no DNA (PAAJARVI *et al.*, 2005).

Além disso, VILLANO *et al.* (2006) também sugerem que a exposição a contaminantes ambientais pode contribuir para a progressão do melanoma metastático, já que seus dados demonstram um estímulo do contaminante TCDD à expressão e atividade de proteínas relacionadas com invasão celular e metástase, parâmetros importantes para a malignidade de tumores (VILLANO *et al.*, 2006).

2.2.2. O decabromodifenil éter (BDE-209)

O 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodifenil éter (BDE-209; FIGURA 5) é um composto da classe dos éteres de difenil polibromados (PBDE). A fórmula química das moléculas difenil éter contém 10 átomos de hidrogênio e pode conter de 1 a 10 átomos de bromo, e qualquer átomo de hidrogênio pode ser

trocado com bromo, o que resulta em 209 possíveis congêneres (ALAE *et al.*, 2003).

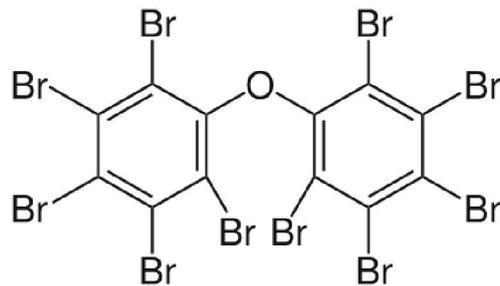


FIGURA 5. Fórmula química do BDE-209 (EPA, 2008).

Os PBDEs são compostos semelhantes às bifenilas policloradas (PCBs), e aparentemente agem de forma similar no meio ambiente, pois são persistentes e apresentam capacidade de bioacumulação ao longo da cadeia trófica (MCDONALD, 2002).

O BDE-209 é utilizado pela indústria como retardante de chama e utilizado em materiais como madeira, plásticos, papéis, utensílios de cozinha, aparelhos eletrônicos como computadores, circuitos, conectores, capas plásticas e cabos e em coberturas de televisão (HARDY, 2000; PESTANA *et al.*, 2008). Este composto é utilizado para tornar os materiais mais resistentes ao fogo ou altas temperaturas (PESTANA *et al.*, 2008); porém, em casos de incineração desses materiais, grande quantidade de fumaça e gases tóxicos – como dioxinas e furanos – é produzida, podendo desencadear vários efeitos tóxicos (DARNERUD *et al.*, 2008).

Portanto, os PBDEs podem ser lançados no ambiente pelas indústrias durante a manufatura desses compostos, pela produção de materiais que contém esses PBDEs ou pelo descarte incorreto desses materiais, contaminando o meio ambiente (PESTANA *et al.*, 2008), por exemplo através

da lixiviação de materiais que contenham BDE-209, como o lixo eletrônico (JIANG *et al.* 2014).

Dados sobre a toxicocinética do BDE-209 indicam que ele é absorvido pelos humanos a partir do ambiente, principalmente por via oral, e então distribuído para os tecidos (EPA, 2008). Os PBDEs estão presentes em alimentos como produtos lácteos, carne, peixe e poeira doméstica; portanto alimentos e o ambiente doméstico são as grandes fontes de exposição (WU *et al.*, 2007). Na China são encontradas altas concentrações de PBDEs em amostras de poeira e alimentos coletados em áreas próximas a lixos eletrônicos. As concentrações de PBDE nas amostras de poeira diminuem com a distância do centro de reciclagem de lixo eletrônico, sendo que neste caso, o PBDE mais presente é o BDE-209 (JIANG *et al.* 2014).

Em 1988, foram encontradas quantidades 0-35 pmol de BDE/g lipídios em amostras de sangue de humanos nos Estados Unidos da América (EUA) (MASTEN, 2001). Naquele país, a exposição generalizada ao BDE-209 é observada pelos níveis de PBDEs encontrados em tecidos (8000 ng/kg de lipídios no tecido adiposo) em indivíduos de todo o país e de todas as faixas etárias (MASTEN, 2001).

Estudos mais recentes com adultos e crianças da Califórnia (EUA) demonstram que o BDE-209 está presente em 16% do total de BDEs detectados no soro do sangue, sendo que foi detectado 24% desse congêneres no soro de crianças, 8% no soro dos pais e 20% em adultos mais velhos (WU *et al.*, 2015).

Além da exposição de crianças através do leite materno, um dos motivos para a alta quantidade encontrada em crianças podem ser brinquedos

atualmente produzidos contendo BDE-209, já que o trabalho de Ionas *et al.* (2016) sugere que a exposição de crianças ao BDE-209 em brinquedos de “morder” é maior do que a exposição através da dieta ou poeira. Outro fato relacionado indica que PBDEs têm a capacidade de bioacumular na placenta humana e provavelmente contribuem para a exposição pré-natal (LEONETTI *et al.*, 2016).

Os efeitos tóxicos de PBDEs ocorrem em nível celular ao se ligarem em receptores de superfície celular e ativando fatores de transcrição (EPA, 2008). As semelhanças estruturais entre PBDEs e PCBs sugerem ainda que BDEs podem ativar o receptor AHR e o receptor de estrogênio (ER), que são os mesmos receptores relacionados com a toxicidade do TCDD e que estão associado com seus efeitos carcinogênicos e reprodutivos (EPA, 2008).

Em ratos, após exposição via oral, a excreção ocorre através das fezes, com 90% da dose excretada após três dias. Já o restante é distribuído entre diversos tecidos, como rins, coração e fígado. Sendo que, ao considerar o peso lipídico, o plasma e o fígado apresentam as maiores concentrações após 3 e 7 dias (MORK *et al.*, 2003).

No Brasil, atualmente, não existem restrições legais para o uso de PBDEs (PESTANA *et al.*, 2008) nem há regulamentação para o uso e descarte do BDE-209 (ALAE *et al.*, 2003), que é produzido e utilizado largamente em vários países (CHEN *et al.*, 2012). No entanto, tem-se demonstrado um aumento dessas substâncias no meio ambiente e em tecidos humanos, o que pode ser considerado perigoso para a saúde humana (CHEN *et al.*, 2012).

2.3. Modelo experimental

A grande vantagem da utilização de linhagens tumorais *in vitro* é a possibilidade de avaliar vários parâmetros e fazer diversos testes, reduzindo a utilização de animais em testes *in vivo* para testar uma hipótese.

Há diferentes modelos experimentais para estudos de melanoma, envolvendo diversas sublinhagens de células B16. As linhagens de melanoma murino B16-F0, B16-F1 e B16-F10 são originárias dos melanócitos da pele de camundongo *Mus musculus*; ambas são células aderentes capazes de produzir melanina *in vitro* e podem ser transfectadas para experimentos *in vivo* (ATCC, 2016). A escolha de uma ou mais dessas linhagens em estudos depende da hipótese apresentada, já que podem responder diferentes parâmetros, pois apresentam características próprias de cada linhagem.

A B16-F0 é uma linhagem que produz abundantemente pigmentos de melanina e é amplamente utilizada para elucidar a melanogênese e mecanismos de regulação da proliferação de células de pigmentares (PINON *et al.*, 2011).

As linhagens de células B16-F1 e B16-F10 foram selecionadas de acordo com sua capacidade de formar nódulos tumorais pulmonares, que foram obtidos através da injeção de células tumorais B16 em camundongos geneticamente idênticos por repetidas vezes. Após repetidas injeções, foram obtidas sucessivamente as linhagens B16-F1 e B16-F10, cuja as denominações são referentes ao aumento do número de nódulos tumorais pulmonares obtidos através dessa técnica (FIDLER, 1975). Portanto, comparativamente, a linhagem B16-F1 (FIGURA 6) tem potencial metastático menor e a B16-F10 apresenta alto potencial metastático (HART; SMITH 1986)

e maior taxa de proliferação (DANCIU *et al.*, 2013). Para o presente trabalho, a linhagem B16-F1 foi selecionada como modelo experimental já que, para observar efeitos de maior malignidade causada por contaminantes, seria mais facilmente observá-los em uma célula que não está no seu limite de malignidade (assim como na linhagem B16-F10).

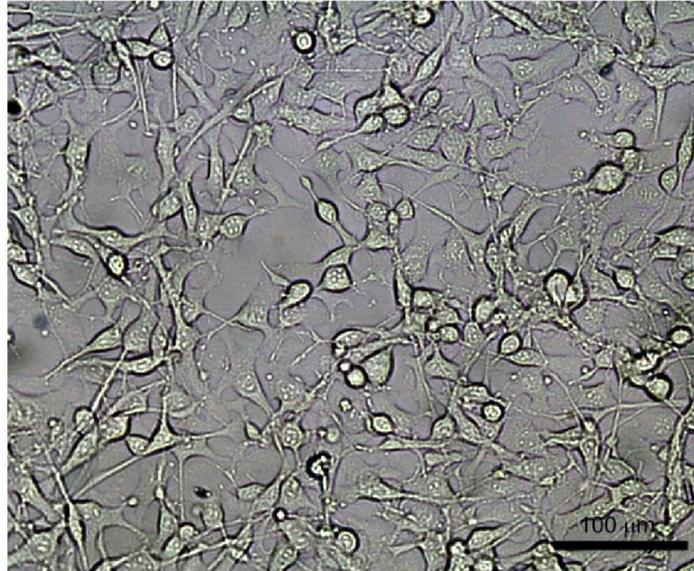


FIGURA 6. Células de melanoma murino B16-F1 em cultivo celular em alta densidade.

Fonte: A autora (2016).

3. PROBLEMA

O efeito carcinogênico de muitos contaminantes é reconhecido e bem investigado. Contudo, mesmo os contaminantes considerados como não-carcinogênicos podem alterar a expressão gênica e metabolismo de células normais e neoplásicas. Nestes casos, uma questão que merece investigação é se a exposição de indivíduos com câncer a contaminantes ambientais poderia levar a alterações no fenótipo das células tumorais e assim aumentar a agressividade dessas células, piorando o prognóstico. Para obter parte da resposta, a interferência de contaminantes em parâmetros como viabilidade, metabolismo, proliferação, migração, ciclo celular, atividade de transportadores de efluxo de drogas, produção de espécies reativas de oxigênio e interação com o quimioterápico foram investigados em células de melanoma murino B16-F1.

4. HIPÓTESE

Os contaminantes TCDD e BDE-209 interferem com o fenótipo da linhagem B16-F1, aumentando seu perfil carcinogênico e de resistência tumoral, tornando-as, portanto, mais agressivas.

5. JUSTIFICATIVA

O número de novos casos de câncer cresce a cada ano e mesmo com novas drogas empregadas para o tratamento, a aquisição de resistência à quimioterapia continua a ser um grande problema. Sabe-se que muitos contaminantes ambientais são carcinogênicos, porém pouco se sabe sobre a ação de poluentes no prognóstico de pacientes com câncer. Considerando essas informações, a capacidade do TCDD e BDE-209 de alterar

características celulares importantes para a malignidade das células B16-F1 foi investigada.

6. OBJETIVOS

6.1. *Objetivo geral*

Investigar se a exposição aos poluentes TCDD e BDE-209 afeta parâmetros de malignidade de células tumorais da linhagem B16-F1.

6.2. *Objetivos específicos e metas*

- Verificar se a morfologia, viabilidade celular, citotoxicidade, proliferação, capacidade de formação de colônias, morte celular e ciclo celular em células B16-F1 são alteradas quando expostas ao TCDD e BDE-209;

- Verificar se a proliferação celular, ciclo celular e a migração e proliferação através do ensaio *scratch* realizando a exposição com apenas 2% de SFB são alterados em células B16-F1 quando expostas ao TCDD e BDE-209;

- Verificar se a atividade de transportadores de efluxo de drogas do sistema MDR, a geração de estresse oxidativo e a migração de células B16-F1 são alteradas pela exposição ao TCDD e BDE-209;

- Verificar se há aumento da resistência (maior viabilidade e proliferação) das células B16-F1 quando expostas previamente aos contaminantes e ao quimioterápico dacarbazina.

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1. Desenho experimental

Células de melanoma murino B16-F1 foram cultivadas e plaqueadas em meio *Eagle Modificado por Dulbecco* (DMEM), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 40 µg/ml de gentamicina a 37 °C e 5% de CO₂. Para os ensaios em microplaca de 96 poços, 5 x 10³ células/poço foram plaqueadas, cada poço com 200 µl de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Para os ensaios em microplaca de 24 e 6 poços foram plaqueadas 3 x 10⁴ e 2,5 x 10⁵ células por poço, com 1 ml e 2 ml de meio, respectivamente.

7.2. Exposição aos xenobióticos

Após as células aderirem por 24 h, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM suplementado com 10% (ou 2% de SFB, no caso dos ensaios proliferação celular e ciclo celular) e 40 µg/ml de gentamicina, contendo os contaminantes TCDD ou BDE-209 nas concentrações 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 nM diluídos em DMSO 0,05%. Além dos grupos expostos, o grupo controle do solvente DMSO (0,05%) foi mantido em paralelo (FIGURA 7). As células foram expostas durante 24 h.

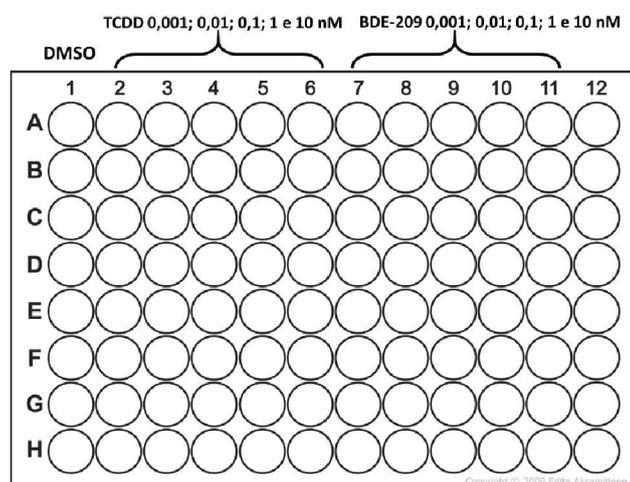


FIGURA 7. Esquema demonstrando a exposição dos contaminantes em uma placa de 96 poços. Em todas os ensaios, as placas eram compostas por um controle DMSO, pelas concentrações de TCDD (0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 nM) e de BDE-209 (0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 nM).

7.3. Determinação das concentrações e diluição dos contaminantes

Os dados utilizados para basear a escolha das concentrações dos poluentes TCDD e BDE-209 neste trabalho foram selecionados dos trabalhos da *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR, 1998 *apud* EGELAND *et al.* 1994) para o TCDD e de Mazdai *et al.* (2003) para o BDE-209. No primeiro artigo foi selecionado o dado de maior nível de TCDD encontrado no soro do sangue: 30.000 pg/g (ou 0,06 ng/ml) (ATSDR, 1998 *apud* EGELAND *et al.*, 1994). Considerando-se que 200 ng/g do sangue são lipídeos - de acordo com valores de referência de exames de sangue - a concentração final de TCDD seria de 0,186 nM. Para a determinação da concentração de BDE-209, foi selecionado o dado da concentração de PBDEs em amostras de sangue humano, onde foi observado a quantidade de Σ PBDEs em soro materno igual a 580 ng/g de lipídeos (MAZDAI *et al.*, 2003). Novamente, levando em consideração que 200 ng/g do sangue são lipídeos, a concentração final de PBDEs é equivalente a 1,209 nM. A partir desses dados, as concentrações selecionadas foram: 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10nM, sendo a concentração mais próxima aos dados encontrados na literatura para o TCDD 0,1 nM e 1 nM para o BDE-209.

Após a definição das concentrações, soluções-estoque dos contaminantes foram preparadas em DMSO e mantidas em frascos de vidro âmbar estéreis, à -20 °C. A concentração final de DMSO no grupo controle e nos grupos expostos ao TCDD e BDE foi de 0,05%.

7.4. Análise da morfologia celular

As células foram monitoradas sob microscópio invertido antes e após período de exposição, a fim de verificar o comportamento das células na presença dos contaminantes (desadesão, morte, alteração de morfologia etc).

7.5. Viabilidade celular e citotoxicidade

Para determinação da viabilidade celular e citotoxicidade dos contaminantes foram empregados três testes distintos, a fim de fornecer dados mais apurados sobre a situação celular: o ensaio do vermelho neutro avalia a captação e posterior acúmulo do corante em endossomas e lisossomas, o ensaio do MTT avalia a atividade metabólica mitocondrial e o ensaio de morte celular com Anexina V-FITC e Iodeto de propídio (PI) avalia tipo de morte celular: necrose x apoptose.

7.5.1. Ensaio do Vermelho Neutro

Após o tempo de exposição, as células foram incubadas com o reagente Vermelho Neutro (50 µg/ml) diluído em meio DMEM durante duas horas. Foram então fixadas com solução de cloreto de cálcio 0,1% e formaldeído a 0,5% em água e o corante foi extraído dos lisossomos e endossomos das células pela solução ácido acético 1% e etanol 50%. Com essa solução o material foi homogeneizado e a absorbância determinada em seguida a 540 nm (REPETTO; PESO; ZURITA, 2008).

7.5.2. Ensaio do MTT

Após o tempo de exposição foi adicionado uma solução de meio DMEM suplementado com 10% de SFB contendo 0,5 mg/ml de MTT (3- (4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). As células foram incubadas com o reagente durante 30 min, o conteúdo dos poços foi retirado integralmente, foi adicionado 100 µl de DMSO em cada poço, o material foi homogeneizado e a absorbância foi medida em seguida a 560 nm (MOSMANN, 1983, com modificações).

7.5.3. Ensaio da anexina V/PI

Nesse ensaio foram utilizados marcadores para verificar a forma de morte celular (necrose x apoptose). A porcentagem de células sofrendo necrose e apoptose foi determinada utilizando kit de detecção de apoptose (*BD Pharmingen*) com os marcadores fluorescentes Anexina V-FITC e o iodeto de propídio (PI), através de citometria de fluxo. O PI é um marcador nuclear, sendo assim as células positivas para esse marcador, que é um intercalante de DNA e penetra apenas em células com membrana plasmática não íntegra serão quantificadas como necróticas. A Anexina V-FITC é um marcador de apoptose, pois se liga na fosfatidilserina, que está presente na membrana externa de células em processo de morte celular programada. As situações com dupla marcação são consideradas como final da apoptose ou processo de necrose.

Em placas de 24 poços foram plaqueadas 3×10^4 células por poço e após 24 h de exposição o meio foi retirado, as células desaderidas com solução contendo tripsina a 0,25% e EDTA a 0,02% em PBS e todo este conteúdo foi centrifugado, o sobrenadante descartado, seguido de 2 lavagens

com PBS. Após isso, as células foram incubadas em 400 µl de solução contendo 5 µl Anexina-FITC e 5µl PI durante 15 min, protegidas da luz. Após a incubação, as amostras foram ressuspensas em PBS e analisadas em citômetro de fluxo. A análise final dos dados foi realizada através do programa *Flowing* (www.flowingsoftware.com/). O controle positivo foi realizado através da incubação de células com 50 µM peróxido de hidrogênio durante 2 h antes do ensaio.

