

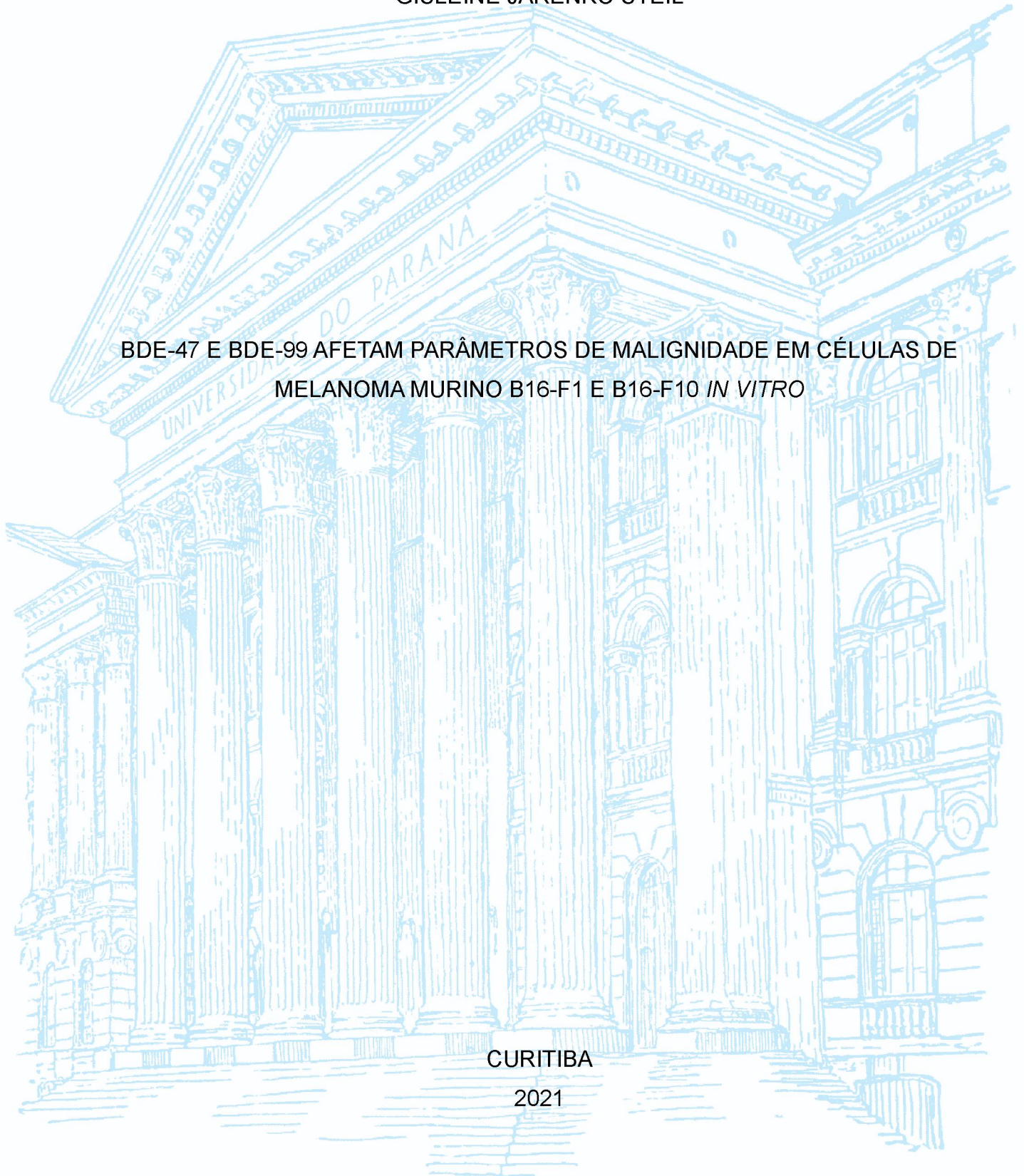
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GISLEINE JARENKO STEIL

BDE-47 E BDE-99 AFETAM PARÂMETROS DE MALIGNIDADE EM CÉLULAS DE
MELANOMA MURINO B16-F1 E B16-F10 *IN VITRO*

CURITIBA

2021



GISLEINE JARENKO STEIL

BDE-47 E BDE-99 AFETAM PARÂMETROS DE MALIGNIDADE EM CÉLULAS DE
MELANOMA MURINO B16-F1 E B16-F10 *IN VITRO*

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA

2021

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Steil, Gisleine Jarenko

BDE-47 e BDE-99 afetam parâmetros de malignidade em
células de melanoma murino B-16-F1 e B-16-F10 *in vitro* /

Gisleine Jarenko Steil. – Curitiba, 2021.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto.

1. Melanoma. 2. Expressão gênica. 3. Câncer. I. Filipak Neto,
Francisco, 1981-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular. III. Título.



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **GISLEINE JARENKO STEIL** intitulada: **BDE-47 E BDE-99 AFETAM PARÂMETROS DE MALIGNIDADE EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16-F1 E B16-F10 IN VITRO.**, sob orientação do Prof. Dr. FRANCISCO FILIPAK NETO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 26 de Fevereiro de 2021.

Assinatura Eletrônica
01/03/2021 11:03:06.0
FRANCISCO FILIPAK NETO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
24/03/2021 09:26:54.0
MARCEL IVAN RAMÍREZ ARAYA
Avaliador Interno (IOC - FIOCRUZ)

Assinatura Eletrônica
24/03/2021 10:54:49.0
KÁTIA SABRINA PALUDO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica
01/03/2021 10:43:13.0
DANIEL BUSSOLARO
Avaliador Externo (INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
01/03/2021 10:30:23.0
GISELI KLASSEN
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu orientador Francisco Filipak Neto que desempenhou de forma impecável esta função: agradeço as sugestões, correções, apontamentos e principalmente todo o apoio acadêmico e pessoal, fundamental para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Aos professores e colegas que tornaram este trabalho possível: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, Marco Antonio Ferreira Randi, João Luiz Aldinucci Buzzo, Jessica Zablocki da Luz, Micheli de Marchi, Aliciane de Almeida Roque, Benísio Ferreira da Silva Filho, Patrícia Manuitt Brito, obrigada pelas colaborações, aprendizado e companheirismo. Às principais instituições relacionadas ao presente trabalho: Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, local onde me formei como bacharela, licenciada, mestre e agora doutora. Agradecimento à CAPES: o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

Ao decorrer da minha trajetória acadêmica / científica, dentre aprendizados, estágios e iniciações científicas, também gostaria de agradecer às seguintes instituições: EMBRAPA Florestas, Jardim Botânico de Curitiba (e Prefeitura Municipal de Curitiba), Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Fundação Araucária e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À minha família e todos os amigos que apoiaram de todas formas por tantas vezes, que puderam entender e respeitar as ausências necessárias, que comemoram comigo todas as pequenas e grandes conquistas e contribuindo assim para eu me manter firme e constante. Agradeço também a todos que uma alguma forma contribuíram para a realização deste estudo (são muitos!) e eu gostaria de dividir um pedacinho dessa conquista com cada um de vocês.

Gostaria de aproveitar esta ocasião para agradecer à *healthtech* Hilab, pela oportunidade de atuar com Pesquisa e Desenvolvimento em Biologia Molecular, na área de Inovação. A formação em Biologia Celular e Molecular e toda experiência acadêmica conquistada até permite contribuir para inovar e aperfeiçoar exames e diagnósticos moleculares, além de representar uma grande conquista pessoal e profissional. Sendo assim, sinto-me honrada e com a sensação de que toda essa dedicação está trazendo resultados em prol da saúde humana. Obrigada a todos e todas!

“A ignorância é um vírus. Uma vez que começa a ser transmitida, só pode ser curado pela razão. Pelo bem da humanidade, nós devemos ser essa cura.”
(NEIL DEGRASSE TYSON)

RESUMO

Apesar dos tratamentos disponíveis, a taxa de mortalidade por diversos tipos de câncer continua elevada, devido principalmente ao desenvolvimento de resistência tumoral e capacidade de formação de metástases. As células tumorais apresentam características que as diferem de células normais. Particularmente, o acúmulo de mutações e alterações fenotípicas associadas à sobrevivência, efluxo de drogas, capacidade migratória e invasiva podem representar um obstáculo para o tratamento contra o câncer e contribuir para um pior prognóstico. Ainda, o efeito carcinogênico de muitos contaminantes é bem reconhecido e investigado. Contudo, mesmo os contaminantes ambientais não carcinogênicos podem alterar a expressão gênica e o metabolismo de células normais e neoplásicas. Nestes casos, uma questão que merece investigação é se a exposição de indivíduos com tumores já estabelecidos a contaminantes ambientais poderia levar a alterações no fenótipo das células tumorais e assim aumentar a agressividade/malignidade de tumores, piorando o prognóstico e aumentando a resistência a quimioterápicos. No presente estudo, investigamos os efeitos de dois compostos polibromados – conhecidos e utilizados pela indústria como retardantes de chama – que apresentam alta estabilidade no meio ambiente, distribuição global e capacidade de bioacumulação. Foi verificado o efeito da exposição em características fenotípicas de células de melanoma, utilizadas como modelo tumoral. Células de melanoma murino B16-F1 (menos metastática) e B16-F10 (mais metastática) foram expostas a 0,01-1,0 nM de BDE-47 (2,2',4,4'-Tetrabromodifenil éter) e BDE-99 (2,2',4,4',5-Pentabromodifenil éter) e à mistura de ambos na menor concentração (a 0,01 nM) por 24 h (exposição aguda) e 15 dias (exposição crônica). Os efeitos desses compostos foram avaliados através de parâmetros de viabilidade, efluxo de drogas, formação de colônias, migração, invasão e alterações na expressão de genes importantes no processo tumoral. Os BDEs 47 e 99 não afetaram a viabilidade das células expostas, mas levaram ao aumento da atividade dos transportadores de efluxo de drogas, migração celular e formação de colônias, bem como superexpressão dos genes ABCC2, MMP-9 e TP53 e regulação negativa do gene TIMP-3 em células B16-F10. Esses efeitos são relacionados ao aumento da resistência, agressividade e malignidade dos tumores causados devido à exposição aos retardantes de chama. Esses resultados levantam preocupação quanto aos efeitos que esses produtos químicos podem ter no tratamento contra o melanoma e no prognóstico do câncer, bem como preocupação acerca da produção, utilização, descarte e legislação envolvendo esses compostos.

Palavras-chave: Compostos bromados. Melanoma. Expressão gênica. Câncer. Malignidade.

ABSTRACT

Despite advances in available treatments, the mortality rate from several types of cancer remains high, mainly due to the development of tumor resistance and the ability to metastasize. Tumor cells have characteristics that differ from normal cells. Particularly, the accumulation of mutations and phenotypic changes associated with survival, drug efflux, migratory and invasive capacity may represent an obstacle to cancer treatment and contribute to a worse prognosis. Furthermore, the carcinogenic effect of many contaminants is well recognized and investigated. However, even non-carcinogenic environmental contaminants can alter gene expression and metabolism in normal and neoplastic cells. In these cases, an issue that deserves investigation is whether the exposure of individuals with established tumors to environmental contaminants could lead to changes in the phenotype of tumor cells and thus increase tumor aggressiveness/malignancy, worsening the prognosis and increasing resistance to chemotherapeutics. In the present study, we investigated the effects of two polybrominated compounds – known and used by the industry as flame retardants – which have high stability in the environment, global distribution and bioaccumulation capacity. The effect of exposure on phenotypic characteristics of melanoma cells, used as a tumor model, was verified. B16-F1 (less metastatic) and B16-F10 (more metastatic) murine melanoma cells were exposed to 0.01-1.0 nM of BDE-47 (2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether) and BDE-99 (2,2',4,4',5-Pentabromodiphenyl ether) and the mixture of both at the lowest concentration (at 0.01 nM) for 24 h (acute exposure) and 15 days (chronic exposure). The effects of these compounds were evaluated through parameters of viability, drug efflux, colony formation, migration, invasion and changes in the expression of genes important in the tumor process. BDEs 47 and 99 did not affect the viability of exposed cells, but led to increased activity of drug efflux transporters, cell migration and colony formation, as well as overexpression of ABCC2, MMP-9 and TP53 genes and downregulation of the TIMP-3 gene. in B16-F10 cells. These effects are related to increased resistance, aggressiveness and malignancy of tumors caused due to exposure to flame retardants. These results raise concerns about the effects that these chemicals may have on melanoma treatment and cancer prognosis, as well as concerns about the production, use, disposal and legislation involving these compounds.

Keywords: Brominated compounds. Melanoma. Gene expression. Cancer. Malignancy

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PROGRESSÃO TUMORAL.....	17
FIGURA 2 - CÉLULAS DE MELANOMA MURINO.....	23
FIGURA 3 - 2,2',4,4'-TETRABROMODIFENÍL ÉTER (BDE-47).....	27
FIGURA 4 - 2,2',4,4',5-PENTABROMODIFENÍL ÉTER (BDE-99).....	27
FIGURA 5 - ESQUEMA EXPOSIÇÃO CRÔNICA E VIABILIDADE CELULAR.....	32
FIGURA 6 - ESQUEMA ENSAIO DO RISCO (<i>scratch</i>).....	34
FIGURA 7 - ESQUEMA ENSAIO CLONOGÊNICO 2D.....	35
FIGURA 8 - ESQUEMA ENSAIO CLONOGÊNICO 3D.....	36
FIGURA 9 - ESQUEMA PLAQUEAMENTO ENSAIO DE INVASÃO TRANSWELL...	37
FIGURA 10 - ESQUEMA PROCESSAMENTO ENSAIO DE INVASÃO TRANSWELL	38
FIGURA 11 - CÉLULAS B16-F1 CONTROLE E EXPOSTAS AO BDE-47 SOB MICROSCÓPIO INVERTIDO.....	41
FIGURA 12 - CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-99 E MISTURA SOB MICROSCÓPIO INVERTIDO.....	42
FIGURA 13 - VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS.....	42
FIGURA 14 - VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS.....	43
FIGURA 15 - ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS EM CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-47.....	44
FIGURA 16 - ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS EM CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-99.....	45
FIGURA 17 - ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS EM CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS AO BDE-47.....	45
FIGURA 18 - ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS EM CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS AO BDE-99.....	46
FIGURA 19 - ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS EM CÉLULAS B16-F1 E F10 EXPOSTAS A MISTURA DOS CONTAMINANTES.....	46
FIGURA 20 - MIGRAÇÃO DE CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-47.....	47
FIGURA 21 - MIGRAÇÃO DE CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-99.....	47
FIGURA 22 - MIGRAÇÃO DE CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS AO BDE-47.....	48

FIGURA 23 - MIGRAÇÃO DE CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS AO BDE-99.....	49
FIGURA 24 - MIGRAÇÃO DE CÉLULAS B16-F1 E B16-F10 EXPOSTAS A MISTURA	49
FIGURA 25 - ENSAIO-TESTE DE INVASÃO CELULAR.....	50
FIGURA 26 - INVASÃO CELULAR DE CÉLULAS B16-F1.....	51
FIGURA 27 - INVASÃO CELULAR DE CÉLULAS B16-F10.....	51
FIGURA 28 - FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-47.....	52
FIGURA 29 - FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-99.....	53
FIGURA 30 - FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS AO BDE-47.....	53
FIGURA 31 - FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS AO BDE-99.....	54
FIGURA 32 - FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE CÉLULAS B16-F1 E B16-F10 EXPOSTAS A MISTURA DOS CONTAMINANTES.....	55
FIGURA 33 - FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM ÁGAR MOLE DE CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS DURANTE 15 DIAS AO BDE-47 E 99.....	55
FIGURA 34 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENES ABCC 1 POR RT-qPCR.....	56
FIGURA 35 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE ABCC2 POR RT-qPCR.....	57
FIGURA 36 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE CD44 POR RT-qPCR.....	58
FIGURA 37 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE MMP-2 POR RT-qPCR.....	58
FIGURA 38 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE MMP-9 POR RT-qPCR.....	59
FIGURA 39 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE MMP-14 POR RT-qPCR.....	59
FIGURA 40 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE RECK POR RT-qPCR.....	60
FIGURA 41 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE TIMP-1 POR RT-qPCR.....	61
FIGURA 42 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE TIMP-2 POR RT-qPCR.....	62
FIGURA 43 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE TIMP-3 POR RT-qPCR.....	62
FIGURA 44 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE PGK-1 POR RT-qPCR.....	63
FIGURA 45 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE PIK3CA POR RT-qPCR.....	63
FIGURA 46 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE TP53 POR RT-qPCR.....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - GENES E FUNÇÕES.....	22
TABELA 2 - SEQUÊNCIA DE PRIMERS DOS GENES ALVOS.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

B16-F1	- Linhagem de células de Melanoma murino (baixa malignidade);
B16-F10	- Linhagem de células de Melanoma murino (alta malignidade);
PBDE	- Éteres Difenílicos Polibromados
BDE-47	- 2,2',4,4'-Tetrabromodifenil éter;
BDE-99	- 2,2',4,4',5-Pentabromodifenil éter;
PCR	- PCR - reação em cadeia da polimerase;
qPCR	- PCR em tempo real;
RT-qPCR	- PCR em tempo real com etapa de transcriptase reversa (técnica para moléculas de fita única, como RNAs);
SFB	- Soro fetal bovino;
µL	- Microlitro (unidade de medida);
mL	- Mililitro (unidade de medida);
µm	- Micrometro (unidade de medida);
mM	- Milimolar (unidade de medida);
° C	- Grau Celsius;
h	- horas;
min	- minutos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 JUSTIFICATIVA.....	14
1.2 OBJETIVOS.....	14
1.2.1 Objetivo geral.....	14
1.2.2 Objetivos específicos.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 CÂNCER.....	16
2.1.1 Tratamento.....	17
2.1.2 O Câncer de pele.....	18
2.1.3 A relação dos quimioterápicos com a resistência tumoral.....	19
2.1.3 Expressão gênica de marcadores tumorais.....	21
2.2 MODELO EXPERIMENTAL.....	23
2.3 CONTAMINANTES AMBIENTAIS E CÂNCER.....	24
2.4 RETARDANTES DE CHAMA.....	25
2.4.1 O 2,2',4,4'-Tetrabromodifenil éter (BDE-47).....	26
2.4.2 O 2,2',4,4',5-Pentabromodifenil éter (BDE-99).....	27
2.4.3 Exposição aos BDEs e câncer.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 CULTURA CELULAR.....	30
3.2 EXPOSIÇÃO AOS XENOBIÓTICOS.....	30
3.3 DESENHO EXPERIMENTAL.....	31
3.4 VIABILIDADE CELULAR.....	32
3.5 ATIVIDADE DE TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS.....	33
3.6 MIGRAÇÃO (<i>SCRATCH</i>).....	33
3.7 ENSAIO CLONOGÊNICO 2D.....	34
3.8 ENSAIO CLONOGÊNICO 3D.....	35
3.9 ENSAIO DE INVASÃO TRANSWELL.....	36
3.10 EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR).....	38
3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	40
4 RESULTADOS.....	41

4.1 MORFOLOGIA E VIABILIDADE CELULAR.....	41
4.2 ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS.....	44
4.3 MIGRAÇÃO CELULAR.....	47
4.4 INVASÃO CELULAR.....	50
4.5 ENSAIO DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS (2D E 3D).....	52
4.6 EXPRESSÃO GÊNICA.....	56
5 DISCUSSÃO.....	66
6 CONCLUSÃO.....	76
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos esforços e avanços na medicina e na indústria farmacêutica nas últimas décadas, a incidência e a mortalidade por câncer aumentam a cada ano. Existem vários fatores extrínsecos e intrínsecos que podem estar relacionados com o surgimento e progressão desta doença, dentre eles, a influência de substâncias tóxicas. O potencial carcinogênico está bem documentado para muitos produtos químicos, mas pouco se sabe sobre os efeitos da exposição de poluentes no prognóstico de cânceres já estabelecidos e/ou nas alterações das células tumorais. Os chamados retardantes de chama são uma classe de compostos químicos utilizados pela indústria para tornar materiais mais resistentes ao fogo e altas temperaturas para reduzir acidentes e incêndios. Os Éteres Difenílicos Polibromados (PBDEs) são retardantes de chama que contêm bromo em sua composição e não possuem legislação específica para uso e descarte no Brasil. Esses compostos apresentam características lipofílicas que aumentam sua biodisponibilidade, bioacumulação nos tecidos adiposos de animais e biomagnificação ao longo da cadeia trófica. Atualmente existem alguns estudos acerca da preocupação com a exposição a estas substâncias no meio ambiente e para a saúde humana, porém, há poucos estudos sobre os possíveis efeitos na malignidade e resistência tumoral decorrentes da exposição dos BDEs em células tumorais. No presente estudo, investigamos se a exposição aguda (24 h) e crônica (15 dias) ao 2,2',4,4'-Tetrabromodifenil éter (BDE-47) e ao 2,2',4,4',5-Pentabromodifenil éter (BDE-99) e uma mistura é capaz de alterar características importantes na progressão e formação de metástases em células tumorais. Como modelo experimental, foram utilizadas duas linhagens de melanoma murino (B16-F1 – que apresenta baixa capacidade metastática – e B16-F10 altamente metastática), e os efeitos da exposição foram avaliados por parâmetros de viabilidade, atividade dos transportadores de efluxo de drogas, migração celular, clonogenicidade, invasão e expressão de genes relacionados (ABCC1, ABCC2, CD44, PGK, PIK3CA, TP53, MMP-2, MMP-9, MMP-14, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e RECK), a fim de compreender os efeitos dos compostos polibromados no aumento da malignidade e resistência em células tumorais.

1.1 JUSTIFICATIVA

Estimativas de novos casos de cânceres e mortalidade causada por estas doenças avançam a cada ano (IARC¹, 2020). Além disso, mesmo com novas drogas empregadas para o tratamento, a aquisição de resistência à quimioterapia continua a ser um grande problema.

Vários estudos com substâncias tóxicas demonstram preocupação principalmente em relação aos níveis de exposição humana, contaminação ambiental, citotoxicidade e indução de tumor de PBDEs (MAZDAI *et al.*, 2003; FREDERIKSEN *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2018). No entanto, existem poucos estudos sobre a capacidade dos PBDEs de alterar os parâmetros celulares, tornando os tumores mais resistentes à quimioterapia ou mais agressivos (SALGADO *et al.*, 2018; BRITO *et al.*, 2020).

Em função das características das moléculas utilizadas, nossa hipótese considera que os retardantes de chamas BDE-47 e BDE-99 são capazes de alterar características celulares importantes para a malignidade das linhagens celulares B16-F1 e B16-F10 durante exposições agudas (24 h) e crônicas (15 dias), sendo promotoras de tumor. Portanto, efeitos em parâmetros como viabilidade, resistência, formação de colônias, migração, invasão e modulação da expressão gênica de moléculas relacionadas foram investigados em células expostas foram investigadas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Investigar se a exposição aos retardantes de chama BDE-47 e BDE-99 durante 24 h e 15 dias afeta parâmetros celulares associados à malignidade e resistência a quimioterápicos de células tumorais das linhagens B16-F1 e B16-F10.

1.2.2 Objetivos específicos

- Verificar o efeito do BDE-47 e 99 na morfologia e viabilidade celular em células B16-F1 e B16-F10 expostas de forma aguda (24 h) e crônica (15 dias);
- Verificar o efeito do BDE-47 e 99 sobre parâmetros importantes relacionados à formação de metástases *in vitro*, utilizando as linhagens B16-F1 e B16-10 e avaliando a capacidade de formação de colônias, migração e invasão das células;
- Verificar se os contaminantes BDE-47 e 99 são capazes de alterar parâmetros relacionados com a resistência tumoral, avaliando a atividade de transportadores de efluxo de drogas do sistema MDR em células B16-F1 e B16-F10;
- Verificar se há alteração na expressão de genes relacionados à resistência tumoral, proliferação, migração, invasão e efluxo de drogas em células B16-F1 e B16-F10 quando expostas de forma crônica (15 dias) ao BDE-47 e BDE-99.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER

“Câncer” é o termo utilizado para o conjunto de mais de 200 tipos de doenças caracterizadas por uma proliferação descontrolada de células com acúmulo de mutações, alterações na regulação do ciclo e/ou morte celular e que causam distúrbios para o funcionamento do organismo.

