

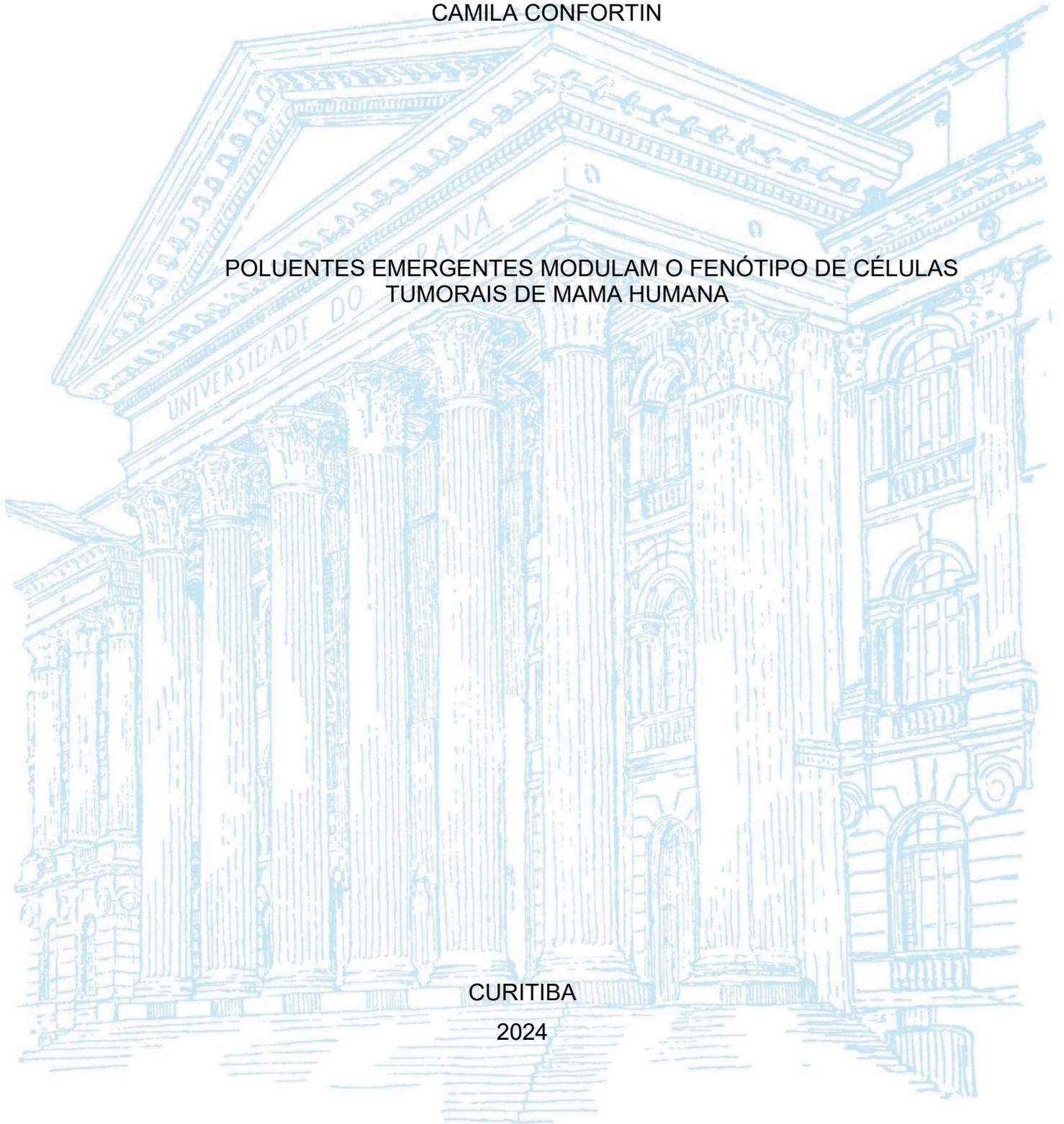
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA CONFORTIN

POLUENTES EMERGENTES MODULAM O FENÓTIPO DE CÉLULAS
TUMORAIS DE MAMA HUMANA

CURITIBA

2024



CAMILA CONFORTIN

POLUENTES EMERGENTES MODULAM O FENÓTIPO DE CÉLULAS
TUMORAIS DE MAMA HUMANA

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. Francisco Filipak Neto

CURITIBA

2024

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

Confortin, Camila, 1992-
Poluentes emergentes modulam o fenótipo de células tumorais de mama humana. /
Camila Confortin. – Curitiba, 2024.
1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.
Orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto.

1. Contaminantes. 2. Poluentes ambientais. 3. Poluentes Orgânicos. 4. Mamas -
Câncer. 5. Tumores. 6. Progressão da doença. 7. Proliferação celular. 8. Poluentes
Químicos. I. Filipak Neto, Francisco, 1981-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. V.
Título.



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CAMILA CONFORTIN** intitulada: **Poluentes emergentes modulam o fenótipo de células tumorais de mama humana**, sob orientação do Prof. Dr. FRANCISCO FILIPAK NETO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de 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, 14 de Novembro de 2024.

Assinatura Eletrônica
18/11/2024 09:26:16.0
FRANCISCO FILIPAK NETO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
18/11/2024 11:19:44.0
DANIEL DE LIMA BELLAN
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE GENÉTICA)

Assinatura Eletrônica
18/11/2024 18:15:55.0
MARCIA HELENA APPEL
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica
21/11/2024 14:53:15.0
ALESSANDRA MELO DE AGUIAR
Avaliador Interno (INSTITUTO CARLOS CHAGAS/FIOCRUZ)

Assinatura Eletrônica
18/11/2024 09:44:03.0
VIVIAN ROTUNO MOURE VALDAMERI
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS DA
UFPR)

Dedico esta tese, com todo o meu carinho e gratidão, àqueles que estiveram ao meu lado em cada etapa dessa jornada. Aos meus pais Zeli e Amarildo, minha irmã Angela e meu marido Luiz Henrique que sempre acreditaram no meu potencial e me ofereceram apoio incondicional.

Dedico este trabalho a todos os que sonham e lutam pela pesquisa e pelo conhecimento, que não desistem de crescer e construir um mundo melhor.

AGRADECIMENTOS

Concluir esta tese representa um marco importante em minha vida, e essa conquista não seria possível sem o apoio de muitas pessoas que me acompanharam ao longo do caminho.

Agradeço ao meu orientador Francisco, pelo apoio, por me entender, apoiar minhas ideias e por me ensinar e orientar nestes anos de doutorado.

Agradeço aos meus pais Zeli e Amarildo, por serem meu alicerce e inspiração, por acreditarem em mim mesmo nos momentos em que eu duvidava. A vocês, minha mais profunda gratidão e amor incondicional, pois cada passo desta trajetória reflete o apoio e a educação que me deram.

À minha irmã Angela, por ser a melhor pessoa que tenho em minha vida. Ela é meu refúgio e meu orgulho. Ela esteve sempre ao meu lado, me inspirando e me lembrando da importância de perseverar. Obrigada por ser meu porto seguro, por cada palavra de incentivo e por me fazer acreditar que esse sonho era possível. Sua presença mesmo distante fisicamente, foi essencial em cada etapa deste percurso.

Ao meu esposo Luiz Henrique, pelo amor, paciência e apoio incondicional durante esta jornada. Por ser meu porto seguro. Obrigado por cada palavra de encorajamento, por acreditar em mim mesmo nos momentos em que eu duvidava e por compartilhar comigo os desafios e as conquistas deste percurso. Sua presença ao meu lado tornou tudo mais leve e possível, e cada conquista aqui é, também, um reflexo do seu companheirismo e dedicação.

Aos professores do grupo de pesquisa em Toxicologia Celular, que compartilharam comigo seu conhecimento e seu tempo, sempre me incentivando a questionar, a buscar e a evoluir. Obrigado por cada ensinamento, cada conversa, cada correção, e por acreditarem na relevância deste trabalho.

À minha banca avaliadora, Daniel, Alessandra, Marcia e Vivian por disponibilizarem seu tempo e dedicação para avaliar o meu trabalho e contribuir para o melhoramento do mesmo.

Aos amigos e colegas do grupo de pesquisa, Roberta, Micheli, Heloisa, Jessica, Aliciane, Tugstênio, Melyssa, Ana Paula e Fernando por me lembrarem da importância do equilíbrio e por estarem ao meu lado, mesmo nos momentos mais desafiadores. Vocês foram uma fonte constante de ânimo, compreensão e alegria.

À minha aluna de iniciação científica Heloisa, pelo auxílio nos experimentos,

por todas as conversas, risadas e apoio, não somente nas questões relacionadas com a tese.

Um agradecimento especial à Aliciane que me ensinou tudo o que precisava para dar início a esta jornada. Ao Tugstênio pelo auxílio com a parte de bioinformática pois eu estava extremamente perdida. À Jessica pelo auxílio dos experimentos, pelas conversas, risadas e desabafos e por acreditar em mim e me indicar para o trabalho que estou atualmente. Roberta e Micheli que estiveram sempre ao meu lado, pelo auxílio, pelos conselhos, conversas, risadas e desabafos.

E claro, não podia deixar de agradecer especialmente meus grandes amigos Ana e Fernando, por todos os almoços no RU, pelas conversas, sendo elas científicas ou não, pelas ideias, apoio, risadas, pelas jantas e vinhos lá em casa e por estarem todos os dias ao meu lado vocês foram essenciais na minha jornada.

Às minhas colegas e amigas do grupo de Virologia Molecular da Fiocruz, onde trabalho atualmente, Caroline e Carla, pelos novos ensinamentos, pela paciência, pelas conversas e por entenderem a minha ansiedade e necessidade de finalizar esta jornada, obrigada do fundo do coração.

Aos amigos de longa data, que estiveram ao meu lado, me apoiando. Que entenderam quando tive que me ausentar de algum compromisso, meu mais sincero obrigado.

Aos técnicos e funcionários da Universidade Federal do Paraná, em especial os que atuam no departamento de Biologia Celular pelo apoio.

Ao professor José do Departamento de Biologia Celular por toda a ajuda com as análises e com o artigo.

Aos professores e alunos dos laboratórios de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos, de Investigação de Polissacarídeos Sulfatados e de Células Inflamatórias e Neoplásicas, pelo auxílio em diversas questões.

Ao professor Dr. Glaucio Valdemeri e o doutorando Lucas do Laboratory of Cancer Drug Resistance, pela parceria e ajuda na realização dos ensaios de proliferação.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa durante o doutorado.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para que esta jornada fosse possível. Este trabalho é também uma homenagem ao apoio, à generosidade e à força de todos vocês.

*“Eu me reinvento e me recrio infinitamente e, mesmo assim, permaneço eu
mesma.”*

— A Hora da Estrela, Clarice Lispector

RESUMO

Com o avanço da ciência e tecnologia, a maior parte dos produtos utilizados em nosso cotidiano beneficia-se do uso de compostos químicos. A exposição de humanos a essas substâncias favorece o surgimento de diversas enfermidades, incluindo o câncer. O objetivo deste estudo foi avaliar se os contaminantes químicos: ácido perfluorooctanóico, bisfenol A, metoxicloro e benzofenona-1 são capazes de modular o fenótipo de células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, alterando processos que contribuem para a progressão tumoral. Primeiramente realizou-se uma seleção dos contaminantes por molecular docking após levantamento na literatura, seguido de ensaios *in vitro* com as células em cultura. As células foram expostas aos contaminantes químicos por 24 horas e 15 dias em concentrações distintas e depois submetidas aos ensaios de viabilidade celular, de efluxo de drogas, migração, formação de colônias, proliferação, invasão e expressão gênica. Na linhagem MDA-MB-231, a exposição modulou importantes características associadas à malignidade tumoral, como o aumento de viabilidade) e atividade de efluxo de drogas, aumento da proliferação celular e número de gerações celulares, da capacidade de migração e invasão das células, e da expressão dos genes (RPS6, SYNCRIP, ESR2 e VEGFA) que estão ligados com a progressão tumoral, particularmente na exposição por 15 dias. A linhagem MCF-7 apresentou aumento de viabilidade, aumento significativo na formação de colônias, proliferação celular e expressão dos genes (STAT3, ESR2, ABCG2 e VEGFA), porém sem alteração na migração, também de forma mais expressiva na exposição por 15 dias. Os contaminantes não foram citotóxicos para a linhagem não tumoral MCF10A, contudo, promoveram um aumento do metabolismo do MTT, na retenção do corante vermelho neutro e na proliferação, além também de um aumento no efluxo de drogas após exposição por 24 horas e 15 dias. Notavelmente, a expressão de genes relacionados com a progressão tumoral, como proliferação (VEGFA, STAT3, RPS6, SYNCRIP) e resistência a múltiplas drogas (ABCG2), a proliferação celular, atividade de transportadores envolvidos no efluxo de drogas, migração, invasão celular e formação de colônias indicam que há uma modulação do fenótipo das células de tumor mamário. Além disso, essa modulação foi maior nas células já muito agressivas (MDA-MB-231), intermediária nas células tumorais menos metastáticas e menos agressivas (MCF-7) e muito menor nas células não tumorais (MCF-10A). Em conjunto, os dados apresentados corroboram a hipótese de que a exposição constante a esses contaminantes ambientais pode modular fenótipo de células de tumor de mama tornando-as mais agressivas.

Palavras-chave: contaminantes emergentes; poluentes orgânicos; câncer de mama; progressão tumoral; proliferação celular.

ABSTRACT

With the advancement of science and technology, most of the products used in our daily lives benefit from the use of chemical compounds. Human exposure to these substances favors the emergence of various diseases, including cancer. The objective of this study was to evaluate whether the chemical contaminants perfluorooctanoic acid, bisphenol A, methoxychlor, and benzophenone-1 are capable of modulating the phenotype of MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells, altering processes that contribute to tumor progression. First, a selection of contaminants was performed through molecular docking after a literature review, followed by in vitro assays with cultured cells. The cells were exposed to the chemical contaminants for 24 hours and 15 days at different concentrations and then subjected to assays for cell viability, drug efflux, migration, colony formation, proliferation, invasion, and gene expression. In the MDA-MB-231 cell line, exposure modulated important characteristics associated with tumor malignancy, such as increased viability and drug efflux activity, increased cell proliferation and number of cell generations, enhanced cell migration and invasion capacity, and upregulation of genes (RPS6, SYNCRIP, ESR2, and VEGFA) associated with tumor progression, particularly after 15 days of exposure. The MCF-7 cell line showed increased viability, a significant increase in colony formation, cell proliferation, and upregulation of genes (STAT3, ESR2, ABCG2, and VEGFA), but no change in migration, also more pronounced after 15 days of exposure. The contaminants were not cytotoxic to the non-tumoral MCF-10A cell line; however, they promoted an increase in MTT metabolism, retention of the neutral red dye, and proliferation, as well as an increase in drug efflux activity after both 24-hour and 15-day exposures. Notably, the expression of genes related to tumor progression, such as proliferation (VEGFA, STAT3, RPS6, SYNCRIP) and multidrug resistance (ABCG2), along with increased cell proliferation, drug efflux transporter activity, migration, invasion, and colony formation, indicate that there is a modulation of the breast tumor cell phenotype. Furthermore, this modulation was greater in highly aggressive cells (MDA-MB-231), intermediate in less metastatic and less aggressive tumor cells (MCF-7), and much lower in non-tumoral cells (MCF-10A). Together, the presented data support the hypothesis that constant exposure to these environmental contaminants may modulate the phenotype of breast tumor cells, making them more aggressive.