7.6. Ensaio do Cristal Violeta

Este ensaio foi realizado após a exposição das células aos contaminantes em meio DMEM suplementado 2% e 10% de SFB, para melhor avaliação da proliferação celular com menor e maior interferência do SFB (efeito mitógeno).

A proliferação celular foi determinada através do ensaio de cristal violeta (VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011, com modificações). Após exposição, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 30 min, coradas com 100 µl da solução de cristal violeta a 0,25 mg/ml preparada em água deionizada durante 10 min, então lavadas duas vezes com água deionizada. O corante foi eluído com 100 µl da solução ácido acético 33% em água sob um agitador de microplacas durante 30 min e procedendo-se então a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 570 nm.

7.7. Espécies reativas de oxigênio (sonda DCF)

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi realizado o ensaio com a 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF) de acordo com BENOVA; SZTEINBERG; FRIDOVICH (1998). Após o tempo de exposição,

o meio de cultura dos poços foi descartado e foi adicionado 200 µl de meio DMEM suplementado com 10% de SFB contendo 10 µM de DCF. Após 15 min de incubação a 37°C, protegida da luz, o meio foi descartado, os poços lavados com PBS e foi adicionado 200 µl de PBS por poço. Imediatamente foi feita a leitura em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de 488 nm (excitação) e 530 nm (emissão).

7.8. Atividade de transportadores de efluxo de drogas

Para determinação das atividades dos transportadores da família MDR (PESSATTI *et al.*, 2002, com modificações), após a exposição das células o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com 200 µl por poço de PBS contendo rodamina B a 1 µM, em 37°C e protegidas da luz. Após 30 min o meio foi descartado, os poços lavados com PBS e 250 µl de PBS foram adicionados. A placa foi levada a um ultrafreezer (- 80° C) para que o conteúdo dos poços congelasse e assim, rompessem as células, para que a rodamina internalizada fosse liberada para o meio. Em seguida, após o material descongelar em temperatura ambiente, o conteúdo dos poços foi homogeneizado e 200 µl de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços preta, com leitura imediata em espectrofluorímetro a 540 nm (excitação) e 580 nm (emissão).

7.9. Ensaio com o quimioterápico dacarbazina

A dacarbazina é um dos quimioterápicos mais utilizados para o tratamento de pacientes com melanoma. Além disso, é sabido que existe grande resistência dessas células tumorais. Para investigar a resistência das células B16-F1 expostas aos xenobióticos e em seguida à dacarbazina, foram

empregados dois testes: ensaio com o corante vermelho neutro e verificação da proliferação celular no ensaio com o corante cristal violeta. Os ensaios foram realizados por adaptação de protocolo de JIN *et al.* (2011).

7.9.1. Seleção da concentração de dacarbazina

Para determinar a concentração do quimioterápico a ser utilizada nos ensaios, foi empregado o ensaio do Azul de Tripán. Esse ensaio avalia a viabilidade celular de acordo com a integridade da membrana plasmática das células. São consideradas células não viáveis aquelas em que o corante Azul de Tripán é internalizado, e viáveis as células onde o corante não é internalizado, portanto as células com a membrana plasmática íntegra.

Em placas de 24 poços foram plaqueadas 3×10^4 células por poço com meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 48 h de exposição ao quimioterápico nas concentrações 0; 100; 200; 300; 400 e 500 μM , as células foram então desaderidas do fundo dos poços por 500 μl de solução contendo tripsina 0,25% e EDTA 0,02% em PBS. O conteúdo dos poços foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o *pellet* de células ressuspendido em PBS 2:1 Azul de Tripán. Após 90 segundos, as células foram fotografadas em câmara de *Neubauer* em microscópio invertido, sendo as células posteriormente analisadas e contadas. Células coradas em azul foram consideradas como não viáveis e a concentração selecionada para o trabalho foi 400 μM por sua exposição representar 65% de viabilidade das células B16-F1 (FIGURA 18).

7.9.2. Viabilidade com quimioterápico – Vermelho Neutro

Para o ensaio de viabilidade celular na presença da dacarbazina, após 24h de exposição aos xenobióticos, o meio foi descartado e 200 μl de meio

DMEM suplementado com 10% SFB com 400 μM de dacarbazina (concentração definida através do ensaio anterior) foi adicionado em cada poço. Após 48h de exposição à dacarbazina, o protocolo para o ensaio do vermelho neutro foi seguido conforme já descrito no item 7.9.1.

7.9.3. Proliferação celular com quimioterápico – Cristal Violeta

Para o ensaio de proliferação celular na presença da dacarbazina, após 24h de exposição aos xenobióticos com meio DMEM contendo 2% de SFB, o meio foi descartado e 200 μl de meio DMEM suplementado com 2% SFB com 400 μM de dacarbazina foi adicionado em cada poço. Após 48 h de exposição à dacarbazina, o protocolo para o ensaio do cristal violeta foi seguido conforme já descrito no item 7.6.

7.10. Determinação do Ciclo Celular

Para esse ensaio, $2,5 \times 10^5$ células por poço foram plaqueadas em placas de 6 poços. Após 24 h de exposição, o meio foi retirado, o poço lavado levemente com PBS e as células soltas com tripsina 0,25% e EDTA 0,02% em PBS. Todo este conteúdo foi transferido para um tubo de centrifuga, o material centrifugado por 3 min, o sobrenadante descartado e o material fixado em etanol 70% e mantido a -20°C . O experimento, realizado em triplicata, procedeu da seguinte maneira: os tubos contendo as células fixadas foram centrifugados, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em PBS, novamente centrifugado, o sobrenadante descartado e adicionado de *staining buffer* (PBS com 2% de SFB). Para a marcação, o material foi novamente centrifugado e o sobrenadante descartado e então adicionado 500 μl de Iodeto de propídio (PI) e RNase (*BD Pharmingen*). Após 15 min de

incubação, protegida da luz, as células coradas foram analisadas através do citômetro de fluxo. Os dados gerados foram analisados através do programa *Flowing* (www.flowingsoftware.com/).

7.11. Ensaio *scratch*

Para investigar os efeitos causados pelos xenobióticos utilizados neste trabalho sobre a migração e proliferação das células B16-F1 foi empregado o ensaio relacionado com um risco (*scratch*) (LIANG; PARK; GUAN, 2007) feito nos poços após o tempo de exposição.

O ensaio foi realizado de acordo com NOGUCHI *et al.* (2012) com adaptações. O ensaio *scratch* foi realizado com o objetivo de verificar a migração e proliferação das células e conseqüentemente diminuição da área do “risco” entre os tempos 0 h e 48 h. Esses resultados podem ser relacionados com o ensaio de proliferação celular, já que são parâmetros que podem ser comparados.

Em microplaca de 96 poços, após 24 h de exposição com 2% de SFB, o meio foi descartado e meio DMEM novo foi adicionado. Com o auxílio de ponteiros p10 foi feito um “risco” com a ponta da ponteira no meio de cada poço. O meio foi novamente descartado e os poços foram lavados duas vezes com meio DMEM para retirada de células soltas. Após esses procedimentos, 200 µl de meio DMEM foram adicionados em cada poço. Os poços das placas foram observados e fotografados em microscópio invertido nos tempos 0h e 48h. A extensão da migração das células para a região da qual as células foram raspadas foi determinada a partir da análise das imagens de 0 h e 48 h com o auxílio do *software* livre ImageJ® (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

7.12. Ensaio Clonogênico

O ensaio foi realizado de acordo com YANG *et al.* (2015). Foram plaqueadas 250 células por poço em placas de 24 poços. Após 24 h de incubação, as células foram expostas aos contaminantes por 24 h. Após este período o meio foi substituído por DMEM contendo 10% de SFB e as células foram incubadas durante 7 dias, sem a necessidade de ocorrer troca do meio. O meio foi descartado, as células fixadas com paraformaldeído 2% em PBS durante 30 min, coradas com cristal violeta 0,5% por 15 min e as colônias contadas em microscópio invertido e fotografadas. Para o cálculo do fator de sobrevivência (FS), considera-se o tamanho e a quantidade de colônias observadas (>50 células); quanto mais colônias e maiores, maior a capacidade de proliferação e crescimento celular (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005). As imagens serão analisadas com o auxílio do programa ImageJ® onde será calculada a área ocupada do poço por colônias, para que pudessem ser avaliados qual(is) grupo(s) exposto(s) apresenta(m) maior quantidade de formação de colônias e proliferação.

7.13. Análises estatísticas

Três experimentos independentes foram realizados para cada ensaio e 8 replicatas por grupo por cultura em todos os ensaios. *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste *Dunnet*, comparando controle *versus* todas as concentrações de TCDD, e controle *versus* todas as concentrações de BDE-209, para os dados com distribuição normal. Dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados, através das mesmas comparações, pelo teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunns*. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

8. RESULTADOS

8.1. Morte celular

Este ensaio objetivou avaliar células viáveis e não viáveis, sendo as células não viáveis classificadas como apoptóticas ou necróticas². Os valores para o grupo controle foram de 88,3% de viabilidade, 2,6% de apoptose e 9,1% de necrose. Para o ensaio, tanto células aderidas como possíveis células mortas e soltas contidas no meio de cultura dos poços na placa foram analisados.

Com exceção do grupo exposto à menor concentração do TCDD (0,001 nM), que apresentou taxa de viabilidade muito próxima ao controle (88%), todos os grupos expostos ao TCDD apresentaram aumento de viabilidade (2,6-4,3%) e redução da incidência de necrose (3,4-4,3%) em relação ao grupo controle.

Já o grupo exposto à menor concentração de BDE-209 (0,001 nM) apresentou alta taxa de necrose (13,6%) em relação ao grupo controle (9,1%) e a menor taxa de viabilidade (79,9%) entre todos os grupos. Os grupos expostos às outras concentrações de BDE-209 apresentaram menor taxa de necrose em relação ao grupo controle (9,1%): 6,9% (0,01 nM); 7,75% (0,1 nM); 8,3% (1 nM); 8,7% (10 nM). Ainda, foi observado maior taxa de apoptose em relação ao controle: 5,2% (0,01 nM); 3,2% (0,1 nM); 8,2% (1 nM) e 3,5% (10 nM). Indicando que a exposição ao BDE-209 diminui os níveis de necrose, sem

² Para fins de apresentação dos resultados e discussão, utilizou-se a referência de “necrose” como forma de morte para as células em necrose e em final de apoptose (ou apoptose tardia – *late apoptosis*), visto que não é possível diferenciá-las com clareza pelo ensaio da anexina V - PI em citometria de fluxo, já que são células duplamente marcadas (por anexina v e por PI).

alterar as taxas de viabilidade para todas as concentrações do BDE-209, com exceção da menor concentração (0,001 nM) (FIGURA 8).

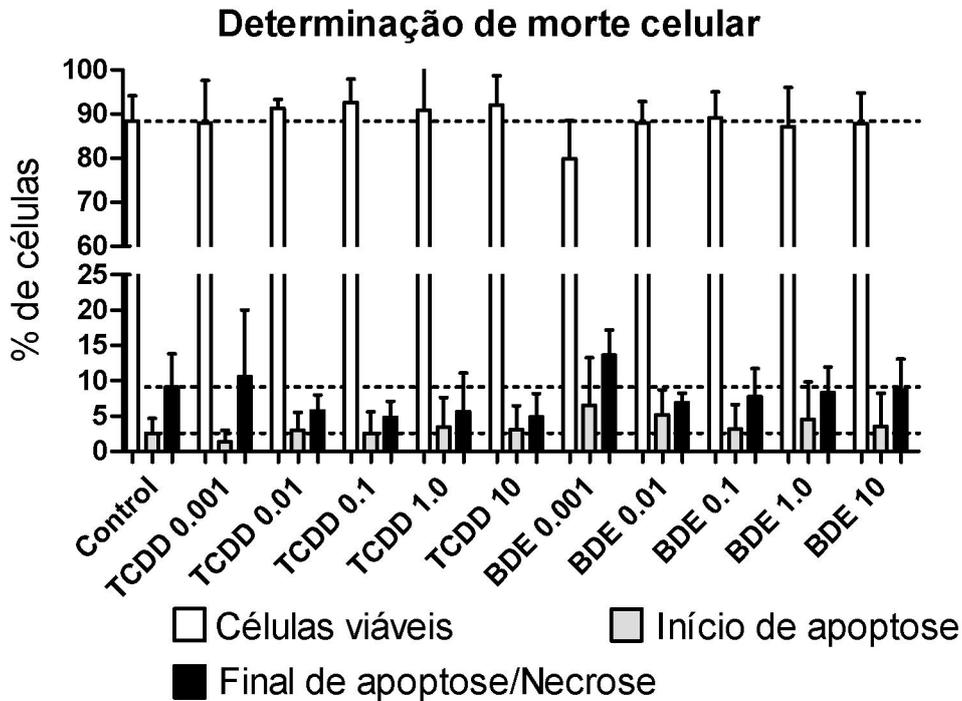


FIGURA 8. Ensaio para determinação de morte celular realizado com células B16-F1 expostas a diferentes concentrações de TCDD e BDE-209 durante 24h. As células foram consideradas como viáveis (sem marcação) e não viáveis. As células não viáveis foram classificadas em (1) apoptose/início de apoptose: células marcadas por anexina V ou em (2) necrose (final de apoptose/necrose): células marcadas apenas por PI e células duplamente marcadas por anexina V e PI. Portanto, foi considerado morte por necrose a soma de células em necrose e apoptose tardia. Para a maioria dos grupos expostos ao TCDD a morte celular foi reduzida (0,01 – 10 nM), já para os grupos expostos ao BDE-209 a taxa de viabilidade não foi alterada com exceção do grupo exposto a 0,001 nM, que diminuiu a viabilidade das células. Entretanto, não houve diferença significativa nos resultados obtidos. Média+SEM (erro padrão da média).

Vale salientar que apesar dessas alterações, os valores não foram significativos, portanto não sendo um resultado expressivo. Ainda, este ensaio

foi realizado com 10% de SFB. É válido a repetição do experimento com exposição com 2% de SFB para que os resultados possam ser comparados.

Apesar de os resultados não serem estatisticamente significativos, é sugerido uma tendência de que os contaminantes TCDD e BDE-209 possam ser capazes de alterar parâmetros de viabilidade e morte celular em células de melanoma murino B16-F1.

8.2. Ensaio do Vermelho Neutro e de Proliferação celular com 10% de SFB

O ensaio avalia a retenção do corante vermelho neutro no interior de vesículas lisossomais, células que apresentam menor retenção de corante podem ter seu sistema endolisossomal sendo afetados. O ensaio é avaliado pela absorvância do corante.

A absorvância do corante vermelho neutro foi 11,4% maior em células expostas à concentração 0,01 nM de TCDD (FIGURA 9), sugerindo que ocorreu aumento da retenção do corante nas células, uma vez que este resultado não é seguido por aumento na proliferação celular (FIGURA 10). Já para os demais grupos expostos ao TCDD há maior porcentagem de viabilidade (FIGURA 8), porém não acompanhado de um aumento na absorvância do corante vermelho neutro (FIGURA 9).

Nas células expostas ao BDE-209 há diminuição da retenção intracelular do corante vermelho neutro (relacionado com a integridade do sistema endolisossomal da célula) nos grupos expostos às concentrações 1 nM e 10 nM (16,1% e 16,5% respectivamente).

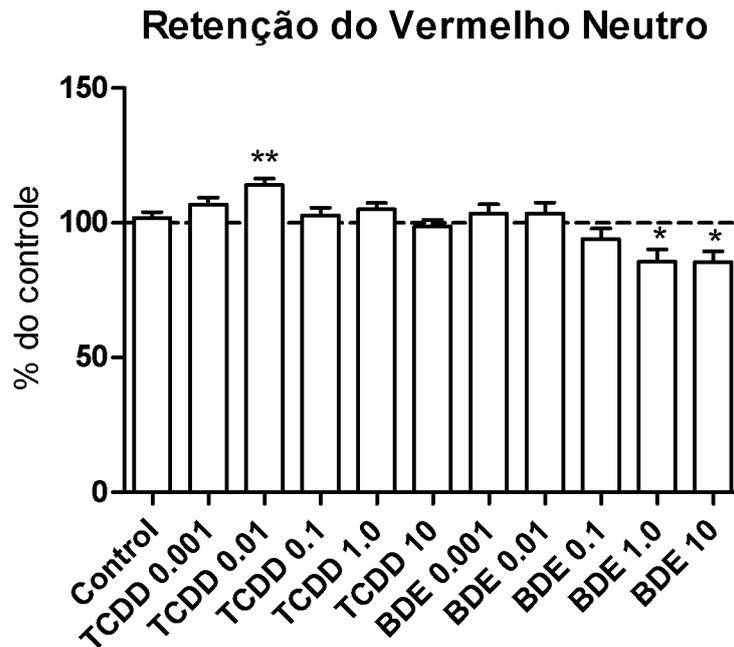


FIGURA 9. Retenção do corante vermelho neutro em células de melanoma murino B16-F1 expostas a diferentes concentrações de TCDD e BDE-209 durante 24h, demonstrando que a integridade do sistema de endomembranas pode ser afetado na exposição às maiores concentrações de BDE-209. Média+SEM.

No ensaio de proliferação celular, o corante cristal violeta é capaz de corar as células, portanto, havendo maior absorbância, maior o número de células, consequentemente maior foi a proliferação nesta amostra,

A exposição ao TCDD não alterou a taxa de proliferação celular com DMEM com 10% SFB (FIGURA 10). Entretanto, foi observado menor proliferação de células expostas às concentrações 0,01; 1,0 e 10 nM de BDE-209 em relação ao controle (7,8%, 10,8% e 24%, respectivamente), de forma dependente da concentração (FIGURA 10). Vale salientar que as placas foram verificadas anteriormente ao processamento do ensaio e não foi observado células desaderidas em nenhum dos grupos analisados.

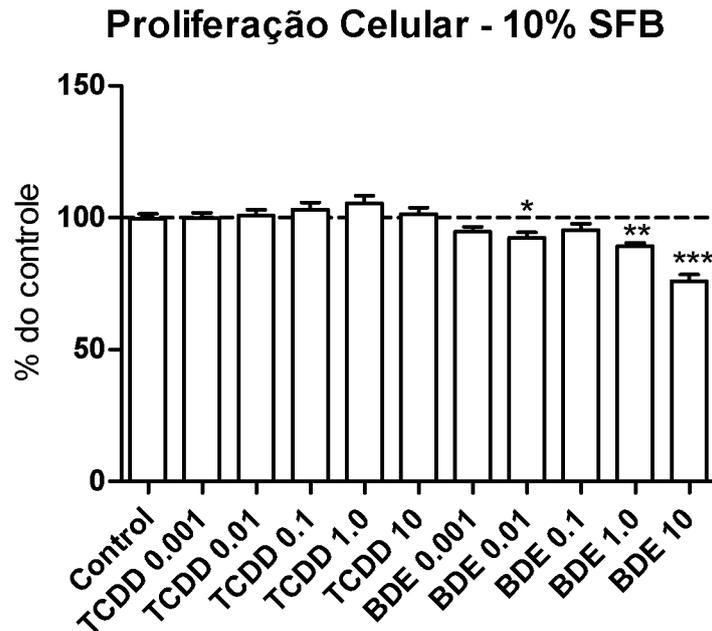


FIGURA 10. Proliferação celular de células de melanoma murino B16-F1 expostas a diferentes concentrações de TCDD e BDE-209 durante 24h com exposição contendo DMEM com 10% de SFB, demonstrando menor proliferação celular para a maioria das células expostas ao BDE-209.