O câncer é a segunda maior causa de morbidade e mortalidade do mundo, com estimativa de 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes em 2020 (IARC1, 2020). Os tipos de câncer com maior incidência são, por ordem decrescente: pulmão, mama, colorretal, próstata, câncer de pele não-melanoma e estômago e os que causam maior mortalidade no mundo, em ordem decrescente são o câncer de pulmão, colorretal, estômago, fígado e mama (OPAS, 2020).

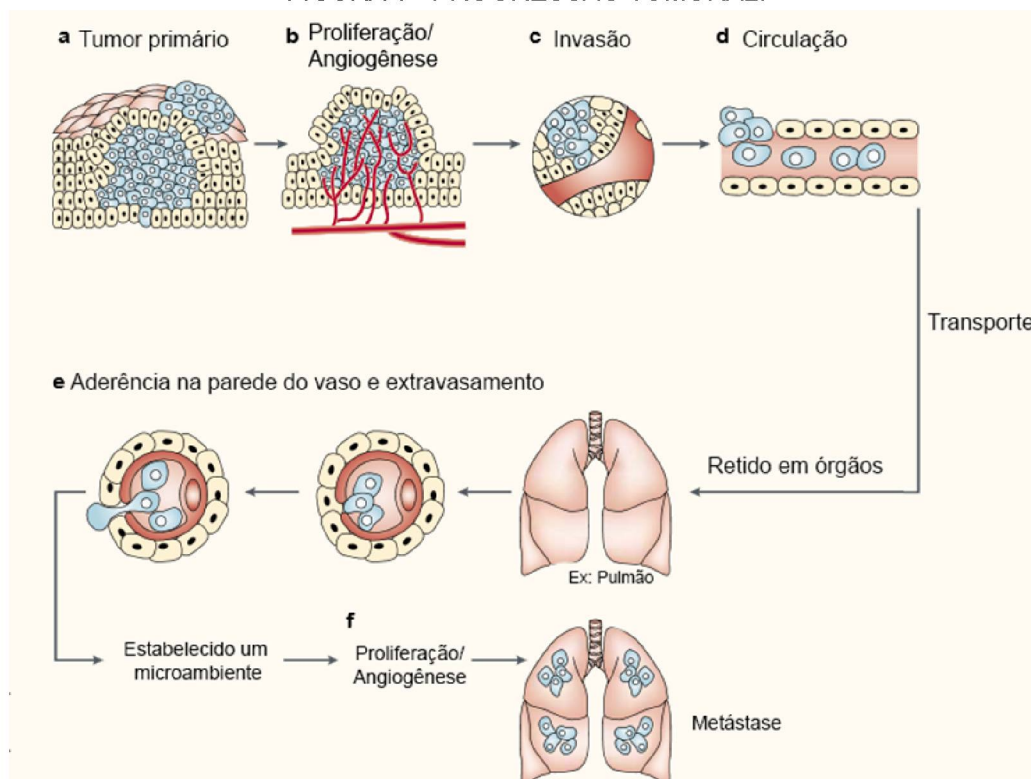
Vários fatores extrínsecos, como hábitos alimentares, sedentarismo, tabagismo e ingestão de álcool, exposição à luz solar e outras formas de radiação, exposição a produtos químicos, como pesticidas e outros poluentes, podem contribuir com 70-90% no desenvolvimento de tipos de câncer comuns (WU *et al.*, 2016).

As células tumorais apresentam características diferentes de células normais e isso também determina a complexidade e diversidade dos tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A característica mais fundamental do câncer envolve a capacidade aumentada de proliferação celular, ao contrário dos tecidos normais que apresentam um controle eficiente sobre o crescimento e divisão celulares (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Outras características importantes das células tumorais são o desenvolvimento de diferentes mecanismos para contornar ou limitar a morte celular por apoptose, como a expressão de genes anti-apoptóticos ou de sinais de sobrevivência; a indução da angiogênese, para o fornecimento de nutrientes e oxigênio e para excreção de resíduos metabólicos das células tumorais; além da capacidade de invasão e metástase (FIGURA 1), que está associada com a perda da adesão célula-célula e célula-matriz extracelular no caso de tumores sólidos

(HANAHA; WEINBERG, 2011). Assim, a patogenicidade do câncer está relacionada com esses processos (HANAHA; WEINBERG, 2011).

FIGURA 1 - PROGRESSÃO TUMORAL.



Processo de progressão tumoral: a) transformação celular e crescimento do tumor primário; b) aumento da vascularização (angiogênese) e aumento da massa tumoral (proliferação celular); c) migração e invasão dependentes de alterações na adesão celular e degradação de moléculas da matriz extracelular; d) destacamento e acesso aos vasos sanguíneos – assim a célula tumoral é capaz de atingir outros órgãos e tecidos; e) saída da célula tumoral do vaso sanguíneo; f) proliferação no órgão/tecido invadido: processo metastático. Essas células podem novamente invadir outros órgãos e tecidos, gerando metástases adicionais. Fonte: FIDLER (2003), com adaptações feitas pela autora.

2.1.1 Tratamento

O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia. Podem ser utilizados de forma isolada ou combinada, dependendo da origem celular e do grau de malignidade das células tumorais (VANNEMAN & DRANOFF, 2012; DRAKE; LIPSON; BRAHMER, 2014; NIJENHUIS *et al.*, 2014).

Em tratamentos quimioterápicos 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 (INCA3, 2020). O tratamento para o câncer de pele do tipo não-melanoma depende de fatores como localização, grau, margem e dimensões, sendo o tratamento principalmente utilizado a biópsia excisional (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015).

Porém, ao progredir para o estado metastático o sucesso do tratamento diminui (GRAYSHOPFER *et al.*, 2007). Para o câncer do tipo melanoma, são opções de tratamento o uso de imunoterapia, quimioterapia, radioterapia e combinações de técnicas (SIMÕES; SOUSA; PAIS, 2015). Na quimioterapia, são utilizados medicamentos citotóxicos para células tumorais, sendo que a maioria dessas drogas atua induzindo morte celular por apoptose (GRAY-SHOPFER *et al.*, 2007).

2.1.2 O Câncer de pele

A origem deste tipo de câncer é multifatorial, sendo a exposição frequente e prolongada à radiação ultravioleta (UV), proveniente do Sol, o principal agente etiológico (GORDON, 2013). Alguns fatores de risco incluem a cor da pele, olhos e cabelos claros e manchas (CHIN *et al.*, 2006).

É o tipo de câncer mais frequente no mundo e representa cerca de 30% de todos os casos de câncer registrados no Brasil (INCA, 2021¹).

Existem dois tipos de câncer de pele: o tipo não-melanoma que é mais frequente, porém menos letal; e o tipo melanoma (GRAYSHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). A cada ano no Brasil, são estimados cerca de 177 mil novos casos de câncer do tipo não-melanoma e mais de 2.000 mortes (INCA, 2021¹). Já para o tipo melanoma, são 8.450 novos casos e 1.791 mortes/ano (INCA, 2021²).

Outras causas para a formação do câncer de pele do tipo melanoma podem ser atribuídas aos hábitos de vida do indivíduo, ao meio ambiente e à genética (GORDON, 2013).

O surgimento do melanoma ocorre a partir dos melanócitos epidérmicos e pode ocorrer em qualquer tecido que contenha essas células pigmentares, que estão localizadas principalmente na pele (GRAY-SHOPFER *et al.*, 2007; GORDON,

2013). 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).

Definir o “estágio” de um câncer ajuda a determinar sua gravidade e melhor tratamento: inicialmente o melanoma em estágio inicial é descrito como estágio 0 (melanoma in situ) e, com o aumento da progressão da doença, é dividido em estágios de I (1) a IV (4). Esses estágios são definidos através de exames físicos, biópsias e exames de imagem e quanto maior o grau, pior o prognóstico (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

O tratamento mais comumente utilizado para o câncer do tipo não melanoma é cirurgia para a remoção do tumor, assim como nos estágios iniciais do câncer tipo melanoma. Porém, ao progredir para o estado metastático (estágio IV) o sucesso do tratamento diminui profundamente (GRAYSHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019) e essa é uma das causas da alta mortalidade deste tipo de câncer: apesar de o tipo melanoma representar aproximadamente apenas 3% dos cânceres de pele no Brasil, apresenta também a maior taxa de letalidade (INCA, 2021²; GORDON, 2013).

2.1.3 A relação dos quimioterápicos com a 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 do câncer é, em alguns casos, a elevada resistência das células tumorais aos agentes quimioterápicos (GRAY-SHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). Muitos agentes antineoplásicos interferem no ciclo celular, resultando em morte celular. Porém quando células malignas sofrem mutação e ativam mecanismos para escapar da morte celular programada, elas podem deixar de ser sensíveis à(s) droga(s), e a resistência surge (WILKES; BARTON-BURKE, 2015). Alguns mecanismos de malignidade tumoral também podem envolver o aumento da expressão de protooncogenes, permitindo que as células tumorais resistam e sobrevivam a diferentes tratamentos em diversos tipos de câncer (INDRAN *et al.*, 2011).

Muitas células de cânceres agressivos podem apresentar, como mecanismo de resistência a quimioterápicos, o aumento da expressão e da atividade de transportadores de efluxo de drogas pertencentes à superfamília ABC, o que caracteriza o fenótipo chamado MDR - multidrug resistance, trata-se do aumento do transporte de substâncias para fora da célula (LEVINE *et al.*, 1993).

As funções celulares dos transportadores ABC envolvem controlar as concentrações intracelulares de compostos tóxicos, drogas e componentes alimentares, com o objetivo de proteger as células; esses transportadores facilitam o efluxo de moléculas polares do interior das células (HOFFMANN; KROEMER, 2004).

Esse fenótipo MDR ocorre intrinsecamente ou pode ser adquirido pela exposição a drogas antitumorais durante a quimioterapia, já que os tumores malignos apresentam populações de células heterogêneas e a quimioterapia induz apoptose primeiramente em células tumorais mais sensíveis (PERSIDIS, 1999; HOUSMAN, *et al.*, 2014). Portanto, a ação de drogas ou substâncias químicas podem fazer essa característica se sobressair frente a uma exposição.

O surgimento do fenótipo MDR 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, visto que as células aumentam a capacidade de efluxo de diferentes xenobióticos do seu interior (PERSIDIS, 1999; HOUSMAN, *et al.*, 2014).

Outras formas de resistência tumoral ocorrem através da supressão de proteínas pró-apoptóticas (proteínas que promovem apoptose), como a Bax (YIP; REED, 2008; INDRAN *et al.*, 2011). A Bax é frequentemente suprimida ou mutada em cânceres, sendo que a mutação leva à perda de função, resultando na inibição da via intrínseca da apoptose mediada pela mitocôndria, promovendo resistência à morte celular (INDRAN *et al.*, 2011).

Ainda, a superexpressão de proteínas antiapoptóticas como a Bcl-2 é capaz de inibir a apoptose das células tumorais desencadeada por diferentes estímulos, como a privação de fatores de crescimento, hipóxia e estresse oxidativo (YIP; REED, 2008).

No caso do melanoma, a expressão de proteínas pró-apoptóticas como Bax e antiapoptóticas como a Bcl-2 é normalmente alterada quando comparada com células normais (TANG *et al.*, 1998). Sendo assim, tanto o silenciamento de genes que codificam para proteínas relacionadas com morte celular, bem como a regulação negativa causada por mutações desses genes pode proteger células tumorais da morte celular (INDRAN *et al.*, 2011).

Outro gene de interesse para estudos de tumores é o p53. Trata-se de um gene que é ativado em situação de estresse celular e também pode agir como supressor de tumor (ou chamados como proto oncogenes). Esse gene está mutado em vários tipos de cânceres, como consequência desta mutação, ocorrem defeitos na proteína ou vias relacionadas a este gene, ocasionando perda de função e consequentemente alterações em fatores relacionados com a progressão tumoral, como em mecanismos de resistência e a promoção de metástases, invasão, migração e proliferação das células tumorais (MULLER; VOUSDEN, 2013).

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 célula tumoral (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 (GRAYSHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). Por essa razão, células de melanoma devem ter maior vantagem para escapar de mecanismos apoptóticos, resultando em uma maior sobrevivência e persistência destas células no organismo.

2.1.3 Expressão gênica de marcadores tumorais

A modulação de genes em células tumorais é o que determina a heterogeneidade dos tumores (ZHANG *et al.*, 1997), portanto, a investigação de alterações na expressão gênica pela ferramenta de RT-qPCR é possível verificar

como essas alterações contribuem com o pior prognóstico e malignidade de células tumorais expostas aos contaminantes BDE-47 e BDE-99 (VAN'T VEER *et al.*, 2002).

Na Tabela 1 estão apresentados os nomes e breve função relacionada aos genes quais a possível alteração da expressão gênica foi investigada no presente trabalho. Os genes foram escolhidos por apresentarem papéis em diferentes mecanismos relacionados ao processo tumoral. A nomenclatura dos genes e breve descrição está de acordo com o NCBI (2021).

TABELA 1 – GENES E FUNÇÕES.

<i>Genes (sigla e nome)</i>	<i>Principal função relacionada</i>
ABCC1 – ATP binding cassette subfamily C member 1	A proteína codificada por esses genes são da família de transportadores ABC (ATP-binding cassette). As proteínas ABC transportam moléculas através das membranas celulares e estão envolvidas na resistência à múltiplas drogas (sistema MDR).
ABCC2 - ATP binding cassette subfamily C member 2	
CD44 - CD44 molecule	Codifica para uma glicoproteína de superfície celular, envolvida em interações célula-célula, adesão e migração celular. Pode interagir com MMPs. Também pode estar relacionada à metástase tumoral.
MMP2 - matrix metalloproteinase 2	Genes da família de metaloproteinases de matriz, são enzimas (peptidases) capazes de clivar e degradar componentes da matriz extracelular. Estão envolvidas com muitas vias, incluindo regulação da vascularização e metástase.
MMP9 - matrix metalloproteinase 9	
MMP 14 - matrix metalloproteinase 14	
RECK - reversion inducing cysteine rich protein with kazal motifs	Codifica uma proteína extracelular cuja expressão é muito suprimida em caso de muitos tumores. Em células normais, é um regulador negativo de MMPs.
TIMP1 - metalloproteinase inhibitor 1	A família de genes TIMP codifica proteínas inibidoras de MMPs. Podem também apresentar funções antiapoptóticas, sendo capazes de promover proliferação celular.
TIMP2 - metalloproteinase inhibitor 2	
TIMP3 - metalloproteinase inhibitor 3	
PGK1 - phosphoglycerate kinase 1	Codifica uma enzima glicolítica que é secretada por células tumorais, tendo um papel na angiogênese do tumor.

PIK3CA - phosphatidylinositol-4,5-A proteína codificada por este gene representa uma bisphosphate 3-kinase catalytic subunitsubunidade catalítica. É um gene considerado oncogênico. alpha

TP53 - tumor protein p53

Codifica para uma proteína supressora de tumor, atua induzindo a parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo do DNA ou alterações no metabolismo. Mutações neste gene estão associadas a diversos cânceres humanos.

B2M – beta-2-microglobulin*

Codifica para uma proteína sérica relacionada ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC), presente na superfície de quase todas as células nucleadas. Por isso, é utilizada como gene endógeno (controle), já que seus níveis de expressão ocorrem de maneira imparcial.

*gene endógeno (controle)

2.2 MODELO EXPERIMENTAL

As linhagens de melanoma murino B16-F0, B16-F1 e B16-F10 são originárias dos melanócitos transformados da pele de camundongo *Mus musculus*; ambas são compostas de células aderentes capazes de produzir melanina in vitro e podem ser empregadas para experimentos in vivo. Essas células foram selecionadas de acordo com sua capacidade de formar nódulos tumorais pulmonares como resultado da injeção de células tumorais B16 em camundongos geneticamente idênticos por repetidas vezes (FIDLER, 1975). Após as repetidas injeções, foram estabelecidas 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 tem potencial metastático menor e a B16-F10 (FIGURA 2) apresenta alto potencial metastático e maior taxa de proliferação (DANCIU *et al.*, 2013).

FIGURA 2 - CÉLULAS DE MELANOMA MURINO

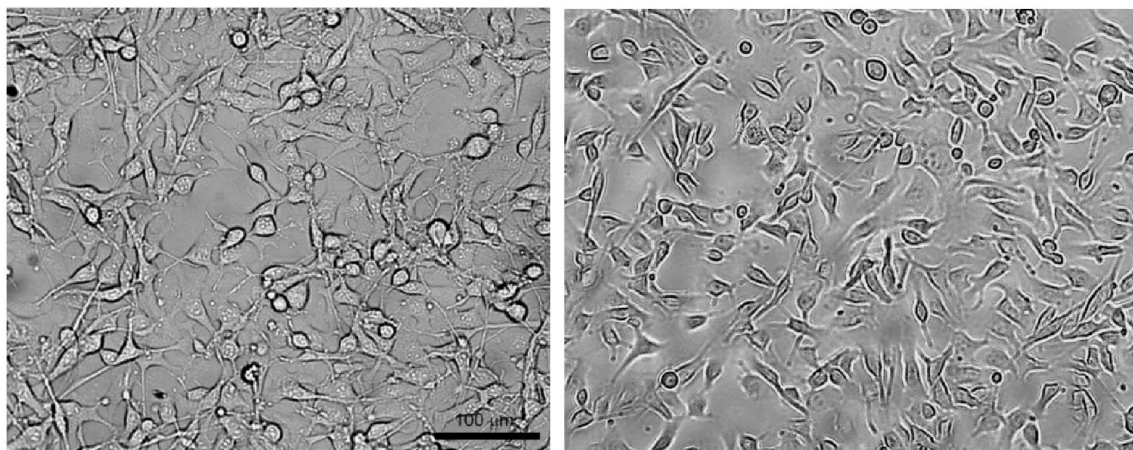


Imagem em microscópio invertido à esquerda: células de melanoma murino B16-F1 e direita: B16-F10 em cultivo celular em alta densidade. Fonte: A autora (2018).

Como o câncer de pele do tipo melanoma apresenta alta capacidade de invasão e formação de metástases, ao atingirem órgãos e tecidos, estas células também estariam sujeitas aos compostos presentes nestes locais. Portanto, é concebível a proposta de um modelo tumoral exposto a substâncias tóxicas que alcançam e bioacumulam nos tecidos.

2.3 CONTAMINANTES AMBIENTAIS E CÂNCER

Substâncias químicas podem ser de origem natural no próprio meio ambiente, ou adentrar os ambientes a partir de alimentos, atividade industrial, agrícola ou urbana (OMS, 2000). Programas como o Programa Internacional sobre Segurança Química (IPCS) determinam que avaliações como obtenção de níveis toleráveis de exposição, ingestão diária tolerável e avaliações de segurança em alimentos devem ser realizados para avaliar os riscos à saúde humana de substâncias potencialmente tóxicas (OMS, 2000). Entretanto, preocupações acerca de substâncias que podem afetar cânceres já estabelecidos não entram na pauta de agências reguladoras e legislação.

Como citado anteriormente, vários são os fatores extrínsecos e intrínsecos para o surgimento e progressão de tumores. Quando a exposição a substâncias potencialmente carcinogênicas ocorre especificamente via ar, água, solo e alimentos, estes fatores podem ser considerados fatores ambientais (BOFFETTA,

2006). Vale salientar que poluentes ambientais podem ser apresentados nos estados líquido, sólido, gasoso ou em suspensão (BAUDOUIN *et al.*, 2002).

Nos processos celulares de metabolismo/biotransformação, ativação ou acumulação, os poluentes podem se tornar ainda mais tóxicos para organismos. A mistura de poluentes ainda pode ativar ou potencializar o efeito de substâncias tóxicas (BAUDOUIN *et al.*, 2002). Vários estudos demonstram evidências epidemiológicas relacionando a exposição a substâncias tóxicas e risco relativo (RR) do surgimento de cânceres, como exposição doméstica ao amianto (RR = 3,5), poluição do ar e câncer de pulmão (RR = 1,3-1,5), tabaco e câncer de pulmão (RR = 1,22), pesticidas e dioxinas (BOFFETTA, 2006).

A pele é uma das barreiras físicas que delimitam o que é o meio interno do organismo e o que está no seu exterior, sendo, portanto, um dos principais órgãos exposto a poluição ambiental. Essa exposição pode trazer consequências desde alergias, inflamações e até cânceres. Os contaminantes ambientais também podem ser genotóxicos, provocando mutações e efeitos deletérios no tecido epitelial humano (BAUDOUIN *et al.*, 2002).

2.4 RETARDANTES DE CHAMA

Os retardantes de chama são utilizados pela indústria para tornar materiais mais resistentes ao fogo e altas temperaturas, diminuindo assim os riscos de acidentes com fogo (PESTANA *et al.*, 2008). São substâncias adicionadas após a manufatura e não incorporadas quimicamente aos produtos (IARC², 2013).

Os Éteres difenílicos polibromados (PBDEs) são retardantes de chama que contêm bromo na sua composição. Sua fórmula química envolve dez átomos de hidrogênio e pode conter de um a dez átomos de bromo em diversas posições. Isso permite que existam 209 congêneres de BDEs, sendo a nomenclatura de cada um baseada na posição dos bromos nas moléculas. Os BDEs apresentam conformação molecular similar aos Bifenilpoliclorados (PCBs - classe de compostos organoclorados), portanto, podem agir de forma parecida no meio ambiente, já que também são moléculas persistentes, altamente lipofílicas, apresentam capacidade de bioacumulação principalmente em tecido adiposo e biomagnificação ao longo da

cadeia trófica, além de serem contaminantes ambientais presentes no mundo todo (MCDONALD, 2002; IARC², 2013).

Estudos sobre a exposição aos BDEs indicam que eles são absorvidos principalmente por via oral, mas também pode ocorrer a exposição através da inalação e contato dérmico (SJODIN; PATTERSON; BERGMAN, 2003; LAW, 2014). A presença de BDEs no ambiente pode ocorrer através do lançamento pelas indústrias durante sua manufatura, pela produção e descarte incorreto de materiais que contenham esses compostos (PESTANA *et al.*, 2008), bem como através do processo de lixiviação (JIANG *et al.* 2014).

Em ambientes internos, os BDEs estão presentes normalmente na forma de pó, ocorrendo assim, exposição através da inalação da poeira doméstica (DE WIT, 2002; WU *et al.*, 2007; LAW *et al.*, 2014). Sendo assim, a ingestão de diversos alimentos e a inalação de poeira em ambientes fechados contendo BDEs são as principais fontes de exposição humana (DE WIT, 2002, SJODIN; PATTERSON; BERGMAN, 2003; WU *et al.*, 2007).

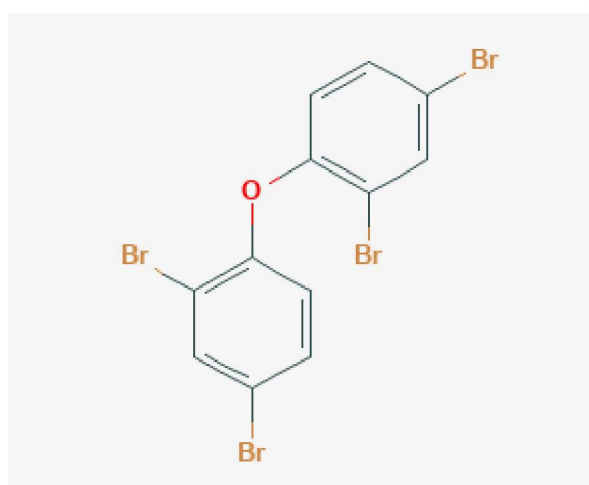
Por ser uma molécula altamente lipofílica e com capacidade de bioacumulação, diferentes congêneres e concentrações de BDEs podem ser encontrados no sangue, soro, leite materno, sêmen, placenta e cordão umbilical, e tecido adiposo humano. Em função dessas características, os BDEs também encontrados em alimentos, principalmente os de origem animal, inclusive, há estudos demonstrando a correlação entre o consumo de carnes e produtos lácteos e BDEs presentes na poeira doméstica com maiores concentrações no leite materno (SJODIN; PATTERSON; BERGMAN, 2003; FREDERIKSEN *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2012).

