

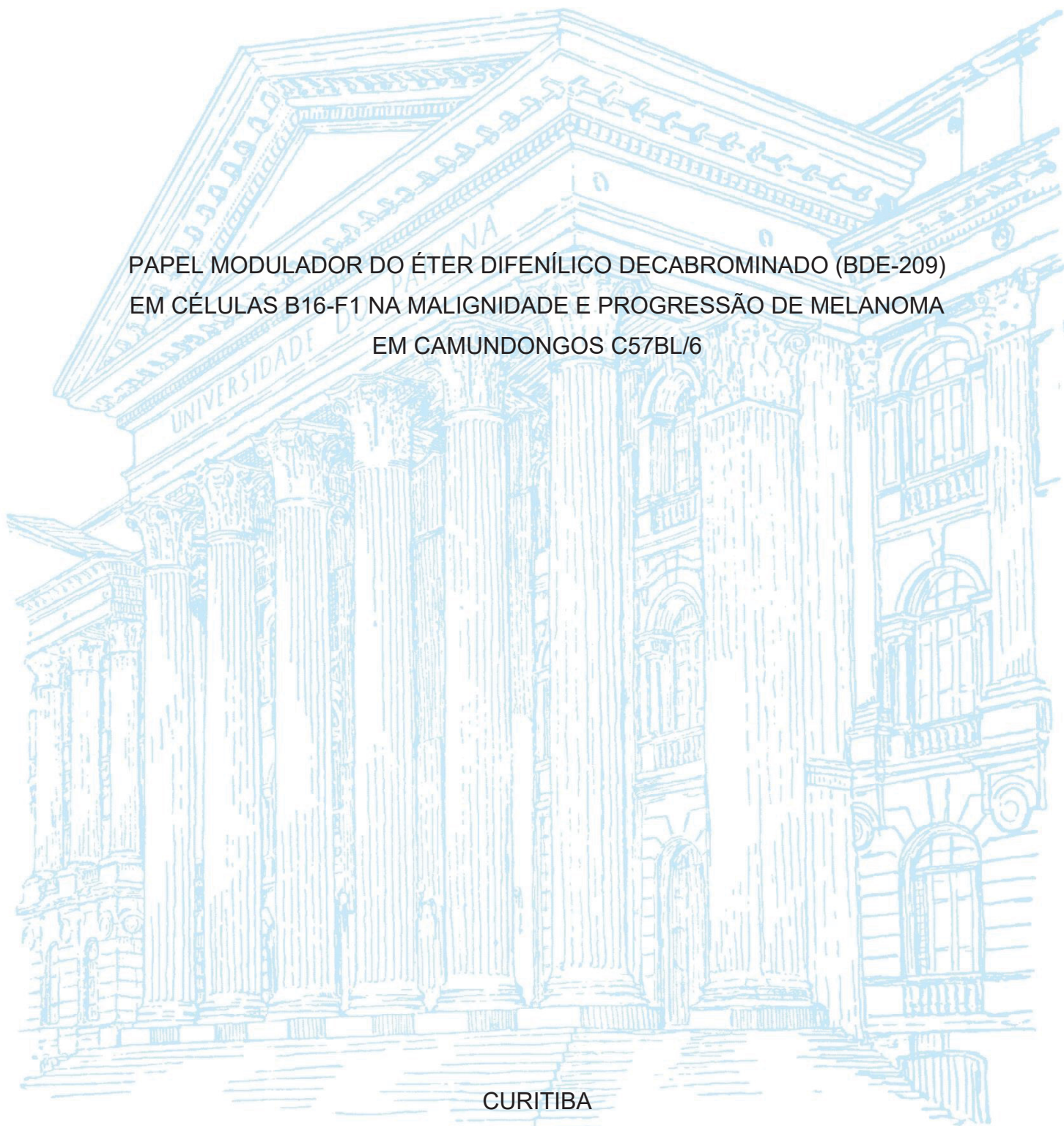
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELI DE MARCHI

PAPEL MODULADOR DO ÉTER DIFENÍLICO DECABROMINADO (BDE-209)
EM CÉLULAS B16-F1 NA MALIGNIDADE E PROGRESSÃO DE MELANOMA
EM CAMUNDONGOS C57BL/6

CURITIBA

2023



MICHELI DE MARCHI

PAPEL MODULADOR DO ÉTER DIFENÍLICO DECABROMINADO (BDE-209)
EM CÉLULAS B16-F1 NA MALIGNIDADE E PROGRESSÃO DE MELANOMA
EM CAMUNDONGOS C57BL/6

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

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

CURITIBA

2023

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

Marchi, Micheli de

Papel modular do éter difenílico decabrominado (BDE-209) em células B16-F1 na malignidade e progressão de melanoma em camundongos C57BL/6 / Micheli de Marchi. – Curitiba, 2023.

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. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro.

1. Poluentes orgânicos persistentes. 2. Melanoma. 3. Progressão tumoral. I. Ribeiro, Ciro Alberto de Oliveira, 1960. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. III. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MICHELI DE MARCHI** intitulada: **PAPEL MODULADOR DO ÉTER DIFENÍLICO DECABROMINADO (BDE-209) EM CÉLULAS B16-F1 NA MALIGNIDADE E PROGRESSÃO DE MELANOMA EM CAMUNDONGOS C57BL/6**, sob orientação do Prof. Dr. CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora 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, 19 de Outubro de 2023.

Assinatura Eletrônica

25/10/2023 10:46:17.0

CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

11/12/2023 17:16:06.0

BENISIO FERREIRA DA SILVA FILHO
Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO UNINTER)

Assinatura Eletrônica

25/10/2023 14:00:51.0

EDVALDO DA SILVA TRINDADE
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/12/2023 10:46:19.0

ANDRÉA RODRIGUES ÁVILA
Avaliador Interno (ICC-FIOCRUZ)

Assinatura Eletrônica

31/10/2023 10:34:02.0

GLAUCIO VALDAMERI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico este trabalho:

Ao meu avô, Luiz Nerci dos Santos (*In Memoriam*)

Ao meu pai, Adair de Marchi

À minha mãe, Márcia R. S. de Marchi

Ao meu irmão, Luan Michel de Marchi

Ao meu esposo, Bruno Cougo Kowalczuk

AGRADECIMENTOS

À Deus por abençoar e permitir a realização desse ciclo importante em minha vida. Por me conceder forças, coragem, bom ânimo e sua paz que excede todo entendimento, durante os momentos difíceis. “Pois dEle, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória para sempre! Amém.” Romanos 11:36.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, primeiramente, por aceitar ser meu orientador e abrir as portas do Grupo de Pesquisa de Toxicologia Celular. Meus sinceros agradecimentos pelo suporte acadêmico, paciência, ajuda, sabedoria, conselhos e oportunidades. Agradeço por todos os ensinamentos transmitidos, durante mais de 6 anos de orientação, sendo para mim uma referência de ética, dedicação e conduta na pesquisa e ensino.

Ao Prof. Dr. Francisco Filipak Neto por todo conhecimento transmitido, ajuda e sabedoria, sendo para mim uma referência de professor e pesquisador.

Ao Dr. Claudemir Souza pelo conhecimento compartilhado, paciência, conselhos, palavras de apoio e confiança em mim depositada, sendo para mim um grande exemplo de profissional e ser humano.

Aos demais professores do Grupo de Pesquisa em Toxicologia Celular, Maritana, Claudia e Marco pela dedicação e conhecimento transmitido; A todos os professores do PPG de Biologia Celular e Molecular e também de outros departamentos pelo conhecimento transmitido, pelo auxílio e empréstimo de equipamentos, materiais e reagentes, em especial aos professores Luiza, Sheila, Andrea, Silvio, Marcel, Célia, Glaucio, Magda, Lucélia, Fernanda, Luiz Fernando e Zanata; Ao Lucas, secretário de PPG em Biologia Celular e Molecular, pelo suporte com os trâmites burocráticos;

Aos professores que contribuíram com a minha formação ao longo dos anos.

Aos meus amigos e colegas do Grupo de Pesquisa de Toxicologia Celular Jessica, Roberta, Camila, Aliciane, Fernanda, Gisleine, Patrícia, Mariliza, Melissa, Joelma, Ana Paula, Luiza, Amanda, Benisio, Tugstênio, Yuri, Dámaso, Tobias pela apoio acadêmico, conselhos e momentos de descontração que tornaram essa jornada mais agradável; em especial, ao meu amigo e colega,

Erick Laurent Moggio por toda ajuda no desenvolvimento do estudo, pelos conselhos, palavras de conforto, apoio, piadas ruins, momentos de descontração e café ao longo desses 6 anos de trabalho.

Aos colegas de outros Laboratórios da UFPR ou do Instituto Carlos Chagas (ICC) Izadora, Stellee, Hulyanna, Daniel, Antonella, Zelinda, Pedro, Hanna, João, Matheus, Fernando, pela ajuda, conhecimento transmitido e momentos de descontração.

Ao Centro de Tecnologias Avançadas de Fluorescência (CTAF) UFPR e ao Israel Bini pela ajuda na manipulação dos equipamentos e aquisição de imagens.

Aos colaboradores, em especial ao Marcel, Andréa, Michel, Hulyanna, Sandra e Silvana pelo suporte e conhecimento compartilhado.

Ao Hospital veterinário UFPR e ao Olair Carlos Beltrame pelas análises hematológicas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Capes; A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À minha família, a minha mãe, Márcia R dos S. de Marchi, ao meu pai, Adair de Marchi, ao meu irmão, Luan Michel de Marchi. Obrigada por todo apoio, compreensão, paciência, conselhos, palavras de conforto, encorajamento, ideais e valores. Pela felicidade diante das minhas conquistas e pelo suporte em minhas escolhas. Todas essas realizações somente foram possíveis porque vocês estavam ao meu lado, mesmo a 500 km de distância. Obrigada por todo suporte, amor, carinho e proteção.

Ao meu avô Luiz Nerci Luiz (*In Memoriam*), por ter sido um grande exemplo de professor e ser humano. Um cidadão que tinha esperança de um país melhor. Tenho muito orgulho de suas obras escritas que nos deixou de recordação. Agradeço por todo orgulho que demonstrava ter por mim, pelo seu bom humor, piadas, sabedorias, ensinamentos, por ter cuidado de mim com tanto amor e carinho.

Ao meu esposo, Bruno Cougo Kowalczyk por todo apoio, conselhos, compreensão, paciência, por tornar os dias cansativos e difíceis mais leves e agradáveis. Agradeço por todo amor, cuidado e carinho. Obrigada por toda ajuda e companheirismo, pelas palavras de conforto quando eu mais precisava, por

acreditar em mim e em meu trabalho e por sempre me motivar, sendo para mim uma grande inspiração.

Aos avós, Olinda Alves Lemos, Inês de Marchi, Adelino de Marchi (*In Memoriam*); Aos tios, em especial Clóvis, Jussara, Altair e Marinice; aos primos por todo suporte, carinho e momentos bons em família vivenciados.

Aos amigos, Caroline, Isabel, Stefany, Denise, Daniela, Yasmin, Alana, Laize, Giovana, Josiane, Marcione, Suzana, Camila, Aline, João F, Júlia, Alexandre, Lucas, Gabriel N, Gabriel, Felipe (*In Memoriam*), Lucas N, Gabriela, Ana Paula e Mariele, etc. Agradeço pelos momentos de descontração, alegrias e apoio durante esses anos; Aos meus sogros, Elizabeth e Mário por todo apoio e carinho.

“You cannot hope to build a better world without improving the individuals. To that end, each of us must work for his own improvement and, at the same time, share a general responsibility for all humanity, our particular duty being to aid those to whom we think we can be most useful.”

Marie Curie

RESUMO

A incidência do câncer apresenta aumento ao longo dos últimos anos. O melanoma é um tipo de câncer de pele agressivo, devido a sua alta capacidade metastática e rápida progressão para outros tecidos e órgãos. O 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodifenil éter (BDE-209) é um aditivo em plásticos, vastamente utilizado pelas indústrias como um retardante de chamas. Devido a suas características de difícil degradação, persistência no ambiente, natureza lipofílica, e conseqüentemente, capaz de bioacumular nos tecidos, o BDE-209 entrou para a lista dos Poluentes Orgânicos Persistentes (POP). Esse composto foi detectado em rios, ar, solo, plantas comestíveis, animais silvestres, assim como em diferentes amostras biológicas humanas, incluindo leite materno, plasma, sêmen, placenta, cordão umbilical, tecido adiposo, entre outros. Diferentes vias são fontes de exposição a esse composto à população humana, dentre elas, ocorre por meio da dieta, ingestão e inalação de poeira de residências e através do contato dérmico em ambiente domiciliar. Portanto, esse poluente ambiental merece atenção em termos de saúde pública e ambiental, visto que sua exposição pode ocorrer desde a fase fetal e se estender ao longo da vida do indivíduo. Dessa forma, em razão dos resultados recentes obtidos no grupo de pesquisa de Toxicologia Celular - UFPR, buscamos investigar *in vivo* o papel do BDE-209 na progressão, malignidade e quimiorresistência no câncer de melanoma, em camundongos C57BL/6. As concentrações utilizadas de BDE-209 são ambientalmente relevantes, como base em concentrações encontrados em amostras biológicas humanas. Primeiramente, as células B16-F1 de melanoma murino foram expostas ao BDE-209 durante 15 dias e posteriormente, inoculadas via veia caudal em camundongos. Em outro momento também foi realizado o tratamento quimioterápico com dacarbazina (DTIC), em determinados grupos de animais. Após 20 dias de metástase experimental, foram realizadas diferentes análises. As células B16-F1 expostas ao BDE-209 resultaram em um aumento significativo da área colonizada por metástase nos pulmões dos camundongos. A regulação negativa da expressão gênica de supressores tumorais como de *Timp3* e *Reck* em pulmões colonizados por metástases de melanoma, a diminuição da peroxidação lipídica e o aumento da resposta inflamatória sistêmica e local também foram observados. Os achados histopatológicos revelam uma maior quantidade de pontos focais de metástases nos pulmões e também uma maior invasividade para o cérebro (88,8%). Além disso, os camundongos inoculados com as células B16-F1 expostas ao BDE-209, bem como o grupo inoculados com as células B16-F1 previamente expostas ao BDE-209 e posterior administração do tratamento quimioterápico *in vivo*, apresentaram o aumento significativo da massa pulmonar, de metástases colonizadas na superfície dos pulmões, do índice de lesões metastáticas nas análises histológicas e a redução do supressor tumoral *Timp3*. Também foi observado no pulmão dos camundongos a depleção de tióis não proteicos (GSH e outros tióis), bem como a diminuição de GSH no fígado. Um padrão diferenciado nas análises do extrato de proteínas totais do pulmão dos camundongos, com diversas bandas mais expressas foram visualizadas no grupo em que sofreu a exposição prévia ao BDE-209. Ainda, no mesmo grupo de animais, houve a superexpressão de *Abcb1*, principal transportador ABC de resistência a múltiplas drogas, bem como a diminuição da expressão de *Abcc4*

e *Cd44* e o aumento do tamanho das vesículas extracelulares (VEs). O tamanho das vesículas também foi aumentado no grupo exposto previamente ao BDE-209 com administração do quimioterápico dacarbazina, no entanto, houve o aumento da expressão de *Abcc4* e *Cd44* . Em suma, os resultados mostram que o BDE-209 pode alterar o fenótipo das células B16-F1 e agravar o perfil metastático *in vivo*. Os dados atuais sugerem que o BDE-209 pode interferir na progressão e prognóstico do câncer de melanoma, modulando as células com menor capacidade de invasividade para um perfil mais agressivo.

Palavras-chave: Poluentes orgânicos persistentes. Deca-209. Melanoma. B16-F1. C57BL/6. Progressão tumoral. Quimiorresistência.

ABSTRACT

Cancer incidence has been increasing over the past few years. Melanoma is an aggressive type of skin cancer due to its high metastatic capacity and rapid progression to other tissues and organs. The 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodiphenyl ether (BDE-209) is an additive in plastics widely used by industries as a flame retardant. Due to its characteristics of being difficult to degrade, persistence in the environment, lipophilic nature, and consequently, its ability to bioaccumulate in tissues, BDE-209 has been listed as Persistent Organic Pollutants (POPs). This compound has been detected in rivers, air, soil, edible plants, wildlife, as well as in various human biological samples, including breast milk, plasma, semen, placenta, umbilical cord, adipose tissue, among others. Various pathways are sources of exposure to this compound for the human population, including through diet, ingestion, inhalation of household dust, and dermal contact in a domestic environment. Therefore, this environmental pollutant deserves attention in terms of public and environmental health, as exposure to it can occur from the fetal stage and throughout an individual's life. In light of recent results obtained by the Cellular Toxicology research group at UFPR, we aimed to investigate the role of BDE-209 in the progression, malignancy, and chemoresistance of melanoma cancer in C57BL/6 mice in vivo. The concentrations of BDE-209 used are environmentally relevant, based on concentrations found in human biological samples. Firstly, murine melanoma B16-F1 cells were exposed to BDE-209 for 15 days and subsequently inoculated via the caudal vein in mice. At another time, chemotherapy treatment with dacarbazine (DTIC) was also performed in certain groups of animals. After 20 days of experimental metastasis, various analyses were conducted. B16-F1 cells exposed to BDE-209 resulted in a significant increase in the area colonized by metastasis in the mice's lungs. Negative regulation of gene expression of tumor suppressors such as *Timp3* and *Reck* in lungs colonized by melanoma metastases, decreased lipid peroxidation, and increased systemic and local inflammatory response were also observed. Histopathological findings revealed a greater number of focal metastatic points in the lungs and greater invasiveness towards the brain (88.8%). In addition, mice inoculated with B16-F1 cells exposed to BDE-209, as well as the group inoculated with B16-F1 cells previously exposed to BDE-209 and subsequently administered in vivo chemotherapy, showed a significant increase in lung mass, colonized metastases on the surface of the lungs, the metastatic lesion index in histological analyses, and a reduction in the tumor suppressor *Timp3*. Depletion of non-protein thiols (GSH and other thiols) in the mice's lungs, as well as a decrease in GSH in the liver, were also observed. A distinct pattern in the analysis of total protein extract from the mice's lungs, with several more expressed bands, was visualized in the group that had previous exposure to BDE-209. Furthermore, in the same group of animals, there was overexpression of *Abcb1*, the main ABC transporter for multidrug resistance, as well as decreased expression of *Abcc4* and *Cd44*, and an increase in the size of extracellular vesicles (EVs). The size of the vesicles was also increased in the group previously exposed to BDE-209 with dacarbazine chemotherapy administration; however, there was an increase in the expression of *Abcc4* and *Cd44*. Therefore, the results show that BDE-209 can alter the phenotype of B16-F1 cells and worsen the in vivo metastatic profile. Current data suggest that BDE-

209 may interfere with the progression and prognosis of melanoma by modulating cells with a lower invasiveness capacity into a more aggressive profile.

Keywords: Persistent Organic Pollutants. Deca-209. Melanoma. B16-F1. C57BL/6. Tumor progression. Chemoresistance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação da estrutura química do Éter decabromodifenílico (BDE-209). FONTE: IARC (2023). 27
- Figura 2. As 14 marcas do câncer. FONTE: Hanahan (2022). 32
- Figura 3. Visão geral da cascata metastática: invasão, intravasamento, circulação, extravasamento e por último colonização. FONTE: Fares et al. (2020). 36
- Figura 4. Visão geral dos diferentes níveis moleculares que podem ser alterados no câncer de pele, que resultam em modificações fenotípicas da célula e contribuem para a progressão e classificação do câncer. FONTE: Azimi; Fernandez-Peñas (2023). 38
- Figura 5. Diferentes tipos de tratamento de melanoma. Do convencional à nanotecnologia. FONTE: Mishra et al. (2018). 41
- Figura 6. Mecanismo hipotético do transporte de drogas anticâncer pelos transportadores ABC, resultando na redução da concentração do fármaco intracelular e sobrevivência celular de células cancerígenas. FONTE: Wang et al. (2021). 44
- Figura 7. Biogênese de exossomos e microvesículas. (A) Microvesículas (40-1000 nm) são provenientes do brotamento e desprendimento externo da membrana plasmática. (B) Exossomos (40-150 nm) são secretados por exocitose de vesículas intraluminais (ILVs) pela fusão da membrana plasmática com endossomos multivesiculares (MVE) com a membrana plasmática da célula, para o meio extracelular (seta roxa). FONTE: Adaptado de Sheta et al. (2023). 46
- Figura 8. Abordagem experimental das células de melanoma murino (B16-F1), expostas 15 dias ao BDE-209. Fonte: a autora (2019). 53
- Figura 9. Fluxograma da abordagem experimental desenvolvida no estudo - Fase I. FONTE: a autora (2023). 53
- Figura 10. Fluxograma da abordagem experimental desenvolvida no estudo - Fase II. FONTE: a autora (2023). 54
- Figura 11. Biomarcadores bioquímicos em camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F1 após 20 dias de metástase experimental.

Atividade da glutathione S-transferase (GST), atividade da catalase (CAT) e peroxidação lipídica (LPO) no fígado (A, B, C) e pulmão (D, E, F). * $p < 0,05$ em relação ao controle. N = 7 (C0 animais saudáveis); N = 10 (demais grupos). FONTE: a autora (2023). 69

Figura 12. Avaliação da área colonizada por metástases na superfície pulmonar de camundongos Black C57/BL6, 20 dias após a metástase experimental. **(a)** P0 (pulmão saudável sem inoculação de células B16) **(b)** inoculação de células B16-F10 **(c)** inoculação de células B16-F1 **(d)** Controle (células B16-F1 expostas à concentração de veículo DMSO) **(e)** **(f)** **(g)** células B16-F1 expostas a concentração de 0,01nM, 0,1 nM e 1 nM de BDE-209, respectivamente **(h)** Área pulmonar total/área colonizada por metástases. N = 7 (P0: animais saudáveis) e N = 10 (demais grupos). (****) $p < 0,0001$ Significa diferença estatística entre o grupo B16-F10 e o grupo controle; (*) $p < 0,05$ diferença entre grupo exposto a concentração 1nM de BDE-209 em relação ao grupo controle (DMSO). Barra de escala – 10000 μm . FONTE: a autora (2023). 71

Figura 13. Cortes transversais de pulmões de camundongos C57BL/6. Ponto final de metástase experimental, 20 dias após a inoculação de células B16. (a) L0 (b) B16-F10 (c) B16-F1 (d) Controle (veículo DMSO) (e) inoculação de células B16-F1 expostas a 0,01 nM BDE-209 (f) inoculação de células B16-F1 expostas a 0,1 nM BDE-209 (g) inoculação de células B16-F1 expostas a BDE-209 1 nM BDE-209 (h) Contagem de focos de metástases de melanoma no pulmão dos animais. Setas indicam nódulos tumorais. Barra de escala 500 μm . Coloração hematoxilina e eosina. N = 7 (P0: animais saudáveis) e N = 10 (demais grupos). FONTE: a autora (2023). 73

Figura 14. Percentual de indivíduos com disseminação de metástase no cérebro, fígado e rim de camundongos C57BL/6, 20 dias após a inoculação das células B16-F1 cronicamente expostas ao BDE-209 (1 nM). (A) Disseminação de metástase cerebral no vaso (seta maior) e no tecido (seta menor). (B) Disseminação de metástase hepática e (C) Disseminação de metástase renal. Controle significa

inoculação de células B16-F1 expostas ao veículo (DMSO). Barra de escala = 50µm. Coloração hematoxilina e eosina. (A) N = 9, (B) N = 5 e (C) N = 5. FONTE: a autora (2023). 74

Figura 15. Expressão gênica do pulmão de camundongos Black C57BL/6, após 20 dias de metástase experimental. Os animais foram inoculados com células B16-F1 previamente expostas durante 15 dias ao BDE-209 (1nM) e DMSO (0,05%) no grupo controle. A expressão relativa do mRNA foi determinada pela média geométrica dos genes endógenos gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β2-microglobulina (β2M). A expressão relativa foi normalizada pelo controle. Os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney (*) p 0,0571. N = 3 - 5 experimentos independentes foram realizados. FONTE: a autora (2023). 75

Figura 16. Infiltrado de células imunes no pulmão de camundongos C57BL/6 após 20 dias de metástase de melanoma evocado por B16-F1 não exposto ou exposto crônico ao BDE-209. (A – B) Coloração H&E. *: células tumorais. **Seta preta**: infiltração de células imunológicas. (C - D) Marcação de CD3 – Linfócitos. (F – G) Marcação de Ly6G - Neutrófilos. Número de linfócitos (E) e neutrófilos (H). Setas brancas - linfócitos ou neutrófilos. Barra: 50 µm. Os dados representam a média ± SEM. Controle (veículo) (N = 3); B16-F1 expostas previamente ao BDE-209 (N = 4 – 5). ** p < 0,01 vs. Controle. FONTE: a autora (2023). 77

Figura 17. Infiltração de células imunes. (A – C) Coloração H&E. *: células tumorais. Seta preta: infiltração de células imunes. (D – F) Marcação de CD3 – Linfócitos. (G – I) Marcação de Ly6G - Neutrófilos. Número de linfócitos (J) e neutrófilos (K). **Setas brancas** - linfócitos ou neutrófilos. P0 (não tumoral); B16-F1 (pulmão de camundongos C57BL/6 após 20 dias de metástase de melanoma de células B16-F1 não expostas). BDE-209 0,1 nM (pulmão de camundongos C57BL/6 após 20 dias de metástase de melanoma de células B16-F1 previamente expostas a BDE-209 0,1 nM). Barra: 50 µm. Os dados representam a média ± SEM. N = 3 – 5. FONTE: a autora (2023). 78

Figura 18. Análise biométrica dos camundongos da linhagem Black C57BL/6 após a inoculação das células expostas ao BDE-209 (*in vitro*) durante 15 dias e tratamento quimioterápico com a Dacarbazina (DTIC) (*in vivo*) com seus respectivos controles. Peso dos órgãos (A) pulmão, (B) Cérebro, (C) Fígado, (D) Rim, (E) Ovário, ambos em relação ao peso corporal; (F) Peso dos animais (g). C0; B16-F10 e B16-F1 N = 5; Veículo (DMSO); BDE-209, Veículo (DMSO) + DTIC e BDE-1nM + DTIC N = 10. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. FONTE: a autora (2023). 99

Figura 19. Análise de biomarcadores bioquímicos do pulmão dos camundongos Black C57BL/6 inoculados com células B16-F1 expostas ao BDE-209, com seus respectivos controles e também frente ao tratamento quimioterápico. Pulmão (A) Tióis não proteicos; (B) Atividade da Glutathione S-transferase; (C) Catalase. Fígado (D) Tióis não proteicos; (E) Atividade da Glutathione S-transferase; (F) Catalase. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. C0; B16-F10 e B16-F1 N = 5; demais grupos N = 10. FONTE: a autora (2023). 101

Figura 20. (A) Ponto final de metástase experimental 20 dias após a inoculação celular com exposição prévia ao BDE-209 *in vitro* e posterior tratamento quimioterápico *in vivo*, em camundongos Black C57BL/6 (a) P0, animais saudáveis sem inoculação de células B16 (b) B16-F10 (c) B16-F1 (d-e) Veículo (DMSO) (f) BDE-209 (1nM) (g) Veículo (DMSO) + DTIC (h) BDE-209 (1nM) + DTIC (B) Área total de colonização de metástases. Área pulmonar total/área metastática. (P0, B16-F10 e B16-F1 N = 4; Veículo N = 8; BDE-209, Veículo, Veículo + DTIC e BDE-209 + DTIC N = 10). * $p = 0,0204$ (B16-F10 vs. Veículo); ** $p = 0,0067$ (Veículo + DTIC vs. BDE-209 + DTIC); ** $p = 0,0018$ (BDE-209 vs. BDE-209 + DTIC); **** $p < 0,0001$ (BDE-209 vs. Veículo) Barra de escala 2000 μm . FONTE: a autora (2023). 103

Figura 21. Imagem panorâmica das secções pulmonares de camundongos C57BL/6, após metástase experimental. (A) P0, animais sem inoculação de células tumorais; (B) B16-F10, inoculação de

células B16-F10 sem exposição ao poluente; **(C)** B16-F1, inoculação de células B16-F1, sem exposição ao poluente; **(D)** Veículo, inoculação das células B16-F1 expostas ao DMSO; **(E)** inoculação das células B16-F1 expostas ao BDE-209; **(F)** Dacarbazina, inoculação de células B16-F1 expostas ao DMSO e posterior tratamento quimioterápico *in vivo*; **(G)** BDE-209 + dacarbazina, inoculação de células B16-F1, expostas ao BDE-209 e posterior tratamento quimioterápico com a dacarbazina *in vivo* e **(H)** Área tumoral (área total/área metastática) de cortes histológicos de pulmões dos camundongos C57BL/6, após metástase experimental. N = 3 – 7. FONTE: a autora (2023). 105

Figura 22. Índice de lesão metastática. *: indicam diferença estatisticamente significativa em: ***p < 0.001; ****p < 0.0001. Valores = Média ± Desvio padrão. ANOVA de uma via (*One-way ANOVA*) com pós teste de Šídák. N = 3 – 7. FONTE: a autora (2023). 107

Figura 23. Secções transversais pulmonares de camundongos C57BL/6. **A e B**: Não inoculados e não tratados (Controle); **C e D**: Inoculados com células B16-F10; **E e F**: Inoculados com células B16-F1; **G e H**: Inoculados com células B16-F1 tratadas com DMSO (Veículo); **I e J**: Inoculados com células B16-F1 tratadas com DMSO e Dacarbazina; **K, L e M**: Inoculadas com células B16-F1 tratadas com BDE-209 (1nM); **N, O e P**: Inoculadas com células B16-F1 tratadas com BDE-209 (1nM) e Dacarbazina. Cabeça de seta: Edema intercelular. Estrela: Angiogênese. Seta larga: Melanófagos. Círculo pontilhado: Massa tumoral bem delimitada. Seta: Células em mitose. Asterisco: região necrótica. Barra de escala: A = 200 µm; B-G, I-L e N-P = 50 µm; H, M e P = 20 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina. FONTE: a autora (2023).. 108

Figura 24. Análise das vesículas extracelulares (LEVs) do plasma do sangue dos camundongos Black C57BL/6. Os camundongos foram inoculados com as células B16-F1 expostas ao BDE-209 (in vitro) e tratamento quimioterápico (in vivo), após 20 dias da metástase experimental. N = 3. * p < 0,05. FONTE: a autora (2023). 109

Figura 25. (A) Análise da expressão gênica de *Abcb1*, *Abcc1* e *Abcc4* (B) de *Mmp2*, *Mmp9*, *Mmp14*, *Timp3* e *Cd44* do pulmão dos camundongos Black C57BL/6, ao final de 20 dias de metástase experimental, após a inoculação de células B16-F1 expostas ao BDE-209 (1nM) ou veículo (DMSO) e adição do tratamento quimioterápico *in vivo* com a Dacarbazina. Os alvos foram avaliados em relação aos controles endógenos *Gapdh* e *B2m* (média geométrica) e também normalizados em relação ao controle (veículo ou veículo + DTIC) (N = 3 - 5). * p < 0,05 e ** p < 0,01. FONTE: a autora (2023). 111

Figura 26. Análise do extrato de proteínas totais do pulmão de camundongos por SDS-PAGE. Gel de poliacrilamida 9% corado com Azul de Coomassie R-250 contendo 50 µg de proteínas por linha. (C) Pulmão do camundongo controle (veículo DMSO); (T) Pulmão do camundongo tratado (células B16-F1 expostas ao BDE-209 na concentração de 1nM). (M) Marcador de peso molecular (kaleidoscope precision plus – Bio-Rad). As setas indicam o peso molecular das proteínas que apresentaram padrão diferenciado entre as amostras analisadas. FONTE: a autora (2023). 112

Figura 27. (A) Expressão de proteínas anti-MMP2 do pulmão de camundongos, após metástase experimental. (B) Análise das bandas da expressão de proteínas (MMP2) dos diferentes grupos experimentais. Quantificação realizada no software Image J. N = 3 - 4. FONTE: a autora (2023). 114

Figura 28. Expressão de proteínas anti-MMP9 do pulmão de camundongos, após metástase experimental. FONTE: a autora (2023). 115

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. GRUPOS EXPERIMENTAIS (<i>IN VIVO</i>).....	62
TABELA 2. INFORMAÇÕES DOS PRIMERS	65
TABELA 3. ANÁLISE DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E CONTAGEM DE CÉLULAS EM PLASMA.....	68
TABELA 4. GRUPOS EXPERIMENTAIS (<i>IN VIVO</i>).....	91
TABELA 5. EXTENSÃO DE CADA ALTERAÇÃO DE ACORDO COM O SCORE	94
TABELA 6. FERRAMENTAS DE AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PARA LESÕES METASTÁTICAS	95
TABELA 7. INFORMAÇÕES DOS PRIMERS	97
TABELA 8. CONDIÇÕES TESTADAS NO ENSAIO DE <i>WESTERN BLOT</i> EM TECIDO DE PULMÃO DOS CAMUNDONGOS, COM METÁSTASES DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16- F1).....	113

LISTA DE SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BCRP	Proteína de Resistência do Câncer de Mama
BDE-209	Éter decabromodifenílico
BFRs	Retardadores de Chamas Bromados
BHT	Hidroxitolueno Butilado
BSA	Albumina de Soro Bovino
CAT	Catalase
CDNB	1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
CTCs	Células tumorais circulantes
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
cDNA	DNA Complementar
DTIC	Dacarbazina
ECR	Ensaio Clínicos Randomizados
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EMT	Transição Epitélio-Mesenquimal
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FASP	Digestão em Filtro
FRs	Retardante de chamas
GSH	Glutationa
GSSG	Dissulfeto de Glutationa
GST	Glutationa S-Transferase
HEPES	Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LC-MS/MS Tandem	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa em Tandem
LPO	Peroxidação Lipídica
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas
MEC	Matriz Extracelular
MRPs	Proteínas associadas a resistência a múltiplas drogas
MTIC	3-metil-(triazol-1-il)imidazol-4-carboxamida
PBDEs	Éteres Difenílicos Polibromados
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCA	Análise de Componentes Principais

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
P-gp	Glicoproteína-P
POPs	Poluentes Orgânicos Persistentes
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase via Transcrição Reversa
Quantitativa	
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido dismutase
TA	Temperatura ambiente
TAMs	Macrófagos Associados ao Tumor
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TFA	Ácido Trifluoroacético
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante Beta
THP-1	Linhagem Celular Humana de Leucemia Monocítica Aguda
TIMPs	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases
TMDs	Domínios Transmembranares
TME	Microambiente Tumoral
TMZ	Temozolomida
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNP	Tióis não proteicos
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEs	Vesículas Extracelulares
WB	<i>Western Blot</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 ÉTERES DIFENÍLICOS POLIBROMADOS (PBDES): ONIPRESENÇA, RELAÇÃO AMBIENTAL, SAÚDE PÚBLICA E POSSÍVEIS EFEITOS.....	26
2.2 ESTRESSE OXIDATIVO.....	30
2.3 CÂNCER	31
2.4 MELANOMA.....	36
2.5 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO	40
2.6 TRANSPORTADORES ABC.....	43
2.7 VESÍCULAS EXTRACELULARES (VES).....	45
3 JUSTIFICATIVA	49
4 HIPÓTESE	50
5 OBJETIVOS	50
5.1 <i>Objetivo geral</i>	50
5.2 <i>Objetivos específicos</i>	50
6 ABORDAGEM EXPERIMENTAL	52
CAPÍTULO I	55
RESUMO	56
ABSTRACT	57
1 INTRODUÇÃO	58
2 MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1 PREPARAÇÃO DE ÉTER DECABROMODIFENÍLICO (BDE-209).....	60
2.2 CULTIVO DE CÉLULAS B16	60
2.3 DESENHO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i>	60
2.4 EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i> (METÁSTASE EXPERIMENTAL).....	61
2.5 MARCADORES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS EM PLASMA E AMOSTRAGEM	62
2.6 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM TECIDOS	62
2.7 ANÁLISE DA PROGRESSÃO TUMORAL	63
2.8 RT-QPCR.....	64
2.9 IMUNOFLUORESCÊNCIA	65
2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	66

3 RESULTADOS	67
3.1 ANÁLISE DA SAÚDE DOS CAMUNDONGOS	67
3.2 PROGRESSÃO METASTÁTICA DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16-F1)	69
3.3 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICA.....	71
3.4 RT-QPCR.....	75
3.5 IMUNOFLOURESCÊNCIA	76
4 DISCUSSÃO	79
5 CONCLUSÃO	84
CAPÍTULO II	85
RESUMO	86
ABSTRACT	87
1 INTRODUÇÃO	88
2 MATERIAL E MÉTODOS	90
2.1 ÉTER DECABROMODIFENÍLICO (BDE-209)	90
2.2 CULTIVO DE CÉLULAS B16	90
2.3 EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS B16-F1 AO BDE-209 <i>IN VITRO</i>	90
2.4 METÁSTASE TUMORAL DE MELANOMA MURINO (B16-F1)	90
2.5 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO COM A DACARBAZINA (DTIC) EM CAMUNDONGOS C57BL/6	90
2.6 ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	91
2.6.1 <i>Biomarcadores bioquímicos em tecidos</i>	91
2.6.2 <i>Análise de vesículas extracelulares (VEs) em plasma</i>	92
2.6.3 <i>Análises de progressão tumoral</i>	92
2.6.4 <i>Análises histopatológicas</i>	93
2.6.5 <i>Expressão gênica (RT-qPCR)</i>	95
2.6.6 <i>Western Blot (WB)</i>	97
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	98
3 RESULTADOS	98
3.1 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS	98
3.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS	100
3.3 PROGRESSÃO METASTÁTICA PULMONAR E QUIMIORRESISTÊNCIA APÓS METÁSTASE EXPERIMENTAL DE CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-209.....	101

3.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES (VES).....	109
3.5 EXPRESSÃO GÊNICA.....	110
3.6 SDS-PAGE.....	111
3.7 <i>WESTERN BLOT</i>	112
4 DISCUSSÃO	116
5 CONCLUSÃO	123
CONSIDERAÇÕES FINAIS	124
REFERÊNCIAS	126
ANEXO 1 – CERTIFICADO DO CEUA/BIO-UFPR	155
ANEXO 2. TESTES REALIZADOS PARA O ENSAIO DE <i>WESTERN BLOT</i>.	156

1 INTRODUÇÃO

O BDE-209 pertence a classe dos éteres difenil polibromados (PBDEs) e são compostos aditivos utilizados como retardante de chamas (FRs) em uma grande diversidade de produtos industrializados, intensificando o uso dessa molécula nos últimos anos. Atualmente, essa substância é considerada um composto onipresente, ressaltando sua ocorrência no ambiente natural, bem como nos ambientes doméstico e de trabalho (ABDALLAH et al., 2009; SIDDIQI, et al., 2003; YANG et al., 2018).

A exposição humana não ocupacional aos FRs ocorre principalmente por meio da ingestão de poeira doméstica, dieta, contato dérmico com poeira ou produtos de consumo e inalação de ar no ambiente domiciliar (ABDALLAH et al., 2008; FREDERIKSEN et al., 2009; WATKINS et al., 2011). A inalação de poeira é uma das principais fontes de exposição humana ao BDE-209. O ar, solo e alimentos como peixes e frutos do mar também podem ser fontes de exposição, seguido pelos alimentos (ABDALLAH et al., 2008; CHOU et al., 2019; PALM et al., 2014; ROSS et al., 2009). Dentre as diferentes formas de exposição ao poluente se acentua a exposição crônica, onde a população humana encontra-se mais suscetível extrapolando o controle das agências responsáveis. Essa situação coloca em alerta as agências de controle da saúde pública; visto que a exposição humana pode iniciar na vida uterina, continuar durante a amamentação e persistir ao longo da vida adulta (LEONETTI et al., 2016; ZHANG et al., 2011).

Nos últimos 30 anos, o grupo de pesquisa em Toxicologia Celular tem investigado a ação de diversos tipos de contaminantes e poluentes ambientais tanto em estudo *in vitro* como *in vivo*. No entanto, nos últimos 12 anos, foram desenvolvidos estudos sobre o papel de poluentes orgânicos na alteração de fenótipo em células tumorais. Essa nova linha de investigação busca avaliar o risco em potencial de populações humanas expostas a diversas moléculas lançadas no ambiente pela atividade antrópica, onde a base do estudo é avaliar seus efeitos no prognóstico do câncer.

O controle dessa doença é um grande desafio para a medicina moderna. Portanto, todo estudo que venha agregar informações nesse contexto, tornam-se de grande relevância para os estudos de toxicologia humana e de saúde

pública. Esse trabalho é, portanto, uma continuidade desses estudos onde buscamos responder algumas questões que surgiram ao longo dos estudos mais recentes. Investigamos se a exposição crônica (15 dias) de células do melanoma murino B16-F1, a concentrações ambientalmente relevantes de BDE-209, e posterior inoculação em camundongos pode interferir na malignidade, progressão e prognóstico do melanoma *in vivo*. Com isso, procuramos como objetivo central avaliar se as alterações fenotípicas causadas pelo BDE-209 e observadas *in vitro*, podem interferir com o desenvolvimento e o tratamento da doença em estudos *in vivo*, alterando negativamente o prognóstico do câncer.

O estudo desenvolvido nesse projeto foi dividido em Fases I e II. Na Fase I - Inicialmente, as células B16-F1 de melanoma murino foram expostas durante 15 dias ao BDE-209 e inoculadas posteriormente em camundongos Black C57BL/6 para o ensaio de metástase experimental pelo período de 20 dias. Fase II – A abordagem experimental ocorreu da mesma forma como mencionado, anteriormente, na Fase I, contudo, para identificar uma possível modulação do BDE-209 frente à resposta quimioterápica, os animais foram tratados com o agente quimioterápico Dacarbazina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ÉTERES DIFENÍLICOS POLIBROMADOS (PBDEs): ONIPRESENÇA, RELAÇÃO AMBIENTAL, SAÚDE PÚBLICA E POSSÍVEIS EFEITOS

Os éteres difenílicos polibromados (PBDEs) constituem uma classe de poluentes utilizados principalmente como retardante de chamas (FRs). Nesse grupo encontra-se o BDE-209 que possui capacidade de bioacumulação em tecidos de animais, difícil degradação e persistência no ambiente, percorrendo longas distâncias através de correntes atmosféricas ou marítimas. Devido a essas características, em 2017 esse composto polibromado entrou para a lista dos poluentes orgânicos persistentes, tornando um alerta e uma preocupação ambiental e de saúde pública (CHOU et al., 2019; STOCKHOLM CONVENTION, 2019; YU et al., 2015).

A estrutura química do 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-deca-bromodifenil éter (BDE-209) (Figura 1), consiste em dois anéis fenil conectados por uma ligação éter e 10 moléculas de bromo dispostas ao redor dos anéis fenil, denominado portanto, como deca-bromado apresentando baixa solubilidade em água (<20–30 µg / L) (CHEN et al., 2018; TSENG et al., 2006; ZHAO et al., 2011; WHO, 2004).

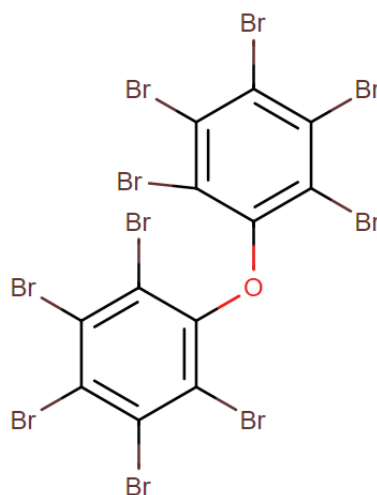


Figura 1. Representação da estrutura química do Éter decabromodifenílico (BDE-209). FONTE: IARC (2023).

Assim como a maioria dos polibromados, o BDE-209 é um aditivo em produtos industriais principalmente em plásticos, com a função de agir como um retardante de chamas. Portanto um composto químico empregado em diferentes produtos industriais como: espumas, tintas, materiais de construção, têxteis, madeira, plásticos e materiais eletrônicos. Pelo fato de ser aditivo aos produtos industriais, o BDE-209 é facilmente liberado do produto para o ambiente por volatilização e exsudação, conseqüentemente, presente em ambientes como o interior de residências ou áreas de trabalho (ABDALLAH et al., 2009; SIDDIQI, et al., 2003; YANG et al., 2018).

Os compostos polibromados são despejados em grandes quantidades em ambientes aquáticos devido à atividade industrial e através de deposição atmosférica ou pelos despejos urbanos. Estudos apontam o BDE-209 como o principal composto dos polibromados, sendo detectado em elevadas concentrações no ambiente, onde os sedimentos funcionam como verdadeiros reservatórios naturais, o que representa uma ameaça para a biota e exposição

humana, principalmente pelo consumo de pescados e frutos do mar (ROSS et al., 2009). Além disso, foi ainda detectado no solo (CHOU et al., 2019), no ar (PALM et al., 2014), em animais selvagens (NELSON et al., 2015) e em plantas (YANG et al., 2018). A exposição humana não ocupacional aos FRs ocorre principalmente pela ingestão e inalação de poeira doméstica, alimento e contato dérmico em ambiente domiciliar (ABDALLAH et al., 2008; FREDERIKSEN et al., 2009; WATKINS et al., 2011).