8.3. Ensaio do MTT

Para avaliar o metabolismo mitocondrial, através da transformação do MTT em cristais de formazan pela mitocôndria em células expostas aos contaminantes TCDD e BDE-209, foi realizado o ensaio do MTT. O ensaio verifica a absorvância da amostra, considerando que o MTT apresenta coloração amarela e os cristais de formazan são de coloração violeta.

Houve diminuição significativa do metabolismo do MTT (aumento de toxicidade) pelas células expostas às concentrações 0,1 nM de TCDD (9%) e 0,01 nM de BDE-209 (11,5%). No grupo exposto à maior concentração do BDE-209 (10 nM), houve aumento do metabolismo do MTT (13,3%), sugerindo uma resposta celular ao estresse (FIGURA 11).

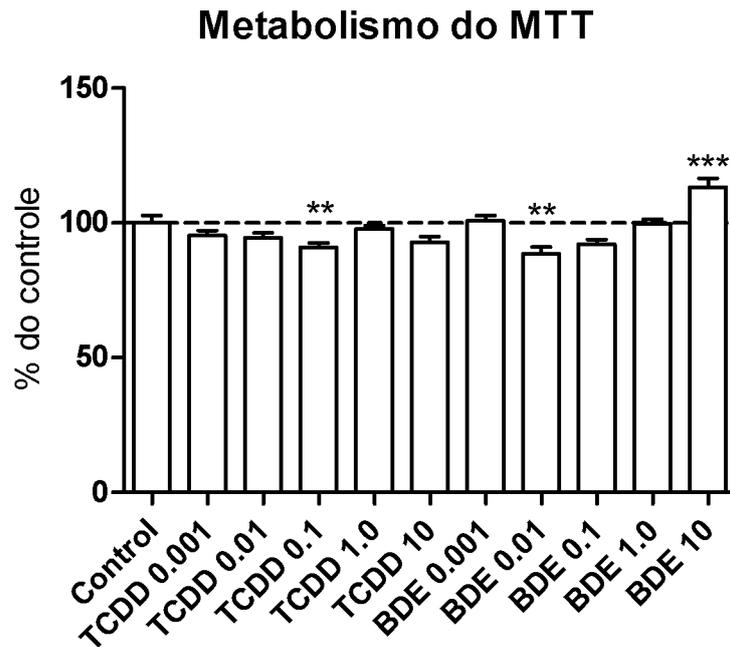


FIGURA 11. Ensaio do MTT realizado com células de melanoma murino B16-F1 expostas a diferentes concentrações de TCDD e BDE-209 durante 24h, demonstrando maior citotoxicidade nas células expostas ao TCDD (1 nM) e BDE-209 (0,01 nM) e aumento do metabolismo do MTT para a maior concentração de BDE-209. Média+SEM.

8.5. Atividade de transportadores de efluxo de drogas

O ensaio verifica a quantidade de rodamina B retida no interior da célula. Como a rodamina é transportada para fora da célula através de transportadores de efluxo de drogas do sistema MDR, quanto maior a concentração intracelular de rodamina, menor a atividade/quantidade dos transportadores do tipo Pgp (glicoproteína P). No caso do presente ensaio, apenas o transporte da rodamina é possível de ser avaliada e não a atividade dos transportadores. Não houve diferenças significativas entre os grupos para este ensaio (FIGURA 12).

Logo, os dados obtidos neste ensaio não corroboram com a hipótese de aumento da atividade de efluxo de drogas e consequente aumento da resistência aos quimioterápicos em células B16-F1 expostas ao TCDD e ao BDE-209.

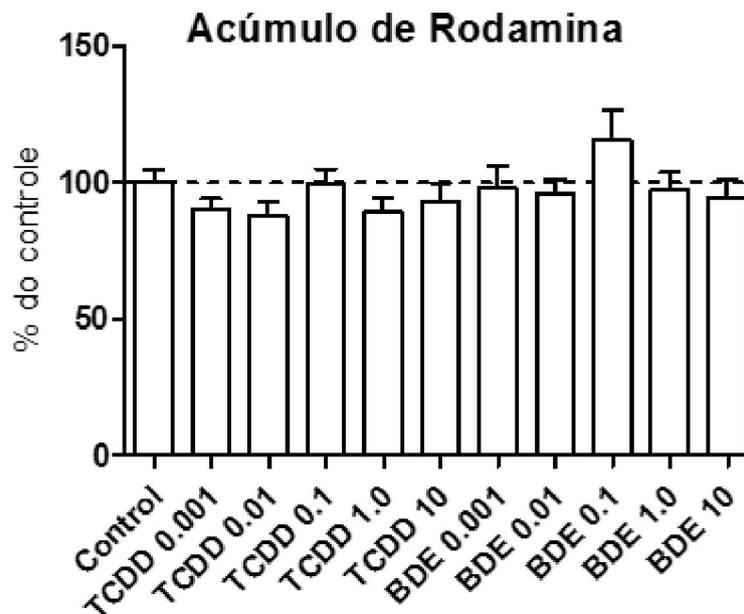


FIGURA 12. Acúmulo de rodamina B intracelular em células de melanoma murino B16-F1 expostas a diferentes concentrações de TCDD e BDE-209 durante 24h, demonstrando que não há diferença significativa de transporte de rodamina pela Pgp entre os grupos expostos e o controle. Média+SEM.

8.6. Produção de EROs

Neste ensaio, buscou-se avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio que estão presentes no meio de cultura após 24 de exposição. Avaliou-se a fluorescência que ocorre pela interação das EROS com a sonda DCF. Através da avaliação em espectrofotômetro (emissão/excitação), não houve diferenças significativas entre os grupos expostos às diferentes concentrações de TCDD e BDE-209 (FIGURA13).

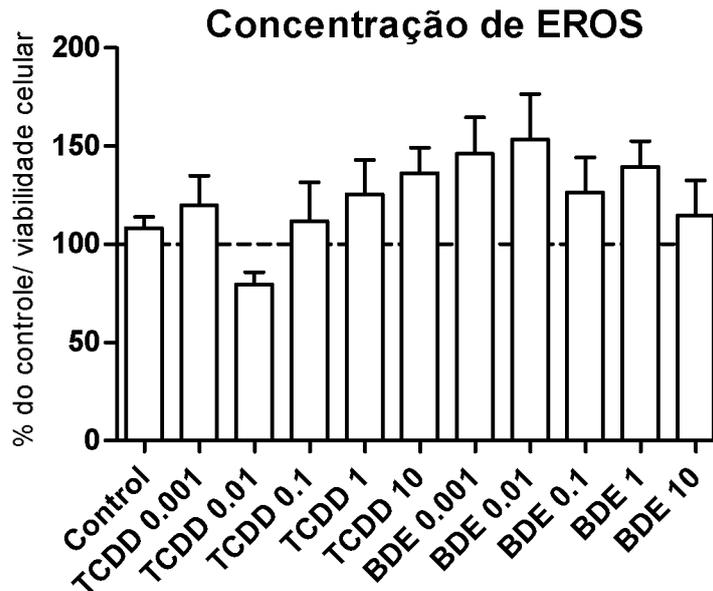


FIGURA 13. Produção de espécies reativas de oxigênio em células de melanoma murino B16-F1 expostas a diferentes concentrações de TCDD e BDE-209 durante 24h, demonstrando que não há diferença significativa na produção de espécies reativas de oxigênio nos grupos expostos em relação ao controle. Média+SEM.

8.7. Ensaio de proliferação celular com 2% de SFB

Este ensaio foi realizado com menor concentração de SFB para avaliar o efeito de promoção de tumor dos contaminantes, uma vez que o SFB possui efeito mitogênico e isto poderia mascarar os resultados.

Neste ensaio observou-se aumento de proliferação celular de forma concentração-dependente nas células expostas ao TCDD. A maioria das concentrações de TCDD utilizadas apresentou aumento significativo da proliferação (0,01 nM (9%); 1 nM (14,5%) e 10 nM (17%), com exceção das concentrações 0,001 e 0,1nM (FIGURA14).

Para a maioria das concentrações de BDE-209 também houve aumento da proliferação 0,001 nM (14%); 0,01nM (14,4%) e 1 nM (17%) (FIGURA 14).

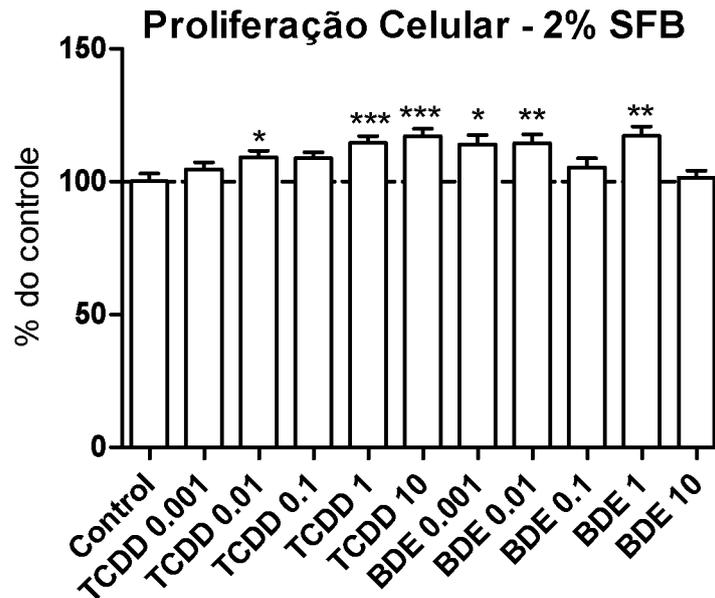


FIGURA 14. Proliferação celular de células de melanoma murino B16-F1 expostas a diferentes concentrações de TCDD e BDE-209 durante 24h com exposição contendo DMEM com 2% de SFB, demonstrando aumento de proliferação para a maioria dos grupos expostos para ambos os contaminantes. Média+SEM

8.8. Ciclo celular

No ensaio do ciclo celular, realizado após exposição ao TCDD e BDE-209 em meio de cultura contendo 2% de SFB (neste ensaio foi utilizado esta quantidade de SFB pois no ensaio de proliferação celular com 2% de SFB foram obtidos dados mais relevantes), foram avaliados as fases do ciclo celular em que se encontravam células de melanoma murino B16-F1 expostas ao TCDD e BDE-209. A técnica realizada em citômetro de fluxo utiliza PI para as marcações. O grupo exposto a 0,01 nM de BDE-209 apresentou menos células na fase G1 (2,3%) (FIGURA 15). Os grupos expostos a 0,001 nM de TCDD e 0,1 nM de BDE-209 apresentaram mais células na fase S (4,2% e 6,4%, respectivamente). Comparando esses dados, essas concentrações podem estar causando retenção das células na fase S, já que esse dado não está

acompanhado do aumento da proliferação celular (FIGURA 14). O grupo exposto a 10 nM de TCDD apresentou menos células na fase G2/M (3,1%), consequentemente havendo mais células nas fases G1 e S, o que concorda com o aumento de proliferação celular (FIGURA 14).

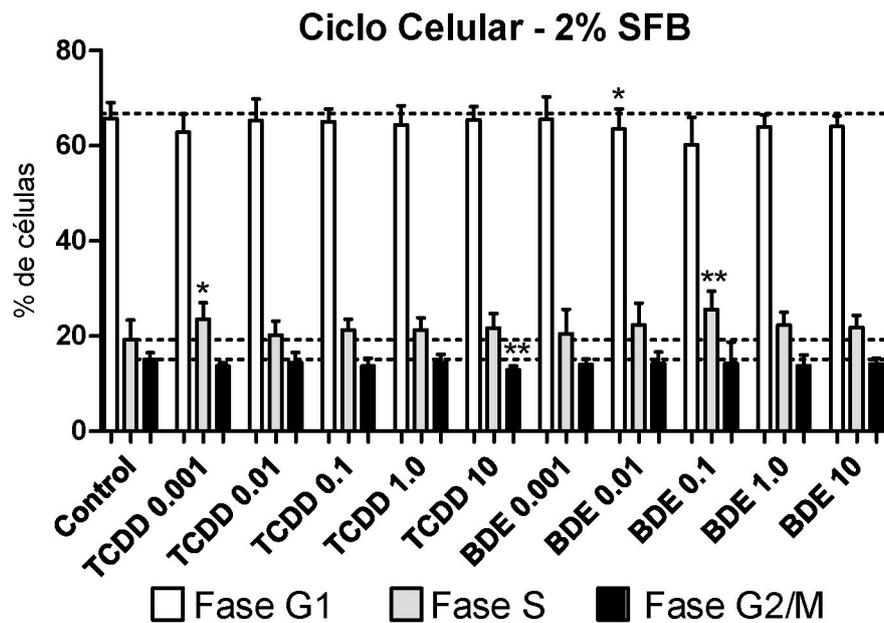


FIGURA 15. Fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) de células de melanoma murino B16-F1 expostas a diferentes concentrações de TCDD e BDE-209 durante 24h. Média+SEM

8.9. Ensaio scratch

Para avaliar a proliferação e migração de células - parâmetros relacionados com aumento da malignidade tumoral -, foi realizado o ensaio do *scratch*, onde as imagens do tempo zero e 48 h após ser feito um “risco” na parte central do poço de uma placa de 96 poços, foram comparadas. Grupos onde apresentaram maior fechamento do risco são relacionados com maior aumento de proliferação e migração, pois as células preencheram a área disponível.

Os grupos de células expostas às concentrações de 0,001 e 1 nM de BDE-209 apresentaram valor significativo de fechamento do risco em relação ao controle (aumento de 32,8%) após 48 h (FIGURA 16 e FIGURA 17), o que se relaciona com o ensaio de proliferação com 2% de SFB, onde houve aumento de proliferação nessa mesma concentração de BDE-209 (FIGURA 14). Em conjunto, esses dados mostram que neste grupo ocorre maior proliferação e possivelmente maior migração.

A concentração 1 nM de TCDD também apresenta aumento significativo desses parâmetros, confirmando seu papel como promotor de tumor, já bem estabelecido.

Vale ressaltar que em todos os grupos expostos aos contaminantes o valor numérico médio de fechamento foi superior ao fechamento do controle: 11,4%; 28,4%; 26,7%; 26,4%; 21,6% no TCDD 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10 nM respectivamente e 29,1%; 24,2%; 28,8% e 9% no BDE-209 0,001; 0,01; 0,1 e 10 nM respectivamente, incluindo diferença estatística no aumento deste parâmetro nas concentrações demonstrando aumento de proliferação, podendo ainda estes dados serem correlacionados com o aumento da proliferação celular, (FIGURA 16).

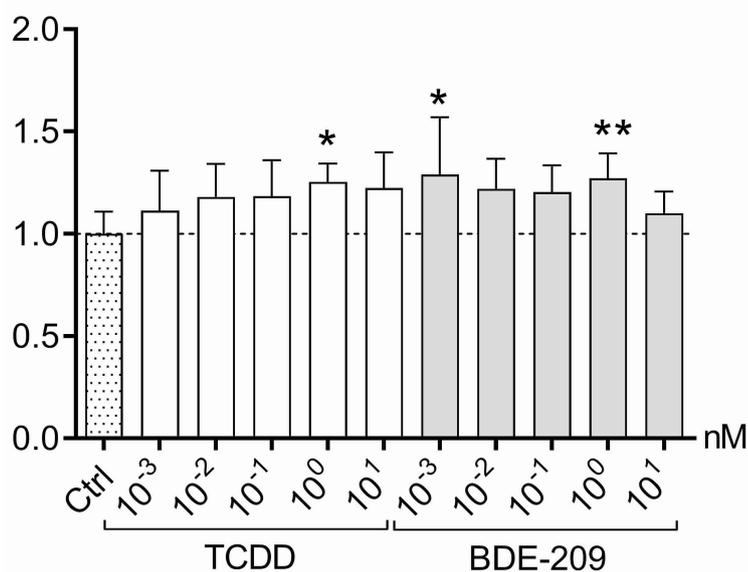


FIGURA 16. Fechamento do *scratch* (risco) após 48 h em células de melanoma murino expostas ao TCDD e BDE-209 durante 24 h, demonstrando que todos os grupos apresentaram numericamente maior fechamento do risco em relação ao controle, estatisticamente, os grupos de células expostas ao TCDD 1 nM e BDE-209 0,001 e 1 nM apresentaram aumento deste parâmetro. Média+SEM

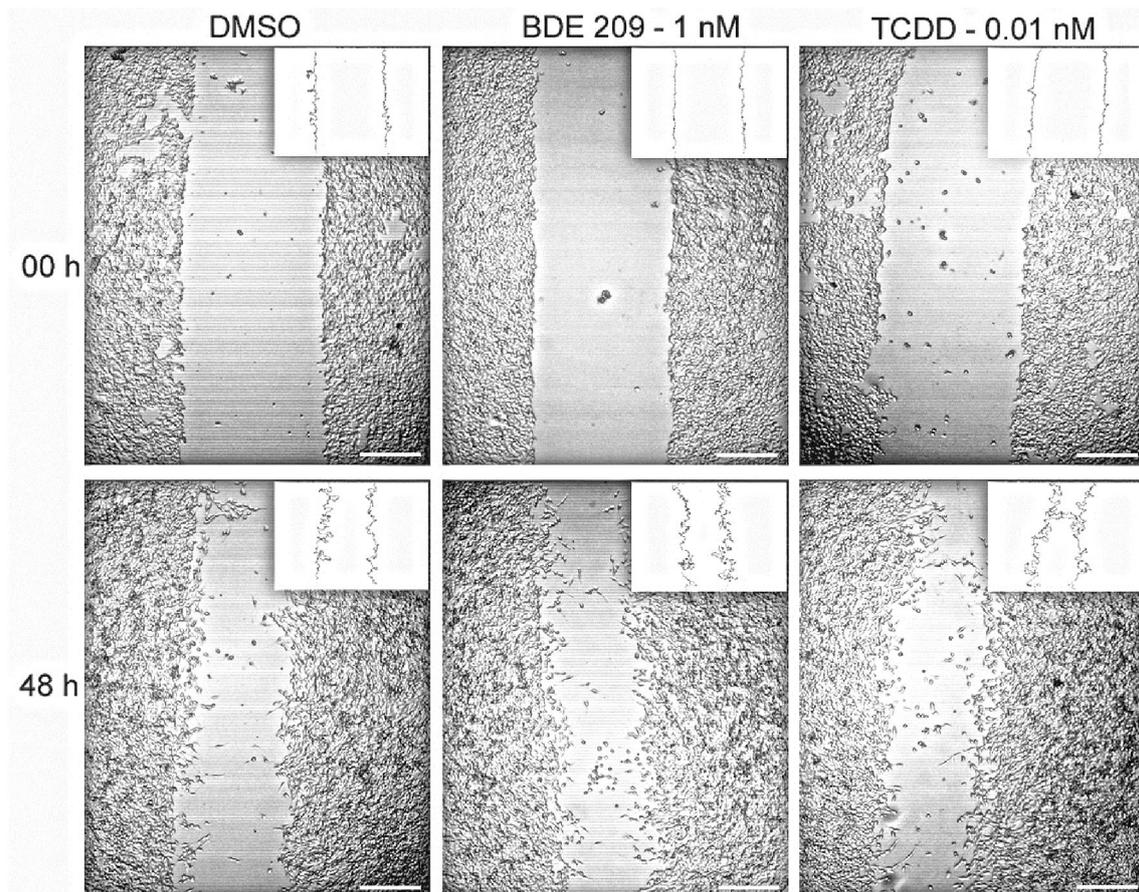


FIGURA 17. Imagem representando os grupos controle DMSO, grupo exposto ao BDE-209 1 nM e grupo exposto ao TCDD 0,01 nM no ensaio *scratch*. É possível observar o fechamento do *scratch* (risco) no tempo 0 h e 48 h em células de melanoma murino em microscópio invertido (imagem acima) e imagem após análise no programa ImageJ® (abaixo). As imagens pequenas no canto direito superior de cada imagem representa parte da análise no programa ImageJ®. Escala = 300 μ m. Fonte: a autora (2016).