Portanto, a postulação que apoia a hipótese e objetivos do presente trabalho, é o fato de que é provável que poluentes hidrofóbicos que possam ser armazenados no tecido adiposo e sejam mobilizados para a corrente sanguínea em função de alterações como doenças, por exemplo, durante o processo de emagrecimento associado a alguns casos de cânceres.

2.4.1 O 2,2',4,4'-Tetrabromodifenil éter (BDE-47)

O BDE-47 possui massa molecular de 485.795 g/mol e fórmula molecular $C_{12}H_6Br_4O$ (FIGURA 3). Este é o principal congênere de BDEs encontrado em humanos expostos de forma não ocupacional (SJODIN *et al.* 2003; WU *et al.*, 2007), também o presente em maior quantidade no leite materno de acordo com WU *et al.*, 2007 e também o presente em maior quantidade no tecido adiposo de mulheres na Espanha (24% entre todos os BDEs encontrados) (FERNANDEZ *et al.*, 2007).

FIGURA 3 - 2,2',4,4'-TETRABROMODIFENÍL ÉTER (BDE-47).

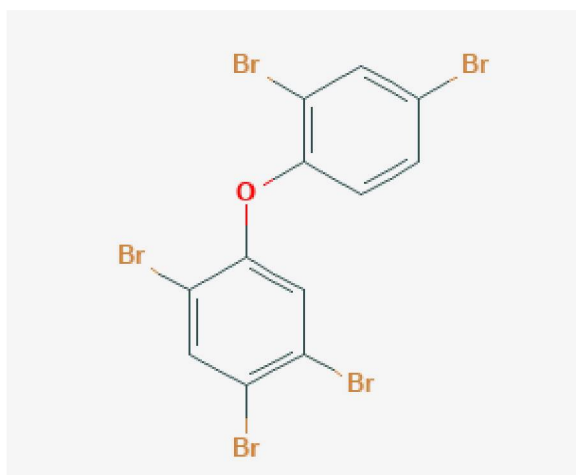


Fonte: PubChem (2021).

2.4.2 O 2,2',4,4',5-Pentabromodifeníl éter (BDE-99)

O BDE-99 possui massa molecular de 564.691 g/mol e fórmula molecular $C_{12}H_5Br_5O$ (FIGURA 4) e é encontrado, principalmente, em materiais como espumas de poliuretano e estofados (SJODIN *et al.*, 2003). Pode ser detectado na poeira doméstica em concentrações de 1 $\mu\text{g/g}$ e, assim como o BDE-47, também é encontrado no leite materno (13% entre todos os BDEs encontrados, referente a 2,4 ng/g lipídico) (WU *et al.*, 2007) e está presente também no tecido adiposo de mulheres na Espanha, sendo responsável por 10% de todos os BDEs presentes nas amostras (FERNANDEZ *et al.*, 2007).

FIGURA 4 – 2,2',4,4',5-PENTABROMODIFENÍL ÉTER (BDE-99).



Fonte: PubChem (2021).

Estudos indicam que há uma correlação significativa entre o BDE-47 e o BDE-99 em diferentes amostras, demonstrando que eles podem coexistir em mesmas fontes de exposição (CHEUNG *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2013). Por exemplo, no estudo envolvendo três faixas etárias distintas da população da Califórnia (Estados Unidos), o BDE-47 foi detectado em 100% das amostras, seguido do BDE-153 e BDE-99 (100% e 99% das amostras, respectivamente) (WU *et al.*, 2016). Também foram encontrados os congêneres BDE-47 e BDE-99 em 100% das amostras em poeira de casas e escritórios na China (WANG *et al.*, 2018). Respalhando, assim, futuros estudos considerando os efeitos da mistura dessas substâncias.

Atualmente não existem restrições legais para o uso de PBDEs no Brasil bem como não há regulamentação para o uso e descarte (ALAE *et al.*, 2003; PESTANA *et al.*, 2008). O Projeto de Lei do Senado nº 173, de 2009 visava estabelecer limite máximo de 0,1% de concentração de BDEs em equipamentos de informática em geral no Brasil, único voltado para esta questão, foi proposto em 2009 e arquivado em 2011. Há apenas a instrução normativa Nº 01, de 19 de Janeiro de 2010 que exige que para aquisição de bens, um dos critérios de sustentabilidade ambiental, no Capítulo III, Artigo 5º: “IV – que os bens não contenham substâncias perigosas em concentração acima da recomendada na diretiva RoHS (Restriction of Certain Hazardous Substances), tais como mercúrio (Hg), chumbo (Pb), cromo hexavalente (Cr(VI)), cádmio (Cd), bifenilas-polibromadas (PBBs), Éteres Difenílicos Polibromados (PBDEs)”. A ausência de controles e

legislação para essas substâncias demonstra como esse tema ainda não é considerado de acordo com a importância que deveria. Portanto, pesquisas para avaliar os efeitos tóxicos dos BDEs em diferentes modelos são necessárias e importantes para que os resultados possam impactar no estabelecimento de novas legislações ambientais. Como existem diferentes nomenclaturas para o BDE-47 e BDE-99, no presente trabalho será utilizada a nomenclatura definida pelo PubChem (disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.4.3 Exposição aos BDEs e câncer

Diferentes estudos de efeitos, toxicidade e carcinogenicidade apontam para diversos efeitos da exposição aos retardantes de chama: supressão do sistema imunológico, alterações hormonais, indução, mas não promoção de hepatocarcinoma em estudos com animais (ratos, camundongos e hamsters) (IARC2, 2013). Em longas exposições, os BDEs ainda produzem tumores no fígado e em uma variedade de outros tecidos e órgãos. Em alguns estudos, há evidências de promoção de tumor com aumento de nódulos no fígado e rim e também em câncer de pele. Contudo, diferentes congêneres de BDEs podem apresentar diferentes níveis de toxicidade e tipos de tumores (IARC2, 2013). Para a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC², 2013), existem, portanto, evidências para que os BDEs sejam considerados agentes carcinogênicos. Apesar de não haver estudos suficientes em relação à indução e promoção de tumores em humanos, os BDEs são classificados no Grupo 2 como provavelmente carcinogênicos para humanos com base em semelhanças estruturais aos Bifenilpoliclorado (PCBs - classe de compostos organoclorados) (IARC², 2013). De acordo com o tempo de exposição a substâncias tóxicas, os efeitos podem ser considerados agudos ou crônicos (BAUDOUIN *et al.*, 2002). Considerando esses dados, no presente estudo, investigamos como a exposição a estes contaminantes ambientais de forma aguda e crônica pode ser capaz de alterar as características fenotípicas de células tumorais que são importantes para a progressão do câncer.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTURA CELULAR

Células de melanoma murino B16-F1 e B16-F10 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), cultivadas e semeadas em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 2 mM de GlutaMAX™, 4,5 g L⁻¹ de glicose, 1,5 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio, 5 mM de HEPES (2- [4- (2-hidroxietil) piperazin-1-il] ácido etanossulfônico) e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 40 µg mL⁻¹ de gentamicina e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂. Para o subcultivo, as células foram desaderidas quando em confluência 80~90% com solução contendo tripsina a 0,25% e EDTA a 0,02% em PBS (Tampão fosfato-salino), pH 7,2, por 5 min a 37 °C.

3.2 EXPOSIÇÃO AOS XENOBIÓTICOS

Para basear a determinação das concentrações a serem utilizadas, foram utilizados os dados disponíveis sobre quantidades presentes em amostras humanas obtidas no trabalho de Mazdai *et al.*, 2003, que encontraram 580 ng/g de ΣPBDEs em lipídios no soro de sangue materno.

Considerando uma quantidade de lipídios presente no sangue humano de 200 ng/g, a concentração final de PBDEs equivaleria a 1,209 nM. Assim, as concentrações de exposição selecionadas para o presente trabalho foram: 0,01; 0,1 e 1,0 nM. Soluções estoque (2000X concentrado) de BDE-47 e BDE-99 foram preparadas em DMSO (dimetilsulfóxido) e utilizadas em concentrações finais de 0,01; 0,1 e 1,0 nM (exposições isoladas) e 0,01 nM para a mistura de BDE-47 e BDE-99. Além dos grupos expostos, o grupo controle, que recebeu o solvente DMSO na concentração de 0,05%, foi mantido em paralelo (ver item DESENHO EXPERIMENTAL).

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Para verificar a influência de contaminação a longo prazo, foram selecionados dois tempos para o estudo: 24 horas (exposição aguda) e 15 dias (exposição crônica). Com a exposição aguda é possível verificar as respostas celulares iniciais. Através a exposição crônica, além de verificar parâmetros que podem levar mais tempo para sofrerem alterações, é possível distinguir células que são capazes de permanecer viáveis frente a toxicidade dos compostos por longos períodos. Como os tumores são heterogêneos e podem apresentar células com diferentes níveis de suscetibilidade e agressividade, os diferentes compostos podem promover uma seleção de subpopulações de células.

Para a exposição aguda (24 h) as células foram semeadas em diferentes densidades, de acordo com o protocolo de cada ensaio (os protocolos estão descritos na sequência) e mantidas por 24 h em meio DMEM com as suplementações previamente descritas. Posteriormente, o meio de cultura foi substituído por novo meio de cultura contendo a mesma suplementação e os contaminantes (BDE-47, BDE-99 ou a mistura) e na sequência as células foram expostas durante 24 horas a 37°C. Após este período, seguiram-se os ensaios. Para a exposição crônica (15 dias), $1,3 \times 10^3$ (B16-F10) e $2,6 \times 10^3$ (B16-F1) células viáveis por cm^2 foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm^2 de superfície de crescimento contendo 5 mL de meio DMEM com suplementações e cultivadas por 24 h. Então, o meio de cada garrafa foi substituído por meio 5 mL de DMEM suplementado contendo os contaminantes (BDE-47, BDE-99 ou a mistura). A cada quatro (4) dias de exposição, era realizado o subcultivo das células, a viabilidade celular era verificada e os cálculos de densidade para os novos subcultivos consideraram apenas a quantidade de células viáveis. Este procedimento foi repetido três vezes para cada replicata de cada ensaio, totalizando 15 dias de exposição cada. As células então eram semeadas em placas de 24 ou 96 poços e então incubadas por 24 h em meio DMEM com suplementação ou armazenadas em RNA later (para a avaliação da expressão gênica), em quantidades variáveis de acordo com cada ensaio (FIGURA 5).

3.4 VIABILIDADE CELULAR

Para definir a viabilidade das células, a cada subcultivo as células foram incubadas com o corante Azul de Tripan (Gibco) 0,2% durante 1 minuto. As células foram verificadas e contadas em câmara de Neubauer em microscópio invertido. Como o corante Azul de Tripan não é capaz de adentrar células com a membrana plasmática íntegra, células coradas em azul após o uso do corante foram consideradas não viáveis (FIGURA 5d).

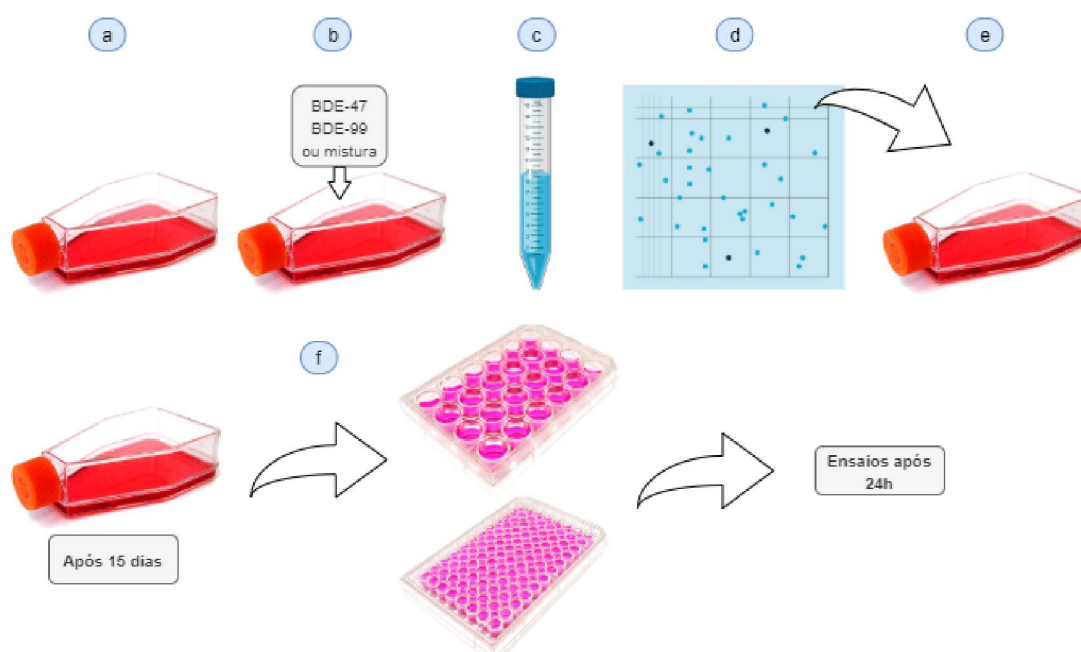


FIGURA 5 - ESQUEMA EXPOSIÇÃO CRÔNICA E VIABILIDADE CELULAR

a – Células B16-F1 ou B16-F10 foram semeadas em garrafas de cultura de 25 cm² em meio DMEM suplementado e com 10% de SFB. b – Após 24 h, o meio foi substituído por meio contendo BDE-47, BDE-99 ou a mistura dos contaminantes por 96 h até serem subcultivadas. c – As células foram desprendidas do fundo das garrafas com tripsina a 0,25% e EDTA a 2 mM por 5 min a 37°C, centrifugadas e d – As células foram incubadas com azul de tripan, para contagem e cálculo da viabilidade em câmara de Neubauer sob microscópio invertido. e – As células foram semeadas em garrafas de 25 cm² novas e cultivadas por mais 96 h. Os procedimentos “c”, “d” e “e” foram repetidos, até totalizar 15 dias de exposição. f – as células foram novamente incubadas com Azul de tripan, contadas e semeadas em placas de 24, 96 poços ou outros procedimentos de acordo com o protocolo referente ao ensaio. Após 24 h, seguiram-se os ensaios.

3.5 ATIVIDADE DE TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS

Para a determinação das atividades dos transportadores de drogas da superfamília ABC (PESSATTI *et al.*, 2002, com modificações), 5×10^3 e 10×10^3 células/poço para B16-F10 e B16-F1, respectivamente, foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após a exposição das células o meio de cultura foi removido e as células incubadas com rodamina B ($1 \mu\text{M}$ em PBS) em 37°C e protegidas da luz. Após 30 min o meio foi descartado, os poços lavados duas vezes com PBS e $250 \mu\text{l}$ de PBS foi adicionado. O conteúdo foi transferido para uma placa de 96 poços preta, específica para reagentes com característica de fluorescência. Foi realizada uma leitura imediata para a setagem inicial (t_0) e após 10 minutos (t_1) em espectrofluorímetro a 540 nm (excitação) e 580 nm (emissão). A emissão de fluorescência da rodamina efluxada para fora da célula foi determinada como $t_1 - t_0$.

3.6 MIGRAÇÃO (SCRATCH)

Para verificar a capacidade de migração após a exposição aos contaminantes, foi realizado o ensaio “scratch” (LIANG *et al.*, 2007). Um total de 1×10^4 e 2×10^4 células/poço para B16-F10 e B16-F1, respectivamente foram semeadas em placas de 96 poços. Após a exposição, foi adicionado Mitomicina C (Sigma-Aldrich) durante 90 min ($20 \mu\text{g/ml}$ para B16-F10 e $10 \mu\text{g/ml}$ para B16-F1), a fim de bloquear a proliferação das células. Com uma ponteira p10 foi feito um “risco” atravessando cada poço confluyente de células. Os poços foram lavados duas vezes com meio DMEM suplementado mas sem SFB para retirada de células soltas e as células mantidas em meio DMEM suplementado porém, neste momento, sem a adição de SFB. Imagens dos poços foram capturadas em microscópio invertido nos tempos 0 h (t_0) e após 24 h e 48 h (t_1) para as linhagens B16-10 e B16-F1, respectivamente. A extensão da migração das células para a região da qual as células foram removidas foi determinada com a comparação das imagens obtidas nos dois tempos ($t_1 - t_0$), com o software ImageJ® (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

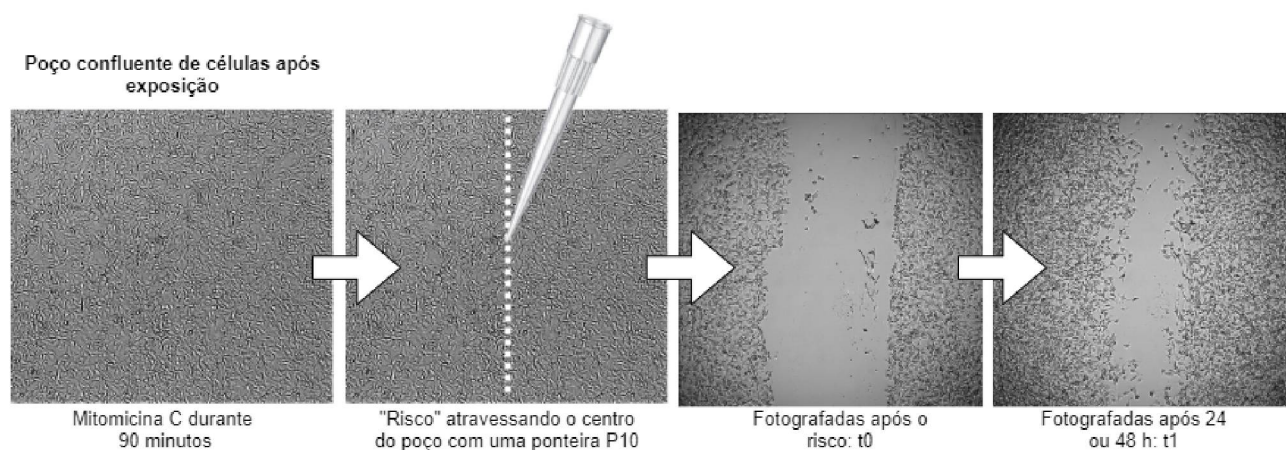


FIGURA 6 - ESQUEMA ENSAIO DO RISCO (*scratch*)

Para o ensaio do scratch, ao obter poços com culturas confluentes após a exposição das células, as células foram incubadas com meio DMEM suplementado, sem SFB, contendo Mitomicina C a 20 ou 10 µg/ml, de acordo com a linhagem durante 90 min a 37°C. As células foram então lavadas com meio DMEM sem SFB e com o auxílio de uma ponteira p10 foi feito um "risco" atravessando o meio de cada um dos poços. Os poços foram lavados com meio DMEM sem SFB pelo menos duas vezes, até que as células soltas fossem removidas da cultura. Imagens foram obtidas através de microscópio invertido no tempo 0 h (logo após o risco) e 24 h (B16-F10) ou 48 h (B16-F1) após o risco. O espaço ocupado pelas células que migraram foi calculado através do software ImageJ®.

3.7 ENSAIO CLONOGÊNICO 2D

Este ensaio avalia a capacidade das células de sobreviverem em baixa densidade e proliferar, formando assim, colônias de células. O ensaio foi realizado de acordo com FRANKEN *et al.* (2006): 150 e 300 células viáveis de B16-F10 e B16-F1, respectivamente, foram semeadas por poço em placas de 24 poços com 1 mL de meio DMEM suplementado por poço, durante 3 – 6 dias. O meio de cultura foi então descartado, as células fixadas com paraformaldeído 4% em PBS durante 30 min e coradas com cristal violeta 0,5% por 15 min para registro fotográfico em estereomicroscópio Discovery.V12, com câmera AxioCam 503 acoplada ao software Zen pro 2.6 (Zeiss) e a área do poço ocupada pelas colônias foi verificada através

do software ImageJ® (FIGURA 7). Quanto maior a área ocupada pelas células, maior a capacidade de sobrevivência e proliferação.

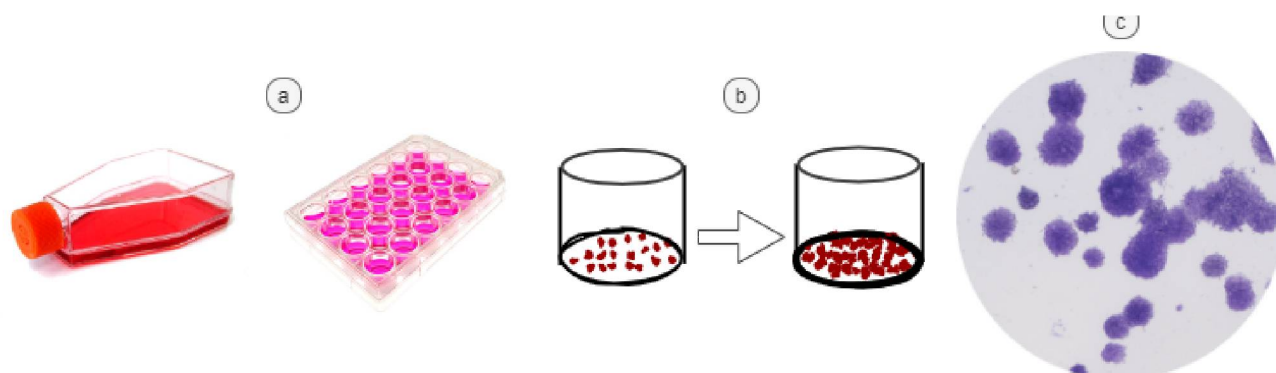


FIGURA 7 - ESQUEMA ENSAIO CLONOGÊNICO 2D

a - Após a exposição, 300 células viáveis foram semeadas por poço em placas de 24 poços. b - as células em baixa confluência foram mantidas incubuadas a 37°C até formarem colônias (3-6 dias). c - as células foram fixadas, coradas, fotografadas em estereomicroscópio e as imagens obtidas foram analisadas através do software ImageJ®.

3.8 ENSAIO CLONOGÊNICO 3D

Para simular a capacidade de formação de colônias em um tecido mole, mais próximo de um modelo real, foi utilizado o ensaio clonogênico 3D ou ensaio do ágar mole. Após 15 dias de exposição, células viáveis foram misturadas com ágar na concentração final de 0,35% em meio DMEM suplementado. Então, células B16-F10 foram semeadas em placas de 6 poços (semeando 5×10^3 células por poço) com poços previamente cobertos com uma camada de ágar a 0,5% em meio DMEM suplementado (1:1). As células foram mantidas por 15 dias a 37°C e 5% de CO₂ e então coradas com 0,005% de Cristal Violeta durante 60 min (Bissel, 2006). As colônias foram fotografadas em estereomicroscópio Discovery.V12, com câmera Axiocam 503 acoplada ao software Zen pro 2.6 (Zeiss) e contadas através do software ImageJ®.