Keywords: emerging contaminants; organic pollutants; breast cancer; tumor progression; cell proliferation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 O progresso dos contaminantes emergentes em relação aos avanços na detecção de substâncias químicas potencialmente prejudiciais ao ambiente e ecossistemas.....	24
Figura 2. Principais características de compostos com capacidade de desregulação endócrina.....	9
Figura 3 Estrutura química do composto Pfoa.....	32
Figura 4 Estrutura química do composto Bpa.....	33
Figura 5 Estrutura química do composto Mtx.	34
Figura 6 Estrutura química do composto Bp1.....	36
Figura 7. Processo de carcinogênese.	38
Figura 8. Subtipos moleculares e histológicos do câncer de mama, destacando suas características, prevalência e relação com a taxa de sobrevivência.....	41
Figura 9. Vantagens e desvantagens dos métodos de pesquisa in sílico..	45
Figura 10. Linhagem MCF-7.....	46
Figura 11. Linhagem MDA-MB-231.....	477
Figura 12. Linhagem MCF10-A..	488
Figura 13. Esquema dos experimentos de exposição por 24 h e 15 dias..	555
Figura 14. Screening de concentrações para o Pfoa, Bpa e Mtx.....	69
Figura 15. Ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular da linhagem MCF10-A...71	
Figura 16. Ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular da linhagem MCF-7.	73
Figura 17. Ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231.	75
Figura 18. Ensaios de efluxo de drogas da linhagem MCF10-A.....	77
Figura 19. Ensaios de efluxo de drogas da linhagem MCF-7.....	78
Figura 20. Ensaios de efluxo de drogas da linhagem MDA-MB-231..	79
Figura 21. Ensaio clonogênico 2D da linhagem MCF-7..	80
Figura 22. Ensaio clonogênico 2D da linhagem MCF10-A.....	81

Figura 23. Ensaio clonogênico 2D da linhagem MDA-MB-231.....	81
Figura 24. Migração de células MDA-MB-231.....	82
Figura 25. Migração de células MCF10-A.	83
Figura 26. Migração de células MCF-7.....	84
Figura 27. Ensaio de invasão transwell das células MDA-MB-231.....	85
Figura 28. Ensaio de proliferação celular utilizando o marcador Cell Trace Far Red na linha celular MCF10-A.	86
Figura 29. Ensaio de proliferação celular utilizando o corante Cell Trace Far Red na linhagem celular MCF-7.	87
Figura 30. Ensaio de proliferação celular utilizando o corante Cell Trace Far Red na linha celular MDA-MB-231.....	88
Figura 31. Expressão gênica avaliada por RT-qPCR da linhagem MCF-7.....	90
Figura 32. Expressão gênica avaliada por RT-qPCR da linhagem MDA-MB-231... ..	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tabela contendo os genes selecionados, as sequências, a quantidade de pares de bases e o número de referência da sequência (RefSeq)62

Tabela 2. Screening molecular com base nas energias de ligação determinadas por AUTODOCK VINA entre as proteínas e contaminantes químicos selecionados66

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

- ABC** – Transportadores de ATP Binding Cassette
- ABCB1** – Gene Transportador ABC Subfamília B Membro 1 (P-gp)
- ABCC1** – Gene Transportador ABC Subfamília C Membro 1 (MRP1)
- ABCC4** – Gene Transportador ABC Subfamília C Membro 4 (MRP4)
- ABCG2** – Proteína ABC Subfamília G Membro 2 (Breast Cancer Resistance Protein)
- AKT1** – Proteína Quinase AKT 1 (AKT Serine/Threonine Kinase 1)
- ANKRD17** – Proteína Anquirina Repeat Domain 17
- ANOVA** – Análise de Variância (Analysis of Variance)
- AR** – Receptor Androgênico
- AR** – Receptor Androgênico
- ARGs** – Genes de Resistência a Antibióticos (Antibiotic Resistance Genes)
- ATCC** – Coleção Americana de Culturas Tipo (American Type Culture Collection)
- B-ACTINA** – Beta-Actina
- BCRJ** – Banco de Células do Rio de Janeiro
- BCRP** – Proteína de Resistência ao Câncer de Mama (Breast Cancer Resistance Protein)
- BDE-209** – Decabromodifenil Éter (Decabromodiphenyl Ether)
- BP-1** – 2,4-Dihidroxibenzofenona ou Benzofenona 1
- BPA** – Bisfenol-A
- BRCA1** – Gene de Suscetibilidade ao Câncer de Mama 1 (Breast Cancer Gene 1)
- BSA** – Albumina de Soro Bovino (Bovine Serum Albumin)
- c-MYC** – Proto-oncogene MYC.
- cDNA** – DNA Complementar (Complementary DNA)
- CEs** – Contaminantes Emergentes
- CONAMA** – Conselho Nacional do Meio Ambiente
- CTAF** – Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência
- CTFR** – CellTrace™ Far Red
- DMEM** – Meio Modificado de Eagle de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
- E2** – Estradiol

EDCs – Produtos Químicos Desreguladores Endócrinos (Endocrine-Disrupting Chemicals)

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetraacético (Ethylenediaminetetraacetic Acid)

EGF – Fator de Crescimento Epidérmico (Epidermal Growth Factor)

EPA – Agência de Proteção Ambiental dos EUA (Environmental Protection Agency)

ER+ – Receptor de Estrogênio Positivo

ER α – Receptor de Estrogênio Alfa

ER β – Receptor de Estrogênio Beta

ESR1 – Receptor de Estrogênio 1 (Receptor de Estrogênio Alfa, ER α)

ESR2 – Receptor de Estrogênio 2 (Receptor de Estrogênio Beta, ER β)

F12 – Mistura Nutricional de Ham (Ham's Nutrient Mixture)

FSC – Espalhamento Frontal (Forward Scatter)

GAPDH – Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase

GP α – Receptor de Estrogênio Acoplado à Proteína G

HCBs – Hexaclorobenzenos

HER2 – Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano

HER2+ – Receptor 2 Positivo do Fator de Crescimento Epidérmico Humano

HSPA8 – Proteína de Choque Térmico 8 (Heat Shock Protein Family A Member 8)

MDR – Fenótipo de Resistência Múltipla a Drogas (Multidrug Resistance Phenotype)

MMP2 – Metaloproteinase de Matriz 2 (Matrix Metalloproteinase 2)

MMP9 – Metaloproteinase de Matriz 9 (Matrix Metalloproteinase 9)

MRP1 – Proteína de Resistência a Múltiplas Drogas 1

MRP4 – Proteína de Resistência a Múltiplas Drogas 4

MTT – Método de Análise de Viabilidade Celular (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

MTX – Metoxicloro

NTC – Controle Negativo Sem Modelo (No Template Control)

P-gp – Glicoproteína P

PBBs – Bifenilas Polibromadas (Polybrominated Biphenyls)

PBDEs – Éteres Difenil-polibromados (Polybrominated Diphenyl Ethers)

PBS – Solução Salina Tampão de Fosfato (Phosphate-Buffered Saline)

PCBs – Bifenilas Policloradas (Polychlorinated Biphenyls)

PCDD/PCDF – Dioxinas e Furanos Policlorados

PDB – Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Bank)

PFA – Ácido Parafórmico

PFAS – Substâncias Per e Polifluoroalquil

PFOA – Ácido Perfluorooctanóico

POPs – Poluentes Orgânicos Persistentes

PR – Receptor de Progesterona

PR+ – Receptor de Progesterona Positivo

RNA – Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Acid)

RPS6 – Proteína Ribossomal S6 (Ribosomal Protein S6)

RT-qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction)

SFB – Soro Fetal Bovino

SSC – Espalhamento Lateral (Side Scatter)

STAT3 – Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3)

SYBR – Corante de Intercalação para Detecção de DNA em RT-PCR (SYBR Green)

SYNCRIP – Proteína Associada a Sinapse, Ribonucleoproteína Citosólica e Nuclear

TCDD – 2,3,7,8-Tetraclorodibenzeno-p-Dioxina

TNBC – Câncer de Mama Triplo Negativo (Triple-Negative Breast Cancer)

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UV – Ultravioleta

UVA – Ultravioleta A

UVB – Ultravioleta B

VEGFA – Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (Vascular Endothelial Growth Factor A)

β-TUBULINA – Beta-Tubulina

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	6
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS.....	14
SUMÁRIO.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Contaminantes emergentes e poluentes orgânicos persistentes: presença e impactos no ambiente e saúde.....	22
2.2 Contaminantes emergentes e a capacidade de desregulação endócrina.....	26
2.3 Poluentes orgânicos persistentes (POPs).....	29
2.4 Poluentes selecionados para o estudo.....	31
2.4.1 Ácido Perfluorooctanóico (Pfoa).....	31
2.4.2 Bisfenol A (Bpa).....	33
2.4.3 Metoxicloro (Mtx).....	34
2.4.4 2,4-Dihidroxibenzofenona (Benzofenona 1/ Bp1).....	36
2.5 O câncer.....	37
2.6 O câncer de mama.....	39
2.7 Emprego de modelos <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> na toxicologia celular.....	43
2.8 Linhagens celulares empregadas no estudo.....	45
2.8.1 Linhagem MCF-7.....	46
2.8.2 Linhagem MDA-MB-231.....	47
2.8.3 Linhagem MCF10-A.....	47
2.9 Relevância deste estudo.....	49
3 OBJETIVOS.....	51
3.1 Objetivo geral.....	51
3.2 Objetivos específicos.....	51
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1 Seleção dos contaminantes e molecular docking.....	52
4.2 Cultura das células.....	53

4.3 Preparo dos contaminantes	53
4.4 Seleção das concentrações dos contaminantes	54
4.5 Delineamento experimental	54
4.6 Ensaio de densidade e viabilidade celular	56
4.6.1 Retenção do vermelho neutro	56
4.6.2 Metabolismo do MTT	56
4.6.3 Cristal violeta	57
4.7 Atividade dos transportadores de efluxo de drogas	57
4.7.1 Rodamina B	58
4.7.2 Calceína-AM	58
4.7.3 Hoechst 33342	58
4.8 Avaliação de mecanismos relacionados à progressão tumoral	59
4.8.1 Ensaio de migração (scratch)	59
4.8.2 Formação de colônias: ensaio clonogênico bidimensional 2D	59
4.8.3 Ensaio de invasão	60
4.8.4 Ensaio de proliferação celular por marcação com CellTrace™ far Red	61
4.9 Transcrição reversa – qPCR (RT-qPCR)	62
4.9.1 Seleção dos genes	62
4.9.2 RT-qPCR	64
4.10 Análise estatística	64
5 RESULTADOS	66
5.1 Molecular docking e screening de concentrações	66
5.2 Ensaio de viabilidade celular	70
5.2.1 Linhagem MCF10-A	70
5.2.2 Linhagem MCF-7	72
5.2.3 Linhagem MDA-MB-231	73
5.3 Ensaio atividade dos transportadores ABC envolvidos no efluxo de drogas	76
5.3.1 Linhagem MCF10-A	76
5.3.2 Linhagem MCF-7	77
5.3.3 Linhagem MDA-MB-231	78
5.4 Avaliação de mecanismos relacionados à progressão tumoral	79
5.4.1 Formação de colônias: ensaio clonogênico 2D	79

5.4.2 Migração celular (scratch)	82
5.4.3 Invasão celular (transwell).....	84
5.4.4 Proliferação celular (Cell Trace Far Red)	85
5.5 Expressão gênica- RT-qPCR	89
6 DISCUSSÃO	92
6.1 As concentrações testadas dos contaminantes emergentes não interferiram na viabilidade das células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF10A.	92
6.2 Os contaminantes químicos alteram a atividade dos transportadores de efluxo de drogas, importantes na aquisição do fenótipo MDR.	94
6.3 Os contaminantes químicos alteram mecanismos relacionados com a progressão tumoral e expressão gênica	96
7 CONCLUSÃO	103
CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
REFERÊNCIAS.....	106

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de mortalidade da população no mundo, tendo um aumento cada vez mais progressivo e sendo responsável por quase uma em cada seis mortes (16,8%), estando associado com custos sociais e macroeconômicos relevantes. Este aumento de casos, acaba refletindo o envelhecimento da população, situação socioeconômica e o papel que os fatores de risco possuem, como a ingestão de álcool, tabaco, alimentação não saudável, falta de atividade física e ainda, o contato da população com contaminantes químicos, advindos de fontes diversas (CHEN et al., 2023; BRAY et al., 2024). Dentre os diversos tipos de câncer que acometem e preocupam a população, o câncer de mama é o que mais acomete mulheres no mundo (DARBRE, 2021).

A ocorrência de câncer de mama no mundo está crescendo continuamente, tendo sua incidência aumentada tanto em países não desenvolvidos como também em países desenvolvidos (DARBRE, 2021; E SILVA et al., 2024). Durante a progressão do câncer de mama, ocorre a multiplicação descontrolada de células transformadas, resultando na formação de um tumor. Muitas dessas células, acabam se disseminando através dos vasos sanguíneos e linfáticos, causando metástases em outros órgãos. Ademais, a heterogeneidade intratumoral contribui para o aumento da capacidade das células cancerosas de reprogramação gênica, contribuindo para que estas células possam alterar seu comportamento e se adaptar ao microambiente (ZHENG 2022; KHAN et al., 2022; CLUSAN, 2023). A evolução do câncer de mama apresenta uma complexidade alta e envolve principalmente fatores ambientais e genéticos, sendo que a contribuição hereditária é menor (DARBRE, 2021), visto que a população está constantemente exposta a diversos fatores ambientais que prejudicam a saúde.

Assim, a exposição aos fatores ambientais que auxiliam na evolução do câncer de mama, pode ocorrer de maneiras diversas, sendo o contato com contaminantes químicos, o principal meio para tal exposição. Este contato acontece diariamente através do leite materno, cordão umbilical, ingestão, inalação e contato com a pele. A exposição a estes contaminantes químicos pode desencadear doenças diversas, pois, por meio de mecanismos moleculares e bioquímicos distintos, podem iniciar alterações como aumento de proliferação celular, estresse oxidativo, instabilidade

genômica e modificações epigenéticas (SMITH et al., 2016; SARPA e FRIEDRICH, 2022). A exposição contínua e descarte inadequado de contaminantes químicos, aumenta significativamente o risco de desenvolvimento do câncer devido à ativação de um ou mais mecanismos de ação carcinogênica em organismos vivos (OLIVEIRA, GUILLEN e SILVA, 2022).