8.10. Ensaio com o quimioterápico

8.10.1 Determinação da concentração de dacarbazina

A concentração 400 μM foi selecionada para ensaios os ensaios seguintes, pois causou uma redução de 65% da viabilidade celular (ensaio com o corante Azul de Tripán) como descrito no item 7.9.1. A CL_{50} da dacarbazina em células B16-F1 em 48 h foi 500 μM (FIGURA18).

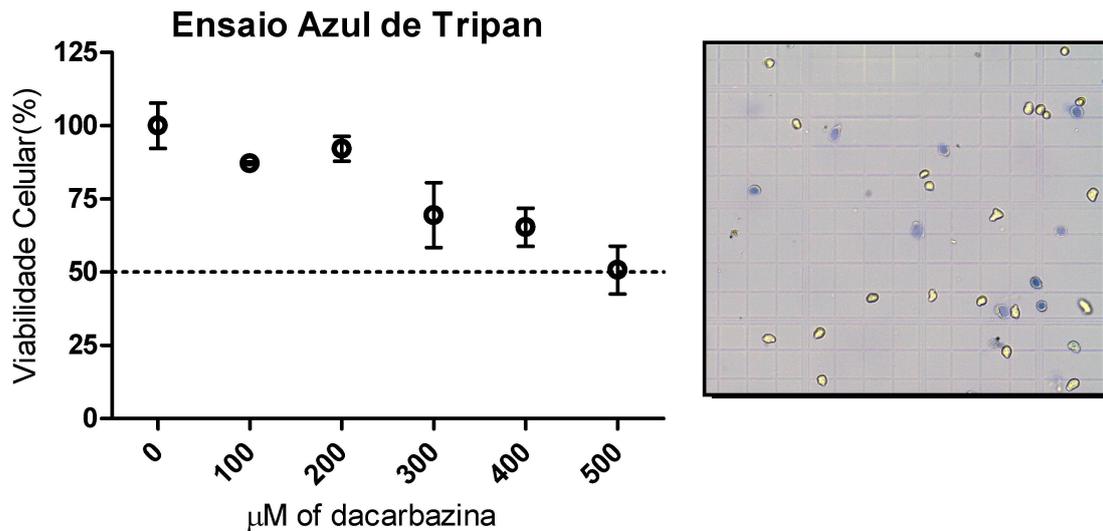


FIGURA 18. Viabilidade das células expostas a diferentes concentrações de dacarbazina durante 48h (esquerda). Campo da câmara de *Neubauer* durante a determinação da viabilidade (direita). Média+SEM. Fonte: A autora (2015).

8.10.2. Viabilidade com quimioterápico – Vermelho Neutro

Este ensaio foi realizado afim de avaliar a resistência ao quimioterápico Dacarbazina de células B16-F1 pré-expostas ao TCDD e BDE-209. Para o controle negativo, as células foram cultivadas em meio contendo o veículo de diluição dos contaminantes (DMSO) por 24h, e posteriormente mantidas em meio de cultura sem os contaminantes e o quimioterápico por 48 h. Já no controle positivo, as células foram cultivadas em meio contendo o veículo de diluição dos contaminantes (DMSO) por 24h e, em seguida, em meio de cultura contendo dacarbazina por 48 h. A viabilidade do controle positivo, determinada pelo ensaio do vermelho neutro, foi de 54,6%, valor condizente com o obtido

pelo ensaio do Azul de Tripán (65%) no *screening* de concentrações (item 8.10.1), considerando os princípios de método distintos de ambos os ensaios (FIGURA 19).

A pré-exposição aos contaminantes TCDD e BDE-209 em meio DMEM contendo 2% SFB e seguida da exposição à dacarbazina aumentou a retenção do vermelho neutro no grupo 0,1 nM de TCDD (8,9 %) e na maioria dos grupos expostos ao BDE-209: 0,001; 0,01; 0,1 e 10 nM (10,5%; 10,3%; 10,2% e 10,6% respectivamente) em relação ao controle positivo (controle com exposição à dacarbazina durante 48h) (FIGURA 19). Estes dados condizem, para maioria dos grupos expostos ao BDE-209, com os resultados de proliferação celular (FIGURA 14), indicando que o aumento na retenção de vermelho neutro deve-se, principalmente, ao aumento do número de células. Já para o TCDD, houve efeito metabólico diferente apenas para uma concentração (0,1 nM).

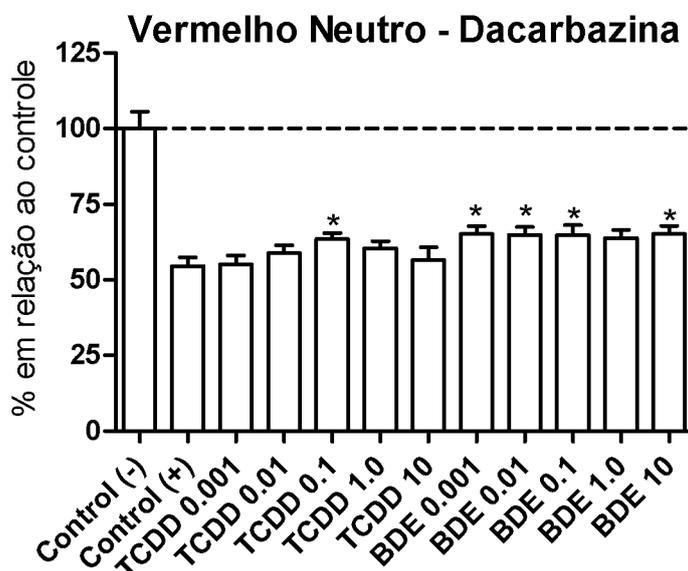


FIGURA 19. Retenção do corante vermelho neutro em células de melanoma murino B16-F1 expostas a diferentes concentrações de TCDD e BDE-209 durante 24h e posteriormente expostas ao quimioterápico dacarbazina durante 48h. O controle negativo (-) representa células sem exposição à dacarbazina e o controle positivo (+) representa células expostas à dacarbazina por 48h. É possível observar aumento da

retenção do corante vermelho neutro para a maioria dos grupos expostos ao BDE-209 e para os expostos a concentração 0,1 nM de TCDD. Média+SEM.

8.10.3. Proliferação celular com quimioterápico

Após a pré-exposição aos contaminantes TCDD e BDE-209 e posterior exposição ao quimioterápico Dacarbazina por 48 h, houve aumento da proliferação de 22,9% no grupo de células expostas a 10 nM de TCDD e de 45,2%, 19,9%, 22,6% e 23,2%, respectivamente, para as concentrações de BDE-209 de 0,001; 0,1; 1 e 10 nM (FIGURA 20).

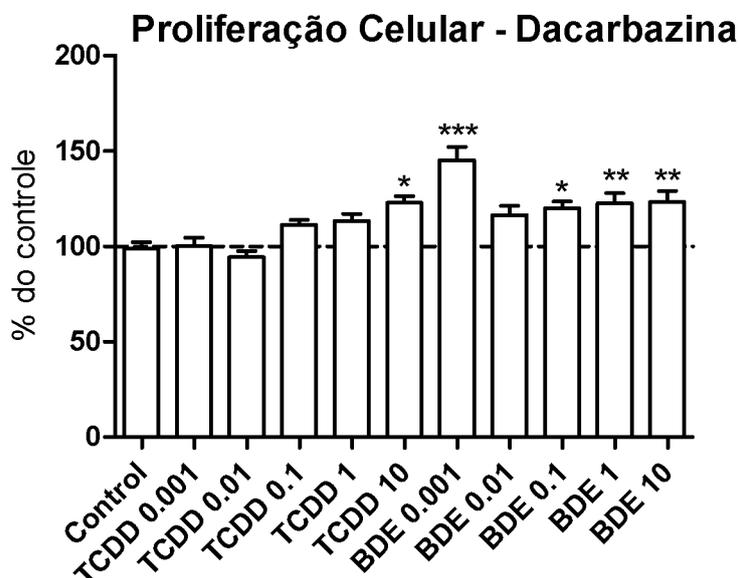


FIGURA 20. Proliferação celular avaliada através do ensaio do corante cristal violeta em células de melanoma murino B16-F1 expostas a diferentes concentrações de TCDD e BDE-209 durante 24h e posteriormente expostas ao quimioterápico Dacarbazina por 48h. É possível observar aumento da proliferação nos grupos expostos à maior concentração de TCDD e para a maioria dos grupos expostos ao BDE-209. Média+SEM.

Assim, a pré-exposição aos contaminantes – principalmente para os grupos expostos ao BDE-209- está tornando as células mais resistentes à Dacarbazina, aumentando a proliferação das células expostas (FIGURA 20) em relação ao controle.

8.11. Ensaio Clonogênico

Um teste inicial para este ensaio foi realizado seguindo o protocolo adaptado de YANG *et al.* (2015). O tempo de 7 dias foi suficiente para a formação de colônias e o protocolo de fixação e coloração foi bem-sucedido (FIGURA 21). Entretanto não houve tempo hábil para a análise dos resultados gerados através dos experimentos, não sendo possível a discussão dos resultados deste ensaio.

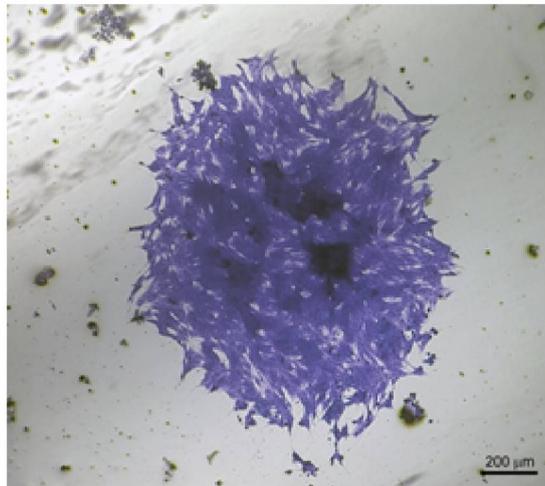


FIGURA 21. Colônia formada por células de melanoma murino B16-F1 após 15 dias de incubação. Fixação com paraformaldeído 4% em PBS; Coloração: cristal violeta. Fonte: A autora (2016).

8.12. Resumo dos resultados

Para melhor visualização dos resultados, segue tabela contando os ensaios realizados e os resultados obtidos (TABELA 1).

TABELA 1. Resumo dos ensaios seguidos dos resultados obtidos. SD = ensaio sem diferença significativa; ↑ = aumento e ↓ = diminuição em relação ao controle DMSO; seguido das concentrações que apresentaram diferença significativa.

Ensaio	TCDD	BDE-209
Morte Celular	SD	SD
Retenção do Vermelho Neutro	↑ 0,01 nM	↓ 1 e 10 nM
Proliferação Celular 10% SFB	SD	↓ 0,01; 1 e 10 nM
Atividade Mitocondrial (MTT)	↓ 0,1 nM	↓ 0,01 e ↑10 nM
Ativ. transportadores de efluxo	SD	SD
Produção de EROS	SD	SD
Proliferação Celular 2% SFB	↑ 0,01; 1 e 10 nM	↑ 0,01; 0,01 e 1 nM
Ciclo celular	↑ S 0,001 nM ↓G2/M 10 nM	↑ G1 0,01nM ↑ S 0,1 nM
Fechamento do risco	↑ 1 nM	↑ 0,001 e 1 nM
<i>Ensaio com dacarbazina</i>		
Retenção do Vermelho Neutro	↑ 0,1 nM	↑ 0,001; 0,01; 0,1 e 10 nM
Proliferação Celular 2% SFB	↑ 10 nM	↑ 0,001; 0,1; 1 e 10 nM

9. DISCUSSÃO

9.1. *Exposição ao TCDD*

Viabilidade e proliferação celular

A exposição ao contaminante ambiental TCDD durante 24 h não foi capaz de alterar os níveis de morte celular em células de melanoma murino B16-F1 de forma significativa.

A hipótese de que uma das consequências da ligação do TCDD ao receptor AHR é a ativação de defesas celulares como uma “defesa ao estresse” nas células expostas foi levantada por MATSUMURA (2003). Esta defesa celular pode possibilitar que células danificadas consigam escapar da apoptose/necrose.

Os dados observados no presente trabalho não corroboram com PARK e MATSUMURA (2006), que demonstraram que TCDD é capaz de bloquear a apoptose em células de MCF-10A (célula epitelial mamária humana), gerando um efeito protetivo nestas células. Possivelmente existem diferenças entre os tipos celulares que são responsáveis pelos resultados adversos observados, além disso a linhagem MCF-10A, trata-se de outro modelo animal e de uma célula não-tumoral.

Ainda, inibição da apoptose é um fator importante na promoção e progressão de tumores. Como já descrito anteriormente, células cancerosas diferentemente de células normais, apresentam deficiência nos mecanismos de apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2011) ou ativam mecanismos para evitar este processo, e isto é um dos motivos para a dificuldade em se ter sucesso na

quimioterapia (ZORNING *et al.*, 2001; GRAY-SHOPFER, WELLBROCK, MARAIS, 2007; INDRAN *et al.*, 2011).

Um dos mecanismos pelos quais o TCDD poderia agir para resultar em diminuição dos níveis de morte celular pode ser através da sua ligação com o receptor AHR, que é um receptor com alta afinidade pelo TCDD e está relacionado às funções celulares envolvidas, inclusive, com o controle do ciclo celular (NEBERT *et al.*, 2000; NTP, 2011; BOELSTERLI, 2007; MANDAL, 2005).

Em linhagens celulares diferentes como a MCF-10A (negativa para o receptor de estrogênio (ER)) o TCDD (10 nM) é capaz de aumentar o número de células e inibir a apoptose (DAVIS II *et al.*, 2001; PARK, MATSUMURA, 2005), embora em células de câncer de mama humana MCF-7 o TCDD (0,1 nM) tenha exercido efeito antiproliferativo (LIU; SAFE, 1996). No primeiro estudo citado, foi demonstrado que a maneira pela qual o TCDD pode alterar o crescimento das células MCF-10A é por “mimetismo” de fatores de crescimento em vias de sinalização (como o IGF-I e EGF (*epidermal growth factor*)). Em princípio, o EGF estimula uma via anti-apoptótica e o IGF uma via pró-mitogênica (DAVIS II *et al.*, 2001). Extrapolando para a linhagem B16-F1, é válida a investigação destes mecanismos para verificar a importância destas vias nos efeitos do TCDD nesta linhagem.

Assim como o presente trabalho, o TCDD não afetou a viabilidade e a taxa de apoptose em células granulosas de ovário de suínos (JABLONSKA, 2014). Nas linhagens de células hipotalâmicas de ratos GnV-3 (SOLAK *et al.*, 2013) e células de câncer de mama ZR-75-1 expostas ao TCDD combinado com o mediador de proliferação celular 17β -estradiol (OENGA *et al.*, 2004),

também não houve diminuição da viabilidade. Portanto, os efeitos do TCDD podem ser distintos de acordo com o tipo celular, constatando que outros receptores e/ou outras vias podem interferir com seus efeitos tóxicos.

No presente trabalho, a concentração 0,01 nM de TCDD aumentou a retenção do vermelho neutro, não sendo seguido por aumento de proliferação (com 10% SFB) em células B16-F1.

Em células 5L (descendentes de hepatoma de rato H4IIEC3), por exemplo, o TCDD aumenta em duas vezes a incorporação do vermelho neutro em 48h de exposição, porém inibe a proliferação (GOTTLICHER; WIEBEL, 1991). Desta forma, no grupo exposto ao TCDD 0,01 nM, pode ocorrer um aumento de retenção do corante vermelho neutro não relacionado à proliferação celular: para essas concentrações, o contaminante pode estar retardando, mas não parando a proliferação celular e mantendo as células viáveis ao mesmo tempo. Isso reafirma a hipótese de que o contaminante pode, neste caso, agir em mecanismos do metabolismo e proliferação celulares e suprimindo mecanismos de morte celular.

MARTINS *et al.* (2013) consideraram em sua pesquisa que células mamárias podem estar envolvidas com autofagia quando apresentam maior retenção do corante vermelho neutro, seguida da redução da proliferação celular com o corante cristal violeta e da redução da atividade mitocondrial com o ensaio do MTT. Neste modelo os ensaios se conectam, pois em caso de autofagia ocorreria um aumento de autolisossomos, o que poderia ser verificado através do ensaio com o corante vermelho neutro, sem alterar a proliferação ou atividade mitocondrial (MARTINS *et al.* 2013). Nos ensaios de proliferação celular e atividade mitocondrial do presente trabalho, não foi

observado diferença significativa no grupo exposto ao TCDD 0,01 nM em relação ao controle, portanto não é possível definir se há autofagia neste grupo. Outros ensaios como microscopia confocal e/ou eletrônica de transmissão poderiam futuramente auxiliar nesta investigação.

O TCDD também pode agir como um desregulador endócrino, agindo no receptor de estrogênio (ER) (EPA, 2008), portanto alguns de seus efeitos tóxicos são relacionados com o funcionamento do sistema reprodutivo e fertilidade. Por este motivo, há vários estudos com linhagens celulares que apresentam este receptor (linhagens relacionadas ao sistema reprodutivo).

Por exemplo, no estudo com células humanas de câncer de mama T47D expostas ao TCDD, onde não foram encontradas alterações na proliferação celular, mesmo em co-tratamento com mitógenos que são capazes de estimular a proliferação dessas células, como o 17β -estradiol, EGF, IGF-1 e insulina. Apenas na concentração de 10 nM há diminuição no número de células (FERNANDEZ; SAFE, 1993), demonstrando um efeito antimitótico do TCDD em células tumorais, sendo o contrário do esperado, já que este contaminante apresenta um papel na promoção de tumores. Provavelmente a interação com outros receptores das células T47D, como por exemplo o receptor de estrogênio (ER), que está presente nestas células, possam ter minimizado este efeito do TCDD.