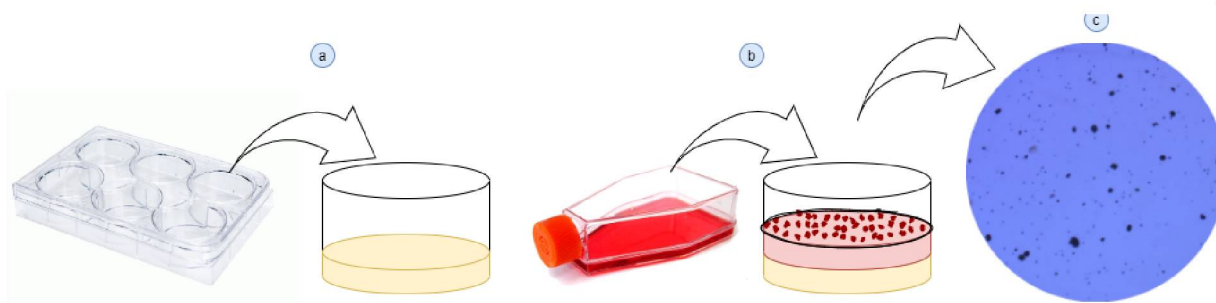


FIGURA 8 - ESQUEMA ENSAIO CLONOGÊNICO 3D

a – Em placas de 6 poços foi adicionado 1,5 mL de uma solução de meio DMEM suplementado e com 10% de SBF em ágar 0,5%. b – após a exposição, células viáveis foram contadas, misturadas em ágar (concentração final 0,35%) em meio DMEM suplementado e com 10% de SFB e incubadas a 37°C por 15 dias. c – as células foram coradas, imagens foram capturadas em estereomicroscópio e as colônias contadas com o software ImageJ®

3.9 ENSAIO DE INVASÃO TRANSWELL

Este ensaio permite avaliar a capacidade invasiva das células, um fator relacionado com a malignidade tumoral (adaptado de DEBBIE, BROOKS, 2001). Após a exposição crônica, 8×10^4 células viáveis foram semeadas dentro de insertos de transwell (membrana de 6 mm de diâmetro com poros de 8 μm), previamente recobertos com 35 μL Matrigel® (preparação proteica de membrana basal solubilizada, extraída do sarcoma de rato Engelbreth-Holm-Swarm, rico em proteínas da matriz extracelular, como: laminina, colágeno IV, heparina, sulfato de proteoglicanos, entactina/nidogênio e fatores de crescimento) 2,6 mg mL⁻¹ em meio DMEM sem SFB. Na face externa ao inserto, no poço, foram adicionados 500 μL de meio DMEM contendo 10% de SFB, formando um gradiente quimioatraente para as células tumorais, assim, células invasivas apresentam a capacidade de degradar moléculas do Matrigel® e migrar para a outra face do inserto (FIGURA 9). Protocolos já estabelecidos por Gonçalves *et al.* (2019) para células B16-F10, definiram o tempo de 72 h de incubação, porém para as células B16-F1 não havia protocolo estabelecido. Considerando que células B16-F10 apresentam parâmetros mais alterados de agressividade, realizou-se um teste com diferentes tempos de incubação para células B16-F1, comparando com B16-F10 para selecionar o tempo em que as duas linhagens apresentassem resultados próximos. Foram testados 72

h, 120 h e 7 dias de incubação. Após a definição do ensaio-teste, as células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 72 h (B16-F10) e 96 h (B16-F1).

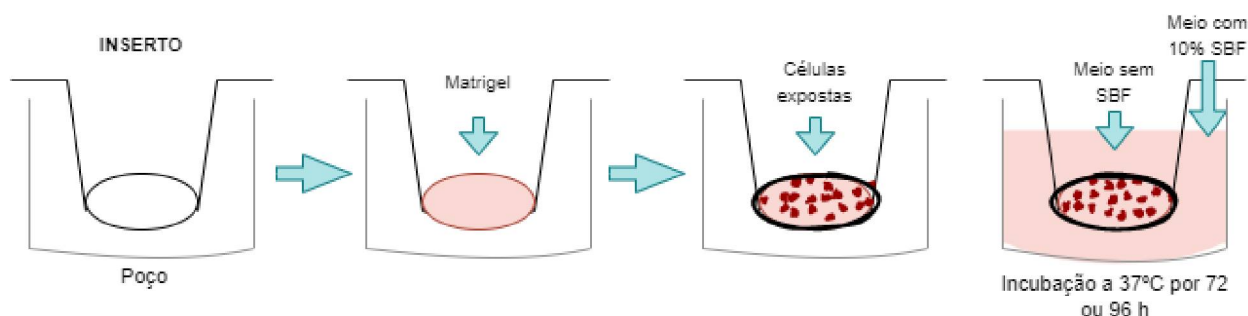


FIGURA 9 - ESQUEMA PLAQUEAMENTO ENSAIO DE INVASÃO TRANSWELL

Insertos de Transwell foram acondicionados em placas de cultura de 24 poços. Sobre os poços foi adicionado Matrigel e na sequência, 3×10^4 células viáveis expostas durante 15 dias. Dentro dos insertos foi adicionado meio DMEM sem soro e, na parte externa, meio DMEM contendo 10% de SFB, para que fosse criado um gradiente quimioatratante para células invadirem para o outro lado da membrana do inserto.

As membranas foram fixadas com 2% de paraformaldeído por 30 min, lavadas com PBS e marcadas durante 30 min com ActinGreen™ 488 ReadyProbes™ Reagent (Invitrogen) e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) preparados em PBS com saponina 0,01%. Os insertos foram então lavados com PBS e um cotonete de algodão foi utilizado para remover as células que não invadiram. As membranas foram então recortadas com um bisturi, e montadas em lâminas com Fluormount G (FIGURA 10). As imagens foram obtidas em scanner de lâminas Axio Image Z2 (Carl Zeiss) equipado com software Metafer 4/Vslide (Metasystems) e as imagens analisadas através do software ImageJ®.

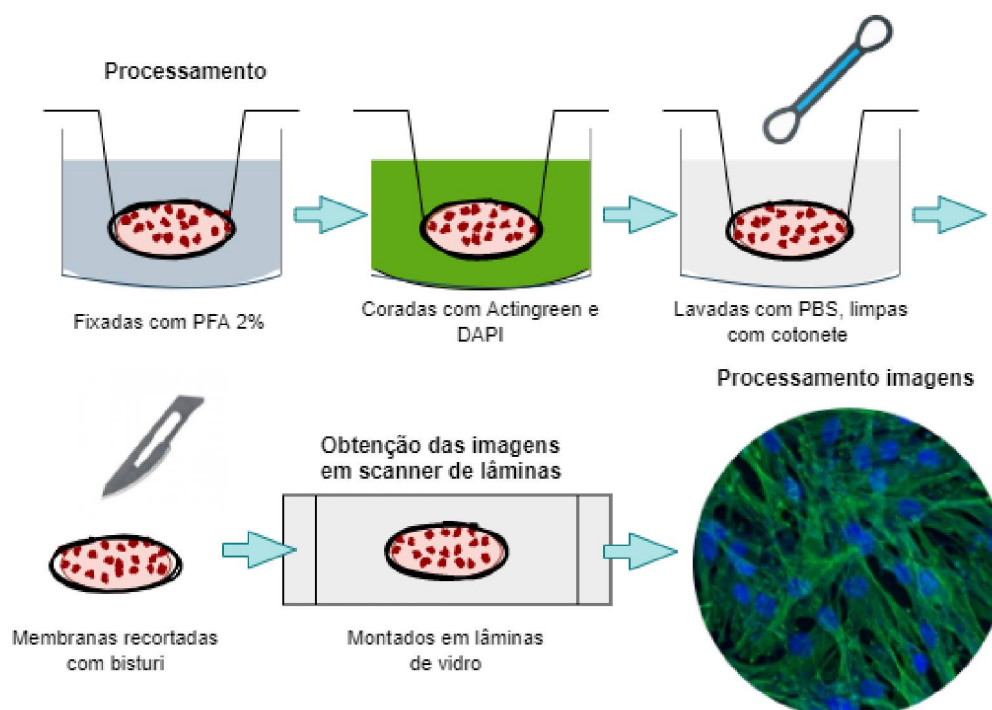


FIGURA 10 - ESQUEMA PROCESSAMENTO ENSAIO DE INVASÃO TRANSWELL

Após o tempo de incubação das células, o meio foi removido e as células fixadas com PFA 2% durante 30 minutos, em sequência foram marcadas com Actingreen e DAPI com saponina 0,01%. As membranas foram limpas com PBS e com um cotonete foram retiradas células que não migraram. As membranas foram recortadas com um bisturi, montadas em lâmina com Fluormount G e as imagens que foram obtidas em scanner de lâminas foram analisadas através do software ImageJ®.

3.10 EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

Para avaliar a expressão de genes relacionados com parâmetros importantes para o estabelecimento de metástase e resistência tumoral frente a exposição dos contaminantes, foram utilizadas 5×10^6 células que foram previamente expostas durante 15 dias e foram mantidas em *RNA later* em temperatura -20°C até o momento da extração. Para a extração, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado, as células foram homogeneizadas em Trizol e maceradas em equipamento *TissueLyser*. A extração seguiu-se com o *Purelink RNA mini Kit* (Applied Biosystems – Thermo Fisher) e a conversão em cDNA com o kit *Superscript IV* (Applied Biosystems 39 – Thermo Fisher). O total de cDNA obtido foi quantificado no equipamento NanoDrop 2000/2000c (Applied Biosystems – Thermo Fisher). Os *primers* foram previamente desenhados por integrantes do grupo de pesquisa e

validados através de PCR convencional, com as bandas geradas correspondentes ao tamanho dos fragmentos e posteriormente a concentração foi confirmada por reação de qPCR com SYBR® Green. A expressão dos genes ABCC1, ABCC2, CD44, MMP2, MMP9, MMP14, RECK, PGK-1, PIK3CA, TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 and TP53 (Tabela 2) foi realizada por PCR em tempo real (RT-qPCR) utilizando como gene endógeno a β 2- microglobulina, para estabelecer comparações nos níveis de expressão nas amostras antes e após a exposição aos contaminantes (gene housekeeping). As reações foram realizadas em termociclador Step one fast system (Applied Biosystems), utilizando SYBR® Green PCR Master Mix e 200 ng μ L⁻¹ de cDNA por replicata. A termociclagem ocorreu por 50 ciclos a 94°C, seguida de temperatura de hibridização a 60°C. Foram realizados três a cinco experimentos independentes com três replicatas por grupo e por experimento.

TABELA 2 - SEQUÊNCIA DE PRIMERS DOS GENES ALVOS.

Nome do gene	Sequência dos primers (5' - 3')
ABCC1	GAACCTCCCACACTGAATGG (foward) GGGCTGACAGCAGAGATGAC (reverse)
ABCC2	GGCTTCAAGGCCTACAAGAA (foward) AAGCCACCAGTCCTGAAGAA (reverse)
β 2-microglobulina (gene endógeno)	CGAGACATGTGATCAAGCATC (foward) GCTATTTCTTTCTGCGTG CAT (reverse)
CD44	AAGTACCGGTCCATCTTCCA (foward) CTAAGGCCACACTGATGTGC (reverse)
MMP 2	TGACCGGGATAAGAAGTATGG (foward) ACTTGTTGCCAGGAAAGTG (reverse)
MMP 9	TGACAAGAAGTGGGGTTTCTG (foward) GGCACGCTGGAATGATCTA (reverse)
MMP14	TATGGGCCCCAACATCTGTG (foward) TCCATCACTTGGTTATTCCTCA (reverse)
RECK	ATAGGCTGCAAACCCATCAT (foward) TGTCACCTTAGCAATAGTGTCCA (reverse)
TIMP1	GCGTACTCTGAGCCCTGCT (foward)

	<i>TCACTCTCCAGTTTGCAAGG (reverse)</i>
TIMP2	<i>AACAGGCGTTTTGCAATG (forward)</i>
	<i>GAATCCTCTTGATGGGGTTG (reverse)</i>
TIMP3	<i>ACCTCACCTCCTTCCCATC (forward)</i>
	<i>CCAGTGCTAAATTTGCAAGAAA (reverse)</i>
PGK1	<i>GTGCCAAATGGAACACAGAG (forward)</i>
	<i>AACATTGCTGAGAGCATCCA (reverse)</i>
PIK3CA	<i>TGACCTTCGGCTTTTTCAAC (forward)</i>
	<i>GGCATGCCAATAACAAAACC (reverse)</i>
TP53	<i>GGCGTAAACGCTTCGAGAT (forward)</i>
	<i>CTGGAGTGAGCCCTGCTG (reverse)</i>

Estes genes são associados com malignidade tumoral e resistência. FONTE: A autora (2020).

3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

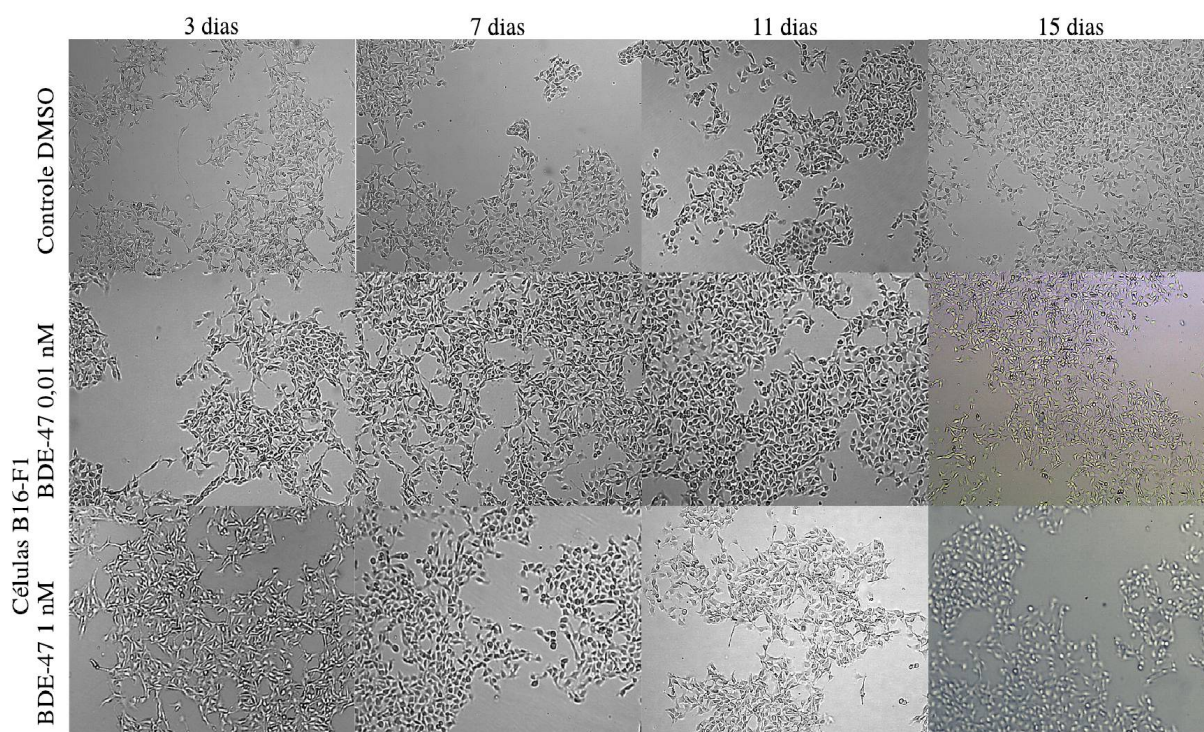
Três a cinco experimentos independentes foram realizados para cada ensaio. Para a análise estatística, a média das replicatas foi calculada para cada experimento independente e empregados para comparação entre controle e as concentrações do controle vs grupos expostos ao BDE-47, controle vs grupos expostos ao BDE-99 e controle vs grupo mistura, por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's quando aplicável. Para RT-qPCR, a expressão relativa foi calculada ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) e as comparações foram realizadas usando ANOVA + teste de Dunnet (dados com distribuição normal) ou pós-teste de Kruskal-Wallis + Dunn (dados que não passaram no teste de normalidade). O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 MORFOLOGIA E VIABILIDADE CELULAR

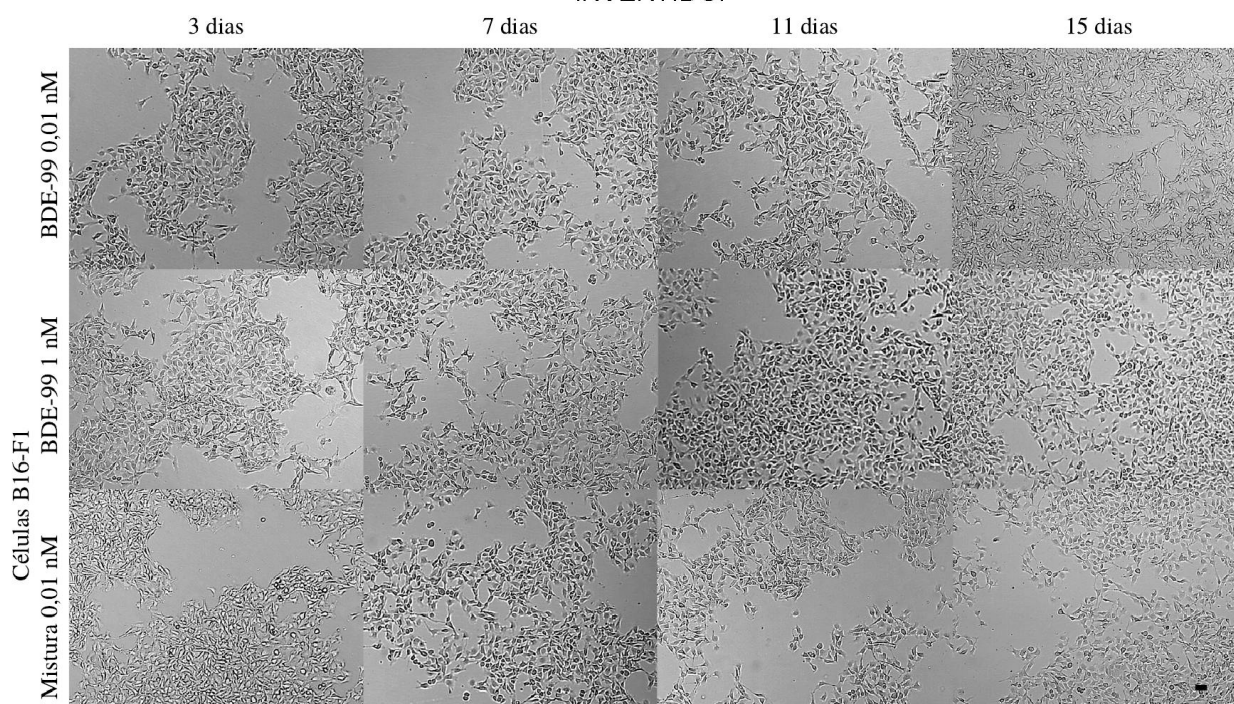
A morfologia e viabilidade das células foram monitoradas ao longo da exposição e entre os subcultivos. Não foram observadas mudanças morfológicas claras para células B16-F10 sob microscópio invertido, porém as células B16-F1 parecem adquirir uma morfologia mais semelhantes a fibroblastos (fibroblast-like) na concentração mais baixa de grupos expostos aos BDEs (exposição de 15 dias, BDE47, BDE-99 e mistura a 0,01 nM), FIGURA 11 e 12.

FIGURA 11 - CÉLULAS B16-F1 CONTROLE E EXPOSTAS AO BDE-47 SOB MICROSCÓPIO INVERTIDO.



Grupo controle, BDE-47 (0,01 e 1 nM), após 3, 7, 11 e 15 dias de exposição. As células expostas à concentração mais baixa de BDE-47 são mais fibroblásticas do que as do controle. Nenhum resíduo celular indicativo de citotoxicidade foi observado em qualquer condição de exposição. Barra = 100 μ m. Fonte: A autora (2019).

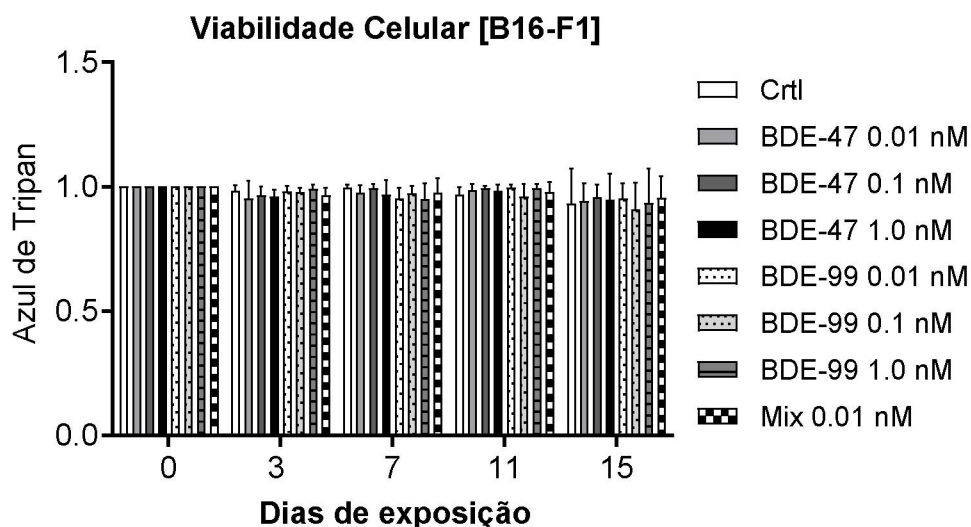
FIGURA 12 - CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-99 E MISTURA SOB MICROSCÓPIO INVERTIDO.



Grupo BDE-99 (0,01 e 1 nM) e mistura após 3, 7, 11 e 15 dias de exposição. As células expostas à concentração mais baixa de BDE-99 são mais fibroblásticas do que as do controle. Nenhum resíduo celular indicativo de citotoxicidade foi observado em qualquer condição de exposição. Barra = 100 µm. Fonte: A autora (2019).

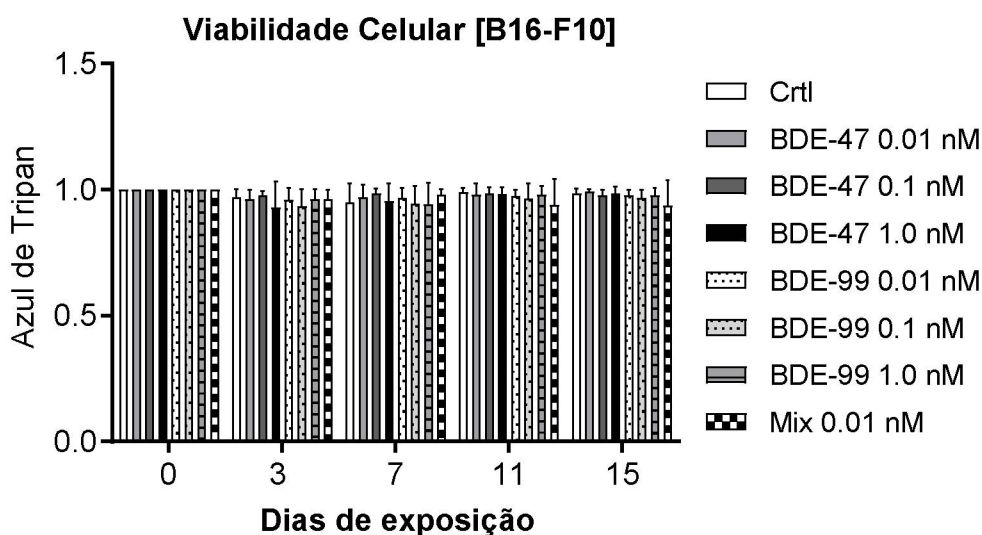
A viabilidade celular foi verificada em todos os subcultivos durante a exposição crônica, nos dias 3, 7, 11 e 15 de exposição, utilizando o corante Azul de tripan. Não foram encontradas alterações na viabilidade de células B16-F1 (FIGURA 13) e células B16-F10 (FIGURA 14) expostas ao BDE-47 e 99 e a mistura, demonstrando que as concentrações utilizadas não são tóxicas para estas linhagens.