Esses contaminantes possuem origens e usos variados, com concentrações e locais de ocorrência diversificados e são numerosos os produtos químicos que estão em uso atualmente ou que já foram amplamente utilizados, mas que em decorrência da capacidade de persistência no ambiente e bioacumulação acabam acumulando em solos, sedimentos, ar e organismos vivos, expondo os seres humanos por várias vias (KOUAL, 2020). Uma classe de compostos que tem chamado bastante atenção e em decorrência disso, sido largamente estudada, são os contaminantes emergentes (WANG et al., 2024).

Derivados de fontes antropogênicas e naturais, os contaminantes emergentes são compostos que incluem diversas categorias de produtos presentes em produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais, componentes de plásticos, subprodutos de desinfecção, compostos perfluorados, drogas ilícitas, produtos industriais como retardantes de chama organofosforados e retardantes de chama bromados, e alguns agrotóxicos, entre outros. Ainda, alguns destes compostos possuem a capacidade de interagir com o sistema endócrino, sendo classificados como desreguladores endócrinos, como o bisfenol A (Bpa), que gera seus efeitos principalmente nos receptores de estrogênio alfa e beta (SWEENEY et al., 2015; KOUAL, 2020; FARTO, 2021).

A carcinogenicidade dos contaminantes emergentes é bem documentada, entretanto, há uma lacuna significativa no conhecimento acerca dos efeitos da exposição a esses compostos no prognóstico de cânceres já estabelecidos e nas alterações induzidas em células tumorais. Diante disso, estudos que analisam as respostas celulares à exposição a contaminantes emergentes são relevantes. Portanto, para investigar os efeitos desses contaminantes no fenótipo de malignidade tumoral de mama, o presente estudo utilizou as linhagens celulares de mama humana MCF7 e MDA-MB231 e a linhagem não tumoral MCF10A, expostas a diferentes concentrações dos contaminantes ácido perfluorooctanóico (Pfoa), bisfenol-A (Bpa), metoxicloro (Mtx) e 2,4-dihidroxibenzofenona ou benzofenona 1 (Bp1). Em resumo, avaliamos se os produtos químicos descritos podem alterar características das

células tumorais ou normais de mama, tornando-as mais agressivas, interferindo na migração, proliferação, capacidade de estabelecer colônias e invadir outros tecidos, bem como, alteração da expressão genética.

Os dados relacionados à fatores que podem dar origem a tumores malignos são amplamente estudados e descritos na literatura. Contudo, fatores relacionados à desencadeadores de piores prognósticos para a progressão dos tumores, ainda carecem de mais investigação, principalmente os fatores relacionados à contaminantes emergentes. Portanto, esta pesquisa se propõe a fazer uma relação entre a exposição aguda e crônica a estes contaminantes e a modulação de células tumorais de mama in vitro. Adaptações celulares à exposição aos contaminantes que podem aumentar fatores relacionados ao grau de malignidade. E com os resultados obtidos tentar iniciar uma extrapolação para os efeitos nos organismos onde o câncer já está em progressão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contaminantes emergentes e poluentes orgânicos persistentes: presença e impactos no ambiente e saúde

As transformações resultantes do novo estilo de vida humano após a revolução Industrial no século XVIII provocaram, como consequência, a exposição indiscriminada a inúmeros compostos capazes de causar danos ao meio ambiente e às populações humanas (POSE-JUAN; FERNANDEZ-CRUZ; SIMAL-GÁNDARA, 2016). A crescente industrialização e urbanização acabou afetando diferentes estratos do meio ambiente, como a água, solo e o ar. Todos os ecossistemas estão enfrentando níveis inéditos de estresse provocados pela atividade humana, impulsionando-os para pontos críticos. Vários agentes estressores influenciam a condição ecológica desses ecossistemas em escalas continentais e globais (BĂNĂDUC et al., 2024; WANG, GAO e ZUO, 2024).

As tecnologias químicas são fundamentais para as sociedades contemporâneas, dado que mais de 95% de todos os bens e artigos manufaturados dependem da química. Embora os produtos químicos ofereçam muitos benefícios desejáveis, eles podem ser liberados ao longo de seu ciclo de vida, ocasionando efeitos adversos à saúde humana e ao meio ambiente (WANG et al., 2020). Um dos

principais focos da comunidade científica e órgãos de fiscalização tem sido a presença de um grupo de contaminantes de interesse, conhecidos como contaminantes emergentes (CEs). Atualmente, diversos tipos de produtos disponíveis no mercado enquadram-se nessa categoria quando liberados no ambiente (CHIAVELLI et al., 2019).

Esses contaminantes são identificados em diversos ambientes, como água, solo e ar e podem ser classificados como de origem antrópica, incluindo compostos presentes em efluentes domésticos, hospitalares, industriais e agrícolas. Também podem ocorrer naturalmente, como em algumas espécies de plantas (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017; TRAN, REINHARD e GIN, 2018). O termo contaminantes emergentes começou por volta do ano 2000, contudo, antes disso já havia uma preocupação com compostos como os PFAS (substâncias per e polifluoroalquil), clorofluorocarbonetos, pesticidas, neonicotinóides, plásticos e seus subprodutos, dentre outros. Porém ainda não tinham uma classificação exata destes compostos e com a evolução na detecção vestigial ao longo dos anos foi possível uma melhor compreensão de quais compostos fazem parte desta classe denominada contaminantes emergentes e dar início a estudos que elucidem os seus efeitos na saúde e no ambiente, como mostra a Figura 1 (WANG et al., 2024).

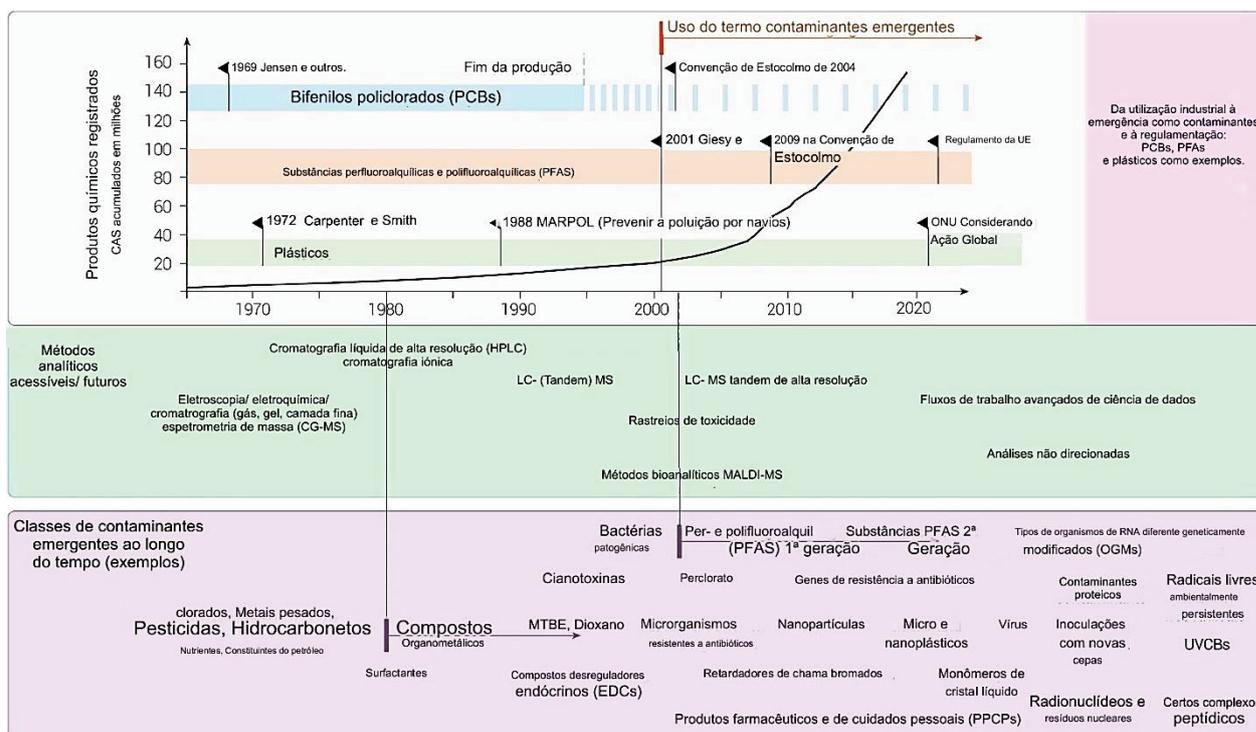


Figura 1 O progresso dos contaminantes emergentes em relação aos avanços na detecção de substâncias químicas potencialmente prejudiciais ao ambiente e ecossistemas. Esse progresso é atribuído a uma capacidade aprimorada de detecção de contaminantes inorgânicos e orgânicos em níveis de traços, além de uma compreensão mais profunda de seus impactos no ecossistema e na saúde. Adaptado de WANG et al., 2024.

A maioria dos contaminantes emergentes é de natureza orgânica, embora alguns pesquisadores também incluam nanopartículas inorgânicas (VÉLEZ et al., 2019). Esses compostos podem ser categorizados como medicamentos, produtos de higiene pessoal, filtros UV, compostos perfluoro alquílicos, plastificantes, hormônios, drogas ilícitas, aditivos alimentares, metabólitos, retardadores de chama, pesticidas, estimulantes e nanopartículas, entre outros. Os produtos farmacêuticos geralmente entram em sistemas aquáticos por meio das águas residuais, após serem consumidos por humanos e animais e serem excretados como compostos parentais ou metabólitos. Estes contaminantes considerados emergentes, não tem um aporte legislativo e assim, estas ocorrências não estão incluídas nos monitoramentos rotineiros gerando assim o potencial de causar perturbações ecológicas e efeitos na saúde humana (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017; VÉLEZ et al., 2019; CHAVES et al., 2023).

Os contaminantes emergentes foram detectados e quantificados recentemente graças ao desenvolvimento de novas técnicas analíticas sensíveis e mais sofisticadas. Na literatura, também são utilizadas as seguintes terminologias para se referir aos CEs: poluentes emergentes, micropoluentes, microcontaminantes e microcontaminantes de interesse emergente (FARTO et al., 2021; OLIVEIRA, GUILLEN E SILVA, 2022).

Diante da recente detecção, cresceram as preocupações à cerca dos CEs e qual o impacto que os mesmos poderiam causar na população e meio ambiente. Até o momento, não há uma legislação específica sobre estes contaminantes, ainda que tenham sido incorporados em listas de substâncias prioritárias elaboradas pela União Europeia e pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US-EPA). Estes compostos foram inseridos nestas listas de substâncias de prioridade, pela ocorrência de impactos adversos em organismos não alvo, sendo que alguns possuem potencial para atuar desregulando o sistema endócrino e causando problemas de fertilidade, malformação e alterações no metabolismo principalmente de espécies aquáticas (GUTIÉRREZ-NOYA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2024).

Além disso, no ano de 2022, a União Europeia propôs a alteração de três diretivas. A Diretiva-Quadro da Água (DQA, Diretiva 2000/60), a Diretiva das Águas Subterrâneas (DQA, Diretiva 2006/118/CE) e a Diretiva sobre Normas de Qualidade Ambiental (EQSD, Diretiva 2008/105/CE), relativas a normas de qualidade, gestão e proteção da água. As alterações propostas pela União Europeia visam atualizar, melhorar e integrar ainda mais as políticas de gestão da água, incluindo 68 novas substâncias prioritárias, ajuste de limites de concentração com base em novas evidências científicas e a implementação de novas estratégias de monitoramento e gestão. As substâncias incluídas nesta proposta de alteração incluem microplásticos, pesticidas, produtos farmacêuticos e o grupo das substâncias perfluoroalquiladas (PFAS) (EUROPEAN COMMISSION, 2022; BACKHAUS, 2023).

A nível nacional, a legislação relativa aos contaminantes emergentes é escassa. A regulamentação do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 430/2011 estabelece apenas os padrões de qualidade para o lançamento de efluentes, sem oferecer uma definição ou padronização específica para contaminantes emergentes. Além disso, a retirada desses contaminantes normalmente não é eficaz por meio dos métodos convencionais em estações de tratamento de água como lodo ativado, filtração, e desinfecção particularmente em países em desenvolvimento (DUARTE et al., 2023; PURI, GANDHI e KUMAR, 2023).

Ainda, os estudos para definição de índices residuais aceitáveis destas substâncias também são escassos, aumentando a dificuldade e a demora para regulação destes. A maior fonte de descarte dos contaminantes emergentes é a rede de esgoto e, levando em conta que no Brasil grande parte do esgoto não é tratado e que, mesmo realizando os tratamentos ainda é difícil retirar estes compostos da água, ocorre então o acúmulo gradual dos contaminantes emergentes em corpos e reservas hídricas, entrando posteriormente em contato com a população (STARLING, AMORIM e LEÃO, 2019; OLIVEIRA, GUILLEN E SILVA, 2022).

Em 2021 entrou em vigor a Portaria Nº 888, do Ministério da Saúde, que introduziu novos paradigmas sobre o tema. A Portaria estabelece padrões de potabilidade da água para consumo humano e, ainda que seja limitada, aborda e incorpora alguns contaminantes emergentes. E assim, torna-se um marco regulatório, visto que não há outras legislações e normas anteriores para a questão dos contaminantes emergentes no país (BRASIL, 2021).

De acordo com Oliveira, Guillen e Silva (2022), a Portaria Nº 888 é de extrema relevância, pois institui o tratamento jurídico em torno dessas substâncias emergentes, cujos estudos estavam anteriormente restritos a ambientes acadêmicos e atividades relacionadas à defesa do meio ambiente. Diante disso, é de suma importância regularizar e impor limites e parâmetros que estejam alinhados com a realidade da sociedade contemporânea.

Considerando que esses contaminantes são de difícil detecção e tratamento, acumulam-se cada vez mais no meio ambiente e causam diversos problemas à saúde e aos ecossistemas, como aumento da resistência bacteriana, alterações do sistema endócrino causada pela interação dos contaminantes com receptores hormonais, contaminação das águas e do solo entre outros, torna-se fundamental investir em técnicas capazes de detectar precocemente e tratar corretamente esses poluentes.

2.2 Contaminantes emergentes e a capacidade de desregulação endócrina

O interesse científico em produtos químicos desreguladores endócrinos (EDCs) tem crescido ao longo dos últimos anos, tendo sua preocupação marcada por Roy Hertz em 1958, quando notou e sugeriu que certos produtos químicos utilizados na criação de bois e vacas em confinamento poderiam, ao ser absorvidos pelo organismo, “imitar” a atividade dos hormônios (MODICA, BENEVENTO e COLAO, 2023). No entanto, depois disso pouco progresso foi feito até o ano de 1970. Foi neste ano que médicos e pesquisadores descobriram que o dietilestilbestrol (um estrogênio sintético), que já havia sido administrado para milhões de mulheres com a finalidade de redução de abortos espontâneos, aumentava a incidência de um tumor raro em mulheres ainda jovens e também induzia anomalias no trato reprodutivo em homens expostos. E com isso foi sugerido um possível mecanismo estrogênico desses compostos, contribuindo para a formação de tumores, o que preocupou então as autoridades e os fez abordar este tema como sendo uma classificação específica (MODICA, BENEVENTO e COLAO, 2023).