A absorção e distribuição do BDE-209 foram avaliadas simulando a exposição aguda que ocorre em trabalhadores que manipulam o lixo eletrônico, utilizando ratas fêmeas expostas oralmente e diariamente a 1 mg kg⁻¹. O estudo mostra que a concentração de BDE-209 aumenta exponencialmente em todos os tecidos avaliados (fígado, tecido adiposo, sangue e intestino delgado) durante o período de 7 dias, demonstrando a bioacumulação do BDE-209 nos animais expostos. O fígado acumulou a maior quantidade do poluente, com base no peso úmido, enquanto o tecido adiposo apresentou a maior concentração, ao final de 22 dias de depuração (MI et al., 2017).

Apesar das evidências toxicológicas envolvidas com a exposição ao BDE-209, poucos estudos tem sido desenvolvidos buscando avaliar o efeito do polibromado na saúde humana, ressaltando a importância de estudos sobre o risco de exposição a esse poluente. Nos estudos *in vitro* foi observada a citotoxicidade do BDE-209 em células de neuroblastoma humano (SK-N-MC) (5-20 µmol/L), com danos ao DNA pela indução de estresse oxidativo (Pellacani et al., 2012). Exposições crônicas e doses elevadas de BDE-209 mostrou uma regulação positiva da via de sinalização do receptor de hidrocarboneto de arila/citocromo P4501A1 (CYP1A1) em células HepG2 (YUAN et al., 2021). Outros estudos mostraram que o efeito do BDE-209 encontra-se também relacionado com a desregulação endócrina, avaliada pelas alterações histológicas e danos oxidativos na glândula tireóide, bem como pela expressão de genes relacionados ao eixo hipotálamo-hipófise-tireóideano (HPT) em ratos (WANG et al., 2019). Os danos cardiovasculares provocados pelo pelo estresse oxidativo e inflamação endotelial também foram descritos em estudos *in vivo* por Jing et al. (2019).

A presença do BDE-209 em 50% das amostras placentárias humanas, coletadas entre 2010 e 2011 nos EUA, indicam que a exposição pré-natal a esse contaminante é uma realidade e motivo de grande preocupação para a saúde humana (LEONETTI et al., 2016). Estudos realizados com ratas prenhas expostas ao BDE-209 (5 $\mu\text{mol/kg}$) durante o período gestacional e amamentação, mostraram que tanto o BDE-209 como seus produtos debrominados podem ser transferidos da mãe para a prole (ZHANG et al., 2011). Não bastasse a exposição intrauterina, recentemente, concentrações de BDE-209 também foram detectados em amostras de leite materno de mães saudáveis que viviam em áreas urbanas (MATOVU et al., 2019; WEMKEN et al., 2020).

Na infância e pré-adolescência, foi observado que as concentrações de BDE-209 foram mais altas que seus congêneres (BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153, BDE-154 e BDE-183) em amostras de sangue de crianças de 9 a 11 anos de idade. Em adultos, foi observada a presença de BDE-209 no soro de 731 indivíduos com idade variando entre 18 e 74 anos. Essas amostras foram coletadas em 2002 na Catalunha, no nordeste da Espanha. O BDE-209 foi o congêneres predominante (mediana 3,7 ng/g de lipídio), seguido pelo BDE-47 (2,6 ng/g de lipídio) e BDE-99 (1,2 ng/g de lipídio), onde a idade foi o fator sociodemográfico de maior influência na distribuição dos PBDEs, pois as concentrações mais elevadas foram encontradas em indivíduos jovens (< 30 anos) e não em adultos (≥ 30 anos) (GARÍ; GRIMALT, 2013). Esse dados mostram que o BDE-109 está presente em todas as etapas do ciclo de vida do homem, o que destaca a importância de um monitoramento constante desse poluente no ambiente, além da investigação das principais vias de exposição humana (LINK et al., 2012).

De acordo com Thompson et al. (2015), os PBDEs não são classificados como cancerígenos e genotóxicos, no entanto, estudos tem mostrado a capacidade do BDE-209 em promover a proliferação de diferentes células tumorais no sistema reprodutor feminino bem como a diminuição da apoptose induzida (LI et al., 2012). A exposição ao BDE-209 através da poeira doméstica foi relacionada com uma maior ocorrência e gravidade do câncer em tireóide papilar por Hoffman et al. (2017). Os níveis de PBDEs no tecido adiposo também foram relacionados com o risco de câncer de mama em mulheres chinesas em estudo realizado entre 2014 e 2016, onde 209 casos de câncer foram

diagnosticados em Shantou na China. Nesse estudo foram encontrados 14 congêneres de PBDEs no tecido adiposo da mama de pacientes com câncer de mama, cujos níveis de polibromados incluindo o BDE-209, foram maiores nos casos de câncer de mama se comparado com o grupo controle (HE et al., 2018).

Os estudos *in vitro* realizados em nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Toxicologia Celular- UFPR, evidenciam que a exposição a concentrações ambientalmente relevantes ao BDE-209 em células de melanoma murino, pode modular parâmetros celulares como da expressão gênica e alteração da atividade dos transportadores ABC (MARCHI et al., 2021), da expressão gênica de *Bcl2* (MOGGIO, 2019), *Mmp2*, *Mmp9*, *Mmp14*, *Pgk1*, *Timp2*, *Timp3* e *Reck*, bem como da expressão proteica de vimentina e E-caderina e de proliferação celular (SILVA-FILHO et al., 2022).

Em conjunto de todos esses dados, observamos que a exposição de BDE-209 em células do melanoma murino B16-F1, leva a um perfil mais agressivo e possivelmente mais metastático dessas células (SILVA-FILHO et al., 2022). Brito e colaboradores (2020), observaram que o BDE-209 modula a formação de metástase em modelos murinos *in vivo*, utilizando camundongos C57BL/6 expostos previamente ao polibromado (0,08, 0,8 e 8 mg/kg) via gavagem (intervalos de 5 dias por 45 dias), e inoculados com células do melanoma murino B16-F10, por 20 dias. Os resultados mostraram a presença de metástases em pulmões e em outros órgãos como cérebro, rim e gônadas. Portanto, de acordo com o estudo, a exposição prévia dos animais ao BDE-209 favoreceram o aumento da disseminação metastática de células B16-F10, revelando possíveis implicações deste composto com o prognóstico do melanoma.

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

O sistema antioxidante celular é um mecanismo utilizado com frequência nos estudos de citotoxicidade de xenobióticos, onde os poluentes ocupam um lugar de destaque (SAMET; WAGES, 2018). O estresse oxidativo ocorre quando o mecanismo falha, favorecendo a instalação de um estado pró oxidante celular, e pode ocorrer devido à diminuição ou inativação de moléculas antioxidantes, elevação de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERNs) ou

também pelo aumento de outras moléculas pró oxidantes como metabólitos endógenos (LUSHCHAK, 2014; SIES, 2015).

Portanto, o sistema antioxidante enzimático e não enzimático tem por função manter os níveis basais das espécies oxidantes, mantendo o equilíbrio óxido redutor celular. Na eventual falha do mecanismo podem ocorrer danos às macromoléculas celulares como proteínas, lipídeos de membrana e o próprio material genético. Algumas das principais enzimas do sistema antioxidante enzimático incluem: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) (ROVERSI et al., 2006), enquanto que no sistema antioxidante não enzimático atuam os tióis não proteicos (glutathione (GSH) e outros tióis, os quais desempenham um papel relevante na defesa contra os danos oxidativos (ANANDAN et al., 2013).

As funções biológicas normais em células do fígado, pulmão, sistemas endócrino e neural pela indução do estresse oxidativo tanto *in vitro* como *in vivo* podem ser alteradas pela exposição aos PBDEs (RALDÚA et al., 2008; GAO et al., 2009; BRITO et al., 2020). Nos últimos anos, aumentaram as informações sobre os efeitos adversos de alguns PBDEs. Contudo, o efeito tóxico do BDE-209 precisa ser elucidado (ZHAO et al., 2011).

2.3 CÂNCER

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que apresentam em comum o crescimento desordenado de células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos. Essas células dividem-se rapidamente e apresentam comportamento tipicamente adverso se comparado com as células normais, gerando a formação de tumores (INCA, 2019). Assim as neoplasias são originadas pela transformação de células somáticas maduras mas também através de células-tronco normais (LIU, 2020).

Hanahan e Weinberg (2000) apresentam algumas características que auxiliam na identificação do câncer: (i) proliferação sustentada; (ii) inibição de supressores de tumor; (iii) resistência a morte celular; (iv) imortalização; (v) indução de angiogênese e a (vi) ativação da invasão e metástase. Em 2011, os mesmos autores acrescentaram mais algumas características à lista como: (vii) alteração metabólica; (viii) instabilidade genômica, (xi) inflamação

(microambiente tumoral) e (x) evasão. Mais recentemente, Hanahan (2022), propõe mais 4 aspectos que são importantes na identificação do câncer: (xi) plasticidade fenotípica, (xii) fatores epigenéticos, (xiii) células senescentes e (xiv) microbiota (Figura 2).

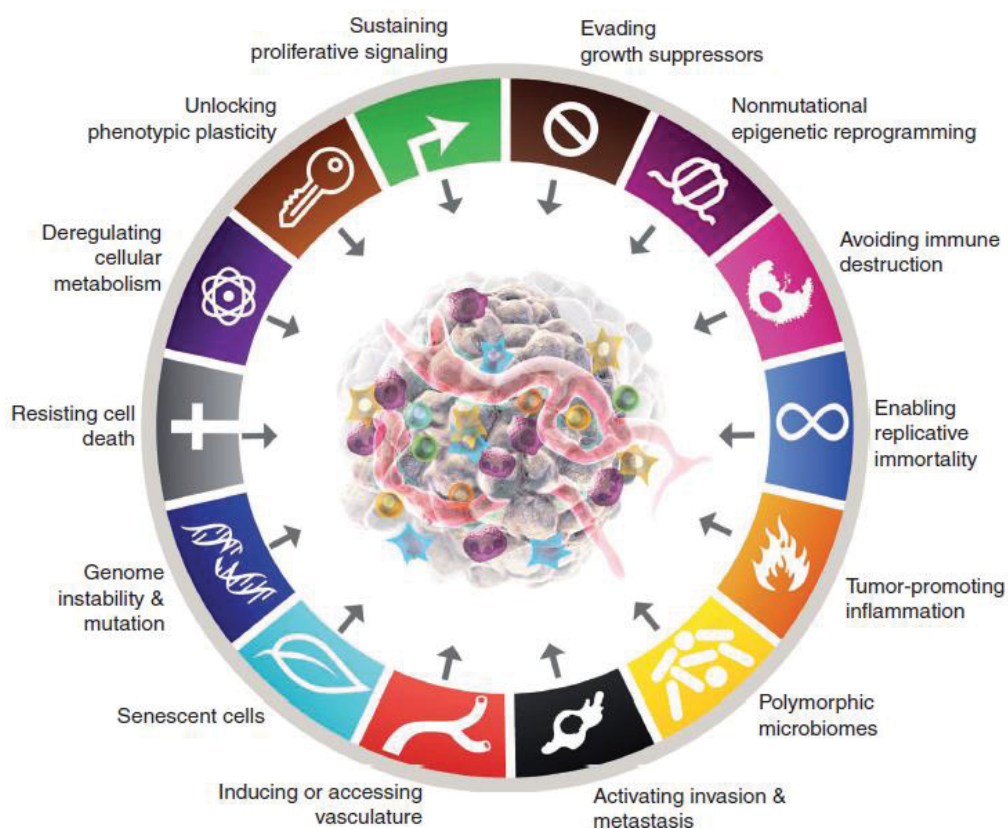


Figura 2. As 14 marcas do câncer. FONTE: Hanahan (2022).

Nessa seção, serão discutidos alguns fatores envolvidos da progressão do câncer. A transição epitélio-mesenquimal (EMT) está envolvida no processo de disseminação tumoral (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011), onde alterações moleculares e bioquímicas reversíveis possibilitam que células epiteliais específicas adquiram um fenótipo mesenquimal, sendo fundamental para progressão do câncer e formação de metástases (YE; WEINBERG, 2015). Frequentemente, as metástases são responsáveis pelo fracasso da terapia e pelo elevado número de mortes relacionadas ao câncer. O avanço do tumor primário para outros tecidos é denominado como tumor secundário, proveniente de metástases liberadas diariamente na circulação em pacientes com câncer.

Estudos de melanoma em modelos animais sugerem que <0.1% das células cancerosas desenvolvem metástases (FARES et al., 2020; LUZZI et al., 1998).

Alguns componentes da matriz extracelular como as lamininas, fibronectinas, elastinas, colágenos, proteoglicanos e proteinases fazem parte dos processos metastáticos e invasivos de células tumorais. A desmontagem da matriz extracelular e de seus componentes são fundamentais na invasão das células cancerígenas. Esse processo ocorre por meio de enzimas denominadas de metaloproteinases de matriz (MMPs). As MMPs também possuem funções relevantes na proliferação celular, resposta imune, sobrevivência, angiogênese, além de desempenhar um papel importante na invasão dos tecidos (CURRAN; MURRAY, 2000; KESSENBROCK et al., 2010; MOSS et al., 2012).

As MMPs são encontradas em níveis elevados na maioria dos diferentes tipos de câncer e encontram-se associadas a um mau prognóstico da doença (EGEBLAD; WERB, 2002; HADLER-OLSEN et al., 2013). São proteínas essenciais para o deslocamento das células cancerosas em direção ao tecido alvo. Entre as diferentes MMPs, as MMP2 e MMP9 são as principais enzimas de degradação do colágeno tipo IV e são superexpressas em células cancerosas (LI et al., 2004). A expressão de MMP14 foi associada ao mau prognóstico em diferentes tipos de câncer. Em melanoma a MMP14 é expressa em linha de frente da invasividade em melanoma e células estromais em locais de forte ativação de MMP2 (KNAPINSKA; FIELDS, 2019; KURSCHAT et al., 2002). Porém, em ambos os tipos de células, a matriz é um indutor de expressão e atividade de MMP2/9 e MMP14 (KURSCHAT et al., 1999; ZIGRINO; DRESCHER; MAUCH, 2001).

Por outro lado, a proteína RECK, proteína rica em cisteína indutora de reversão é uma glicoproteína ligada à membrana que inibe as metaloproteinases de matriz envolvidas na degradação da matriz extracelular. Estudos mostram a relação de um prognóstico melhorado de tumores humanos, quando a expressão de RECK é preservada, onde em muitos tumores é regulada negativamente. As MMP2 e MMP14 geralmente apresentam a expressão inversa de RECK, porém, existe exceções. (CLARK et al., 2007; ALEXIUS et al., 2014). Os TIMPS (inibidores teciduais de metaloproteinases) regulam diferentes metaloproteinases e seus substratos, e conseqüentemente, regulando a homeostase tecidual. Os TIMPs estão estreitamente relacionados com muitos

dos processos do câncer, como na invasão, angiogênese, inflamação, entre outros. Dentre os 4 inibidores teciduais de metaloproteinases, TIMP1 e TIMP3 possuem uma correlação inversa que demonstram o mau prognóstico do câncer onde a expressão de TIMP1 é aumentada e a de TIMP3 é reduzida (JACKSON et al., 2017).

A glicoproteína transmembrana CD44 pertence às famílias de moléculas de adesão. Diferentes vias de sinalização são mediadas por essa molécula, abrangendo vias intracelulares, proteínas quinases, modificações do citoesqueleto, proteinases e fatores de transcrição que atuam na divisão, proliferação, angiogênese e invasão de células de câncer. Um fenótipo de alta expressão de CD44 pode inibir o efeito citotóxico de agentes quimioterápicos em muitos tipos de câncer. Consequentemente, a superexpressão de CD44 está também relacionada a um mau prognóstico da doença. (MARHABA; ZÖLLER, 2004; YAGHOBI et al., 2021).

Dentre os vários fatores que determinam uma célula cancerosa citados anteriormente, o microambiente tumoral possui um papel importante nessa patologia. Esse abriga as células tumorais que interagem com as células vizinhas por meio do sistema circulatório e linfático (ARNETH, 2020). O microambiente tumoral é composto por diferentes tipos celulares como os fibroblastos, miofibroblastos, células do sistema imune, tecido vascular e estromal, bem como de componentes da matriz extracelular (WITZ; LEVY-NISSENBAUM, 2006; WEBER; KUO, 2012). O sistema vascular desenvolvido nesse contexto, é necessário para o fornecimento de oxigênio e nutrientes às células cancerígenas, sendo fundamental para o desenvolvimento e crescimento do tumor. Outro fator importante para o microambiente tumoral é a presença do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), em que consiste em uma glicoproteína homodimérica de ligação a heparina e pertence a uma família de fatores de crescimento. O papel do VEGF está relacionado ao processo de angiogênese e apresenta um papel relevante na proliferação e migração das células endoteliais (HOLASH et al., 1999; FERRARA et al., 2003; ELLIS; HICKLIN, 2008).

O microambiente inflamatório em alguns tipos de câncer pode melhorar a sua proliferação, angiogênese e metástases (MANTOVANI et al., 2008), uma vez que os tumores sólidos, podem desenvolver processos inflamatórios locais que

resultam no crescimento e disseminação do mesmo. Da mesma forma, esses mesmos processos podem interferir com a imunossupressão protegendo os tumores do ataque imunológico. No contexto da inflamação desencadeada pelo câncer há um ciclo contínuo de perturbação na estrutura do tecido, produção de citocinas, fatores de crescimento e recrutamento de células, levando a persistência da inflamação (MUNN, 2017); ou, subvertendo respostas imunes adaptativas do organismo, modificando respostas a hormônios e agentes quimioterápicos (MANTOVANI et al., 2008). A infiltração de leucócitos pode potencializar o avanço do tumor, criando uma via na matriz extracelular, o que se alinha com o conceito da teoria de invasão contracorrente (OPDENAKKER et al., 2004).

Diferentes fatores como a acessibilidade e restrições físicas podem atrair as células cancerosas. Estas, podem infiltrar na circulação por meio de um vaso sanguíneo ou linfático (WONG; HYNES, 2006). Quando ocorre a infiltração na circulação, as células tumorais circulantes (CTCs) são submetidas ao estresse causado pelo cisalhamento do fluxo sanguíneo, onde o fenômeno de *anoikis* e a resposta imunológica, podem ser capazes de eliminar uma quantidade considerável dessas células. Apesar disso, algumas CTCs resistem a esses fatores, sobrevivem e possibilitam a formação de metástases à distância (HUANG et al., 2018; LOU et al., 2015). Na fisiopatologia de metástases são cruciais o intravasamento e extravasamento de células cancerosas por meio dos vasos sanguíneos rompidos (REYMOND et al., 2013; WEIS et al., 2004). Uma vez que as CTCs se deslocam por capilares pequenos, podem ficar presas, e como consequência, muitas vezes, pode ocorrer a ruptura microvascular levando o extravasamento das células cancerosas (MASSAGUE; OBENAUF, 2016).

O processo de extravasamento das células tumorais é complexo e envolve diferentes fatores como as quimiocinas, interações entre ligante-receptor bem como células circulantes não tumorais. Além disso, as integrinas exercem um papel fundamental na determinação dos locais em que decorrem o extravasamento e colonização, proporcionando a sobrevivência independente da ancoragem das CTCs. (Figura 3) (REYMOND et al., 2013; ALIX-PANABIERES; PANTEL, 2016; STEGNER et al., 2014; HAMIDI; IVASKA, 2018).

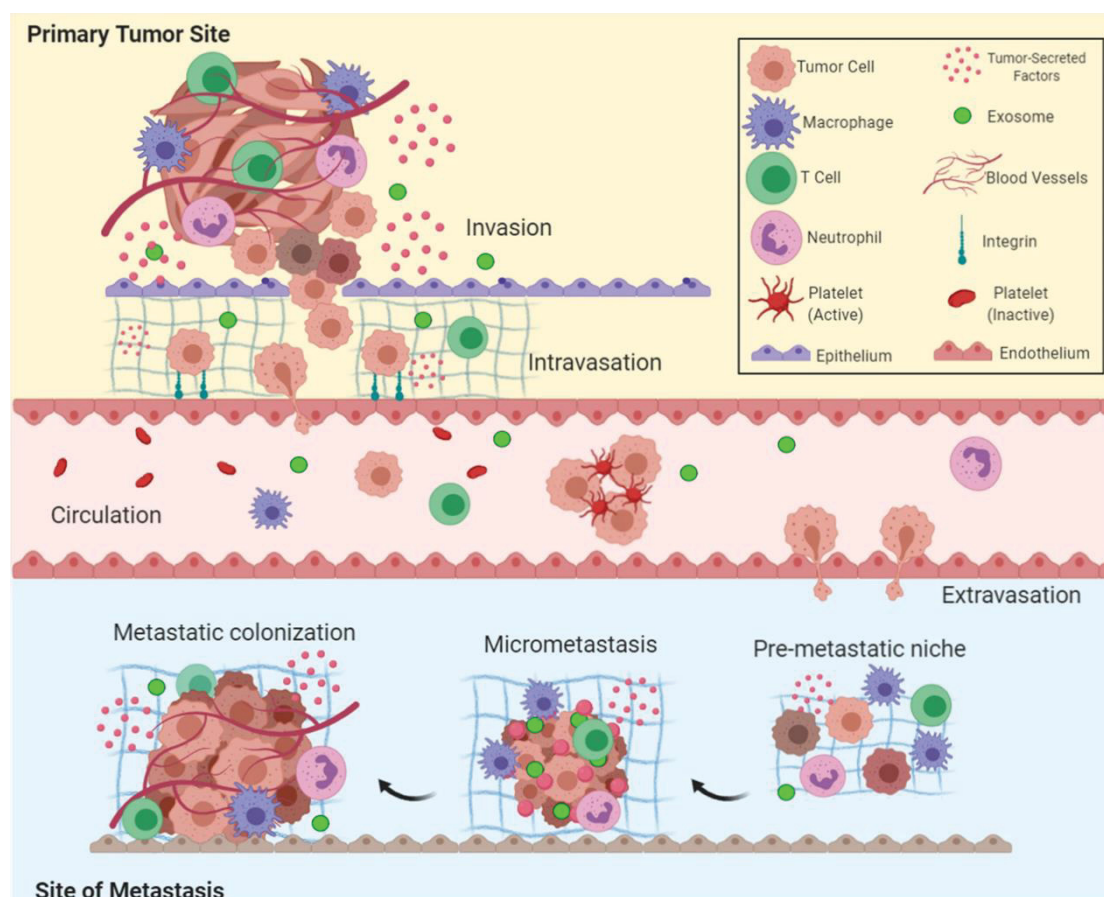


Figura 3. Visão geral da cascata metastática: invasão, intravasamento, circulação, extravasamento e por último colonização. FONTE: Fares et al. (2020).

Contudo, segundo o Instituto Nacional do Câncer (2018), entre 80% e 90% dos casos de cânceres estão associados as causas externas. Diversos fatores como o ambiente, a água, o solo, ar, assim como, os alimentos, medicamentos, o ambiente de trabalho, o estilo de vida e hábitos diários, podem levar ao surgimento de diferentes tipos de cânceres. Os fatores de riscos ambientais para o desenvolvimento do câncer, são denominados cancerígenos ou carcinógenos, resultando em um primeiro momento na alteração da estrutura genética das células.

2.4 MELANOMA

A pele é o órgão mais externo do corpo e dessa maneira está exposta ao ambiente, que pode entrar em contato com microrganismos, poeira, poluição e radiação UV, muitas vezes resultando em diferentes tipos de doenças de pele (VIJAYALAKSHMI, 2019). Existem diferentes tipos de cânceres que corresponde

aos diferentes tipos de células do corpo. Assim, quando ocorre em células do tecido epitelial, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas (INCA, 2019).

O câncer de pele é uma doença complexa e possui diferentes características e peculiaridades que envolve alterações em vários níveis de informações biológicas. Dentre essas alterações, encontram-se os genes, transcritos, proteínas e metabólitos que resultam em modificações fenotípicas e físicas na dermatoscopia, microscopia confocal, histologia e sintomas clínicos. As alterações moleculares podem levar ao surgimento de propriedades neoplásicas em células normais da pele, ocasionando a progressão para lesões pré-malignas e carcinomas agressivos (AZIMI; FERNANDEZ-PEÑAS, 2023) (Figura 4).

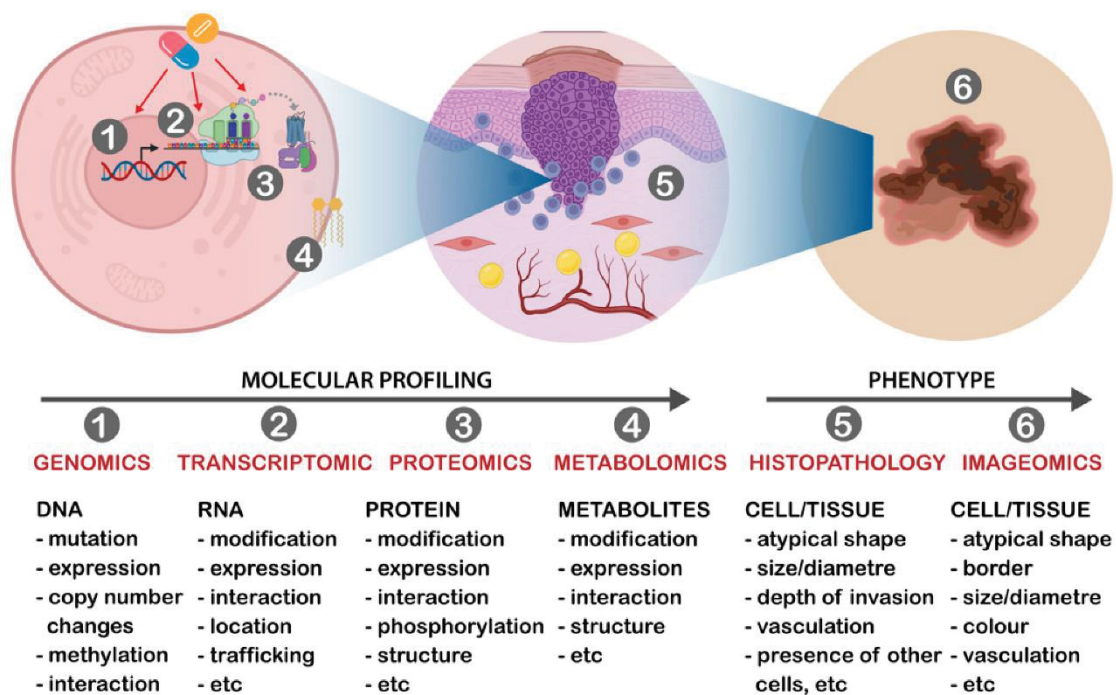


Figura 4. Visão geral dos diferentes níveis moleculares que podem ser alterados no câncer de pele, que resultam em modificações fenotípicas da célula e contribuem para a progressão e classificação do câncer. FONTE: Azimi; Fernandez-Peñas (2023).

O câncer de pele é classificado em duas categorias principais: melanoma e não melanoma (ELGAMAL et al., 2013). A maioria dos casos de câncer de pele se encontra na categoria não melanoma, que são representados principalmente pelo carcinoma basocelular e carcinoma epidermoide (INCA, 2022). Essas células neoplásicas malignas possuem baixa capacidade metastática, diferentemente do câncer de pele do tipo melanoma que possui alto potencial metastático (FERRY et al., 2020).

O melanoma é um tipo de câncer de pele resultante da transformação maligna dos melanócitos (MÂNICA et al., 2019). Os melanócitos são células responsáveis pela produção de pigmentos, originam-se da crista neural e migram para a pele, trato uveal, meninges e mucosas. A maioria dos melanócitos estão localizados principalmente na junção dérmica-epidérmica da pele, sendo a maioria dos melanócitos originados de locais cutâneos (KOZOVSKA; GABRISOVA; KUCEROVA, 2016). As mutações mais frequentes encontradas no melanoma são nas serina/treonina quinase – BRAF em 50%, em seguida na GTPase NRAS (25%) e no supressor de tumor e regulador de RAS neurofibromina 1 (NF1) onde ambos conduzem ao aumento da proliferação e sobrevivência das células (TCGA, 2015).

O melanoma costuma ser inicialmente diagnosticado em pacientes por um dermatologista utilizando os critérios ABCDEF. Esses critérios são: (A) assimetria; (B) bordas irregulares; (C) cor variável; (D) diâmetro superior a 6mm; (E) evolução, quando a lesão se modifica e apresenta mudanças de tamanho, cor ou formato; (F) *funny looking* “aparência engraçada”, em que um nevo maligno não se encontra nos perfis comuns de nevos achadados em um paciente. Esses parâmetros são utilizados com o intuito de diferenciar uma lesão benigna ou maligna (JENSEN; ELEWSKI, 2015).

Em escala global, as taxas de incidência de melanoma cutâneo apresentam uma variação de até 100 vezes entre as diferentes populações. As taxas mais elevadas a nível mundial são relatadas na Nova Zelândia e Austrália, atingindo entre homens 42 casos por 100.000 indivíduos/ano e as mulheres 31 casos por 100.000 indivíduos/ano (IARC, GLOBOCAN 2020). O melanoma cutâneo ocorre principalmente na população com idade entre 40 e 60 anos, mas também pode acometer adolescentes e idosos de idade avançada (≥ 80 anos) (GARBE et al., 2012). Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) do Brasil para o ano de 2020, revelaram taxas de incidência de melanoma de 4,03 novos casos por ano por 100.000 habitantes para homens e 3,94 para mulheres. Porém, são poucos os dados de mortalidade para diferentes regiões do Brasil e são influenciados pela subnotificação (NADER et al., 2020).

Apesar disso, segundo Milac e Negroiu (2018), a incidência do melanoma aumentou de forma global nos últimos 30 anos, e mesmo apesar de estar entre os tipos de cânceres de pele menos frequente (4% e 7%), é a forma mais agressiva, com uma taxa de mortalidade em torno de 80%. Isso se deve à sua alta capacidade metastática e rápida progressão para outros tecidos e órgãos como cérebro e pulmão. Dessa forma, o melanoma passou a se apresentar como um grande problema de saúde pública. A detecção da doença em estágio inicial pode ser tratada com sucesso, no entanto em estágio avançado, que progrediu para outros órgãos, apresenta um péssimo prognóstico, com uma sobrevida média de menos de 10 meses (KALAL et al., 2017).

Os modelos experimentais que reproduzam o desenvolvimento e a evolução de doenças humanas, são fundamentais para preencher a lacuna entre a pesquisa fundamental e a terapia médica. São poucos os modelos animais para a metástase tumoral, no entanto, a utilização da linhagem de melanoma

murino B16 é um modelo de estudo muito popular para a progressão tumoral (POSTE et al., 1982; EDDY; SHAH; CHEN, 2021). A linhagem celular parental B16-F0 originou-se a partir de camundongo C57BL/6 que desenvolveu espontaneamente lesões e posteriormente foi adaptada para crescer em condições de cultura celular (FIDLER, NICOLSON, 1976; POSTE et al., 1982). Já as linhagens celulares tumorais variantes de melanoma murino B16, como a linhagem B16-F1 foi resultante de procedimento seletivo único, ou seja, proveniente de metástases pulmonares, através da inoculação de células B16-F0 em camundongos C57BL/6 que sofreu uma única seleção *in vivo*.

Por outro lado, a linhagem B16-F10 foi derivada de procedimento seletivo de 10 passagens de colônias pulmonares. A linhagem B16-F10 apresenta maior capacidade de sobrevivência e potencial de crescimento *in vivo*, quando comparado com a linhagem B16-F1 e B16-F0 (FIDLER, NICOLSON, 1976; NAKAMURA et al., 2002). Portanto, a escolha da linhagem deve ser realizada conforme o objetivo do estudo. A linhagem B16-F1 que possui menor capacidade metastática em relação a B16-F10, é uma boa aliada quando se quer investigar a progressão tumoral e a linhagem B16-F10 para estudos que tem como objetivo avaliar a regressão tumoral, a qual pode também ser empregada nos estudos *in vitro* e *in vivo* como um controle positivo de malignidade.

2.5 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Atualmente, as opções terapêuticas para pacientes com melanoma são as excisões cirúrgicas e diferentes modalidades de tratamentos, como a quimioterapia, imunoterapia, terapia tópica, nanotecnologia e a terapia direcionada (Figura 5) (DOMINGUES et al., 2018; MISHRA et al., 2018).

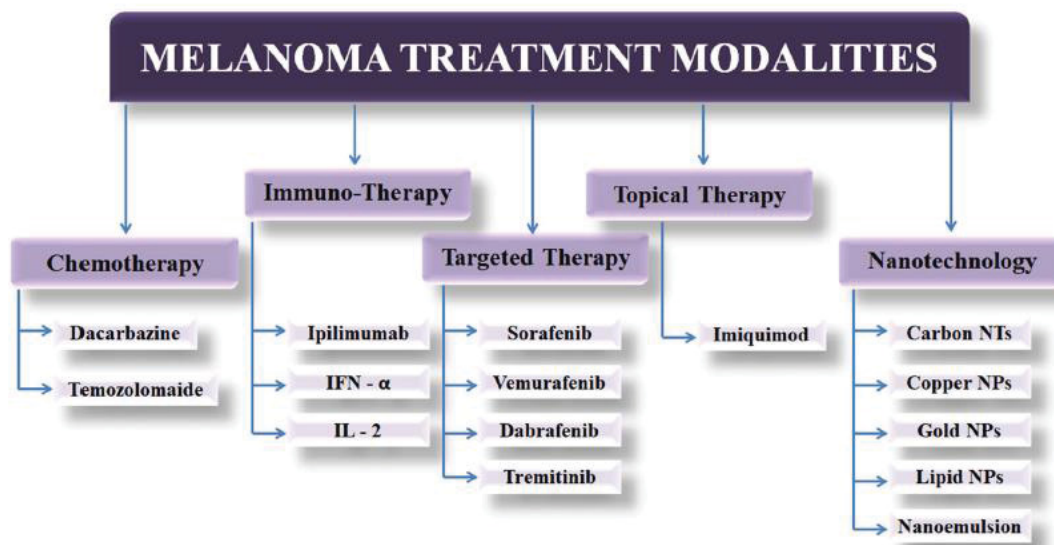


Figura 5. Diferentes tipos de tratamento de melanoma. Do convencional à nanotecnologia. FONTE: Mishra et al. (2018).

A excisão cirúrgica do tumor primário não metastático de melanoma, continua sendo o padrão ouro da terapia (BALDEA; IOANA, 2012). Após o surgimento de metástases, o melanoma torna-se altamente resistente à rádio e quimioterapia convencionais. Porém, a quimioterapia com a dacarbazina segue sendo a opção de tratamento padrão, que possui taxa de resposta limitada, relativamente baixa em pacientes, em torno de 15 % (BHATIA; TYKODI; THOMPSON, 2009). A dacarbazina é um agente alquilante que forma adutos de DNA e apresenta efeitos citotóxicos nas células. No fígado, a dacarbazina é metabolizada e sofre conversão em seu metabólito intermediário, 3-metil-(triazen-1-il) imidazol-4-carboxamida (MTIC) (BAJETTA et al., 2002; LI; MCCLAY, 2002; NEWLANDS et al., 1997).

A quimioterapia utilizando temozolomida (TMZ) ou dacarbazina (DTIC), são frequentemente usadas em pacientes com melanoma em estágio avançado com a doença em condição progressiva ou recidiva (KIM et al., 2010). A dacarbazina foi a primeira quimioterapia aprovada para melanoma, que por sua vez, continua em uso em países de baixa e média renda, como no Brasil, apesar dos diferentes efeitos adversos (AL-BADR et al., 2016; BRASIL, 2013; CORRÊA et al., 2019; DOMINGUES et al., 2018; GUERRA et al., 2019).

O principal tratamento disponibilizado pelo sistema público de saúde brasileiro para pacientes com melanoma metastático, dispõe da quimioterapia com a dacarbazina, como a primeira linha de tratamento sistêmico (BRASIL,

2013). Estudos de fase II relatam que a dacarbazina produz respostas objetivas em torno de 5-12%. A maioria das respostas com a dacarbazina e também com seu análogo oral, a temozolomida, são temporárias. A porcentagem dos pacientes que alcançam uma resposta duradoura a quimioterapia são baixas entre 1-2 % (AVRIL et al., 2004; EIGENTLER et al., 2003; SCHADENDORF et al., 2006).

Diferentes estratégias foram efetuadas para comparar a resposta de sobrevida global por melanoma metastático com medicamentos comercializados no Brasil. Alguns fármacos como a fotemustina e outros agentes quimioterápicos foram testados sozinhos ou em combinação em Ensaios Clínicos Randomizados (ECR) de fase III (cisplatina, carmustina e tamoxifeno), ambos não demonstraram o benefício de sobrevida global em comparação com dacarbazina como agente único (AVRIL et al., 2004; SCHADENDORF et al., 2006). O uso de vemurafenibe e ipilimumabe também não apresentaram evidências de melhora em termos de sobrevida global para pacientes com melanoma disseminado (CHAPMAN et al., 2011; HODI et al., 2010; ROBERT et al., 2011). A temozolamida, apresentou resultado igualmente eficaz à dacarbazina, porém seu custo é muito elevado comparado à dacarbazina, e conseqüentemente, o Ministério da Saúde não recomenda o uso desse quimioterápico para o melanoma metastático (BRASIL, 2013).

A abordagem de bioquimioterapia empregando a combinação de agentes quimioterápicos como vimblastina, cisplatina e dacarbazina com IFN ou IL-2 aumentaram as taxas de respostas. No entanto, não teve um impacto substancial na sobrevida global em comparação com a quimioterapia isolada, conforme indicado pelos ECRs de fase II e III (BAJETTA et al., 2006; RIDOLFI et al., 2002). Contudo, nenhum dos medicamentos ou a combinação de medicamentos comercializados no Brasil, comprovadamente, causa o aumento das taxas de sobrevida global de melanoma metastático. Dentre os medicamentos disponíveis, nenhum tratamento demonstrou-se em ECRs ou em meta-análises mais eficiente do que a dacarbazina. Dessa forma, o uso da dacarbazina é recomendado como primeira linha de tratamento sistêmico no Brasil, em pacientes com condições clínicas de suportar a quimioterapia (BRASIL, 2013).

2.6 TRANSPORTADORES ABC

Os transportadores ABC pertencem a superfamília de proteínas constituídas de sete subfamílias (ABCA-G). São responsáveis pela translocação de substratos do meio intracelular para o meio extracelular através da membrana plasmática. A ligação de ATP gera uma importante mudança conformacional nas proteínas resultando no efluxo de diferentes substratos (DEAN; RZHETSKY; ALLIKMETS, 2001; ZOLNERCIKS et al., 2011). Alguns dos substratos translocados pelos transportadores ABC são substâncias endógenas como os fosfolípidios, glicolipídios, ânions inorgânicos, vitaminas, molécula pró-inflamatória como o leucotrieno, glutathione oxidada (GSSH), moléculas sinalizadoras na biologia tumoral, xenobióticos e drogas anticâncer (COLE, 2014; FLETCHER et al., 2010; JONES; GEORGE, 2004).

Os transportadores ABC também são responsáveis pela resistência das células neoplásicas ao tratamento quimioterápico, denominado como resistência a múltiplas drogas, uma vez que essas proteínas são capazes de transportar drogas quimioterápicas das células, reduzindo a eficiência ou sensibilidade das células ao tratamento (Figura 6). A superexpressão ou ativação dos transportadores ABC é apontado como um das principais causas responsáveis pelo fracasso do tratamento do câncer, resultando na redução da concentração do quimioterápico nas células (GILLET; GOTTESMAN, 2010; HOUSMAN et al., 2014; MOITRA, 2015).

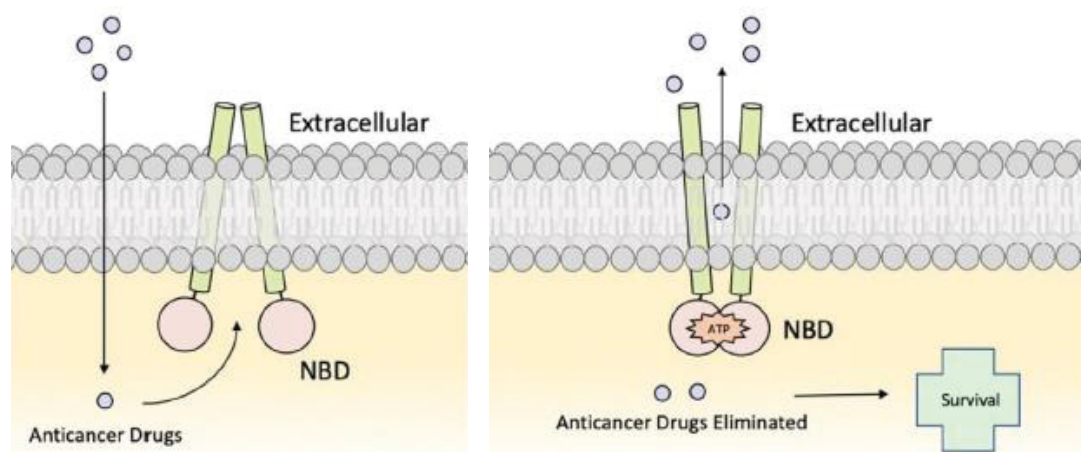


Figura 6. Mecanismo hipotético do transporte de drogas anticâncer pelos transportadores ABC, resultando na redução da concentração do fármaco intracelular e sobrevivência celular de células cancerígenas. FONTE: Wang et al. (2021).

O melanoma é um dos tipos de câncer resistente a radioterapia e quimioterapia convencionais, e superexpressam transportadores ABC que transportam drogas anticâncer das células, como o ABCA9, ABCB1, ABCB5, ABCB8, ABCC1, ABCC2 e ABCD1 e conseqüentemente, podem ser associados à resistência ao tratamento. (CHEN et al., 2009). A exposição repetida de células de melanoma ao quimioterápico dacarbazina, enriqueceu as culturas com células de melanoma quimiorresistentes (BITEGHE et al., 2020). A quimioterapia anti-melanoma com o tratamento de referência do melanoma metastático como a dacarbazina, mas também a outros drogas quimioterapicas como vemurafenib, pode resultar na quimiorresistência, através da seleção de subpopulações de células que expressam ABCB5. As células que expressam ABCB5 sobrevivem seletivamente quando expostas a dacarbazina (CHARTRAIN et al., 2012).

O transportador ABCC4 também é expresso em células de melanoma (HEIMERL et al., 2007), porém, não há indícios conclusivos para estabelecer uma ligação direta entre esse transportador e a resistência a medicamentos em tumores sólidos, apesar de estar presente em diferentes linhagens celulares de câncer humano resistente a medicamentos (BORST et al., 2007; KOOL et al., 1997). Contudo, o papel dos transportadores ABC é amplo, estudos indicam que os transportadores ABC podem estar envolvidos em diferentes *hallmarks* do câncer, abrangendo a proliferação, migração, invasão, angiogênese, apoptose e vias de inflamação (WANG et al., 2021).

2.7 VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs)

As vesículas extracelulares (VEs) são estruturas de membrana derivadas de células e são classificadas pelo menos em duas classes principais: exossomos (SEVs – *small extracellular vesicles*) e microvesículas (LEVs – *Large extracellular vesicles*). Os exossomos são secretadas por exocitose após a fusão de endossomos com a membrana plasmática, gerados a partir de três etapas: biogênese, transporte e liberação. Essas vesículas variam seu tamanho entre 40 a 150 nm de diâmetro. Quinases e uma chaperona específica de quinase CDC37 são as principais moléculas envolvidas na biogênese e secreção de exossomos. Por outro lado, as microvesículas são liberadas da membrana plasmática, formadas por brotamento direto e desprendimento da membrana plasmática, e seu tamanho varia entre 150 nm a 1000 nm (Figura 7). Ambas, são fundamentais para a comunicação intercelular e sinalização. As VEs carregam uma variedade de moléculas como proteínas, RNA, fragmentos de DNA, lipídeos, entre outros (KALLURI; LEBLEU, 2020; SHETA et al., 2023; STAHL; RAPOSO, 2019; VAN NIEL et al., 2018; XU et al., 2018).