FIGURA 13 - VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS



Células B16-F1 foram expostas ao BDE-47, BDE-99 e a mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) durante 24 h e 15 dias. A viabilidade das células foi verificada através do corante azul de tripan ao longo da exposição crônica em células melanoma murino, não demonstrando diferença significativa ao longo do tempo de exposição. Média $\pm$ desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 14 - VIABILIDADE DE CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS

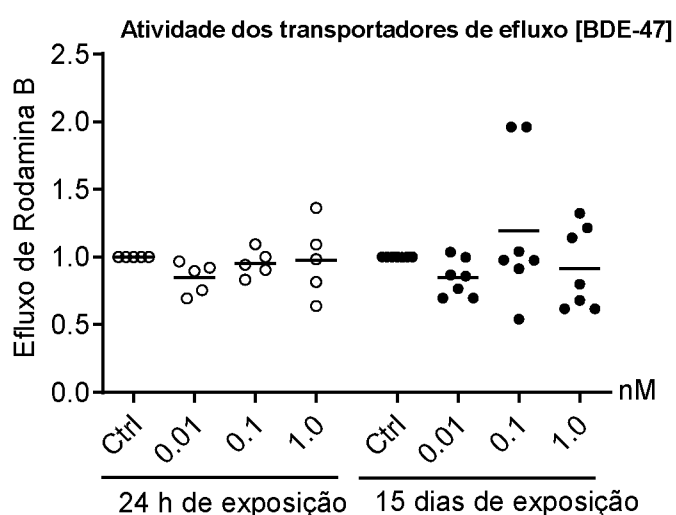


Células B16-F10 foram expostas ao BDE-47, BDE-99 e a mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) durante 24 horas e 15 dias. A viabilidade das células foi verificada através do corante azul de tripan ao longo da exposição crônica em células melanoma murino, não demonstrando diferença significativa ao longo do tempo de exposição. Média $\pm$ desvio padrão. Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados

4.2 Atividade dos transportadores de efluxo de drogas

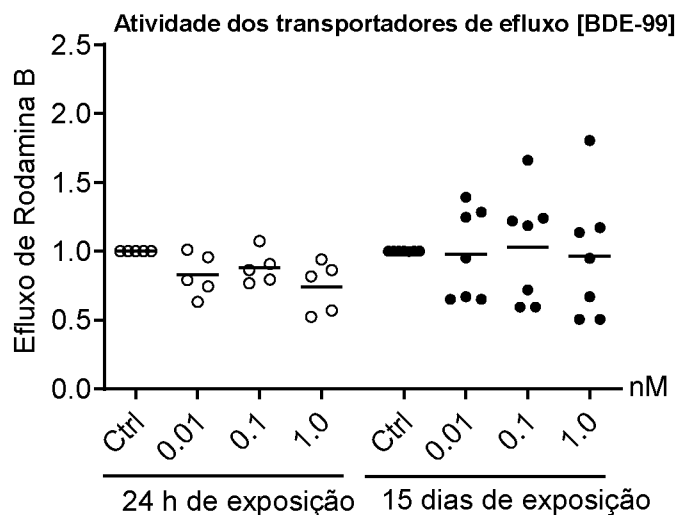
A atividade dos transportadores de efluxo de drogas é um parâmetro relacionado à resistência à quimioterapia, já que ao ser efluxado para fora das células, os quimioterápicos não permanecem na concentração necessária para promover a morte das células tumorais, diminuindo assim, o efeito do tratamento. Esse ensaio foi medido pelo efluxo da rodamina B, processo este envolvido com o sistema de resistência à múltiplas drogas (MDR). A taxa de rodamina B transportada para o meio extracelular aumentou 50% nas células B16-F10 expostas a BDE-47 0,01 nM por 15 dias (FIGURA 17), mas não foi afetada nos outros grupos e nas células B16-F1 (FIGURAS 15, 16, 18 e 19).

FIGURA 15 - ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS EM CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-47



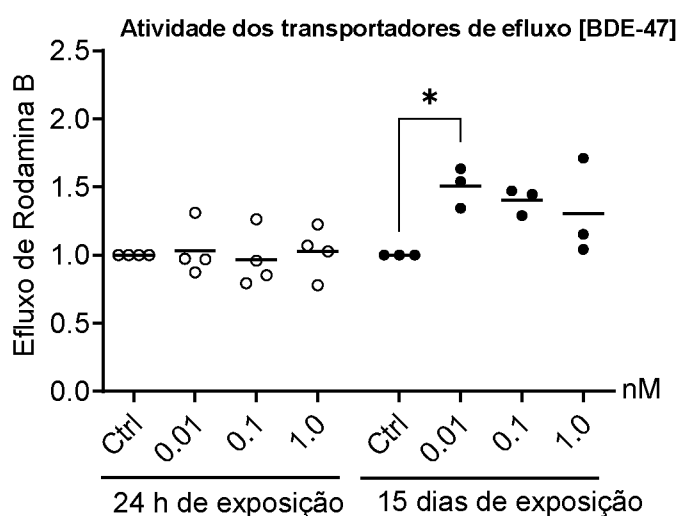
A exposição ao BDE-47 em células B16-F1 não afetou a atividade dos transportadores de efluxo de drogas. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 16 - ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS EM CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-99



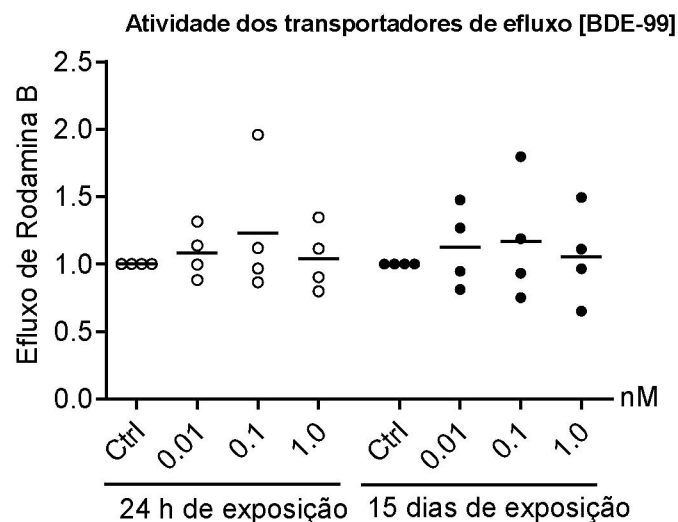
A exposição ao BDE-99 não afetou a atividade dos transportadores de efluxo de drogas em células B16-F1. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 17 - ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS EM CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS AO BDE-47



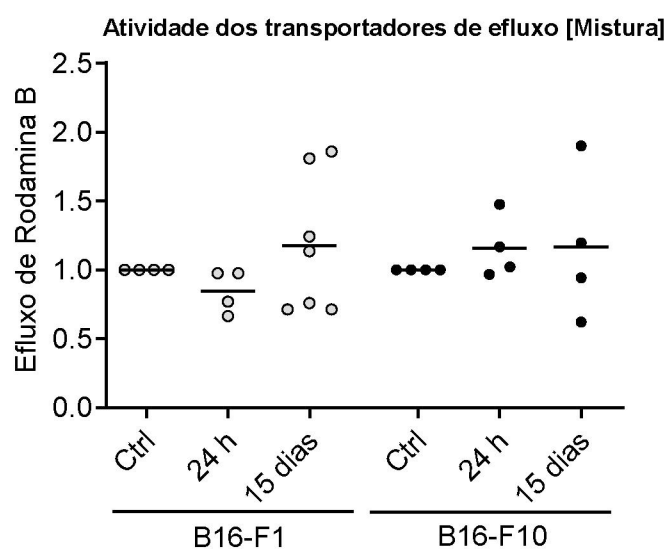
A exposição aos BDE-47 em células B16-F10 afetou a atividade dos transportadores de efluxo de drogas apenas na menor concentração de BDE-47 em células expostas durante 15 dias. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. * $p < 0,05$. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 18 - ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS EM CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS AO BDE-99



A exposição ao BDE-99 não afetou a atividade dos transportadores de efluxo de drogas em células B16-F10. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 19 - ATIVIDADE DOS TRANSPORTADORES DE EFLUXO DE DROGAS EM CÉLULAS B16-F1 E F10 EXPOSTAS A MISTURA DOS CONTAMINANTES

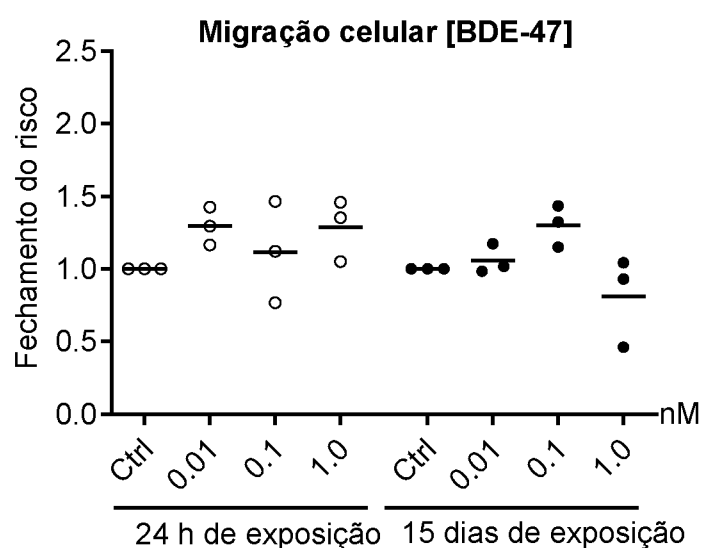


A exposição à mistura dos BDEs não afetou a atividade dos transportadores de efluxo de drogas em células B16-F1 e B16-F10. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

4.3 MIGRAÇÃO CELULAR

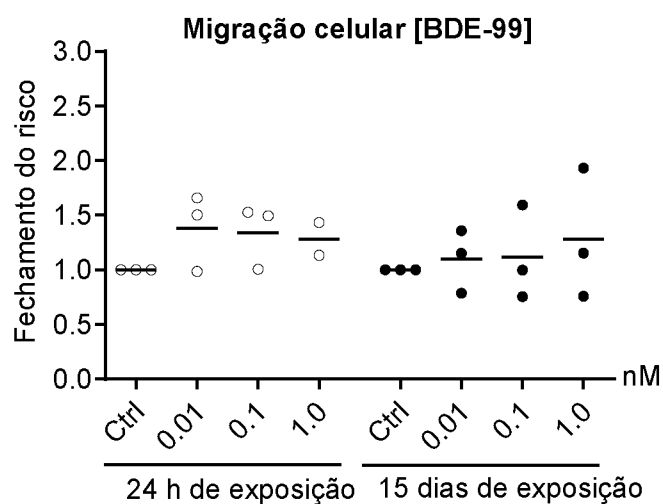
A migração de células expostas foi avaliada pelo ensaio do *scratch* (“risco”). Neste ensaio, quanto maior a diferença entre o espaço formado pelo risco entre t_1 e t_0 , maior a alteração deste parâmetro. A migração das células B16-F10 aumentou após 24 h de exposição ao BDE-47 1,0 nM (67%, FIGURA 22) e ao BDE-99 0,01 e 0,1 nM (38% e 34%, respectivamente, FIGURA 23). No entanto, a exposição de 15 dias a mistura de BDE 47 + BDE-99 levou ao efeito oposto, ou seja, 39% diminuiu a migração celular em células B16-F10 (FIGURA 24). A migração celular não foi afetada nos outros grupos e nas células B16-F1 (FIGURAS 20 e 21).

FIGURA 20 - MIGRAÇÃO DE CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-47



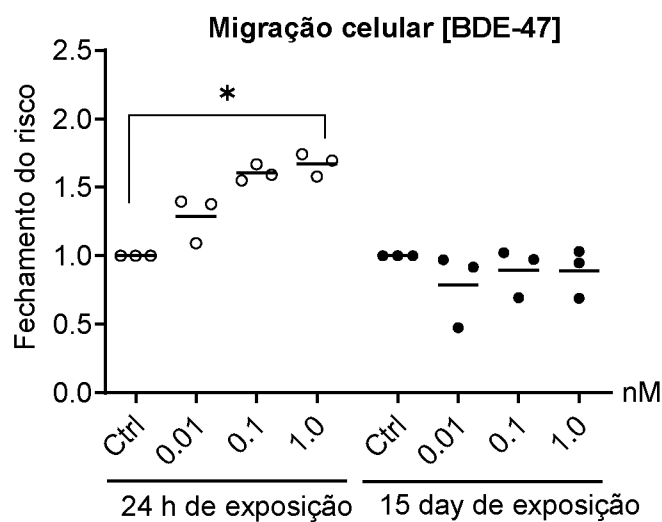
As células B16-F1 foram expostas ao BDE-47, BDE-99 e à mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) durante 24 h e 15 dias. A migração celular não foi afetada pela exposição ao BDE-47 em células B16-F1. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. * $p < 0,05$. Três experimentos independentes foram realizados. Conjunto de imagens obtidas em microscópio invertido demonstrando a migração das células logo após o risco (0 h = t_0) e após 24 h (B16-F10) ou 48 h (B16-F1) = t_1 .

FIGURA 21 - MIGRAÇÃO DE CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-99



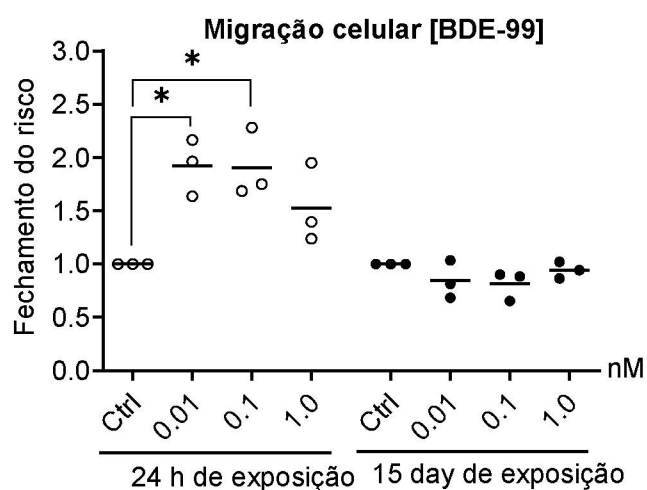
Migração de células B16-F1 expostas ao BDE-99 durante 24 h e 15 dias. A migração celular não foi afetada. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. Três experimentos independentes foram realizados

FIGURA 22 - MIGRAÇÃO DE CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS AO BDE-47



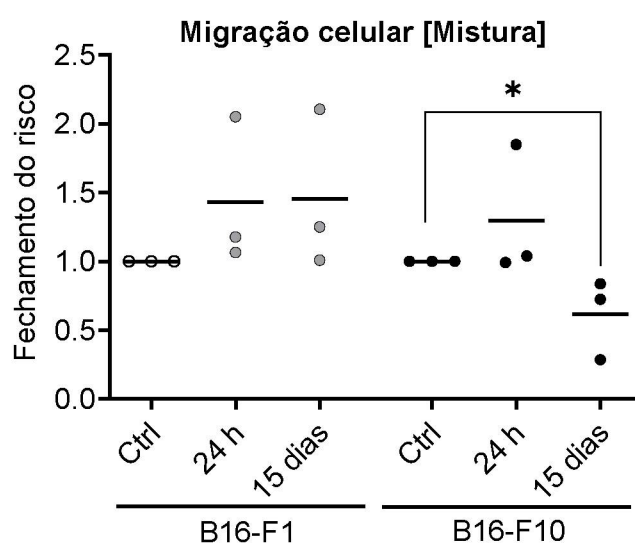
As células B16-F10 foram expostas a BDE-47, BDE-99 e à mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) durante 24 h e 15 dias. A migração celular aumentou em células B16-F10 após exposição a BDE-47 1 nM durante 24 h. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de KruskalWallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. * $p < 0,05$. Três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 23 - MIGRAÇÃO DE CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS AO BDE-99



Migração de células B16-F10 expostas ao BDE-99 durante 24 h e 15 dias. A migração celular aumentou em células B16-F10 após exposição ao BDE-99 0,01 e 0,1 nM durante 24 h. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. * $p < 0,05$. Três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 24 - MIGRAÇÃO DE CÉLULAS B16-F1 E B16-F10 EXPOSTAS A MISTURA

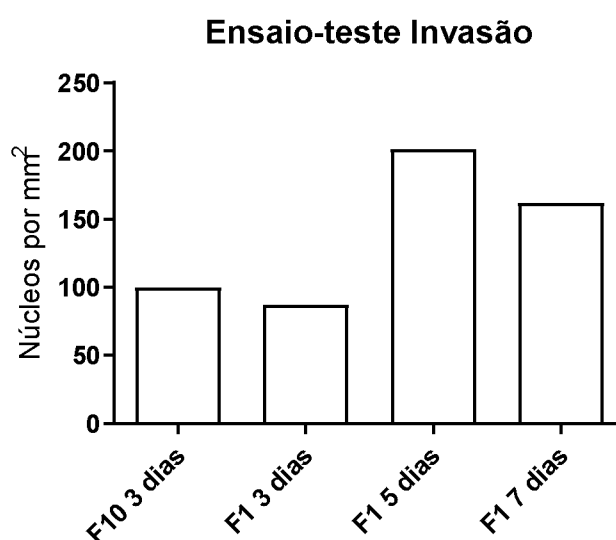


As células B16-F1 e B16-F10 foram à mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) durante 24 h e 15 dias. A exposição à mistura levou a uma diminuição da migração celular após 15 dias de exposição. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pósteste de Dunn's, quando apropriado. * $p < 0,05$. Três experimentos independentes foram realizados.

4.4 INVASÃO CELULAR

As células invasivas têm a capacidade de degradar os componentes da matriz extracelular, como a matriz rica em laminina (Matrigel®), e migrar em direção a um gradiente quimioatraente de SFB, do outro lado do inserto. Para definição do protocolo, foi realizado um ensaio-teste comparando a capacidade invasiva de células B16-F10 – com protocolo já anteriormente estabelecido de 72 h de incubação – e células B16-F1. As células B16-F1 foram incubadas por 72 h, 120 h e 7 dias e comparadas com células B16-F10 incubadas com 72 h. Os resultados demonstraram que células B16-F1 incubadas por 72 h invadem menos do que a outra linhagem no mesmo tempo, porém 120 h a quantidade de células capazes de atravessar o inserto foi muito superior e, em 7 dias, esse número diminuía (provavelmente atribuído a processos de morte celular ou atravessamento das células para o outro lado da membrana e desprendimento das mesmas) (FIGURA 25). Optou-se por selecionar 96 h de incubação para células B16-F1, representando um tempo intermediário. A exposição aos BDEs 47 e 99 não afetou a capacidade invasiva das células B16-F1 e B16-10 (FIGURAS 26 e 27).

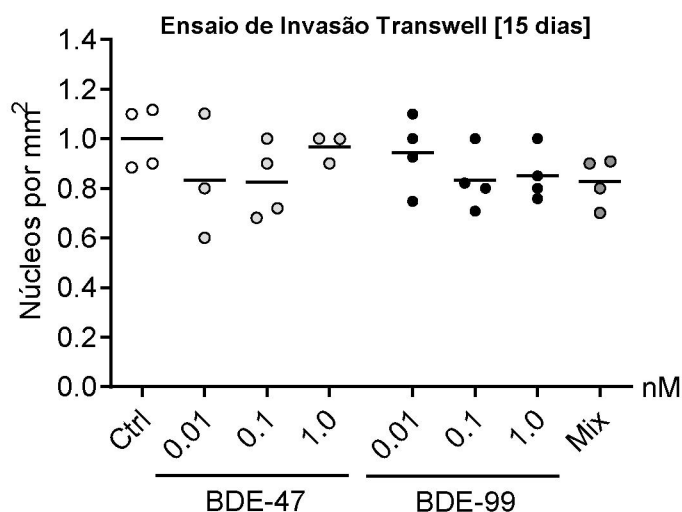
FIGURA 25 - ENSAIO-TESTE DE INVASÃO CELULAR



Células B16-F1 e B16-F10 foram semeadas em insertos de transwell contendo Matrigel e incubadas por 72h (B16-F10), 72 h, 120 h e 7 dias (B16-F1) e comparadas a fim de se determinar o melhor

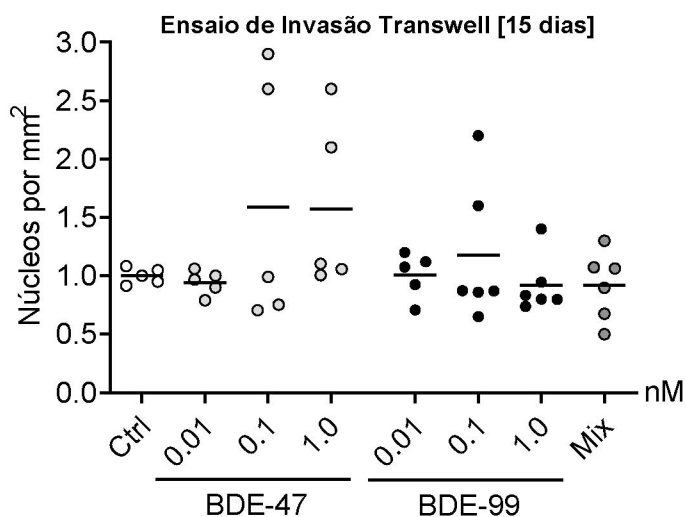
tempo de incubação para as células B16-F1 comparativamente com B16-F10, com protocolo previamente definido. Foi selecionado o tempo de 96 h para incubação de células B16-F1.

FIGURA 26 - INVASÃO CELULAR DE CÉLULAS B16-F1.



As células B16-F1 foram expostas ao BDE-47, BDE-99 e à mistura (BDE47 + BDE-99 a 0,01 nM) durante 15 dias. A capacidade invasiva investigada pelo ensaio transwell com matriz Matrigel® não foi alterada pelos BDEs 47 e 99 em células B16-F1. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. Três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 27 - INVASÃO CELULAR DE CÉLULAS B16-F10.



As células B16-F10 foram expostas ao BDE-47, BDE-99 e à mistura (BDE47 + BDE-99 a 0,01 nM) durante 15 dias. A capacidade invasiva investigada pelo ensaio transwell com matriz Matrigel® não foi

alterada pelos BDEs 47 e 99 em células B16-F10. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. Três experimentos independentes foram realizados.

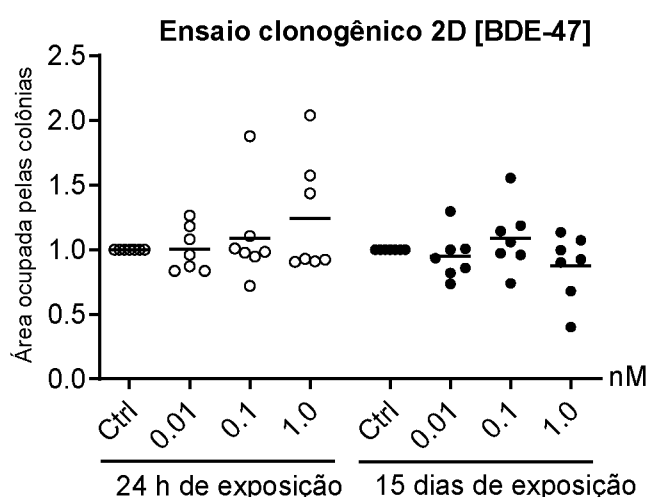
4.5 Ensaio de formação de colônias (2D e 3D)

A capacidade das células de sobreviver em baixa densidade sobre substrato sólido e formar colônias demonstra a capacidade das células de burlar a morte celular por anoikis (morte celular por redução dos contatos celulares e perda de adesão ao substrato), um parâmetro importante para a colonização de outros órgãos e tecidos por células tumorais metastáticas, além de demonstrar maior proliferação celular ao ocupar maior área no poço.

A área ocupada pelo poço através do ensaio clonogênico 2D aumentou 34% nas células B16-F10 expostas a 0,01 nM de BDE-47 (FIGURA 30) e 26% nas células expostas a mistura (FIGURA 32) após 15 dias de exposição.