Os desreguladores endócrinos (EDCs) compreendem um grande número de produtos químicos que são bastante heterogêneos, tendo sua exposição ocorrendo diariamente por diferentes vias como a inalação, ingestão (sendo esta uma das mais importantes), contato direto (via cutânea) e dispersos no solo e corpos hídricos, afetando assim, a função do sistema endócrino dos animais e seres humanos (BURKS

et al. 2017; METCALFE et al., 2022; MACEDO et al., 2023). Eles são caracterizados como substâncias exógenas com capacidade de interferir na síntese e metabolismo, transporte, ligação aos receptores específicos, eliminação ou secreção de hormônios, o que acaba resultando no mau desenvolvimento, disfunções na reprodução, infertilidade, problemas no desenvolvimento, e desordens imunológicas e neurológicas (ADHIKARI et al., 2023).

Os EDCs mais comuns abrangem compostos fenólicos, podem ser encontrados em inseticidas, pesticidas (como o DDT, por exemplo), retardantes de chama, produtos químicos usados na indústria, hormônios, metais, plastificantes, produtos de higiene pessoal, medicamentos, entre outros (METCALFE et al., 2022; NIU et al., 2024; MACEDO et al., 2023). Esses compostos são amplamente distribuídos no ambiente e as técnicas para detectar os mesmos incluem principalmente espectrometria de massa, métodos cromatográficos, métodos eletroquímicos e colorimétricos. Alguns EDCs são lipofílicos e ao serem ingeridos por humanos através da cadeia alimentar, acumulam-se no tecido adiposo (NIU et al., 2024).

Desreguladores endócrinos podem ter como mecanismo de ação a capacidade de inibem ou ativam a ação hormonal ao se ligarem a receptores, modulando a biossíntese do hormônio e até mesmo ativando outros fatores de transcrição (BURKS et al., 2017). A maioria dos desreguladores endócrinos, sejam eles de fontes naturais ou sintéticas, apresentam estruturas semelhantes às dos hormônios endógenos, como estradiol (E2) ou andrógeno. Em consequência disso, eles tendem a interferir nas ações dos hormônios esteróides ao se ligarem aos receptores hormonais correspondentes (AHN e JEUNG et al., 2023).

No corpo humano, circulam baixas concentrações de hormônios e a exposição a compostos que desregulam a função do sistema endócrino, mesmo que em afetando muito pouco essas concentrações, provoca efeitos significativos nas funções fisiológicas e biológicas, devido a acréscimos ou reduções de hormônios. Um dos mecanismos mais relatados para os desreguladores endócrinos é a capacidade de “mimetizar” o hormônio estrogênio. Portanto, não é surpresa que esses compostos impactem tecidos sensíveis ao estrogênio, como o sistema reprodutor feminino (BURKS et al., 2017; GOGOLA, HOFFMANN e PTAK, 2019).

Embora os desreguladores endócrinos atuem através de receptores hormonais nucleares, evidências recentes indicam que os mecanismos pelos quais esses

compostos operam são muito mais amplos do que originalmente reconhecido (HUANG et al., 2020). Estudos demonstraram que, além de modificar a sinalização dos receptores nucleares, estes compostos podem atuar através de receptores não esteróides, coativadores transcricionais, vias enzimáticas envolvidas na biossíntese e no metabolismo de esteróides, ainda, alterar o sistema endócrino, contribuir para o desenvolvimento de câncer, alterar função da tireóide, alterações no metabolismo, na obesidade, na função cardiovascular e também na reprodução, além de afetar diretamente a expressão de diferentes genes (LOPEZ-RODRIGUEZ et al., 2021; AHN e JEUNG et al., 2023).

La Merrill et al. (2020) identificaram as dez principais características dos compostos desreguladores endócrinos, através de uma ampla revisão de literatura científica (Figura 2).

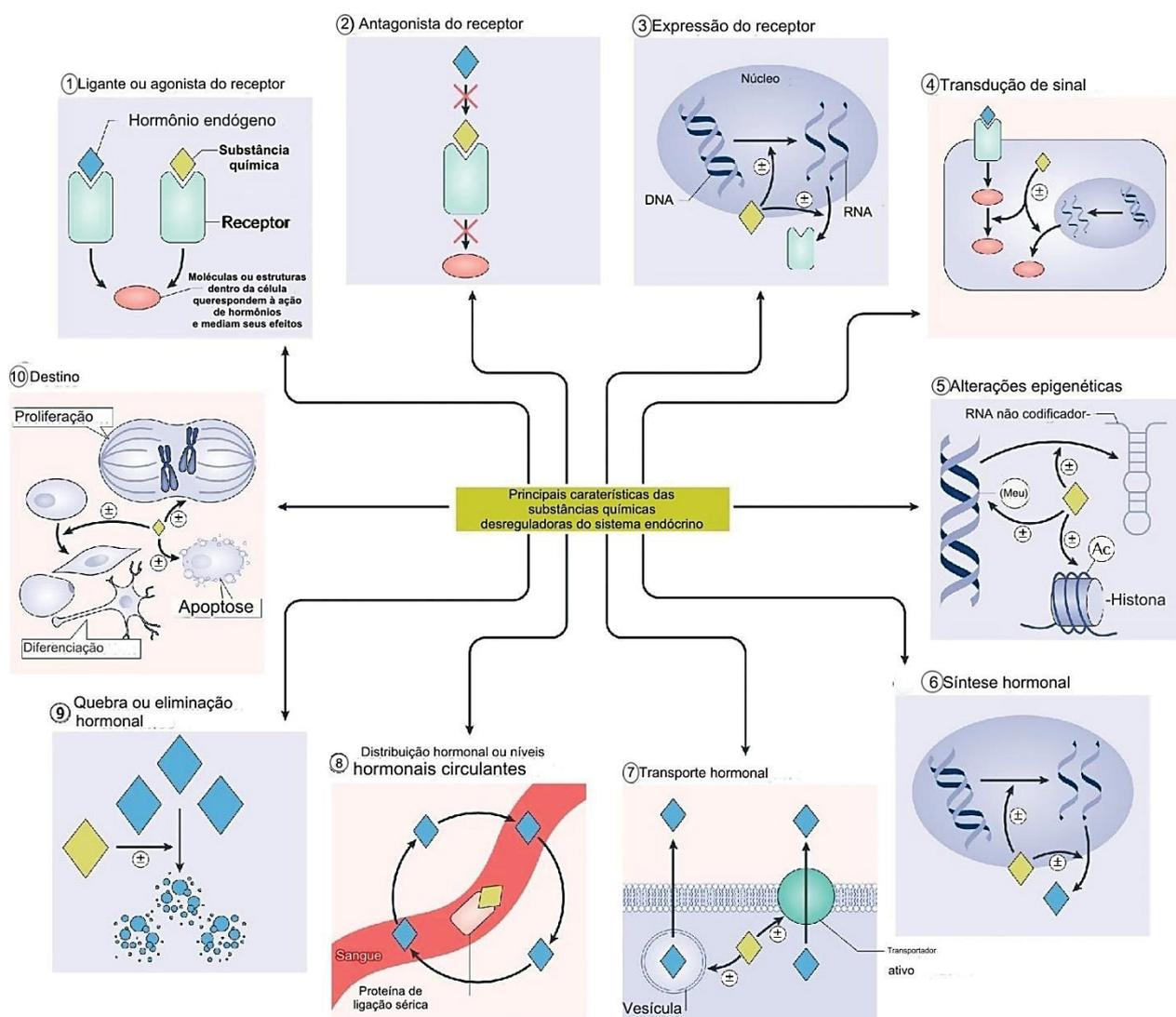


Figura 2 . Principais características de compostos com capacidade de desregulação endócrina. 1- um composto desregulador do sistema endócrino pode interagir ou ativar receptores hormonais. 2- o composto pode antagonizar receptores hormonais. 3- um composto desregulador do sistema endócrino pode modificar a expressão dos receptores hormonais. 4- alterar a transdução de sinal em células que respondem a hormônios. 5- indica que o composto pode induzir modificações epigenéticas nas células. 6- modificação da síntese hormonal. 7- influencia no transporte hormonal através das membranas celulares. 8- alteração da distribuição ou dos níveis circulantes de hormônios no sangue. 9- influencia no metabolismo ou eliminação dos hormônios. 10- os compostos podem modificar o destino de células produtoras ou que respondem a hormônios. Adaptado de (LA MERRILL et al., 2020).

Um exemplo de composto que é amplamente utilizado e que causa interações hormonais é o Bisfenol A (Bpa). Este, pode interagir com os receptores ER α e ER β , assim como o GPER, receptor de hormônio tireoidiano e AR, ativando a transcrição em células sensíveis ao estrogênio. Desta forma, ele provoca múltiplos efeitos em diversas espécies (LA MERRILL et al., 2020).

Presume-se que os compostos químicos desreguladores endócrinos, desempenhem um papel na origem do câncer de mama, tanto através de mecanismos de promoção quanto no desenvolvimento da glândula mamária. Desreguladores endócrinos, sendo eles estrogênicos ou não, são considerados como tendo papéis fundamentais no surgimento do câncer de mama (PIEROZAN e KARLSSON, 2018). Portanto, a pesquisa desses compostos em produtos comerciais e na poluição é considerada uma prioridade.

Como já mencionado, são diversos os tipos de compostos que são considerados desreguladores endócrinos. Tendo em torno de 1.480 substâncias que se enquadram nesta classificação e muitos destes também são considerados poluentes orgânicos persistentes (POPs), levantando ainda mais as preocupações sobre os efeitos a longo prazo, tanto na saúde da população, quanto com o meio ambiente (MODICA, BENEVENTO e COLAO, 2023; MACEDO et al., 2023).

2.3 Poluentes orgânicos persistentes (POPs)

Os contaminantes orgânicos persistentes (POPs) são produtos químicos à base de carbono, que são de forma contínua lançados no meio ambiente. Estes, são

tóxicos, bioacumulativos e altamente resistentes à degradação ambiental e à degradação metabólica, por meio de processos químicos, biológicos e fotolíticos (ARIENZO, 2023; NIU et al., 2024).

Os POPs possuem alto potencial para sofrer transporte de longo alcance e em geral suas fontes são descritas como primárias e secundárias. As fontes primárias são provenientes da produção ou o uso direto destes compostos, como por exemplo a aplicação deles na agricultura. A fonte de emissão secundária consiste no deslocamento destes compostos para estratos distintas, como o ar, solo e água, sendo o ar a maior fonte de distribuição dos POPs pelo meio ambiente, podendo se espalhar globalmente e chegando a áreas remotas (LI et al., 2024).

A Convenção de Estocolmo foi o principal tratado com o objetivo restringir ou até mesmo proibir o uso, produção e emissão de alguns poluentes orgânicos persistentes, entrando em vigor em 2004 (AKINRINADE et al., 2024). Em 2019, a União Européia reformulou o Regulamento N.º 850/2004, relativa a poluentes orgânicos persistentes entrando em vigor o Regulamento 1021/2019, com medidas mais rígidas no que tange os poluentes persistentes (EUROPEAN COMMISSION, 2019). Já no Brasil, a legislação que trata da implementação da Convenção de Estocolmo sobre Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) no Brasil é o Decreto nº 5.472, de 20 de junho de 2005 (BRASIL, 2005).

Essas regulamentações vêm com o objetivo de minimizar o uso e a emissão destes compostos, pois com o aumento das atividades industriais e agrícolas, ocorreu uma crescente produção e emissão dos poluentes no meio ambiente, principalmente os poluentes orgânicos persistentes e como esses possuem como características a bioacumulação, capacidade de transformação e persistência no meio ambiente e em organismos vivos, com o passar do tempo tornaram-se uma ameaça para o meio ambiente, saúde da população, fauna e flora (MISHRA et al., 2022; MATEI et al., 2023).

Os poluentes orgânicos persistentes, são divididos em grupos e os principais são os pesticidas, produtos químicos da indústria e subprodutos industriais (que não são gerados intencionalmente) e, por último, os produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais. No grupo dos pesticidas, enquadram-se os organoclorados, muito utilizados na agricultura e que mesmo com seu banimento ainda são encontrados no solo, água de rios, sedimentos, fauna aquática e ar. Já os produtos produzidos na indústria e seus subprodutos incluem os compostos poliperfluorados, éteres difenílicos

polibromados (PBDEs), substâncias perfluoroalquílicas e polifluoroalquiladas, bifenilas polibromados (PBBs), metais pesados, bifenilas policlorados (PCBs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, hexaclorobenzenos (HCBs), dibenzo-p-dioxina policlorada e dibenzofurano policlorado (PCDD/PCDF) e naftalenos policlorados (RAMÍREZ-MORALES et al., 2021; MISHRA et al., 2022; ALSHEMMARI et al., 2023; ARIENZO et al., 2023).

Os produtos farmacêuticos como o norfloxacino, carbamazepina, diclofenaco e ibuprofeno também estão incluídos como poluentes persistentes e ainda, um grupo de corantes orgânicos também faz parte destes, como é o caso do azul de metileno e laranja de metila (NAGHDI et al., 2023). Todos esses poluentes representam riscos para os componentes bióticos de cada nível trófico, tendendo a biomagnificar em concentrações elevadas nos organismos que ocupam os níveis tróficos mais altos na cadeia alimentar (NAGAR et al., 2023).

Poluentes orgânicos persistentes podem causar danos graves à saúde da população, como por exemplo, interferir no sistema endócrino e causar distúrbios hormonais e reprodutivos, deficiências neurocomportamentais, deficiências congênitas, distúrbios de imunodeficiência, desenvolvimento e progressão do câncer. Estes comprometimentos fisiológicos são provenientes de interações que os poluentes fazem com diversas macromoléculas biológicas, como a expressão de diversos genes e ainda, desencadear a ativação ou inativação de cascatas de sinalização distintas e que são cruciais para o funcionamento celular (ROSENFELD e COOKE, 2019; GILEADI et al., 2021; NAGAR et al., 2023).

Alguns compostos químicos atualmente em uso podem interferir em mecanismos que influenciam processos celulares como proliferação, migração, invasão e capacidade de sobrevivência celular, aumentando assim, a progressão tumoral. Diversos fatores extrínsecos e intrínsecos podem estar associados ao surgimento e à progressão do câncer, incluindo a influência de substâncias tóxicas (STEIL et al., 2022).

2.4 Poluentes selecionados para o estudo

2.4.1 Ácido Perfluorooctanóico (Pfoa)

O ácido perfluorooctanóico (Pfoa) é um produto químico sintético que possui uma cadeia perfluorooctanóica de oito carbonos com grupo funcional ácido carboxílico

(Figura 3), que é um subproduto industrial da fabricação de polímeros comerciais (LIU et al., 2023). Embora o Pfoa seja alvo de uma vigilância e regulamentação rigorosa, ele é detectado como poluente primário em águas superficiais, sendo encontrado no soro humano em concentrações de 4 ng/mL (0,01 µM) a 22 µg/mL (53 µM). Atualmente é classificado como possível carcinógeno humano (grupo 2B) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (WANG et al., 2024).