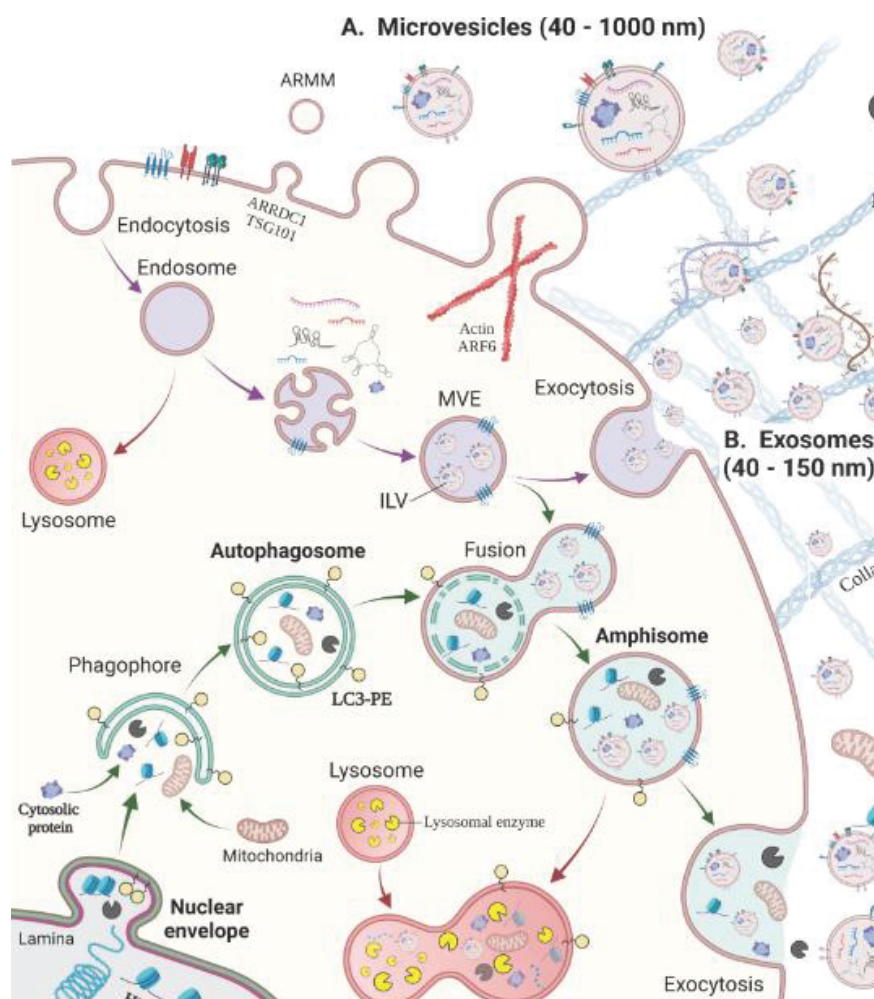


Figura 7. Biogênese de exossomos e microvesículas. (A) Microvesículas (40-1000 nm) são provenientes do brotamento e desprendimento externo da membrana plasmática. (B) Exossomos (40-150 nm) são secretados por exocitose de vesículas intraluminais (ILVs) pela fusão pela fusão da membrana plasmática com endossomos multivesiculares (MVE) com a membrana plasmática da célula, para o meio extracelular (seta roxa). FONTE: Adaptado de Sheta et al. (2023).

A proteína S-palmitoilase auxilia na classificação das proteínas para as VEs, bem como, na entrega para as células receptoras. A palmitoilação confere uma maior hidrofobicidade às proteínas permitindo a sua associação com as membranas lipídicas das VEs e das células (EGUCHI et al., 2022; SHETA et al., 2023). As VEs são secretadas por diversos tipos de células eucariotas *in vitro* e também foram detectadas em diferentes fluidos corporais como no sangue, saliva, urina, bile, leite materno, lacrimal, seminal e também nas fezes (KOSAKA; IGUCHI; OCHIYA, 2010; RAPOSO; STOORVOGEL, 2013; WITWER et al., 2013). O papel desenvolvido por essas estruturas são recorrentes tanto na fisiologia normal quanto na patologia. Alguns dos diferentes processos

fisiológicos normais em que as VEs participam incluem, a diferenciação de células-tronco, regeneração tecidual, angiogênese, autofagia, coagulação sanguínea, imunidade inata e/ou adquirida e imunomodulação (Baixauli et al., 2014; GREENING et al., 2015; HEIJNEN et al., 1999; NAIR et al., 2014; ROBBINS et al., 2014; TENG et al., 2015).

As VEs também estão envolvidas em processos patológicos como na malignidade e progressão do câncer (BEBELMAN et al., 2018), e, portanto, apresentam um papel crucial na comunicação entre células tumorais e células estromais no microambiente local e também distante, o que favorece o desenvolvimento tanto do tumor primário como também no avanço metastático. Além disso, atuam em diferentes fatores de desenvolvimento do câncer como no crescimento sustentado, invasão, alteração do fenótipo do microambiente tumoral e ainda, favorece o desenvolvimento do nicho pré-metastático (BECKER et al., 2016; XU et al., 2018).

As VEs podem induzir mediadores responsáveis pelos processos inflamatórios, como por exemplo TGF- β , TNF- α , S100, IL-6 e IL-8, após os exossomos serem secretados pelo tumor e capturadas pelas células receptoras. Ocasionalmente a ativação e o remodelamento de células estromais e também o recrutamento de células derivadas da medula óssea (fibroblastos, células endoteliais, macrófagos e diversas populações de células provenientes da medula óssea) para o nicho pré-metastático (BECKER et al., 2016; COSTA-SILVA et al., 2015; PEINADO et al., 2012).

Mediante o crescimento e desenvolvimento do tumor surge como consequência a baixa concentração de oxigênio (hipóxia) das células no microambiente tumoral. Para reverter esse quadro, o tumor secreta fatores angiogênicos, onde as VEs exercem um papel fundamental para a progressão do câncer, estimulando o recrutamento de vasos sanguíneos. As VEs provenientes do tumor primário podem modular fatores envolvidos na transição epitélio mesenquimal promovendo a perda de adesão das células tumorais, a remodelação da matriz extracelular e das metaloproteases de matriz (MMPs). Em conjunto, esses fatores resultam na liberação de células tumorais na circulação e conseqüentemente a disseminação para locais distantes (BECKER et al., 2016). Os exossomos provenientes do melanoma podem modular as células derivadas da medula óssea, para auxiliar e formar um nicho pré-

metastático no pulmão. Também podem estabelecer a formação de nicho pré-metastático de linfonodos, resultando no recrutamento de células de melanoma, proliferação vascular de linfonodos, bem como na deposição de matriz extracelular (BECKER et al., 2016; HOOD et al., 2011).

3 JUSTIFICATIVA

O BDE-209 pertence a classe dos éteres difenil polibromados (PBDEs), são compostos aditivos utilizados como retardante de chamas, sendo vastamente utilizados pelas indústrias em vários produtos utilizados pela sociedade. Ao longo dos anos o uso dessa molécula se intensificou, sendo considerado atualmente como um composto onipresente no ambiente natural bem como no ambiente doméstico e de trabalho, onde nesses casos, a inalação da poeira é uma das principais formas de exposição humana.

Além disso, os PBDEs podem estar presentes na água, no solo, no ar e nos alimentos, sendo esse último o mais preocupante, pois é um tipo de exposição crônica e em concentrações que muitas vezes extrapolam o controle das agências responsáveis por esse tipo de avaliação. A exposição humana ao BDE-209 inicia na vida uterina, continua durante a amamentação e persiste ao longo da vida adulta através do alimento e da poeira, entre outras fontes.

O nosso grupo de pesquisa do laboratório de Toxicologia Celular – UFPR realiza estudos nos últimos 30 anos, sobre a ação de diversos contaminantes ambientais tanto *in vitro* como *in vivo*. No entanto, mais recentemente (12 anos), o grupo se interessou por avaliar se a exposição de células tumorais a alguns tipos de poluentes orgânicos poderia interferir com o fenótipo dessas células, tornando-as mais agressivas que o normal. Essa nova linha de investigação vem de encontro ao fato de que ocorre o aumento da liberação de diversas moléculas para o ambiente, da mesma forma que há um agravamento do crescente índice de câncer nas últimas décadas. Controlar essa doença é um dos grandes desafios da medicina moderna, e todo tipo de abordagem que venha agregar informações nesse contexto, é de grande relevância para a saúde pública.

Entretanto, o estudo de poluentes ambientais que afetam a malignidade e progressão do câncer é uma abordagem original e emergente, o qual há muito a ser investigado. Diante disso, buscamos nesse trabalho fechar algumas questões referentes ao efeito do BDE-209 em células do melanoma murino que surgiram com nossos estudos prévios. Nesse caso, foram inoculados em camundongos Black C57BL/6 uma linhagem celular de melanoma murino (B16-F1) menos agressiva e de menor índice metastático, previamente exposta a diferentes e baixas concentrações de BDE-209.

4 HIPÓTESE

4.1 Exposições em células B16-F1 de melanoma murino ao BDE-209 e posterior inoculação das células em camundongos, desenvolvem alterações fenotípicas que favorecem o desenvolvimento e a progressão de metástase pulmonar de melanoma *in vivo*.

4.2 Exposição de células B16-F1 ao BDE-209 favorece o desenvolvimento de metástase pulmonar *in vivo*, mesmo sob condições de tratamento quimioterápico, modificando negativamente o prognóstico da doença.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Investigar se a exposição *in vitro* a concentrações ambientalmente relevantes de BDE-209 em células de melanoma murino (B16-F1) durante 15 dias, seguida da inoculação das células tratadas em camundongos Black C57BL/6, pode interferir na malignidade, progressão e no prognóstico do câncer de melanoma.

5.2 Objetivos específicos

CAPÍTULO I

I. Investigar se a exposição crônica do BDE-209 às células B16-F1 inoculadas em camundongos Black da linhagem C57BL/6 pode interferir no aumento de metástases e progressão tumoral;

II. Avaliar através de parâmetros hematológicos e biomarcadores bioquímicos a condição de saúde dos animais inoculados com células B16-F1 após exposição crônica ao BDE-209;

III. Quantificar a progressão tumoral da área colonizada por metástases do pulmão dos camundongos, após exposição de células B16-F1 ao BDE-209 seguida de inoculação e metástase experimental;

V. Realizar análises histológicas do pulmão e de outros órgãos como do cérebro, fígado e rim, para verificar a invasividade e dispersão das células de melanoma murino, após a exposição ao BDE-209 e metástase experimental;

VI. Analisar a expressão gênica de alvos moleculares relacionados com a progressão do câncer, como de Metaloproteinases de Matriz (*Mmp2*, *Mmp9* e *Mmp14*) e supressores tumorais como *Timp3* e *Reck*;

VII. Análise do infiltrado de células imunológicas através da marcação de linfócitos e neutrófilos através de ensaio de imunofluorescência do pulmão dos camundongos.

CAPÍTULO II

I. Investigar se a exposição crônica do BDE-209 às células B16-F1 inoculadas em camundongos Black da linhagem C57BL/6 interferem com a expressão de moléculas relacionadas a malignidade e progressão do câncer de melanoma e tratamento quimioterápico;

II. Avaliar os efeitos na saúde dos animais através de biomarcadores bioquímicos em tecidos-alvo e dados dos parâmetros somáticos, após a inoculação de células B16-F1 em exposição crônica ao BDE-209 e posterior inoculação nos animais;

III. Detectar e caracterizar as vesículas extracelulares no plasma do sangue dos camundongos, após a inoculação de células B16-F1 expostas ao BDE-209;

IV. Avaliar se a exposição crônica ao BDE-209 em células B16-F1 inoculadas em camundongos Black da linhagem C57BL/6 pode interferir no tratamento quimioterápico, na área colonizada por metástases e crescimento tumoral pulmonar;

V. Analisar a expressão gênica de alvos relacionado com a malignidade e progressão do câncer (*Mmp2*, *Mmp9*, *Mmp14* e *Timp3*), bem como na resistência ao tratamento quimioterápico (*Abcb1*, *Abcc1*, *Abcc4*);

VI. Quantificar a expressão de proteínas específicas envolvidas no agravamento do câncer, como de Metaloproteinases de Matriz.

6 ABORDAGEM EXPERIMENTAL

Os experimentos foram encaminhados ao Comitê de Ética para Experimentação Animal do SCB/UFPR e aprovados sob registro no. 1362 em 21/07/2020. Para os ensaios *in vivo*, os camundongos (fêmeas) da linhagem Black C57BL/6 foram adquiridos no Biotério do Instituto Carlos Chagas – ICC/PR e mantidos no biotério do Setor de Ciências Biológicas/UFPR. O estudo desenvolvido foi dividido em duas fases.

O desenho experimental foi realizado da seguinte forma: Fase I - células tumorais de melanoma murino B16-F1 foram expostas durante 15 dias ao BDE-209 (Figura 8), com concentrações baseadas em amostras biológicas humanas, e seus respectivos controles. Após o fim da exposição de 15 dias ao BDE-209, os animais foram submetidos ao ensaio de crescimento tumoral e metástase, segundo Shimada et al. (2018) (20 dias), onde as células B16-F1 previamente expostas foram inoculadas pela veia caudal em camundongos Black da linhagem C57BL/6 com 7 semanas de idade (Figura 9).

Na fase II, o desenho experimental foi realizado da mesma forma que na fase I, porém com o acréscimo da administração do tratamento quimioterápico *in vivo* com a Dacarbazina (Figura 8 e Figura 10). O tratamento iniciou-se após o quinto dia da inoculação das células B16-F1. A aplicação do quimioterápico foi realizada via intraperitoneal (40 mg.Kg^{-1}), a cada três dias após a primeira aplicação, totalizando em 5 aplicações. Ao final dos 20 dias de metástase experimental, os animais foram eutanasiados e então coletado o sangue, pulmão, cérebro, fígado e rim para as análises biológicas.

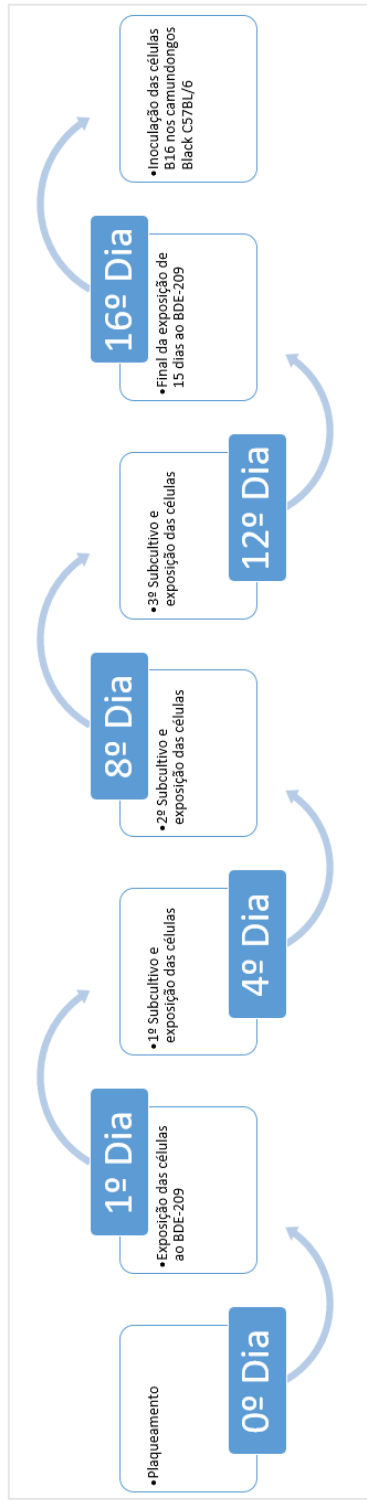


Figura 8. Abordagem experimental das células de melanoma murino (B16-F1), expostas 15 dias ao BDE-209. Fonte: a autora (2019).

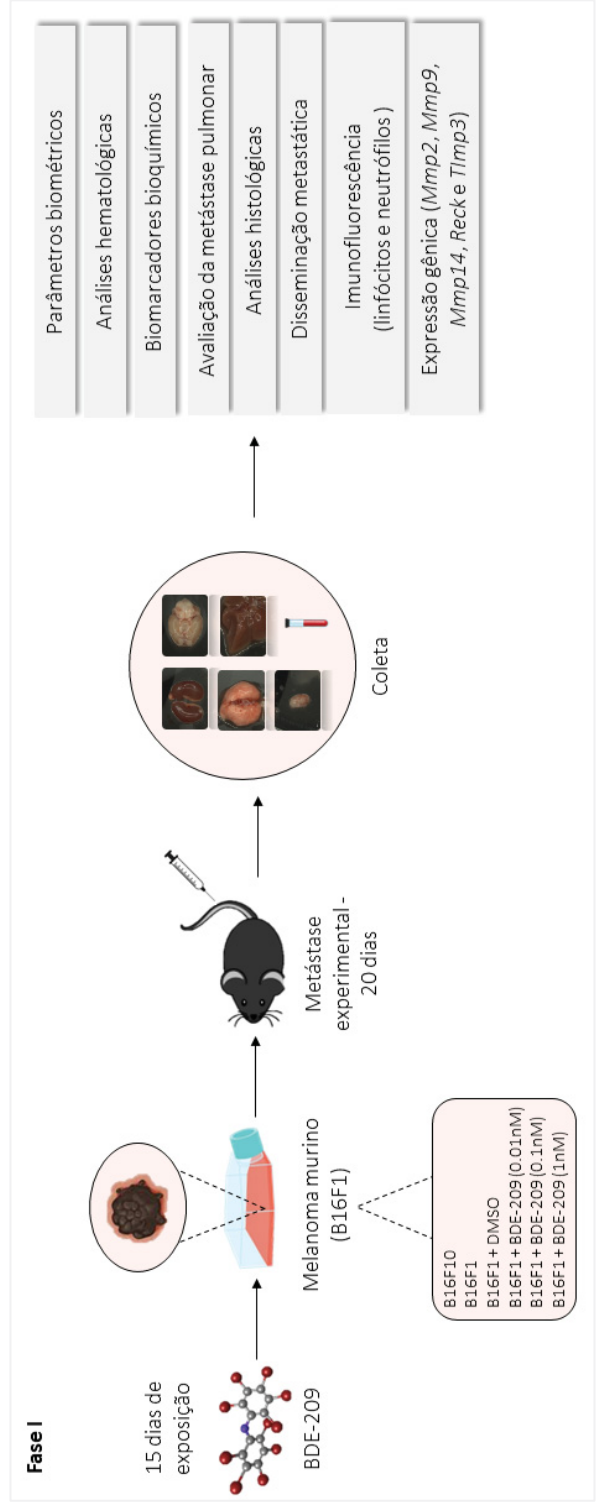


Figura 9. Fluxograma da abordagem experimental desenvolvida no estudo - Fase I. FONTE: a autora (2023).

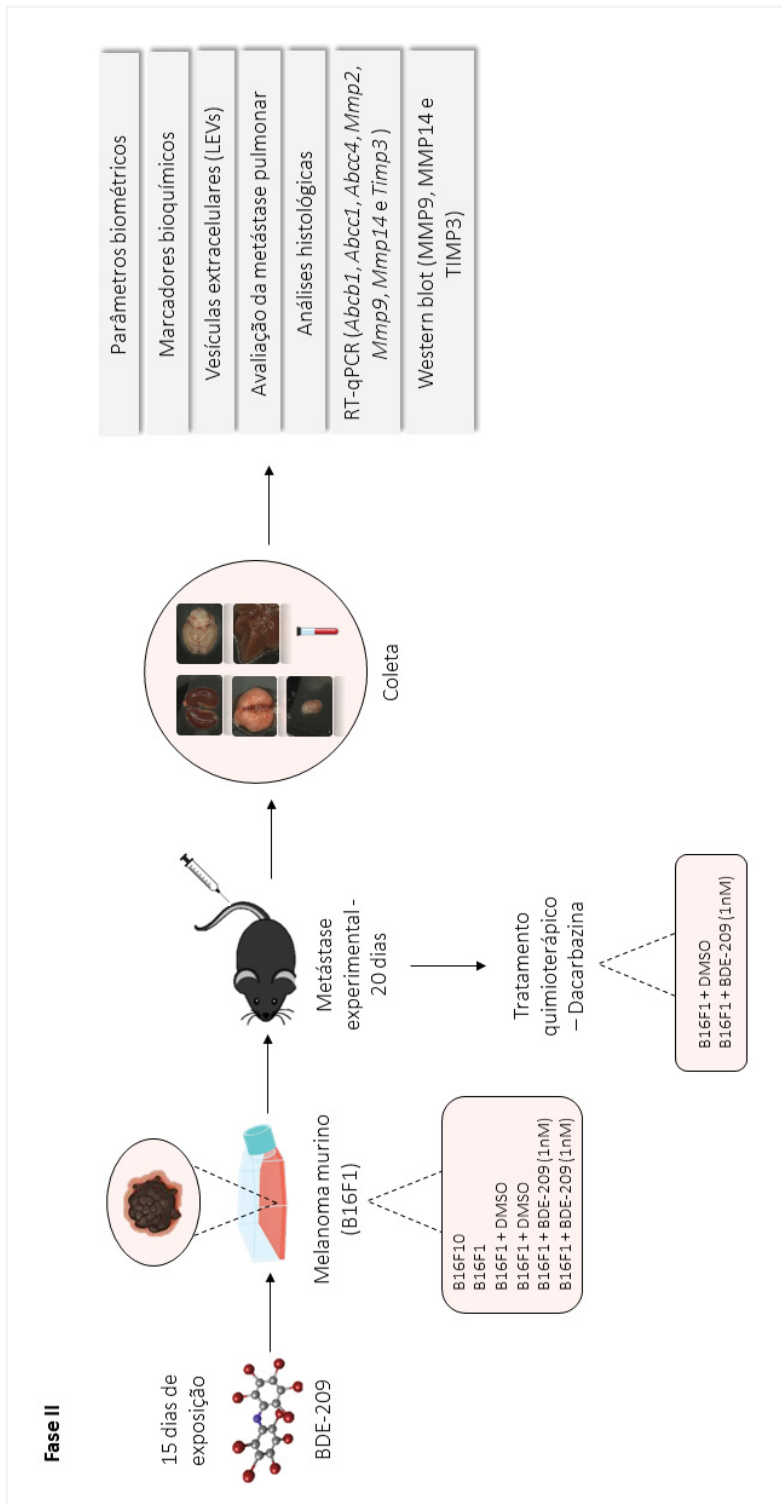


Figura 10. Fluxograma da abordagem experimental desenvolvida no estudo - Fase II. FONTE: a autora (2023).

CAPÍTULO I

**A exposição ao BDE-209 em células de melanoma murino (B16-F1)
modula a malignidade e a progressão tumoral *in vivo***

RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer de pele considerado agressivo devido a sua alta capacidade metastática e rápida progressão para outros tecidos e órgãos. 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-deca-bromodifenil éter (BDE-209) é um aditivo utilizado como retardante de chamas, classificado como um poluente orgânico persistente e apresenta a capacidade de bioacumulação devido à sua natureza lipofílica. Essa substância já foi detectada em rios, ar, solo, plantas e até mesmo em diferentes tipos de amostras biológicas humanas, tornando-se motivo de preocupação em termos de saúde pública. Assim, no presente estudo investigamos se as células de melanoma murino (B16-F1) previamente expostas ao BDE-209 modulam *in vivo* a progressão e malignidade do melanoma. Primeiramente, as células B16-F1 foram expostas durante 15 dias às concentrações de exposição (0,01, 0,1 e 1 nM) para serem, posteriormente, inoculadas em camundongos Black C57BL/6 via veia caudal e analisados após 20 dias de metástase experimental. As células B16-F1 expostas ao BDE-209 resultaram em um aumento significativo da área colonizada por metástase nos pulmões de camundongos em 82%. A regulação negativa da expressão gênica de supressores tumorais como de *Timp3* e *Reck* em pulmões colonizados por metástases de melanoma, a diminuição da peroxidação lipídica e o aumento da resposta inflamatória sistêmica e local também foram observados. Esses achados favorecem o desenvolvimento do melanoma. Adicionalmente, os achados histopatológicos revelam uma maior quantidade de pontos focais de metástases nos pulmões e também uma maior invasividade para o cérebro (88,8%). Estes resultados mostram que o BDE-209 pode alterar o fenótipo das células B16-F1 e agravar o perfil metastático *in vivo*. Os dados atuais sugerem que o BDE-209 pode interferir no prognóstico do câncer de melanoma, modulando as células com menor capacidade de invasividade para um perfil mais agressivo.

Palavras-chave: Poluentes emergentes. Deca-BDE. C57BL/6. Progressão do câncer; *Timp3*. *Reck*.

ABSTRACT

Melanoma is a type of skin cancer considered aggressive due to its high metastatic ability and rapid progression to other tissues and organs. 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodiphenyl ether (BDE-209) is an additive used as a flame retardant and classified as a persistent organic pollutant and present a high bioaccumulation capacity due to its lipophilic nature. This substance has already been detected in rivers, air, soil, plants and even in different human biological samples as plasma, umbilical cord blood and breast milk, revealing a great concern to human populations. Thus, in the current study we investigated if B16-F1 cells previously exposed to BDE-209 modulate *in vivo* the progression and malignancy of melanoma. The exposure concentrations (0.01, 0.1 e 1 nM) were first exposed to murine melanoma cells for 15 days to be inoculated subsequently in Black C57BL/6 mice via caudal vein, and analyzed after 20 days for experimental metastasis. B16-F1 cells exposure preciously to BDE-209 resulted in a significant increase of metastasis colonized area in the lungs of mice by 82 %. Downregulation gene expression of tumor suppressors such as *Timp3* and *Reck* in lung colonized by melanoma metastases, decrease of lipid peroxidation and increased systemic and local inflammatory response were also observed. These findings are related to melanoma progression. Additionally, the histopathological analysis reveals the greater number of focal points of metastases in the lungs and the greater invasiveness of metastases to brain (88.8 %). The results showed that the previously BDE-209 exposure may change the phenotypic of B16-F1 cells worsen the metastatic profile. Current data showed that BDE-209 may interfere with the prognosis of melanoma cancer modulating cells with less invasiveness capacity to a more aggressive profile.

Keywords: Emerging pollutants. Deca-BDE. C57BL/6. Cancer progression. *Timp3*. *Reck*.

1 INTRODUÇÃO

O panorama de investigação sobre a exposição ambiental dos produtos químicos à população humana está em constante mudança a medida que surgem novos produtos químicos, os níveis de produção mudam e as políticas são implementadas (HOFFMAN et al., 2021). Os éteres difenílicos polibromados (PBDEs) são compostos retardadores de chama bromados (BFRs), aditivos principalmente em plásticos e outros produtos industrializados, que volatilizam facilmente para o meio ambiente (YANG et al., 2018). Também é utilizado em produtos eletrônicos, materiais de construção, espuma, móveis, peças automotivas ou têxteis. Dentre os PBDEs, o éter decabromodifenílico (BDE-209) é um dos BFRs mais importantes introduzidos industrialmente, na década de 1970 (ABDALLAH et al., 2009; CHEN et al., 2012). Em 2017, durante a Convenção de Estocolmo, esse composto foi incluído na lista de poluentes orgânicos persistentes (POPs), como um produto químico altamente persistente, bioacumulável, tóxico e de dispersão a longas distâncias (GARCÍA-FERNÁNDEZ, 2014).

A exposição humana não ocupacional aos BFRs ocorre principalmente por meio da ingestão de poeira, absorção dérmica ou dieta (ABDALLAH et al., 2008; ABDALLAH et al., 2015; FREDERIKSEN et al., 2009; WATKINS et al., 2011; HOFFMAN et al., 2017). Em ambientes externos, o BDE-209 foi detectado no solo (CHOU et al., 2019), no ar (PALM et al., 2014), em animais selvagens (NELSON et al., 2015) ou em plantas comestíveis (YANG et al., 2018). A exposição humana é confirmada pela presença de BDE-209 em amostras biológicas humanas como no sangue de placenta (LEONETTI et al., 2016), leite materno (MATOVU et al., 2019; WEMKEN et al., 2020) e sangue de crianças de 9 a 11 anos (LINK et al., 2012).

Estudos com populações humanas relatam que a exposição ao BDE-209 está correlacionada com a ocorrência de alguns tipos de câncer, pela proliferação de células tumorais no sistema reprodutor feminino, bem como na diminuição nos eventos de apoptose induzida (LI et al., 2012). De acordo com Hoffman et al. (2017), a exposição ao BDE-209 através da poeira de ambientes internos, foi associada à ocorrência do câncer de tireoide papilar, enquanto He

et al. (2018) descreveram o acúmulo de PBDEs no tecido adiposo com o risco de câncer de mama em mulheres chinesas.

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer cita alguns dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer, como álcool, hábito alimentar, tabaco, radiação, exposição ocupacional, bem como exposição ambiental (IARC, 2023). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (2018) entre 80% e 90% dos casos de câncer estão associados a causas externas. Diferentes fatores como qualidade do ar, alimentação, estilo de vida e exposição ocupacional podem causar o surgimento de diferentes tipos de câncer, incluindo o melanoma. Esse tipo de câncer de pele é resultante da transformação maligna das células dos melanócitos (MÂNICA et al., 2019; SHAIN; BASTIAN 2016). Devido à sua alta capacidade metastática e rápida progressão para outros tecidos e órgãos, o melanoma é o câncer de pele com maior taxa de mortalidade (GARBE et al., 2016; MILAC; NEGROIU, 2018).

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram que misturas de herbicidas com poluentes orgânicos (SALGADO et al., 2018), BDE-209 (SILVA FILHO, et al., 2021) e misturas de pesticidas com seus principais metabólitos (ROQUE et al., 2022) são moduladores do fenótipo de células B16-F1 para um perfil mais agressivo e metastático. Além disso, os estudos de Brito et al. (2021) revelam que camundongos Black C57BL/6 expostos diariamente ao BDE-209, e posteriormente inoculados com as células B16-F10 tiveram um aumento na dispersão de metástases de forma dose-dependente. Mais recentemente, Almeida Roque et al. (2023) mostram que a exposição de células B16-F1 a misturas complexas de pesticidas foi capaz de modular a linhagem de células monocíticas de leucemia humana (THP-1) para o fenótipo tipo M2 de macrófago pró-tumoral.

Todos esses resultados apresentados reforçam a necessidade de aprofundar as investigações sobre o papel dos poluentes orgânicos persistentes na malignidade e progressão do câncer, incluindo sua capacidade de modulação em interferir negativamente no prognóstico da doença. Portanto, o principal objetivo desse estudo foi avaliar se as alterações fenotípicas previamente encontradas em células de melanoma murino (B16-F1), devido à exposição ao BDE-209 (SILVA FILHO et al., 2022), podem alterar a dispersão metastática e

colonização *in vivo* pelo método de metástase experimental, através da inoculação dessas células via veia caudal em camundongos Black C57BL/6.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PREPARAÇÃO DE ÉTER DECABROMODIFENÍLICO (BDE-209)

Soluções estoque BDE-209 ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) foram preparadas em Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich), diluídas em Tampão Salino Fosfatado (PBS) para estoques concentrados em 500x (BDE-209: 5, 50 e 500 nM) e mantido a -20°C . A concentração intermediária de BDE-209 (0,1 nM) foi escolhida com base em dados relatados em amostras de tecido humano, conforme descrito em trabalho anterior (SILVA FILHO et al., 2022) e concentrações 10 vezes menores (0,01 nM) e maiores (1 nM) do BDE-209 foram estabelecidos. A concentração de 0,05 % de DMSO foi utilizada.

2.2 CULTIVO DE CÉLULAS B16

Células de melanoma murino B16-F1 e B16-F10 (Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil) foram cultivadas em meio de DMEM alta glicose, sem glutamina (DMEM, Cultilab), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS, Sigma- Aldrich), 1% GlutaMAX™ (Gibco), 40 mg L⁻¹ de Sulfato de Gentamicina (Inlab), 1,5 g L⁻¹ bicarbonato de sódio e 5 mM HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-il] etano sulfônico , Sigma-Aldrich), a 37 °C e 5% de CO₂. Para os subcultivos, as células foram tripsinizadas com 0,5% de tripsina-EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) em PBS (tampão fosfato salino) pH 7,2 por 3 min a 37 °C.

2.3 DESENHO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

As células B16-F1 ou B16-F10 (2×10^5 /células) foram plaqueadas (dia 0) em frascos de cultura (75 cm²), contendo 10 mL de DMEM com suplementação. Após 24 h (dia 1), as células foram expostas ao contaminante BDE-209 (0,01, 0,1 e 1 nM) ou DMSO (0,05%) (veículo) em meio de cultura, durante 15 dias. As

células foram subcultivadas no dia 4, 8 e 12 e realizado a substituição do meio de cultura contendo o tratamento (BDE-209 ou DMSO). Como controles adicionais, as células B16-F1 e B16-F10 também foram cultivadas nas mesmas condições, porém sem a adição do tratamento. Para obtenção da quantidade necessária de células para o experimento *in vivo* (metástase experimental), no terceiro subcultivo (dia 12) foram plaqueadas 4×10^5 células em garrafas de 182 cm². Após 15 dias de exposição (16° dia), as células foram desaderidas, ressuspensas em meio DMEM, centrifugadas a 1300 rpm por 3 minutos, lavadas 2 vezes com PBS e contadas. A viabilidade celular foi determinada com a solução Azul de Tripán 0,4% (Sigma-Aldrich) em câmara de Neubauer em microscópio invertido.

2.4 EXPERIMENTO *IN VIVO* (METÁSTASE EXPERIMENTAL)

Um total de 67 camundongos C57BL/6 com 6 a 7 semanas de idade foram adquiridos do biotério do Instituto Carlos Chagas (ICC/PR), mantidos na Universidade Federal do Paraná (UFPR/PR) e tratados de acordo com os princípios éticos. Os animais foram aclimatados durante 7 dias. Após o período de aclimação, os camundongos foram mantidos durante 20 dias em caixa de polipropileno com 5 indivíduos a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo controlado de 12 h e fornecimento de comida e água *ad libitum*.

Para o ensaio de metástase experimental, as células B16 foram inoculadas na veia caudal com seringa e agulha BD Ultra-fine II de 0,3 mL ($2,5 \times 10^5$ células em 100 μL de PBS/camundongo) nos camundongos C57BL/6, com seus respectivos controles (TABELA 1). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA/BIO – UFPR, certificado nº 1362), instituído pela Resolução nº 86/11 do Conselho de Extensão e Ensino de Pesquisa da Universidade Federal do Paraná.

TABELA 1. GRUPOS EXPERIMENTAIS (*IN VIVO*)

Grupos experimentais	Condições	N amostral
C0/P0	Animal saudável sem inoculação de células B16	7
B16-F10	Animais inoculados com células B16-F10	10
B16-F1	Animais inoculados com células B16-F1	10
Controle	Animais inoculados com células B16-F1 expostas a concentração de 0.05% de DMSO (veículo)	10
BDE-209 0,01nM	Animais inoculados com células B16-F1 expostas a concentração de 0,01 nM de BDE-209	10
BDE-209 0,1nM	Animais inoculados com células B16-F1 expostas a concentração de 0,1 nM de BDE-209	10
BDE-209 1nM	Animais inoculados com células B16-F1 expostas a concentração de 1 nM de BDE-209	10
Total		67

FONTE: a autora (2023).

2.5 MARCADORES HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS EM PLASMA E AMOSTRAGEM

Após 20 dias de metástase experimental, os camundongos foram anestesiados com 10 mg kg⁻¹ de xilazina e 100 mg kg⁻¹ de cetamina. As amostras de sangue foram coletadas da veia cava e armazenadas em tubos com EDTA. Os parâmetros bioquímicos sanguíneos e a contagem de células foram realizados por um analisador químico Mindray BS-200 (Shenzhen, China). Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e o pulmão, cérebro, fígado e rim foram fotografados, pesados e armazenados para análises histológicas, biomarcadores bioquímicos, RT-qPCR, imunofluorescência e progressão tumoral.

2.6 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM TECIDOS

O conteúdo de proteína foi medido pelo método de Bradford (1976) a 595 nm e a concentração de proteína foi normalizada para 1 mg / mL para atividade enzimática de glutathiona-S-transferase (GST) e catalase (CAT). As leituras das amostras foram realizadas em Varioskan Lux (Thermo Scientific). O pulmão e o

fígado foram homogeneizados em tampão (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (fluoreto de fenilmteilsulfonil), pH 7,6) e centrifugados (12.000 g por 20 min, 4°C). Os sobrenadantes foram armazenados a -80°C.

Atividade da glutationa-S-transferase (GST): o sobrenadante de pulmão ou de fígado (20 µL) foram adicionados a microplacas de 96 poços, seguido pela adição de meio de reação (180 µL, 1,5 mM de GSH (glutationa), 2 mM de 1-cloro- 2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 0,1 M tampão fosfato de potássio, pH 6,5. A absorbância foi medida a 340 nm por 5 min e o coeficiente de extinção molar para CDBN ($9,6 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) foi usado para calcular a atividade GST (KEEN et al., 1976).

Peroxidação lipídica (LPO): o sobrenadante de pulmão ou de fígado (200 µL) foram misturados com 800 µL do meio de reação (0,1 mM laranja de xilenol, 25 mM H_2SO_4 , 4 mM hidroxitolueno butilado (BHT)) e 0,25 mM $\text{FeSO}_4\cdot\text{NH}_4$ (sulfato ferroso de amônio) em metanol 90%. Após 20 min, as amostras foram centrifugadas a 9.000 g por 10 min em temperatura ambiente (TA), 200 µL do sobrenadante foram pipetados em microplacas de 96 poços e a absorbância foi medida a 570 nm. A concentração de hidroperóxidos foi calculada usando o coeficiente de extinção molar aparente para H_2O_2 e hidroperóxido de cumeno de $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (JIANG et al., 1991, 1992).

Atividade da catalase (CAT): o sobrenadante (5 µL; para fígado e 10 µL; para pulmão) foi misturado com 195 µL (para fígado) ou 190 µL (para pulmão) de meio de reação (20 mM H_2O_2 , 50 mM Tris-base, 0,25 mM EDTA, pH 8,0) em microplaca UV-star® de 96 poços (Greiner Bio-One), e a diminuição da absorbância foi imediatamente medida a 240 nm por 5 min. O coeficiente de extinção molar para H_2O_2 ($40 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) foi utilizado para calcular a atividade da catalase (AEBI, 1984, com modificações).

2.7ANÁLISE DA PROGRESSÃO TUMORAL

As imagens dos pulmões foram obtidas para avaliar a área da superfície pulmonar colonizada por metástase em relação à área total do pulmão, usando o Software ImageJ Fiji (SCHINDELIN et al., 2012). Para as análises histológicas, os pulmões foram fixados por 4 horas em paraformaldeído a 4% (EMS – Hatfield, EUA) diluído em PBS. Para os demais órgãos (cérebro, fígado e rim) foram

preservados em ALFAC (70% de etanol, 4% de formaldeído e 5% de ácido acético) por 12 h. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série graduada de etanol, diafanizadas em xilol e a inclusão foi realizada em Paraplast Plus (Merck - Darmstadt, Alemanha). Para o pulmão, cortes de 5 μm foram obtidos e corados com Hematoxilina-Eosina. Para os demais órgãos, cortes seriados de 5 μm de espessura (um corte a cada 50 μm) foram processados e corados com Hematoxilina-Eosina, ambos para identificação de metástases (BRITO et al., 2020). As imagens foram obtidas com Slide Scanner, Zeiss Axio Imager Z2 (Zeiss/MetaSystems). Adicionalmente, foram obtidos cortes de 3 μm dos pulmões para análise de imunofluorescência

2.8 RT-qPCR

A extração de RNA total das amostras de pulmão, após exposição prévia de células B16-F1 ao BDE-209 e 20 dias de metástase experimental, foi realizada com mini-Kit Purelink™ RNA (Invitrogen, ref. 12183018A) com uma etapa adicional utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, ref. 15596026). As amostras tiveram suas células lisadas e homogeneizadas em TissueLyser II (Qiagen) por 3 minutos (25 Hz).

O reagente Quantifluor® (Promega, ref. E2671) foi utilizado para quantificar o RNA extraído. A avaliação da qualidade do RNA total foi realizada verificando a pureza, utilizando a relação Abs260/Abs280 para verificar o grau de contaminação por proteínas e a relação Abs260/Abs230 para verificar o grau de contaminação por fenol e outros contaminantes, com valores limite de ~2,0 e 1,8 -2,2, respectivamente (DESJARDINS; CONKLIN, 2011); enquanto a integridade do RNA foi verificada utilizando eletroforese em gel de agarose. O material foi convertido em cDNA usando SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen, ref. 18091050) e a concentração de 20 ng de cDNA e 500 nM de primers para cada reação foi ajustada para um volume final de 10 μL .

Para amplificação em tempo real, foram utilizados PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Invitrogen, ref. A25776) e o StepOnePlus™ Real-Time PCR System. Para a análise dos dados, foi utilizado o servidor Web-based LinRegPCR. Os mRNAs de referência utilizados foram β 2-microglobulina (β 2m) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*). Os mRNAs alvo foram

metaloproteínase de matriz 2 (*Mmp2*), metaloproteínase de matriz 9 (*Mmp9*), metaloproteínase de matriz 14 (*Mmp14*), inibidor tecidual de metaloproteínase 3 (*Timp3*), proteína rica em cisteína indutora de reversão com motivos Kazal (*Reck*) (TABELA 2).

TABELA 2. INFORMAÇÕES DOS PRIMERS

Gene	GenBank	Primers	Amplicon (bp)
Metaloproteínase de Matriz 2 (<i>Mmp2</i>)	NM_008610	F: 5' TGACCGGGATAAGAAGTATGG 3' R: 5' ACTTGTGCCCAGGAAAGTG 3'	110
Metaloproteínase de Matriz 9 (<i>Mmp9</i>)	NM_013599	F: 5' TGACAAGAAGTGGGGTTTCTG 3' R: 5' GGCACGCTGGAATGATCTA 3'	101
Metaloproteínase de Matriz 14 (<i>Mmp14</i>)	NM_008608	F: 5' TATGGGCCCAACATCTGTG 3' R: 5' TCCATCACTTGGTTATTCCTCA 3'	113
Inibidor tecidual de metaloproteínase 3 (<i>Timp3</i>)	NM_011595	F: 5'ACCTCACCTCCTTCCCATC3' R: 5'CCAGTGCTAAATTTGCAAGAAA3'	100
Proteína rica em cisteína indutora de reversão com motivos Kazal (<i>Reck</i>)	NM_016678	F: 5' ATAGGCTGCAAACCCATCAT 3' R: 5' TGTCACCTTAGCAATAGTGCCA 3'	108
β2-microglobulina (β2m) (gene endógeno)	NM_009735	F: 5'CGAGACATGTGATCAAGCATC3' R: 5'GCTATTTCTTTCTGCGTGCAT3'	110
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (<i>Gapdh</i>) (gene endógeno)	NM_00141184 0.1	F: 5'AGAACATCATCCCTGCATCC3' R: 5' ACATTGGGGGTAGGAACACG3'	109

FONTE: a autora (2023).

2.9 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A reação de imunofluorescência foi realizada em cortes pulmonares, conforme descrito por Zaqout et al. (2020). As lâminas foram diafanizadas a 65°C por 2 h, hidratadas em banhos sequenciais de xileno e etanol e incubadas com tampão citrato (1 mM, pH 6,0) a 95°C por 30 min para resgate antigênico. Em seguida, as lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente por 2 h, lavadas com PBS e permeabilizadas com tampão I (0,25% Triton X-100 e 0,2% de gelatina de peixe (Sigma Aldrich) em PBS) por 10 min. Para bloqueio, as lâminas foram imersas em tampão I com 5% de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma Aldrich) em PBS por 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram incubadas *overnight* a 4 °C com os seguintes anticorpos primários: anti-rat-Ly6G (marcador de neutrófilos; 1:50; Invitrogen #16-9668-82) ou anti-rabbit-CD3 (marcador de linfócitos; 1:25; Abcam #ab5690) preparado em tampão II (tampão I + 1% BSA).

No final da incubação, as lâminas foram lavadas com PBS e tampão I e incubadas com os anticorpos secundários anti-rat conjugado com Alexa Fluor

488 (1:250, Invitrogen #A111006) ou anti-rabbit conjugado com Alexa Fluor-488 (1:250 #A11008 Invitrogen) em tampão II por 1 h em temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com PBS; incubadas com DAPI (1 µg mL, BD Biosciences) por 10 min; lavadas com PBS; 1 vez com uma solução contendo 10 mM CuSO₄/50 mM NH₄Cl por 10 minutos; 1 lavagem rápida com água destilada. As lâminas foram montadas com Fluoromount™ #F4680 (Sigma Aldrich)

As imagens foram analisadas utilizando um microscópio de fluorescência Axioskop 2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e cinco campos foram capturados utilizando o software AxioVision 4.7 (Carl Zeiss). As células positivas para Ly6G e CD3 foram contadas usando a ferramenta *counter tool* do Fiji/ImageJ software (Version 2.9.0/1.53t National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). A contagem foi representada pela média dos cinco campos contados por lâmina. As análises de imunofluorescência foram realizadas no Laboratório de Laboratório de Toxicologia Experimental da Universidade de São Paulo.

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram primeiramente testados quanto à normalidade dos resíduos e homocedasticidade das variâncias, utilizando o teste de Shapiro-Wilk e Bartlett ou F, respectivamente. Os dados paramétricos foram analisados usando ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett e expressos como média. Dados não paramétricos foram avaliados para três ou mais grupos usando Kruskal-Wallis seguido de Dunn's e para dois grupos o teste de Mann-Whitney foi aplicado. Ambas as análises foram realizadas avaliando as diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle (DMSO), usando o software GraphPad Prism 8.0.1. O grupo L0/P0 (animais saudáveis) não foi considerado nas análises estatísticas. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DA SAÚDE DOS CAMUNDONGOS

Após 20 dias da inoculação das células B16, foram realizadas análises de parâmetros bioquímicos sanguíneos e contagem de células. A contagem de células através das análises hematológicas de indivíduos inoculados com células B16-F1, expostas ao BDE-209 (1 nM) apresentou o aumento de 42% de glóbulos brancos (leucócitos e linfócitos) comparativamente ao grupo controle (DMSO). Os outros parâmetros hematológicos não apresentaram alterações entre os grupos experimentais (TABELA 3).