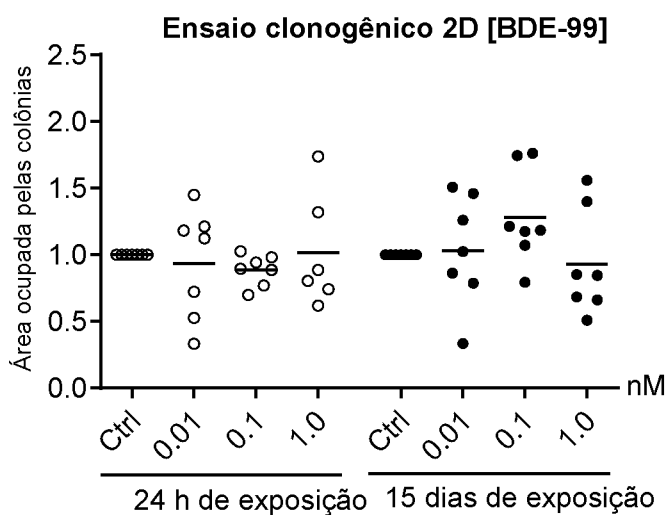
No entanto, a exposição ao BDE não teve efeito nos outros grupos e nas células B16-F1 (FIGURAS 28 e 29) e B16-F10 expostas ao BDE-99 (FIGURA 31). Para avaliar a sobrevivência celular e a formação de colônias em células suspensas, um ensaio clonogênico 3D utilizando ágar em baixa concentração foi realizado para células B16-F10. A exposição aos BDEs 47 e 99 não teve efeito sobre a formação de colônias 3D em células B16-F10 após 15 dias de exposição (FIGURA 33).

FIGURA 28 - FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-47.



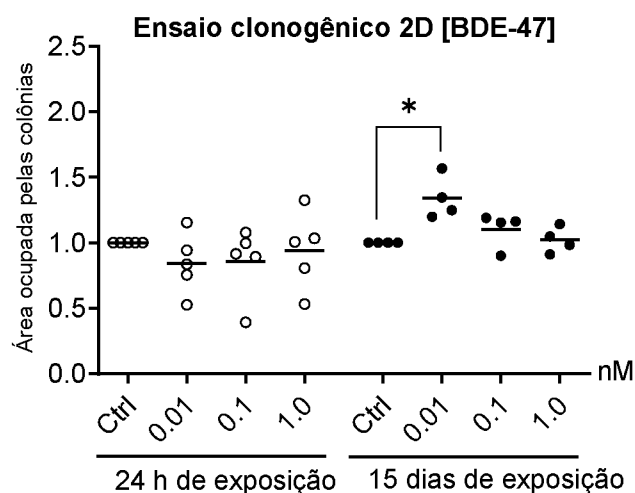
As células B16-F1 foram expostas ao BDE-47, BDE-99 e a mistura (BDE47 + BDE-99 a 0,01 nM) durante 24 h e 15 dias. A formação de colônias não foi afetada pela exposição ao BDE-47 em células B16-F1. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 29 - FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-99.



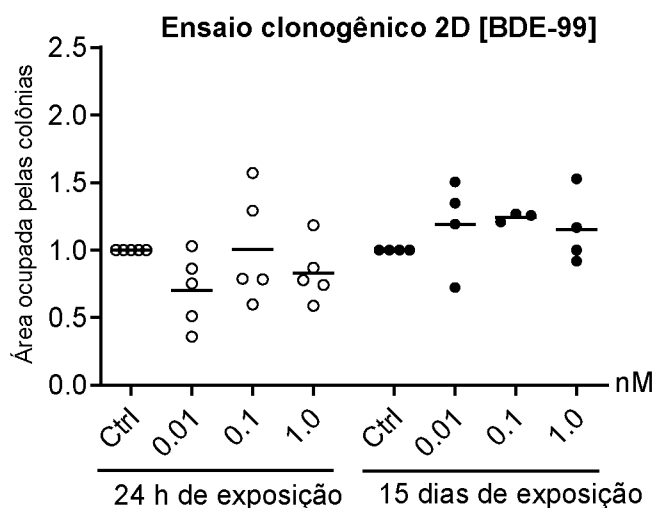
Células B16-F1 expostas ao BDE-99 durante 24 h e 15 dias. A formação de colônias não foi afetada pela exposição aos BDE-99 em células B16-F1. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 30 - FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS AO BDE-47.



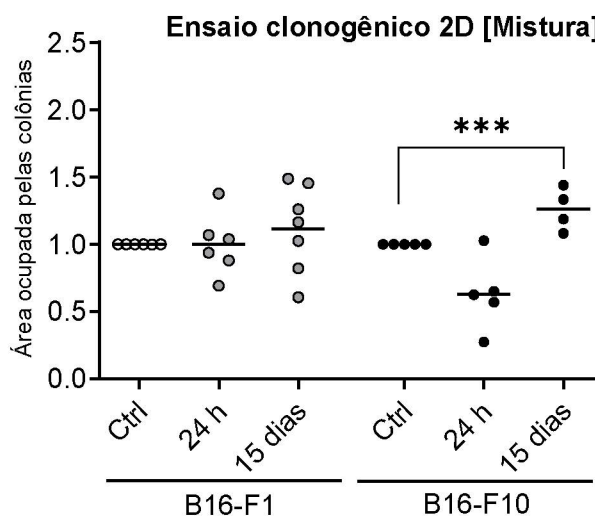
As células B16-F10 foram expostas ao BDE-47, BDE-99 e a mistura (BDE47 + BDE-99 a 0,01 nM) durante 24 h e 15 dias. A formação de colônias aumentou para células B16-F10 expostas ao BDE-47 0.01 nM. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. * $p < 0,05$. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 31 - FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE CÉLULAS B16-F10 EXPOSTAS AO BDE-99.



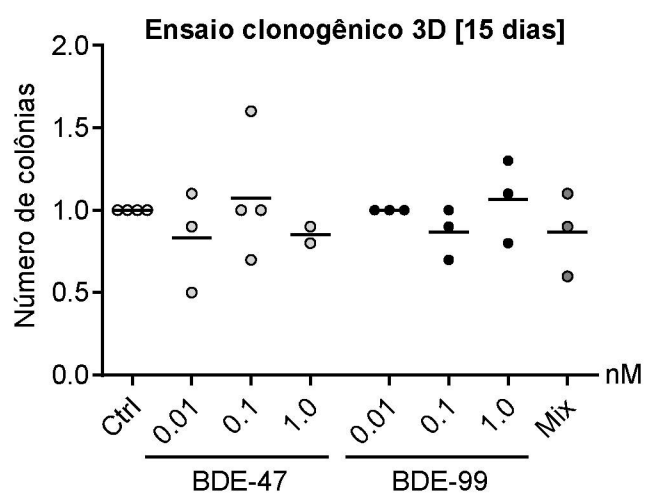
Células B16-F10 expostas ao BDE-99 durante 24 h e 15 dias. A formação de colônias não foi afetada pela exposição aos BDE-99 em células B16-F10. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 32 - FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE CÉLULAS B16-F1 E B16-F10 EXPOSTAS A MISTURA DOS CONTAMINANTES.



As células B16-F1 e B16-F10 expostas a mistura (BDE47 + BDE-99 a 0,01 nM) durante 24 h e 15 dias. A formação de colônias aumentou para células B16-F10 expostas à mistura durante 15 dias. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. *** $p < 0,001$. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 33 - FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM ÁGAR MOLE DE CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS DURANTE 15 DIAS AO BDE-47 E 99.



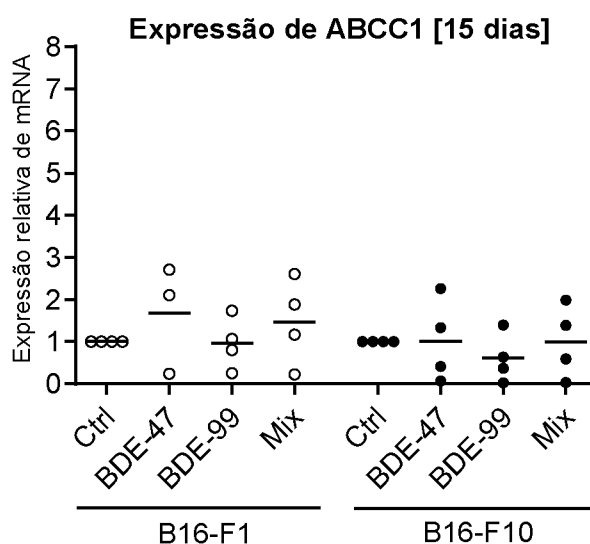
As células B16-F1 e B16-F10 foram expostas ao BDE-47, BDE-99 e a mistura (BDE47 + BDE-99 a 0,01 nM) durante 15 dias. O ensaio clonogênico 3D foi realizado em matriz de ágar mole apenas para o experimento crônico (15 dias de exposição). A formação de colônias não foi afetada. Média (barra

horizontal) e experimentos independentes (pontos). Teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's, quando apropriado. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

4.6 Expressão gênica

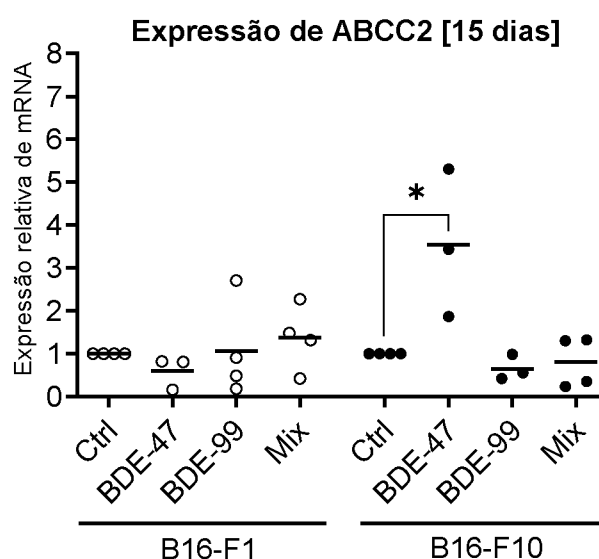
Considerando que a expressão gênica é um ensaio de maior custo, somente células expostas durante 15 dias foram analisadas, permitindo que alterações mais persistentes causadas pela exposição aos BDEs 47 e 99 fossem evidenciadas. Além disso, foram selecionadas concentrações que se destacaram nos ensaios iniciais do presente trabalho. Portanto, a expressão gênica foi avaliada em células expostas cronicamente às concentrações mais baixas de BDE-47, BDE-99 e sua mistura por meio de RTqPCR. A exposição aos BDEs 47 e 99 não afetou os níveis de mRNA de ABCC1 (FIGURA 34), CD44 (FIGURA 36), MMP-14 (FIGURA 39), TIMP-1 (FIGURA 41), TIMP-2 (FIGURA 42) e PGK-1 (FIGURA 44), para ambas as células B16-F1 e B16-F10. No entanto, para células B16-F10, houve aumentos da expressão de ABCC2 (~ 3 vezes) para BDE-47 (FIGURA 35), TP53 (1,6 vezes) e MMP-9 (3 vezes) para BDE99 (FIGURA 46 e 38), e MMP-9 (~ 5 vezes) e RECK para a mistura (FIGURA 38 e 40). Além disso, uma diminuição de 2 vezes na expressão do gene TIMP-3 ocorreu para BDE-99 (FIGURA 43).

FIGURA 34 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENES ABCC 1 POR RT-qPCR



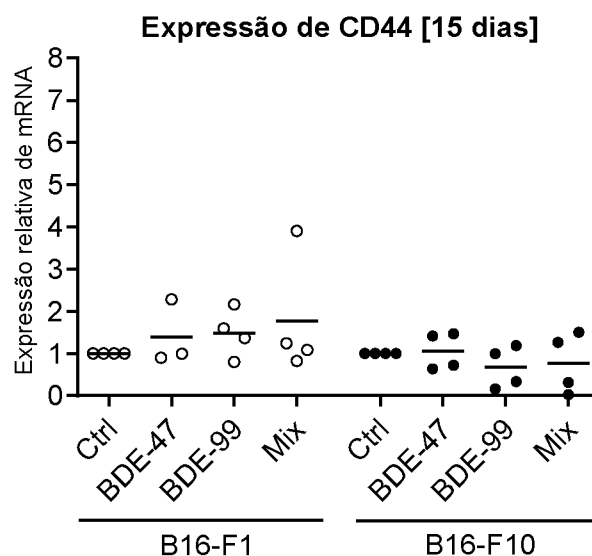
As células B16-F1 e B16-F10 foram expostas à menor concentração de BDE-47, BDE-99 e da mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) por 15 dias e a expressão gênica foi determinada por RTqPCR. O gene da β 2-microglobulina foi usado como gene endógeno. Os BDEs 47 e 99 não afetaram a expressão do gene ABCC1 em células B16-F1 e B16-F10. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida (B16F1: $p=0,6015$; B16F10: $p=0,8183$). Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 35 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE ABCC2 POR RT-qPCR



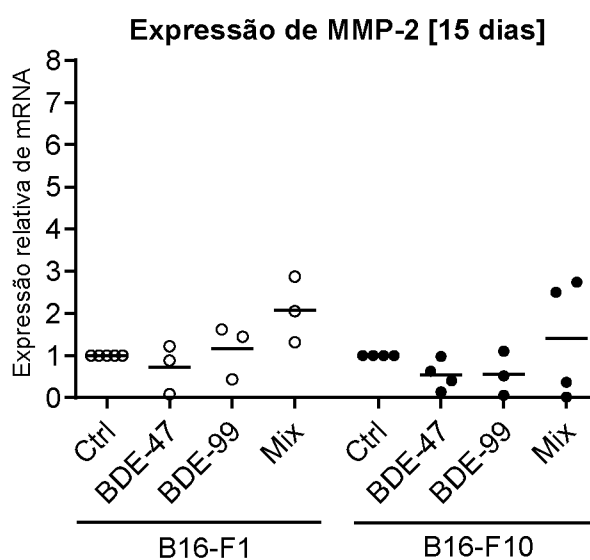
As células B16-F1 e B16-F10 foram expostas à menor concentração de BDE-47, BDE-99 e da mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) por 15 dias e a expressão gênica foi determinada por RTqPCR. O gene da β 2-microglobulina foi usado como gene endógeno. O BDE-47 induziu a expressão de ABCC2 em células B16-F10. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's (B16F1: $p=0,2335$; B16F10: $p=0,0239$). * $p<0,05$. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 36 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE CD44 POR RT-qPCR



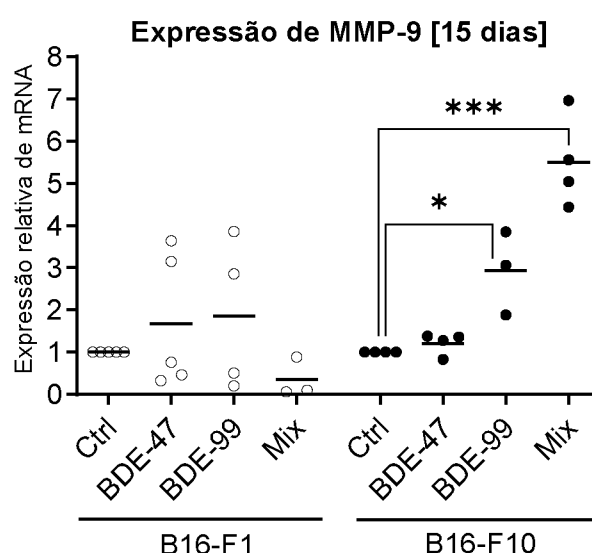
As células B16-F1 e B16-F10 foram expostas à menor concentração de BDE-47, BDE-99 e da mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) por 15 dias e a expressão gênica foi determinada por RTqPCR. O gene da $\beta 2$ -microglobulina foi usado como gene endógeno. Os BDEs 47 e 99 não afetaram a expressão de CD44 em ambas as linhagens B16-F1 e B16-F10. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (B16F1: $p=0,7991$; B16F10: $p=0,7153$). Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 37 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE MMP-2 POR RT-qPCR



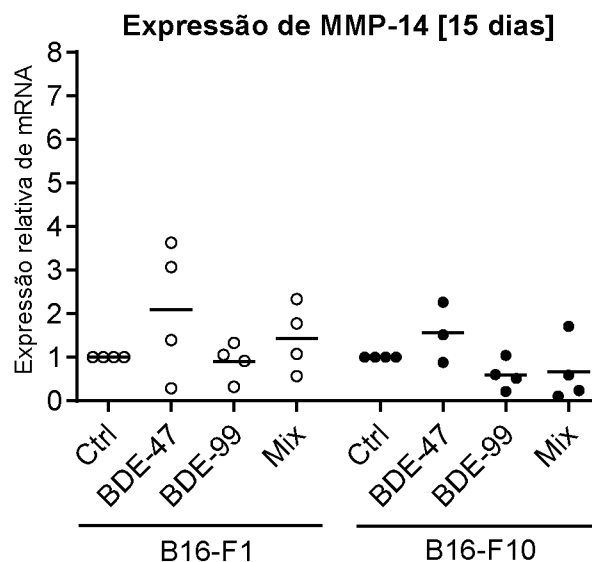
As células B16-F1 e B16-F10 foram expostas à menor concentração de BDE-47, BDE-99 e da mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) por 15 dias e a expressão gênica foi determinada por RTqPCR. O gene da β 2-microglobulina foi usado como gene endógeno. Os BDEs 47 e 99 não afetaram a expressão de MMP-2 em ambas as linhagens B16-F1 e B16-F10. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (B16F1: $p=0,0594$; B16F10: $p=0,5086$). Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 38 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE MMP-9 POR RT-qPCR



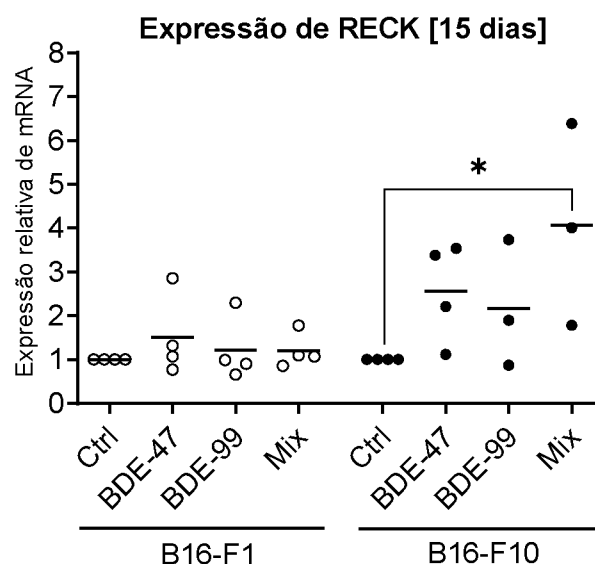
As células B16-F1 e B16-F10 foram expostas à menor concentração de BDE-47, BDE-99 e da mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) por 15 dias e a expressão gênica foi determinada por RTqPCR. O gene da β 2-microglobulina foi usado como gene endógeno. O BDE-99 e a mistura induziram a expressão de MMP-9 em células B16-F10. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's (B16F1: $p=0,3881$; B16F10: $p<0,0001$).. * $p<0,05$, *** $p<0,01$. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 39 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE MMP-14 POR RT-qPCR



As células B16-F1 e B16-F10 foram expostas à menor concentração de BDE-47, BDE-99 e da mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) por 15 dias e a expressão gênica foi determinada por RTqPCR. O gene da β 2-microglobulina foi usado como gene endógeno. Os BDEs 47 e 99 não afetaram a expressão de MMP-14 em ambas as linhagens B16-F1 e B16-F10. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (B16F1: $p=0,4263$; B16F10: $p=0,2363$). Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

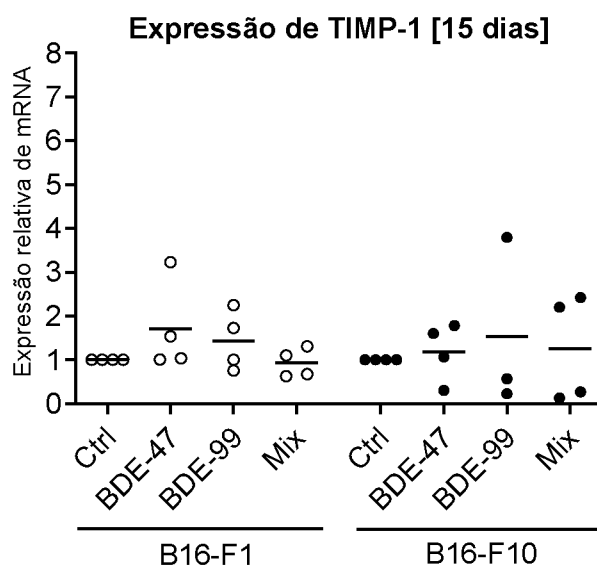
FIGURA 40 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE RECK POR RT-qPCR



As células B16-F1 e B16-F10 foram expostas à menor concentração de BDE-47, BDE-99 e da mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) por 15 dias e a expressão gênica foi determinada por RT-

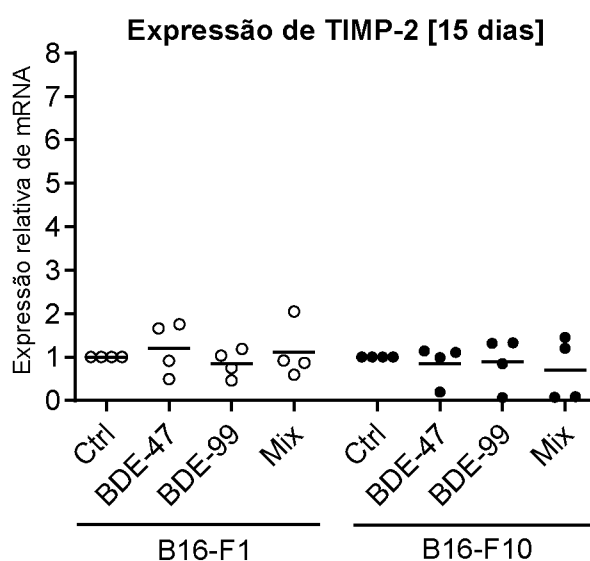
qPCR. O gene da $\beta 2$ -microglobulina foi usado como gene endógeno. A exposição à mistura dos contaminantes induziu a expressão de RECK em células B16-F10. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's (B16F1: $p=0,5902$; B16F10: $p=0,0384$).. $*p<0,05$. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 41 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE TIMP-1 POR RT-qPCR



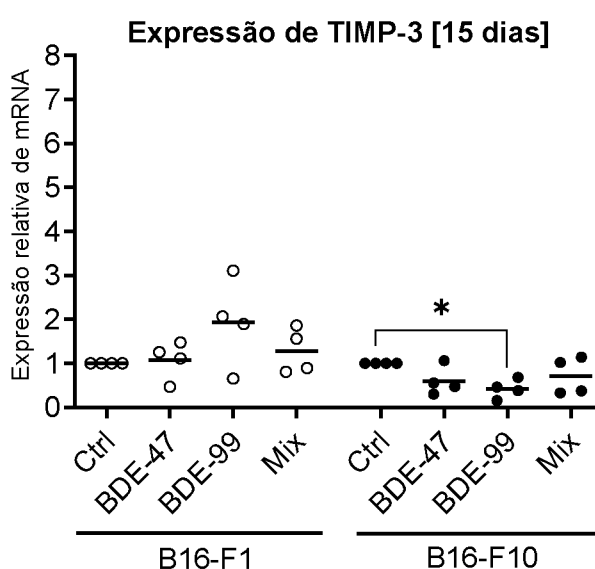
As células B16-F1 e B16-F10 foram expostas à menor concentração de BDE-47, BDE-99 e da mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) por 15 dias e a expressão gênica foi determinada por RTqPCR. O gene da $\beta 2$ -microglobulina foi usado como gene endógeno. Os BDEs 47 e 99 não afetaram a expressão de TIMP-1 em ambas as linhagens B16-F1 e B16-F10. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis (B16F1: $p=0,1794$; B16F10: $p=0,9410$). Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 42 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE TIMP-2 POR RT-qPCR