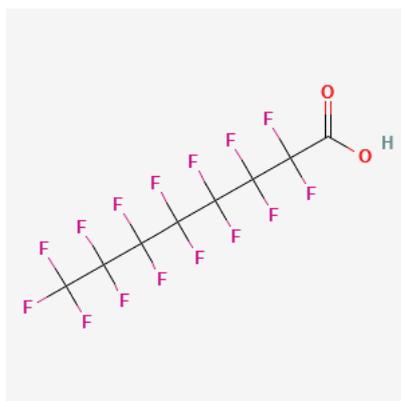


Figura 3. Estrutura química do composto Pfoa. FONTE: PUBCHEM (2024). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Perfluorooctanoic-acid#section=2D-Structure>

O Pfoa é amplamente utilizado em produtos industriais e de consumo por suas características como resistência a manchas e repelência à água, sendo encontrado em painéis antiaderentes, cosméticos, estofados, e como produto final da degradação de muitos compostos derivados de flúor. Além disso, pode bioacumular nas cadeias alimentares (PIEROZAN, JERNEREN E KARLSSON, 2018; SAKAI et al., 2022; QU et al., 2023). No entanto, atualmente, sua utilização é limitada pela regulamentação de Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) proveniente da Conferência de Estocolmo. Ainda, este composto é conhecido por levar a uma variedade de disfunções no organismo, principalmente desregulação do sistema endócrino, afetando o equilíbrio do estrogênio no organismo e aumento dos riscos de desenvolvimento e progressão de câncer de mama, incluindo cânceres de mama negativos para receptor de estrogênio (LI et al., 2018; PIEROZAN, JERNEREN E KARLSSON, 2018; MANCINI et al., 2020; SAKAI et al., 2022).

Além do Pfoa estar relacionado com o câncer e outras doenças, ele pode passar da mãe para o feto através do sangue do cordão umbilical. Oh e colaboradores (2022) encontraram uma associação entre as concentrações de Pfoa no sangue do cordão umbilical e as funções cognitivas em crianças de 4 a 40 meses, sugerindo que

o composto pode causar impactos negativos na saúde durante o desenvolvimento fetal. Estudos com modelos animais indicam que o Pfoa é absorvido por exposição oral, inalatória e cutânea e as doses de menor efeito adverso observado correspondem a níveis séricos de 20–51 µg/mL (48–123 µM) em ratos e de 10–14 µg/mL (24–33,8 µM) em camundongos (FUJIWARA et al., 2023).

2.4.2 Bisfenol A (Bpa)

O bisfenol A (Bpa) é um composto sólido incolor que possui dois anéis fenólicos conectados por uma ponte metílica, com dois grupos funcionais metílicos ligados (Figura 4) (MURATA e KANG, 2018).

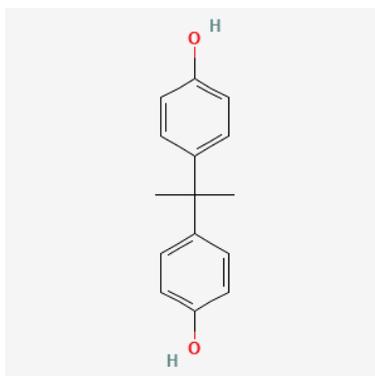


Figura 4. Estrutura química do composto Bpa. FONTE: PUBCHEM (2024). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol-A>

Largamente utilizado na produção de policarbonato e revestimentos de resina epóxi, o Bpa está presente em diversos produtos de consumo, como embalagens de alimentos, revestimentos de latas, garrafas plásticas, materiais odontológicos, como selantes e mamadeiras. Ainda, é utilizado como agente estabilizador em produtos como o PVC (cloreto de polivinila) e papel térmico (POLLACK et al., 2015; WANG et al., 2023; TORRES-ALAMILLA et al., 2023; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2024). E, segundo Ma e colaboradores (2019), as ligações éster que unem os monômeros favorecem uma hidrólise parcial quando expostas ao calor ou ambientes ácidos, o que facilita a liberação de Bpa no meio ambiente. Devido a esta hidrólise, ocorre a liberação do Bpa no ambiente e exposição de pessoas ao composto, sendo pela inalação, ingestão ou contato com a pele (ENGIN E ENGIN, 2021; LI et al., 2023). Há estimativas de liberação do Bpa para o ambiente, em cerca de 400 000 toneladas

anuais, impactando diversas esferas, como por exemplo o solo e a água (AKKUS e CEYLAN, 2023). Este composto é considerado um desregulador endócrino, ou seja, ele interage com os receptores hormonais, e alguns estudos pré-clínicos já evidenciaram que a exposição ao Bpa aumenta o risco de desenvolvimento de câncer, principalmente de mama (STILLWATER et al., 2020; KWON, 2022).

Considera-se que o Bpa é consumido diariamente com alimentos, e a exposição do organismo humano ao Bpa pela via trófica foi estimada em 0,48 a 1,6 ug / kg / dia. Na urina de gestantes norueguesas, foram encontrados níveis de 4,5 ug / dm³. Já em habitantes da Holanda (2,5 ug / dm³), Bélgica (2,55 ug / dm³) e EUA (3,9 ug / dm³), os níveis na urina são um pouco menores. O que não se observa na urina de bebês prematuros, onde uma análise realizada, mostrou níveis alarmantes de Bpa (30 ug / dm³). No sangue, os dados mostram níveis em torno de 1 ug / dm³ a 4 ug / dm³. Ainda, a detecção no leite variou de 1,1 a 3,4 ug / dm³, no tecido da placenta (1–104 ug / kg) e tecido adiposo 3,16 ug / kg (MICHAŁOWICZ, 2014).

2.4.3 Metoxicloro (Mtx)

O metoxicloro é um inseticida empregado em atividades agrícolas, pecuária, jardins e em animais de estimação. Esse pesticida organoclorado passou a ser amplamente utilizado após a proibição do diclorodifeniltricloroetano (DDT) e tem em sua estrutura química dois anéis aromáticos ligados a átomos de cloro e grupos metoxi (Figura 5).

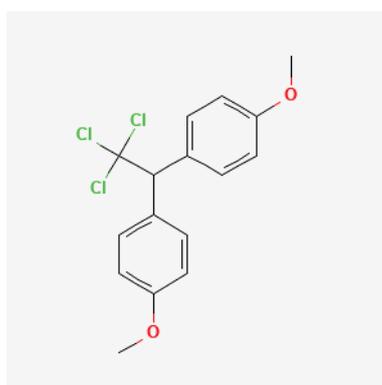


Figura 5. Estrutura química do composto Mtx. FONTE: PUBCHEM (2024). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methoxychlor>

Atualmente, seu uso agrícola está proibido devido à sua elevada toxicidade, capacidade de bioacumulação e ação como desregulador endócrino (CHEN, 2014; CHENG et al., 2019). Sabe-se que o Mtx atua como agonista nos receptores de estrogênio além de funcionar como antagonista do receptor de andrógeno, o que confere a este composto a característica de desregulação endócrina (MARTINI et al., 2020).

Não está presente naturalmente no ambiente. A maior parte da liberação ocorre devido à aplicação em florestas, plantações e animais de criação. Nas áreas agrícolas e florestais, ele é aplicado por pulverização aérea, o que pode contaminar solos e fontes de água próximas. As chuvas e a neve facilitam a sedimentação do metoxicloro no solo de forma mais rápida (ATSDR, 2002). Embora o Mtx seja menos persistente no ambiente que o DDT, ainda existem preocupação com a presença de seus resíduos no solo e nos sedimentos (KIM, et al., 2014). Foi encontrado em tecidos como a placenta e tecido adiposo e em fluidos como leite materno e soro (Botella et al., 2004; Shen et al., 2007). É capaz de bioacumular e persistir no ambiente, sendo encontrado no solo, em plantas e animais, na água e ar (Witek et al., 2021).

Devido ao fato de ter sido amplamente utilizado nas atividades agrícolas e possuir a característica de persistência, há registros da presença deste composto no leite materno e tecidos humanos, inclusive, após um considerável intervalo sem uso. Ainda, a contaminação por Mtx ocorre, em sua maioria, por ingestão, sendo ele absorvido no trato gastrointestinal e, posteriormente, metabolizado no fígado, seguindo uma via de destoxificação (ELDAKROORY et al., 2017; KAO et al., 2019; MARTINI et al., 2020). Estudos indicam que o sistema reprodutivo é um dos principais alvos do Mtx em todas as fases de desenvolvimento, sugerindo seu papel como desregulador endócrino com efeitos negativos na fertilidade (CHENG et al. 2019). Ele também é capaz de estimular a proliferação de células MCF7 ao aumentar a expressão de genes que favorecem o ciclo celular e ao reduzir a expressão de genes antiproliferativos, especialmente aqueles que influenciam o ciclo celular (LEE et al., 2012).

Já é de conhecimento que os compostos organoclorados possuem uma predisposição para bioacumulação no tecido adiposo devido ao fato de serem lipossolúveis, levando ao aumento das concentrações encontradas em seres humanos e oferecendo um risco significativo à saúde pública (ELDAKROORY et al. 2017).

2.4.4 2,4-Dihidroxibenzofenona (Benzofenona 1/ Bp1)

A 2,4-Dihidroxibenzofenona possui como estrutura dois anéis aromáticos ligados por um grupo carbonila (Figura 6).

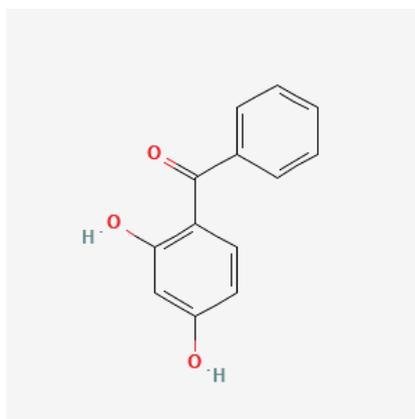


Figura 6. Estrutura química do composto Bp1. FONTE: PUBCHEM (2024). https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-Dihydroxybenzophenone

As benzofenonas (BP) são filtros orgânicos que possuem a capacidade de absorver raios UVA, UVB ou ambos, reduzindo os danos causados pelos mesmos. São amplamente encontradas em produtos cosméticos, como protetores solares e produtos de cuidado para proteção da pele que possuem a finalidade de proteger contra danos ou envelhecimento induzidos pela luz UVA e UVB (IN et al., 2015; LOCATELLI et al., 2019). São igualmente usadas para evitar a degradação dos polímeros plásticos pela luz. Por serem lipofílicas, as BP têm uma alta capacidade de absorção pela pele e de bioacumulação (IN et al., 2015).

Devido a capacidade que as BP possuem de penetrar as barreiras da pele e entrar no corpo, cresce as preocupações acerca do assunto, pois cada vez mais são utilizados produtos que têm estes compostos químicos em sua composição. E, além disso, as BP possuem a capacidade de interagir com o sistema endócrino e, portanto, são desreguladores endócrinos (PARK et al. 2013).

As BP vêm ganhando destaque devido à presença de resíduos em ambientes aquáticos, decorrente de atividades recreativas ou também do tratamento e remoção ineficiente que ocorre nas estações de tratamento de esgoto (ZOU, et al. 2021). E, com o fato de que a exposição humana ocorre em grandes quantidades e através de diversos produtos, principalmente os produtos de beleza e protetores solares, a Bp1

pode ser detectada na urina, sangue e leite materno (RODRÍGUEZ-GÓMEZ et al., 2014; GAO et al., 2015; ZHAO et al., 2017).

Estudos *in vitro* e *in vivo* realizados com as benzofenonas 1, 2 e 3 (Bp1, Bp2 e Bp3) mostram que as mesmas apresentam atividades estrogênicas e antiandrogênicas, exercendo efeitos semelhantes ao estrogênio (SUZUKI et al., 2005; YAMASAKI et al. 2003; ORAL et al., 2020; CARSTENSEN et al., 2022) e promovendo a migração e invasão de linhagens celulares de tumor de mama (ALAMER e DARBRE, 2017).

2.5 O câncer

O câncer é considerado uma das quatro principais causas de mortes prematuras a nível global, sendo a segunda principal causa de óbitos no Brasil, configurando-se como um sério problema de saúde pública devido à sua alta prevalência, e afetando negativamente a expectativa de vida (BRASIL, 2021). No ano de 2022, foram registrados em torno de 20 milhões de casos de câncer no mundo, levando a um número de óbitos de 9,7 milhões (BRAY et al. 2024). O câncer refere-se, na verdade, a um amplo conjunto de doenças, cada uma delas com características fundamentais que envolvem alterações no comportamento celular normal, sendo marcadas pela perda dos mecanismos habituais de controle biológico (COMPTON, 2020).

As origens do câncer são complexas e envolvem fatores distintos, sendo eles, biológicos, químicos, físicos, estresse psicológico, genéticos e ambientais. Embora ainda não sejam totalmente compreendidas, pode-se dizer que o componente ambiental se sobressai quando em comparação aos outros fatores, como, por exemplo, o hereditário. Inicialmente no desenvolvimento do câncer, ocorre a proliferação descontrolada de células anormais, que formam um tumor. Muitas dessas células acabam disseminando por meio dos vasos sanguíneos e linfáticos, atingindo outros órgãos (Figura 7). Os tumores são ecossistemas organizados de forma espacial e são compostos por diferentes tipos de células, onde cada uma é capaz de adotar uma variedade de fenótipos, definidos pela coexpressão de várias proteínas (KEREN et al., 2018; DARBRE, 2021; ZHENG, 2022; CLUSAN, 2023; KHAN et al., 2022).