Já na linhagem de câncer de mama MCF-7 exposta ao TCDD (0,01 – 10 nM) em co-tratamento com o mitógeno IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) há aumento de proliferação na concentração de 0,01 nM e diminuição da proliferação nas outras concentrações (SAFE *et al.*, 1992). Na linhagem de câncer de ovário humana OVCAR-3 o TCDD (0,01-100 nM) inibe a

proliferação, contudo, não alterando a proliferação nas linhagens de câncer de ovário SKOV-3 e IOS 358 (LI *et al.* 2014), demonstrando que mesmo em células de um mesmo tipo de tumor os efeitos tóxicos do TCDD podem ter diferentes níveis.

Também não há alterações em outros tipos de células como as de neuroblastoma N2a expostas ao TCDD 10 nM (SUL *et al.*, 2009). Assim, o TCDD nas concentrações e tempos de exposição utilizados exibe uma atividade antiproliferativa em diferentes linhagens de células tumorais ou não interfere no aumento da proliferação, mesmo na presença de mitógenos. Logo, os efeitos do TCDD podem variar de acordo com o tipo celular, possivelmente explicando porque a linhagem B16-F1 não responde ao TCDD no parâmetro de proliferação celular quando na presença de 10% SFB (que contém moléculas que atuam como mitógenos).

Novamente, portanto, as diferentes respostas observadas em diferentes tipos celulares expostos às mesmas concentrações de TCDD podem ocorrer por diferenças na expressão de receptores ativados/inativados pelo contaminante e diferenças nas vias de sinalização, ocasionando diferentes níveis de toxicidade.

Citotoxicidade

No presente trabalho foram verificadas alterações no metabolismo do MTT pela exposição ao TCDD apenas no grupo exposto à concentração 0,1 nM, indicando que este não induz citotoxicidade mitocondrial às células expostas nas outras concentrações utilizadas. Em linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, o TCDD (0,001-10 nM) é capaz de aumentar a

citotoxicidade. Na linhagem MCF-7 a citotoxicidade ocorreu de maneira concentração-dependente e para MDA-MB-231 ocorreu apenas para concentrações acima de 1 nM (LIN *et al.*, 2007). O TCDD (5-15 nM) aumentou a citotoxicidade em células de Sertoli de ratos, seguida do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ALY; KHAFAGY, 2011). Contudo, tal relação não foi observada no presente trabalho, indicando ação de diferentes mecanismos nas diferentes linhagens expostas ao TCDD.

Houve redução do metabolismo mitocondrial, observado pela menor absorvância do MTT, de forma concentração-dependente (TCDD 1-200 nM), porém não alterando a síntese de DNA nem a viabilidade de células β (beta) de rato INS-1 (KIM *et al.*, 2009). No presente trabalho, a concentração de 0,1 nM de TCDD indziu a diminuição do metabolismo celular, através de dados obtidos pelo ensaio do MTT. Este resultado não foi acompanhado de alterações de outros parâmetros celulares, como a retenção do corante vermelho neutro e da proliferação celular, sugerindo que o TCDD causa inibição da redução do MTT a cristais de formazan nesta concentração, porém evento não é capaz de causar perda da viabilidade das células expostas. As linhagens supracitadas são mais sensíveis aos efeitos citotóxicos do TCDD do que células B16-F1, em relação ao metabolismo do MTT, o que indica que estas diferenças podem se dar pela variação da expressão de receptores ou com mecanismos/vias relacionados com a produção hormonal ou receptores relacionados a reprodução nas outras linhagens.

Atividade dos transportadores do sistema MDR

A resistência a múltiplas drogas (MDR), mediada, muitas vezes, via expressão do gene MDR1 é extensivamente descrita como uma resistência

adquirida a agentes citotóxicos. O gene MDR1 codifica para uma glicoproteína transmembrana chamada glicoproteína-P (Pgp). A ocorrência de MDR é um dos maiores problemas nos tratamentos contra o câncer, visto que o não sucesso com o tratamento pode levar o paciente ao óbito. Por exemplo, pacientes com sarcoma com expressão negativa a glicoproteína-P têm uma sobrevida maior em relação aos pacientes positivos para glicoproteína-P (cerca de 60% dos casos analisados) (COLEY *et al.*, 2000).

Assim como observado neste trabalho, alguns autores não observaram alterações no sistema MDR, mesmo utilizando-se de outros ensaios como de quantificação e expressão gênica e proteica de elementos relacionados com o sistema de efluxo de drogas. Como no trabalho SCHRENK *et al.* (2001), que não encontraram modulação dos níveis do RNAm ou proteína MRP2 relacionado com a superfamília ABC de efluxo de drogas em células de hepatocarcinoma humano HepG2 e câncer de mama humano MCF-7 expostos ao TCDD.

Já GELHAUS *et al.* (2009) observaram que células bronco-alveolares humanas H358 tratadas com TCDD (10 nM por 48 h) apresentaram um grande aumento na expressão de MRP4. A proteína de resistência a múltiplas drogas 4 (MRP4) pertencente a superfamília ABC (*ATP-binding cassette*), que atuam como transportadoras de efluxo transmembranar.

JIGOREL *et al.* (2006) expuseram células de cultivo primário de hepatócitos humanos ao TCDD na concentração de 10 nM e observaram indução do gene MDR1. Também XU *et al.* (2010) expuseram células HepG2 e cultura primária de hepatócitos humanos ao TCDD (1, 5 e 10 nM) e observaram

aumento da expressão do mRNA quanto da proteína MRP4, relacionada com MDR (multidrug resistance) de forma tempo e concentração-dependente.

JACOB *et al.* (2015) observaram aumento dos níveis de expressão da proteína e transcrição do gene CYPBY em células de endotélio microvascular cerebral humanas hCMEC/D3 induzido pelo TCDD na concentração 10 nM. Porém não foi encontrada alteração na expressão de ABCB1/ABCG2. As proteínas codificadas pelos genes ABCB1, ABCG2 e CYP1B1 podem atuar em conjunto para diminuir concentrações intracelulares de vários xenobióticos, garantindo uma proteção e diminuindo danos celulares, ou reduzindo a penetração de agentes farmacológicos.

WANG; HAWKINS; MILLER (2010) expuseram capilares cerebrais de ratos ao TCDD e observaram tanto *in vitro* quanto *in vivo* a indução de enzimas de metabolismo de xenobióticos: CYP1A1 e CYP1B1. Ainda, a exposição ao TCDD durante 3 h aumentou a atividade de transporte específico e a expressão da proteína para a glicoproteína-P. EBERT; SEIDEL; LAMPEN (2005) observaram aumento dos níveis de mRNA de BCRP em células intestinais humanas Caco-2 expostas a TCDD (50 nM); a proteína BCRP é uma proteína envolvida na resistência do câncer de mama, capaz de transportar ativamente fármacos antitumorais. Logo, outros métodos para avaliação da expressão/atividade dos transportadores de efluxo de drogas são necessários para confirmar a ausência de efeito do TCDD no efluxo de drogas nas células B16-F1, visto que a rodamina B não é substrato de todos os transportadores de efluxo presentes nas células, como por exemplo, para o transportador MRP2 (gene ABCC2) os substratos podem ser *99mTc-Mebrofenin*, *7-Hydroxymethotrexate* e *Valproateglucuronide*, para o MRP3 (gene ABCC2), o

7-Hydroxymethotrexate, *Valproateglucuronide*, para o BRCP (gene ABCG2) *Rosuvastatina* e *Nitrofurantoin*, para os transportadores OCT1 (gene SLC22A1) e MATE1 (gene SLC47A1) a metformina e o OATP1B1(gene SLCO1B1) o metotrexato, pravastatina e o Gadoxetate dissódico (CHU *et al.*, 2013).

Existem poucos trabalhos na literatura demonstrando o papel do TCDD com implicações com o sistema MDR. Porém no trabalho de MAZUR; MARCHITTI; ZASTRE, (2015), observa-se um resultado interessante da interação da substância química propiconazole (fungicida) inibindo a atividade de efluxo de drogas da glicoproteína-P, em células de fibroblasto murino NIH-3T3-G185 transfectado com MDR1(NIH-3T3/MDR1), diminuindo assim a resistência das células ao quimioterápico paclitaxel, utilizado posteriormente. Este estudo demonstra que é possível que a interação de agrotóxicos e drogas possam alterar a resistência de células, ou seja: a inibição da atividade PgP envolvida com o efluxo de drogas para fora de célula, aumenta a concentração do composto dentro das células, fazendo com que estas sejam mais susceptíveis à sua ação tóxica, portanto tornando-se menos resistentes MAZUR; MARCHITTI; ZASTRE, (2015). Sendo assim, outros sistemas podem estar relacionados com a toxicidade do TCDD via sistemas de resistência/ efluxo de drogas.

Ainda, no trabalho de WALSH *et al.*, (2010) é indicado que a expressão de genes relacionados com o efluxo de drogas MRP-1 e MDR1/PgP e a expressão de proteínas principalmente a MRP-1 é comum em pacientes com melanoma, principalmente em casos de metástase (forma mais agressiva). Portanto, este sistema de efluxo de drogas poderia estar relacionado com a

resistência à quimioterapia e a dificuldade de cura deste tipo de câncer (WALSH *et al.*, 2010).

Nesse trabalho não foi observada diferença significativa na atividade dos transportadores de efluxo de drogas pelo ensaio empregado. Como o ensaio não avalia a expressão do gene MDR1 nem MDR1/PgP ou a proteína MRP-1 ou Pgp, não é possível inferir se estes estão sendo induzidos pelo contaminante, porém não foi encontrado um efeito na a atividade dos transportadores, que apresentam importância para o funcionamento celular e apresentariam importância para o presente trabalho.

Produção de espécies reativas de oxigênio

Como já citado anteriormente, os efeitos tóxicos causados pelo TCDD podem incluir o aumento de espécies reativas de oxigênio (MANDAL, 2005). Além disso, há normalmente grande produção de EROs em cânceres como o melanoma (CHENG *et al.*, 2004; REUTER *et al.*, 2010).

Concentrações teciduais de TCDD altas (superiores a concentrações encontradas no ambiente) são necessárias para provocar estresse oxidativo, tanto em exposições agudas como subcrônicas em tecidos de camundongos (SLEZAK *et al.*, 2000).

Em células HepG2, por exemplo, a exposição ao TCDD (0.1, 1, 10, 50 e 100 nM) durante 6 h foi capaz de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (PALANISAMY *et al.*, 2015). Sendo assim, talvez as concentrações utilizadas no presente trabalho não sejam suficientes para alterar este sistema nas células B16-F1, ou ainda, no tipo celular estudado, não hajam alterações perceptíveis através do método utilizado para verificação do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Podendo demonstrar um possível

sistema de defesa envolvida contra a produção de ROS ou no aumento de antioxidantes, o que não foi investigado no presente trabalho.

Proliferação celular (2% SFB)

MAGGETTO *et al.* (1999) observaram houve proliferação celular na linhagem de células de pulmão humano MRC-5 cultivada durante 7 dias em meios de cultura contendo tanto 2% quanto 10% de SFB. CARVALHO *et al.* (2008) mostraram que a viabilidade de células B16-F10 com 2% e 10% de SFB não é alterada pela quantidade de SFB. Já no presente trabalho é possível observar diferenças na proliferação celular induzida pelo TCDD em função das diferentes concentrações de SFB (10% e 2%), de modo que o TCDD poderia, em princípio, atuar promovendo tumores já iniciados. Isto porque é observado aumento da proliferação para a maioria dos grupos expostos com 2% de SFB.

Também em células de queratinócitos HEKs, a exposição ao TCDD aumenta a proliferação celular (com 10% SFB), diminui níveis de expressão de proteínas relacionadas com a senescência e induz alterações na diferenciação dessas células, sendo que essas alterações são coordenadamente acompanhadas do aumento da expressão do receptor AHR no 6° e 8° dias de exposição. Nos outros tempos de exposição (0,5 e 2 dias) não há alterações significativas. De acordo com os autores, o TCDD pode ter acelerado a diferenciação além de ter suprimido a senescência das células expostas, trazendo uma desvantagem para o grupo controle no parâmetro de proliferação celular e essa diferença tornou-se mais evidente com o maior tempo de tratamento, por isso nos primeiros dias não houve alterações significativas (RAY; SWANSON, 2003). Neste estudo é levantada a hipótese de que o

contaminante ao inibir a senescência das células, promoveria maior vantagem proliferativa do grupo exposto em relação ao grupo controle.

O aumento da proliferação celular causada pelo TCDD pode ser em função do aumento da expressão de genes que regulam este processo, como genes relacionados com o receptor AHR. Além disso, aparentemente um maior tempo de exposição possibilita melhor observação dos efeitos do TCDD na proliferação de células HEKs assim como talvez seja nas células B16-F1, já que alguns dados com outros tempos de tratamento para HEKs mostram diferentes resultados, e as respostas causados pelo TCDD podem ser mais evidentes com um tempo de exposição maior.

Ensaio *scratch*

Houve aumento dos parâmetros de migração e proliferação nos grupos de células expostos à 1 nM de TCDD e 0,001 e 1 nM de BDE-209.

O TCDD (0,1-10 nM) não afeta a viabilidade e proliferação de células da membrana coriônica TCL1 (FUKUSHIMA *et al.*, 2012). Da mesma forma, não afeta a atividade celular de migração através do ensaio do *scratch* sem a utilização de um bloqueador de proliferação (FUKUSHIMA *et al.*, 2012). Indicando que para algumas linhagens celulares, o TCDD pode não ser capaz de interagir com parâmetros relacionados com aumento de malignidade e agressividade.

Já no presente trabalho, a proliferação de células expostas ao TCDD com 2% de SFB aumentou para a maioria das concentrações, o que pode estar relacionado com o maior fechamento numérico do risco no ensaio “*scratch*” e ainda com a diferença estatística para a concentração 1 nM, já que parâmetros

de viabilidade e proliferação também se relacionam positivamente neste ensaio.

Para ter um exemplo de comparação, outro pesticida da classe das dioxinas, o hexaclorobenzeno (HCB) que é considerado, assim como o TCDD, potencialmente carcinogênico e também se liga ao receptor AHR, atua induzindo um desbalanço no crescimento de células hepáticas de ratos, promovendo proliferação e também causou indução de apoptose (GIRIBALDI *et al.*, 2011). Já em células de câncer de mama MCF-7 (GARCIA *et al.*, 2010), o HCB estimula a proliferação celular, assim como nas linhagens MDA-MB-231 e LM3, podendo levar a lesões pré-neoplásicas ou causar o aumento de malignidade (PEÑAA *et al.*, 2012). Na linhagem MDA-MB-231 a capacidade de invasão é aumentada com indução de vias relacionadas com o AHR pelo HCB.

Sendo assim, o HCB, que é uma molécula com características semelhantes ao TCDD, é capaz de aumentar o crescimento tumoral e favorecendo o surgimento de metástase, sendo um fator de progressão de tumores (PONTILLO, 2013) e desta forma, poderíamos talvez esperar efeitos parecidos caso fosse utilizado o contaminante TCDD nesta linhagem celular.

Ciclo celular

Apesar de o TCDD ter alta afinidade com o receptor AHR e esse ser responsável por várias respostas celulares, entre elas a progressão do ciclo celular, no presente trabalho apenas o grupo exposto à concentração de 0,001 nM apresentou maior percentual de células na fase S, não sendo acompanhado de aumento de proliferação celular, sugerindo que nessa concentração o TCDD retém as células nessa fase, impedindo a continuação do ciclo celular. Este fato é uma tendência se relacionado com o ensaio de

morte celular no presente trabalho, onde o grupo exposto a esta concentração é o único sem aumento na taxa de viabilidade e com a maior taxa de necrose entre os grupos expostos ao TCDD.

Este é um resultado que merece ser mais bem investigado, já que o TCDD está retendo por um período ou impedindo que a célula continue o ciclo celular normalmente, o que não ocorre nas outras concentrações de TCDD, que aumentam a viabilidade e diminuem a incidência de necrose.

Ainda, a exposição ao TCDD 1nM (com 10% de SFB) em queratinócitos humanos (HEKs) no 6° e 8° dias de exposição resultou na diminuição da fase G1/G0, num ligeiro aumento de fase S correspondente a uma diminuição da fase G2/M e um aumento na fase sub-G1/G0. Além disso essa alteração foi acompanhada de aumento da proliferação, o que não ocorreu no presente trabalho. Entretanto, nos outros períodos de tratamento, assim como o presente trabalho, não foi observado diferenças significativas (RAY; SWANSON, 2003)

Ensaio com a dacarbazina

COLLIER; PRISTOS; PRISTOS, (2006) observaram que ao expor células de câncer de mama MCF-7 ao TCDD, não houve toxicidade. Entretanto, o contaminante em co-tratamento ao quimioterápico mitomicina C aumentou significativamente a incidência de morte celular. Os autores indicam que o aumento de toxicidade observada é mediado pelo aumento de enzimas biorredutoras resultantes da ativação do AHR (COLLIER; PRISTOS; PRISTOS, 2006)

Ainda, não há informações na literatura (pesquisas em sites de bancos de dados de artigos científicos: *Science direct* e *Web of Science*) sobre a

resistência do melanoma ao tratamento com o quimioterápico dacarbazina em relação ao sistema MDR que sejam válidos para o presente trabalho.

Na linhagem de câncer de mama MCF7-WT foi observado correlação entre a diminuição da expressão de Pgp com a diminuição da resistência a quimioterápicos utilizados nesse tipo de câncer (MECHETNER *et al.*, 1998), portanto este é um mecanismo válido para ser investigado para células B16-F1, que também é uma célula tumoral.

Porém no presente trabalho tal correlação não foi observada, e não houve diferença significativa no ensaio da atividade dos transportadores de efluxo de drogas para as células expostas ao TCDD, porém essas se tornaram mais resistentes à dacarbazina na concentração 0,1 nM de TCDD (onde houve maior retenção do corante vermelho neutro) e 10 nM (onde houve aumento de proliferação celular). Assim, existe a possibilidade de que (1) o pré-tratamento aos contaminantes favoreça a resposta ao quimioterápico dacarbazina, diminuindo sua toxicidade nessas concentrações; (2) o mecanismo de resistência do melanoma envolva outros mecanismos além do sistema MDR, como alterações do metabolismo, inibição de apoptose por desregulação de proteínas apoptóticas e aumento da proliferação de subpopulações de células resistentes (ZAHREDDINE; BORDEN, 2013).

Células de cultivo primário de melanoma de rato SB2 e MeWo foram expostas *in vitro* repetidas vezes a dacarbazina e após a seleção das células resistentes, houve aumento do crescimento do tumor e metástase *in vivo*. Esses dados demonstram que o tratamento com a dacarbazina pode selecionar fenótipos mais agressivos de melanoma (LEV *et al.*, 2004), o que pode estar acontecendo com as concentrações 0,01 nM e 10 nM de TCDD no

presente trabalho, já que ocorreu aumento dos parâmetros de retenção do corante vermelho neutro e aumento da proliferação celular para alguns grupos.