As células B16-F1 e B16-F10 foram expostas à menor concentração de BDE-47, BDE-99 e da mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) por 15 dias e a expressão gênica foi determinada por RTqPCR. O gene da β 2-microglobulina foi usado como gene endógeno. Os BDEs 47 e 99 não afetaram a expressão de TIMP-2 em ambas as linhagens B16-F1 e B16-F10. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via (B16F1: $p=0,7506$; B16F10: $p=0,8826$).. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

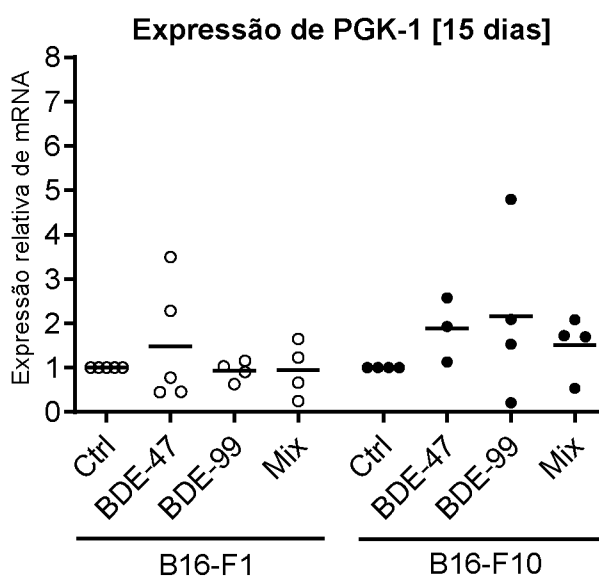
FIGURA 43 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE TIMP-3 POR RT-qPCR



As células B16-F1 e B16-F10 foram expostas à menor concentração de BDE-47, BDE-99 e da mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) por 15 dias e a expressão gênica foi determinada por RT-

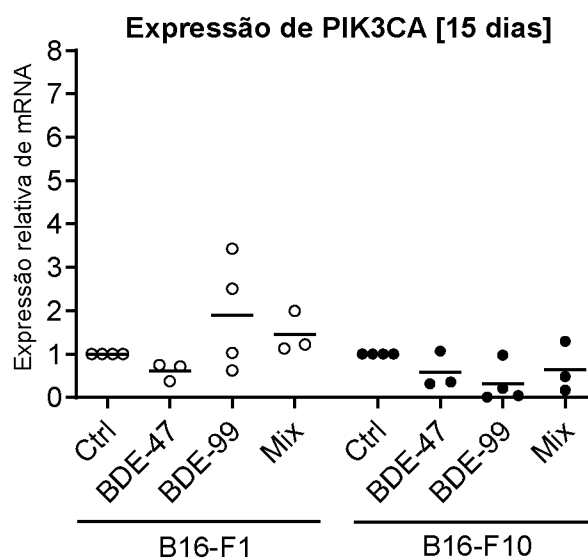
qPCR. O gene da $\beta 2$ -microglobulina foi usado como gene endógeno. O BDE-99 inibiu a expressão do gene TIMP-3 em células B16-F10. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's (B16F1: $p=0,1739$; B16F10: $p=0,0382$).. $*p<0,05$. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 44 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE PGK-1 POR RT-qPCR



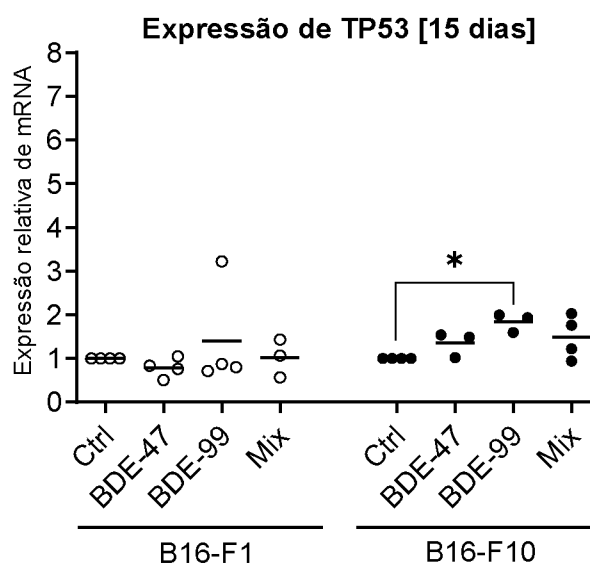
As células B16-F1 e B16-F10 foram expostas à menor concentração de BDE-47, BDE-99 e da mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) por 15 dias e a expressão gênica foi determinada por RTqPCR. O gene da $\beta 2$ -microglobulina foi usado como gene endógeno. Os BDEs 47 e 99 não afetaram a expressão de PGK-1 em ambas as linhagens B16-F1 e B16-F10. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's (B16F1: $p=0,9961$; B16F10: $p=0,2883$).. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 45 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE PIK3CA POR RT-qPCR



As células B16-F1 e B16-F10 foram expostas à menor concentração de BDE-47, BDE-99 e da mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) por 15 dias e a expressão gênica foi determinada por RTqPCR. O gene da $\beta 2$ -microglobulina foi usado como gene endógeno. Os BDEs 47 e 99 não afetaram a expressão de PIK3CA em ambas as linhagens B16-F1 e B16-F10. Média (barra horizontal) e experimentos independentes (pontos). Os dados foram analisados por ANOVA (B16F1: $p=0,1886$) e pelo teste de Kruskal-Wallis (B16F10: $p=0,1376$), dependendo da distribuição. . Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

FIGURA 46 - EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE TP53 POR RT-qPCR



As células B16-F1 e B16-F10 foram expostas à menor concentração de BDE-47, BDE-99 e da mistura (BDE-47 + BDE-99 a 0,01 nM) por 15 dias e a expressão gênica foi determinada por RT-qPCR. O gene da $\beta 2$ -microglobulina foi usado como gene endógeno. A exposição ao BDE-99 induziu

a expressão de TP53 em células B16-F10. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Dunnett's (B16F10: $p=0,0354$) ou pelo teste de Kruskal-Wallis (B16F1: $p=0,6176$), dependendo da distribuição. $*p<0,05$. Pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

5 DISCUSSÃO

Substâncias químicas que não demonstram toxicidade para organismos e linhagens celulares podem ser liberadas para produção e utilização após testes necessários, como testes de toxicidade e ingestão diária (OMS, 2000). No entanto, avaliações mais complexas como capacidade de interferir com a progressão de tumores já estabelecidos, não são consideradas. Mesmo em pesquisas nas áreas de toxicologia ou estudos sobre cânceres, existem pouca investigação sobre a capacidade de substâncias químicas e/ou poluentes ambientais em alterar as características das células tumorais (TAGLIAFERRI *et al.*, 2010; TANG *et al.*, 2018; SALGADO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2019) e a distribuição de metástases (LI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2019; BRITO *et al.*, 2020).

No presente trabalho, concentrações realísticas e baixas de BDE-47 e o BDE-99 e a mistura dos contaminantes não afetaram a viabilidade e proliferação das células de melanoma murino B16-F1 e B16-F10. Este resultado está de acordo com o esperado, já que o objetivo do presente trabalho envolvia a análise de alterações que são relacionadas à progressão de cânceres e um dos parâmetros importantes para células tumorais é desenvolver mecanismos para sobrevivência e escapar da apoptose. A exposição aos contaminantes afetou parâmetros celulares que são relacionados com a resistência à quimioterapia e formação de metástases. Essas alterações estão ligadas diretamente à progressão de cânceres e consequentemente pior prognóstico e menor sobrevida dos pacientes.

O câncer de pele do tipo melanoma, que foi utilizado como modelo tumoral no presente trabalho, é considerado um tumor maligno e agressivo, de modo que substâncias químicas que sejam capazes de alterar ainda mais essas características tornam-se adversárias na luta contra a doença.

O BDE-47 e o BDE-99 não alteraram a viabilidade das células B16, mas a morfologia celular foi alterada em células B16-F1

As células B16-F1 e B16-F10 foram expostas ao BDE-47 e BDE-99 e uma mistura dos contaminantes na menor concentração durante 24 h (exposição aguda) e 15 dias (exposição crônica), sendo a exposição prolongada uma simulação mais

realista da exposição, já que ambos os contaminantes são persistentes no ambiente e apresentam capacidade de bioacumulação (MCDONALD, 2002). Além disso, poderiam ser observados efeitos imediatos causados pela exposição em comparação com efeitos de longo prazo.

As concentrações selecionadas para o presente trabalho foram baseadas nas encontradas em amostras presentes no sangue e em tecidos humanos, e são muito mais baixas do que as concentrações empregadas na maioria dos estudos de toxicidade com diferentes linhagens celulares.

No presente trabalho, o BDE-47 e o BDE-99 e a mistura não foram capazes de diminuir a viabilidade das células B16-F1 e B16-F10 ao longo do tempo de exposição em baixas concentrações, não demonstrando citotoxicidade, sendo este um dado inicial em concordância com o propósito do presente trabalho. Entretanto, em outras linhagens foi relatado toxicidade celular: em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) (LIU *et al.*, 2015; TANG *et al.*, 2018), neuroblastoma murino (Neuro-2a, CHEN *et al.*, 2017) e macrófagos (LY *et al.*, 2015) expostas ao BDE-47 e em células de neuroblastoma humano (SK-N-Mc) expostas ao BDE-99 (TAGLIAFERRI *et al.*, 2010). Porém, a maioria destes estudos utilizou concentrações mais elevadas para verificar estes efeitos. No entanto, o BDE-47 não afetou a viabilidade das células de câncer de mama humano (MCF-7) (WEI *et al.*, 2018). Assim, diferentes linhagens celulares podem responder de formas diferentes aos contaminantes utilizados no presente trabalho.

A ausência de citotoxicidade nos casos de linhagens tumorais como no presente trabalho com células B16 e com a linhagem MCF-7 (WEI *et al.*, 2018) expostas ao BDE sugere que essas células são tolerantes a baixas concentrações desses contaminantes e essa característica poderia auxiliar as células malignas num processo de estabelecimento de tumores, já que pode estar relacionada com mecanismos que permitem evitar o processo de morte celular.

Apesar de não ser observado alterações na viabilidade de células B16-F1 e B16-F10 expostas no presente trabalho, outros parâmetros direcionados para contribuir para a nossa hipótese, importantes para a malignidade e resistência celular foram avaliados.

Primeiramente, vale lembrar que, de acordo com a sua origem e estudos, as células B16-F10 são mais metastáticas do que as células B16-F1, com menor capacidade de gerar metástases pulmonares em camundongos (FIDLER, 1973), de modo que era esperado que as células B16-F1 fossem mais suscetíveis a alterações de parâmetros relacionados à malignidade tumoral, já que a linhagem B16F10 estaria mais próxima de “um limite” destes parâmetros.

A ligeira mudança da morfologia celular observada na concentração mais baixa dos BDEs (exposição de 15 dias, BDE47, BDE-99 e mistura a 0,01 nM) em células B16-F1, indicando um aspecto mais fibroblástico, poderia indicar uma transição epitélio-mesenquimal (EMT), o que é pode estar relacionado com mecanismos de progressão de cânceres e metástases (NIETO *et al.*, 2016).

Qu *et al.* (2015) observaram aumento migração de células de câncer de pulmão A549 e H358 (através do ensaio do scratch) expostas ao metabólito de BDE47 hidroxilado a 10 nM, em função de EMT via AKT / Snail (QU *et al.* 2015). Esses resultados foram acompanhados por alterações morfológicas nas células e confirmado por regulação negativa da expressão de E-caderina e zona occludina-1 (marcadores epiteliais), e regulação positiva de vimentina e N-caderina (marcadores mesenquimais) nas células expostas ao metabólito do BDE-47 (QU *et al.*, 2015). Resultados semelhantes foram relatados para células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expostas ao BDE-47 (aumento da migração e regulação negativa de marcadores epiteliais), bem como aumento da invasão e expressão de MMP-9 via GPER / PI3K / Akt (TIAN *et al.*, 2015) e para células de câncer colorretal (HCT-116) expostas ao BDE-99 (indução de EMT via PI3K / Akt / Snail, aumento da migração celular e invasão transwell (WANG *et al.*, 2015). Entretanto, apesar de a EMT poder ocorrer em casos de câncer, esse processo ainda não é inteiramente compreendido (NIETO *et al.*, 2016).

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram o potencial dos BDEs 47 e 99 em induzir alterações na tanto na expressão gênica, quanto na atividade de características importantes para a resistência e malignidade de células tumorais. Ainda, muitas das alterações observadas ocorreram em células B16-F10 expostas cronicamente ao BDE-47, que foi capaz de promover características de uma linhagem altamente agressiva, podendo representar uma piora no prognóstico

da doença, ainda sem alterações na viabilidade e proliferação, indicando que os contaminantes estudados podem ser capazes de modular uma sub-linhagem celular que já é considerada altamente agressiva.

O efluxo de drogas é aumentado, provavelmente via ABCC2, apenas em células B16-F10 expostas cronicamente a BDE-47

A atividade dos transportadores do sistema MDR, avaliada pelo ensaio da atividade dos transportadores de efluxo de drogas, assim como os níveis de mRNA de ABCC2, aumentaram em células B16-F10 expostas ao BDE-47 por 15 dias, ou seja, esse aumento da atividade dá-se provavelmente por modulação desta via.

O aumento da atividade dos transportadores de efluxo de drogas está relacionado à resistência ao tratamento com drogas quimioterápicas e pode levar a um pior prognóstico da doença (LEVINE *et al.*, 1993; HOUSMAN, *et al.*, 2014). Isto porque um maior efluxo resultaria em um menor acúmulo intracelular de quimioterápicos, diminuindo a toxicidade destas drogas nas células tumorais e consequentemente diminuindo a mortalidade destas.

A expressão de muitos transportadores da superfamília ABC, como ABCB1 (MDR1, glicoproteína P), ABCB5, ABCC1 (proteína associada à resistência a múltiplas drogas-1) e ABCC2 (MRP2 / transportador de ânion orgânico multiespecífico canalicular) pode desempenhar um papel na baixa responsividade do melanoma metastático à quimioterapia. Inclusive, substâncias que são capazes de diminuir a expressão do gene e dos níveis proteicos de ABCC1 são considerados como promissores para o tratamento de cânceres (PASZEL-JAWORSKA *et al.*, 2015).

A MRP2 está envolvida no efluxo de muitas drogas quimioterápicas, como o quimioterápico cisplatina (TANIGUCHI *et al.*, 1996). Em particular, dacarbazina, tamoxifeno e cisplatina são usados para tratar pacientes com melanoma (ICHINASHI E KITAJIMA, 2001). Assim, a superexpressão de MRP2 pelo BDE-47 pode estar tornando células B16-F10 mais resistentes ao tratamento.

Assim como em células de pulmão resistentes à cisplatina (A549/DDP), o gene ABCC2 é superexpresso e causa a diminuição da citotoxicidade do quimioterápico às células tumorais (CHEN *et al.*, 2020). Já o tribromofenol, outro

composto bromado, é capaz de diminuir a atividade dos transportadores de efluxo de drogas em células B16-F1 expostas (via ABCB5 – um gene que não foi verificado no presente trabalho) (SALGADO *et al.*, 2018), indicando que contaminantes ambientais podem ter um papel no aumento da resistência a produtos químicos.

No presente trabalho, as células B16-F10 tiveram a atividade dos transportadores de efluxo de drogas aumentada pela exposição ao BDE-47, no ensaio que avalia a atividade dos transportadores de efluxo de drogas, acompanhado de aumento na expressão gênica de ABCC2, um gene determinante deste parâmetro. Essa alteração está intimamente ligada a maior resistência ao tratamento com quimioterápicos. Já nas células expostas ao BDE-99, não há alteração nesses parâmetros, demonstrando que o mesmo efeito não é observado pela exposição ao outro congênere.

A capacidade de migração celular aumentou em células B16-F10 após 24 h de exposição, porém não houve alterações na invasão celular

A exposição ao BDE-47 e ao BDE-99 aumentou a migração celular na exposição de 24 h, mas não na exposição de 15 dias, conforme verificado pelo ensaio do scratch. Uma maior atividade neste parâmetro tem um papel importante para o espalhamento das células tumorais, causando, eventualmente, metástases. Entretanto este efeito ocorreu de forma aguda (mais imediata), não se mantendo, já que não foi observado na exposição crônica (15 dias de exposição).

Outros trabalhos relataram aumento da migração e invasão celular após a exposição ao BDE-47 (células SH-SY5Y, TIAN *et al.*, 2015), BDE-99 (células HCT116, WANG *et al.*, 2015) e ao metabólito do BDE-47 hidroxilado (células A549 e H358, QU *et al.*, 2015), demonstrando que este é um parâmetro que pode ser modulado em células tumorais expostas à BDEs.

Ainda, diferentes efeitos podem ocorrer de acordo com a concentração utilizada: a exposição de células SK-N-Mc à mistura de BDE-47 e BDE-99 causou efeitos antagônicos (nas maiores concentrações da mistura) e sinérgicos (nas menores concentrações da mistura). Além disso, baixas concentrações de BDE-47 parecem modular os efeitos do BDE-99 (TAGLIAFERRI *et al.*, 2010). Portanto, para Tagliaferri *et al.* (2010), a ação antagônica pode ocorrer devido à saturação dos

mesmos alvos celulares, ocorrendo devido à alta concentração de moléculas tóxicas, o que levanta um argumento sobre as diferentes respostas para este ensaio do presente trabalho.

É importante mencionar que a formação de metástases é um processo altamente complexo e vários tipos de células presentes no microambiente tumoral podem interferir nesse parâmetro. No caso do melanoma, até 30% do conteúdo celular do tumor pode ser composto por macrófagos, que agem secretando proteases, incluindo metaloproteinases de matriz, que degradam a matriz extracelular (YAMAGUCHI *et al.*, 2005), podendo favorecer processos como migração celular e estabelecimento de novos tumores. Ainda, o sistema imunológico também parece ser afetado, uma vez que em macrófagos murinos peritoneais expostos ao BDE-47 ocorre um aumento na taxa de necrose e apoptose (LV *et al.*, 2015). Outros fatores também podem estar envolvidos. Por exemplo, o BDE-47 pode inibir a expressão e a secreção de IL-6 e TNF- α , duas citocinas pró-inflamatórias, que atuam na prevenção do desenvolvimento de tumores, em células THP-1 de monócitos humanos (LONGO *et al.*, 2019). A supressão do sistema imunológico favorece o desenvolvimento de tumores, processos de invasão e metástase. Portanto, é válido cogitar, futuramente, outros ensaios que incluam macrófagos e/ou outros tipos de células presentes no microambiente tumoral e/ou expressão de genes relacionados ao sistema imunológico para melhor investigar esse possível interferente.

Além desses processos, a atividade das metaloproteinases da matriz (MMPs) também é essencial para a invasão tumoral e metástase (MONDAL *et al.* 2020). No presente trabalho, houve aumento da expressão de MMP-9 em células B16-F10 expostas ao BDE-99 e à mistura dos BDEs 47 e 99.

Ao degradar moléculas de matriz extracelular como agrecan, colágenos de membrana basal e colágeno não fibrilar (Tipo IV, V, VII, X e XIV), gelatina, laminina etc, a MMP-9 tem um papel chave no processo de invasão e formação de metástase (MONDAL *et al.* 2020). A MMP-9 também está relacionada a alterações no sistema imunológico, causando clivagem da interleucina-2a (IL-2a), liberação da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e ativação do fator de crescimento transformante

beta (TGF- β) (BJORKLUND E KOIVUNEN, 2006; MONDAL *et al.* 2020), piorando o prognóstico de cânceres.

Os inibidores de metaloproteínases (TIMPS) regulam a atividade das MMPs. Especificamente a MMP-9 é regulada pelo TIMP-1, que pode impedir sua ativação (MONDAL *et al.* 2020). Em xenoenxertos de tumor em camundongos, o aumento de TIMP-3 é capaz de reduzir a tumorigenicidade ao diminuir a angiogênese e a infiltração de macrófagos (ANANIA *et al.* 2011). O aumento da expressão de MMP-9 não seguido de alterações em TIMP-1 sugere que a via de controle pode estar comprometida pela exposição de células B16-F10 ao BDE-99 e a mistura, ainda, há diminuição da expressão de TIMP-3 após a exposição ao BDE-99 em 15 dias de exposição, com o desbalanço entre essas moléculas, pode ocorrer a degradação da matriz extracelular, estimulando processos de migração e invasão in vivo.

Não é a toa que a regulação de genes como MMP-9 e TIMP-3 é muito relevante para processos tumorais, de modo que ambos os genes são considerados atuais alvos terapêuticos para tratamentos de tumores (MEHNER *et al.*, 2014; SU *et al.*, 2019).

A expressão do gene RECK aumentou após a exposição à mistura do BDE 47 e 99, indo num sentido oposto da hipótese do presente trabalho. O RECK é um gene de supressão tumoral, portanto seu aumento pode estar relacionado com sistemas de defesa celulares visando suprimir parâmetros tumorais.

Para a mistura de BDE-47 e BDE-99, houve diminuição da migração das células B16-F10 aos 15 dias de exposição, o que pode estar associado com este aumento de 4 vezes na expressão de RECK, demonstrando um efeito sinérgico causado pela mistura de dois congêneres de BDE, e reforçando a importância de também realizar ensaios com substâncias em conjunto.

Ainda, o gene RECK pode inibir a secreção e o processamento de pró-MMP9, bem como a atividade catalítica de MMP-2, -9 e -14 (OH *et al.* 2001, TAKAHASHI *et al.* 1998), diminuindo assim a migração celular. A superexpressão de RECK também diminui a invasão e migração celular ao ativar vias de sinalização relacionadas ao p53 em células de câncer cervical (HELA and C33A) (LIU *et al.*, 2018). Portanto, o aumento na expressão de RECK no presente trabalho não é um dado que corrobora a hipótese inicial para a mistura. Essa diminuição também é acompanhada pelo

gene p53 em células expostas ao BDE-99, o que pode sugerir conexão entre essas modulações, assim como observado por Liu *et al.* (2018). Portanto, verifica-se no presente trabalho importantes dados sobre a modulação gênica causada pela exposição ao BDE 47 e 99.

A formação de colônias aumentou após a exposição de células B16-F10 ao BDE-47 e à mistura

A formação de colônias em substrato sólido (ensaio clonogênico 2D) envolve a sobrevivência celular em baixa densidade e proliferação. No presente trabalho, para a mistura dos contaminantes, as células tendem a migrar menos (pelo ensaio do scratch), mas formam colônias maiores (ensaio clonogênico) em 15 dias de exposição.

Assim como verificado em outros trabalhos que relataram um maior número de colônias para células HepG2 expostas ao BDE-47 (WANG *et al.*, 2012) e células epiteliais brônquicas humanas (16HBE) expostas a BDE-47 e BDE-99 (MONTALBANO *et al.* 2020), além de aumento da viabilidade e proliferação celular em células MCF-7, HeLa, OVCAR-3 e CHO expostas ao BDE-209, um congênere que contém mais bromos em sua composição (LI *et al.*, 2012).

Este efeito pode ser devido principalmente à presença do BDE-47 na mistura, visto que também se observou aumento da área de ocupação do poço pelas colônias na mesma concentração do contaminante isolado. Isto demonstra que a presença deste contaminante pode ser suficiente para este efeito se sobrepôr no grupo de mistura dos contaminantes, já que este efeito não ocorre com a exposição ao BDE-99.

Embora o ensaio clonogênico 2D apoie a hipótese de aumento da malignidade das células após a exposição ao BDE 47 e 99, os contaminantes não afetaram a formação de colônias em suspensão de ágar (ensaio clonogênico 3D), que se aproxima mais de um microambiente in vivo.