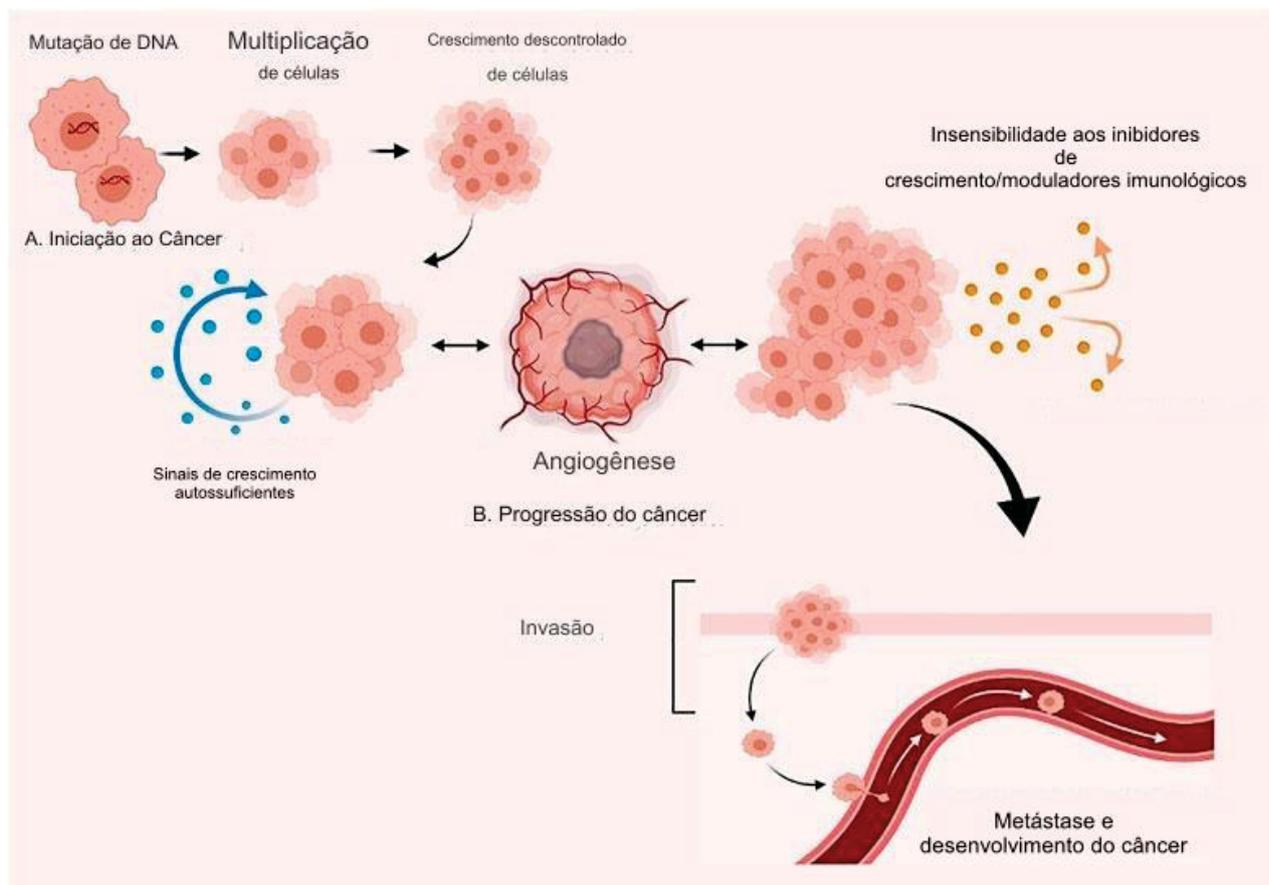


Figura 7. Processo de carcinogênese, nesta imagem dividido em três fases principais: iniciação, progressão e desenvolvimento do câncer. Geralmente causada por mutações em genes específicos que regulam o controle da proliferação, diferenciação e sobrevivência das células. Essas etapas refletem o desenvolvimento gradual de um câncer, desde a mutação inicial até o surgimento de tumores secundários e a resistência aos mecanismos normais de controle de crescimento e imunidade. Adaptado de: CHAUDHRY et al. (2022).

O câncer é caracterizado por elementos bem definidos, como mutação, seleção e deriva genética. Este processo depende da interação entre células individuais, o microambiente e o sistema imunológico, que podem promover ou suprimir o crescimento tumoral. Em muitos tipos de câncer, a oncogênese ocorre junto com o acúmulo de mutações, o que pode conferir uma vantagem seletiva às células cancerosas, aumentando sua adaptação ao microambiente e a modificação de seu comportamento (GATENBY e BROWN, 2017; CHEN e MELLMAN, 2017; KEREN et al., 2018; ZAHIR et al., 2020).

O crescimento e disseminação do tumor é favorecida pela angiogênese, um processo no qual ocorre a formação de novos vasos sanguíneos que são frequentemente imaturos, irregulares e permeáveis, o que facilita a entrada de células

tumorais na circulação sanguínea e linfática, promovendo sua disseminação. Com isso, a chance destas células atingirem outros órgãos e estabelecerem metástases, aumenta. As metástases constituem um problema preocupante nas taxas de sobrevivência de pacientes com câncer pelo fato de serem uma das principais causas do fracasso das terapias (IARC, 2008; KLEIN, 2020; FARES et al., 2020).

Conforme já mencionado, vários fatores podem influenciar no desenvolvimento de tumores, e um dos mais preocupantes é a exposição a fatores ambientais. Esta exposição ocorre de diversas formas, contudo, um dos principais mecanismos é a exposição a contaminantes químicos, que ocorre diariamente, seja pelo leite materno, cordão umbilical, ingestão, inalação e contato com a pele. Através de mecanismos bioquímicos e moleculares distintos como alteração na proliferação das células, alterações epigenéticas, estresse oxidativo, instabilidade genômica, entre outros, a exposição aos produtos químicos pode desencadear a formação dos tumores (OPA, 2018; SARPA e FRIEDRICH, 2022; SMITH et al. 2016).

Em razão do aumento significativo na incidência e mortalidade relacionadas ao câncer, o conhecimento sobre agentes carcinogênicos tem sido o foco de numerosos estudos. Se a população estivesse bem ciente dos riscos da exposição aos compostos considerados carcinogênicos e limitasse esta exposição, cerca de 30% dos casos de câncer poderiam ser evitados (BALWIERZ et al., 2023). Segundo Ferlay e colaboradores (2021), países que são mais desenvolvidos, apresentam uma incidência de câncer superior ao que se observa em países ainda em desenvolvimento.

2.6 O câncer de mama

O câncer de mama é o tipo mais comum de câncer diagnosticado em mulheres e a principal causa de mortalidade entre os cânceres. Apesar dos avanços na detecção e tratamento, o número de casos continua a aumentar anualmente. O câncer de mama ficou em segundo lugar no ranking mundial em 2022 como um dos mais incidentes (11,6%) tendo mais de 2 milhões de casos relatados. As estatísticas apontam que até 2030, serão mais de 2,7 milhões de novos casos por ano de câncer de mama (ŁUKASIEWICZ et al., 2021; WANG et al., 2023; NOLAN, LINDEMAN e VISVADER, 2023; BRAY et al., 2024).

A incidência do câncer de mama é influenciada por uma combinação de fatores genéticos e ambientais. Alguns dos fatores ambientais são a idade, histórico reprodutivo (como primeira menstruação, gravidez e menopausa), terapia hormonal pós-menopausa, obesidade, hábitos de vida (tabagismo e consumo de álcool), exposição à radiação, alta densidade mamária e a presença de alterações histológicas, como hiperplasia atípica, embora alguns desses fatores possam também estar associados a uma predisposição genética (NOLAN, LINDEMAN e VISVADER, 2023; OMS, 2024, OBEAGU e OBEAGU, 2024).

Ainda que seja considerado como uma doença que afeta predominantemente mulheres com mais idade (acima de 50 anos), alguns diagnósticos ocorrem em mulheres com idades menos avançadas e muitos destes casos, a forma como o câncer se apresenta é mais agressiva e com piora no prognóstico (JAIN et al., 2022).

Em tecido saudável, o epitélio glandular da mama é constituído de dois tipos celulares, podendo ser as células luminais ou células basais. As células basais estão em contato direto com a membrana basal e possuem características mais parecidas com a musculatura lisa; já as células luminais, possuem características de células epiteliais polarizadas. Receptores hormonais, como os receptores de estrogênio e progesterona, normalmente são mais expressos em células luminais. Já as células basais possuem uma expressão maior de citoqueratinas, caderinas e marcadores relacionados ao músculo liso (PELLACANI et al., 2019; CLUSAN et al., 2023).

Os principais métodos de tratamento para o câncer de mama incluem intervenções cirúrgicas, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapias alvo e imunoterapia. A variação biológica do câncer de mama impacta tanto seu comportamento clínico quanto a eficácia das diferentes abordagens terapêuticas. A maioria dos casos de câncer de mama pertence ao subtipo luminal, caracterizado pela presença de receptores de estrogênio e progesterona. Assim, a terapia hormonal é a estratégia mais empregada nesse subtipo, atuando ao bloquear as vias de produção hormonal, reduzir a disponibilidade de hormônios naturais ou inibir os receptores hormonais na superfície das células. No entanto, com o tempo, as células cancerosas acabam desenvolvendo resistência a esses tratamentos hormonais (WAKS e WINER, 2019; MIRET et al., 2023; OLAYIWOLA e GOLLAHON, 2024; KHAN et al., 2024).

Pelo fato de o câncer de mama possuir alta heterogeneidade, acaba por ser uma doença bem distinta, geneticamente e epigeneticamente (DAI, et al. 2017), possuindo, além da classificação histológica e da classificação de Nottingham, outros

parâmetros importantes para a sua classificação e dentre estes está a classificação molecular (ROY et al., 2023). Conforme Shaath, Elango e Alajez (2021), as classificações moleculares são com base na expressão imuno-histoquímica de receptores hormonais, podendo ser receptor hormonal positivo (ER+ e PR+), receptor de fator de crescimento epidérmico humano positivo (HER2+) e triplo-negativo (TNBC), que não expressa qualquer um dos receptores (Figura 8) (SHAATH, ELANGO e ALAJEZ, 2021).

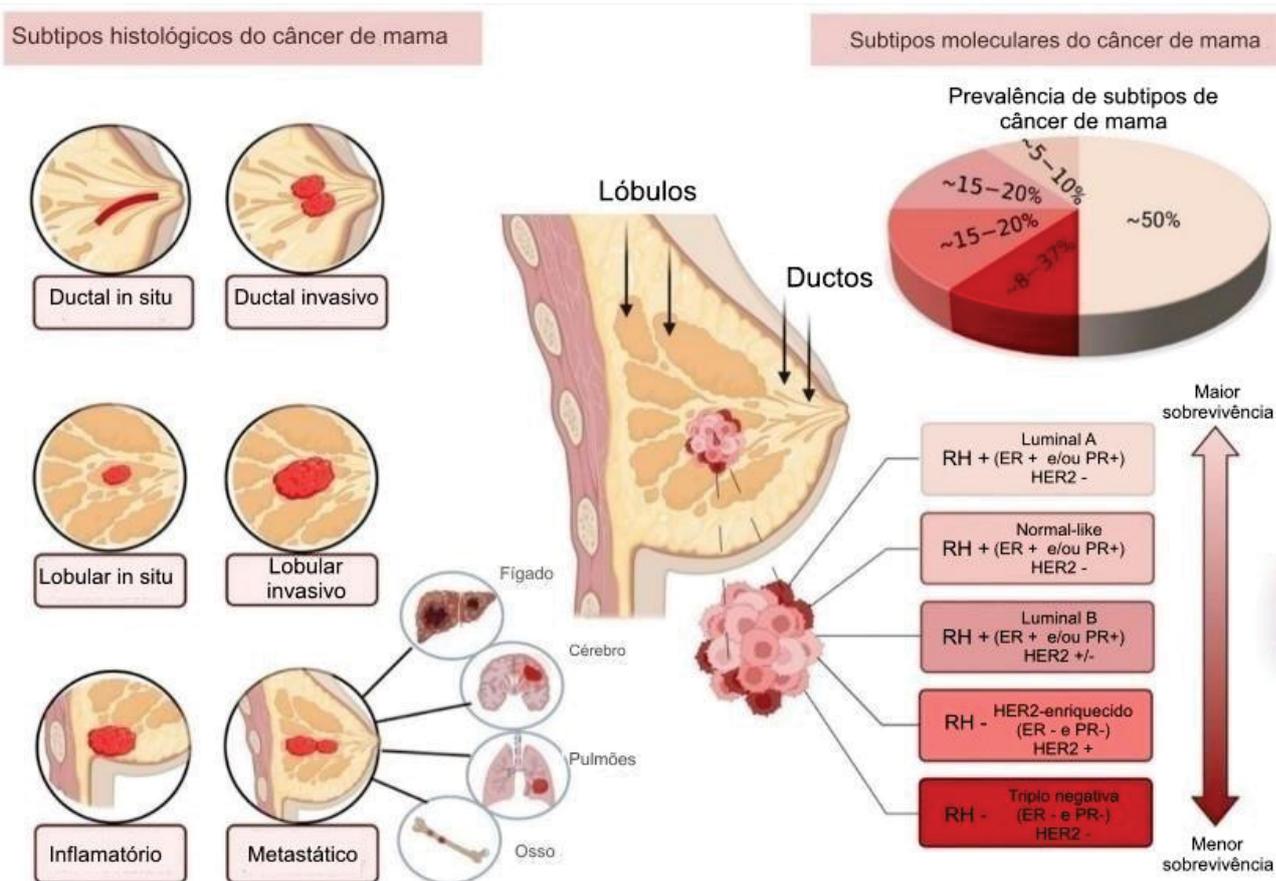


Figura 8. Subtipos moleculares e histológicos do câncer de mama, destacando suas características, prevalência e relação com a taxa de sobrevivência. **Subtipos Histológicos de Câncer de Mama:** DCIS - Carcinoma Ductal in Situ: tipo não invasivo que se desenvolve nos ductos mamários. Carcinoma Ductal Invasivo: tipo invasivo que se origina nos ductos e tem potencial para invadir tecidos adjacentes. Carcinoma Lobular in Situ: tipo não invasivo localizado nos lóbulos mamários. Carcinoma Lobular Invasivo: tipo invasivo que se origina nos lóbulos e pode se espalhar para outras partes do corpo. Câncer de Mama Inflamatório: um tipo raro e agressivo de câncer de mama que causa inflamação. Câncer de Mama Metastático: câncer de mama que já se espalhou (metástase) para órgãos distantes, como fígado, cérebro, pulmões e ossos. **Subtipos Moleculares de Câncer de Mama:** Os subtipos moleculares são classificados com base em marcadores hormonais e proteínas, como os receptores de estrogênio (ER), progesterona (PR) e HER2. Esses subtipos influenciam o prognóstico e a resposta ao tratamento, podendo ser luminal A, normal-like, luminal B, HER2-enriquecido e triplo negativo. **Distribuição e Sobrevivência:** O gráfico de pizza na imagem ilustra a prevalência dos subtipos de câncer de mama. A seta ao lado dos subtipos moleculares indica uma relação entre a classificação

molecular e a taxa de sobrevivência, com os subtipos Luminal A tendo uma maior taxa de sobrevivência e o subtipo triplo negativo estando associado a uma menor taxa de sobrevivência. Adaptado de: SARVARI et al. (2022).

O receptor de estrogênio e progesterona são marcadores de diagnóstico crucial, uma vez que a maioria dos carcinomas da mama apresentam uma expressão significativamente elevada destes e estão associados com um prognóstico mais favorável (ORRANTIA-BORUNDA et al., 2022; LANDEROS, CASTILLO e PÉREZ-CASTRO, 2023). Os subtipos intrínsecos, compreendem os tumores Luminal A, Luminal B, superexpressão da proteína HER2, basais e normais. Cerca de 70-75% dos tumores de mama são classificados como luminal A e B e são receptores hormonais positivos respondendo bem a terapias endócrinas. Em torno de 20% dos tumores possuem superexpressão de HER2, são negativos para os receptores hormonais (ER e PR), sendo agressivos e com prognóstico e resposta ruins à quimioterapia, porém respondendo bem a drogas que bloqueiam a atividade do HER. Já os triplos-negativos são considerados basais e representam 10-15% do total, sendo um desafio clínico, devido ao fato de não responderem às terapias endócrinas padrões (PROVENZANO, ULANER e CHIN, 2018; NASCIMENTO e OTONI, 2020; LANDEROS, CASTILLO e PÉREZ-CASTRO, 2023; POMMERENKE et al., 2024). Um dos mecanismos mais citados para os desreguladores endócrinos é sua capacidade de "mimetizar" o hormônio estrogênio e por conta disso, é comum que eles afetem tecidos sensíveis aos hormônios como os encontrados na mama (BURKS et al. 2017; GOGOLA, HOFFMANN e PTAK, 2019).