TABELA 3. ANÁLISE DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E CONTAGEM DE CÉLULAS EM PLASMA

Parâmetros bioquímicos	Unidade	C0	B16-F10	B16-F1	Controle	BDE-209 0.01 nM	BDE-209 0.1 nM	BDE-209 1 nM	p value
Triglicérides	mg/dL	78.78 ± 16.89	59.34 ± 16.13	78.19 ± 23.95	67.11 ± 26.277	56.155 ± 15.809	77.07 ± 38.307	60.86 ± 16.783	p 0.0662
Colesterol total	mg/dL	79.58 ± 13.15	87.36 ± 13.66	78.69 ± 13.97	87.82 ± 17.906	81.633 ± 9.059	81.98 ± 10.355	89.23 ± 9.447	p 0.3715
Glicose	mg/dL	232.57 ± 61.36	237.91 ± 87.04	316.49 ± 109.04	287.85 ± 85.888	255.966 ± 51.352	309.33 ± 171.428	259.41 ± 54.521	p 0.7093
Proteínas totais	g/dL	4.78 ± 0.89	5.08 ± 1.03	4.67 ± 0.62	5.25 ± 1.749	4.566 ± 0.703	4.59 ± 1.159	5.26 ± 0.835	p 0.2111
Albumina	g/dL	2.74 ± 0.41	2.66 ± 0.49	2.63 ± 0.44	2.65 ± 0.544	2.377 ± 0.290	2.45 ± 0.535	2.57 ± 0.326	p 0.3591
Globulina	g/dL	2.04 ± 1.17	2.42 ± 0.83	2.04 ± 0.76	2.6 ± 1.247	2.188 ± 0.442	2.14 ± 0.967	2.69 ± 0.570	p 0.4169
VLDL	g/dL	15.78 ± 3.39	11.88 ± 3.24	15.62 ± 4.80	13.42 ± 5.247	11.233 ± 3.179	15.41 ± 7.650	12.16 ± 3.359	p 0.1329
Contagem de células sanguíneas									
Leucócitos	x10 ³ /µL	4.05 ± 0.95	3.51 ± 0.92	3.51 ± 0.39	3.65 ± 1.343	3.911 ± 1.583	4.9 ± 1.251	5.2 ± 1.256*	p 0.0399*
Linfócitos	x10 ³ /µL	3.22 ± 0.76	2.42 ± 0.70	2.5 ± 0.37	2.72 ± 1.034	2.788 ± 1.323	3.71 ± 1.094	3.88 ± 0.713*	p 0.0487*
Monócitos	x10 ³ /µL	0.21 ± 0.08	0.23 ± 0.09	0.21 ± 0.07	0.2 ± 0.124	0.222 ± 0.120	0.27 ± 0.105	0.29 ± 0.152	p 0.5430
Granulócitos	x10 ³ /µL	0.61 ± 0.13	0.86 ± 0.29	0.8 ± 0.20	0.73 ± 0.262	0.9 ± 0.239	0.92 ± 0.244	1.03 ± 0.569	p 0.1072
Glóbulos vermelhos	x10 ⁶ /µL	7.42 ± 0.30	7.84 ± 0.33	7.66 ± 0.42	7.95 ± 0.563	7.833 ± 0.458	7.493 ± 0.33	7.599 ± 0.673	p 0.1675
Hemoglobina	g/dL	11.65 ± 0.57	12.28 ± 0.40	12.19 ± 0.90	12.16 ± 0.772	12.033 ± 0.708	11.73 ± 0.588	11.7 ± 1.051	p 0.2058
Hematócrito	%	34.20 ± 1.11	35.07 ± 1.64	34.63 ± 2.18	35.72 ± 1.786	35.144 ± 2.248	33.34 ± 2.085	34.23 ± 3.167	p 0.2102
Plaquetas	x10 ³ /µL	376.71 ± 54.88	319.80 ± 47.87	358.40 ± 98.70	457.7 ± 140.428	455.111 ± 100.317	432.6 ± 77.661	414.7 ± 47.171	p 0.8409

Os dados representam a média ± SD de 7 (C0) ou 10 animais (outros grupos) por grupo, após 20 dias de metástase experimental. (*) Representa a diferença estatisticamente significativa da análise de leucócitos em relação ao BDE-209 1nM e grupo controle. (**) Também representa a diferença estatisticamente significativa na análise de linfócitos entre BDE-209 1nM e grupo controle. FONTE: a autora (2023).

Os biomarcadores bioquímicos analisados para o fígado não apresentaram resultados diferentes entres os grupos experimentais (Figura 11A-C), enquanto nos pulmões foi observada a redução de 40% na peroxidação lipídica, em indivíduos inoculados com células B16-F1 expostas ao BDE-209 (1nM) em relação ao grupo controle (Figura 11F). Essa redução também foi observada nos animais inoculados com células B16-F10 (controle positivo) em relação ao grupo controle (49%) (Figura 11F).

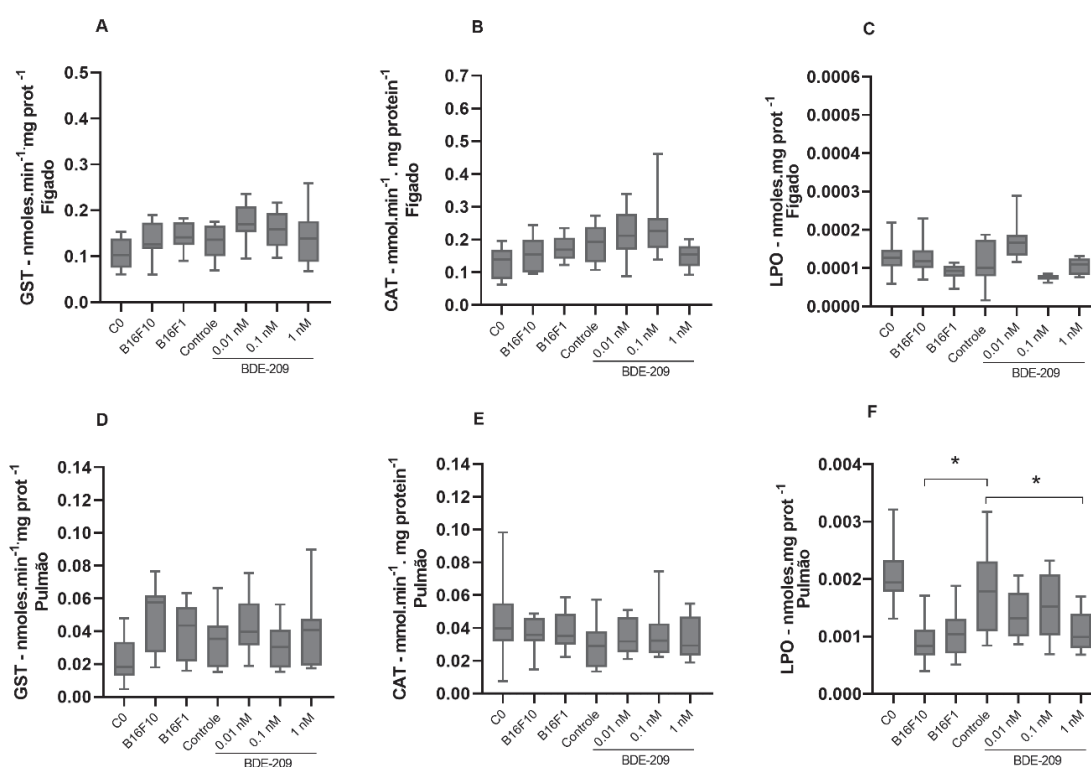


Figura 11. Biomarcadores bioquímicos em camundongos C57BL/6 inoculados com células B16-F1 após 20 dias de metástase experimental. Atividade da glutatona S-transferase (GST), atividade da catalase (CAT) e peroxidação lipídica (LPO) no fígado (A, B, C) e pulmão (D, E, F). * $p < 0,05$ em relação ao controle. N = 7 (C0 animais saudáveis); N = 10 (demais grupos). FONTE: a autora (2023).

3.2 PROGRESSÃO METASTÁTICA DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16-F1)

As imagens da colonização das células de melanoma nos pulmões dos camundongos foram avaliados, após 20 dias de metástase experimental. A ausência de metástase em indivíduos não inoculados com células B16 é mostrada na Figura 12. a. Como esperado, os indivíduos inoculados com células

B16-F10 (controle positivo) apresentaram um aumento (174,98%) da colonização de metástase na superfície pulmonar quando comparados aos animais inoculados com células B16-F1 expostos ao DMSO (grupo controle) (Figura 12. b-d; Figura 12. h). Os resultados mostraram que os indivíduos inoculados com as células B16-F1 sem exposição ao BDE-209 não são estatisticamente diferentes dos indivíduos do grupo controle (veículo) (Figura 12. c-d; Figura 12. h). Entretanto, os indivíduos inoculados com células B16-F1 previamente expostas ao BDE-209 (1nM) aumentaram a colonização da superfície da metástase (82%), comparativamente ao grupo controle (Figura 12. d-g; Figura 12. h).

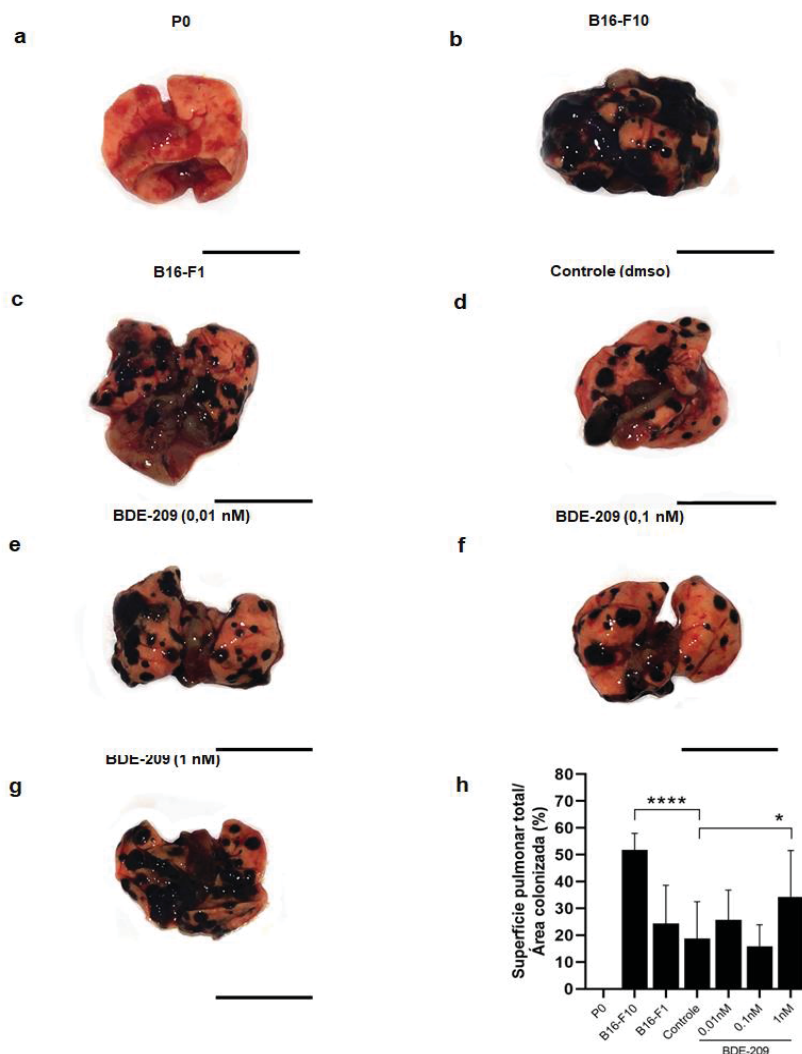


Figura 12. Avaliação da área colonizada por metástases na superfície pulmonar de camundongos Black C57/BL6, 20 dias após a metástase experimental. **(a)** P0 (pulmão saudável sem inoculação de células B16) **(b)** inoculação de células B16-F10 **(c)** inoculação de células B16-F1 **(d)** Controle (células B16-F1 expostas à concentração de veículo DMSO) **(e)** **(f)** **(g)** células B16-F1 expostas a concentração de 0,01nM, 0,1 nM e 1 nM de BDE-209, respectivamente **(h)** Área pulmonar total/área colonizada por metástases. N = 7 (P0: animais saudáveis) e N = 10 (demais grupos). (****) $p < 0,0001$ Significa diferença estatística entre o grupo B16-F10 e o grupo controle; (*) $p < 0,05$ diferença entre grupo exposto a concentração 1nM de BDE-209 em relação ao grupo controle (DMSO). Barra de escala – 10000 μm . FONTE: a autora (2023).

3.3 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICA

Como esperado, apenas os animais do grupo P0 (pulmão saudável, sem inoculação de células B16) não apresentaram metástases nos pulmões (Figura 13. a), enquanto os indivíduos inoculados com células B16-F1 apresentaram a

ocorrência de metástases pulmonares em B16-F1 (Figura 13. c), controle (DMSO) (Figura 13. d) e em células B16-F1 previamente expostas aos grupos BDE-209 (0,01, 0,1 e 1 nM) (Figura 13. e-g). No entanto, quando exposto ao BDE-209 na concentração de 1nM (Figura 13. g) a presença de pontos focais de metástases (nódulos) de melanoma é maior, quando comparado com o controle. O mesmo também é observado em indivíduos inoculados com células B16-F10 (controle positivo) (Figura 13. b).

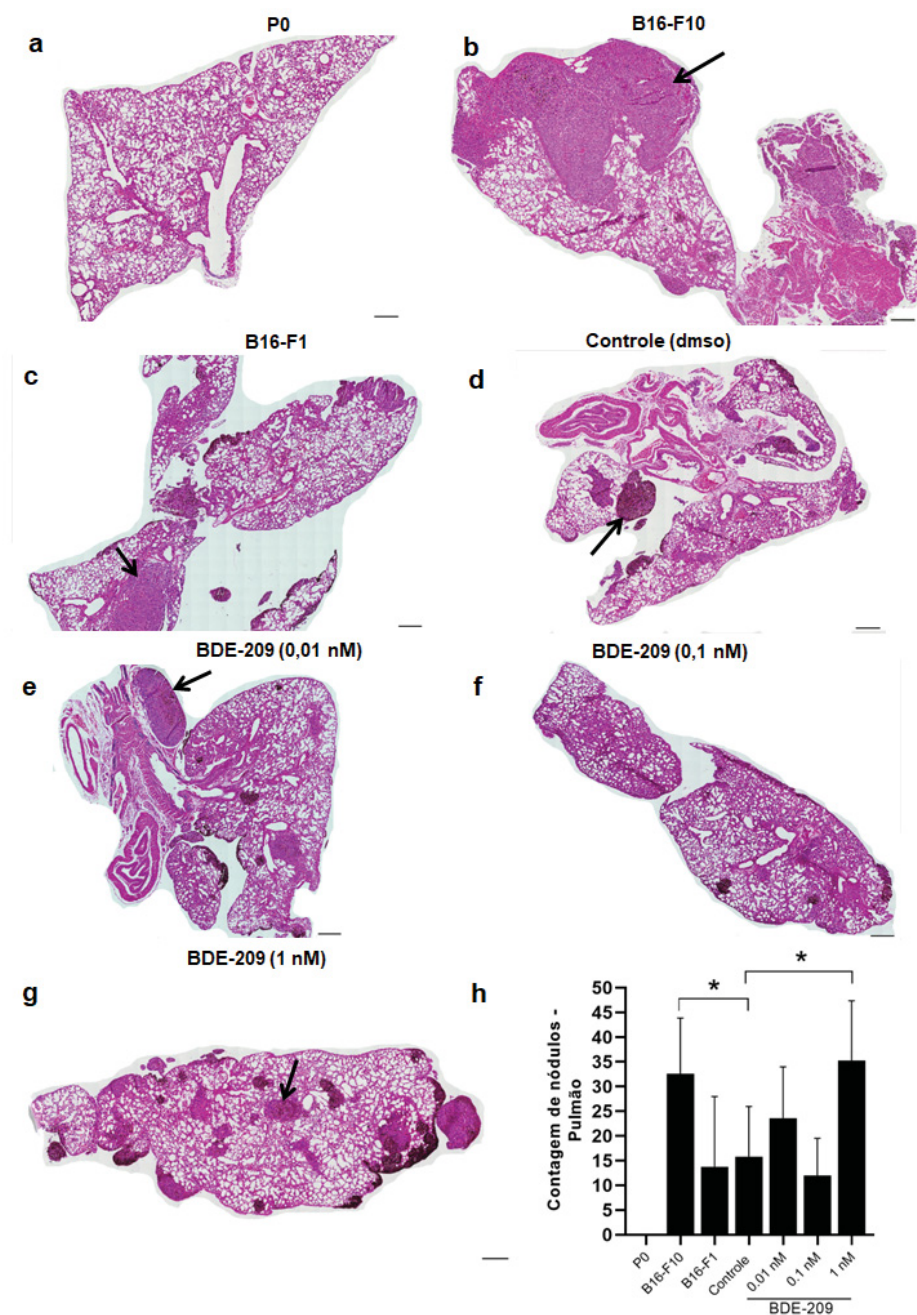


Figura 13. Cortes transversais de pulmões de camundongos C57BL/6. Ponto final de metástase experimental, 20 dias após a inoculação de células B16. (a) L0 (b) B16-F10 (c) B16-F1 (d) Controle (veículo DMSO) (e) inoculação de células B16-F1 expostas a 0,01 nM BDE-209 (f) inoculação de células B16-F1 expostas a 0,1 nM BDE-209 (g) inoculação de células B16-F1 expostas a BDE-209 1 nM BDE-209 (h) Contagem de focos de metástases de melanoma no pulmão dos animais. Setas indicam nódulos tumorais. Barra de escala 500 μ m. Coloração hematoxilina e eosina. N = 7 (P0: animais saudáveis) e N = 10 (demais grupos). FONTE: a autora (2023).

Além disso, o tratamento com BDE-209 (1 nM) em células B16-F1 apresentou uma disseminação de metástases para outros órgãos como cérebro (88,8%) (Figura 14. A), fígado (80%) (Figura 14. B) e rim (60%) (Figura 14. C).

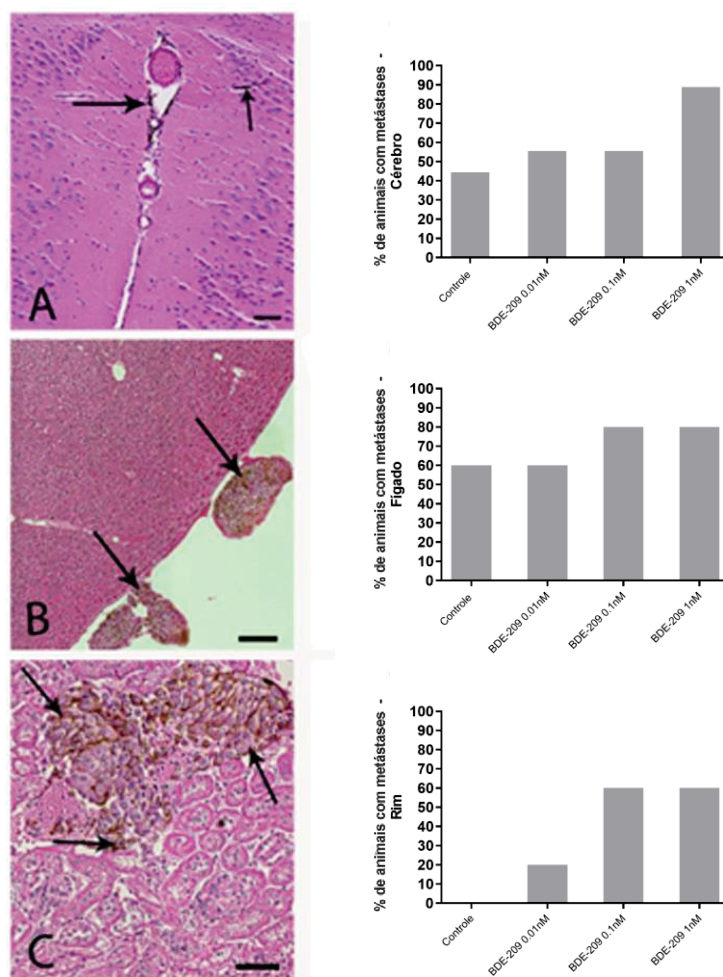


Figura 14. Percentual de indivíduos com disseminação de metástase no cérebro, fígado e rim de camundongos C57BL/6, 20 dias após a inoculação das células B16-F1 cronicamente expostas ao BDE-209 (1 nM). (A) Disseminação de metástase cerebral no vaso (seta maior) e no tecido (seta menor). (B) Disseminação de metástase hepática e (C) Disseminação de metástase renal. Controle significa inoculação de células B16-F1 expostas ao veículo (DMSO). Barra de escala = 50µm. Coloração hematoxilina e eosina. (A) N = 9, (B) N = 5 e (C) N = 5. FONTE: a autora (2023).

3.4 RT-qPCR

A análise da expressão gênica foi realizada em pulmão dos indivíduos inoculados com as células B16-F1 previamente expostas ao BDE-209 (1nM) e grupos controle (veículo), após 20 dias de metástase experimental. O objetivo principal foi explicar parcialmente o aumento observado na dispersão de metástases no pulmão de indivíduos inoculados com células B16-F1, previamente expostos ao BDE-209. Os genes *Mmp2*, *Mmp9* e *Mmp14* não foram afetados pela exposição ao BDE-209, mas uma regulação negativa da expressão gênica para ambos supressores tumorais *Timp3* (74,14%) e *Reck* (39,13%) foi observada no grupo exposto ao BDE-209 em relação ao grupo controle (Figura 15).

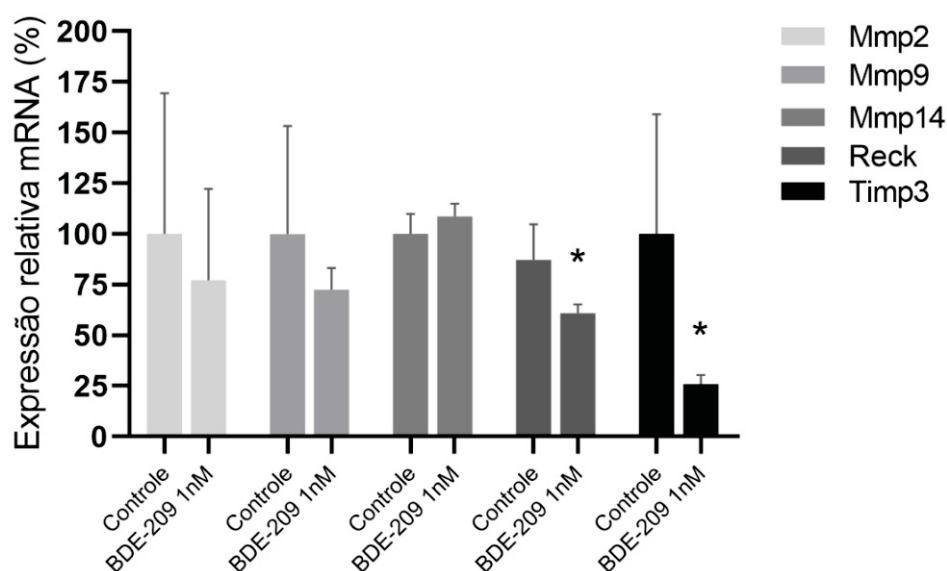


Figura 15. Expressão gênica do pulmão de camundongos Black C57BL/6, após 20 dias de metástase experimental. Os animais foram inoculados com células B16-F1 previamente expostas durante 15 dias ao BDE-209 (1nM) e DMSO (0,05%) no grupo controle. A expressão relativa do mRNA foi determinada pela média geométrica dos genes endógenos gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β 2-microglobulina (β 2M). A expressão relativa foi normalizada pelo controle. Os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney (*) p 0,0571. N = 3 - 5 experimentos independentes foram realizados. FONTE: a autora (2023).

3.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para avaliar a presença de células imunes no microambiente tumoral, foram realizadas coloração H&E e imunofluorescência. Pela coloração H&E foram observadas células tumorais (*) e infiltrado de células imunes (setas pretas) no grupo controle e no grupo BDE-209 (Figura 6 A e B). Porém, foi observado um aumento de células imunes no grupo BDE-209 (Figura 6B). Assim, para verificar a identidade das células imunes encontradas no microambiente tumoral, foi empregada imunofluorescência utilizando anticorpos específicos para linfócitos (CD3) e neutrófilos (Ly6G).

Como mostrado na Figura 16, os pulmões com células B16-F1 previamente expostas ao BDE-209 (1 nM) e grupo controle apresentaram marcação para linfócitos (Figura 16 C e D) e neutrófilos (Figura 16 F-G), que foram encontrados próximos as células tumorais conforme observado na Figura 16 C - G – seta branca. Entretanto, o número de linfócitos foi maior nas células B16-F1 previamente expostas ao BDE-209 do que no grupo controle (Figura 16 C - D). O número de neutrófilos no microambiente tumoral não foi notavelmente afetado pelas células B16-F1 anteriores à exposição ao BDE-209 em comparação com o controle (Figura 16 E-H). A marcação de linfócitos e neutrófilos nos grupos P0, B16-F1 sem exposição e BDE- 209 na concentração de 0,1 nM não apresentaram diferenças significativas (Figura 17).

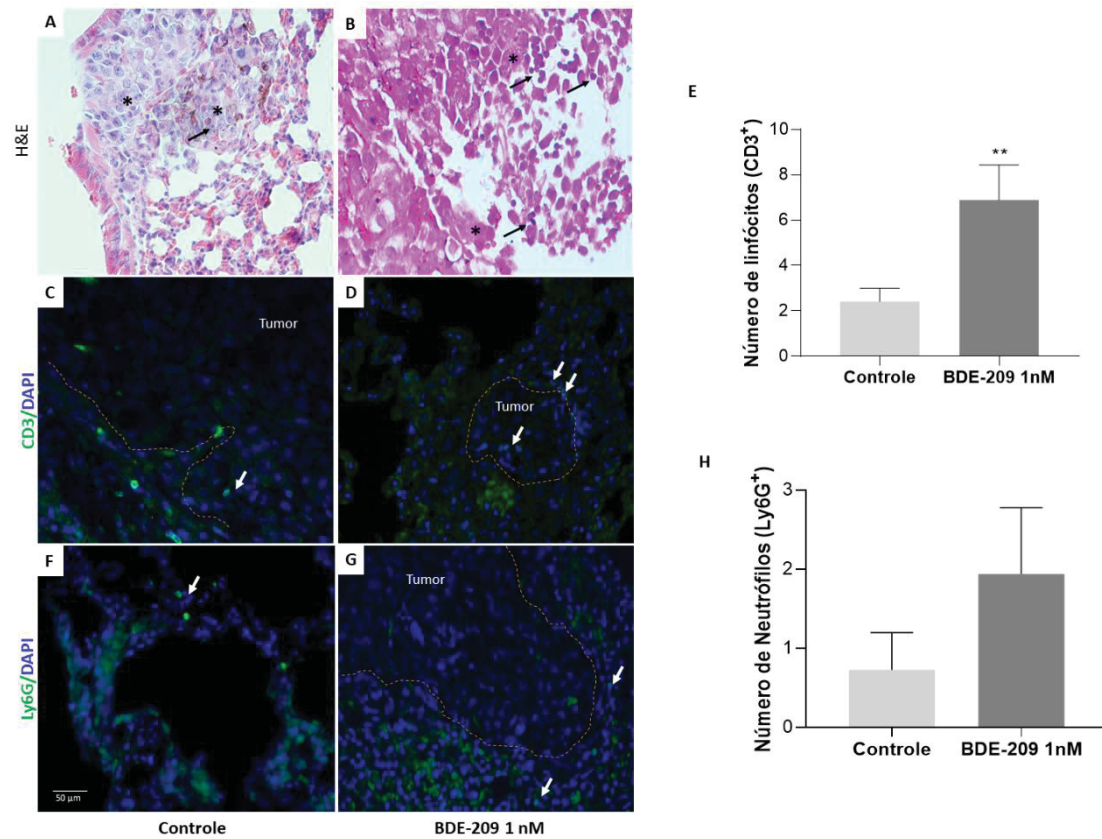


Figura 16. Infiltrado de células imunes no pulmão de camundongos C57BL/6 após 20 dias de metástase de melanoma evocado por B16-F1 não exposto ou exposto crônico ao BDE-209. (A – B) Coloração H&E. *: células tumorais. **Seta preta**: infiltração de células imunológicas. (C - D) Marcação de CD3 – Linfócitos. (F – G) Marcação de Ly6G - Neutrófilos. Número de linfócitos (E) e neutrófilos (H). Setas brancas - linfócitos ou neutrófilos. Barra: 50 μ m. Os dados representam a média \pm SEM. Controle (veículo) (N = 3); B16-F1 expostas previamente ao BDE-209 (N = 4 – 5). ** $p < 0,01$ vs. Controle. FONTE: a autora (2023).

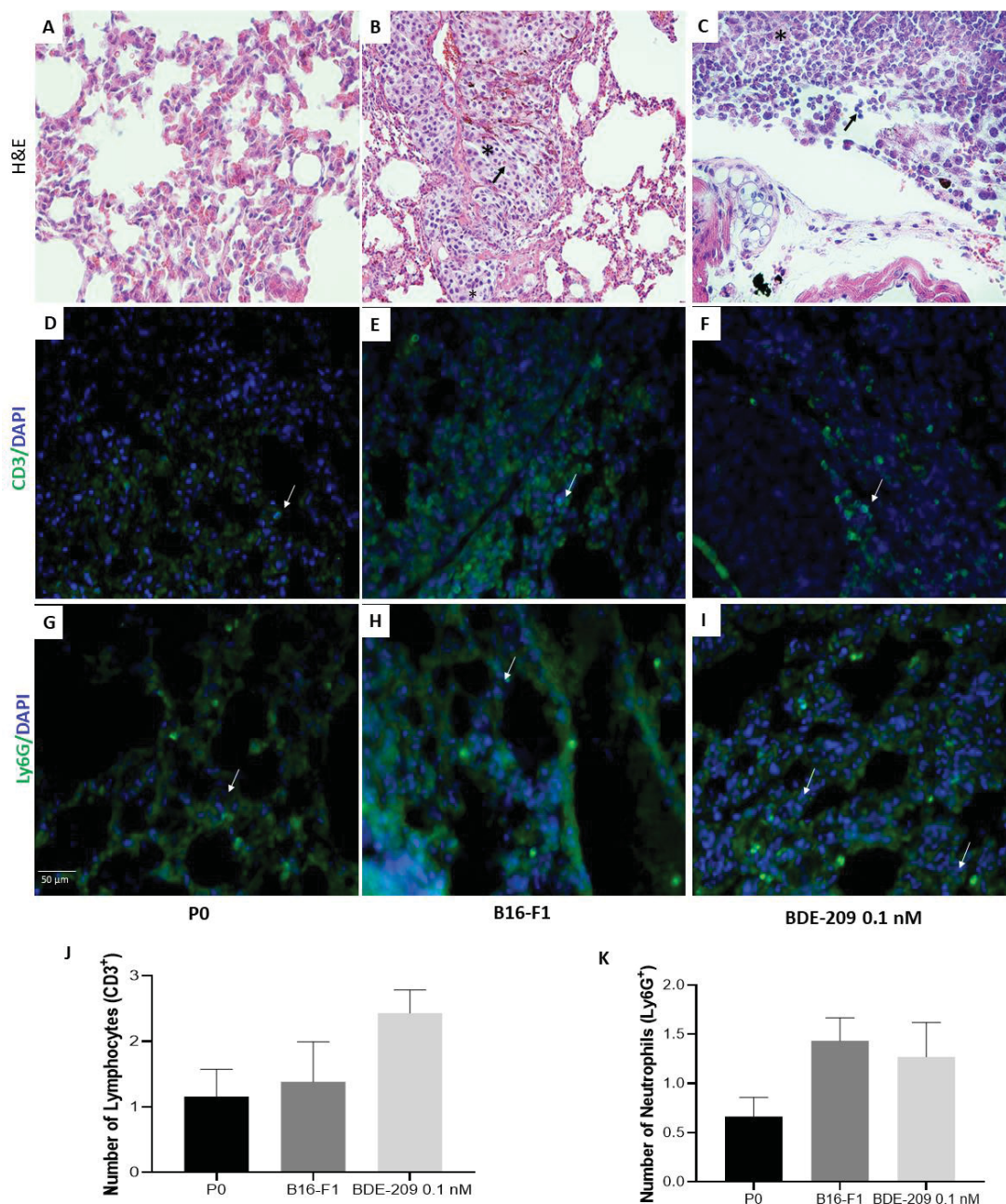


Figura 17. Infiltração de células imunes. (A – C) Coloração H&E. *: células tumorais. Seta preta: infiltração de células imunes. (D – F) Marcação de CD3 – Linfócitos. (G – I) Marcação de Ly6G - Neutrófilos. Número de linfócitos (J) e neutrófilos (K). **Setas brancas** - linfócitos ou neutrófilos. P0 (não tumoral); B16-F1 (pulmão de camundongos C57BL/6 após 20 dias de metástase de melanoma de células B16-F1 não expostas). BDE-209 0,1 nM (pulmão de camundongos C57BL/6 após 20 dias de metástase de melanoma de células B16-F1 previamente expostas a BDE-209 0,1 nM). Barra: 50 μ m. Os dados representam a média \pm SEM. N = 3 – 5. FONTE: a autora (2023).

4 DISCUSSÃO

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa mostraram que a exposição de células de melanoma murino (B16-F1) a concentrações ambientais relevantes de BDE-209, apresentaram alterações fenotípicas, levando células B16-F1 a um perfil mais agressivo em estudos *in vitro* (MARCHI et al., 2021; SILVA FILHO et al., 2022), enquanto camundongos C57BL/6 expostos cronicamente ao BDE-209 mostrou maior suscetibilidade à disseminação de células B16-F10 *in vivo* (BRITO et al., 2020). No presente estudo, mostramos que as alterações do fenótipo celular relatadas por Silva Filho et al. (2022), também pode resultar em maior disseminação de células de melanoma *in vivo*, mesmo sem a exposição dos camundongos C57BL/6. Esses dados sugerem que o prognóstico da doença do melanoma em animais é afetado pelo BDE-209 de forma aditiva, aumentando ou estimulando o progresso da doença, corroborando a hipótese de que o BDE-209 pode alterar o prognóstico do câncer tipo melanoma.

Essa nova abordagem sobre o papel dos Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) em doenças metabólicas ou não metabólica, não podem ser mais negligenciadas, uma vez que a compreensão da origem das doenças é um novo conceito que liga este tema a disfunções biológicas mais complexas. De acordo com Devi et al. (2020) e Hoffman et al. (2021), os POPs são substâncias químicas perturbadoras do metabolismo que podem levar a diversos problemas de saúde, como câncer, defeitos congênitos, disfunções do sistema imunológico, reprodutivo e nervoso; no entanto, poucos estudos descreveram os seus efeitos no prognóstico do câncer (BRITO et al., 2020; MARCHI et al., 2021; STEIL et al., 2022; SILVA FILHO et al., 2022).

Embora os resultados tenham mostrado diferenças na contagem de nódulos, disseminação de metástases e estimulação imunológica no pulmão, a inoculação de células B16-F1 expostas ao BDE-209 não levou a alterações nos parâmetros bioquímicos sanguíneos e nos marcadores bioquímicos antioxidantes nos pulmões e no fígado. Por outro lado, a diminuição da peroxidação lipídica nos pulmões em animais inoculados com células B16-F10, também foram encontrados em indivíduos inoculados com as células B16-F1 expostas ao BDE-209 (1 nM), foi o primeiro sinal de alteração do fenótipo

observado em células B16-F1 expostas ao polibromado. Essa semelhança de perfil entre as duas linhagens é um indicativo de que o BDE-209 pode interferir na modulação do fenótipo tumoral, e se aproximar do perfil encontrado nas células B16-F10 (controle positivo), que consistem em uma linhagem celular mais agressiva e metastática.

A redução dos níveis de peroxidação lipídica nos pulmões dos animais, pode estar relacionada ao aumento de células tumorais nos pulmões. De acordo com Arslanbaeva et al. (2022), as células do melanoma utilizam mecanismos como UBIAD1 e CoQ10 na membrana plasmática que favorecem a sobrevivência e a proliferação das células, prevenindo a peroxidação lipídica e a morte celular. A enzima UB1AD1 produtora de CoQ10 neutraliza o estresse oxidativo e os eventos de peroxidação lipídica no melanoma cutâneo.

Adicionalmente, também foi observada a baixa produção de hidroperóxidos lipídicos em células resistentes à ferroptose, expressão consistente e sustentada das enzimas AKR1C1-3, responsáveis pela redução de peróxidos lipídicos e, conseqüentemente, ocasionando a inibição da morte celular favorecendo a progressão de cânceres malignos (POLLAK et al., 2007). Em células de melanoma metastático, a regulação/ativação de AKR1C1-C3 foi proposta como um mecanismo que envolve a inibição da morte celular ferroptótica através da redução dos níveis de peróxido lipídico (GAGLIARDI et al., 2019).

As análises hematológicas revelaram o aumento na contagem de glóbulos brancos (leucócitos) e linfócitos em camundongos inoculados com células B16-F1 previamente expostas ao BDE-209, sugerindo a estimulação inflamatória. Esta condição pode estar diretamente relacionada com a progressão do câncer de melanoma induzido por células B16-F1 previamente expostas ao BDE-209, confirmada pelo aumento da área colonizada por metástases nos pulmões. O melanoma é um tumor altamente imunogênico e sua interação com células imunes encontradas no microambiente tumoral desempenha um papel significativo no desenvolvimento de metástases (TUCCI et al., 2019).

Diferentes fenótipos de células imunes infiltrantes de tumor podem exercer ações anti ou pró-metastáticas (HÖLZEL; TÜTING, 2016). Por exemplo, células T CD8+, dendríticas (DCs) e *natural killer* (NK) desempenham papéis essenciais na imunidade ativa a terapias antitumorais (WU et a., 2012);

inversamente, células T reguladoras (Tregs), neutrófilos N2 e macrófagos associados a tumores (TAMs) indicam supressão imunológica, que promovem a tumorigênese, bem como a angiogênese para irrigar a área tumoral (ZHOU et al., 2022). Essa complexidade de ações imunológicas nas áreas tumorais é orquestrada pela secreção de mediadores químicos pelas células tumorais ou estromais, que por sua vez alteram o fenótipo das células infiltrantes. É reconhecido que as células de melanoma secretam fator de transformação crescimento β (TGF β), que induz a polarização para neutrófilos N2 (DREWES et al., 2017), proliferação de Treg (LAINÉ et al., 2021) e fenótipo TAM (THAM et al., 2014). A análise de imunofluorescência do tecido pulmonar mostrou maior influxo de linfócitos nos tumores eliciados pelas células B16-F1 previamente expostas ao BDE-209, e que o tumor evoluiu mesmo em maior influxo destas células. Portanto, pode-se supor que o tratamento prévio com BDE-209 favoreça as células do melanoma a secretar mediadores que contribuem na polarização de leucócitos antiinflamatórios e pró-angiogênicos.

Imagens *ex vivo* de pulmões e análises histológicas revelam o aumento da progressão das células B16-F1 após a exposição ao BDE-209, e inoculadas em camundongos C57BL/6. As alterações fenotípicas observadas *in vitro* (SILVA FILHO et al., 2022; MARCHI et al., 2021), caracterizando essas células como mais metastáticas após a exposição crônica ao BDE-209, se confirmam pelo aumento da colonização metastática no pulmão dos camundongos inoculados. A semelhança observada com a colonização metastática encontrada no grupo controle positivo (inoculação de células B16-F10), é outra evidência de que o BDE-209 é capaz de interferir com o desenvolvimento do melanoma, aumentando a malignidade das células que desempenha um papel substancial na disseminação de metástases para o pulmão de indivíduos não expostos ao poluente.

Um aumento na disseminação de metástases foi também descrito por Brito et al. (2020) em camundongos cronicamente expostos via oral ao BDE-209 e posteriormente inoculados com células do melanoma murino B16-F10. Embora o desenho experimental de ambos os experimentos sejam distintos, fica claro que o polibromado BDE-209 é capaz de alterar o prognóstico da doença tanto pela exposição do animal como da célula tumoral. Portanto, os dados sugerem que as concentrações ambientalmente relevantes de BDE-209, presentes em

amostras biológicas, podem estar envolvidas com um aumento na progressão do câncer de melanoma, o que pode mudar substancialmente a relevância da exposição a esse tipo de poluente para o risco de exposição humana.

O mecanismo para explicar a maior invasividade das células B16-F1 após exposição ao BDE-209 observada no pulmão, foi descrito por Silva Filho et al. (2022). Segundo os autores, a regulação negativa da E-caderina e a regulação positiva da expressão do gene da vimentina indicam alterações que favorecem a transição epitelial-mesenquimal, enquanto a regulação positiva dos genes *Mmp2*, *Mmp9*, *Mmp14* e *Pgk1* ou a regulação negativa dos genes *Timp2*, *Timp3* e *Reck*, podem favorecer um estado mais metastático das células B16-F1. Conseqüentemente, a redução de supressores tumorais como de *Timp3* e *Reck* do pulmão de camundongos inoculados com células B16-F1 confirma *in vivo* os resultados *in vitro*, indicando o potencial do BDE-209 em alterar a progressão do melanoma.

TIMPS são proteínas inibidores teciduais de metaloproteinases que regulam diferentes proteínas e em consequência, a homeostase tecidual. De acordo com Jackson et al. (2017), essas proteínas estão intimamente relacionadas a vários processos de câncer, como invasão, angiogênese e inflamação. Nesse trabalho, foi observada a redução da expressão gênica de TIMP3, o que pode estar associada com atividades pró-inflamatórias, maior colonização e invasividade das células do melanoma murino. Em camundongo nude, foi observado que a expressão de TIMP3 reduziu o crescimento tumoral, a angiogênese e a infiltração de macrófagos de tumores BLM (linhagem celular de melanoma) (DAS et al., 2014). Além disso, casos de melanoma cutâneo primário com linfonodo compatível ou transitório (estágio III) e metástase à distância (estágio IV), mostram que a expressão do inibidor tecidual da metaloproteinase-3 (TIMP3) diminui durante a progressão do melanoma (DAS et al., 2016), corroborando com os dados do presente estudo.

A proteína rica em cisteína indutora de reversão com motivos kazal (RECK) é um inibidor endógeno de muitas proteínas que promovem invasão, metástase e progressão tumoral (SHEN et al., 2018; ZHANG, 2015). Portanto, a redução da expressão gênica de *Reck* nos pulmões dos animais, após metástase experimental com a inoculação de células de melanoma murino (B16-F1) expostas ao BDE-209, também pode estar relacionada ao aumento da área

colonizada por metástases de melanoma encontradas no pulmão. Análises da expressão de RECK em biópsias de pele, incluindo casos de melanoma maligno cutâneo (CMM) mostram uma redução do CMM positivo para RECK, enquanto que todos os casos avaliados de nevo melanocítico benigno (BMN) apresentaram positividade em diferentes níveis de RECK (ZHANG, 2015). Recentemente, estudos do nosso grupo mostraram que a alteração da expressão do gene *Reck* em melanoma murino (células B16-F1 e B16-F10) foi observada após exposição ao BDE-209 e a mistura de BDE-47 + BDE-99 (SILVA FILHO et al., 2022; STEIL et al., 2021), corroborando os resultados obtidos nesse trabalho. Esses dados estão de acordo com os achados do presente estudo. No entanto, com base nos dados descritos acima, com o objetivo de compreender melhor o papel dos poluentes orgânicos no desenvolvimento e prognóstico tanto de doenças metabólicas como não metabólicas, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos mecanísticos.

Embora o aumento da disseminação de metástases no pulmão após a inoculação de células expostas ao BDE-209 revele sérios efeitos notórios na progressão do melanoma, a ocorrência de metástases cerebrais em 88,8% dos animais, é motivo de preocupação e corrobora as alterações fenotípicas em decorrência à modulação da exposição ao BDE-209 o progresso do melanoma. O melanoma é a terceira causa mais comum de metástases cerebrais, depois do câncer de pulmão e de mama, e essas são responsáveis por 95% das mortes (NICHOLAS et al., 2013). O estudo de Brito et al. (2020) revelou que a exposição oral prévia dos animais ao BDE-209, modula a disseminação metastática do melanoma no pulmão, cérebro, fígado, gônadas e rim de camundongos Black C57BL/6, inoculados com células B16-F10.

Diferente do realizado por Brito et al. (2020), no corrente estudo, os animais não foram expostos ao BDE-209, mas apenas às células B16-F1 durante 15 dias antes da inoculação. Apesar das células B16-F1 apresentarem menor capacidade metastática comparativamente às células B16-F10, os resultados semelhantes de disseminação de metástases para outros órgãos e tecidos corroboram as alterações fenotípicas descritas por Silva Filho et al. (2022), e sugerem uma mudança no prognóstico da doença, que é afetada de duas formas, pela exposição apenas do indivíduo ou pela exposição apenas da célula. Em termos reais, o que observamos é a ocorrência de ambas as situações, pois

o indivíduo ao ser exposto ao poluente, e se já for acometido pela doença vai apresentar um efeito aditivo da exposição do indivíduo e da célula tumoral. Nesse caso, teoricamente o resultado pode ser maior que o observado tanto no experimento realizado por Brito et al. (2020) como o do presente estudo, visto que ambas as situações favorecem a disseminação das metástases. Esta nova abordagem coloca em evidência os limites seguros de exposição a poluentes orgânicos como os polibromados para a população humana e amplia a discussão sobre o risco do meio ambiente para a saúde humana.