A exposição ao BDE afetou a expressão de alguns genes relacionados com agressividade tumoral, principalmente em células B16-F10

O aumento da expressão dos genes ABCC2, MMP-9, TP53 e diminuição de TIMP-3 estão relacionados com resistência e malignidade tumoral, porém, apesar dessa modulação, outros fatores e mecanismos pós-transcricionais podem estar envolvidos. A síntese proteica não foi avaliada no presente trabalho, visto que se trata de um trabalho inicial de levantamento de efeitos causados pelo BDE 47 e 99 no contexto do câncer. Para trabalhos futuros ou *in vivo*, essas análises podem ser úteis para verificar melhor o papel das vias envolvidas.

O gene ABCC2 está envolvido com o efluxo de drogas e consequentemente resistência a quimioterápicos e já foi previamente mencionado. Vários tipos de cânceres apresentam alterações na expressão deste gene, como na síndrome de Dubin-Johnson, câncer de cabeça e pescoço, glioblastoma, câncer de mama (GILHAM *et al.*, 2012) e câncer de pulmão (CHEN *et al.*, 2020), e ele codifica um transportador de efluxo de drogas da superfamília ABC.

A MMP-9 e um de seus inibidores, o TIMP-3, também já mencionados anteriormente, tiveram efeitos opostos na migração e invasão celular: o gene supressor de tumor TP53 codifica para a proteína p53, que é capaz de promover a parada do ciclo celular para permitir o reparo ao DNA ou apoptose para prevenir a sobrevivência e proliferação de células com danos graves no DNA (OZAKI E NAKAGAWARA, 2011). Portanto, a indução de TP53 em células B16F10 expostas a BDE-99 pode estar ocorrendo em função de danos ao DNA causados pela exposição. Montalbano *et al.* (2020) relataram que o BDE-47 e o BDE-99 provocaram danos ao DNA (através da avaliação pelo ensaio Cometa), bem como aumento da fosforilação de H2AX, um marcador de recrutamento de um sistema de reparo de DNA, em células 16HBE.

Com o aumento da expressão de p53, pode ocorrer o aumento da resistência das células tumorais a agentes que danificam o DNA, como, por exemplo, quimioterápicos. Por este motivo que alguns medicamentos quimioterápicos, como a dacarbazina (utilizada no tratamento de melanoma), são usados em altas concentrações, a fim de induzir danos extensos. Porém, o gene TP53 é mutado, em mais de 50% dos cânceres humanos, produzindo proteínas p53 não funcionais (OZAKI E NAKAGAWARA, 2011), podendo causar também resistência à morte

celular invasão, migração, proliferação e consequentemente metástases (MULLER; VOUSDEN, 2013).

Outros estudos demonstraram modulações do fenótipo de células tumorais por BDEs. Zhang *et al.* (2019) relataram que o BDE-47 aumentou o fenótipo invasivo de células de carcinoma endometrial estrógeno-dependente (Ishikawa e HEC-1B) através das vias de sinalização ER α / GPR30 e EGFR / ERK, aumentando o tamanho dos tumores e as metástases em camundongos injetados com células previamente expostas ao BDE-47. As células expostas ao BDE-47 também se tornaram mais resistentes ao tratamento com cisplatina e paclitaxel (quimioterápicos utilizados no tratamento do melanoma) in vitro (ZHANG *et al.* 2019). E Brito *et al.* (2020) relataram aumento da incidência de metástases em diferentes órgãos de camundongos após a injeção de células B16-F10 expostas ao BDE-209. A expressão dos genes relatados também está relacionada com alterações em processos biológicos em células B16-F10, como na migração celular, verificado pelo ensaio do scratch e metástase, através do ensaio de formação de colônias. Esses argumentos concordam com a nossa hipótese.

O presente trabalho apresenta argumentos que devem ser considerados em relação a capacidade do BDE 47 e 99 modularem parâmetros em células tumorais B16-F10. Desta forma, os questionamentos e resultados presentes no presente trabalho são pertinentes e indicam, ao menos parcialmente, que a exposição ao BDE-47, BDE-99 e uma mistura são capazes de alterar características fenotípicas e moleculares de células de melanoma murino B16-F1 e B16-F10, tornando-as mais resistentes, agressivas e metastáticas. Esses efeitos podem ser condizentes com um quadro mais grave, de piora do prognóstico de pacientes com cânceres já estabelecidos, caso ocorram numa situação in vivo de exposição.

Desse modo, este estudo infere um aumento em relação à preocupação com a poluição e necessidade de legislação ambiental mais cuidadosa para compostos químicos, já que é demonstrado o risco potencial destes estarem presentes no ar, na água, nos alimentos, somados aos indícios de serem capazes de modular características fenotípicas de células tumorais, com potenciais efeitos prejudiciais tanto nos tratamentos, quanto no prognóstico de pacientes acometidos com câncer.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através da presente pesquisa estão relacionados com a hipótese de uma situação de maior malignidade tumoral e formação de metástases em função da exposição prévia dos BDEs. Essas alterações se suportam em função dos efeitos biológicos verificados após a exposição ao BDE nas células B16-F10, que parecem mais suscetíveis aos efeitos do BDE-47 e BDE-99 do que células B16-F1. No geral, os efeitos do BDE-47 e do BDE-99 diferem, destacando a divergência de efeitos entre os congêneres, provavelmente em função de diferenças estruturais das moléculas, o que pode influenciar na forma de interação das mesmas no sistema biológico.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Precedentes trabalhos científicos compatíveis com o presente trabalho já propunham que diferentes congêneres de BDE podem causar efeitos distintos após a exposição em linhagens celulares. Os efeitos podem ser variáveis de acordo com o congênere, concentração e linhagem selecionada para o trabalho. Contudo, eventualmente não havia disponível na literatura uma correlação entre concentrações realísticas - considerando dados de exposição humana - e as concentrações empregadas.

Fundamentado nos resultados primários obtidos pelo presente trabalho, diante disso sugere-se seriamente que ocorra a ampliação das investigações a cerca dos efeitos da exposição do BDE47, BDE-99, outros congêneres e possíveis misturas em concentrações factíveis, considerando exposições ambientais e humanas.

Do mesmo modo, estudos subsequentes envolvendo a investigação dos efeitos da exposição de contaminantes ambientais emergentes, especialmente aqueles com propriedades comparáveis à contaminantes da classe BDE, linhagens tumorais são considerados necessários e relevantes para o tema.

Ensaio que podem ser considerados para a novos desdobramentos do presente trabalho, são ensaios para validar a expressão das proteínas, como *Western blot*, além de ensaios *in vivo* demonstram um segundo e importante passo para a confirmação dos dados já obtidos *in vitro*. Portanto, após evidências suficientes, estudos de exposição *in vivo* podem ser considerados.

A intenção desta pesquisa também envolve alertar as instituições governamentais e reguladoras sobre produção, uso e descarte dessas substâncias, bem como levantar preocupações acerca destes fatores para substâncias químicas produzidas futuramente. Espera-se fornecer argumentos para legisladores determinarem novas leis ou regras ambientais, com o objetivo de proteger tanto a população humana quanto o meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN CANCER SOCIETY, Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/melanoma-skin-cancer-stages.html> acesso em 10/03/2021.
- ANANIA, M. C.; SENSI, M.; RADAELLI, E.; MIRANDA, C.; VIZIOLI, M. G.; PAGLIARDINI, S.; FAVINI, E.; CLERIS, L.; SUPINO, R.; FORMELLI, F.; BORRELLO, M. G.; PIEROTTI, M. A.; GRECO, A. TIMP-3 regulates migration, invasion and *in vivo* tumorigenicity of thyroid tumor cells. *Oncogene*, v. 30, n. 27, p. 3011-3023, 2011.
- BAUDOUIN, C.; CHARVERON, M.; TARROUX, R.; GALL, Y. Environmental pollutants and skin cancer. *Cell biology and toxicology*, v. 18, n. 5, p. 341-348, 2002.
- BISSEL, M. Soft Agar Assay for Colony Formation. Bissel Lab, Disponível em: <www2.lbl.gov> Access in July 2018.
- BJORKLUND, M.; KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1755 (2006) 37e69.
- BOFFETTA, P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 608, n. 2, p. 157-162, 2006.
- BRITO, P. M.; BISCAIA, S. M. P.; DE SOUZA, T. L.; RAMOS, A. B.; LEÃO-BUCHIR, J.; DE ALMEIDA ROQUE, A.; DE LIMA BELLAN, D.; DA SILVA TRINDADE, E.; FILIPAK NETO, F.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Oral exposure to BDE-209 modulates metastatic spread of melanoma in C57BL/6 mice inoculated with B16–F10 cells. *Chemosphere*, vol. 260, 127556, 2020.
- CHEN, H.; TANG, X. ZHOU, B.; XU, N.; ZHOU, Z.; FANG, K.; WANG, Y. BDE-47 and BDE-209 inhibit proliferation of Neuro-2a cells via inducing G1-phase arrest. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 50, p. 76-82, 2017.
- CHEN, Y.; ZHOU, H.; YANG, S.; SU, D. Increased ABCC2 expression predicts cisplatin resistance in non-small cell lung cancer. *Cell Biochemistry and Function*, 2020.
- CHEUNG, K. C.; ZHENG, J. S.; LEUNG, H. M.; WONG, M. H. Exposure to polybrominated diphenyl ethers associated with consumption of marine and freshwater fish in Hong Kong. *Chemosphere*, vol. 70, p. 1707-1720, 2008.
- CHIN, L; GARRAWAY, L. A.; FISHER, D. E. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes & development*, v. 20, n. 16, p. 2149-2182, 2006.
- DANCIU, C.; FALAMAS, A.; DEHELAN, C.; SOICA, C.; RADEKE, H.; BARBU-TUDORAN, 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.

DEBBIE, M.; BROOKS, S. A.; *in vitro* invasion assay using Matrigel®. Metastasis Research Protocol, vol. 58 p. 61-70, 2001.

DEEPAK, S. A.; KOTTAPALLI, K. R.; RAKWAL, R.; OROS, G.; RANGAPPA, K. S.; IWAHASHI, H.; MASUO, Y.; AGRAWAL, G. K. Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. Current genomics, vol. 8, n. 4, p. 234-251, 2007.

DE WIT, C. A.; An overview of brominated flame retardants in the environment. Chemosphere, vol. 46, p. 583-624, 2002.

FERNANDEZ, M. F.; ARAQUE, P.; KIVIRANTA, H.; MOLINA-MOLINA, J. M.; RANTAKOKKO, P.; LAINE, O.; VARTIAINEM, T.; OLEA, N. PBDEs and PBBs in the adipose tissue of woman from Spain. Chemosphere, vol. 66 p. 377-383, 2007.

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. Selection of successive tumor lines for metastasis. Nature, v. 242 p.148-149, 1973.

FRANKEN, N. A.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J., VAN BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. Nature Protocols. v. 1, n. 5, p.2315-2319, 2006.

FREDERIKSEN, M.; THONSEN, C.; FROSHAUG, M.; VORKAMP, K.; THOMSEN, M.; BECHER, G.; KNUDSEN, L. E.; Polybrominated diphenyl ethers in paired samples of maternal and umbilical cord blood plasma and associations with house dust in a Danish cohort. International Journal of Hygiene and Environmental Health, vol. 213 p.233-242, 2010.

GILHAM, D. E.; DEBETS, R.; PULE, M.; HAWKINS, R. E.; ABKEN, H. CAR-T cells and solid tumors: tuning T cells to challenge an inveterate foe. Trends in Molecular Medicine, vol. 18 n. 7 p. 377-384, 2012.

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.

GORDON, Randy. Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. In: Seminars in oncology nursing. WB Saunders. p. 160-169, 2013.

GRAY-SHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and the new target therapy. Nature, vol. 445 p. 851-857, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, vol. 144 p. 646-674, 2011.

HOFFMANN, U; KROEMER, H. K. The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance. *Drug metabolism reviews*, v. 36, n. 3-4, p. 669-701, 2004.

HOUSMAN, G.; BYLER, S.; HEERBOTH, S.; LAPINSKA, K.; LONGACRE, M.; SNYDER, N.; SARKAR, S. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers*. vol. 6 n. 3, p. 1769-1792, 2014.

IARC, International Agency for Research on Cancer - Global Cancer Observatory. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 20 dez. 2020.

IARC- International Agency of Research on Cancer. IARC Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans. Polychlorinated and polybrominated biphenyls, vol. 107 Lyon, 2013.

ICHINASHI, N.; KITAJIMA, Y. Chemotherapy induces or increases expression of multidrug resistance- associated protein in malignant melanoma cells. *British Journal of Dermatology*. v. 144 n. 4 p. 745-750, 2001.

INCA¹ – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Câncer de pele não melanoma. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-nao-melanoma> acesso em 20/01/2021.

INCA² – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Câncer de pele melanoma. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma> acesso em 20/01/2021.

Instrução normativa Nº 01, DE 19 DE JANEIRO DE 2010 Disponível em: <http://www.comprasnet.gov.br/legislacao/legislacaoDetalhe.asp?ctdCod=295> acesso em 10/01/2021.

INDRAN, I. R.; GRÉGOR, 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.

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.

KALOW, W. Pharmacogenetics and personalised medicine. Fundamental & clinical pharmacology, v. 16, n. 5, p. 337-342, 2002.

LAW, R. J.; COVACI, A.; HARRAD, S.; HERZKE, D.; ABDALLAH, M. A. E.; FERNIE, K.; TOMS, L. M. L.; TAKIGAMI, H. Levels and trends of PBDEs and HBCDs in the global environment: Status at the end of 2012. Environment International, vol. 65 p. 147-158, 2014.

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.

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.

LIU, P.; ZHAO, Y.; ZHU, Y.; QIN, Z.; RUAN, X.; ZHANG, Y.; CHEN, B.; LI, Y.; YAN, S.; QIN, X.; FU, S.; XU, X. Determination of polybrominated diphenyl ethers in human semen. Environment International, vol. 42 p. 132-137, 2012.

LIU, X.; WANG, J.; LU, C.; ZHU, C.; QIAN, 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, Y.; LI, L.; LIU, Y.; GENG, P.; LI, G.; YANG, Y.; & SONG, H.; RECK inhibits cervical cancer cell migration and invasion by promoting p53 signaling pathway. Journal of cellular biochemistry, v. 119, n. 4, p. 3058-3066, 2018.

LONGO, V.; LONGO, A.; DI SANO, C.; CIGNA, D.; CIBELLA, F.; DI FELICE, G.; COLOMBO, P. *in vitro* exposure to 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) impairs innate inflammatory response. Chemosphere, v. 219, p. 845-854, 2019.

LV, Q.; WAN, B.; GUO, L.; ZHAO, L.; YANG, Y. *in vitro* immune toxicity of polybrominated diphenyl ethers on murine peritoneal macrophages: Apoptosis and immune cell dysfunction. Chemosphere, vol. 120 p. 621-630, 2015.

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.

MCDONALD, T. A. A perspective on the potential health risks of PBDEs. Chemosphere, vol. 46 p. 745-755, 2002.

MEHNER, C.; HOCKLA, A.; MILLER, E.; RAN, S.; RADISKY, D. C.; RADISKY, E. S. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. *Oncotarget*, v. 5, n. 9, p. 2736, 2014.

MILLER, A. J.; MIHN M. C. J. Mechanisms of Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, vol. 355 p. 51-65, 2006.

MOCELLIN, S.; ROSSI, C. R.; PILATI, P.; NITTI, D.; MARINCOLA, F. M. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends in molecular medicine*, v. 9, n. 5, p. 189-195, 2003.

MONDAL, S., ADHIKARI, N., BANERJEE, S., AMIN, S.A., JHA, T. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its inhibitors in cancer: A minireview. *Eur J Med Chem*. 2020 May 15;194:112260. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112260

MONTALBANO, A.M., ALBANO, G.D., ANZALONE, G., MOSCATO, M., GAGLIARDO, R., DI SANO, C., BONANNO, A., RUGGIERI, S., CIBELLA, F., PROFITA, M. Cytotoxic and genotoxic effects of the flame retardants (PBDE-47, PBDE-99 and PBDE209) in human bronchial epithelial cells. *Chemosphere*. 2020 Apr;245:125600. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125600.

NCBI - NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Gene. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> acesso em 07/02/2021.

NIETO, M. A.; HUANG, R. Y. J.; JACKSON, R. A.; THIERY, J. P. EMT: 2016. *Cell*, v. 166, n. 1, p. 21-45, 2016.

OH, J., TAKAHASHI, R., KONDO, S., MIZOGUCHI, A., ADACHI, E., SASAHARA, R. M., NISHIMURA, S., IMAMURA, Y., KITAYAMA, H., ALEXANDER, D. B., IDE, C., HORAN, T.P., ARAKAWA, T., YOSHIDA, H., NISHIKAWA, S. I., ITOH, Y., SEIKI, M., ITOHARA, S., TAKAHASHI, C., NODA, M. M. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 107, 789–800, 2001.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Substâncias químicas perigosas à saúde e ao ambiente. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2008.

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde. Câncer. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer> acesso em 21/12/2020.

OZAKI, T, NAKAGAWARA, A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)*. 2011;3(1):994-1013. Published 2011 Mar 3. doi:10.3390/cancers3010994

PASZEL-JAWORSKA, A.; RUBIS, B.; BEDNARCZYK-CWYNAR, B.; ZAPRUTKO, L.; RYBCZYŃSKA, M. Proapoptotic activity and ABCC1-related multidrug resistance reduction ability of semisynthetic oleanolic acid derivatives DIOXOL and HIMOXOL in human acute promyelocytic leukemia cells. *Chemico-biological interactions*, v. 242, p. 1-12, 2015.

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.

PERSIDIS, A. Cancer multidrug resistance. *Nature Biotechnology*, vol. 17, p. 94-95, 1999.

PROJETO DE LEI DO SENADO n° 173, de 2009. Disponível em: <https://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-/materia/90884> acesso em 10/01/2021.

PUBCHEM - 2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_2_4_4_-Tetrabromodiphenyl-ether acesso em 22/01/2021.

PUBCHEM - 2,2',4,4',5-Pentabromodiphenyl ether. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_2_4_4-tribromo-5-_2_4_-dibromophenoxy_benzene acesso em 22/01/2021.

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.

QU, B. L.; YU, W.; HUANG, Y. R.; CAI, B. N.; DU, L. H.; LIU, F. 6-OH-BDE-47 promotes human lung cancer cells epithelial mesenchymal transition via the AKT/Snail signal pathway. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 39, n. 1, p. 271-279, 2015.

SALGADO, Y. C. S.; BOIA-FERREIRA, M.; ZABLOCKI DA LUZ, J.; FILIPAK NETO, F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Tribromophenol affects the metabolism, proliferation, migration and multidrug resistance transporters activity of murine melanoma cells B16F1. *Toxicology in vitro*, vol. 50, p. 40-46, 2018.

SHI, Z.; JIAO, Y.; HU, Y.; SUN, Z.; ZHOU, X.; FENG, J.; LI, J.; WU, Y. Levels of tetrabromobisphenol A, hexabromocyclododecanes and polybrominated diphenyl ethers in human milk from the general population in Beijing, China. *Science of The Total Environment*, vol. 452–453, p. 10-18, 2013.

SIMÕES, M. F.; SOUSA, J. S.; PAIS, A. C. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer letters*, v. 357, n. 1, p. 8-42, 2015.

SJODIN, A.; PATTERSON, D. G.; BERGMAN, A. A review on human exposure to brominated flame retardants—particularly polybrominated diphenyl ethers. *Environmental International*, vol. 29 p. 829-839, 2003.

SU, C. W.; LIN, C. W.; YANG, W. E.; YANG, S. F. TIMP-3 as a therapeutic target for cancer. *Therapeutic advances in medical oncology*, v. 11, p. 1758835919864247, 2019.

TAGLIAFERRI, S.; CAGLIERI, A.; GOLDONI, M.; PINELLI, S.; ALINOV, 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.

TAKAHASHI, C.; SHENG, Z.; HORAN, T.P.; KITAYAMA, H.; MAKI, M.; HITOMI, K.; KITAURA, Y.; TAKAI, S.; SASAHARA, R.M.; HORIMOTO, A.; IKAWA, Y.; RATZKIN, B.J.; ARAKAWA, T.; NODA, M. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Oct 27;95(22):13221-6. doi: 10.1073/pnas.95.22.13221.

TANG, L.; TRON, A. V.; REED, J. C.; MAH, K. J.; KRAJEWSKA, M.; LI, G.; ZHOU, X.; HO, V. C.; TROTTER, M. J. Expression of Apoptosis Regulators in Cutaneous Malignant Melanoma. *Clinical Cancer Research*, vol. 4 p. 1865-1871, 1998.

TANG, S.; LIU, H.; YIN, H.; LIU, H.; PENG, H.; LU, G.; DANG, Z.; HE, C. Effect of 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) and its metabolites on cell viability, oxidative stress, and apoptosis of HepG2. *Chemosphere*, vol. 193 p. 978-988, 2018.

TANIGUCHI, K.; WADA, M.; KOHNO, K.; NAKAMURA, T.; KAWABE, T.; KAWAKAMI, M.; KAGOTANI, K.; OKOMURA, K.; AKIYAMA, S.; KUWANO, M. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Research*, v. 56, n. 18, p. 4124-4129, 1996.

TIAN, P. C.; WANG, H.L.; CHEN, G.H.; LUO, Q.; CHEN, Z.; WANG, Y.; LIU, Y. F. 2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether promotes human neuroblastoma SH-SY5Y cells migration via the GPER/PI3K/Akt signal pathway. *Hum Exp Toxicol*. 2016 Feb;35(2):124-34. doi: 10.1177/0960327115578974.

TENTORI L.; LACAL P. M.; GRAZIANI G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 34 n° 12, 2013.

VAN'T VEER, L. J.; DAI, H.; VAN DE VIJVER, M. J.; HE, Y. D.; HART, A. A. M.; PETERSE, M. M. H. L.; DER VAN DER KOOY, K.; MARTON, M. J.; WITTEVEEN, A. T.; SCHREIBER, G. J.; KERKHOVEN, R. M.; ROBERTS, C.; LINDSEY, P. S.; BERNARDS, R.; FRIEND, S. H. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *nature*, v. 415, n. 6871, p. 530-536, 2002.

WANG, J.; WANG, Y.; SHI, Z.; ZHOU, X.; SUN, Z.; Legacy and novel brominated flame retardants in indoor dust from Beijing, China: Occurrence, human exposure assessment and evidence for PBDEs replacement. *Science of The Total Environment*, vol. 618 p. 48-59, 2018.

WANG, F., RUAN, X.J, ZHANG, H.Y. BDE-99 (2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether) triggers epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells via PI3K/Akt/Snail signaling pathway. *Tumori*. 2015 Mar-Apr;101(2):238-45. doi: 10.5301/tj.5000229.

WEI, J.; XIANG, L.; YUAN, Z.; LI, S.; YANG, C.; LIU, H.; JIANG, Y.; CAI, Z. Metabolic profiling on the effect of 2,20,4,40-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in MCF-7 cells. *Chemosphere*, vol. 192 p. 297-304, 2018.

WILKES, G. M.; BARTON-BURKE, M. 2015 *Oncology Nursing Drug Handbook*. 19ª 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, S.; POWERS, S.; ZHU, W.; HANNUN, Y. A. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. *Nature*. v. 529, n. 7584, p. 43-47, 2016

YAMAGUCHI, H.; WYCKOFF, J.; CONDEELIS, J. Cell migration in tumors. *Current Opinion in Cell Biology*. Vol. 17 n. 5 p. 559-564, 2005.

YIP, K. W.; REED, J. C. Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* vol. 27 p. 6398-6406, 2008.

ZHANG, L.; ZHOU, W.; VELCULESCU, V. E.; KERN, S. E.; HRUBAN, R. H.; HAMILTON, S. R.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science*, v. 276, n. 5316, p. 1268-1272, 1997.

ZHANG, F., PENG, L., HUANG, Y., LIN, X., ZHOU, L., CHEN, J. Chronic BDE-47 Exposure Aggravates Malignant Phenotypes and Chemoresistance by Activating ERK Through ER α and GPR30 in Endometrial Carcinoma. *Front Oncol*. 2019 Oct 31;9:1079. doi: 10.3389/fonc.2019.01079