Acredita-se que produtos químicos com atividade hormonal possam desempenhar um papel na origem do câncer de mama, tanto através de mecanismos de promoção quanto ao influenciar o desenvolvimento da glândula mamária. Desreguladores endócrinos sendo eles estrogênicos ou não estrogênicos, são considerados como tendo papéis críticos na carcinogênese da mama humana (PIEROZAN e KARLSSON, 2018).

O tratamento da maior parte dos cânceres de mama é hormonal, baseado na presença ou ausência dos receptores, e a interação dos compostos químicos com estes receptores pode alterar a capacidade de efluxo de drogas, gerando uma quimiorresistência e dificultando o tratamento (CAO et al., 2021; KANNAMPUZHA e GOPALAKRISHNAN, 2023). Ainda outras características essenciais das células podem ser alteradas, como proliferação, migração, capacidade de sobrevivência e

invasão, contribuindo para a progressão tumoral. Estudar a interação desses compostos com linhagens de células tumorais de mama é fundamental para identificar as possíveis mudanças na evolução do tumor. Diante da grande heterogeneidade do processo de carcinogênese, diversos estudos utilizam modelos *in silico* e *in vitro* para avaliar a interação entre compostos químicos e linhagens celulares.

2.7 Emprego de modelos *in vitro* e *in silico* na toxicologia celular

A exposição a contaminantes ambientais representa uma preocupação crescente para a saúde pública e o meio ambiente, exigindo métodos eficazes de avaliação de seus efeitos (SHARMA et al. 2019). Nesse contexto, os testes *in vitro* e *in silico* têm ganhado destaque como ferramentas fundamentais para investigar a toxicidade e o impacto desses contaminantes.

A toxicologia cada vez mais se afasta do uso de modelos animais para investigar a interação de compostos químicos. Contudo, métodos de avaliação *in vitro*, também possuem suas limitações, tais como complexidade dos tecidos e processos fisiológicos e patológicos que ocorrem em animais e humanos, e por isso é necessário para estes tipos de estudos chegar o mais próximo possível das interações que acontecem no organismo vivo (BLAAUBOER, 2017; WANG et al., 2024).

As estratégias para a análise de compostos químicos devem englobar diversas metodologias e a combinação de testes *in vitro* e *in silico* proporciona uma abordagem integrada e sinérgica. Juntas, essas metodologias impulsionam o progresso na toxicologia, aprofundando o entendimento sobre os riscos dos contaminantes e auxiliando na elaboração de políticas públicas e regulamentações de segurança mais eficazes e fundamentadas cientificamente (MOSCHEM E GONÇALVES, 2022).

As linhagens celulares vêm sendo largamente utilizadas em estudos que visam investigar o desenvolvimento e progressão tumoral, sendo um instrumento útil e eficaz para realização de estudos que visam verificar a ação e efeitos de contaminantes químicos (PRASAD et al., 2023). Em contraste com o cultivo primário de células, as linhagens celulares contínuas possuem suprimento ilimitado e podem ser facilmente manipuladas e propagadas (POMMERENKE et al., 2024). As principais vantagens dos modelos *in vitro* do uso de células de uma única linhagem e fora do ambiente do organismo que não pode ser bem controlado, é a capacidade de controlar bem o tempo de exposição, as condições de cultura e o espaço de realização dos

experimentos, além da capacidade de controlar as variáveis experimentais de forma independente (SEARSON, 2023).

Além dos modelos *in vivo* e *in vitro*, bastante utilizados nas pesquisas de toxicologia celular, os modelos computacionais *in silico* vêm ganhando bastante espaço, devido ao fato da tecnologia computacional ter avançado e criado interfaces mais fáceis de entender e utilizar, e a extensa disponibilidade de informações em bancos de dados que auxiliam nas modelagens (GELLATLY e SEWELL, 2019). Depois de criado, o modelo pode ser usado para prever resultados em diversos âmbitos da pesquisa, permitindo a modelagem molecular de diferentes formas, bem como testar ideias que seriam difíceis ou impossíveis de testar *in vivo* ou *in vitro*. É possível identificar como moléculas interagem com organismos vivos, encontrando relações entre a estrutura química do composto e sua interação em uma área ou molécula específica, por exemplo genes e proteínas (ALVES, STREIT e PIZZOLATO, 2023; YUSUF, 2023).

Os modelos de bioinformática utilizam de diferentes métodos e ferramentas, como encaixe molecular, triagem virtual, simulações de dinâmica molecular e modelagem quantitativa de relação estrutura-atividade, possibilitando que os pesquisadores prevejam as ligações que podem ocorrer entre o composto a ser estudado e os alvos selecionados (RUDRAPAL, KHAIRNAR e JADHAV, 2020; MUSHEBENGE et al., 2023). Os métodos *in silico* estão alinhados com os princípios dos 3Rs, diminuindo a necessidade de utilizar animais em experimentos e contribuindo para o desenvolvimento de práticas de pesquisa sustentáveis (PASTORINO, PREARO e BARCELÓ, 2024). Como pode ser visto na Figura 9, os modelos *in silico* apresentam vantagens e desvantagens.



- eficiência de tempo e de custos
- identificação precoce de perigos potenciais
- triagem de alto rendimento
- previsão do modo de ação
- avaliação de segurança em estágio inicial
- integração e mineração de dados

MÉTODOS IN SILICO



- requisitos de recursos computacionais
- complexidade do modelo
- interações e sinergias
- condições ambientais dinâmicas
- problemas de validação

Figura 9. Vantagens e desvantagens dos métodos de pesquisa *in silico*. Os métodos *in silico* na pesquisa toxicológica trazem várias vantagens, incluindo economias substanciais de tempo e custo em comparação com as abordagens experimentais tradicionais. Eles permitem a triagem em larga escala de muitos produtos químicos ou compostos, ajudando a identificar riscos potenciais de maneira antecipada. Além disso, modelos computacionais fornecem informações sobre os mecanismos de ação de substâncias tóxicas, detalhando os processos moleculares e celulares envolvidos em seus efeitos. Esses métodos são especialmente úteis para avaliações iniciais de segurança de compostos químicos, pois facilitam a integração de diferentes tipos de dados. Apesar de serem ferramentas promissoras para modelagem preditiva em diversas áreas científicas, os métodos *in silico* possuem algumas limitações. Eles podem apresentar dificuldades em replicar com precisão condições ambientais variáveis, e sua aceitação regulatória exige validações rigorosas que comprovem sua confiabilidade e capacidade preditiva. Adaptado de: PASTORINO, PREARO e BARCELÓ (2024).

Devido a possuir algumas desvantagens, os resultados precisam ser validados com outros modelos, como experimentos *in vitro*, por exemplo. O intuito dos modelos *in silico* é melhorar a compreensão e ajudar a projetar estudos de toxicologia usando informações existentes em bancos de dados, auxiliando em uma triagem mais precisa de alvos e acelerando as tomadas de decisões acerca das pesquisas (KAR e LESZCZYNSKI, 2019; RIM, 2020; JEYASINGH e JOSEPHINE, 2024).

2.8 Linhagens celulares empregadas no estudo

As linhagens de câncer de mama são consideradas modelos *in vitro* apropriados para uma variedade de pesquisas. Existem várias linhagens contínuas de células mamárias, cada uma com características próprias e distintas. No presente

trabalho, foram utilizadas as linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e a linhagem de epitélio mamário não tumoral MCF10-A.

2.8.1 Linhagem MCF-7

A linhagem MCF-7 (Figura 10) foi estabelecida na Fundação do Câncer de Michigan em 1973 (FLODROVA et al. 2016). Possuem uma morfologia semelhante às células epiteliais e as monocamadas possuem formas tridimensionais com colônias geralmente arredondadas (KENNY et al., 2007).

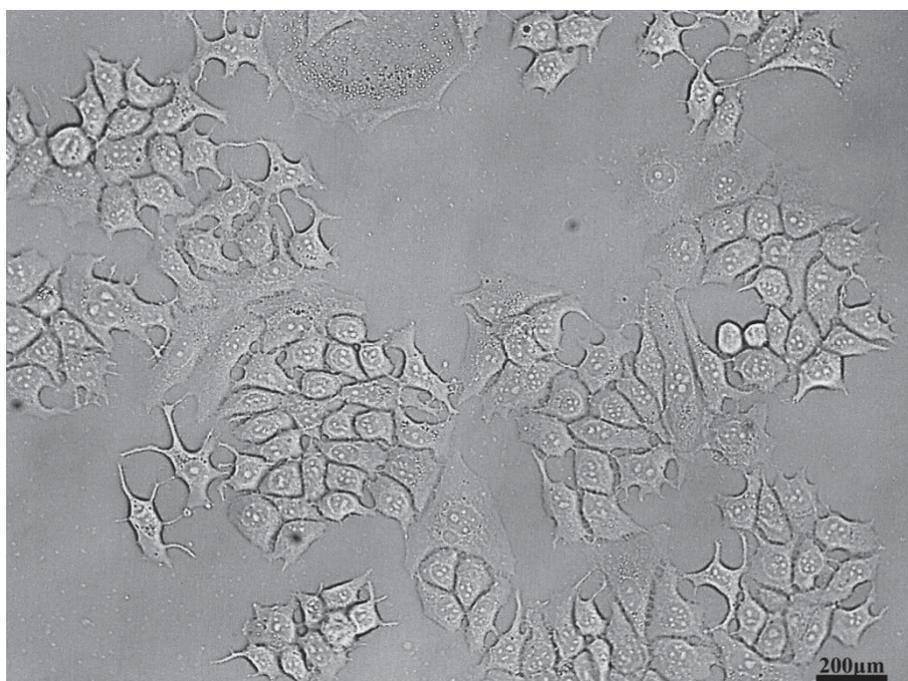


Figura 20. Linhagem MCF-7. FONTE: (A autora, 2024).

A MCF-7 é uma linha celular de câncer de mama frequentemente utilizada como modelo em investigações de câncer de mama em todo o mundo, derivada de adenocarcinoma maligno em um derrame pleural. A linhagem retêm várias características do epitélio mamário, expressa marcadores do fenótipo epitelial luminal e é usada como modelo para tumores positivos para receptor de estrogênio, pois processa estrogênio, na forma de estradiol, por meio dos receptores de estrogênio do citoplasma das células. Caracteriza-se como receptor hormonal positivo (ER+ e PR+), pouco agressiva, possui como uma de suas características, a baixa migração e invasão (MLADKOVA et al., 2010; CAMARILLO et al., 2014; COMSA,

CÎMPEAN e RAICA, 2015). O tempo de duplicação da linhagem MCF-7 é em torno de 29 horas (BCRJ, 2024).

2.8.2 Linhagem MDA-MB-231

A linha celular MDA-MB-231 é uma linhagem celular epitelial de câncer de mama humano que foi estabelecida a partir de um derrame pleural de uma mulher caucasiana de 51 anos com adenocarcinoma mamário metastático. Amplamente utilizada em laboratórios de pesquisa médica, esta linhagem é negativa para os receptores hormonais (ER, PR, HER2), além da E-caderina e expressa p53 mutada, apresentando-se como um bom modelo de câncer de mama triplo negativo (TNBC) (WELSH, 2013; WITT e TOLLEFSBOL, 2023). Além de ser negativa para os receptores hormonais, esta linhagem não expressa marcadores epiteliais, mas apresenta um nível alto de expressão de vimentina, um marcador do fenótipo mesenquimal (MLADKOVA et al., 2010). Possui projeções estreladas que frequentemente conectam múltiplas colônias de células (Figura 11) (KENNY et al, 2007).



Figura 11. Linhagem MDA-MB-231. FONTE: (A autora, 2024).

2.8.3 Linhagem MCF10-A

Em 1990, o estudo de Soule e seus colaboradores (1990) estabeleceu uma linhagem celular espontaneamente imortalizada, a MCF10, que viria a catalisar importantes avanços na pesquisa sobre o câncer de mama ao longo das décadas. A partir disso, foram estabelecidas outras linhagens parentais, uma delas a MCF10-A (Figura 12) que é uma linhagem celular epitelial não tumoral que não expressa receptores de estrogênio. Foi isolada da glândula mamária de uma mulher branca de 36 anos, pré-menopausa, com mamas fibrocísticas. Esta linhagem é amplamente utilizada *in vitro* possibilitando diversas descobertas na biologia das células epiteliais mamárias normais, além de revelar mudanças essenciais que ocorrem durante a progressão para a malignidade (WANG e SCHULTZ, 2014; QU et al. 2015; PULEO e POLYAK, 2021; ATCC, 2024). Neve e colaboradores (2006) demonstraram que a linhagem MCF10-A exibem um fenótipo basal e possui ainda, algumas características semelhantes a linhagens de câncer mesenquimal. Ainda, expressam p53 normalmente e não formam colônias celulares (IMBALZANO et al., 2009).



Figura 12. Linhagem MCF10-A. FONTE: (A autora, 2024).

A derivação espontânea das linhagens imortalizadas MCF10 e consequentemente da linhagem parental MCF10-A foi um marco, representando a primeira ocasião em que células epiteliais de mama normais foram cultivadas a partir

do tecido livre de lesões, tanto malignas como benignas. Ainda, estas células conseguiram se manter em cultura sem modificações genéticas ou químicas (PULEO e POLYAK, 2021). O tempo de duplicação das células MCF10-A é de aproximadamente 48 horas (GAJEWSKI et al. 2007).

2.9 Relevância deste estudo

O câncer de mama atualmente é o tipo de câncer mais diagnosticado e que mais atinge mulheres em todo o mundo. São vários os fatores que podem influenciar no surgimento e desenvolvimento do câncer de mama, como fatores genéticos e ambientais, sendo que em torno de 10% destes são causados por predisposições genéticas e a grande maioria fica condicionado a fatores ambientais, como alcoolismo, tabagismo, obesidade, dieta, exposições ambientais a produtos químicos, entre outros (MICHAELS, WORTHINGTON e RUSIECKI, 2023; PANIS e LEMOS, 2024).