5 CONCLUSÃO

Em geral, o presente estudo mostrou que o BDE-209 nas concentrações testadas não é citotóxico para células de melanoma, mas induz um conjunto de respostas *in vivo* que, juntas, demonstram o potencial desse poluente ambiental em modular a progressão e o prognóstico da doença melanoma. Dessa forma, o aumento da área colonizada por metástases nos pulmões, presença de metástases no cérebro dos camundongos, a redução dos supressores tumorais (*Timp3* e *Reck*), a redução da peroxidação lipídica e aumento da resposta inflamatória local e sistêmica, apresentam evidências de que o papel dos poluentes orgânicos na progressão do câncer não pode ser descartado.

CAPÍTULO II

Alteração fenotípica de células B16-F1 pela exposição de BDE-209 para um perfil mais agressivo e quimiorresistente *in vivo*

RESUMO

A indução a metástases e a resistência a múltiplas drogas (MDR), são os principais fatores que dificultam o sucesso do tratamento do câncer. O melanoma é um tipo de câncer de pele agressivo devido a sua alta capacidade metastática e rápida progressão para outros tecidos e órgãos. O 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-deca-bromodifenil éter (BDE-209) é um aditivo muito utilizado principalmente em plásticos, com a função de retardar chamas. Esse composto é classificado como poluente orgânico persistente, abrangendo características de natureza lipofílica, com a capacidade de bioacumular nos tecidos, percorre a longas distâncias e de difícil degradação. Visto que a exposição ao BDE-209 pode ocorrer desde a fase fetal e se estender ao longo da vida do indivíduo, esse poluente ambiental reflete grande preocupação, em termos de saúde pública. Assim, devido à onipresença desse composto e com base em resultados recentes do nosso grupo de pesquisa, buscamos investigar em estudo *in vivo* o papel do BDE-209 na progressão, malignidade e seu efeito no tratamento quimioterápico com a dacarbazina. A concentração utilizada do BDE-209 é ambientalmente relevante, com base em concentrações de amostras biológicas humanas. Primeiramente, as células B16-F1 de melanoma murino foram expostas ao BDE-209 durante 15 dias. Em seguida, camundongos da linhagem C57BL/6 foram submetidos ao ensaio de metástase experimental, onde as células previamente tratadas foram inoculadas via veia caudal. Em grupos selecionados foi administrado o tratamento quimioterápico com dacarbazina *in vivo*, nos animais inoculados com as células B16-F1 previamente expostas ao BDE-209. Após o período de metástase experimental (20 dias), foram avaliados diferentes parâmetros. A inoculação das células B16-F1 expostas ao BDE-209 nos animais, e o grupo inoculado com as células B16-F1 previamente expostas ao BDE-209 e posterior administração do tratamento quimioterápico, apresentaram o aumento significativo da massa pulmonar, metástases colonizadas na superfície dos pulmões, índice de lesões metastáticas nas análises histológicas e a redução do supressor tumoral *Timp3*. Também foi observado no pulmão e fígado dos camundongos a diminuição de tióis não proteicos. Nos animais inoculados com as células B16-F1 expostas ao BDE-209 foi encontrado uma maior expressão de proteínas do extrato de proteínas totais do pulmão dos camundongos, quando comparado ao controle. Adicionalmente, no mesmo grupo de animais, houve a superexpressão de *Abcb1*, principal transportador ABC de resistência a múltiplas drogas, bem como a diminuição da expressão de *Abcc4* e *Cd44* e o aumento do tamanho das vesículas extracelulares (VEs) do plasma. O tamanho das vesículas também foi aumentado no grupo exposto previamente ao BDE-209 com administração do quimioterápico dacarbazina e o aumento da expressão de *Abcc4* e *Cd44* foi observada. Portanto, esses dados sugerem que o potencial efeito do BDE-209 na modulação fenotípica de células de melanoma murino (B16-F1) interferem *in vivo* na progressão tumoral e no tratamento do melanoma.

Palavras-chave: Deca-BDE. Quimiorresistência, *Abcb1*. Vesículas extracelulares. Progressão tumoral. *Timp3*.

ABSTRACT

The induction of metastasis and resistance to multiple drugs (MDR) are the main factors that hinder the success of cancer treatment. Melanoma is an aggressive type of skin cancer due to its high metastatic capacity and rapid progression to other tissues and organs. The 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'- decabromodiphenyl ether (BDE-209) is a commonly used additive in plastics, primarily used as a flame retardant. This compound is classified as a persistent organic pollutant, possessing lipophilic properties, the ability to bioaccumulate in tissues, travel long distances, and resist degradation. Given that exposure to BDE-209 can occur from the fetal stage and extend throughout an individual's life, this environmental pollutant raises significant concerns in terms of public health. Therefore, based on recent results from our research group and due to the ubiquity of this compound, our goal is to investigate the role of BDE-209 in progression, malignancy, and its effect on chemotherapy with dacarbazine in an *in vivo* study. The concentration of BDE-209 used is environmentally relevant, based on concentrations found in human biological samples. Initially, murine melanoma B16-F1 cells were exposed to BDE-209 for 15 days. Subsequently, C57BL/6 mice were subjected to an experimental metastasis assay, where previously treated cells were inoculated via the caudal vein. In selected groups, *in vivo* chemotherapy with dacarbazine was administered to the animals inoculated with B16-F1 cells previously exposed to BDE-209. After the experimental metastasis period (20 days), different parameters were evaluated. Inoculation of B16-F1 cells exposed to BDE-209 in the animals and the group inoculated with B16-F1 cells previously exposed to BDE-209 and subsequently administered chemotherapy showed a significant increase in lung mass, colonized lung surface metastases, metastatic lesion index in histological analyses and a reduction in the tumor suppressor *Timp3*. Decrease of non-protein thiols was also observed in the lungs and livers of the mice. In the animals inoculated with B16-F1 cells exposed to BDE-209, higher expression of proteins in the total lung protein extract was found compared to the control. Additionally, in the same group of animals, there was overexpression of *Abcb1*, the main ABC transporter for multi-drug resistance, as well as a decrease in the expression of ABCC4 and CD44 and an increase in the size of extracellular vesicles (EVs) in the plasma. Increased vesicle size was also observed in the group previously exposed to BDE-209 with dacarbazine administration and an increase in the expression of ABCC4 and CD44 was noted. Therefore, these data suggest the potential effect of BDE-209 on the phenotypic modulation of murine melanoma cells (B16-F1) *in vivo*, influencing tumor progression and melanoma treatment.

Keywords: Deca-BDE. Chemoresistance. *Abcb1*. Extracellular vesicles (EVs). Tumor progression. *Timp3*.

1 INTRODUÇÃO

A resistência aos medicamentos anticâncer em células cancerígenas é um processo complexo, responsável pela falha ao tratamento por agentes quimioterápicos comuns nos diferentes tipos de câncer. Diferentes fatores podem estar envolvidos e influenciar no mecanismo de resistência aos medicamentos, como a heterogeneidade tumoral, microambiente tumoral, inativação dos medicamentos anticâncer, resistência a múltiplas drogas (MDR), redução da absorção dos medicamentos, inibição da morte celular, amplificação gênica e alteração epigenética (ASSARAF et al., 2019; MANSOORI et al., 2017). Nas últimas décadas, uma ampla gama de métodos de tratamentos contra o câncer tem sido desenvolvidos, no entanto, a quimioterapia continua sendo o principal procedimento utilizado para o tratamento do câncer. Alguns dos quimioterápicos comumente administrados podem ser de diferentes classes como antimetabólitos, agentes alquilantes, agentes do fuso mitótico e inibidores da topoisomerase (BUKOWSKI; KCIUK; KONTEK, 2020).

O melanoma é o tipo de câncer de pele mais agressivo e atualmente, resistente a todas as variedades de terapias contra o câncer, impactando de forma sutil na taxa de sobrevivência global do paciente, quando existente. Os mecanismos de resistência do melanoma, são os responsáveis pela baixa efetividade do tratamento quimioterápico (RASS; HASSEL, 2009; SOENGAS; LOWE, 2003). A dacarbazina é um agente quimioterápico utilizado com muita frequência no tratamento para o câncer de melanoma. Esse quimioterápico pertence a classe de medicamento anticâncer alquilante, que leva a morte de células cancerígenas pela adição de um grupo alquil ao DNA da célula (DEMETRI et al., 2017; TARHINI et al., 2006).

Estudos bioquímicos, funcionais e genéticos tem demonstrado que as células de melanoma desenvolvem resistência a diferentes medicamentos quimioterápicos, reprogramando as vias de sobrevivência, proliferação e evasão da apoptose durante a progressão da doença (SOENGAS; LOWE, 2003). O reparo do DNA e a resistência a múltiplas drogas (MDR) são outros mecanismos de resistência abordados no câncer de melanoma (RASS; HASSEL, 2009). A principal causa de resistência a múltiplas drogas em câncer humano é decorrente da expressão e função de diferentes transportadores ABC, que

transportam medicamentos anticâncer das células, reduzindo o acúmulo de drogas nas células neoplásicas, prejudicando o tratamento. No contexto do melanoma, um conjunto de transportadores ABC, incluindo ABCCA9, ABCB1, ABCB5, ABCB8, ABCC1, ABCC2 e ABCD1, podem estar relacionados ao mecanismo de resistência contra diversos medicamentos anticâncer (CHEN et al., 2009). Estudos recentes revelam que os transportadores ABC também desempenham funções adicionais na biologia tumoral, com o transporte de moléculas que favorecem o tumor e também com moléculas que impactam a agressividade e o prognóstico do câncer (MURIITHI et al., 2020). Outro fator importante para a progressão tumoral são as vesículas extracelulares (VEs), que sequestram substâncias moleculares do citoplasma e as transportam como mensageiros para as células-alvo. Essas vesículas podem transportar diferentes moléculas incluindo proteínas, DNA, RNA e microRNA provenientes de células cancerígenas que podem afetar o crescimento, angiogênese, progressão e disseminação metastática do tumor (CHENG et al., 2021; LATTMANN; LEVESQUE, 2022).

Poluentes ambientais como os Éteres difenílicos polibromados (PBDEs) tem sido relacionado com a malignidade e progressão do câncer de melanoma (STEIL et al., 2022; SILVA FILHO et al., 2022). Dentre os congêneres dos PBDEs, incluem-se o decabromodifenil éter (BDE-209), um retardante de chamas amplamente utilizado pelas indústrias, principalmente em plásticos com a função de controlar a combustão. Esse composto, entrou para a lista dos Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) (2017), devido às suas características de bioacumular em tecidos, por ser uma molécula lipofílica, percorrer a longas distâncias e persistente no ambiente (CHOU et al., 2019; STOCKHOLM CONVENTION, 2019; YU et al., 2015).

A população humana pode estar exposta aos polibromados por diferentes vias, onde se destaca a inalação de poeira doméstica, ingestão oral, contato dérmico, ou solo contaminado (WU et al., 2020). Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa, mostram que poluentes ambientais podem modular a atividade e expressão dos transportadores ABC. O BDE-209 está relacionado com o aumento da expressão de transportadores ABC como de *Abcb1* e *Abcc4*, enquanto que o TCDD com o *Abcb5*, *Abcc1* e *Abcc4* (MARCHI et al., 2021). Roque et al. (2023), mostram que uma mistura complexa de pesticidas e

metabólitos modulam *in vitro* a expressão de transportadores ABC como *Abcb1*, *Abcc1* e *Abcc4*. Nesse contexto, em que poluentes ambientais podem favorecer o desenvolvimento do câncer de melanoma, nosso objetivo é avaliar se o BDE-209 pode modular o fenótipo das células de melanoma murino (B16-F1), interferindo no tratamento quimioterápico *in vivo* com a Dacarbazina e consequentemente, no prognóstico da doença.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÉTER DECABROMODIFENÍLICO (BDE-209)

A preparação da solução de BDE-209 (1 nM) foram preparadas da mesma forma, como descrito na seção 2.1 do Capítulo I.

2.2 CULTIVO DE CÉLULAS B16

As células foram cultivadas como mencionadas no Capítulo I, na seção 2.2.

2.3 EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS B16-F1 AO BDE-209 *IN VITRO*

A exposição das células de melanoma murino (B16-F1) durante 15 dias ao BDE-209, estão descritas na seção 2.3 do Capítulo I.

2.4 METÁSTASE TUMORAL DE MELANOMA MURINO (B16-F1)

Os procedimentos envolvidos para o desenvolvimento de metástase experimental *in vivo*, foram realizados conforme descrito na seção 2.4 do Capítulo I.

2.5 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO COM A DACARBAZINA (DTIC) EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Após a inoculação das células de melanoma murino (B16-F1) expostas durante 15 dias ao BDE-209, alguns grupos de animais foram administrados com

o tratamento quimioterápico com a dacarbazina (DTIC). O tratamento quimioterápico *in vivo* com a Dacarbazina, iniciou-se após o quinto dia da inoculação das células B16. A aplicação do quimioterápico foi realizada via intraperitoneal (40 mg.Kg^{-1}) a cada três dias após a primeira aplicação, totalizando em 5 aplicações. Ao final dos 20 dias de metástase experimental, os animais foram eutanasiados e então coletado o sangue, pulmão, cérebro, fígado, rim e ovário para as análises biológicas. Os grupos experimentais estão descritos na TABELA 4.

TABELA 4. GRUPOS EXPERIMENTAIS (*IN VIVO*)

Tratamento	Grupos experimentais	N amostral
I	C0/P0 (animais sem inoculação de células) – animais saudáveis. Nos gráficos não são considerados nas análises estatísticas.	5
II	B16-F10 (inoculação de células B16-F10)	5
III	B16-F1 (inoculação de células B16-F1)	5
IV	Veículo (DMSO) (inoculação de células B16-F1 expostas ao DMSO)	10
V	BDE-209 1 nM (inoculação de células B16-F1 expostas ao BDE-209 a concentração de 1 nM).	10
VI	Veículo + DTIC (inoculação de células B16-F1 expostas ao DMSO e tratamento quimioterápico com a Dacarbazina <i>in vivo</i>).	10
VII	BDE-209 1 nM + DTIC (inoculação de células B16-F1 expostas ao BDE-209 a concentração de 1 nM e posterior tratamento quimioterápico <i>in vivo</i> com a Dacarbazina).	10
Total		55

FONTE: a autora (2023).

2.6 ENSAIOS *IN VIVO*

2.6.1 Biomarcadores bioquímicos em tecidos

Fragmentos dos pulmões e do fígado foram homogeneizados em TissueLyser II (Qiagen), por 3 minutos a uma frequência de 25 Hz, em tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, PMSF (Fhenylmtehylsulfonyl fluoride) 1 mM (pH 7,6). Centrifugados a 12.000 g por 20 minutos, 4°C para os seguintes biomarcadores bioquímicos: (i) tióis não proteicos (TNP) (SEDLAK; LINDSAY, 1968), (ii) glutathiona-S-transferase (GST) (KEEN et al., 1976) e (iii) catalase (CAT) (AEBI, 1984). O sobrenadante do conteúdo de proteína foi medido pelo

método de Bradford (1976) 595 nm em Varioskan Lux (Thermo Scientific), e a concentração de proteína foi normalizada para 1 mg/mL para atividade enzimáticas.

2.6.2 Análise de vesículas extracelulares (VEs) em plasma

A purificação das vesículas extracelulares grandes (*Large extracellular vesicles* - LEVs), foi realizada de acordo com Sana et al. (2023) com modificações. O sangue dos camundongos foi coletado em tubos contendo EDTA, homogeneizados em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2500 xg por 15 minutos a 10°C. O sobrenadante foi passado para um novo tubo e repetido a centrifugação. O volume do plasma obtido para cada animal foi registrado. As amostras foram diluídas em 1 mL de PBS estéril. Em seguida, as amostras foram centrifugadas 11.000 xg por 2 horas para obtenção das microvesículas (*Large extracellular vesicles* - LEVs) (majoritariamente microvesículas) (pellet). As amostras de LEVs foram ressuspensas em 50µL de PBS. Leituras de 60 s de captura foram feitas em triplicata em temperatura ambiente. O tamanho das VEs foram determinadas por análise de rastreamento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis - NTA - NanoSight LM10, Malvern, U.K.). Os dados de média e moda do diâmetro das vesículas e a concentração de partículas e proteínas foram avaliados.

2.6.3 Análises de progressão tumoral

Os pulmões foram fotografados frente e verso e capturadas as imagens com a câmera Axiocam 503, Zeiss acoplado ao estereomicroscópio (Discovery.V12, Zeiss e o software Zen pro 2.6 Zeiss). A escala de 2000 µm foi utilizada como referência do tamanho dos pulmões. As fotografias dos pulmões foram analisadas pelo software ImageJ (Fiji), quantificando a área total dos pulmões e a área colonizada por metástases. Assim segundo o modelo, quanto maior o número ou área de metástases, resulta na maior colonização das células tumorais inoculadas.

2.6.4 Análises histopatológicas

Para as análises histológicas, os pulmões foram fixados por 4 horas em paraformaldeído a 4% (EMS – Hatfield, EUA) diluído em PBS. As amostras foram desidratadas em série graduada de etanol, diafanizadas em xilol e a inclusão foi realizada em Paraplast Plus (Merck - Darmstadt, Alemanha). Cortes de 5 µm foram feitos e corados com Hematoxilina-Eosina para a análise de lesões metastáticas. As imagens foram obtidas no microscópio BX51 (Olympus).

Para avaliação histológica foi elaborado um índice que permite diferenciar e quantificar as lesões metastáticas, baseado no índice descrito por Bernet e colaboradores (1999). Inicialmente, as alterações foram classificadas em 4 diferentes padrões de reação. Os padrões 1 e 2 representam distúrbios circulatórios e alterações regressivas, esse tipo de lesão pode ser revertido em tecidos normais, porém frequentemente são encontrados em lesões pré-neoplásicas (DALECK et al., 2016; KLEIN et al., 2011; NISHIYA et al., 2016). Os padrões 3 e 4, dizem respeito ao tipo e localização tumoral e anormalidades celulares que podem contribuir para um pior prognóstico, ou até mesmo a disseminação das células tumorais (HASLETON et al., 2013; KLEIN et al., 2011; STEVENSON et al., 2023).

Além disso, mesmo dentro dos padrões de reação é possível discriminar parâmetros individuais, estabelecendo lesões específicas. A relevância dessas lesões depende da sua importância, quanto mais grave a lesão, maior será o fator de importância. Nesse estudo foram utilizados os fatores de importância de 1 a 3. Adicionalmente, cada alteração foi avaliada por um *score* que variou entre 0 a 6, dependendo do grau e extensão dessa alteração (TABELA 5). Um total de 10 campos por lâminas foram avaliados.

TABELA 5. EXTENSÃO DE CADA ALTERAÇÃO DE ACORDO COM O SCORE

Score	Frequência no tecido
0	inexistente
1	1-16%
2	17-33%
3	34-49%
4	50-65%
5	66-81%
6	82-100%

FONTE: a autora (2023).

O cálculo considera a soma das alterações, ou seja, dos padrões de alterações (rp) e do fator de importância (w), multiplicados pelo valor do score (a), conforme apresentado na equação a seguir:

$$\text{Índice de lesão metastática} = \sum_{Alt} (rp + w) \cdot a$$

As alterações avaliadas foram compiladas na TABELA 6.

TABELA 6. FERRAMENTAS DE AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PARA LESÕES METASTÁTICAS

Padrão de reação		Alteração	Fator de Importância (W: 1-3)	Valor do score (a: 0-6)
Distúrbios circulatórios (tecido total)	1	Hemorragia/Hiperemia/Aneurisma	1	
		Edema Intercelular	1	
Mudanças regressivas	2	Hiperplasia	1	
		Metaplasia	2	
Tipo e localização tumoral	3	Borda pulmão	1	
		Interior pulmão	2	
		Falta de delimitação do tumor	3	
		Células fusiformes ou redondas	1	
		Células epitelióides	2	
		Amelanótico	2	
		Melanótico	1	
Mudanças Progressivas	4	Pleomorfismo	1	
		Núcleo polimórfico	2	
		Macrocariose	2	
		Anisocariose	2	
		Agregação anormal da cromatina	2	
		Relação núcleo-citoplasma aumentado	3	
		2 ou + Núcleos hiper cromáticos	3	
		Figuras mitóticas	3	
		Angiogênese	3	
		Índice mitótico	3	

FONTE: a autora (2023).

2.6.5 Expressão gênica (RT-qPCR)

A expressão gênica relativa de *Mmp2*, *Mmp9*, *Mmp14*, *Timp3*, *Reck*, *Abcb1*, *Abcc1* e *Abcc4* foi detectada usando RT-qPCR, em pulmões de camundongos após a exposição ao BDE-209, durante 15 dias em células de melanoma murino (B16-F1) e posterior inoculação nos animais para metástase experimental (20 dias). A extração de RNA total foi realizada com o mini-Kit RNA Purelink™ (Invitrogen, ref. 12183018A) com uma etapa adicional usando o reagente Trizol (Invitrogen, ref. 15596026). As amostras foram lisadas e homogeneizadas em TissueLyser II (Qiagen), por 3 minutos a uma frequência de 25 Hz.

Quantifluor® (Promega, ref. E2671) foi usado para quantificar o RNA extraído. A avaliação da qualidade do RNA total foi realizada pela verificação da pureza, usando a razão Abs260/Abs280 para verificar o grau de contaminação por proteínas e a razão Abs260/Abs230 para verificar o grau de contaminação por fenol e outros contaminantes, com valores limite de ~2,0 e 1,8 -2,2, respectivamente (DESJARDINS; CONKLIN, 2011). Para verificar a integridade do RNA foi utilizada a eletroforese em gel de agarose.

O material foi convertido em cDNA usando SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen, ref. 18091050) e a concentração de 20 ng de cDNA e 500 nM de primers para cada reação foi ajustada em volume final de 10 µL. Para amplificação em tempo real, PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Invitrogen, ref. A25776) e StepOnePlus™ Real-Time PCR System, foram usados em amostras de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicatas.

As sequências de primers estão listados a seguir (TABELA 7). Os resultados relativos da quantificação da expressão gênica foram normalizados em níveis de transcrição de *Gapdh* e *Beta-2-microglobulina* como genes de referência (média geométrica), estabelecendo comparações dos níveis de expressão entre os genes alvos de cada amostra analisada.

TABELA 7. INFORMAÇÕES DOS PRIMERS

Gene	GenBank	Primers - F (forward) and R (reverse)	Amplicon (bp)
Metaloproteinase de Matriz 2 (Mmp2)	NM_008610	F - 5' TGACCGGGATAAGAAGTATGG 3' R - 5' ACTTGTTGCCAGGAAAGTG 3'	110
Metaloproteinase de Matriz 9 (Mmp9)	NM_013599	F - 5' TGACAAGAAGTGGGGTTTCTG 3' R - 5' GGCACGCTGGAATGATCTA 3'	101
Metaloproteinase de Matriz 14 (Mmp14)	NM_008608	F - 5' TATGGGCCCAACATCTGTG 3' R - 5' TCCATCACTTGGTTATTCCTCA 3'	113
Inibidor tissidual de metaloproteinase 3 (Timp3)	NM_011595	F - 5' ACCTCACCTCCTTCCCATC3' R - 5' CCAGTGCTAAATTTGCAAGAAA3'	100
Proteína rica em cisteína indutora de reversão com motivos Kazal (Reck)	NM_016678	F - 5' ATAGGCTGCAAACCCATCAT 3' R - 5' TGTCACCTTAGCAATAGTGTCCA 3'	108
Antígeno Cd44 (Cd44)	NM_001039151	F - 5' AAGTACCGGTCCATCTTCCA 3' R - 5' CTAAGGCCACACTGATGTGC 3'	100
Transportador de membrana Subfamília B Membro 1 (Abcb1)	NM_011075	F - 5' CTACCTGTTGGTCTATGC 3' R - 5' GACAGTAAGCACTTCTCC 3'	97
Transportador de membrana Subfamília C Membro 1 (Abcc1)	NM_008576	F - 5' GAACCTCCCACACTGAATGG3' R - 5' GGGCTGACAGCAGAGATGAC3'	103
ATP-Binding Cassette Subfamily C Member 4 (Abcc4)	NM_001163676	F - 5' GGCTTCAAGGCCTACAAGAA 3' R - 5' AAGCCACCAGTCCTGAAGAA 3'	117
β2-microglobulina (β2M) (gene endógeno)	NM_009735	F - 5' CGAGACATGTGATCAAGCATC3' R - 5' GCTATTTCTTTCTGCGTGCAT3'	110
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase Gapdh (gene endógeno)	NM_001411840.1	F - 5' AGAACATCATCCCTGCATCC3' R - 5' ACATTGGGGGTAGGAACACG3'	109

FONTE: a autora (2023).

2.6.6 Western Blot (WB)

Após a exposição *in vitro* ao BDE-209 e posterior inoculação em camundongos para metástase experimental durante 20 dias, as proteínas do tecido do pulmão foram extraídas e lisadas em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl, 1 mM de DTT; 2 mM de EDTA e 0,5 mM de PMSF. Posteriormente, o homogenato foi incubado por 60 minutos à 4°C sob agitação constante e clarificado o extrato por centrifugação 10.000g, durante 20 minutos à 4°C. Em seguida, as proteínas totais foram quantificadas no leitor de microplacas VarioSkan Lux em μ Plate por espectrofotometria à 280 nm e então normalizadas para 10 mg/mL no tampão de homogeneização. Amostras de proteína de 40 μ g foram processadas em gel de poliacrilamida SDS a 12% e depois transferidas para membranas de nitrocelulose (A29432624; GE Healthcare Life Science, Germany).

As membranas foram bloqueadas em leite em pó desnatado a 5%, durante 1 h. Após lavagens com PBS-T (Tween 0,1%) por 5 minutos em temperatura ambiente sob agitação leve e constante, as membranas foram incubadas overnight (16h) com o anticorpo primário: anti-actina policlonal

produzido em coelho (Sigma-Aldrich A2103); anti-MMP2 policlonal produzido em coelho (Sigma-Aldrich SAB4501891), anti-MMP9 policlonal produzido em coelho (Sigma-Aldrich AV33090); ou anti-TIMP3 policlonal produzido em coelho (Sigma-Aldrich SAB4502973).

O anticorpo secundário utilizado após diferentes testes foi o anti-coelho, HRP (Promega, Ref: W4011) na diluição de 1:5000, por 1 hora. Após a revelação quimioluminescente, foi realizado o stripping em cada membrana e incubado com o alvo de referência anti-GAPDH monoclonal produzido em camundongo (SC 32233) e o secundário e anti-camundongo HRP (Sigma-Aldrich A5153). Os softwares Image J e GraphPad Prism 8 foram usados para analisar os resultados.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os ensaios *in vivo*, foram empregados de 5 à 10 animais por grupo experimental. Os dados foram primeiramente testados quanto à normalidade dos resíduos e homocedasticidade das variâncias, utilizando o teste de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Os dados paramétricos foram analisados usando ANOVA de uma via seguido pelo teste de Sidak's teste de múltiplas comparações e expressos como média. Dados não paramétricos foram avaliados usando Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn's. Ambos usando o software GraphPad Prism 8.0.1. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3 RESULTADOS

3.1 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

Nas análises biométricas foram observadas diferenças para o peso do pulmão dos camundongos inoculados com as células B16-F10 (controle positivo) comparativamente com os animais inoculados com as células B16-F1 (76,61 %) e também do grupo veículo, onde os animais foram inoculados com células B16-F1 expostas ao DMSO (103,77 %) (Figura 18 A). Aqueles animais inoculados com células B16-F1 expostas previamente por 15 dias ao BDE-209 na

concentração de 1 nM, apresentaram o aumento do peso pulmonar em 68,99% em relação ao controle, entretanto, uma redução quando comparado com os animais inoculados com as células expostas ao BDE-209 e posterior tratamento quimioterápico com a Dacarbazina (*in vivo*) (- 35,02 %) (Figura 18 A).

Ainda, os animais inoculados com as células B16-F1 com exposição ao BDE 1 nM e posterior tratamento quimioterápico com a dacarbazina (*in vivo*) (BDE-209 + DTIC), resultou no aumento do peso do pulmão em 52,96% em relação ao seu respectivo controle (veículo + DTIC), onde os animais foram inoculados com células B16-F1 expostas ao DMSO e administrados com o tratamento quimioterápico com a Dacarbazina (*in vivo*) (Figura 18 A). No entanto, o peso dos órgãos do fígado, rim e ovário e também o peso dos animais (g) não apresentaram diferenças significativas em relação ao peso (Figura 18).

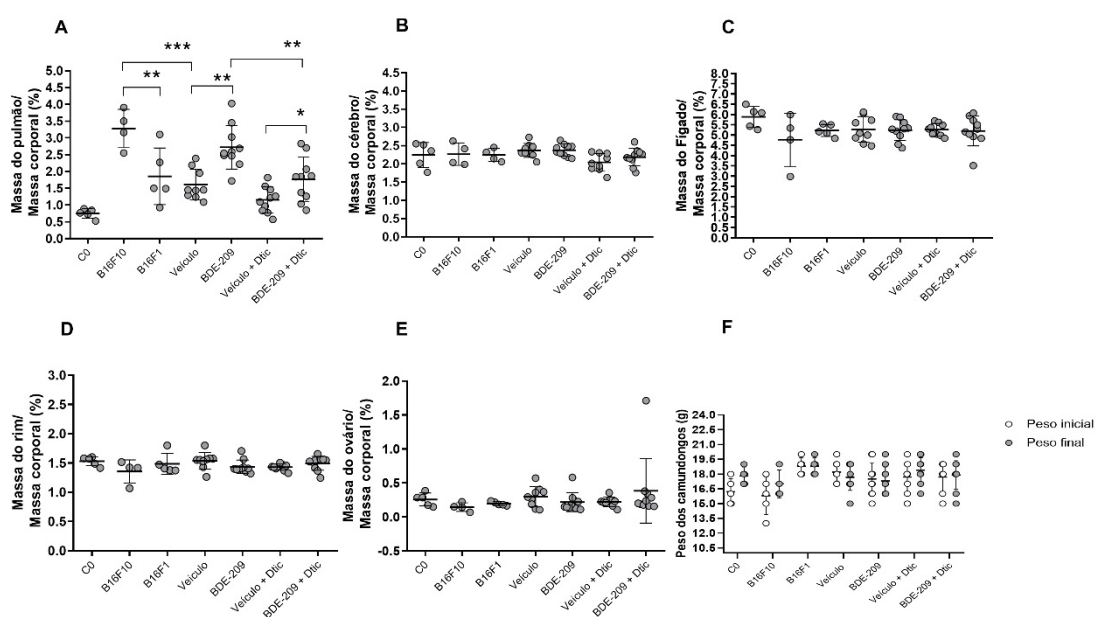


Figura 18. Análise biométrica dos camundongos da linhagem Black C57BL/6 após a inoculação das células expostas ao BDE-209 (*in vitro*) durante 15 dias e tratamento quimioterápico com a Dacarbazina (DTIC) (*in vivo*) com seus respectivos controles. Peso dos órgãos (A) pulmão, (B) Cérebro, (C) Fígado, (D) Rim, (E) Ovário, ambos em relação ao peso corporal; (F) Peso dos animais (g). CO; B16-F10 e B16-F1 N = 5; Veículo (DMSO); BDE-209, Veículo (DMSO) + DTIC e BDE-1nM + DTIC N = 10. * p < 0,05; ** p < 0,01 e *** p < 0,001. FONTE: a autora (2023).

3.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

As análises com os biomarcadores bioquímicos foram realizadas no pulmão e fígado dos camundongos, após 20 dias de metástase experimental, onde as células foram tratadas previamente. A concentração de tióis não proteicos no pulmão dos camundongos dos animais inoculados com células B16-F10 (controle positivo) foi reduzida (- 42,99 %) em relação ao grupo dos animais inoculados com as células B16-F1 (Figura 19 A). O mesmo padrão foi observado quando comparado o grupo de animais inoculados com as células B16-F1 expostas ao BDE-209 (1 nM) em relação ao grupo controle (DMSO) (-52,97 %). A redução da concentração de tióis não proteicos também foi observada no pulmão dos animais que sofreram a inoculação das células B16-F1 expostas somente ao veículo (DMSO), acrescido do tratamento quimioterápico (*in vivo*), quando comparado ao grupo veículo (DMSO) que não sofreu o tratamento quimioterápico (-44,42 %) (Figura 19 A).

Em fígado, a redução de tióis não proteicos também foi encontrada nos animais inoculados com as células B16-F1 expostas ao BDE-209 (1 nM) em relação ao grupo controle - veículo (DMSO) com uma redução de -44,44% (Figura 19 D). O mesmo foi observado no fígado dos animais que foram inoculados com as células B16-F1 expostas ao BDE-209 e posteriormente administrados com tratamento quimioterápico com a Dacarbazina em relação ao seu respectivo controle (Veículo + DTIC) (-20,90 %) (Figura 19 D). Entretanto, quando comparado o grupo BDE-209 + DTIC com o grupo BDE-209 que não sofreu tratamento quimioterápico foi observado o aumento de tióis não proteicos (44,92 %) (Figura 19 D). A atividade da Glutathione S-transferase e de catalase não apresentaram alterações nas diferentes condições, tanto para o pulmão quanto para o fígado (Figura 19).

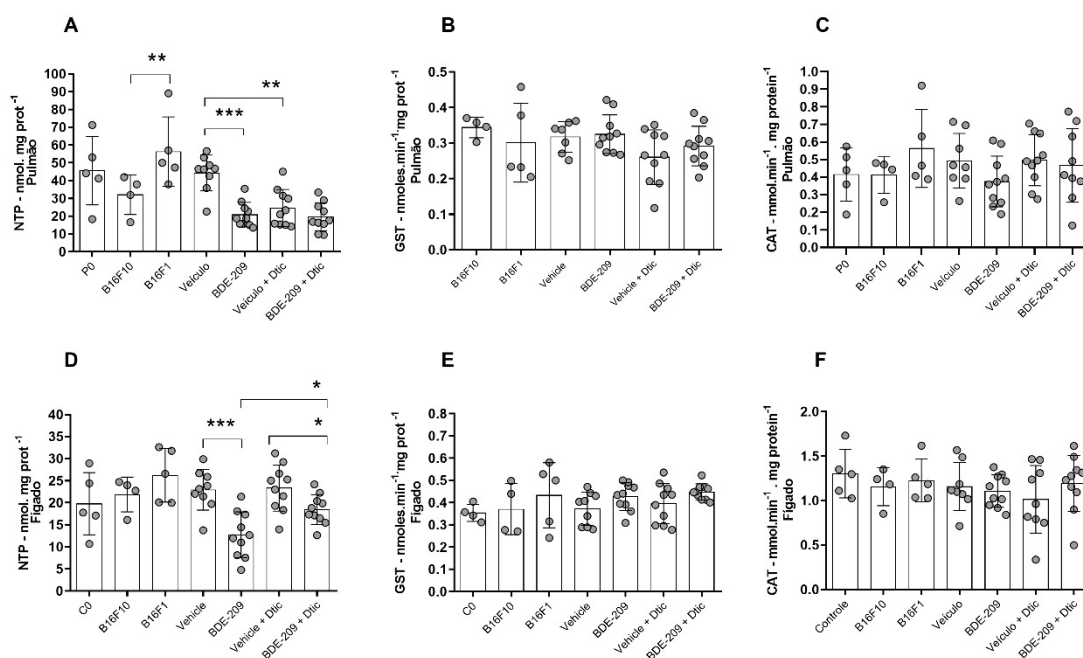


Figura 19. Análise de biomarcadores bioquímicos do pulmão dos camundongos Black C57BL/6 inoculados com células B16-F1 expostas ao BDE-209, com seus respectivos controles e também frente ao tratamento quimioterápico. Pulmão (A) Tióis não proteicos; (B) Atividade da Glutaciona S-transferase; (C) Catalase. Fígado (D) Tióis não proteicos; (E) Atividade da Glutaciona S-transferase; (F) Catalase. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$. C0; B16-F10 e B16-F1 N = 5; demais grupos N = 10. FONTE: a autora (2023).

3.3 PROGRESSÃO METASTÁTICA PULMONAR E QUIMIORRESISTÊNCIA APÓS METÁSTASE EXPERIMENTAL DE CÉLULAS B16-F1 EXPOSTAS AO BDE-209

As avaliações das áreas colonizadas por metástases da superfície pulmonar, foram realizadas através de análises das imagens dos pulmões dos camundongos, após 20 dias de metástase experimental. Os animais inoculados com células B16-F10 (controle positivo) apresentaram o aumento da área colonizada em 73,94 % em relação aos animais inoculados com as células B16-F1 expostas ao DMSO (veículo) (Figura 20 A e B)

No entanto, as células B16-F1 expostas durante 15 dias ao BDE-209 (1nM) apresentou o aumento da área colonizada por metástases nos pulmões dos camundongos em 113,56% em relação ao controle (veículo) (Figura 20 A e B). Por outro lado, os animais inoculados com as células B16-F1 expostas ao veículo (DMSO) e administrados com o quimioterápico Dacarbazina (*in vivo*),

apresentou uma tendência de redução (15,61%) em relação ao veículo sem tratamento quimioterápico, porém, não apresentou diferenças estatisticamente significativas (Figura 20 A e B).

Os animais que foram inoculados com as células B16-F1 expostas ao BDE-209 e administrados com o tratamento quimioterápico *in vivo*, com a Dacarbazina, apresentou o aumento da área colonizada por metástases de 72,06 % em relação ao seu respectivo controle (Veículo + DTIC) (Figura 20 A e B). Contudo, foi observado a redução (-32,01 %) da área colonizada por metástases quando comparado o BDE-209 com tratamento quimioterápico (DTIC) em relação ao BDE-209 sem tratamento quimioterápico (Figura 20 A e B).

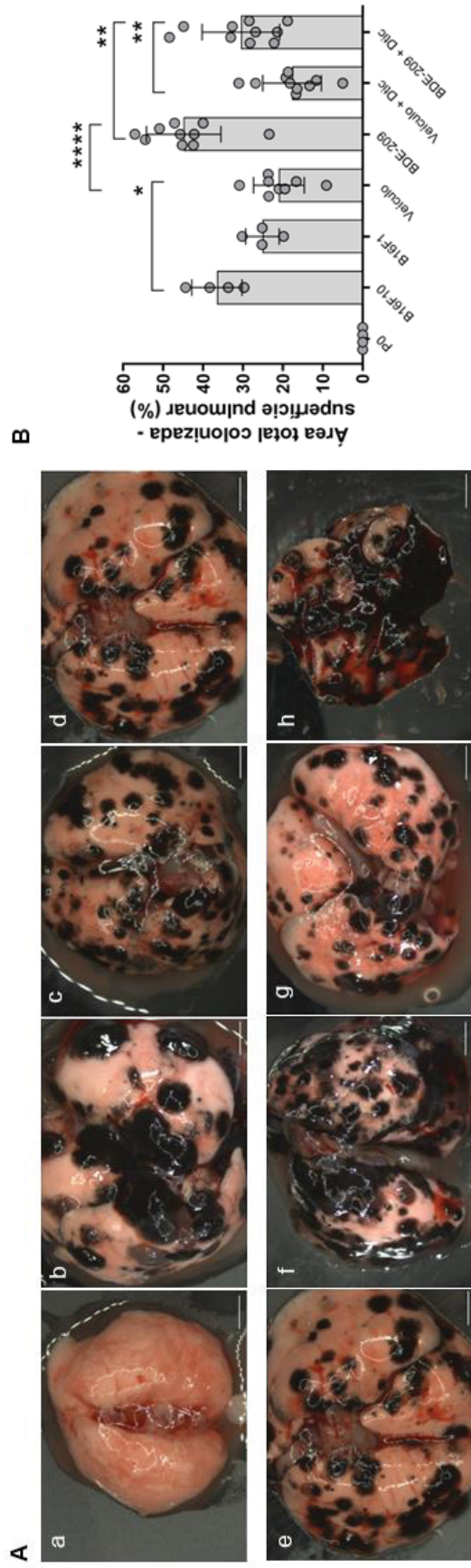


Figura 20. **(A)** Ponto final de metástase experimental 20 dias após a inoculação celular com exposição prévia ao BDE-209 *in vitro* e posterior tratamento quimioterápico *in vivo*, em camundongos Black C57BL/6 **(a)** P0, animais saudáveis sem inoculação de células B16 **(b)** B16-F10 **(c)** B16-F1 **(d-e)** Veículo (DMSO) **(f)** BDE-209 (1nM) **(g)** Veículo (DMSO) + DTIC **(h)** Veículo (DMSO) + DTIC **(B)** Área total de colonização de metástases. Área pulmonar total/área metastática. (P0, B16-F10 e B16-F1 N = 4; Veículo N = 8; BDE-209, Veículo + DTIC e BDE-209 + DTIC N = 10). * p = 0,0204 (B16-F10 vs. Veículo); ** p = 0,0067 (Veículo + DTIC vs. BDE-209 + DTIC); ** p = 0,0018 (BDE-209 vs. BDE-209 + DTIC); **** p < 0,0001 (BDE-209 vs. Veículo) Barra de escala 2000 µm. FONTE: a autora (2023).

Nas secções pulmonares de animais não inoculados e não tratados (P0), ou seja, animais saudáveis, não foram identificadas massas tumorais, como esperado (Figura 21 A), ou alterações condizentes com processos de malignidade (Figura 23 A). Nos grupos inoculados com células de melanoma murino (B16-F10 –Figura 21 B ou B16-F1 –Figura 21 C-G) foram identificadas massas tumorais localizadas tanto no interior do pulmão quanto nas bordas desse órgão.

Em camundongos inoculados com células B16-F10, as massas tumorais ocupavam em média cerca de 60% do pulmão dos camundongos. No grupo em que as células B16-F1 foram expostas ao BDE-209 com ou sem tratamento quimioterápico (Dacarbazina), as massas tumorais ocupavam cerca de 42% dos pulmões. No entanto, no grupo tratado com DMSO e no grupo Dacarbazina, as massas tumorais ocuparam uma menor porção do pulmão (~29%). Apesar dessas particularidades, não foram observadas diferenças significativas na área tumoral nos cortes histológicos (Figura 21 H).

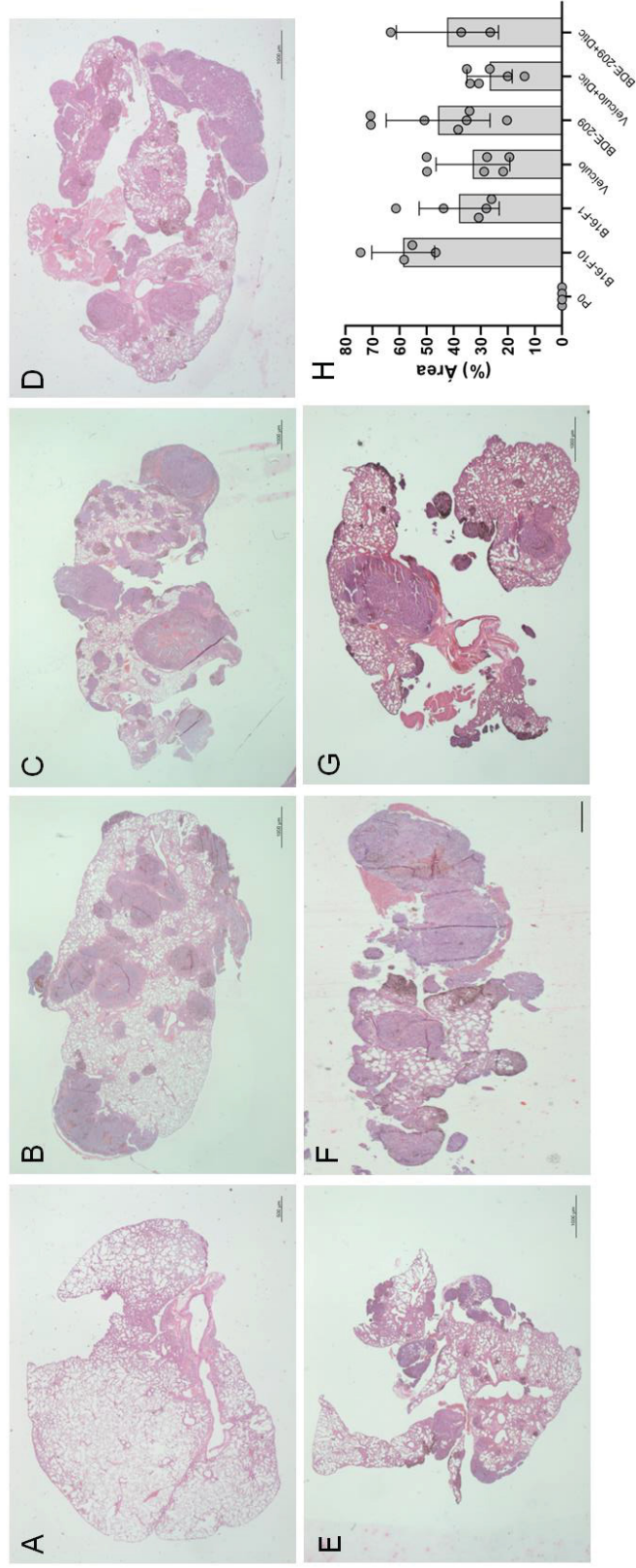


Figura 21. Imagem panorâmica das seções pulmonares de camundongos C57BL/6, após metástase experimental. **(A)** P0, animais sem inoculação de células tumorais; **(B)** B16-F10, inoculação de células B16-F10 sem exposição ao poluente; **(C)** B16-F1, inoculação de células B16-F1, sem exposição ao poluente; **(D)** Veículo, inoculação das células B16-F1 expostas ao DMSO; **(E)** inoculação das células B16-F1 expostas ao BDE-209; **(F)** Dacarbazina, inoculação de células B16-F1 expostas ao DMSO e posterior tratamento quimioterápico *in vivo*; **(G)** BDE-209 + dacarbazina, inoculação de células B16-F1, expostas ao BDE-209 e posterior tratamento quimioterápico com a dacarbazina *in vivo* e **(H)** Área tumoral (área total/área metastática) de cortes histológicos de pulmões de camundongos C57BL/6, após metástase experimental. N = 3 – 7. FONTE: a autora (2023).