Uma hipótese a ser pensada em função dos diferentes efeitos em linhagens celulares - tumorais ou não - pode ter relação com a expressão do AHR, para o qual o TCDD apresenta uma altíssima afinidade³ e cuja ligação resulta na transcrição e ativação de diversos genes relacionados com os efeitos tóxicos do contaminante. Como os diferentes tipos celulares apresentam níveis de expressão do AHR variados, a toxicidade do TCDD pode variar de acordo com tal expressão. Esta é uma hipótese também levantada BOELSTERLI (2007) através de evidências observadas nos trabalhos de OKEY; RIDDICK; HARPER, 1994; FERNANDEZ-SALGUERO *et al.*, 1996; SAFE, 2001 (BOELSTERLI, 2007 apud OKEY; RIDDICK; HARPER, 1994; FERNANDEZ-SALGUERO *et al.*, 1996; SAFE, 2001).

Ainda, JUX *et al.* (2011) demonstraram que em melanócitos murinos normais (NMMs), tanto o receptor AHR quanto mRNA de ARNT (*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) são facilmente detectáveis. Após o tratamento dessas células com TCDD a 10 nM durante 24 h, ocorreu a indução de genes relacionados à ativação do AHR (como o CYP1A1), demonstrando assim que o receptor AHR é funcional nestas células. Além disso, foi demonstrado que a produção de melanina nestas células também está relacionada com o AHR, que atua provavelmente induzindo genes envolvidos com a melanogênese (JUX *et al.*, 2011).

Assim sendo, este receptor provavelmente está presente em células B16-F1, de modo que alguns dos efeitos do TCDD nessas células podem ser induzidos pela interação do contaminante com o receptor.

³ O Kd, concentração com a metade da ocupação máxima do receptor, nas espécies mais sensíveis pode ser tão baixo quanto 10-11 M (BOELSTERLI, 2007).

9.2. Exposição ao BDE-209

Viabilidade e proliferação celulares

A viabilidade de células B16-F1 expostas ao BDE-209 não é alterada nas concentrações maiores que 0,001 nM. Entretanto os níveis de necrose em células expostas são numericamente reduzidos, indicando que o BDE-209 pode interferir com mecanismos relacionados à morte celular.

Outros resultados obtidos no presente trabalho apontam que o BDE-209 pode ser tóxico nas maiores concentrações (1 nM e 10 nM) utilizadas para a célula B16-F1, pois houve diminuição da retenção do corante vermelho neutro de forma dependente da concentração nas concentrações 1 e 10 nM; diminuição da proliferação (com 10% de SFB) para as concentrações 0,01; 1,0 e 10 nM e aumento da citotoxicidade na concentração 0,01 nM. Contudo, não houve alteração na viabilidade celular, nem na atividade dos transportadores de efluxo de drogas, demonstrando que o sistema MDR pode não estar relacionado com os efeitos tóxicos do BDE-209.

Observam-se alguns resultados próximos em trabalhos com outras linhagens celulares e outros congêneres de BDEs, que, por apresentarem fórmula química e efeitos semelhantes, podem ser comparados.

No trabalho de CURCIC *et al.* (2014) a viabilidade de células humanas de carcinoma de cólon SW 480 expostas a 5 e 10 μ M de BDE-209 diminuiu. JIN *et al.* (2010) observaram em células RTG-2 expostas a BDE-47 e BDE-209 diminuição da viabilidade e aumento de citotoxicidade nas concentrações 12,5-

100 μM para o BDE-47 e 25-100 μM para o BDE-209, sendo que a viabilidade diminuiu e a citotoxicidade aumentou de forma concentração-dependente.

TAGLIAFERRI *et al.* (2010) observaram diminuição da viabilidade e aumento da citotoxicidade de forma concentração-dependente em células de neuroblastoma humano (SK-N-Mc) expostas a diferentes concentrações (0,1 – 100 μM) de BDE-47 e BDE-99. Estes resultados correspondem com os encontrados por ZHANG *et al.* (2010), que observaram aumento da citotoxicidade de maneira concentração-dependente em células de cultivo primário de neurônios de hipocampo de ratos SD neonatos expostas a BDE-209 (0,01; 0,03 e 0,05 mM). A exposição da linhagem tumoral HepG2 a 50 e 100 μM de BDE-47 reduziu a viabilidade em 29% e 53%, respectivamente (LIU *et al.*, 2015). Houve aumento da citotoxicidade de forma concentração- e tempo-dependente e diminuição da proliferação de células HepG2 expostas ao BDE-99 (0.5–25 μM) (SOUZA *et al.*, 2013). Em 24 h de exposição apenas nas concentrações 10 e 25 μM houve inibição da proliferação; já em 48 h houve diminuição para todas as concentrações (SOUZA *et al.*, 2013). O BDE-209 (10-100 μM) também reduziu a viabilidade celular de células HepG2 de forma concentração-tempo-dependente (HU *et al.*, 2007).

No presente trabalho a maior concentração utilizada foi de 10 nM, muito inferior quando comparada às concentrações utilizadas nos trabalhos acima citados. Este fato pode ser um motivo para o resultado observado no presente trabalho, onde o BDE-209 não alterou níveis de viabilidade através do ensaio de morte celular.

Apesar das concentrações utilizadas em outros trabalhos serem superiores àquelas utilizadas no presente trabalho, na linhagem B16-F1 é

possível ver os efeitos tóxicos do BDE-209 na retenção do corante vermelho-neutro e proliferação celular de maneira concentração-dependente para as maiores concentrações utilizadas. Além disso, concentrações tão altas utilizadas em alguns dos trabalhos citados, não ocorrem em humanos através da exposição ambiental.

Atividade dos transportadores do de efluxo de drogas

Apesar do conceito de que células de melanoma demonstram alta resistência a tratamentos quimioterápicos, no presente trabalho não foi observado aumento de atividade de transportadores de efluxo de drogas após exposição ao BDE-209 através da técnica empregada. No trabalho de ZOLLNER *et al.* (2001) também não foi encontrada relação entre resistência em células da linhagem tumoral de carcinoma hepatocelular (HCC) e níveis de mRNA de MDR1, MDR3, MRP2 e MRP3 do sistema MDR quando comparadas com células de tecido circundante não tumoral. Desta forma, os transportadores de efluxo podem não estar relacionados diretamente com a resistência desta linhagem.

Após pesquisas sobre trabalhos relacionando os efeitos do BDE-209 com atividade dos transportadores de efluxo de drogas do sistema MDR em plataformas de pesquisa sciencedirect.com e webofscience.com com as palavras-chave “BDE-209” “B16-F1”; “BDE-209” “MDR”; “BDE” “MDR”; “multidrug” “BDE”; em janeiro de 2015 não foram encontrados trabalhos relevantes para fundamentar uma discussão mais aprofundada no presente estudo.

Citotoxicidade

Uma das menores concentrações de BDE-209 (0,01 nM) causou menor nível de estresse para as células, já que houve uma diminuição do metabolismo do MTT e da proliferação celular, porém sem alteração na viabilidade celular e retenção do corante vermelho neutro. Já nas maiores concentrações de BDE-209, a célula sofre maior estresse, observado pelos resultados dos ensaios do MTT, em função do aumento do metabolismo, pela diminuição mais acentuada da proliferação celular e diminuição da retenção do corante vermelho neutro, demonstrando que o BDE-209 é capaz de modular respostas relacionadas à toxicidade celular, porém sem alterar a viabilidade. Já a menor concentração do contaminante BDE-209 (0,001 nM) não afeta parâmetros como retenção do corante vermelho neutro, alterações na proliferação celular ou no metabolismo do MTT.

No presente trabalho, portanto, verificou-se o efeito toxicológico denominado *hormesis* no ensaio de citotoxicidade, que é um efeito considerado por CALABRESE E BALDWIN (2003) como mais comum do que o modelo limiar (curva concentração-resposta clássica).

Considerando que muitas substâncias podem promover certos estímulos celulares em baixas concentrações e doses, *hormesis* é um efeito causado por “algumas substâncias (hormetinas) que apresentam efeitos tóxicos em doses muito baixas, efeitos benéficos em concentrações um pouco mais elevadas até um limiar, a partir do qual voltam a produzir efeitos nocivos, normalmente diferentes que os efeitos benéficos” (REPETTO, 1997 apud LUCKEY; VENUGOPAL, 1997), gerando uma curva dose-resposta complexa (LUCKEY; VENUGOPAL, 1997). CALABRESE E BALDWIN (2003) definem *hormesis*

como um efeito bifásico caracterizado por um maior estímulo em doses baixas e uma inibição em doses elevadas.

Gráficos demonstrando efeito *hormesis* são normalmente caracterizados como dose-resposta em forma de “U” (REPETTO, 1997); (LUCKEY; VENUGOPAL, 1977), assim como alguns resultados observados no presente trabalho com a exposição ao BDE-209.

No ensaio do MTT observou-se efeitos citotóxicos na concentração 0,01 nM e aumento do metabolismo do MTT na concentração 10 nM dos grupos expostos ao BDE-209.

De acordo com a hipótese de DAMELIN *et al.* (2000), a *hormesis* pode ocorrer em exposições a baixas concentrações, exibindo um aumento significativo da atividade celular que coincide com o aumento de proteínas relacionados ao estresse celular. Desta forma, sugere que o efeito de *hormesis* é uma resposta celular específica de estresse e um indicador para concentrações baixas, porém nocivas. Ainda, a resposta hormética é proporcional às concentrações da substância tóxica, sugerindo que é uma resposta celular específica de acordo com o acúmulo de níveis críticos de xenobióticos dentro das células (DAMELIN *et al.*, 2000).

Assim sendo, a baixa concentração de 0,01 nM de BDE-209 foi suficiente para aumentar a citotoxicidade celular, sendo uma resposta ao estresse causado por uma baixa concentração. Apenas na maior concentração de BDE-209 (10 nM) há aumento no metabolismo do MTT e diminuição da viabilidade e proliferação celular, sugerindo um efeito hormético que pode significar um aumento na produção de ATP necessário para os sistemas de defesa lidarem com o estresse, que serve para tentar restaurar a homeostase

celular (DAMELIN *et al.*, 2000), refletindo na toxicidade causada a pelo BDE-209 10 nM à célula.

Já pela hipótese baseada no trabalho de TAGLIAFERRI *et al.* (2010), que observaram efeito hormético em células humanas de neuroblastoma expostas ao BDE-47, o contaminante tóxico do presente trabalho (BDE-209) em baixas concentrações pode ter alta afinidade por alvos específicos sem induzir morte celular; a ligação com esses sítios específicos pode ativar alguns mecanismos de defesa de forma a diminuir a toxicidade. Assim como no grupo exposto concentração de 0,01 nM de BDE-209 em que é observado citotoxicidade, porém sem alteração dos parâmetros de viabilidade, retenção do corante vermelho neutro e proliferação celular.

Ainda, talvez a importância fisiológica do aumento do estresse celular a exposições a baixas concentrações de substâncias tóxicas seja a indução da expressão de proteínas de estresse que aumentariam a proteção a um estresse posterior e maior decorrente de uma maior exposição (CALABRESE, 2008).

Proliferação celular (2% SFB)

Uma hipótese sobre este resultado em comparação com os dados do ensaio utilizando 10% de SFB – já que neste a exposição às maiores concentrações de BDE-209 resultou em menor proliferação celular e retenção do corante vermelho neutro – é que na presença de maior quantidade de soro, o contaminante pode ligar-se em algumas moléculas presentes neste e ser endocitado mais facilmente e assim permitindo que permaneça em maior concentração dentro da célula, promovendo maior efeito tóxico e diminuindo a proliferação. E assim, uma hipótese a ser pensada é que na presença de

apenas 2% de SFB, o contaminante entraria menos junto com essas moléculas do soro, diminuindo sua concentração intracelular e seu potencial tóxico para o parâmetro de proliferação e retenção do corante vermelho neutro. Ou os efeitos observados em 2% de SFB podem ser positivos para a proliferação celular pois na presença de menor quantidade de SFB o contaminante pode aumentar a proliferação atuando como um promotor, como uma medida compensatória para a menor quantidade de SFB. Ainda, a proliferação que é induzida pela maior quantidade de soro poderia encobrir a ação do contaminante, dificultando a observação dos efeitos promotores deste.

LI *et al.* (2012) observaram efeito promotor ao verificarem aumento de proliferação de forma concentração-dependente em diferentes linhagens celulares tumorais: MCF-7 (câncer de mama), HeLa (câncer cervical, OVCAR-3 (câncer de ovário) e também células CHO (células ovarianas de hamster normais) em células expostas a 5 nM -100 nM de BDE-209 em meio contendo 1% de SFB, a partir das maiores concentrações. Ainda, as concentrações acima de 100 nM induziram além de proliferação, efeitos antiapoptóticos.

Assim, o BDE-209 é capaz de atuar como um promotor de tumor e até como indutor de tumor (considerando os dados da linhagem não tumoral CHO), já que este contaminante pode alterar parâmetros envolvidos com sobrevivência e proliferação celulares em linhagens tumorais e não tumorais.

HU *et al.* (2007) observaram efeitos tóxicos do BDE-209 (10-100 μ M) em células HepG2, incluindo o aumento de forma concentração- e tempo-dependente na produção de EROs. Neste trabalho, a via de produção de EROs provavelmente não está relacionada com os efeitos tóxicos do BDE-209. Em contrapartida, foram utilizadas no presente trabalho concentrações bem

menores, sendo que talvez a concentração intracelular do contaminante não foi suficiente para alterar os níveis celulares de EROs.

Ciclo celular

No trabalho de HU *et al.* (2007), o BDE-209 (10-100 μM) foi capaz de aumentar o número de células HepG2 na fase S e diminuir o número de células na fase G0/G1 de maneira concentração-dependente (HU *et al.*, 2007). Neste caso, os resultados demonstram que provavelmente o contaminante foi capaz de reter as células na fase S, podendo impedir ou retardar a continuação do ciclo celular, podendo assim levar as células à morte.

No presente trabalho, houve diminuição do percentual de células na fase G1 após exposição a 0,01 nM de BDE-209, o que concorda com o resultado de aumento da proliferação (com 2% de SFB). Entretanto, também foi observado aumento de células na fase S após exposição a 0,1 nM de BDE-209, não havendo aumento de proliferação nem de viabilidade celular. Assim, o BDE-209 nessa concentração é capaz provavelmente reter ou manter por um período de tempo as células B16-F1 na fase S.

Outro dado interessante foi obtido por LI *et al.* (2012). Segundo eles, a proliferação da linhagem não tumoral CHO foi induzida pelo BDE-209 com aumento do percentual de células na fase S, mas para a linhagem tumoral OVCAR-3, houve aumento da proliferação e aumento do percentual de células na fase G2/M (LI *et al.*, 2012), sugerindo que os efeitos do BDE-209 no ciclo celular em células normais e em células tumorais podem ocorrer por mecanismos diferentes.

Ensaio *scratch*

Existem dados limitados sobre a migração de linhagens tumorais expostas aos BDEs, um indício positivo para a hipótese do presente trabalho, pode ser os resultados do trabalho de QU *et al* (2015), que ao exporem células humanas de câncer de pulmão A549 e H358 à 10 nM de uma molécula similar aos BDEs, um PBDE hidroxilado (6-OH-BDE-47 ou 6-hidróxido-2,2',4',4'-tetrabromodifeniléter), encontraram aumento da invasão e migração destas células tumorais, sendo que houve maior mobilidade em função do aumento da concentração do contaminante em que as células foram expostas. Considerando os dados de QU *et al* (2015) e os dados obtidos no presente trabalho, qual reflete um aumento do fechamento do risco (*scratch*) após a exposição dessas células B16-F1 à 1 nM de BDE-209. Assim, é importante considerar que este contaminante possa apresentar efeitos promotores de tumor em células já transformadas (tumorais). Ainda, este parâmetro pode estar relacionado com maior formação de metástases, já que os resultados sugerem alterações de parâmetros importantes para tal (aumento de proliferação e migração) através do ensaio realizado no presente trabalho.

Ensaio com a dacarbazina

Da mesma forma que discutido anteriormente para o contaminante TCDD, a pré-exposição ao contaminante BDE-209 promoveu um efeito protetor a pós-exposição ao quimioterápico dacarbazina, tendo um efeito mais pronunciado que a exposição ao TCDD, já que a maioria das concentrações de BDE-209 promoveu aumento da viabilidade e proliferação de células B16-F1. Novamente esse é um efeito importante a ser levado em consideração no presente trabalho, pois indica um possível aumento da resistência celular

contra apoptose, ou ainda aumento da robustez dos mecanismos de defesa celular da linhagem estudada.

10.CONCLUSÕES

- Os contaminantes TCDD e BDE-209 apresentaram níveis de toxicidade diferentes, agindo provavelmente através de diferentes mecanismos em células B16-F1, apesar de ambos serem altamente tóxicos, potencialmente cancerígenos e - de acordo com o que indicam vários trabalhos - ligarem-se ao mesmo receptor (AHR).
- Apesar de os resultados do ensaio de morte celular não serem estatisticamente significativos, o TCDD induziu a diminuição da taxa de morte celular em células de B16-F1, gerando uma tendência ao aparecimento de um efeito vantajoso para a resistência destas células. Ainda, O BDE-209 diminuiu as taxas de necrose sem alterações na viabilidade celular, indicando que em ambos os contaminantes apresentam uma tendência para agirem em mecanismos de defesa celular em resposta ao estresse causado, diminuindo seus efeitos tóxicos na mortalidade de células B16-F1.
- Apenas nos grupos expostos ao TCDD 0,01 nM e BDE 1 nM as células apresentaram características que poderiam torná-las mais agressivas de acordo com os ensaios de proliferação e *scratch*.
- A pré-exposição aos contaminantes TCDD e BDE-209 promoveu um efeito protetor a uma exposição posterior ao quimioterápico dacarbazina em células B16-F1, que apresentaram aumento dos parâmetros verificados: proliferação e retenção do vermelho neutro, sugerindo aumento de resistência celular.
- Com base nos resultados obtidos, a exposição de células B16-F1 ao TCDD e BDE-209 induziu parâmetros relacionados com maior agressividade tumoral, como aumento de resistência ao quimioterápico dacarbazina, proliferação e fechamento de *scratch*, sendo condizentes com a hipótese do presente trabalho.

11. PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar dos relatos na literatura, de que o mecanismo de ação deve ser parecido para os dois contaminantes, concentrações semelhantes levam a alguns efeitos diferentes. Assim como a hipótese de DAMENIN *et al.* (2000), efeitos diferentes podem ser esperados, pois dependem das qualidades intrínsecas do agente tóxico ou o complexo agente tóxico/ ligante que determinam sua capacidade de entrar nas células e interações com componentes celulares.