Através do índice de lesão metastática em cortes histológicos do pulmão dos camundongos, foram observadas mudanças progressivas no grupo B16-F10 em relação ao grupo B16-F1 e veículo. O grupo com administração do quimioterápico dacarbazina apresentou a redução de características de mudanças progressivas em relação ao grupo veículo, sem administração de dacarbazina (Figura 22 A).

No entanto, as mudanças progressivas foram encontradas nos animais inoculados com as células expostas ao BDE-209 em relação ao controle (veículo); e do grupo exposto ao BDE-209 com administração da dacarbazina em relação ao controle (veículo + DTIC). Além disso, o grupo BDE-209 com administração de dacarbazina apresentou características de mudanças progressivas maiores em relação ao BDE-209 sem tratamento quimioterápico (Figura 22 A).

O padrão de reação denominado como tipo e localização tumoral também apresentou diferenças significativas entre os grupos (Figura 22 B). Foram observadas diferenças no tipo e localização do tumor no grupo B16-F10 em relação ao grupo B16-F1 e veículo. O grupo com administração do quimioterápico dacarbazina apresentou a diminuição de alterações do tipo e localização tumoral em relação ao controle (veículo) (Figura 22 B). Alterações de características que demonstram a progressão do câncer em relação ao tipo e localização tumoral também foi encontrada no grupo exposto ao BDE-209 com administração da dacarbazina em relação ao controle (veículo + DTIC) ((Figura 22 B).

Todavia, não foram observadas diferenças significativas referentes ao padrão de reação de mudanças regressivas (Figura 22 C) e de distúrbios circulatórios (Figura 22 D). Por último, o índice de lesão metastática que envolve ambos os parâmetros, apresentaram características de progressão tumoral no grupo B16-F10 em relação ao grupo B16-F1 e veículo (Figura 22 E). O mesmo foi observado nos animais inoculados com as células expostas ao BDE-209 em relação ao controle (veículo) e do grupo exposto ao BDE-209 com administração da dacarbazina em relação ao controle (veículo + DTIC) (Figura 22 E). O grupo com administração do quimioterápico dacarbazina apresentou a redução de características de mudanças progressivas em relação ao controle (veículo), sem administração do quimioterápico (Figura 22 E).

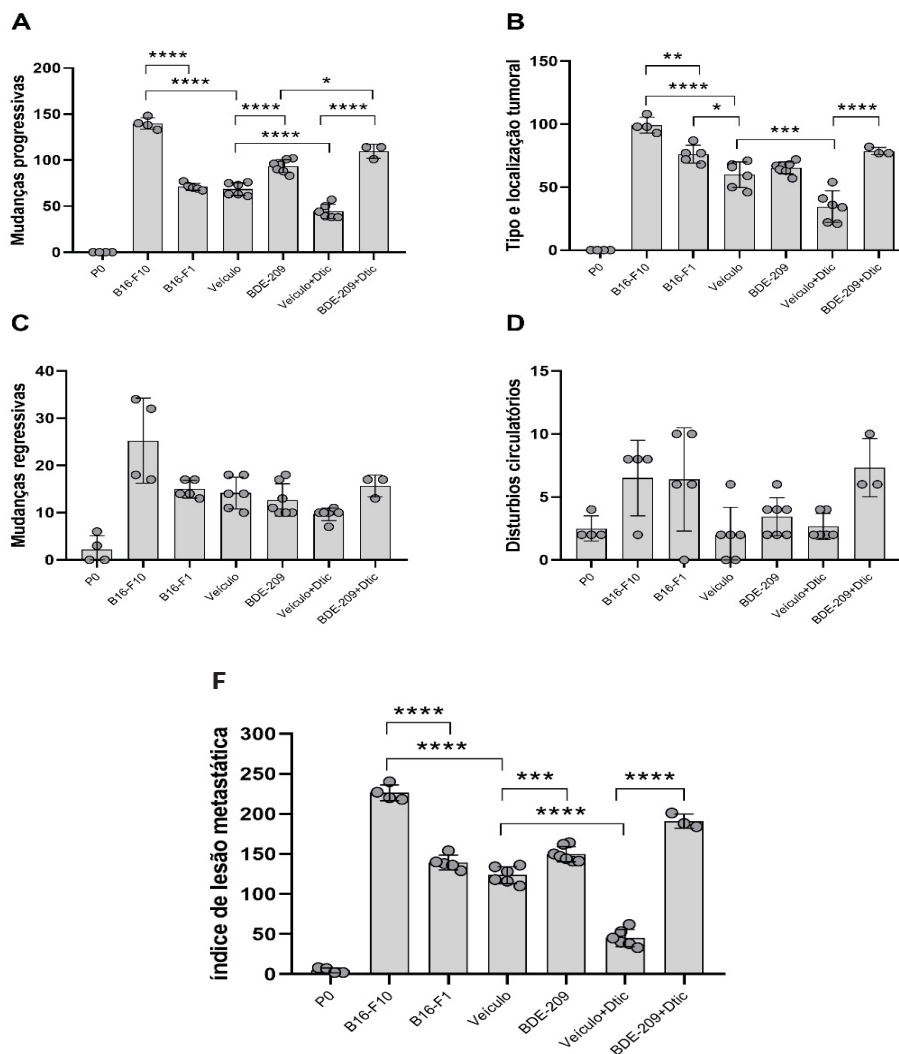


Figura 22. Índice de lesão metastática. *: indicam diferença estatisticamente significativa em: *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Valores = Média \pm Desvio padrão. ANOVA de uma via (*One-way ANOVA*) com pós teste de Šídák. N = 3 – 7. FONTE: a autora (2023).

Algumas das lesões histopatológicas encontradas nos pulmões de camundongos C57BL/6, após a inoculação de células expostas ao BDE-209, com ou sem tratamento quimioterápico *in vivo*, como edema, angiogênese, melanófagos, massa tumoral bem delimitada, células em mitose e região necrótica, são apresentadas na Figura 23.

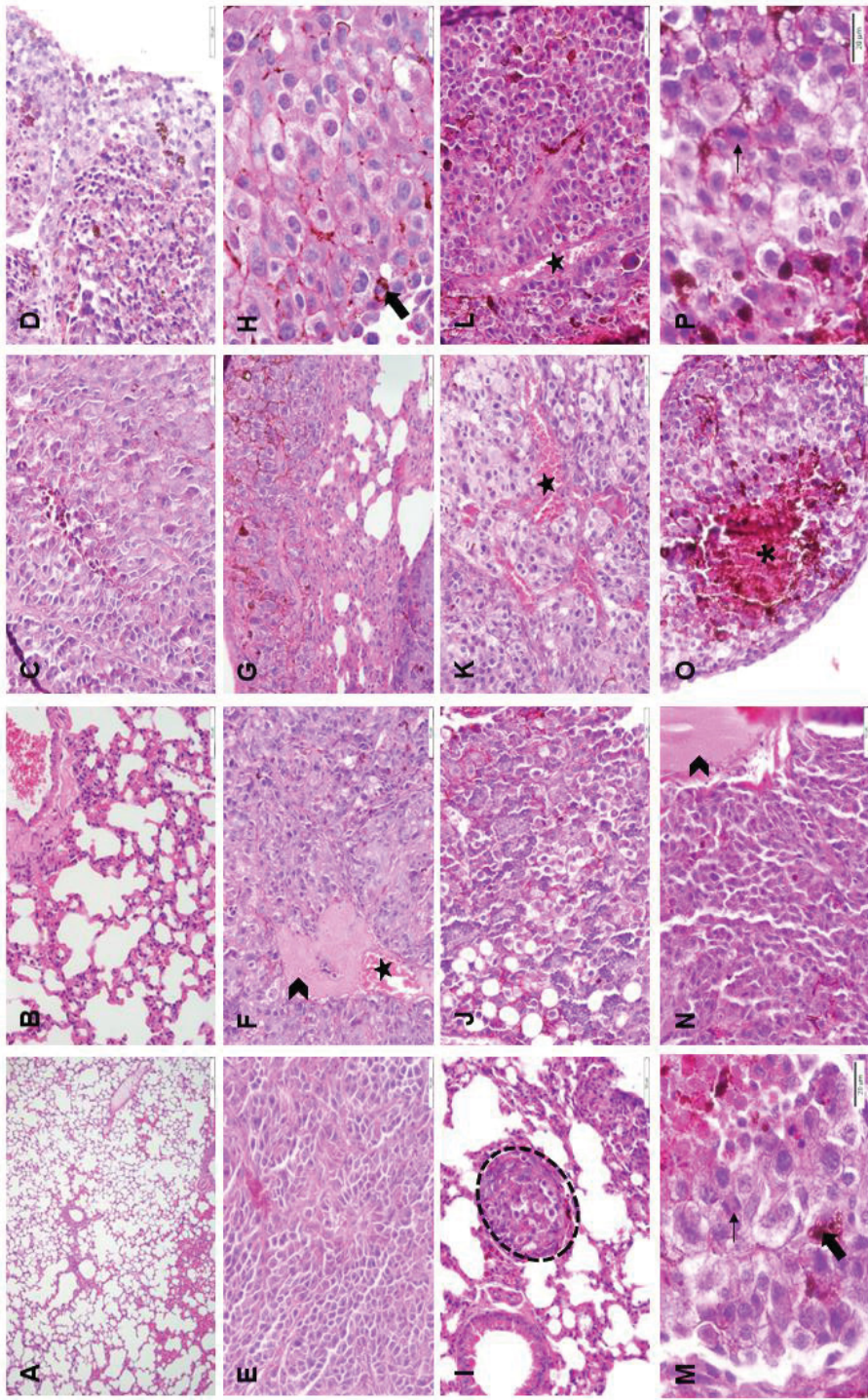


Figura 23. Secções transversais pulmonares de camundongos C57BL/6. **A e B:** Não inoculados e não tratados (Controle); **C e D:** Inoculados com células B16-F10; **E e F:** Inoculados com células B16-F1; **G e H:** Inoculados com células B16-F1 tratadas com DMSO (Veículo); **I e J:** Inoculados com células B16-F1 tratadas com DMSO e Dacarbazina; **K, L e M:** Inoculadas com células B16-F1 tratadas com BDE-209 (1nM); **N, O e P:** Inoculadas com células B16-F1 tratadas com BDE-209 (1nM) e Dacarbazina. Cabeça de seta: Edema intercelular. Estrela: Angiogênese. Seta larga: Melanófagos. Círculo pontilhado: Massa tumoral bem delimitada. Setas: Células em mitose. Asterisco: região necrótica. Barra de escala: A = 200 µm; B-G, I-L e N-P = 50 µm; H, M e P = 20 µm. Coloração: Hematoxilina e Eosina. FONTE: a autora (2023).

3.4 VESÍCULAS EXTRACELULARES (VEs)

Após 20 dias de metástase experimental foi realizada a extração e detecção das vesículas extracelulares (*large extracellular vesicles* - LEVs) em diferentes parâmetros, a partir do plasma do sangue dos camundongos. Os animais que foram submetidos a inoculação das células B16-F1 expostas ao BDE-209 apresentou o aumento estatisticamente significativo do tamanho médio do diâmetro (40,21 %) (Figura 24 A) e a moda do diâmetro (47,35 %) (Figura 24 B) das vesículas extracelulares - LEVs em relação ao controle (veículo). Além disso, houve o aumento da média do tamanho (41,07 %) das LEVs do grupo exposto ao BDE-209 com tratamento quimioterápico (DTIC) em relação ao controle (veículo + DTIC) (Figura 24 B).

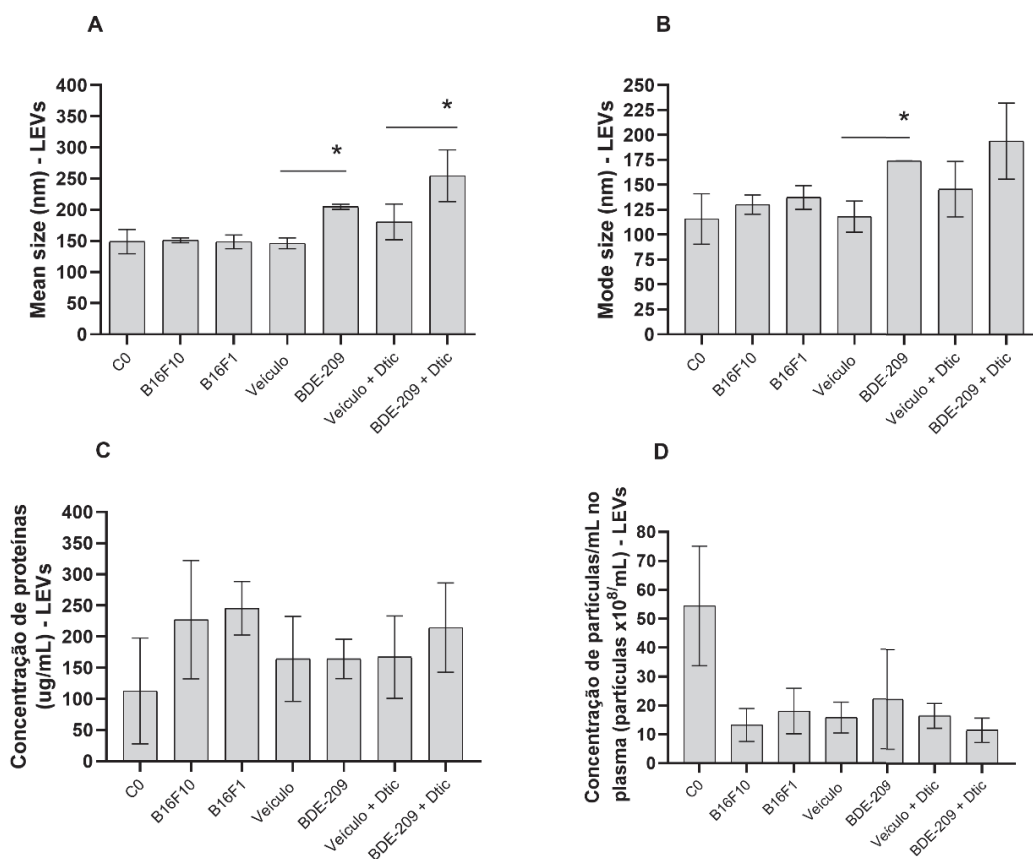


Figura 24. Análise das vesículas extracelulares (LEVs) do plasma do sangue dos camundongos Black C57BL/6. Os camundongos foram inoculados com as células B16-F1 expostas ao BDE-209 (in vitro) e tratamento quimioterápico (in vivo), após 20 dias da metástase experimental. N = 3. * p < 0,05. FONTE: a autora (2023).

3.5 EXPRESSÃO GÊNICA

Análise de expressão gênica do pulmão dos camundongos foi realizada após 20 dias de metástase experimental, com o objetivo de verificar possíveis alterações de alvos moleculares relacionados à malignidade e progressão do melanoma. Um aumento importante de 169,28% da expressão do transportador *Abcb1* que codifica a proteína PGP1, foi observado nos animais inoculados com células B16-F1 expostas durante 15 dias ao BDE-209 em relação ao controle (veículo) (Figura 25 A. a). Também foi observado um aumento da expressão gênica de *Abcc4* (218,40 %) no pulmão dos animais inoculados com as células B16-F1 expostas ao BDE-209 (*in vitro*) e posterior administração quimioterápico (*in vivo*), quando comparado com BDE-209 sem o tratamento quimioterápico (Figura 25 A. c). Por outro lado, a redução de *Abcc4* (63,83 %) foi observada na exposição de BDE-209 em relação ao seu respectivo controle (veículo) (c). A expressão gênica de *Abcc1* não apresentou alterações (Figura 25 A. b).

Para o supressor tumoral *Timp3* foi observado uma *downregulation* de 74,14 % do grupo exposto ao BDE-209 em relação ao grupo controle (veículo) e a redução de 53,20 % do grupo BDE-209 + DTIC em relação ao seu respectivo controle (veículo + DTIC) (Figura 25 B. d). Para o alvo *Cd44* o BDE-209 apresentou uma redução de 37,43% em relação ao controle (veículo) e um aumento na expressão de *Cd44* foi observado no grupo BDE-209 exposto ao quimioterápico (DTIC) em relação ao grupo BDE-209 sem tratamento quimioterápico em 88,07 % (Figura 25 B. e). Contudo, a expressão gênica das Metaloproteinases de Matriz 2, 9 e 14 não apresentaram diferenças entre os grupos (Figura 25 a-c).

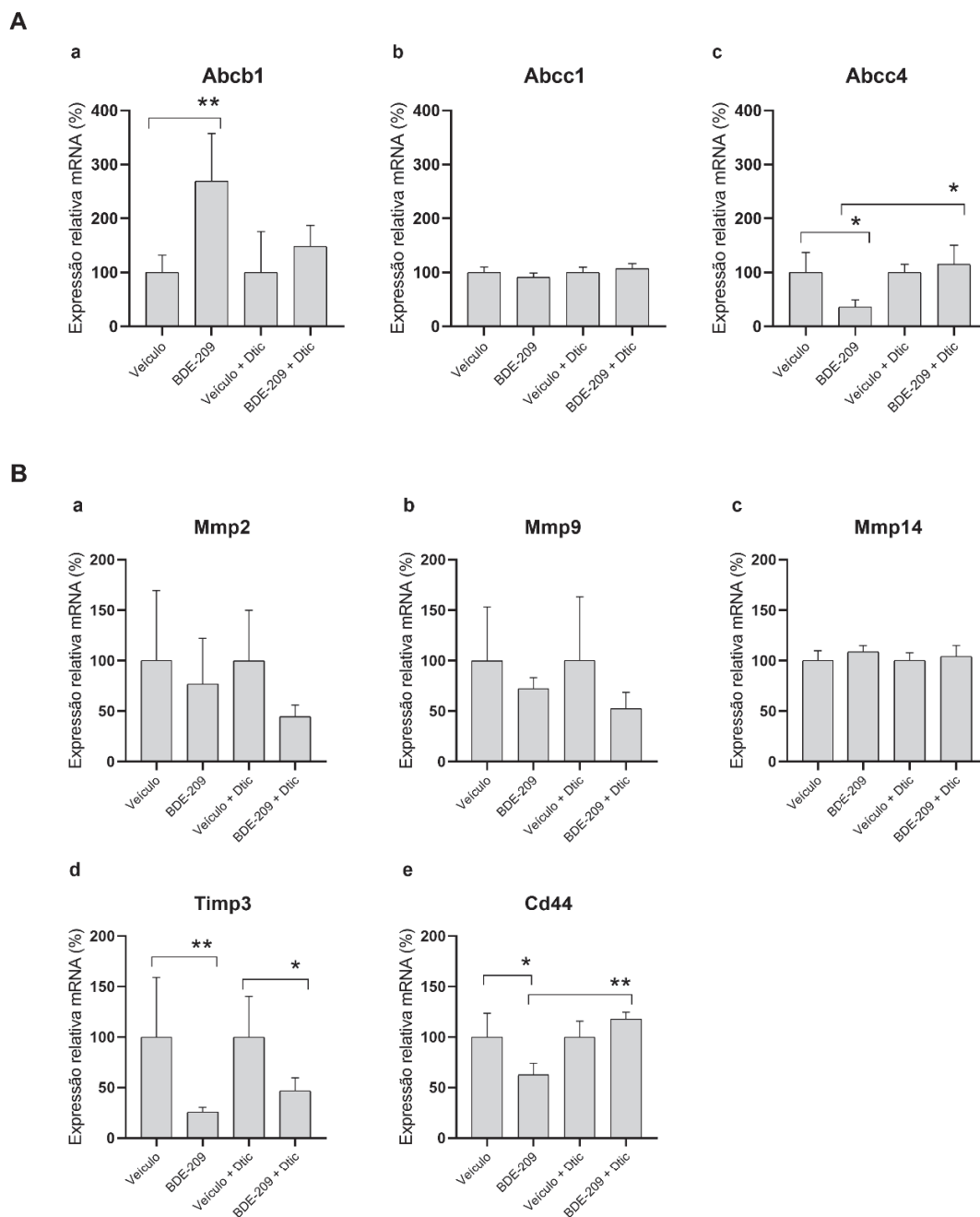


Figura 25. (A) Análise da expressão gênica de *Abcb1*, *Abcc1* e *Abcc4* (B) de *Mmp2*, *Mmp9*, *Mmp14*, *Timp3* e *Cd44* do pulmão dos camundongos Black C57BL/6, ao final de 20 dias de metástase experimental, após a inoculação de células B16-F1 expostas ao BDE-209 (1nM) ou veículo (DMSO) e adição do tratamento quimioterápico *in vivo* com a Dacarbazina. Os alvos foram avaliados em relação aos controles endógenos *Gapdh* e *B2m* (média geométrica) e também normalizados em relação ao controle (veículo ou veículo + DTIC) (N = 3 - 5). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. FONTE: a autora (2023).

3.6 SDS-PAGE

O extrato de proteínas totais do pulmão dos camundongos inoculados com células B16-F1 expostas ao tratamento (BDE-209 à 1nM) e ao seu respectivo

controle (veículo: DMSO) apresentam um padrão diferenciado das amostras analisadas, onde são observadas diversas bandas mais expressas no grupo tratado quando comparado ao controle. O peso molecular de algumas proteínas que apresentaram um padrão diferenciado são identificadas na figura a seguir (setas vermelhas) (Figura 26).

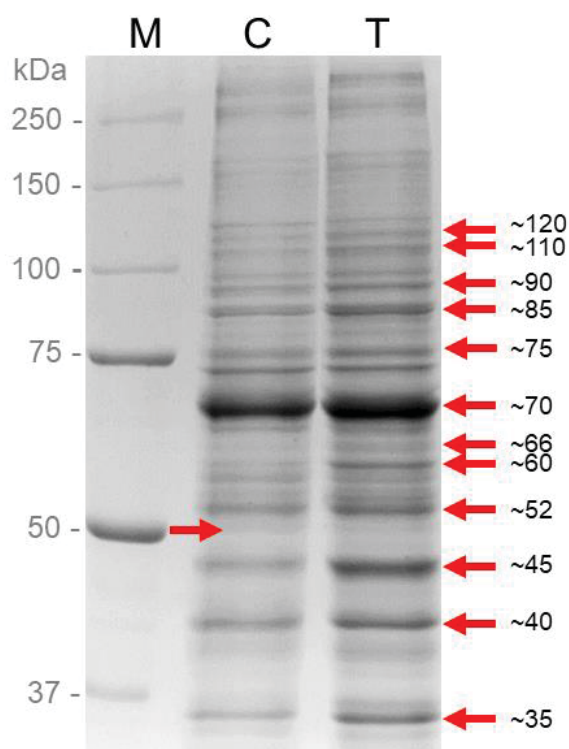


Figura 26. Análise do extrato de proteínas totais do pulmão de camundongos por SDS-PAGE. Gel de poliacrilamida 9% corado com Azul de Coomassie R-250 contendo 50 µg de proteínas por linha. (C) Pulmão do camundongo controle (veículo DMSO); (T) Pulmão do camundongo tratado (células B16-F1 expostas ao BDE-209 na concentração de 1nM). (M) Marcador de peso molecular (kaleidoscope precision plus – Bio-Rad). As setas indicam o peso molecular das proteínas que apresentaram padrão diferenciado entre as amostras analisadas. FONTE: a autora (2023).

3.7 WESTERN BLOT

A expressão de proteínas foi analisada pelo ensaio de *Western Blot* (WB). Primeiramente foram realizados diferentes testes, para a padronização do experimento (TABELA 8), conforme descrito na sequência.

TABELA 8. CONDIÇÕES TESTADAS NO ENSAIO DE *WESTERN BLOT* EM TECIDO DE PULMÃO DOS CAMUNDONGOS, COM METÁSTASES DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16-F1)

Concentração de proteínas totais	Gel	Membrana	Bloqueio	Anticorpo primário	Anticorpo secundário	Revelação
25 µg	Poliacrilamida 12% com 10 poços	Nitrocelulose	Leite em pó desnatado 3%	MMP2	Fosfatase alcalina Peroxidase	Colorimétrico
40 µg		PVDF		MMP9		Quimioluminescente
50 µg	Poliacrilamida 12% com 15 poços		Leite em pó desnatado 5%	TIMP3		
60 µg				ACTINA		
				GAPDH		
BSA 2%						

FONTE: a autora (2023).

Após os diferentes testes realizados, as melhores condições foram utilizadas para avaliar a expressão das proteínas-alvo. As Metaloproteinases de Matriz 2 e 9 foram avaliadas. Contudo, não foram observadas alterações estatisticamente significativas da expressão de MMP2 (Figura 27) e MMP9 (Figura 28) em relação ao endógeno GAPDH entre os diferentes grupos analisados.

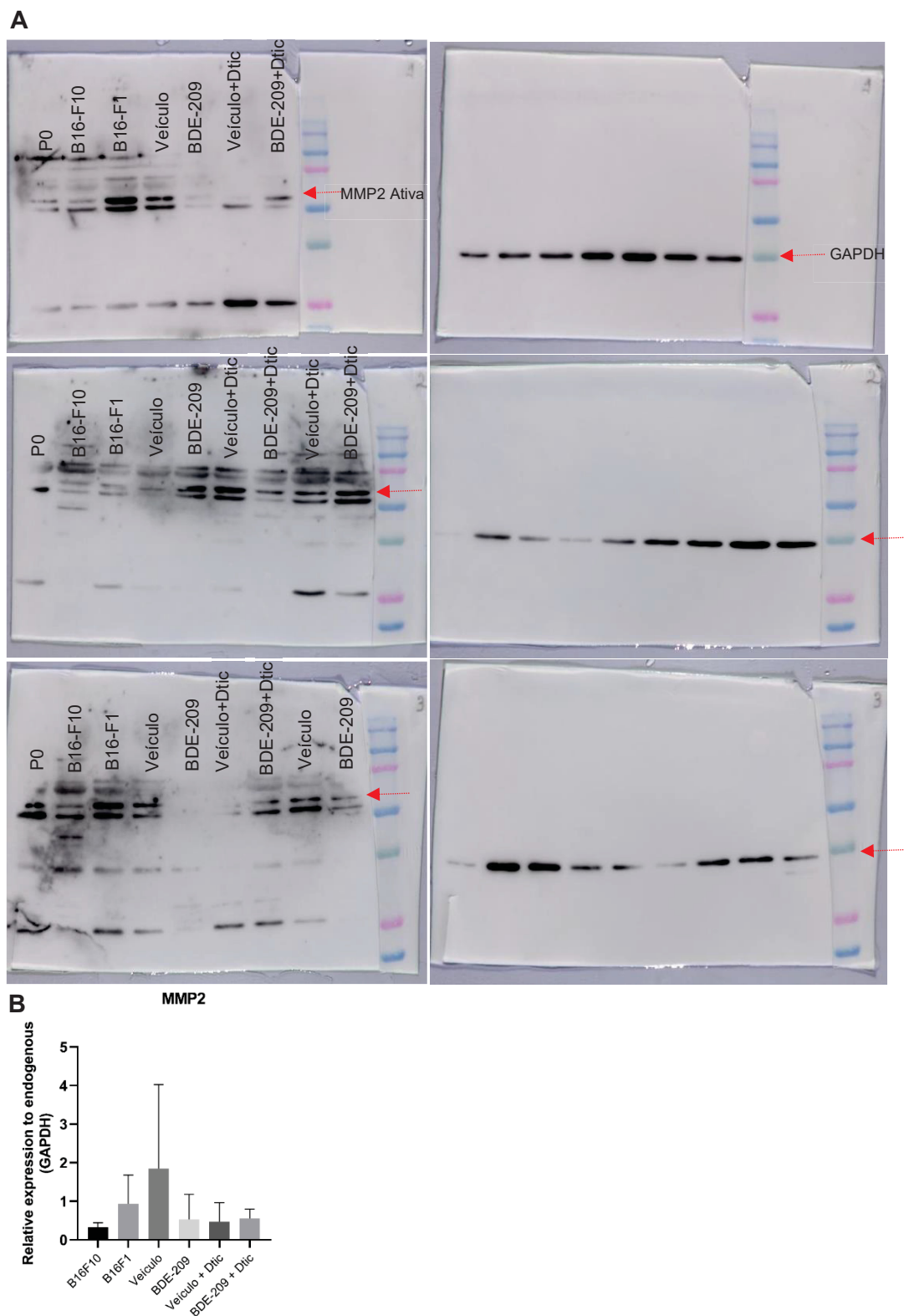


Figura 27. (A) Expressão de proteínas anti-MMP2 do pulmão de camundongos, após metástase experimental. (B) Análise das bandas da expressão de proteínas (MMP2) dos diferentes grupos experimentais. Quantificação realizada no software Image J. N = 3 - 4. FONTE: a autora (2023).

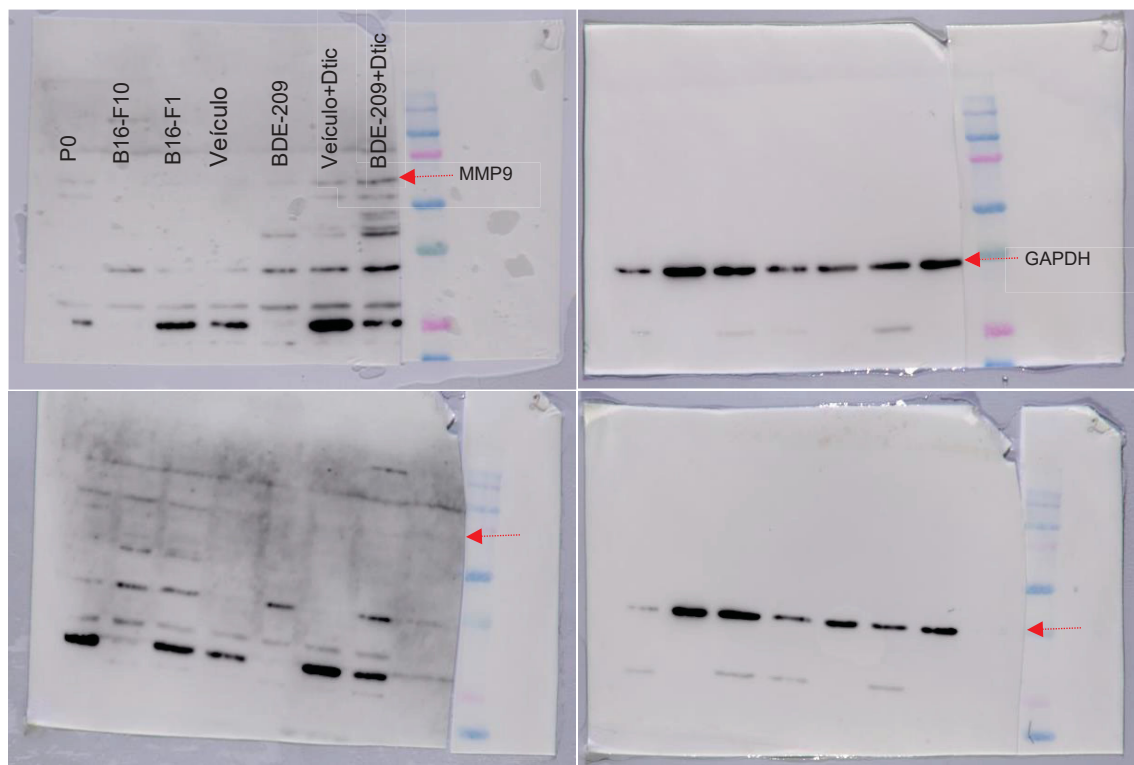


Figura 28. Expressão de proteínas anti-MMP9 do pulmão de camundongos, após metástase experimental. FONTE: a autora (2023).

4 DISCUSSÃO

Os poluentes ambientais orgânicos persistentes (POPs), como o BDE-209, são vastamente liberados no ambiente principalmente pelas atividades antrópicas. Esse fato, torna-se ainda mais preocupante devido as suas características como a capacidade lipofílica, a bioacumulação nos tecidos, a difícil degradação e, conseqüentemente, a longa duração no ambiente (CHOU et al., 2019; YU et al., 2015; STOCKHOLM CONVENTION, 2019). São vários os efeitos causados pelos poluentes ambientais para a saúde humana, e o surgimento ou a progressão do câncer são uma das possíveis conseqüências (INCA, 2018). No entanto, pouco se conhece sobre o papel dos poluentes orgânicos persistentes no desenvolvimento ou prognóstico do câncer.

O melanoma é um tipo de câncer maligno que se origina dos melanócitos, que por sua vez, são células que produzem pigmento de origem neuroectodérmica, que podem ser encontradas em vários locais do corpo, inclusive na pele, íris e reto. O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele e o mais comum no ocidente, sendo responsável por cerca de 75% das mortes relacionadas ao câncer de pele. De modo global, a incidência de melanoma é de 15 a 25 casos a cada 100.000 indivíduos (MILAC; NEGROIU, 2018; SCHADENDORF; HAUSCHILD et al., 2014). A taxa de sobrevivência cai acentuadamente para 65% para aqueles diagnosticados com doenças metastáticas regionais, e para 15% para aqueles diagnosticados com metástases distantes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

Recentemente, o sequenciamento de melanomas primários e metastáticos sugere que dependendo do tumor individual, a disseminação metastática pode ocorrer tanto em estágio precoce como tardio e de forma contínua. Além disso, a disseminação metastática e sua progressão depende de diferentes fatores como a sobrevivência de células metastáticas, sistema imunológico do organismo, microambiente tumoral e a colonização de células neoplásicas ao chegar no nicho pré-metastático (GARTNER et al., 2012; PLEASANCE et al., 2012; SCHADENDORF et al., 2015; TURAJLIC et al., 2012). A indução de metástases e a resistência a múltiplas drogas (MDR) são alguns dos enigmas encontrados durante a quimioterapia do câncer (DA COSTA et al., 2023). Contudo, as investigações sobre os fatores que podem influenciar na

indução de metástases e resistência ao tratamento quimioterápico são fundamentais e demandam urgência. Dessa forma, nosso objetivo é avaliar o efeito do BDE-209 na progressão do câncer de melanoma e no tratamento quimioterápico com a dacarbazina.

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram que após a metástase experimental de 20 dias, os animais inoculados com as células de melanoma murino (B16-F1) expostas ao BDE-209 durante 15 dias, em concentração ambientalmente relevante apresentaram um aumento da massa pulmonar (g), da área colonizada por metástases na superfície do pulmão dos animais e também apresentaram um maior índice de lesão metastática nos cortes histológicos do pulmão, como também foi observado no controle positivo (B16-F10). O mesmo tem sido observado nos animais dos grupos previamente expostas ao polibromado e tratados com a dacarbazina. Esses dados revelam a alteração do fenótipo celular frente a exposição ao BDE-209 das células de melanoma murino, favorecendo a progressão do câncer e interferindo no tratamento quimioterápico, consequentemente, com o prognóstico da doença. Esses resultados chamam atenção, sendo que a principal causa de mortalidade ocasionado pelo melanoma é resultante de metástase para órgãos distantes, incluindo pulmões e cérebro (LAHAV et al., 2019). Por outro lado, o índice de lesão metastática foi menor no grupo veículo (células expostas ao DMSO) com administração da dacarbazina (controle negativo), mostrando que a dacarbazina apresentou efeito de regressão tumoral, quando as células de melanoma murino não foram expostas ao BDE-209.

A exposição oral ao BDE-209 por 45 dias em camundongos Black, inoculados com células B16-F10 e tratados com dacarbazina por 21 dias (cinco doses de 40 mg.kg⁻¹), apresentou uma diminuição das metástases pulmonares em animais tratados com dacarbazina e um aumento significativo em ratos previamente expostos ao BDE-209. O BDE-209 prejudicou o tratamento com dacarbazina, favorecendo a progressão do câncer e afetando o prognóstico da doença (MANUITT-BRITO et al., 2021). Esses dados juntamente com os apresentados nesse estudo, mostram que o BDE-209 atua tanto no organismo como na célula do melanoma favorecendo a progressão da doença bem como interferindo negativamente no tratamento do melanoma

Uma diminuição de tióis não proteicos (NTP) (glutathiona e outros tióis) foi observada nos grupos expostos previamente ao BDE-209. O mesmo foi encontrado no controle positivo (B16-F10). O sistema antioxidante não enzimático como os tióis não proteicos (glutathiona (GSH) e outros tióis), desempenham um papel relevante na defesa contra os danos oxidativos (ANANDAN et al., 2013). A glutathiona (GSH) é o tiol não proteico presente em maior concentração em tecidos de mamíferos, possui um papel central na biotransformação e protege as células dos danos causados por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ou de xenobióticos (KENNEDY et al., 2020). Foi observado que em pulmões dos animais expostos a dacarbazina houve uma diminuição dos níveis de NTP. Segundo Biesalski e Frank (2003) os agentes alquilantes podem ser capazes de esgotar o GSH e levar ao estresse oxidativo celular, também observado para outros dois tipos celulares (células ECC-1 e CHO) quando expostas à dacarbazina (SCHOONEN et al., 2005).

A diminuição de tióis não proteicos também foi encontrada no fígado dos animais em exposição prévia ao BDE-209, bem como na exposição ao BDE-209 com administração do tratamento quimioterápico com a dacarbazina. O desequilíbrio nos níveis de antioxidantes tanto pela redução ou exaustão de componentes como a glutathiona, tocoferol e ascorbato, assim como de depleção de cofatores reduzidos como por exemplo o NADPH, podem culminar na potencialização do estresse oxidativo e também no início do desenvolvimento do processo inflamatório (Kooter et al., 2008; gangwar et al., 2020). Um aumento no processo inflamatório tanto sistêmico como local (pulmão) foi observado em camundongos que foram inoculados com células B16-F1 expostas ao BDE-209 (Capítulo I).

Os transportadores ABC são proteínas transmembrana que exportam diferentes substâncias do interior das células tumorais, incluindo agentes quimioterápicos, levando a resistência adquirida durante o tratamento do câncer (HEMING et al., 2022). Ao menos 11 transportadores ABC, incluindo glicoproteína P (P-PGP/ABCB1); proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (MRPs/ABCCs) e proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP/ABCG2) estão envolvidas no desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas (MDR) (LIU et al., 2019).

Os animais inoculados com as células de melanoma murino (B16-F1) expostas previamente ao BDE-209, apresentaram uma superexpressão do transportador *Abcb1* (MDR1) no pulmão do camundongo. Esse dado pode estar diretamente relacionado com o aumento de metástases presentes nos pulmões, induzidas pelo BDE-209. Apesar de não estar claro a relação entre metástases e os transportadores ABC, alguns estudos mostraram que células cancerígenas metastáticas apresentam maior nível de expressão de transportadores ABC (WANG et al., 2021) por exemplo, o nível de expressão de MRP1 nos linfonodos metastáticos é muito maior do que em células de câncer de mama (ZÖCHBAUER-MÜLLER et al., 2001). Landreville et al. (2011) relatam que amostras de pacientes com melanoma uveal em subpopulação de células que expressam o transportador ABCB1 são altamente metastáticas, também exibiram um perfil mais agressivo em comparação com células tumorais ABCB1 (-). As células de melanoma ABCB1 (+) exibiram maior capacidade de formar colônias *in vitro* e de promover aumento do crescimento tumoral e número de metástases *in vivo*, quando comparadas às células ABCB1-. Corroborando com os dados do presente estudo, onde a expressão do transportador *Abcb1* foi observada no grupo que teve maior colonização de metástases no pulmão dos animais, frente a exposição prévia ao BDE-209.

Além disso, a superexpressão de *Abcb1* observada no presente estudo merece atenção devido à poliespecificidade do ABCB1, que é o principal transportador responsável pela resistência a múltiplas drogas. O ABCB1 transporta compostos hidrofóbicos e anfipáticos, abrangendo drogas quimioterápicas como paclitaxel, o bloqueador de canais de cálcio verapamil, doxorubicina, vincristina, mitoxantrona, entre outros (SAJID; RAHMAN; AMBUDKAR, 2023). Dessa forma, existe a necessidade de investigar o efeito de BDE-209 com a associação a outros quimioterápicos que são transportados pelo ABCB1, em estudos futuros.

O aumento da expressão de *Abcc4* também foi observada no pulmão dos animais que foram inoculados com as células de melanoma murino expostas ao BDE-209 e administrados com o quimioterápico dacarbazina em relação ao grupo exposto ao BDE-209 sem o tratamento quimioterápico. No entanto, houve a redução da expressão de *Abcc4* no grupo BDE-209 em relação ao controle (veículo). A subfamília ABCC, também conhecida como proteínas associadas à

resistência a múltiplas drogas (MRPs) são transportadores com diferentes funções, incluindo o transporte de íons, toxinas e receptor de superfície celular, e esse transportador também está envolvido no tráfego lipídeos (WANG et al., 2021; SCHUETZ et al., 1999). Segundo Lin et al. (2008), a deficiência de ABCC4 pode levar a diminuição de AMPc extracelular e o aumento de AMPc intracelular *in vitro*. Portanto, as alterações encontradas na expressão gênica de *Abcc4*, podem estar relacionadas com as diferentes funções desse transportador. Estudos *in vitro* relatam a alteração da expressão de transportadores ABC com a exposição a poluentes ambientais, como de *Abcb1* e *Abcc4* de células de melanoma murino expostas ao BDE-209 (MARCHI et al., 2021), também observado recentemente com a mistura de pesticidas (Glyphosate, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, Mancozeb, Atrazine, Acephate, and Paraquat) em células B16-F1 (ROQUE et al., 2023).

A inoculação de células de melanoma murino expostas ao BDE-209 e também no grupo com as células expostas ao poluente e administração do quimioterápico dacarbazina, apresentaram a modulação de supressor tumoral, que favorece o desenvolvimento e progressão do câncer. A expressão reduzida do inibidor tecidual de metaloproteinase-3 (Timp3), foi observada nesses grupos e está fortemente associado à progressão do câncer ou ao mau prognóstico do paciente (JACKSON et al., 2017). A redução do supressor tumoral do pulmão dos animais ocorreu nos mesmos grupos de animais que apresentaram o aumento de metástases pulmonares com as células expostas previamente ao BDE-209. Esse é um dado chave pois é uma resposta direta à mudança de fenótipo observada em estudos *in vitro* (SILVA FILHO et al., 2022) e que pode estar envolvida na progressão tumoral encontrada *in vivo*.

O TIMP3 é o único membro da família TIMP que se liga à matriz extracelular e atua em diferentes particularidades envolvidas no câncer, como na supressão do crescimento de células neoplásicas, angiogênese, migração e invasão (SU et al., 2019). O TIMP3 é regulado por metilação genética, que pode resultar na expressão reduzida em muitos tipos de câncer (CLARK et al., 2008). Amostras de melanoma cutâneo primário com linfonodo compatível ou em trânsito (estágio III) e metástase à distância (estágio IV), mostram que a expressão do inibidor tecidual da metaloproteinase-3 (TIMP3) diminui durante a progressão do melanoma (DAS et al., 2016). Além disso, estudos *in vitro* com a

exposição de poluentes ambientais como de TCDD apresentou a redução de *Timp3* em células de melanoma murino (B16-F1) (SILVA-FILHO et al., 2022), bem como a mistura de metabólitos de pesticidas (ROQUE et al., 2023) e a exposição de BDE-99 em células de melanoma murino (B16-F10) (STEIL et al., 2022). No presente estudo, a expressão gênica de *Mmp2*, *9* e *14* não apresentaram diferenças significativas, assim como a expressão proteica de MMP2 e 9, no pulmão dos camundongos com maior colonização e índice metastático. Os TIMPs podem regular a atividade de Metaloproteinasas de Matriz, todavia, podem atuar de forma independente de sua atividade inibitória das MMPs, como na promoção de crescimento e inibição de apoptose (MURPHY, 2011; STETLER-STEVENSON, 2008).

A exposição prévia das células B16-F1 ao BDE-209 levou a redução da expressão de *Cd44* no pulmão dos animais. O CD44 é uma glicoproteína transmembrana de superfície celular, que exerce um papel importante em processos biológicos normais e também em processos patológicos. O CD44 é considerado o principal receptor de superfície celular do hialuronato, que por sua vez, é o principal componente da matriz extracelular. O CD44 constitui a família das moléculas de adesão celular (CAMS) e possui funções relevantes na comunicação celular e adesão entre as células e os componentes da matriz extracelular. Ainda, participa de diferentes processos celulares como na ativação de leucócitos, liberação de citocinas, angiogênese, transição epitélio mesenquimal, metástase, proliferação, migração, invasão, entre outros (MESRATI, et al., 2021; OUHTIT et al., 2018; ZEILSTRA, 2020).