Após a análise dos resultados muitas questões ainda surgem para a elucidação dos efeitos e mecanismos de atuação do TCDD e o BDE-209. Para que ocorra a continuidade das buscas por respostas, alguns ensaios podem ser considerados futuramente:

- Realização de vários ensaios com outros tempos de exposição (por exemplo: 48 e 72 h)
- Realizar os ensaios de retenção do corante vermelho neutro, atividade mitocondrial com o MTT e morte celular com exposição contendo 2% de SFB, para uma melhor comparação com os outros ensaios realizados com 2%
- Realizar os ensaios de atividade mitocondrial com o MTT e ciclo celular com pré-exposição aos contaminantes seguido da exposição à dacarbazina
- Ensaio de invasão (de acordo com GUIMARÃES *et al.*, 2010) com o objetivo de verificar a capacidade das células B16-F1 expostas aos contaminantes TCDD e BDE-209 de transporem uma barreira de matrigel com poros de 8 μ m em placas *Transwell*.
- Caso o ensaio de invasão forneça resultados interessantes, o ensaio de zimografia bem como o ensaio de determinação da atividade gelatinolítica

tornam-se interessantes para a detecção de metaloproteínas da matriz (MMPs), que desempenham um importante papel na invasão celular, sendo marcadores de malignidade tumoral.

- Ensaio *scratch* com a utilização de um bloqueador eficiente de proliferação para verificar apenas a capacidade de migração das células B16-F1 expostas ao TCDD e BDE-209.

- Uso de *Western Blotting* / RT-PCR para verificar níveis de expressão e expressão proteica do receptor AHR em células de B16-F1 e sua indução pelo TCDD e BDE-209 em diferentes concentrações.

- Uso de *Western Blotting* / RT-PCR para verificar níveis de expressão gênica e expressão proteica de moléculas envolvidas com o sistema de efluxo de drogas para compreender melhor a relação deste com células B16-F1 e os contaminantes TCDD e BDE-209.

- Ensaio de melanogênese para verificar alterações na produção de melanina em células B16-F1 desencadeadas pelos contaminantes TCDD e BDE-209 e sua relação com o receptor AHR após as exposições.

- Ensaio de curva de proliferação – cinética de proliferação, para acompanhar o efeito dos contaminantes nas células x tempo.

- Conclusão dos ensaios de morte celular: selecionar ensaios que podem responder melhor como os contaminantes afetam a viabilidade de células tumorais expostas.

12. REFERÊNCIAS

- ABIQUIM – Associação Brasileira da Indústria Química. Produtos Químicos Brasileiros – BRAZILIAN CHEMICALS. Disponível em <http://canais.abiquim.org.br/braz_new/> Acesso em Abril/2016.
- ALAE, M.; ARIAS, P.; SJODIN, A.; BERGMAN, A. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. **Environment International**, vol. 29 p. 683-689, 2003.
- ALBERTS B.; ROBERTS, K.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; JOHNSON, A. **Biologia Molecular da célula**. Editora Artmed, Porto Alegre, 5ª edição, p. 1205-1216, 2010.
- ALMEIDA V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI C. A.; DONNICI C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, vol. 28 n°1 p. 118-129, 2005.
- ALY, H. A. A.; KHAFAGY, R. M. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced cytotoxicity accompanied by oxidative stress in rat Sertoli cells: Possible role of mitochondrial fractions of Sertoli cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 252 p. 273–280, 2011.
- ATCC; B16-F0 – Disponível em:<<http://www.atcc.org/products/all/CRL-6322.aspx>>.Acesso em:02/2016.
- B16-F1 – General Information. Disponível em:<<http://www.atcc.org/products/all/CRL-6323.aspx#generalinformation>>Acesso em:02/2016.
- B16-F10 – General Information. Disponível em: <<http://www.atcc.org/products/all/CRL-6475.aspx#generalinformation>>Acesso em:02/2016.
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for Chlorinated Dibenzo-P-Dioxins**, Atlanta, GA., 1998.
- AUSTIN, M. T., XING, Y., HAYES-JORDAN, A. A., LALLY, K. P., & CORMIER, J. N. Melanoma incidence rises for children and adolescents: an epidemiologic review of pediatric melanoma in the United States. **Journal of Pediatric Surgery**, vol. 48 n° 11 p. 2207-2213, 2013.
- BAY, C.; KEJS, A. M. T.; STORM, H. H.; ENGHOLM, G. Incidence and survival in patients with cutaneous melanoma by morphology, anatomical site and TNM stage: A Danish Population-based Register Study 1989–2011. **Cancer Epidemiology**, vol. 39 n° 1 p. 1-7, 2015.
- BENOV, L., SZTEINBERG, L., FRIDOVICH, I. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 25 p. 826–831, 1998.
- BOELSTERLI, U. A. **Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets**. CRC Press. 2ª ed., 2007.
- BRASIL. Portaria Interministerial N° 19 DE 29 DE JANEIRO DE 1981. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de novembro de 2002, seção 1. Disponível em: <<http://abiquim.org.br/restrito/esp/pinter-19-81-def.pdf>> Acesso em Abril/2016.

- CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. The Hormetic Dose-Response Model Is More Common than the Threshold Model in Toxicology. **Toxicological Sciences**, vol. 71 p.246-250, 2003.
- CALABRESE, E. J. Converging concepts: Adaptive response, preconditioning, and the Yerkes–Dodson Law are manifestations of hormesis. **Ageing Research Reviews**, vol. 7, p. 8-20, 2008.
- CARVALHO, M. A.; ZECCHIN, K. G.; SEGUIN, F.; BASTOS, C. D.; AGOSTINI, M.; RANGEL, A. L. C. A.; VEIGA, S. S.; RAPOSO, H. C. F.; LODA, M.; COLETTA, R. D.; GRANER, E. Fatty acid synthase inhibition with Orlistat promotes apoptosis and reduces cellgrowth and lymph node metastasis in a mouse melanoma model. **International Journal of Cancer**, vol. 123 p. 2557-2565, 2008.
- CAS - Chemical Abstracts Service – **CAS Registry**. Disponível em:<www.cas.org>, acesso em 01/2016.
- CHEN, Y.; LI, J.; LIU, L.; ZHAO, N. Polybrominated diphenyl ethers fate in China: A review with an emphasis on environmental contamination levels, human exposure and regulation. **Journal of Environmental Management**, vol. 113p. 22–30, 2012.
- CHENG, G. C.; SCHULZE, P. C.; LEE, R. T.; SYLVAN, J.; ZETTER, B. R.; HUANG, H. Oxidative stress and thioredoxin-interacting protein promote intravasation of melanoma cells. **Experimental Cell Research**, vol. 300 p. 297-307, 2004.
- CHU, X.; KORZEKWA, K.; ELSBY, R.; FENNER, K.; GALETIN, A.; LAI, Y.; MATSSON, P.; MOSS, A.; NAGAR, S.; ROSANIA, G. R.; BAI, J. P. F.; POLLI, J. W.; SUGIYAMA Y.; BROWER, K. L. R. Intracellular Drug Concentrations and Transporters: Measurement, Modeling, and Implications for the Liver. **Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, vol. 94 p. 126-141, 2013.
- COLEY, H. M.; VERRILL, M. W.; GREGSON, S. E.; ODELL, D. E.; FISHER, C.; JUDSON, I. R. Incidence of P-glycoprotein overexpression and multidrug resistance (MDR) reversal in adult soft tissue sarcoma. **European Journal of Cancer**, vol. 36 p. 881–888, 2000.
- COLLIER, A. C.; PRISTOS, K. L.; PRISTOS, C. A. TCDD as a biological response modifier for Mitomycin C: Oxygen tension affects enzyme activation, reactive oxygen species and cell death. **Life Sciences**, vol. 78 p. 1449-1507, 2006.
- COMISSÃO DE NORMATIZAÇÃO – SIBI/UFPR. **Orientação para Normatização de Trabalhos Acadêmicos** – Modelo de dissertação; disponível em: <http://www.portal.ufpr.br/tutoriais_normaliza/modelo_dissertacao_junho_2012.pdf> acessado em 12/2015.
- CURCIC, M.; DURGO, K.; KOPJAR, N.; ANIC, M.; VUCINIC, S.; ANTONIJEVIC, B. Cadmium and decabrominated diphenyl ether mixture: *in vitro* evaluation of cytotoxic, prooxidative and genotoxic effects. **Environmental toxicology and pharmacology**, vol. 38 p. 663–671, 2014.
- DAMELIN, L. H.; VOKES, S.; WHITCUTT, J. M.; DAMELIN, S. B.; ALEXANDER, J. J. Hormesis: a stress response in cells exposed to low levels of heavy metals. **Human & Experimental Toxicology**, vol. 19 p.420-430, 2000.
- DANCIU, C.; FALAMAS, A.; DEHELAN, C.; SOICA, C.; RADEKE, H.; BARBUTUDORAN, L.; BOJIN, F.; PÎNZARU, C.; MUNTEANU, M. F. A characterization of four B16 murine melanoma cell sublines molecular fingerprint and proliferation behavior. **Cancer Cell International**, vol. 13 n° 75, 2013.
- DARNERUD, P. O.; AUNE, M.; LARSSON, L.; HALLGREN, S. Plasma PBDE and thyroxine levels in rats exposed to bromkal or BDE-47. **Chemosphere**, vol. 67 p. 386-92, 2008.

- DAVIS II, W. J.; LAUER, T. F.; BURDICK, A. D.; HUDSON, L. G.; BURCHIEL, S. W. Prevention of Apoptosis by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the MCF-10A Cell Line: Correlation with Increased Transforming Growth Factor α Production. **Cancer Research**, vol. 61 p. 3314-3320, 2001.
- DOMINGO, J. L.; NADAL, M. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat: What about environmental contaminants? **Environmental Research**, vol. 145, p. 109-115, 2016.
- EBERT, B.; SEIDEL, A.; LAMPEN, A. Identification of BCRP as transporter of benzo[a]pyrene conjugates metabolically formed in Caco-2 cells and its induction by Ah-receptor agonists. **Carcinogenesis**, vol. 26 p. 1754–1763, 2005.
- ECHA – European Chemical Agency**. Regulamento REACH. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/pt/regulations/reach>> Acesso em: Maio/2016.
- EGELAND, G.M.; SWEENEY M.G., FINGERHUT M.A; WILLE, K. K.; SCHNORR, T. M.; HALPERIN, W. E. Total serum testosterone and gonadotropins in workers exposed to dioxins. **American Journal of Epidemiology**, vol. 139 p. 272-281, 1994.
- EPA - Environmental Protection Agency. **Decabromodiphenyl Ether (BDE-209)**. Washington, DC. vol. 635, 2008.
- FERNANDEZ, P.; SAFE, S. Growth inhibitory and antimitogenic activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in T47D human breast cancer cells. **Toxicology**, vol. 61 p. 185-197, 1993.
- FERNANDEZ-SALGUERO, P. M.; HILBERT, D. M.; RUDIHOFF, S.; WARD, M. J.; GONZALEZ, F. J. Aryl-hydrocarbon Receptor-Deficient Mice Are Resistant to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-Induced Toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 140 p. 173–179, 1996.
- FIDLER, I. J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survivor *in vivo*. **Cancer Research**, vol. 35 p. 218-224, 1975.
- FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. **Nature Publishing Group**, vol. 3 p. 453-458, 2003.
- FUKUSHIMA, K.; TSUKIMORI, K.; LI, D.; TAKAO, T.; MOROKUMA, S.; KATO, K.; SEKI, H.; TAKEDA, S.; MATSUMARA, S.; WAKE, N. Effect of transient TCDD exposure on immortalized human trophoblast-derived cell lines. **Human and Experimental Toxicology**, vol. 31 p. 550-556, 2012.
- GARCIA, M. A.; PEÑA, D.; ÁLVAREZ, L.; COCCA, C.; PONTILLO, C.; BERGOC, R.; PISAREV, D. K.; RANDI, A. Hexachlorobenzene induces cell proliferation and IGF-I signaling pathway in an estrogen receptor α -dependent manner in MCF-7 breast cancer cell line. **Toxicology Letters**, vol. 192 p. 195-205, 2010.
- GELHAUS, S. L.; GILAB, O.; HWANG, W.; PENNING, T. M.; BLAIR, I. A. Multidrug resistance protein (MRP) 4 attenuates benzo[a]pyrene-mediated DNA-adduct formation in human bronchoalveolar H358 cells. **Toxicology Letters**, vol. 209 p. 58– 66, 2009.
- GIRIBALDI, L.; CHIAPPINI, F.; PONTILLO, C.; RANDI A. S.; PISAREV, D. L. K.; ALVAREZ L. Hexachlorobenzene induces deregulation of cellular growth in rat liver. **Toxicology**, vol. 289 p. 19–27, 2011.
- GORANTLA, V. C.; KIRKWOOD J. M. State of Melanoma - An Historic Overview of a Field in Transition. **Hematology Oncology Clinics of North America**, vol. 28 p.415–435, 2014.

- GOTTLICHER, M.; WIEBEL, F. J. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Causes Unbalanced Growth in 5L Rat Hepatoma Cells. **Toxicology and applied pharmacology**. vol. 111 p. 496-503, 1991.
- GRAY-SHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and the new target therapy. **Nature**, vol. 445 p. 851-857, 2007.
- GUIMARÃES, F. S. F.; ANDRADE, L. F.; MARTINS, S. T.; ABUD, A. P.; SENE, R. V.; WANDER, C.; TISCORNIA, I.; BOLLATI-FOGOLLIN, M.; BUCHI, D. F.; TRINDADE, E. S. *in vitro* and *in vivo* anticancer properties of a *Calcareo carbonica* derivative complex (M8) treatment in a murine melanoma model. **BioMed Central Cancer**, vol. 10, 2010.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, vol. 144, 2011.
- HARDY, M. Distribution of decabromodiphenyl oxide in the environment. **Organohalogen Compound**, vol. 47 p. 237–240, 2000.
- HART, D. A.; SMITH, R. Differences between the F10, BL6 and F1 sublines of the B16 melanoma in the enhancement of plasminogen activator inhibitor secretion by phorbol myristate acetate. **Cancer Letters**, vol. 35, 1986.
- HU, X.; XU, Y.; HU, D.; HUI, Y.; Y. F. Apoptosis induction on human hepatoma cells HepG2 of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209). **Toxicology Letters**, vol. 171 p. 19-28, 2007.
- IARC - International Agency for Research on Cancer, **Monographs evaluate consumption of red meat and processed meat**, Press release No. 240. Disponível em: <https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240_E.pdf> acessado em 21/12/2015.
- IARC - International Agency of Research on Cancer, editado por BOYLE P.; LEVIN B. **World Cancer Report**, Lyon, France, 2008.
- IARC - International Agency of Research on Cancer, **Word Cancer Report**, editado por STEWART B. W.; WILD, C. P., 2014.
- IARC - International Agency of Research on Cancer, **Special Report: Policy - A review of human carcinogens—Part F: Chemical agents and related occupations**. vol. 10 p. 1143-1144, 2009.
- INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **O que é câncer?** Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>Acesso em 12/2015, 2014a.
- INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Como é o processo de carcinogênese?** Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319>Acesso em 12/2015,2014b.
- INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2016**, Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2015/inca_estima_quase_600_mil_casos_novos_de_cancer_em_2016>, Acesso em 12/2015,2015.
- INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Pele Melanoma**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao+>>

- INDRAN, I. R.; GRÉGORI, A. T.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, vol. 1807 p. 735-745, 2011.
- IONAS, A. C.; ULEVICUS, J.; GÓMEZ, A. B.; BRANDSMA, S. H.; LEONARDS, P. E. G.; BOR, M. V.; COVACI, A. Children's exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) through mouthing toys. **Environment International**, vol. 87 p. 101-107, 2016.
- JABLONSKA, O.; PIASECKA-SRADER, J.; NYNCA, A.; KOŁOMYCKA, A.; ROBAK, A.; WĄSOWSKA, B.; CIERESZKO, R. E. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin Alters Steroid Secretion But Does Not Affect Cell Viability And The Incidence Of Apoptosis In Porcine Luteinised Granulosa Cells. **Acta Veterinaria Hungarica**, vol. 62 p. 408-421, 2014.
- JACOB, A.; POTIN, S.; CHAPY, H.; CRETE, D.; GLACIAL, F.; GANESHAMOORTHY, K.; COURAUD P.; SCHERMANN, J.; DECLÈVES, X. Aryl hydrocarbon receptor regulates CYP1B1 but not ABCB1 and ABCG2 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells after TCDD exposure. **Brain Research**, vol. 1613 p. 27-36, 2015.
- JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **A Cancer Journal for Clinicians**, vol. 61 (2) p. 69-90, 2011.
- JIANG, H.; LIN, Z.; WU, Y.; CHEN, X.; HU, Y.; LI, Y.; HUANG, C.; DONG, Q. Daily intake of polybrominated diphenyl ethers via dust and diet from an e-waste recycling area in China. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 276 p. 35-42, 2014.
- JIGOREL, E.; LE VEE, M.; BOURSIER-NEYRET, C.; PARMENIER, Y.; FARDEL, O. Differential regulation of sinusoidal and canalicular hepatic drug transporter expression by xenobiotics activating drug-sensing receptors in primary human hepatocytes. **Drug Metabolism and Disposition**, vol. 34 p. 1756-1763, 2006.
- JIN, J.; GONG, J.; YIN, T.; LU, Y.; XIA, J.; XIE, Y.; DI, Y.; HE, L.; GUO, J.; SUN, J.; NOTEBORN, M. H. M.; QU, S. PT4D-apoptin protein and dacarbazine show a synergistic antitumor effect on B16-F1 melanoma *in vitro* and *in vivo*. **European Journal of Pharmacology**, vol. 654 p. 17-25, 2011.
- JIN, S.; YANG, F.; HUI, Y.; XU, Y.; LU, Y.; LUI, J. Cytotoxicity and apoptosis induction on RTG-2 cells of 2,20,4,40-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) and decabrominated diphenyl ether (BDE-209). **Toxicology in vitro**, vol. 24 p. 1190-1196, 2010.
- JUNQUEIRA, G. J.; BRAGA, L. M.; MOTTA, M.S.; PILLA, H.S.; Modelo experimental de melanoma murino em camundongos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, vol. 72 p. 487-489, 1997.
- JUX, B.; KADOW, S.; LUECKE, S.; RANNUG, A.; KRUTMANN, J.; ESSER, C. The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates UVB Radiation-Induced Skin Tanning. **Journal of Investigative Dermatology**, vol. 131 p. 203-210, 2011.
- KIM, Y.; SHIM, Y.; SHIM, Y.; SUL, D.; LEE, E.; MIN, B. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin(TCDD) Induces Calcium Influx Through T-type Calcium Channel and Enhances Lysosomal Exocytosis and Insulin Secretion in INS-1 Cells. **International Journal of Toxicology**, vol. 28 n° 3 p.151-161, 2009.
- LEONETTI, C.; BUTT, C. M.; HOFFMAN, K.; MIRANDA, M. L.; STAPLETON, H. M. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and 2,4,6-tribromophenol in human placental tissues. **Environment International**, vol. 88 p. 23-29, 2016.