Amostras de 292 melanomas cutâneos em estágio clínico I foram analisados. Os níveis reduzidos de CD44 e seu ligante hialuronano na superfície celular foram associados ao mau prognóstico no melanoma cutâneo em estágio clínico I, sugerindo o aumento do potencial de disseminação no melanoma cutâneo localizado, corroborando com os dados no presente estudo (KARJALAINEN et al., 2000). A exposição prévia ao BDE-209 apresentou a redução da expressão de *Cd44* no pulmão dos animais. Todavia, existem controvérsias sobre a associação da redução ou aumento da expressão de CD44 com o estágio avançado do tumor e piores taxas de sobrevivência (MESRATI, et al., 2021).

O aumento da expressão de *Cd44* na presença de BDE-209 com a administração do tratamento quimioterápico com a Dacarbazina, em relação ao

grupo exposto ao BDE-209 sem tratamento quimioterápico, foi observada. A alta expressão de CD44 pode impossibilitar o efeito citotóxico de drogas quimioterápicas em diferentes tipos de câncer. Em células malignas, o CD44 pode induzir um fenótipo quimiorresistente, regulando positivamente a expressão de MDR, que realiza o transporte de agentes citotóxicos intracelulares (YAGHOBI et al., 2021). Porém, nesse grupo em questão, não foi observada o aumento da expressão de MDR. Contudo, as alterações na expressão de *Cd44* no tratamento com o BDE-209 em relação ao controle, e também quando há adição do tratamento quimioterápico em relação ao BDE-209 sem exposição a DTIC, podem estar relacionadas com o potencial de CD44 em atuar em diferentes vias e funções nas células.

Um importante fator para a progressão e desenvolvimento do câncer são as vesículas extracelulares. As vesículas extracelulares isoladas no estado de doença, ou coletadas após a exposição a poluentes, são mais numerosas e enriquecidas em proteínas e material genético (LIU; COSTA; ORTIZ, 2022). Os dados obtidos do plasma do sangue, referentes aos camundongos que sofreram a exposição prévia ao BDE-209, apresentaram alteração no tamanho das VEs (média e moda do diâmetro). Também foi observado o aumento do tamanho das VEs (média do diâmetro) nos animais inoculados com as células expostas ao BDE-209 e administradas com o quimioterápico. Além disso, esses mesmos grupos de exposição apresentaram o aumento da área colonizada por metástases no pulmão dos camundongos, como mencionado anteriormente. Esse resultado também pode estar relacionado às vesículas extracelulares, ao passo que as células de melanoma secretam as VEs e os exossomos provenientes de células tumorais apresentam um papel importante no preparo do nicho pré-metastático, favorecendo a disseminação metastática para outros órgãos.

As vesículas extracelulares secretadas por células de melanoma metastático que se metastatizam espontaneamente para os pulmões e para o cérebro, são capazes de ativar a sinalização pró-inflamatória nos fibroblastos pulmonares e nos astrócitos (LAHAV et al., 2019). Também observamos no estudo anterior (Capítulo I), o aumento da inflamação sistêmica e local (pulmão). A alteração do tamanho das VEs pode ser um possível mecanismo decorrente das células de melanoma murino B16-F1 expostas ao BDE-209, que pode

favorecer o desenvolvimento do nicho pré-metastático, contribuindo com a disseminação das metástase encontradas no pulmão dos camundongos. A marcação de proteínas específicas ou a proteômica dessas VEs podem ajudar a elucidar esse possível mecanismo em estudos futuros.

5 CONCLUSÃO

Em conjunto, os dados apresentados nesse capítulo mostram o potencial efeito do BDE-209 em modular o fenótipo das células de melanoma murino (B16-F1), favorecendo a progressão tumoral e quimiorresistência *in vivo*. A exposição prévia ao BDE-209 e também com administração do quimioterápico dacarbazina, levou ao aumento da área colonizada por metástases no pulmão dos camundongos, aumento da massa pulmonar, do índice metastático e redução do supressor tumoral *Timp3*. Além disso, apresentaram o aumento do tamanho das vesículas extracelulares, diminuição de tióis não proteicos e a alteração da expressão de *Abcb1*, *Abcc4* e *Cd44*. Todas essas alterações observadas são evidências de que o BDE-209 pode interferir com o prognóstico e o tratamento do melanoma, podendo ser uma importante informação para a determinação ou revisão dos níveis de exposição mínima também para as populações humanas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição a Poluentes Orgânicos Persistentes, como de polibromados, incluindo o BDE-209, tem ocorrido de forma progressiva nas últimas décadas. As diferentes vias de contato com esse composto ampliam as fontes de exposição da população humana, que pode iniciar na fase fetal e perdurar ao longo da vida do indivíduo. Ainda se sabe pouco sobre os impactos da exposição ao BDE-209 na saúde humana, especialmente em relação ao seu potencial papel no câncer.

No presente estudo, o papel do BDE-209 na progressão do câncer de melanoma foi investigado. Os resultados obtidos mostram a capacidade do BDE-209 em modular o fenótipo das células B16-F1 na progressão tumoral *in vivo*, intensificando a dispersão e colonização das metástases no pulmão dos animais, elevando o índice metastático e o peso dos pulmões, mesmo quando foi realizado a administração do tratamento quimioterápico. Alterações de moléculas associadas com a malignidade do melanoma foram encontradas, como a redução de supressor tumoral *Timp3* e *Reck*, redução da peroxidação lipídica e tióis não proteicos, alteração da expressão de *Cd44* e de moléculas relacionadas ao tratamento quimioterápico como *Abcb1* e *Abcc4*.

Portanto, os resultados observados revelam a possibilidade de efeitos adversos referentes a exposição ao polibromado, BDE-209, no prognóstico do câncer, especialmente no câncer de melanoma. Dado o impacto significativo do tratamento do melanoma para a saúde pública e a dificuldade de resultados satisfatórios com o tratamento quimioterápico, são válidas as investigações que buscam entender os fatores que podem induzir ou agravar as metástases, que é a principal causa de mau prognóstico no câncer e conseqüentemente, resultando nas altas taxas de óbitos de pacientes com essa doença. Destaca-se aqui, a informação de que as concentrações utilizadas de exposição ao BDE-209 são ambientalmente relevantes, sendo baseadas em concentrações detectadas em amostras biológicas humanas.

Contudo, a exposição crescente a essas substâncias, cada vez mais presentes na vida cotidiana em diferentes ambientes, inclusive dentro do ambiente domiciliar e de trabalho, e diante das evidências de que compostos polibromados podem contribuir para a progressão do câncer, é de fato,

preocupante, e provoca um alerta para a saúde pública e ambiental. Diante do exposto, o presente estudo reforça a necessidade de investigações de poluentes orgânicos persistentes com o desenvolvimento/progressão do câncer; a avaliação, fiscalização e monitoramento das concentrações permitidas, pelas agências responsáveis, a fim de assegurar a saúde da população e os impactos no meio ambiente.

REFERÊNCIAS

AASEBØ, ELISE et al. The progression of acute myeloid leukemia from first diagnosis to chemoresistant relapse: A comparison of proteomic and phosphoproteomic profiles. **Cancers**, v. 12, n. 6, p. 1466, 2020.

ABDALLAH, M.A., HARRAD S., COVACI A., 2008a. Hexabromocyclododecanes and tetrabromobisphenol-A in indoor air and dust in Birmingham, U.K.: implications for human exposure. *Environ Sci Technol.* 42, 6855 - 61.

ABDALLAH, M.A., HARRAD, S., COVACI, A., 2009. Isotope dilution method for determination of polybrominated diphenyl ethers using liquid chromatography coupled to negative ionization atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry: validation and application to house dust. **Anal. Chem**, v. 81, p. 7460–7467, 2009.

ABDALLAH, M.A.E., PAWAR, G., HARRAD, S., 2015. Evaluation of in vitro vs. in vivo methods for assessment of dermal absorption of organic flame retardants: A review. **Environment International.** 74, 13 - 22, ISSN 0160-4120, <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.09.012>.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p.121-126, 1984.

AL-BADR, A.A.; ALODHAIB, M.M. Dacarbazine. *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* 2016, 41, 323–377.

ALBANO, G.D., MOSCATO, M., MONTALBANO, A.M., ANZALONE, G., GAGLIARDO, R., BONANNO, A., GIACOMAZZA, D., BARONE, R., DRAGO, G., CIBELLA, F., PROFITA, M., 2020. Can PBDEs affect the pathophysiologic complex of epithelium in lung diseases? **Chemosphere** 241, 125087.

ALEXIUS-LINDGREN, M., ANDERSSON, E., LINDSTEDT, I., & ENGSTRÖM, W. (2014). The RECK gene and biological malignancy—its significance in angiogenesis and inhibition of matrix metalloproteinases. **Anticancer research**, 34(8), 3867-3873.

ALIX-PANABIERES, C. & PANTEL, K. Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. **Cancer Discov.** 6, 479–491 (2016).

ALTELAAR, AF MAARTEN; HECK, ALBERT JR. Trends in ultrasensitive proteomics. **Current opinion in chemical biology**, v. 16, n. 1-2, p. 206-213, 2012.

ALMEIDA ROQUE, ALICIANE DE; NETO, FRANCISCO FILIPAK; COSIO, CLAUDIA; BARJHOUX, IRIS; RIBEIRO, CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA;

RIOULT, DAMIEN. Immunotoxicity of relevant mixtures of pesticides and metabolites on THP-1 cells. **Toxicology**, v. 493, p. 153557, 2023.

AMERICAN CANCER SOCIETY (2015). **American Cancer Society Cancer Facts & Figures 2015**. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc044552.pdf>.

ANANDAN, R., GANESAN, B., OBULESU, T., MATHEW, S., ASHA, K., LAKSHMANAN, P., ZYNUDHEEN, A., 2013. Antiaging effect of dietary chitosan supplementation on glutathione-dependent antioxidant system in young and aged rats. **Cells Stress Chaperones** 18, 121-125.

ARNETH B. Tumor Microenvironment. **Medicina**. 2020; 56(1):15. <https://doi.org/10.3390/medicina56010015>.

ARSLANBAEVA, L., TOSI, G., RAVAZZOLO, M., SIMONATO, M., TUCCI, F. A., PECE, S., ... & SANTORO, M. M. (2022). UBIAD1 and CoQ10 protect melanoma cells from lipid peroxidation-mediated cell death. **Redox Biology**, 51, 102272.

ASSARAF, YEHUDA G. et al. The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer. **Drug Resistance Updates**, v. 46, p. 100645, 2019.

AUNG, P. P.; NAGARAJAN, P.; PRIETO, V. G. Regression in primary cutaneous melanoma: etiopathogenesis and clinical significance. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 97, n. 6, p. 657-668, 2017.

AVRIL MF, AAMDAL S, GROB JJ, HAUSCHILD A, MOHR P, BONERANDI JJ, et al. Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. **J Clin Oncol**. 2004;22(6):1118-25.

AZIMI, A.; FERNANDEZ-PEÑAS, P. Molecular Classifiers in Skin Cancers: Challenges and Promises. **Cancers** 2023, 15, 4463. <https://doi.org/10.3390/cancers15184463>.

BAIXAULI, F., LOPEZ-OTIN, C. & MITTELBRUNN, M. Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. **Front. Immunol**. 5, 403 (2014).

BAJETTA E, DEL VECCHIO M et al (2002) Metastatic melanoma: chemotherapy. **Semin Oncol** 29 (5):427–445.

BAJETTA E, DEL VECCHIO M, NOVA P, FUSI A, DAPONTE A, SERTOLI MR, et al. Multicenter phase III randomized trial of polychemotherapy (CVD regimen) versus the same chemotherapy (CT) plus subcutaneous interleukin-2 and interferon alpha2b in metastatic melanoma. **Ann Oncol**. 2006;17(4):571-7.

BALDEA, IOANA; FILIP, A. G. Photodynamic therapy in melanoma—an update. **Journal of Physiology and pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 109, 2012.

BAUMANN P, ZIGRINO P, MAUCH C, BREITKREUTZ D, NISCHT R. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase-mediated progelatinase A activation in non-tumorigenic and tumorigenic human keratinocytes. **Br J Cancer**. 2000;83(10):1387–93. pmid:11044366; PubMed Central PMCID: PMC2408778.

BEBELMAN et al. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer, **Pharmacology & Therapeutics**, Volume 188, 2018,1-11.

BECKER et al. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis, **Cancer Cell**, Volume 30, Issue 6, 2016, 836-848.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 1, p. 25-34, 1999.

BHATIA, SHAILENDER; TYKODI, SCOTT S.; THOMPSON, JOHN A. Treatment of metastatic melanoma: an overview. **Oncology** (Williston Park, NY), v. 23, n. 6, p. 488, 2009.

BIESALSKI HK, FRANK J. Antioxidants in cancer therapy: Is there a rationale to recommend antioxidants during cancer therapy? **Biofactors**. 2003;17(1- 4):229-240. 51.

BITEGHE, FLEURY AUGUSTIN NSOLE et al. Desensitization of metastatic melanoma cells to therapeutic treatment through repeated exposure to dacarbazine. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 211, p. 111982, 2020.

BODENMILLER B, MUELLER LN, MUELLER M, DOMON B, AEBERSOLD R: Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome. **Nat Methods** 2007, 4(3):231-237.

BORST, PIET; DE WOLF, CORNELIA; VAN DE WETERING, KOEN. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 453, p. 661-673, 2007.

BOULOS, JOELLE C.; IDRES, MUHAMMAD RAHAMA YOUSOF; EFFERTH, THOMAS. Investigation of cancer drug resistance mechanisms by phosphoproteomics. **Pharmacological Research**, v. 160, p. 105091, 2020.

BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72, 248e254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRAMHALL, R. J.; MAHADY, K.; PEACH, A. H. S. Spontaneous regression of metastatic melanoma – Clinical evidence of the abscopal effect. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 40, n. 1, p. 34-41, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Melanoma Maligno Cutâneo**. Portaria Nº 357, de 8 de abril de 2013. Brasília, 2013. Acesso em: 14 de agosto de 2023: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0357_08_04_2013.html>.

BRITO, P. M., BISCAIA, S. M. P., DE SOUZA, T. L., RAMOS, A. B., LEÃO-BUCHIR, J., DE ALMEIDA ROQUE, A., ... & DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. (2020). Oral exposure to BDE-209 modulates metastatic spread of melanoma in C57BL/6 mice inoculated with B16–F10 cells. **Chemosphere**, 260, 127556.

BUKOWSKI, KAROL; KCIUK, MATEUSZ; KONTEK, RENATA. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2020.

BYRUM, S. D., LARSON, S. K., AVARITT, N. L., MORELAND, L. E., MACKINTOSH, S. G., CHEUNG, W. L., & TACKETT, A. J. (2013). Quantitative Proteomics Identifies Activation of Hallmark Pathways of Cancer in Patient Melanoma. **Journal of proteomics & bioinformatics**, 6(3), 43–50. <https://doi.org/10.4172/jpb.1000260>.

CHAPMAN PB, HAUSCHILD A, ROBERT C, HAANEN JB, ASCIERTO P, LARKIN J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **N Engl J Med**. 2011; 364(26): 2507- 16.

CHARTRAIN, Marine et al. Melanoma chemotherapy leads to the selection of ABCB5-expressing cells. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36762, 2012.

CHEN KG, VALENCIA JC, GILLET JP, HEARING VJ, GOTTESMAN MM (2009) Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res** 22: 740-749.

CHEN, T.; NIU, P.; KONG, F.; et al., Disruption of thyroid hormone levels by decabrominated diphenyl ethers (BDE-209) in occupational workers from a deca-BDE manufacturing plant. **Environment International**, v. 120, n. April, p. 505–515, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.08.032>>.

CHEN, M.L; WANG, L; CHI, Y.K; MAO, C.C; LUNG, S.C; MAO, I.F; Polybrominated diphenyl ethers in foodstuffs from Taiwan: level and human dietary exposure assessment. **Sci. Total Environ.**, 431 (2012), pp. 183-187.

CHENG, YING-CHEN et al. The roles of extracellular vesicles in malignant melanoma. **Cells**, v. 10, n. 10, p. 2740, 2021.

CHI, Z.; TAN, S.; LI, W.; et al., Chemosphere In vitro cytotoxicity of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) to human red blood cells (hRBCs). **Chemosphere**, v. 180, p. 312–316, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.032>>.

CHO, E. S., KANG, H. E., KIM, N. H., & YOON, J. I. (2019). Therapeutic implications of cancer epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Archives of pharmacal research**, 42(1), 14–24. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-01108-7>.

CHOU, T.; OU, M.; WU, T.; CHEN, D.; SHIH, Y. Chemosphere Temporal and spatial surveys of polybromodiphenyl ethers (PBDEs) contamination of soil near a factory using PBDEs in northern Taiwan. **Chemosphere**, v. 236, p. 124117, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.087>>.

CLARK, J.C.M., THOMAS, D.M., CHOONG, P.F.M. et al. RECK—a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. **Cancer Metastasis Rev** 26, 675 (2007). <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9093-8>.

CLARK IM, SWINGLER TE, SAMPIERI CL, EDWARDS DR: The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Int J Biochem Cell Biol**. 2008, 40: 1362-1378. [10.1016/j.biocel.2007.12.006](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.12.006).

COLE SPC. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a “multitasking” ATP-binding cassette (ABC) transporter. **J Biol Chem**. 2014; 289:30880–88.

COSTASILVA, N.M. AIELLO, A.J. OCEAN, S. SINGH, H. ZHANG, B.K. THAKUR, A. BECKER, A. HOSHINO, M.T. MARK, H. MOLINA, et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. **Nat. Cell Biol.**, 17 (2015), pp. 816-826.

CRAENE, B., & BERX, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. **Nature reviews. Cancer**, 13(2), 97–110. <https://doi.org/10.1038/nrc3447>.

CRAWFORD RR, POTUKUCHI PK, SCHUETZ EG, SCHUETZ JD (2018) Beyond Competitive Inhibition: Regulation of ABC Transporters by Kinases and Protein-Protein Interactions as Potential Mechanisms of Drug-Drug Interactions. **Drug Metab Dispos** 46: 567-580.

CUFARO, MARIA CONCETTA et al. Extracellular vesicles and their potential use in monitoring cancer progression and therapy: the contribution of proteomics. **Journal of oncology**, v. 2019, 2019.

CURCIC, M., et al., 2017. Interactions between cadmium and decabrominated diphenyl ether on blood cells count in rats-Multiple factorial regression analysis. **Toxicology** 376, 120–125.

CURRAN, S. & MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. **Eur. J. Cancer** 36, 1621–1630 (2000).

DA COSTA, KELLI MONTEIRO et al. ABCB1 and ABCC1 Function during TGF- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition: Relationship between Multidrug Resistance and Tumor Progression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6046, 2023.

DALECK, C. R.; NARDI, A. B. **Oncologia Em Cães E Gatos**, 2 ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

DAS, A.M., SEYNHAEVE, A.L.B., RENS, J.A.P. et al. Differential TIMP3 expression affects tumor progression and angiogenesis in melanomas through regulation of directionally persistent endothelial cell migration. **Angiogenesis** 17, 163–177 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10456-013-9385-2>.

DAS, A. M., BOLKESTEIN, M., VAN DER KLOK, T., OPHUIS, C. M. O., VERMEULEN, C. E., RENS, J. A., ... & EGGERMONT, A. M. (2016). Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) expression decreases during melanoma progression and inhibits melanoma cell migration. **European journal of cancer**, 66, 34-46.

DAS V, BHATTACHARYA S, CHIKKAPUTTAIAH C, HAZRA S, PAL M. The basics of epithelial-mesenchymal transition (EMT): A study from a structure, dynamics, and functional perspective. **J Cell Physiol**. 2019 Feb 5. doi: 10.1002/jcp.28160.

M. DEAN, A. RZHETSKY, R. ALLIKMETS. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Genome Res.**, 11 (2001), pp. 1156-1166.

DEMETRI, G. D. et al. Activity of Eribulin in Patients With Advanced Liposarcoma Demonstrated in a Subgroup Analysis From a Randomized Phase III Study of Eribulin Versus Dacarbazine. **J. Clin. Oncol**. 35(30), 3433–3439 (2017).

DESJARDINS PR, CONKLIN DS (2011) Microvolume quantitation of nucleic acids. **Curr Protoc Mol Biol** 1–16. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mba03.js93>.

DEVI, N. L., 2020. Persistent organic pollutants (POPs): environmental risks, toxicological effects, and bioremediation for environmental safety and challenges for future research. **Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety**: Volume I: Industrial Waste and Its Management, 53-76. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1891-7_4.

DIE, Q., NIE, Z., YANG, Y., TANG, Z., & HUANG, Q., 2015. Persistent organic pollutant waste in China: a review of past experiences and future

challenges. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, 17, 434-441. <https://doi.org/10.1007/s10163-014-0282-6>.

DOLL, SOPHIA; GNAD, FLORIAN; MANN, MATTHIAS. The case for proteomics and phospho-proteomics in personalized cancer medicine. **PROTEOMICS–Clinical Applications**, v. 13, n. 2, p. 1800113, 2019.

DOMINGUES, B; LOPES, J; SOARES, P; POPULO, H. Melanoma treatment in review, **ImmunoTargets Ther.** 7 (2018) 35–49, <https://doi.org/10.2147/ITT.S134842>.

DREWES, C. C., ALVES, A. C., HEBEDA, C. B., COPETTI, I., SANDRI, S., UCHIYAMA, M. K., ARAKI, K., GUTERRES, S. S., POHLMANN, A. R., & FARSKY, S. H. (2017). Role of poly(ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules on melanoma-neutrophil crosstalk. **International journal of nanomedicine**, 12, 7153–7163. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140557>.

J.K. DUNNICKA, A.R. PANDIRIA, B.A. MERRICKA, G.E. KISSLINGA, H. CUNNYA, E. MUTLUA, S. WAIDYANATHAA, R. SILLSA, H.L. HONGA, TV. TONA, T. MAYNORB, L. RECIQB, S.L. PHILLIPSB, M.J. DEVITOA, A. BRIX. Carcinogenic activity of pentabrominated diphenyl ether mixture (de-71) in rats and mice. **Toxicology reports** (2018) V.5, P. 615-624.

EGEBLAD, M. & WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat. Rev. Cancer** 2, 161–174 (2002).

EGUCHI, T.; SHETA, M.; FUJII, M.; CALDERWOOD, S.K. Cancer extracellular vesicles, tumoroid models, and tumor microenvironment. **Semin. Cancer Biol.** 2022, 86, 112–126.

EIGENTLER TK, CAROLI UM, RADNY P, GARBE C. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. **Lancet Oncol.** 2003;4(12):748-59.

ELGAMAL, M. Automatic Skin Cancer Images Classification. **IJACSA** 2013, 4.

ELLIS LM, HICKLIN DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of antitumour activity. **Nat Rev Cancer.** 2008 Aug;8(8):579–591.

EPA. U.S. IRIS Toxicological Review of Decabromodiphenyl Ether (Final Report). EPA/635/R-07/008F. United States Environmental Protection Agency; Washington, D.C., The United States; 2008. <https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/recordisplay.cfm?deid=190307&CFID=74229469&CFTOKEN=62752561> (accessed: 20 Jan 2022).

FARES, J., FARES, M.Y., KHACHFE, H.H. et al., Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Sig Transduct Target Ther** 5, 28 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>.

FERRARA N, GERBER HP, LECOUTER J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**. 2003 Jun;9(6):669–676.

FERRY, A. M., SARRAMI, S. M., HOLLIER, P. C., GERICH, C. F., & THORNTON, J. F. (2020). Treatment of non-melanoma skin cancers in the absence of Mohs micrographic surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery Global Open**, 8(12).

FIDLER, I. J., NICOLSON, G. L. Organ Selectivity for Implantation Survival and Growth of B16 Melanoma Variant Tumor Lines, **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, Volume 57, Issue 5, November 1976, Pages 1199–1202, <https://doi.org/10.1093/jnci/57.5.1199>.

FLETCHER JI, HABER M, HENDERSON MJ, NORRIS MD. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. **Nat Rev Cancer**. 2010;10:147–56.

FREDERIKSEN M, VORKAMP K, THOMSEN M, KNUDSEN LE. Human internal and external exposure to PBDEs—a review of levels and sources. **Int J Hyg Environ Health** 2009;212: 109–34.

FREDERIKSEN, M., THOMSEN, C., FRØSHAUG, 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**, (2010) 213(4), 233–242.

GAGLIARDI M, COTELLA D, SANTORO C, ET AL. M., C. Aldo-keto reductases protect metastatic melanoma from ER stress-independent ferroptosis. **Cell Death Dis**. 2019;10:902.

GANGWAR, R. S et al. Oxidative stress pathways of air pollution mediated toxicity: Recent insights, **Redox Biology**, Volume 34, 2020,101545, ISSN 2213-2317.

GARBE, C. & BAUER, J. in **Dermatology** 3rd edn (eds Bologna, J. L., Jorizzo, J. L. & Schaffer, J. V) 1885–1914 (Elsevier, 2012).

C. GARBE, K. PERIS, A. HAUSCHILD, P. SAIAG, M. MIDDLETON, L. BASTHOLT, J. GROB, J. MALVEHY, ScienceDirect diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline e update 2016, **Eur. J. Cancer** 63 (2016) 201–217, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.05.005>.

GARÍ, MERCÈ; GRIMALT, JOAN O. Inverse age-dependent accumulation of decabromodiphenyl ether and other PBDEs in serum from a general adult population. **Environment international**, v. 54, p. 119-127, 2013.

GARTNER, J. J. et al. Comparative exome sequencing of metastatic lesions provides insights into the mutational progression of melanoma. **BMC Genomics** 13, 505 (2012).

A.J. GARCÍA-FERNÁNDEZ, Ecotoxicology, avian. **Encyclopedia of Toxicology**. Vol 2. (Third Edition), 2014.

GAO, P., HE, P., WANG, A., XIA, T., XU, B., XU, Z., NIU, Q., GUO, L., CHEN, X., 2009. Influence of PCB153 on oxidative DNA damage and DNA repair-related gene expression induced by PBDE-47 in human neuroblastoma cells in vitro. **Toxicol. Sci.** 107, 165-170.

GEIGER, Tamar et al. Proteomic portrait of human breast cancer progression identifies novel prognostic markers. **Cancer research**, v. 72, n. 9, p. 2428-2439, 2012.

GERRITSEN, JACQUELINE S.; WHITE, FOREST M. Phosphoproteomics: a valuable tool for uncovering molecular signaling in cancer cells. **Expert Review of Proteomics**, v. 18, n. 8, p. 661-674, 2021.

GILLET JP, GOTTESMAN MM. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. **Methods Mol Biol.** 2010; 596:47–76.

GLOBOCAN 2012 v1.0, **Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase** No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 02/02/2015.

GOCHEVA, VASILENA et al. Quantitative proteomics identify Tenascin-C as a promoter of lung cancer progression and contributor to a signature prognostic of patient survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 28, p. E5625-E5634, 2017.

GREENING, D. W., GOPAL, S. K., XU, R., SIMPSON, R. J. & CHEN, W. Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. **Semin. Cell Dev. Biol.** 40, 72–81, (2015).

GUERRA, R.L.; DE MIRANDA CORRÊA, F.; FERNANDES, R.R.A.; ZIMMERMAN, I.R. Cost Utility of Target Therapies Compared to Dacarbazine for First-Line Treatment of Advanced Non-Surgical and Metastatic Melanoma in the Brazilian National Health System. **Value Health Reg.** Issues 2019, 20, 103–109.

HADLER-OLSEN, E., WINBERG, J. O. & UHLIN-HANSEN, L. Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. **Tumor Biol.** 34, 2041–2051 (2013).

HAMIDI, H. & IVASKA, J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. **Nat. Rev. Cancer** 18, 532–547 (2018).

HANAHAN, D., AND WEINBERG, R. A. (2000) The hallmarks of cancer, **Cell** 100, 57–70.

HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 144, 646–674 (2011). ISSN 0092-8674, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HANAHAN, D (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, 12(1), 31-46.

HASLETON, P.; FLIEDER, D. B. **Spencer's Pathology of the Lung**, 6 ed. New York: Cambridge University Press, 2013.

HASSN MESRATI M, SYAFRUDDIN SE, MOHTAR MA, SYAHIR A. CD44: A Multifunctional Mediator of Cancer Progression. **Biomolecules**. 2021; 11(12):1850. <https://doi.org/10.3390/biom11121850>.

HE, Y.; PENG, L.; ZHANG, W.; et al. Adipose tissue levels of polybrominated diphenyl ethers and breast cancer risk in Chinese women: A case–control study. **Environmental Research**, v. 167, p. 160–168, 2018. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.07.009>>.

HEIJNEN, H. F., SCHIEL, A. E., FIJNHEER, R., GEUZE, H. J. & SIXMA, J. J. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. **Blood** 94, 3791–3799, 1999.

HEIMERL, SUSANNE et al. Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells. **Melanoma research**, v. 17, n. 5, p. 265-273, 2007.

HEMING, P, C. (2022). **P-glycoprotein and cancer: what do we currently know?**. *Heliyon*, 8 (10), e11171. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11171>.

HODI FS, O'DAY SJ, MCDERMOTT DF, WEBER RW, SOSMAN JA, HAANEN JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **N Engl J Med**. 2010;363(8):711-23.

HOFFMAN, K.; LORENZO, A.; BUTT, C. M.; et al., Exposure to flame retardant chemicals and occurrence and severity of papillary thyroid cancer: A case-control study. **Environment International**, v. 107, n. April, p. 235–242, 2017.

HOFFMAN, D., POWELL, T.L., BARRETT, E.S., HARDY, D.B. 2021. Developmental origins of metabolic diseases. **Physiol Rev**, 101: 739–795. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2020>.

HOLASH J, MAISONPIERRE PC, COMPTON D, BOLAND P, ALEXANDER CR, ZAGZAG D, YANCOPOULOS GD, WIEGAND SJ: Vessel

cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. **Science** 1999; 284: 1994– 1998.

HÖLZEL, M., & TÜTING, T. (2016). Inflammation-Induced Plasticity in Melanoma Therapy and Metastasis. **Trends in immunology**, 37(6), 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.03.009>.

H. HONG, Y. LU, Z.-N. JI, AND G.-Q. LIU, “Up-regulation of P-glycoprotein expression by glutathione depletion-induced oxidative stress in rat brain microvessel endothelial cells, **Journal of Neurochemistry**, vol. 98, no. 5, pp. 1465–1473, 2006.

HOUSMAN G, BYLER S, HEERBOTH S, LAPINSKA K, LONGACRE M, SNYDER N, et al. Drug resistance in cancer: an overview. **Cancers (Basel)**. 2014; 6:1769–92.

HUANG, D.; GOU, W.; ZHANG, S.; GOU, Y.; DONG, X. Primary pulmonary melanoma with brain metastasis: a case description and literature analysis. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 13, n. 4, p. 2768-2771, 2023.

HUANG, X., HE, J., ZHANG, H. T., SUN, K., YANG, J., WANG, H., ZHANG, H., GUO, Z., ZHA, Z. G., & ZHOU, C. (2017). Effect of dacarbazine on CD44 in live melanoma cells as measured by atomic force microscopy-based nanoscopy. **International journal of nanomedicine**, 12, 8867–8886. <https://doi.org/10.2147/IJN.S149107>.

HUANG Q, HU X, HE W, ZHAO Y, HAO S, WU Q, et al., Fluid shear stress and tumor metastasis. **Am J Cancer Res** 2018; 8: 763-77. PMID: 29888101 22.

HUANG, Y., RAJPUT, I.R., SANGANYADO, E., YAJING, S. YU, F. LIANG, B., LIU, W. Immune stimulation effect of PBDEs via prostaglandin pathway in pantropical spotted dolphin: an in vitro study. **Chemosphere**, 254 (2020), p. 126717, 10.1016/j.chemosphere.2020.126717.

IARC, **International Agency for Research on Cancer**. Risk fator. Disponível em: <<https://www.iarc.who.int/cancer-topics/#risk-factor>>.

IARC, International Agency for Research on Cancer: **Global Cancer Observatory. Cancer today**. Published 2021. Accessed 28 de Agosto de 2023. <https://gco.iarc.fr/ today/home>.

INCA. **Causas e Prevenção**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-causa-cancer>>. Acesso em: 20/8/2019.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, WHO. **GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality, and prevalence worldwide in 2012. 2013**. <http://globocan.iarc.fr>. Acessado 30 de agosto de 2023.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: **Global Cancer Observatory. Cancer today**. Published 2021. Accessed 28 de Agosto de 2023. <https://gco.iarc.fr/today/home>.

INCA. **Câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 3/6/2019.

INCA. **Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil**. <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>>.

INCA. **Câncer de pele não melanoma**. 2022.<<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pele-nao-melanoma>>. Acessado: 01/09/23.

ISACESCU E, CHIROI P, ZANOAGA O, NUTU A, BUDISAN L, PIRLOG R, ATANASOV AG, BERINDAN-NEAGOE I. Melanoma Cellular Signaling Transduction Pathways Targeted by Polyphenols Action Mechanisms. **Antioxidants**. 2023; 12(2):407. <https://doi.org/10.3390/antiox12020407>.

JACKSON, H. W., DEFAMIE, V., WATERHOUSE, P., & KHOKHA, R. (2017). TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. **Nature Reviews Cancer**, 17(1), 38-53.

JAKOB JA, BASSETT RL, NG CS, LAZAR AJ, ALVARADO GC, ROHLFS ML, et al. Clinical characteristics and outcomes associated with BRAF and NRAS mutations in metastatic melanoma. **Journal of clinical oncology**: official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2011;29:8500.

JENSEN, J. DANIEL; ELEWSKI, BONI E. The ABCDEF rule: combining the “ABCDE rule” and the “ugly duckling sign” in an effort to improve patient self-screening examinations. **The Journal of clinical and aesthetic dermatology**, v. 8, n. 2, p. 15, 2015.

JIANG, Z-Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v.202, p.384-389, 1992.

JIANG, Z-Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, p. 853-856, 1991.

JING, L.; SUN, Y.; WANG, Y.; et al., Chemosphere Cardiovascular toxicity of decabrominated diphenyl ethers (BDE-209) and decabromodiphenyl ethane (DBDPE) in rats. **Chemosphere**, v. 223, p. 675–685, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.115>>.

JOLLIFFE, Ian T.; CADIMA, Jorge. Principal component analysis: a review and recent developments. **Philosophical transactions of the royal society A**:

Mathematical, Physical and Engineering Sciences, v. 374, n. 2065, p. 20150202, 2016.

P.M. JONES, A.M. GEORGE. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. **Cell. Mol. Life Sci.**, 61 (2004), pp. 682-699.

KALAL, B. S., UPADHYA, D., & PAI, V. R. (2017). Chemotherapy Resistance Mechanisms in Advanced Skin Cancer. **Oncology reviews**, 11(1), 326. <https://doi.org/10.4081/oncol.2017.326>.

KALLURI, R.; LEBLEU, V.S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. **Science** 2020, 367.

KARJALAINEN, J. M., TAMMI, R. H., TAMMI, M. I., ESKELINEN, M. J., AGREN, U. M., PARKKINEN, J. J., ALHAVA, E. M., & KOSMA, V. M. (2000). Reduced level of CD44 and hyaluronan associated with unfavorable prognosis in clinical stage I cutaneous melanoma. **The American journal of pathology**, 157(3), 957–965. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64608-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64608-1).

KARLSSON, M.; JULANDER, A.; VAN BAVEL, B.; HARDELL, L. Levels of brominated flame retardants in blood in relation to levels in household air and dust. **Environment International**, v. 33, n. 1, p. 62–69, 2007.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. **J. Biol. Chem.**, v.251, p.6183–6188, 1976.

KENNEDY, LUKE et al. Role of glutathione in cancer: From mechanisms to therapies. **Biomolecules**, v. 10, n. 10, p. 1429, 2020.

KESSENBROCK, K., PLAKS, V. & WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell** 141, 52–67 (2010).

KHOSRAVI, H.; AKABANE, A. L.; ALLOO, A.; NAZARIAN, R. M.; BOLAND, G. M. Metastatic melanoma with spontaneous complete regression of a thick primary lesion. **Journal of the American Academy of Dermatology Case Reports**, v. 2, n. 6, p. 439-441, 2016.

KIM C., LEE C. W., KOVACIC L., SHAH A., KLASA R., SAVAGE K. J. (2010b). Long-term survival in patients with metastatic melanoma treated with DTIC or temozolomide. **Oncologist** 15 765–771.

KLEIN, S. A.; BECKLER, J. P. **Metastatic Melanoma: Symptoms, Diagnoses and Treatments**. New York: Nova Science Publishers, 2011.

KNAPINSKA, A.M.; FIELDS, G.B. The Expanding Role of MT1-MMP in Cancer Progression. **Pharmaceuticals** 2019, 12, 77.

KOOL, MARCEL et al. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein

gene (MRP1), in human cancer cell lines. **Cancer research**, v. 57, n. 16, p. 3537-3547, 1997.

KORTYLEWSKI, M., JOVE, R. & YU, H. Targeting STAT3 affects melanoma on multiple fronts. **Cancer Metastasis Rev.** 24, 315–327 (2005).

KOSAKA N, IGUCHI H, OCHIYA T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. **Cancer Sci.** 2010;101(10):2087–2092.

KOZOVSKA, Z., GABRISOVA, V., & KUCEROVA, L. (2016). Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells. **Neoplasma**, 63(4), 510–517. https://doi.org/10.4149/neo_2016_403.

KUNISUE, T.; TAKAYANAGI, N.; ISOBE, T.; et al., Polybrominated diphenyl ethers and persistent organochlorines in Japanese human adipose tissues. **Environment International**, v. 33, n. 8, p. 1048–1056, 2007.

KURSCHAT, P.; ZIGRINO, P.; NISCHT, R.; BREITKOPF, K.; STEURER, P.; KLEIN, C.E.; KRIEG, T.; MAUCH, C. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 regulates matrix metalloproteinase-2 activation by modulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity in high and low invasive melanoma cell lines. **J. Biol. Chem.** 1999, 274, 21056–21062.

KURSCHAT, P.; WICKENHAUSER, C.; GROTH, W.; KRIEG, T.; MAUCH, C. Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. **J. Pathol.** 2002, 197, 179–187.

LAHAV et al. Melanoma-derived extracellular vesicles instigate proinflammatory signaling in the metastatic microenvironment. **Int. J. Cancer**:145,2521–2534 (2019).

LAINÉ, A., LABIAD, O., HERNANDEZ-VARGAS, H. et al. 2021. Regulatory T cells promote cancer immune-escape through integrin $\alpha\beta 8$ -mediated TGF- β activation. **Nat Commun** 12, 6228. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26352-2>.

LANDREVILLE, S., AGAPOVA, O. A., KNEASS, Z. T., SALESSE, C., & HARBOUR, J. W. (2011). ABCB1 identifies a subpopulation of uveal melanoma cells with high metastatic propensity. **Pigment cell & melanoma research**, 24(3), 430–437. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2011.00841.x>.

LATTMANN, EVELYN; LEVESQUE, MITCHELL P. The role of extracellular vesicles in melanoma progression. **Cancers**, v. 14, n. 13, p. 3086, 2022.

LEE et al. Evaluation of liver and thyroid toxicity in Sprague-Dawley rats after exposure to polybrominated diphenyl ether BDE-209. **The Journal of Toxicological Sciences (J. Toxicol. Sci.)** Vol.35, No.4, 535-545, 2010.

LEE, H. N.; SEO, H-D.; KIM, E-M.; HAN, B. S.; KANG, J. S. Classification of Mouse Lung Metastatic Tumor with Deep Learning. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 30, n. 2, p. 179-183, 2022.

LEONETTI, C., BUTT, C.M., HOFFMAN, K., HAMMEL, S.C., MIRANDA, M.L., STAPLETON, H.M., 2016. Brominated flame retardants in placental tissues: associations with infant sex and thyroid hormone endpoints. **Environ. Health: a global access science source** 15 (1), 113. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0199-8>.

LEONETTI, C.; BUTT, C. M.; HOFFMAN, K.; MIRANDA, M. L.; STAPLETON, H. M. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and 2,4,6-tribromophenol in human placental tissues. **Environment International**, v. 88, p. 23–29, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.002>>.

LI Y, MCCLAY EF (2002) Systemic chemotherapy for the treatment of metastatic melanoma. **Semin Oncol** 29(5):413–426.

LI, H.C., CAO, D.C., LIU, Y., HOU, Y.F., WU, J., LU, J.S., DI, G.H., LIU, G., LI, F.M., OU, Z.L., JIE, C., SHEN, Z.Z., SHAO, Z.M. Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymphnode-negative breast carcinoma, **Breast Cancer Res. Treat.**, 2004, 88, 75–85.

LI, Z. H.; LIU, X. Y.; WANG, N.; et al., Effects of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in regulation of growth and apoptosis of breast, ovarian, and cervical cancer cells. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 4, p. 541–546, 2012.

LIEBEL, S.; RIBEIRO, C.A.O.; MAGALHÃES, V.F.; DA SILVA, R.C.; ROSSI, S.C.; RANDI, M.A.F.; FILIPAK NETO, F. Low concentrations of cylindrospermopsin induce increases of reactive oxygen species levels, metabolism and proliferation in human hepatoma cells (HepG2). **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 3, p. 479–488, 2015.

LIN, Z. PING et al. Disruption of cAMP and prostaglandin E2 transport by multidrug resistance protein 4 deficiency alters cAMP-mediated signaling and nociceptive response. **Molecular pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 243-251, 2008.

LINK, B.; GABRIO, T.; MANN, V.; et al., International Journal of Hygiene and Polybrominated diphenyl ethers (PBDE) in blood of children in Baden-Württemberg between 2002 / 03 and 2008 / 09. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 215, n. 2, p. 224–228, 2012. Elsevier GmbH. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.10.018>>.

LIU, J. The “life code”: A theory that unifies the human life cycle and the origin of human tumors. **Seminars in Cancer Biology**, v. 60, n. September 2019, p. 380–397, 2020. Elsevier.

LIU, S; COSTA, M; ORTIZ, A. Chapter 12 - Effects of metals on extracellular vesicle signaling, Editor(s): Gunnar F. Nordberg, Max Costa, Handbook on the Toxicology of Metals (Fifth Edition), **Academic Press**, 2022, Pages 279-298, ISBN 9780128232927.

LIU X. (2019). ABC Family Transporters. **Advances in experimental medicine and biology**, 1141, 13–100. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_2.

LOCARD-PAULET, Marie et al. Phosphoproteomic analysis of interacting tumor and endothelial cells identifies regulatory mechanisms of transendothelial migration. **Science signaling**, v. 9, n. 414, p. ra15-ra15, 2016.

LOCHER KP (2016) Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. **Nat Struct Mol Biol** 23: 487-493.

LOU X-L, SUN J, GONG S-Q, YU X-F, GONG R, DENG H. Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication. **Chin J Cancer Res** 2015; 27: 450-60. doi: 10.3978/j.issn.1000-9604.2015.04.10.

LUZZI, K. J. et al., Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. **Am. J. Pathol.** 153, 865–873 (1998).

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chem. Biol. Interact**, 224 (2014), pp. 164-175.

LV, Q. Y.; WAN, B.; GUO, L. H.; ZHAO, L.; YANG, Y. In vitro immune toxicity of polybrominated diphenyl ethers on murine peritoneal macrophages: Apoptosis and immune cell dysfunction. **Chemosphere**, v. 120, p. 621–630, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.029>>.

MACEK, B.; MANN, M.; OLSEN, J. V. Global and Site-Specific Quantitative Phosphoproteomics: Principles and Applications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 49, n. 1, p. 199-221, 2009.

MAHBOOB M, SHIREEN KF, ATKINSON A, KHAN AT. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury. **J Environ Sci Health B**. 2001 Sep;36(5):687-97.

MÂNICA, A.; DA SILVA ROSA BONADIMAN, B.; CARDOSO, A. M.; et al., The signaling effects of ATP on melanoma-like skin cancer. **Cellular Signalling**, v. 59, n. January, p. 122–130, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.03.021>>.

MANUITT-BRITO, P et al. BDE-209 Decreases the Efficacy of Dacarbazine Treatment for Melanoma in C57BL/6 Mice. **Research Square**. 2021.

MANSOORI, B., MOHAMMADI, A., DAVUDIAN, S., SHIRJANG, S., & BARADARAN, B. (2017). The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. **Advanced pharmaceutical bulletin**, 7(3), 339–348. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.041>.

MANTOVANI, A., ALLAVENA, P., SICA, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature** 454, 436–444 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature07205>.

MARCHI, M; MOGGIO, E, L; NETO, F. F; BRITO, P. M; SILVA FILHO, B. F; RIBEIRO, C. A. O. BDE-209 and TCDD Modulate the Expression and Activity of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters in Murine Melanoma Cells (B16-F1). **International Journal of Cancer Science & Therapy**. 2021. Volume 3(2): 3-7. doi: 10.31487/j.IJCST.2021.02.01.

MARHABA, R., & ZÖLLER, M. (2004). CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. **Journal of molecular histology**, 35, 211-231.

MASSAGUE, J. & OBENAU, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature** 529, 298–306 (2016).

MATOVU, H.; SILLANPÄÄ, M.; SSEBUGERE, P. Polybrominated diphenyl ethers in mothers' breast milk and associated health risk to nursing infants in Uganda. **Science of the Total Environment**, v. 692, p. 1106–1115, 2019. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.335>>.

MBEUNKUI, F., JOHANN, D.J. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. **Cancer Chemother Pharmacol**, 63 (4) (2009), pp. 571-582.

MCINTYRE, R.L., KENERSON, H.L., SUBRAMANIAN, S., WANG, S.A., KAZAMI, M., STAPLETON, H.M., YEUNG, R.S., 2015. Polybrominated diphenyl ether congener, BDE-47, impairs insulin sensitivity in mice with liver-specific Pten deficiency. **BMC Obes** 2, 1e8. <https://doi.org/10.1186/s40608-014-0031-3>.

METEREN et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Can Trigger Hepatocyte Release of Extracellular Vesicles by Various Mechanisms of Action Depending on Their Affinity for the Aryl Hydrocarbon Receptor, **Toxicological Sciences**, Volume 171, Issue 2, October 2019, Pages 443–462.

MI, X.B; BAO, L.J; WU, C.C; WONG, C.S; ZENG, E.Y. Absorption, tissue distribution, metabolism, and elimination of decabrominated diphenyl ether (BDE-209) in rats after multi-dose oral exposure, **Chemosphere**, Volume 186, 2017, Pages 749-756, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.049>.

MILAC, A. L.; NEGROIU, G. The Multiple Roles of Tyrosinase-Related Protein-2/L- Dopachrome Tautomerase in Melanoma: Biomarker, Therapeutic

Target, and Molecular Driver in Tumor Progression. **Human Skin Cancers - Pathways, Mechanisms, Targets and Treatments**, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Portaria n_ 357 de 8 de abril de 2013-**Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Melanoma Maligno Cutâneo**; Ministério da Saúde do Brasil: Brazil, 2013; p. 16. Available online: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0357_08_04_2013.html (acessado em 22 Ago 2022).

MIRANDA CORRÊA, F.; GUERRA, R.L.; FERNANDES, R.R.A.; SOUZA, M.C.D.; ZIMMERMANN, I.R. Terapia-alvo versus dacarbazina no tratamento de primeira linha do melanoma avançado não cirúrgico e metastático: Análise de impacto orçamentário na perspectiva do Sistema Único de Saúde, 2018–2020*. **Epidemiol. Serviços Saúde** 2019, 28, e2018325.

MISHRA, H., MISHRA, P.K., EKIELSKI, A. Et al., Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. **J Cancer Res Clin Oncol** 144, 2283–2302 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2726-1>.

MOGGIO, E. L. **Investigação do papel do TCDD e BDE-209 na expressão de genes relacionados com apoptose em células B16-F1**. 2019. <https://hdl.handle.net/1884/64814>.

MOITRA K. Overcoming multidrug resistance in cancer stem cells. **Biomed Res Int**. 2015; 2015:635745.

MOREIRA, L. F; ZOMER, S. J; MARQUES, S.M. Modulation of the multixenobiotic resistance mechanism in Danio rerio hepatocyte culture (ZF-L) after exposure to glyphosate and Roundup (R). **Chemosphere**, 228 (2019), pp. 159-165.

MOOI, W. J.; KRAUSZ, T. **Pathology of Melanocytic Disorders**, 2 ed. New York: Hodder Arnold, 2007.

MOSS, L. A. S., JENSEN-TAUBMAN, S. & STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases changing roles in tumor progression and metastasis. **Am. J. Pathol.** 181, 1895–1899 (2012).

MUNN, LANCE L. Cancer and inflammation. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 9, n. 2, p. e1370, 2017.

MURPHY, GILLIAN. Tissue inhibitors of metalloproteinases. **Genome biology**, v. 12, p. 1-7, 2011.

MURIITHI W, MACHARIA LW, HEMING CP, ECHEVARRIA JL, NYACHIEO A, FILHO PN, NETO VM. ABC transporters and the hallmarks of cancer: roles in cancer aggressiveness beyond multidrug resistance. **Cancer Biol Med**. 2020 May 15;17(2):253-269. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0284. PMID: 32587767; PMCID: PMC7309456.

NADER MARTA, G., MUNHOZ, R. R., TEIXEIRA, M. L. P., WALDVOGEL, B. C., PIRES DE CAMARGO, V., FEHER, O., & SANCHES, J. A. (2020). Trends in melanoma mortality in Brazil: a registry-based study. **JCO global oncology**, 6, 1766-1771.

NAIR, R. et al. Extracellular vesicles derived from preosteoblasts influence embryonic stem cell differentiation. **Stem Cells Dev.** 23, 1625–1635 (2014).

NAKAMURA, K.; YOSHIKAWA, N.; YAMAGUCHIA, Y.; KAGOTA, S.; SHINOZUKA, K.; KUNITOMO, M. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. **Life Sciences**. v. 70, Issue 7, p. 791-798, 2002.

NELSON, C.; DROUILLARD, K.; CHENG, K.; ELLIOTT, J.; ISMAIL, N. Accumulation of PBDEs in an urban river otter population and an unusual finding of BDE-209. **Chemosphere**, v. 118, n. 1, p. 322–328, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.007>>.

NEWLANDS ES, STEVENS MF et al (1997) Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. **Cancer Treat Rev** 23(1):35–61.

NICHOLAS S, MATHIOS D, JACKSON C, LIM M (2013) Metastatic melanoma to the brain: surgery and radiation is still the standard of care. **Curr Treat Options Oncol** 14(2):264–279. <https://doi.org/10.1007/s11864-013-0228-6>.

NIETO, M. A. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 27, 347–376 (2011).

NISHIYA, A. T.; MASSOCO, C. O.; FELIZZOLA, C. R.; PERLMANN, E.; BATSCHINSKI, K.; TEDARDI, M. V.; GARCIA, J. S.; MENDONÇA, P. P.; TEIXEIRA, T. F.; DAGLI, M. L. Z. Comparative Aspects of Canine Melanoma. **Veterinary Sciences**, v. 3, n. 1, p. 7, 2016.

NOBILI S, LAPUCCI A, LANDINI I, CORONNELLO M, ROVIELLO G et al. (2020) Role of ATP-binding cassette transporters in cancer initiation and progression. **Semin Cancer Biol** 60: 72-95.

OUHTIT, A.; RIZEQ, B.; SALEH, H.A.; RAHMAN, M.M.; ZAYED, H. Novel CD44-downstream signaling pathways mediating breast tumor invasion. **Int. J. Biol. Sci.** 2018, 14, 1782–1790.

OPDENAKKER G, VAN DAMME J. The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines. **Int J Dev Biol.** 2004;48:519–527.

PALM, A.; HOLMGREN, T.; REMBERGER, M. Science of the Total Environment Emissions of two phthalate esters and BDE 209 to indoor air and their impact on urban air quality. **Science of the Total Environment**, The, v.

470–471, p. 527–535, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.023>>.

PARKER, ROBERT et al. Phosphoproteomic analysis of cell-based resistance to BRAF inhibitor therapy in melanoma. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 95, 2015.

PELLACANI, C.; BUSCHINI, A.; GALATI, S.; et al., Evaluation of DNA damage induced by 2 polybrominated diphenyl ether flame retardants (BDE-47 and BDE-209) in SK-N-MC cells. **International Journal of Toxicology**, v. 31, n. 4, p. 372–379, 2012.

PEINADO, M. ALECKOVIC, S. LAVOTSHKIN, I. MATEI, B. COSTA-SILVA, G. MORENO-BUENO, M. HERGUETA-REDONDO, C. WILLIAMS, G. GARCIA-SANTOS, C. GHAJAR, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nat. Med.**, 18 (2012), pp. 883-891.

PLEASANCE, E. D. et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. **Nature** 463, 191–196 (2010).

POLLAK N, DÖLLE C, ZIEGLER M. M., Z. The power to reduce: pyridine nucleotides–small molecules with a multitude of functions. **Biochem J.** 2007; 402:205–218.

POSTE, G. et al. Comparison of the metastatic properties of B16 melanoma clones isolated from cultured cell lines, subcutaneous tumors, and individual lung metastases. **Cancer Research**, v. 42, n. 7, p. 2770-2778, 1982.

PRICE, N. LOKMAN, C. RICCIARDELLI. Differing roles of hyaluronan molecular weight on cancer cell behavior and chemotherapy resistance. **Cancers (Basel)**, 10 (482) (2018), 10.3390/cancers10120482.

RALDÚA, D., PADROS, F., SOLÉ, M., ELJARRAT, E., BARCELÓ, D., RIVA, M.C., BARATA, C., 2008. First evidence of polybrominated diphenyl ether (flame retardants) effects in feral barbel from the Ebro River basin (NE, Spain). **Chemosphere** 73, 56-64.

RAPOSO G, STOOORVOGEL W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol.** 2013;200(4):373–383.

RASS, K., & HASSEL, J. C. (2009). Chemotherapeutics, chemoresistance and the management of melanoma. **Giornale italiano di dermatologia e venereologia: organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia**, 144 (1), 61–78.

REISTAD, T., MARIUSSEN, E. A Commercial Mixture of the Brominated Flame Retardant Pentabrominated Diphenyl Ether (DE-71) Induces Respiratory Burst in Human Neutrophil Granulocytes In Vitro, **Toxicological Sciences**,

Volume 87, Issue 1, September 2005, Pages 57–65,
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi222>.

REQUENA, C.; BOTELLA-ESTRADA, R.; TRAVES, V.; NAGORE, E.; ALMENAR, S.; GUILLÉN, C. Problems in defining melanoma regression and prognostic implication. **Actas dermo-sifiligráficas**, v. 100, n. 9, p. 759-766, 2009.

REYMOND, N., D'ÁGUA, B. B. & RIDLEY, A. J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. **Nat. Rev. Cancer** 13, 858–870 (2013).

RIDOLFI R, CHIARION-SILENI V, GUIDA M, ROMANINI A, LABIANCA R, FRESCHI A, et al. Cisplatin, dacarbazine with or without subcutaneous interleukin-2, and interferon alpha-2b in advanced melanoma outpatients: results from an Italian multicenter phase III randomized clinical trial. **J Clin Oncol**. 2002;20(6):1600-7.

ROBBINS, P. D. & MORELLI, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nat. Rev. Immunol**. 14, 195–208, (2014).

ROBERT C, THOMAS L, BONDARENKO I, O'DAY S, M JW, GARBE C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. **N Engl J Med**. 2011;364(26):2517-26.

ROSS, P. S.; COUILLARD, C. M.; IKONOMOU, M. G.; et al., Large and growing environmental reservoirs of Deca-BDE present an emerging health risk for fish and marine mammals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 1, p. 7–10, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.09.002>>.

ROQUE, A.A., DA LUZ, J.Z., SANTURIO, M.T.K. et al. Complex mixtures of pesticides and metabolites modulate the malignant phenotype of murine melanoma B16-F1 cells. **Environ Sci Pollut Res** (2023). <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25603-7>.

ROTTE, A., MARTINKA, M. & LI, G. MMP2 expression is a prognostic marker for primary melanoma patients. **Cell Oncol**. 35, 207–216 (2012).

ROVERSI, F.M., GALDIERI, L.C., GREGO, B.H., SOUZA, F.G., MICHELETTI, C., MARTINS, A.M., D'ALMEIDA, V., 2006. Blood oxidative stress markers in Gaucher disease patients. **Clin. Chim. Acta** 364, 316e320.

RUSSELL, B., GRODEN, J., 2009. BLM Mutation and Colorectal Cancer Susceptibility. In: Potter, J. D., Lindor, N. M. (eds) Genetics of Colorectal Cancer. **Cancer Genetics**. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09568-4_13.

SAJID, ANDALEEB; RAHMAN, HADIAR; AMBUDKAR, SURESH V. Advances in the structure, mechanism and targeting of chemoresistance-linked ABC transporters. **Nature Reviews Cancer**, p. 1-18, 2023.

SALGADO YCS, BOIA-FERREIRA M, ZABLOCKI DA LUZ J, FILIPAK NETO F, OLIVEIRA RIBEIRO CA (2018) Tribromophenol affects the metabolism, proliferation, migration and multidrug resistance transporters activity of murine melanoma cells B16-F1. **Toxicology in Vitro** 50:40–46. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.02.005>.

SALVI, M.; MOLINARI, F.; IUSSICH, S.; MUSCATELLO, L. V.; PAZZINI, L.; BENALI, S.; BANCO, B.; ABRAMO, F.; DE MARIA, R.; ARESU, L. Histopathological Classification of Canine Cutaneous Round Cell Tumors Using Deep Learning: A Multi-Center Study. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 2021.

SAMET, J.M.; WAGES, P.A. Oxidative stress from environmental exposures. **Current Opinion in Toxicology** (2018) v. 7 p. 60-66.

SANA, A., ROSSI, I. V., SABATKE, B., BONATO, L. B., MEDEIROS, L. C. S., & RAMIREZ, M. I. (2023). An Improved Method to Enrich Large Extracellular Vesicles Derived from *Giardia intestinalis* through Differential Centrifugation. **Life**, 13(9), 1799.

SAVAGNER, P., YAMADA, K. M. & THIERY, J. P. The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial–mesenchymal transition. **J. Cell Biol.** 137, 1403–1419 (1997).

SCHADENDORF D, UGUREL S, SCHULER-THURNER B, NESTLE FO, ENK A, BROCKER EB, et al. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. **Ann Oncol.** 2006;17(4):563-70.

SCHADENDORF, D. & HAUSCHILD, A. Melanoma in 2013: Melanoma—the run of success continues. **Nature Rev. Clin. Oncol.** 11, 75–76 (2014).

SCHADENDORF, D., FISHER, D., GARBE, C. et al. Melanoma. **Nat Rev Dis Primers** 1, 15003 (2015). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.3>.

SCHINDELIN, J., ARGANDA-CARRERAS, I., FRISE, E., KAYNIG, V., LONGAIR, M., PIETZSCH, T., ... CARDONA, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.

SCHOONEN WG, WESTERINK WM, DE ROOS JA, DÉBITON E. Cytotoxic effects of 100 reference compounds on Hep G2 and HeLa cells and of 60 compounds on ECC-1 and CHO cells. I mechanistic assays on ROS, glutathione depletion and calcein uptake. **Toxicol in vitro.** 2005;19(4):505-516.

SCHUETZ, John D. et al. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. **Nature medicine**, v. 5, n. 9, p. 1048-1051, 1999.

SHAIN, A. HUNTER; BASTIAN, BORIS C. From melanocytes to melanomas. **Nature reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345-358, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.37>.

SHEN J, WANG B, ZHANG T, ZHU N, WANG Z, JIN J, HE Y, HU M: Suppression of Non-Small Cell Lung Cancer Growth and Metastasis by a Novel Small Molecular Activator of RECK. **Cell Physiol Biochem** 2018;45:1807-1817. doi: 10.1159/000487872.

SHETA, MONA et al. Extracellular Vesicles: New Classification and Tumor Immunosuppression. **Biology**, v. 12, n. 1, p. 110, 2023.

SHIMADA, K.; USHIJIMA, K.; SUZUKI, C.; et al., Pulmonary administration of curcumin inhibits B16-F10 melanoma lung metastasis and invasion in mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 0, n. 0, p. 0, 2018. Springer Berlin Heidelberg.

SIDDIQI, M.A., LAESSIG, R.H., REED, K. D. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): new pollutants-old diseases. **Clin. Med. Res**, v. 1, p. 281- 290., 2003.

SIES. H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biol.**, 4 (2015), pp. 180-183.

SILVA FILHO, B. F., NETO, F. F., MARCHI, M., MOGGIO, E. L., ROSSI, I. V., SABATKE, B., RAMIREZ, M.I., LUCENA, M. C.S., TODESCHINI, A. R., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. (2022). BDE-209 and TCDD enhance metastatic characteristics of melanoma cells after chronic exposure. **Environmental Pollution**, 313, 120140.

SJÖDIN, A.; PATTERSON, D. G.; BERGMAN ÅKE, Å. A review on human exposure to brominated flame retardants - Particularly polybrominated diphenyl ethers. **Environment International**, v. 29, n. 6, p. 829–839, 2003.

SOENGAS, M. S., & LOWE, S. W. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, 22(20), 3138–3151. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206454>.

SRINIVAS PR, KRAMER BS, SRIVASTAVA S. Trends in biomarker research for cancer detection. **Lancet Oncol**. 2001; 2: 698 - 704.

SRINIVAS, POTHUR R. et al. Proteomics for cancer biomarker discovery. **Clinical chemistry**, v. 48, n. 8, p. 1160-1169, 2002.

SRIVASTAVA, A; AHMAD, R; SRIVASTAVA, A. N. Matrix metalloproteases: a review on their proangiogenic and metastatic potential. **Era J. Med. Res**. 2019; 6(1): 1-25.

STAHL, P.D; RAPOSO, G. Extracellular Vesicles: Exosomes and Microvesicles, Integrators of Homeostasis. **Physiology** 34: 169–177, 2019.

STAQUICINI et al. A subset of host B Lymphocytes controls melanoma metastasis through a melanoma cell adhesion molecule /MUC18-dependent interaction: evidence from mice and humans. **Cancer Res** (2008) 68 (20): 8419–8428. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1242>.

STEGNER, D., DUTTING, S. & NIESWANDT, B. Mechanistic explanation for platelet contribution to cancer metastasis. **Thromb. Res.** 133 (Suppl 2), S149–S157 (2014).

STEIL, J., BUZZO, J.L.A., DE OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. et al. Polybrominated diphenyl ethers BDE-47 and BDE-99 modulate murine melanoma cell phenotype in vitro. **Environ Sci Pollut Res** 29, 11291–11303 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16455-0>.

STETLER-STEVENSON, William G. The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 27, n. 1, p. 57-66, 2008.

STEVENSON, V. B.; KLAHN, S.; LEROITH, T.; HUCKLE, W. R. Canine melanoma: A review of diagnostics and comparative mechanisms of disease and immunotolerance in the era of the immunotherapies. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 2023.

STOCKHOLM CONVENTION (2017). European Commission. **Proposal for a COUNCIL DECISION**: on the position to be adopted, on behalf of the European Union, at the Eighth Conference of the Parties to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants regarding the proposals for amendments of Annexes A and C; 2017/0058 (NLE); 2017.

STOCKHOLM CONVENTION, 2019. **What are POPs**. 1219 Châtelaine, Switzerland. <<http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs>>.

SU, CHUN-WEN et al. Loss of TIMP3 by promoter methylation of Sp1 binding site promotes oral cancer metastasis. **Cell death & disease**, v. 10, n. 11, p. 793, 2019.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA. Cancer J. Clin.** 2021, 71, 209–249.

TAGLIAFERRI, S., CAGLIERI, A., GOLDONI, M., PINELLI, S., ALINOVI, R., POLI, D., PELLACANI, C., GIORDANO, G., MUTTI, A., COSTA, L.G., 2010. Low concentrations of the brominated flame retardants BDE-47 and BDE-99 induce synergistic oxidative stress mediated neurotoxicity in human neuroblastoma cells. **Toxicol. Vitro** 24, 116e122. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.08.020>.

TARHINI, A. A. et al. Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease. **Dermatol. Ther.** 19(1), 19–25 (2006).

TCGA. Genomic classification of cutaneous melanoma. **Cell** (2015), 10.1016/j.cell.2015.05.044.

TENG, X. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes improve the microenvironment of infarcted myocardium contributing to angiogenesis and antiinflammation. **Cell Physiol. Biochem.** 37, 2415–2424 (2015).

THAM, Muly et al. Melanoma-initiating cells exploit M2 macrophage TGF β and arginase pathway for survival and proliferation. **Oncotarget**, v. 5, n. 23, p. 12027, 2014.

THIERY, J. P. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. **Nature Rev. Cancer** 2, 442–454 (2002).

THOMPSON, P.A et al., Environmental immune disruptors, inflammation and cancer risk, **Carcinogenesis**, Volume 36, Issue Suppl_1, June 2015, Pages S232–S253, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv038>.

TSENG, L.; LEE, C.; PAN, M.; et al., Postnatal exposure of the male mouse to Decreased epididymal sperm functions without alterations in DNA content and histology in testis. **Toxicology** v. 224, p. 33–43, 2006.

TURAJLIC, S. et al. Whole genome sequencing of matched primary and metastatic acral melanomas. **Genome Res.** 22, 196–207 (2012).

TUCCI, M., PASSARELLI, A., MANNAVOLA, F., FELICI, C., STUCCI, L. S., CIVES, M., & SILVESTRIS, F., 2019. Immune system evasion as hallmark of melanoma progression: the role of dendritic cells. **Frontiers in oncology**, 9, 1148. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01148>.

UBERSAX, JEFFREY A.; FERRELL JR, JAMES E. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 8, n. 7, p. 530-541, 2007.

UNTERGASSER, A., et al., Web-based LinRegPCR: application for the visualization and analysis of (RT)-qPCR amplification and melting data. **BMC Bioinformatics**, 2021. 22(1): p. 398. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04306-1>.

VAN NIEL G, D'ANGELO G, RAPOSO G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2018 Apr;19(4):213-228.

VARA, JUAN ÁNGEL FRESNO et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. **Cancer treatment reviews**, v. 30, n. 2, p. 193-204, 2004.

VIJAYALAKSHMI M M. Melanoma Skin Cancer Detection using Image Processing and Machine Learning. **International Journal of Trend in Scientific Research and Development (ijtsrd)**, ISSN: 2456- 6470, Volume-3 | Issue-4, June 2019, pp.780-784, URL: <https://www.ijtsrd.com/papers/ijtsrd23936.pdf>.

XU, A.; LEE, J.; ZHAO, Y.; WANG, Y.; LI, X.; XU, P. Potential Effect of EGCG on the Anti-Tumor Efficacy of Metformin in Melanoma Cells. **J. Zhejiang Univ. Sci. B** 2021, 22, 548–562.

XU, P., LOU, X., DING, G., SHEN, H., WU, L., CHEN, Z., & WANG, X. 2015. Effects of PCBs and PBDEs on thyroid hormone, lymphocyte proliferation, hematology and kidney injury markers in residents of an e-waste dismantling area in Zhejiang, China. **Sci.Total Environ.** 536, 215- 222.

XU et al. 2018.Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care. Nature Reviews. **Clinical oncology**. Vol 15.

ZANIVAN, SARA et al. In vivo SILAC-based proteomics reveals phosphoproteome changes during mouse skin carcinogenesis. **Cell reports**, v. 3, n. 2, p. 552-566, 2013.

ZAQOUT S.; BECKER, L.L.; KAINDL, A.M. Immunofluorescence Staining of Paraffin Sections Step by Step. **Front. Neuroanat.** 2020, 14, 582218.

ZEILSTRA, J. **CD44 Isoforms in Intestinal Cancer: Identity and Functions**. Ph.D. Thesis, Faculty of Medicine (AMC), University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands, 2020.

ZHANG, W.; CAI, Y.; SHENG, G.; CHEN, D.; FU, J. Tissue distribution of decabrominated diphenyl ether (BDE-209) and its metabolites in sucking rat pups after prenatal and/or postnatal exposure. **Toxicology**, v. 283, n. 1, p. 49–54, 2011. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2011.02.003>>.

ZHANG, LEI et al. Reduced expression of RECK protein may help differentiate cutaneous malignant melanoma from melanocytic nevus. **Anticancer research**, v. 35, n. 6, p. 3185-3191, 2015.

ZHANG F, PENG L, HUANG Y, LIN X, ZHOU L, CHEN J (2019) Chronic BDE-47 exposure aggravates malignant phenotypes and chemoresistance by activating ERK through ER α and GPR30 in endometrial carcinoma. **Front Oncol** 9:1079. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01079>.

ZHAO, A; LIU, H; ZHANG, A; WANG, X; ZHANG, H; WANG, H. Effect of BDE-209 on glutathione system in *Carassius auratus*, **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Volume 32, Issue 1, 2011, Pages 35-39, ISSN 1382-6689, <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.03.004>.

ZHOU, Q., FANG, T., WEI, S., CHAI, S., YANG, H., TAO, M., & CAO, Y. (2022). Macrophages in melanoma: A double-edged sword and targeted therapy strategies (Review). **Experimental and therapeutic medicine**, 24(4), 640. <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11577>.

ZHU, Y., PIEHOWSKI, P. D., ZHAO, R., CHEN, J., SHEN, Y., MOORE, R. J., SHUKLA, A. K., PETYUK, V. A., CAMPBELL-THOMPSON, M., MATHEWS,

C. E., SMITH, R. D., QIAN, W. J., & KELLY, R. T. (2018). Nanodroplet processing platform for deep and quantitative proteome profiling of 10-100 mammalian cells. **Nature communications**, 9(1), 882. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03367-w>.

ZHU, Y., LI, X., LIU, J., ZHOU, G., YU, Y., JING, L., SHI, Z., ZHOU, X., & SUN, Z. (2019). The effects of decabromodiphenyl ether on glycolipid metabolism and related signaling pathways in mice. **Chemosphere**, 222, 849–855. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.003>.

ZIGRINO, P.; DRESCHER, C.; MAUCH, C. Collagen-induced proMMP-2 activation by MT1-MMP in human dermal fibroblasts and the possible role of alpha2beta1 integrins. **Eur. J. Cell Biol.** 2001, 80, 68–77.

ZÖCHBAUER-MÜLLER, SABINE et al. P-glycoprotein and MRP1 expression in axillary lymph node metastases of breast cancer patients. **Anticancer research**, v. 21, n. 1A, p. 119-124, 2001.

J.K. ZOLNERCIKS, E.J. ANDRESS, M. NICOLAOU, K.J. LINTON. Structure of ABC transporters. **Essays Biochem.**, 50 (2011), pp. 43-61.

YAGHOBI, Z., MOVASSAGHPUR, A., TALEBI, M., SHADBAD, M. A., HAJIASGHARZADEH, K., POURVAHDANI, S., & BARADARAN, B. (2021). The role of CD44 in cancer chemoresistance: A concise review. **European Journal of Pharmacology**, 903, 174147.

YANG, C. Y.; WU, S. C.; LEE, C. C.; SHIH, Y. HSIN. Translocation of polybrominated diphenyl ethers from field-contaminated soils to an edible plant. **Journal of Hazardous Materials**, v. 351, n. 2010, p. 215–223, 2018. Elsevier B.V. <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.02.037>>.

YANG, C; LIM, W; SONG, G. Mediation of oxidative stress toxicity induced by pyrethroid pesticides in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, Volume 234, 2020,108758, ISSN 1532-0456.

YE, X. & WEINBERG, R. A. Epithelial-mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression. **Trends Cell Biol.** 25, 675–686 (2015).

YU, G.; BU, Q.; CAO, Z.; et al., Chemosphere Brominated flame retardants (BFRs): A review on environmental contamination in China. **Chemosphere**, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.034>>.

YU, Y et al. Proteomic mechanism of decabromodiphenyl ether (BDE-209) biodegradation by Microbacterium Y2 and its potential in remediation of BDE-209 contaminated water-sediment system, **Journal of Hazardous Materials**, Volume 387, 2020, 121708, ISSN 0304-3894.

YUAN, J; SUN, X; CHE, S; ZHANG, L; RUAN, Z; LI, X; YANG, J. AhR-mediated CYP1A1 and ROS overexpression are involved in hepatotoxicity of

decabromodiphenyl ether (BDE-209), **Toxicology Letters**, Volume 352, 2021, Pages 26-33, ISSN 0378-4274, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.09.008>.

G. WANG, J. ZHAO, R. JIANG, W. SONG. Rat lung response to ozone and fine particulate matter (PM_{2.5}) exposures. **Environ. Toxicol**, 30 (2015), pp. 343-356.

WANG, JING-QUAN et al. ATP-binding cassette (ABC) transporters in cancer: A review of recent updates. **Journal of Evidence-Based Medicine**, v. 14, n. 3, p. 232-256, 2021.

WANG, Jing-Quan et al. Multidrug resistance proteins (MRPs): Structure, function and the overcoming of cancer multidrug resistance. **Drug Resistance Updates**, v. 54, p. 100743, 2021.

WANG, Y.; CHEN, T.; SUN, Y.; et al., A comparison of the thyroid disruption induced by decabrominated diphenyl ethers (BDE-209) and decabromodiphenyl ethane (DBDPE) in rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, n. December 2018, p. 224–235, 2019. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.080>>.

WATKINS DJ, MCCLEANMD, FRASER AJ, WEINBERG J, STAPLETON HM, SJODIN A, et al. Exposure to PBDEs in the office environment: evaluating the relationships between dust, handwipes, and serum. **Environ Health Perspect** 2011;119:1247–52.

WEBER, C.E., KUO, P.C. The tumor microenvironment. **Surgical oncology**. vol 21, issue 3, september 2012, pages 172-177.

WEIS, S., CUI, J., BARNES, L. & CHERESH, D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. **J. Cell Biol.** 167, 223–229 (2004).

WEMKEN, N.; DRAGE, D. S.; CELLARIUS, C.; et al., Emerging and legacy brominated flame retardants in the breast milk of first time Irish mothers suggest positive response to restrictions on use of HBCDD and Penta- and Octa-BDE formulations. **Environmental Research**, v. 180, p. 108805, 2020. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108805>>.

WHO, Environmental Health Criteria 162: **Brominated Diphenyl Ethers**; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2004.

WILLIAMS, A.E., CHAMBERS, R.C. The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS? **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.** 2014, 306(3) p. L217-230. 10.1152/ajplung.00311.2013.

WINIEWSKI, J. R.; ZOUGMAN, A.; NAGARAJ, N.; MANN, M. Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nature Methods**, v. 6, p. 359-362, 2009. <https://www.biochem.mpg.de/226356/FASP>.

WISNIEWSKI JR, ZOUGMAN A, MANN M: Combination of FASP and StageTipbased fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome. **J Proteome Res** 2009, 8(12):5674-5678.

WITZ,I.P., LEVY-NISSENBAUM, O. The tumor microenvironment in the post-PAGET era **Cancer Lett**, 242 (1) (2006), pp. 1-10.

WONG SY, HYNES RO. Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide? **Cell Cycle** 2006; 5: 812-7. doi: 10.4161/cc.5.8.2646.

WU, R., FORGET, M. A., CHACON, J., BERNATCHEZ, C., HAYMAKER, C., CHEN, J. Q., HWU, P., & RADVANYI, L. G. 2012. Adoptive T-cell therapy using autologous tumor-infiltrating lymphocytes for metastatic melanoma: current status and future outlook. **Cancer journal** (Sudbury, Mass.), 18(2), 160–175. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e31824d4465>.

WU Z, HE C, HAN W, SONG J, LI H, ZHANG Y, JING X, WU W (2020). Exposure pathways, levels and toxicity of polybrominated diphenyl ethers in humans: a review. **Environ Res** 187:109531. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109531>.

ANEXOS

ANEXO 1 – CERTIFICADO DO CEUA/BIO-UFPR

10/08/2020

SEI/UFPR - 2829070 - CEUA/BIO: Certificado



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1362

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.035210/2020-01

APROVADO/APPROVAL: 21/07/2020 – R.O. 05/2020

TÍTULO: Análise do efeito do éter difenil decabrominado (BDE-209) em células B16F1 na progressão do melanoma *in vivo*.

TITLE: Analysis of ether diphenis decabrominated (BDE-209) effects in B16F1 cells on melanoma prognosis *in vivo*.

AUTORES/AUTHORS: Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, Micheli de Marchi.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Biologia Celular

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI**, Institucional, em 24/07/2020, às 14:56, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



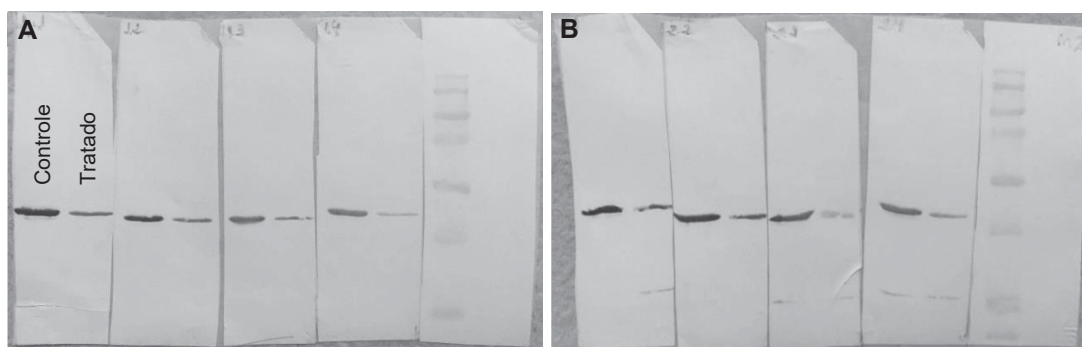
A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **2829070** e o código CRC **D62EFD4E**.

ANEXO 2. TESTES REALIZADOS PARA O ENSAIO DE *WESTERN BLOT*

Amostra biológica:

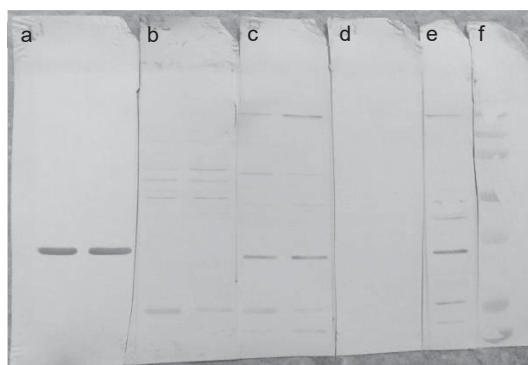
- Pulmão de camundongo Black C57BL/6
- Preparo: amostras diluídas 10mg/mL (Abs 280)

Teste 1: Para o ensaio de *Western Blot* colorimétrico foram testadas as concentrações de 40 μ g (Teste 1) e 60 μ g (Teste 1 B) de proteínas totais/poço da amostra controle (veículo DMSO) e tratado (BDE-209 1nM). Anti-actina foi a proteína-alvo para esse teste inicial utilizada na concentração de 1 μ g/mL. Além disso, foram testadas as diluições de 1:2.500; 1:5.000; 1:10.000; 1:20000 do anticorpo secundário anti-coelho AP. A diluição de 1:2500 do anticorpo secundário mostrou-se mais eficiente. A concentração de 40 μ g apresentou um melhor resultado em relação a concentração de 60 μ g. Porém observou-se uma variação da expressão de Actina entre o grupo controle e tratado (Teste 1).



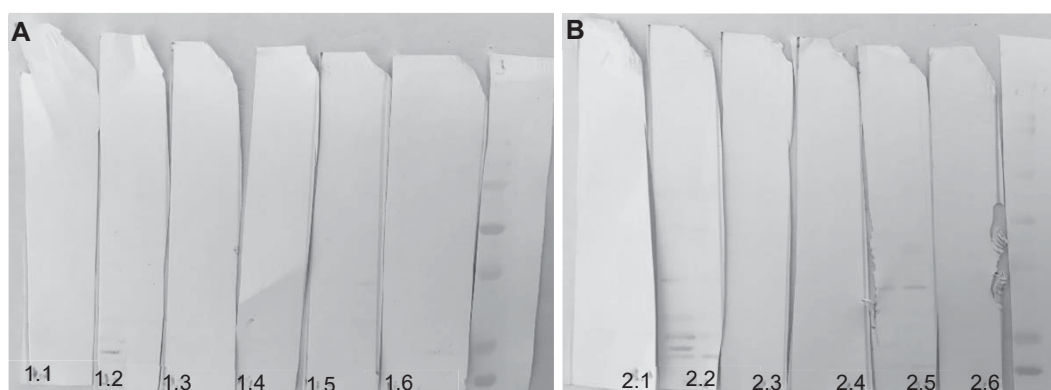
Teste 1: Proteína-alvo Actina. (A) Amostra controle e tratado em 40 μ g de proteínas totais. (B) Amostra controle e tratado em 60 μ g. Revelação: colorimétrica. FONTE: a autora (2023).

Teste 2: Os anticorpos anti-GAPDH, anti-MMP2, anti-MMP9 e anti-TIMP3 foram testados, ambos na concentração de 1 μ g/mL. O GAPDH foi padronizado com sucesso, mostrando ser um bom controle endógeno, sem variações entre o grupo controle e tratado. Pela presença de bandas inespecíficas foram necessários novos testes com os demais alvos para um bloqueio mais eficiente. Contudo, para o alvo TIMP3 não foram observadas marcações tanto para o controle, quanto para o tratado (Teste 2).



Teste 2: Proteínas-alvo: (a) GAPDH; (b) MMP2; (c) MMP9; (d) TIMP3; (e) MMP9, ambos na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. f) Marcador colorimétrico. 40 μg de proteínas/poço. Revelação colorimétrica. FONTE: a autora (2023).

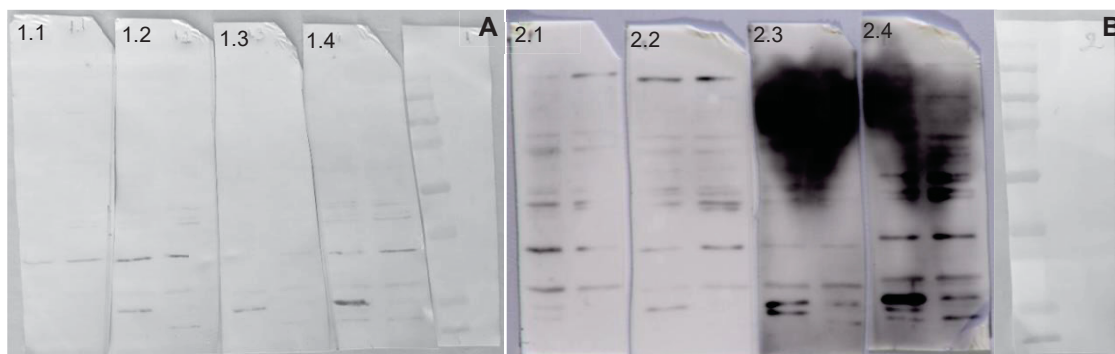
Teste 3: Novamente, os alvos MMP2, MMP9 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e TIMP3 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram testados, utilizando a concentração de proteínas totais de 25 e 50 μg de amostra/poço. O tempo do bloqueio foi realizado overnight (16h) à 4°C. Nesse caso, as membranas não apresentaram nenhuma banda, mostrando que o bloqueio overnight e incubação de 1h com o anticorpo primário foi ineficaz (Teste 3).



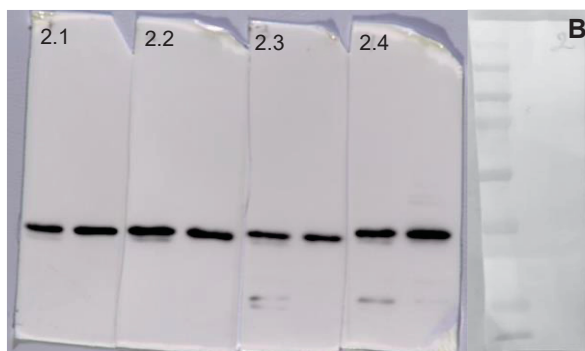
Teste 3: Bloqueio overnight à 4°C e incubação com o anticorpo primário anti-MMP2, 9 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e anti-TIMP3 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 1h a temperatura ambiente. (A) membrana de nitrocelulose (B) membrana de PVDF. Amostra em 25 μg (1.1 - 1.3 e 2.1 - 2.3) e 50 μg (1.4 - 1.6 e 2.4 - 2.6) de proteínas/poço. FONTE: a autora (2023).

Teste 4: O alvo MMP9 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi avaliado com a concentração de 25 e 50 μg de amostra por poço. A concentração de bloqueio utilizada foi de 3% de leite em pó desnatado ou 2% de BSA. Os anticorpos secundários foram testados tanto o conjugado com fosfatase alcalina bem como com a peroxidase. Nessas condições, o resultado quimioluminescente foi mais sensível na detecção da proteína-alvo. O bloqueio com leite em pó desnatado apresentou-se mais efetivo

em relação ao BSA (Teste 4). Além disso, foi testado o protocolo de stripping e incubação com o endógeno GAPDH na mesma membrana e foi obtido resultados satisfatórios (Teste 4.1).

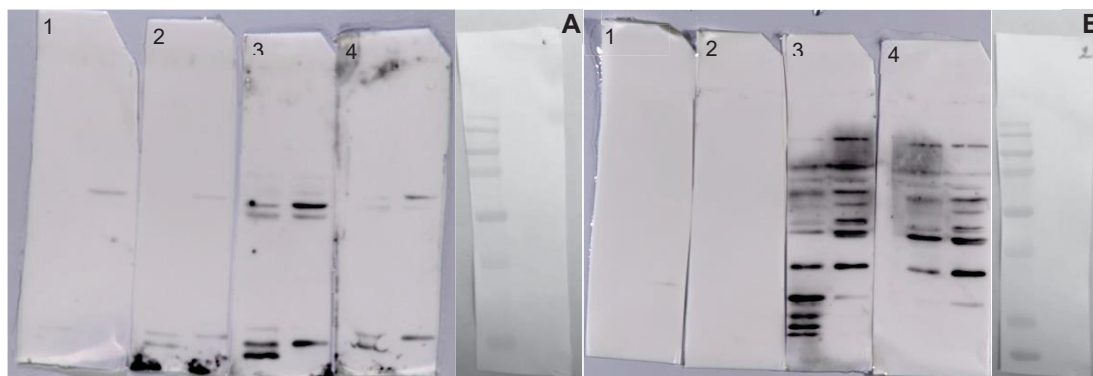


Teste 4: (A) Proteína-alvo MMP9 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Amostra: controle e tratado 25 μg (1.1 e 1.3) e 50 μg (1.2 e 1.4). Bloqueio com leite em pó desnatado a 3% (1.1 e 1.2) e BSA 2% (1.3 e 1.4). Revelação colorimétrica. Teste 4.1: (B) Proteína-alvo MMP9 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Amostra: controle e tratado 25 μg (2.1 e 2.3) e 50 μg (2.2 e 2.4). Bloqueio com leite em pó desnatado a 3% (2.1 e 2.2) e BSA 2% (2.3 e 2.4). Revelação quimioluminescente. FONTE: a autora (2023).



Teste 4.1: (B) Stripping e incubação com o anticorpo anti-GAPDH. Amostra: controle e tratado 25 μg (2.1 e 2.3) e 50 μg (2.2 e 2.4). Bloqueio com leite em pó desnatado a 3% (2.1 e 2.2) e BSA 2% (2.3 e 2.4). Revelação quimioluminescente. FONTE: a autora (2023).

Teste 5: A membrana de nitrocelulose foi incubada com o anticorpo primário anti-MMP2 na concentração de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e o anticorpo secundário conjugado com HRP na diluição de 1:5.000 ou 1:10.000; ou com anticorpo primário anti-MMP2 à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubada com anticorpo secundário conjugado HRP na diluição de 1:5.000 ou 1:10.000. A reatividade anti-TIMP3 foi testada em 1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do anticorpo primário e 1:5.000 ou 1:10.000 do anticorpo secundário. E por último, também foi testado a reatividade anti-MMP9 em 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do anticorpo primário e 1:5.000 ou 1:10.000 do anticorpo secundário (Teste 5).



Teste 5 (A): Reatividade anti-MMP2. (1) anticorpo primário na concentração de 0,5 µg/mL e secundário 1:5000; (2) anticorpo primário em 0,5 µg/mL e secundário 1:10000; (3) anticorpo primário em 1 µg/mL e secundário 1:5000; e (4) anticorpo primário em 1 µg/mL e secundário 1:10000. Concentração de proteínas totais: 40 µg/poço. Teste 5.1 (B) Reatividade anti-TIMP3 (1 e 2) e anti-MMP9 (3 e 4). (1) anticorpo primário na concentração de 1,4 µg/mL e secundário 1:5000; (2) anticorpo primário em 1,4 µg/mL e secundário 1:10000; (3): anticorpo primário em 1 µg/mL e secundário 1:5000; (4): anticorpo primário em 1 µg/mL e secundário 1:10.000. Concentração de proteínas totais de 40 µg/poço. FONTE: a autora (2023).

Portanto, com os testes prévios de padronização observou-se: A reatividade anti-Actina e anti-GAPDH tiveram resultados satisfatórios com a revelação colorimétrica. Já para as metaloproteinases de matriz o método de revelação quimioluminescente apresentou-se mais eficaz; O gel de poliacrilamida 12% com 10 poços foi mais efetivo; O ensaio quimioluminescente é mais sensível, tendo em vista a baixa concentração de amostra da proteína-alvo como de MMP9 e MMP2 em meio ao montante de outras proteínas presentes na amostra do pulmão dos camundongos;

O bloqueio com leite em pó teve melhor êxito em relação ao BSA; O protocolo de stripping e incubação com o endógeno GAPDH teve sucesso; A concentração de 1 µg/mL do anticorpo primário anti-MMP2, MMP9 e ACTINA, apresentaram uma boa reatividade e o endógeno GAPDH na diluição de 1:5.000; A diluição de 1:5000 do anticorpo secundário HRP apresentou melhores resultados. O endógeno GAPDH foi mais eficiente quando comparado com a Actina, apresentando menos variabilidade entre as amostras; Não foi observada a detecção de TIMP3 nas diferentes concentrações testadas.