- LEV, D. C.; VLADISLAVA, A. O.; MELINKOVA, O.; MILLER, C.; STONE, V.; RUIZ, M.; MCGARY, E. C.; ANANTHASWAMY, H. N.; PRICE, J. E.; BAR-ELI, M. Exposure of Melanoma Cells to Dacarbazine Results in Enhanced Tumor Growth and Metastasis In Vivo. **Journal of clinical oncology**, vol. 22 p. 2092-2100, 2004.
- LEVINE, E. A.; HOLZMAYER, T. A.; BONINSON, I. B.; GUPTA T. K. MDR-1 Expression in Metastatic Malignant Melanoma. **Journal of surgical research**, vol. 54 p. 621-624, 1993.
- LI, Y.; WANG, K.; JIANG, Y.; CHANG, X.; DAI, C.; ZHENG, J. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) inhibits human ovarian cancer cell proliferation. **Cellular Oncology**, vol. 37 p. 429–437, 2014.
- LI, Z.; LIU, X.; WANG, N.; CHEN, J.; CHEN, Y.; HUANG, J.; SU, C.; XIE, F.; YU, B.; CHEN, D. Effects of Decabrominated Diphenyl Ether (PBDE-209) in Regulation of Growth and Apoptosis of Breast, Ovarian, and Cervical Cancer Cells. **Environmental Health Perspectives**, vol. 120 p. 541-546 n° 4, 2012.
- LIANG, C.; PARK, Y. A.; GUAN, J. *in vitro scratch* assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature protocols**, vol. 2 n°2 p. 329-333, 2007.
- LIN, P.; LIN, C.; HUANG, C.; CHUANG, M.; LIN, P. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces oxidative stress, DNA strand breaks, and poly (ADP-ribose) polymerase-1 activation in human breast carcinoma cell lines. **Toxicology Letters**, vol. 172 p. 146–158, 2007.
- LIU, X.; WANG, J.; LU, C.; ZHU, C.; QUIAN, B.; LI, Z.; LIU, C.; SHAO, J.; YAN, J. The role of lysosomes in BDE 47-mediated activation of mitochondrial apoptotic pathway in HepG2 cells. **Chemosphere**, vol. 124 p. 10–21, 2015.
- LIU, H.; SAFE, S. Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on Insulin-Induced Responses in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. **Toxicology and applied pharmacology**, vol.138 p. 242 – 250, 1996.
- LUCKEY, T. D.; VENUGOPAL, B. **Physiologic and Chemical Basis for Metal Toxicity – Metal Toxicity in Mammals**. Editora Springer. Netherlands 1a edição, New York, USA. p. 9-22, 1977.
- MAGGETTO, C.; PIROTTON, S.; KNOTT, I.; AERTS, B.; EVRARD, E.; GONZE, M. M.; RAES, M.; FABRY, L.; **Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as a Product** –Development of a serum-free medium for MRC-5 culture. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 463-465, 1999.
- MANDAL, P. K. Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. **Journal of Comparative Physiology B**, vol. 175 p. 221-230, 2005.
- MATSUMURA, F. Is the Ah receptor a stress response receptor, mediating cellular defense reactions? **Journal of UOEH**, vol. 1 p. 153–159, 2003.
- MARTINS, W. K.; SEVERINO, D.; SOUZA, C.; STOLF, B. S.; BAPTISTA, M. S. Rapid screening of potential autophagic inductor agents using mammalian cell lines. **Biotechnology Journal**, vol. 8 p. 730-737, 2013.
- MAZDAI, A.; DODDER N.G.; ABERNATHY M. P., HITES R. A.; BIGSBY R.M. Polybrominated Diphenyl Ethers in Maternal and Fetal Blood Samples **Environmental Health Perspectives**, n° 9, vol. 111, p. 1249-1252, 2003.
- MAZUR, C. S.; MARCHITTIA, S. A.; ZASTREB, J. P-glycoprotein inhibition by the agricultural pesticide propiconazole and its hydroxylated metabolites: Implications for pesticide–drug interactions. **Toxicology Letters**, vol. 232 p. 37–45, 2015.

- MCDONALD, T. A. A perspective on the potential health risks of PBDEs. **Chemosphere**, vol. 46 p. 745-755, 2002.
- MECHETNER, E.; KYSHTOOBAYEVA, A.; ZONIS S.; KIM, H.; STROUP, R.; GARCIA, R.; PARKER, R. J.; FRUEHAUF, J. P. Levels of Multidrug Resistance (MDR1) P-Glycoprotein Expression by Human Breast Cancer Correlate with in vitro Resistance to Taxol and Doxorubicin. **Clinical Cancer Research**, vol. 4 p.389-398, 1998.
- MILLER, A. J.; MIHN M. C. J. Mechanisms of Melanoma. **The New England Journal of Medicine**, vol. 355 p. 51-65, 2006.
- MORCK, A; HAKK, H.; ORN, U; WEHLER E. K. Decabromodiphenyl ether in the rat: absorption, distribution, metabolism, and excretion. **Drug Metabolism and Disposition**, vol. 31 p. 900-907, 2003.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **The Journal of Immunology**, vol. 65 p.55–63, 1983.
- MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R. E. Clonogenic Cell Survival Assay. **Chemosensitivity vol. 1: in vitro Assays**. Blumenthal, vol. 110 p. 21-28, 2005.
- NEBERT, D. W.; ROE, A. L.; DIETER, M. Z.; SOLIS, W. A.; YANG, Y.; DALTON T. P. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. **Biochemical Pharmacology**, vol. 59, p.65–85, 2000.
- NIJENHUIS, C. M.; HAANEN J. B. A. G.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJNEN, J.H. Is combination therapy the next step to overcome resistance and reduce toxicities in melanoma? **Cancer Treatment Reviews**, vol. 39 p. 305-312, 2013.
- NOGUCHI, F., INUI, S.; NAKAJIMA, T.; ITAMI, S. Hic-5 affects proliferation, migration and invasion of B16 murine melanoma cells. **Pigment Cell & Melanoma Research**, vol. 25, p. 773-782, 2012.
- NTP – NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, **Report of Carcinogens**, 12a edição, 2011.
- NTP – NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. Studies of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in female Harlan sprague-dawley rats. **Toxicology and Carcinogenesis** n° 06-4468, 2006.
- OENGA, G. N.; SPINK, C. D.; CARPENTER, D. O. TCDD and PCBs inhibit breast cancer cell proliferation *in vitro*. **Toxicology in vitro**, vol. 18 p. 811–819, 2004.
- OKEY, A. B.; RIDDICK, D. S.; HARPERB, P. A. The Ah receptor: Mediator of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. **Toxicology Letters**, vol. 70 p. 1-22, 1994.
- PAAJARVI, G.; VILUKSELA, M.; POHJANVIRTA, R.; STENIUS, U.; HOGBERG, J. TCDD activates Mdm2 and attenuates the p53 response to DNA damaging agents. **Carcinogenesis**, vol. 26 p. 201– 208, 2005.
- PALANISAMY, A.; KRISHNASWAMY, R.; PARAMASIVAN, P.; CHIH-YANG, H.; V. P., VISHWANADHA. Eicosapentaenoic acid prevents TCDD-induced oxidative stress and inflammatory response by modulating MAP kinases and redox-sensitive transcription factors. **British Journal of pharmacology**, vol. 172 p. 4726-4740, 2015
- PARK, S.; MATSUMURA, F.; Characterization of anti-apoptotic action of TCDD as a defensive cellular stress response reaction against the cell damaging action of ultra-violet irradiation in an immortalized normal human mammary epithelial cell line, MCF10A. **Toxicology**, vol. 217 p. 139-146, 2006.

- PARKIN, D. M.; MESHER, D.; SASIENI, P. Cancers attributable to solar (ultraviolet) radiation exposure in the UK in 2010. **British Journal of Cancer**, vol. 105 p. 66-69, 2011.
- PEÑAA, D.; PONTILLO, C.; GARCÍA, M. A.; COCCA, C.; ALVAREZ, L.; CHIAPPINIA, F.; BOURGUIGNON, N.; FRAHMD, I.; BERGOC, R.; PISAREVA, D. K.; RANDI, A. Alterations in c-Src/HER1 and estrogen receptor α signaling pathways in mammary gland and tumors of hexachlorobenzene-treated rats **Toxicology**, vol. 293 p. 68–77, 2012.
- PERSIDIS, A. Cancer multidrug resistance. **Nature Biotechnology**, vol. 17, 1999.
- PESSATTI, M.L.; RESGALLA, J. R. C.; REIS, F.R.W.; KUEHN, J.; SALOMÃO, L.C.; FONTANA, J.D. Variability of rates of filtration, respiration and assimilation and multixenobiotic mechanism resistance (MXR) of mussel *Perna perna* under lead influence. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 62 p. 651–656, 2002.
- PESTANA, C. R.; BORGES, K. B.; FONSECA, P.; OLIVEIRA, D. P. Risco ambiental da aplicação de éteres de difenilas polibromadas como retardantes de chama. **Revista Brasileira de Toxicologia**, vol. 21 n° 2 p. 41-48, 2008.
- PINON, A.; YOUNESS, L.; MICALLEF, L.; COOK-MOREAU, J.; LIAGREA, B.; DELAGEA, C.; DUVALB, R. E.; SIMON, A. A novel form of melanoma apoptosis resistance: Melanogenesis up-regulation in apoptotic B16-F0 cells delays ursolic acid-triggered cell death. **Experimental Cell Research**, vol. 317 p. 1669-1676, 2011.
- POLAND, A.; KNUTSON, J. C. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo -p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. **Pharmacology Toxicology**, vol. 22 p. 517-54, 1982.
- PONTILLO, C. A.; ROJAS, P.; CHIAPPINI, F.; SEQUEIRA, G.; COCCA, C.; CROCCID, M.; COLOMBO, L.; LANARI, C.; PISAREVA, C. K.; RANDIA, A. Action of hexachlorobenzene on tumor growth and metastasis in different experimental models. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 268 p. 331-342, 2013.
- QU, B.; YU, W.; HUANG, Y.; CAI, B.; DU, L. LIU, F. 6-OH-BDE-47 promotes human lung cancer cells epithelial mesenchymal transition via the AKT/Snail signal pathway. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, vol. 39 p. 271-279, 2015.
- RAY, S. S.; SWANSON, H. I. Alteration of keratinocyte differentiation and senescence by the tumor promoter dioxin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 192 p. 131–145, 2003.
- REPETTO, M.; **Toxicologia Fundamental**. Editora Diaz de Santos. 3ª Edição, p. 30-35, 1997.
- REPETTO, G.; PESO, A. D.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, vol. 3 p. 1125-1131, 2008.
- REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 14 p. 1603-1616, 2010.
- RIBEIRO-SANTOS, G.; PINHEIRO, F. A importância da Toxicologia sob a óptica do REACH. **Revista Intertox de Toxicologia**, Risco Ambiental e Sociedade, vol.1 n°1, 2008.
- ROSE, J. Q.; RAMSEY, J. C.; WENTZLER, T. H.; HUMMEL, R. A.; GEHRING, P. J. The fate of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin following single and repeated oral doses to the rat. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 36 p. 209-26, 1976.

- SAFE, S. Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. **Toxicology Letters**, vol. 120 p. 1-7, 2001.
- SAFE, S.; BIEGEL, L.; HARRIS, M.; NARASIRNHAN, T. R.; LUI H.; FERNANDEZ, P. Inhibition of estrogen- and growth factor-induced proliferation of human breast cancer cell lines by TCDD: characterization and mechanistic studies. **Chemosphere**, vol. 25 p. 83-86, 1992.
- SANDER, C. S.; HAMM, F.; ELSNER P.; THIELE J. J. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. **British Journal of Dermatology**, vol. 148 p.913-922, 2003.
- SCHRENK, D.; BAUS, P. R.; ERMEL, N.; KLEIN, C.; VORDESTEMANN, B. KAUFFMANN, H.; Up-regulation of transporters of the MRP family by drugs and toxins. **Toxicology Letters**, vol. 120 p. 51–57, 2001.
- SEER - Surveillance Epidemiology and End Results; **Cancer Statistics Factsheets: Melanoma of the Skin**. National Cancer Institute. Bethesda, MD, Disponível em: <<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>>, acesso em 12/2015, 2015.
- SEER - Surveillance Epidemiology and End Results. **Observed Incidence, SEER Delay Adjusted Incidence and US Death Rates melanoma of the Skin, White, by Sex**. Disponível em: <http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/results_merged/sect_16_melanoma_skin.pdf>, acesso em 02/2015, 2012.
- SHU, H.; PAUSTENBACH, D.; MURRAY, F. J.; MARPLE, L.; BRUNCK, B.; DEI ROSSI, D.; TEITELBAUM, P. Bioavailability of soil-bound TCDD: Oral bioavailability in the rat. **Fundamental and Applied Toxicology**, vol. 10 p. 648-654, 1988-a.
- SHU, H.; TEITELBAUM, P.; WEBB, A. S.; MARPLE, L.; BRUNCK, B.; DEI ROSSI D.;MURRAY, F. J.; PAUSTENBACH, D. Bioavailability of soil-bound TCDD: Dermal bioavailability in the rat. **Fundamental and Applied Toxicology**, vol. 10 p. 335-343, 1988-b.
- SILVA, M. P. N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, vol. 52 nº1 p. 59-77, 2006.
- SLEZAK, B. P.; HATCH, G. E.; DEVITO, M. J.; DILIBERTO, J.J.; SLADE, R.; CRISSMAN, K.; HASSOUN, E.; BIRBAUM, L. S. Oxidative Stress in Female B6C3F1 Mice following Acute and Subchronic Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). **Toxicological Sciences**, vol. 54 p. 390 –398, 2000.
- SOLAK, K. A.; WIJNOLTS, F. M. J.; PRALONG, F. P.; BLAAUBOER, B. J.; VAN DER BERG, M.; WESTERINK, R. H.; VAN DUURSEN, M. B. M. *in vitro* neuroendocrine effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the AHR-expressing hypothalamic rat GnV-3 cell line. **Toxicology**, vol. 133 p. 124-134, 2013.
- SOUZA, A. O.; PEREIRA, L. C.; OLIVEIRA, D. P.; DORTA, D. J. BDE-99 congener induces cell death by apoptosis of human hepatoblastoma cell line – HepG2. **Toxicology in vitro**, vol. 27 p. 580–587, 2013.
- SUL, D.; KIM, H.; CHO, E.; LEE, M.; KIM, H. S.; JUNG, W.; HWANG, K.; PARK, S. 2,3,7,8-TCDD neurotoxicity in neuroblastoma cells is caused by increased oxidative stress, intracellular calcium levels, and tau phosphorylation. **Toxicology**, vol. 255 p. 65–71, 2009.
- TAGLIAFERRI, S.; CAGLIERI, A.; GOLDONI, M.; PINELLI, S.; ALINOVI, R.; POLI, D.; PELLACANI, C.; GIORDANO, G.; MUTTI, A.; COSTA, L. G. Low concentrations of the brominated flame retardants BDE-47 and BDE-99 induce synergistic oxidative

- stress-mediated neurotoxicity in human neuroblastoma cells **Toxicology *in vitro***, vol. 24 p. 116–122, 2010.
- TENTORI L.; LACAL P. M.; GRAZIANI G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. **Trends in Pharmacological Sciences**, vol. 34 n° 12, 2013.
- UNEP - United Nations Environment Programme. **Guidelines on best available techniques and provisional guidance on best environmental practices**. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Introduction: Sections I-IV, Stockholm, 2008.
- USHER-SMITH, J. A.; EMERY, J.; KASSIANOS, A. P.; WALTER, F. M. Risk prediction models for melanoma: A systematic review. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, vol. 23 n°6, 2014.
- VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M.K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society Journal**, vol.54 p. 10–14. 2011.
- VILLANO, C. M.; MURPHY, K. A.; AKINTOBI, A.; WHITE, L. A. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in A2058 melanoma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 210 p. 212 – 224, 2006.
- WALSH, N.; KENNEDY, S.; LARKIN, A. M.; TRYFONOPOULOS, D.; EUSTACE, A. J.; MAHGOUB, T.; CONWAY, C.; OGLESBY, I.; COLLINS, D.; BALLOT, J.; OOI, W. S.; GULLO, G.; CLYNES, M.; CROWN, J.; O'DRISCOLL, L.; Membrane transport proteins in human melanoma: associations with tumour aggressiveness and metastasis. **British Journal of Cancer**, vol. 102 p. 1157-1162, 2010.
- WANG, X.; HAWKINS, B. T.; MILLER, D. S. Aryl hydrocarbon receptor-mediated up-regulation of ATP-driven xenobiotic efflux transporters at the blood-brain barrier **Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal**, vol. 25 p. 644–652, 2010.
- WHO - World Health Organization. **Dioxins and Their Effect on Human Health**. WHO, Fact sheet n° 225, Geneva, 2014.
- WILKES, G. M.; BARTON-BURKE, M. **2015 Oncology Nursing Drug Handbook**. 19^a edição p. 17-18; 131-134, 2015.
- WU, N.; SHERRMANN, T.; PAEPKE, O.; TICKNER, J.; HALE, R.; HARVEY, E.; GUARDIA, M.; MC CLEAN, M. D.; WEBSTER, T. F. Human Exposure to PBDEs: Associations of PBDE Body Burdens with Food Consumption and House Dust Concentrations. **Environmental Science & Technology**, vol. 41 n°5, 2007.
- WU, X.; BENNETT, D. H.; MORAN, R. H.; MORAN, R. E.; SJODIN, A.; JONES, R. S.; TANCREDI, D. J. ; TULVE, N. S.; CLIFTON, M. S.; COLÓN, M.; WEATHERS, W.; HERTZ-PICCIOTTO, I. Polybrominated diphenyl ether serum concentrations in a Californian population of children, their parents, and older adults: an exposure assessment study. **Environmental Health**, vol. 14 n° 23, 2015.
- XU, S.; WEERACHAYAPHORN, J.; CAI, S.; SOROKA, C. J.; BOYER, J. L. Aryl hydrocarbon receptor and NF-E2-related factor 2 are key regulators of human MRP4 expression. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, vol. 299 p. G126 –G135, 2010.
- YANG, F.; YU, Y.; LEI, Q.; ZENG, A.; LI, Y.; XIE, Y.; YE, T.; WEY, Y. Lobaplatin arrests cell cycle progression, induces apoptosis and impairs migration and invasion in B16-F10 melanoma cell line *in vitro*. **Biomedicine & Pharmacotherapy** vol. 69 p. 402–408, 2015.

- ZAHREDDINE, H.; BORDEN, K. L. B. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 4 article 28, 2013.
- ZHANG, C.; LIU, F.; LIU, X; CHEN, D. Protective effect of N-acetylcysteine against BDE-209-induced neurotoxicity in primary cultured neonatal rat hippocampal neurons *in vitro*. **International Journal Developmental Neuroscience**, vol. 28 p. 521–528, 2010.
- ZOLLNER, G.; FICKERT, P.; FUCHSBICHLER, A.; STUMPTNER, C.; DENK, H.; ZATLOUKAL, K.; TRAUNER, M. Multidrug resistance P-glycoproteins (MDR) and multidrug resistance-associated proteins (MRP) are not overexpressed in human hepatocellular carcinomas (HCC). **Journal of Hepatology**, vol. 34 p. 189, 2001.
- ZORNING, M.; HUEBER, A. O.; BAUM, W.; EVAN, G. Review - Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1551 p. F1-F37, 2001.