As exposições da população a contaminantes ambientais são uma grande preocupação e um problema de saúde pública que toma grandes proporções. Muitos destes compostos orgânicos são considerados de preocupação emergente e são encontrados em diversos locais, como o solo, o ar e principalmente a água em concentrações muito baixas. Como a utilização destes compostos aumentou muito ao longo dos anos pelas indústrias e também na agropecuária, cresceu também a eliminação e a exposição da população aos mesmos, pois na maioria das vezes, o descarte destes contaminantes ambientais é incorreto, o que faz com que ocorra a propagação dos mesmos. Muitos destes compostos são utilizados pela população diariamente, incluindo alguns compostos que são considerados poluentes orgânicos persistentes como os pesticidas, substâncias perfluoroalquílicas, plastificantes, produtos de higiene pessoal, medicamentos, adoçantes artificiais, corantes alimentícios e outros (SELWE et al., 2022; SINGH, SINGH e MISHRA, 2024; MARUMURE et al., 2024).

Alguns destes contaminantes emergentes possuem a capacidade de interagir com o sistema endócrino, "mimetizando" alguns hormônios, desregulando e causando alterações e problemas para os organismos vivos, pois podem interferir na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou eliminação dos mesmos (PAMPLONA-SILVA et al., 2018; SOUZA, MOUNTEER e ARCANJO, 2024). E isso

fez com que estes compostos fossem visados e aumentasse o interesse da comunidade científica em estudar o potencial cancerígeno dos mesmos, porém a maioria desses trabalhos utiliza concentrações mais altas daquelas que são encontradas no ambiente ou em concentrações fisiológicas e o tempo de exposição é mais curto.

Estudos toxicológicos com a finalidade de testar concentrações ambientalmente relevantes de contaminantes emergentes são de grande importância, principalmente no âmbito da saúde pública e devem ser desenvolvidos e explorados, principalmente se tratando de exposições mais longas e com concentrações mais baixas destes compostos. Em sua maioria os trabalhos procuram efeitos carcinogênicos de compostos químicos (HUANG et al. 2015; LECOMTE et al. 2017; SWEENEY et al. 2015; KOUAL et al. 2020) e atualmente ainda são poucas as pesquisas que visam verificar o efeito de produtos químicos sobre a mudança fenotípica e progressão tumoral (DE ALMEIDA ROQUE et al. 2023; STEIL et al. 2022; MANUITT-BRITO et al. 2020; DE SOUZA SALGADO et al. 2018; MARCHI et al. 2021; MARCHI et al. 2024) e levando em conta um contexto de exposição prolongada a contaminantes emergentes, essa abordagem é significativa para avaliar os efeitos na perspectiva de tratamento de pacientes com câncer de mama.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Investigar se contaminantes químicos são capazes de modular o fenótipo das células tumorais MCF-7, MDA-MB-231 e da linhagem de células de epitélio normal de mama MCF10-A, afetando parâmetros celulares importantes para sobrevivência, estabelecimento de metástases e resistência ao tratamento com quimioterápico.

3.2 *Objetivos específicos*

- I. Selecionar quatro contaminantes químicos para o estudo através de uma abordagem *in silico*;
- II. Verificar os efeitos dos contaminantes em células que apresentam diferentes graus de malignidade - células normais (MCF10A), tumorais pouco invasivas (MCF7) e muito invasivas (MDA-MB231) - para determinar os modelos em que os efeitos são mais expressivos;
- III. Avaliar alterações celulares importantes para o crescimento tumoral (proliferação e formação de colônias), formação de metástases (migração e invasão) e resistência a quimioterápicos (atividade de transportadores de efluxo de drogas) em decorrência da exposição aos contaminantes;
- IV. Avaliar o efeito dos contaminantes sobre a expressão de genes que relacionados à progressão tumoral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos contaminantes e molecular docking

Os poluentes foram escolhidos após uma triagem de informações provenientes da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e com base em referências bibliográficas. Inicialmente, foram analisados artigos acadêmicos que abordaram os efeitos de poluentes químicos em células de câncer de mama, ovário e próstata, focando em processos críticos para a progressão do câncer, como crescimento celular, movimento e invasão celular, expulsão de medicamentos, transição epitelial-mesenquimal e expressão de moléculas essenciais, tais como metaloproteinases da matriz e seus inibidores, além de proteínas reguladoras do ciclo celular. Os termos-chave utilizados na pesquisa foram: "poluentes orgânicos", "contaminantes emergentes", "câncer de mama", "crescimento celular" "progressão tumoral", entre outros. Inicialmente, foram identificados 23 compostos químicos com base em seus efeitos em células tumorais, sendo posteriormente refinados para os 10 mais promissores, considerando sua relevância (importância biológica, consistência e impacto dos efeitos sobre o câncer) segundo os dados. Em especial, os estudos de KIM et al., 2014, 2015; LEE et al., 2012; PARK et al., 2013; LI et al., 2018; ZHANG et al., 2014, 2019 forneceram informações importantes para a seleção desses compostos.

Na etapa seguinte, foram realizados cálculos de ancoragem molecular entre os 10 compostos químicos selecionados (triclosan, octilfenol, Mtx, Bp1, endossulfan, Bpa, lindano, hexaclorobenzeno, Pfoa e paration) e o modelo cristalográfico de 32 proteínas, obtido do banco de dados Protein Data Bank (PDB), utilizando o software AutoDock Vina (TROTT e OLSON, 2010). Estas proteínas foram selecionadas com base no seu papel na progressão do tumor e em processos importantes para o câncer, como pode ser visto na Tabela 2.

A seleção dos compostos para os experimentos *in vitro* foi realizada através de um rastreamento molecular com parâmetros definidos utilizando as ferramentas AutoDock (MORRIS et al., 2009). As afinidades foram selecionadas com base em MONTES- GRAJALES et al. (2020), utilizando o valor de corte de -7,0 kcal/mol, que representa aproximadamente 95% da especificidade. Com base nas melhores pontuações de

ligação, ou seja, valores superiores a -7,0 kcal/mol (ligação de alta afinidade), foram selecionados quatro compostos para este estudo (Pfoa, Bpa, Mtx e Bp1).

4.2 Cultura das células

Foram utilizadas duas linhagens distintas de células de câncer de mama humano, a MCF-7 e a MDA-MB-231, e uma linhagem de células mamárias normais, a MCF10-A.

As células MCF-7 foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,01 mg/mL de insulina humana, 40 mg/mL de gentamicina. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 40 mg/mL de gentamicina, conforme orientações do ATCC (American Type Culture Collection) e BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro).

As células MCF10-A foram adquiridas no Banco de células do Rio de Janeiro. Foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) / F12 (Ham's Nutrient Mixture) na proporção 1:1 com 2,5 mM de L-glutamina, 5% de soro de cavalo, 10 µg/mL de insulina humana, 0,5 µg/mL de hidrocortisona, 10 ng/mL de EGF e 100 ng/mL de toxina da cólera e 40 mg/mL de gentamicina. As linhagens celulares foram mantidas a 37 °C em incubadora com atmosfera umidificada e 5% de CO₂, conforme orientações do ATCC (American Type Culture Collection) e BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro).

Os subcultivos foram realizados a cada 4 dias, após tripsinização das células (Tripsina-EDTA (0,5%), 15400054 Thermo Fisher), centrifugação (123 g) e em seguida, o plaqueamento das células.

4.3 Preparo dos contaminantes

Os contaminantes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (95-99% de pureza, Pfoa: 171468-5G, Bpa: 239658-50G, Mtx: 36161-100MG, Bp1: 126217-100G) e, em seguida, foram preparadas soluções estoque, diluídas em DMSO (dimetilsulfóxido) (concentradas 2000x) e armazenadas em vidros âmbar a -20°C. A partir destes estoques, foram feitas soluções de uso (concentradas 500x) diluídas em PBS e DMSO, e depois adicionadas ao meio de cultura suplementado utilizado para expor

as células (concentração final de DMSO no meio de cultura = 0,05%).

4.4 Seleção das concentrações dos contaminantes

Para a escolha das concentrações dos contaminantes, previamente selecionados por meio de pesquisa bibliográfica e docagem molecular, foi realizada inicialmente uma revisão de artigos científicos que testaram esses mesmos compostos em células tumorais e também foram considerados dados de bioacumulação e concentração plasmática dos contaminantes em humanos, a fim de testar se concentrações que de fato podem ocorrer em populações humanas e ainda utilizando dados coletados na bibliografia científica (MONROY et al., 2008; LEE et al., 2012; ARBUCKLE et al., 2013; HANSSEN et al., 2013; LEE et al., 2013; LIEN et al., 2013; PARK et al., 2013; MICHAŁOWICZ, 2014; KIM et al., 2014; ZHANG et al., 2014, KIM et al., 2015; LUO et al., 2017; CABRERA-RODRÍGUEZ et al., 2018; LI et al., 2018; ZHANG et al., 2019).

Foram feitos testes de viabilidade e densidade celular, utilizando a linhagem MCF-7, pois até o momento deste teste, esta era a única que linhagem que tínhamos expandido. As mesmas foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de $1,5 \times 10^4$ por poço e expostas a concentrações distintas no período de 24 horas. Após o período de exposição, realizou-se os ensaios de viabilidade celular (vermelho neutro, MTT e cristal violeta) e leitura de absorbância em leitor Varioksan Lux Termo Scientific. Como houve demora na aquisição do contaminante Benzofenona-1, realizaram-se os testes de viabilidade somente com o Pfoa, Bpa e Mtx. Após a chegada do composto, realizou-se a triagem através da literatura e foram selecionadas duas concentrações que apareciam em todos os artigos selecionados sendo estas, 1 e 10 μM .

4.5 Delineamento experimental

Após o plaqueamento e com o objetivo de estabilização das células estas foram mantidas condições ideais por 24 horas em cultura. Em seguida, as células foram expostas a diferentes concentrações de contaminantes em um período de 24 horas ou 15 dias.

E no caso da exposição de 15 dias, os subcultivos foram realizados a cada 4-5 dias. A exposição foi realizada através da substituição do meio de cultura por novo

meio contendo as mesmas suplementações empregadas na manutenção das células, exceto pela presença do contaminante a ser testado.

Para o experimento de 24 horas, as células foram semeadas em placas de cultura e cultivadas durante 24 horas para adesão e recuperação completa, e então expostas através da substituição do meio e adição do contaminante pelo período de 24 horas. Para o ensaio 15 dias, 8×10^4 células foram semeadas em frascos de cultura de 25 cm² durante 24 horas para adesão e recuperação completa e depois expostas aos contaminantes. Nos dias 4, 8 e 12 após o plaqueamento, as células foram tripsinizadas e transferidas para novos frascos de cultura com meio fresco contendo os poluentes. No 15º dia após o primeiro plaqueamento (ou seja, após 14 dias de exposição), as células foram tripsinizadas, semeadas em frascos adequados (placas de 6, 24 e 96 poços ou frascos de 25 cm²) de acordo com o ensaio a ser efetuado, e cultivadas com meio de cultura sem contaminante durante 24 horas para uma adesão completa das células. Em seguida, as células foram expostas durante mais 24 horas aos compostos químicos no meio de cultura, completando os 15 dias de exposição, e finalmente utilizadas para os ensaios. Em ambas os experimentos, um grupo de controle sujeito aos mesmos procedimentos, exceto pela presença dos poluentes, foi mantido em paralelo (Figura 13).

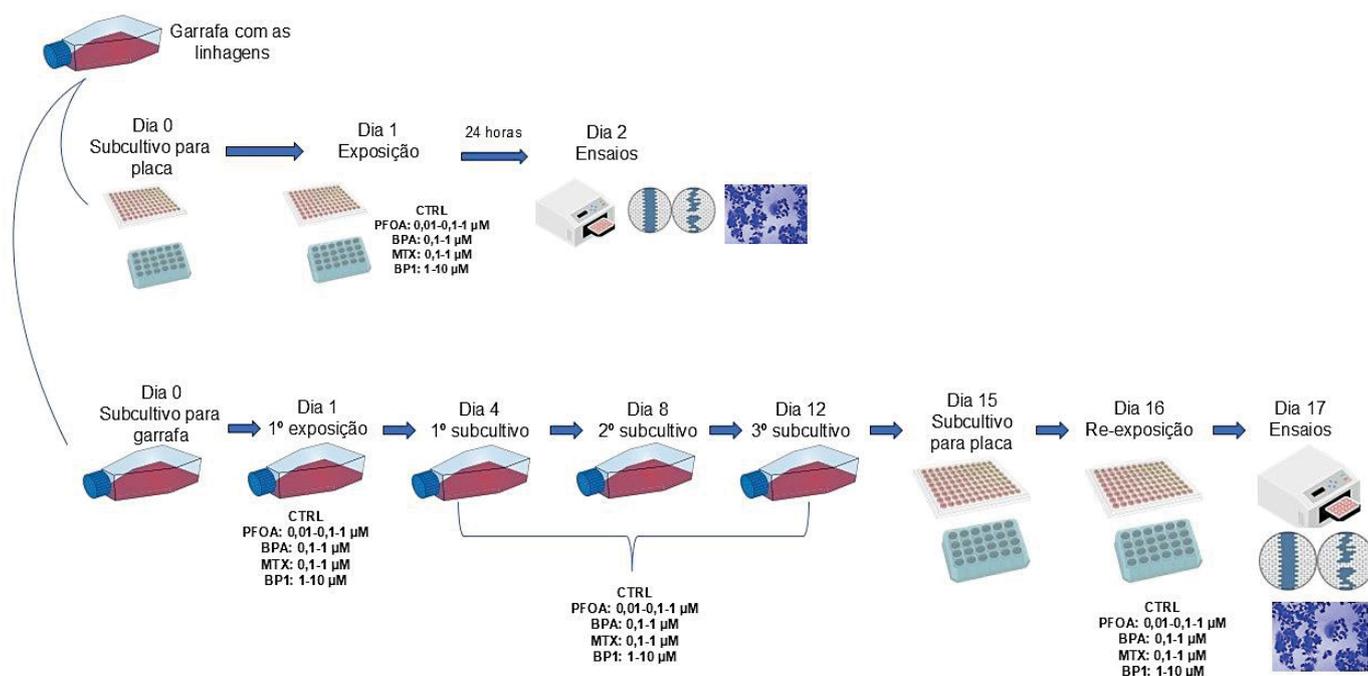


Figura 13. Esquema dos experimentos de exposição por 24 h e 15 dias. Primeiramente, as linhagens são cultivadas em garrafas de cultivo de células, no dia do plaqueamento estas linhagens são passadas para garrafas (no caso da exposição de 15 dias) e placas para os ensaios de 24 horas. No caso da exposição de 24 horas, as células são expostas aos contaminantes e no dia seguinte os ensaios são realizados. A exposição de 15 dias, tem 3 subcultivos, com troca de meio e contaminantes. No dia 15 (que é o dia 14 da exposição), as células são plaqueadas para a realização dos ensaios e re-expostas aos contaminantes para fechar os 15 dias de exposição. FONTE: (A autora, 2024).

4.6 Ensaios de densidade e viabilidade celular

As células foram subcultivadas em placas de 96 poços na densidade de $1,5 \times 10^4$ por poço. Após 24 horas (para adesão das células), foram expostas aos contaminantes (experimento de 24 horas) e re-expostas (experimento de 15 dias). Então, os ensaios de citotoxicidade e viabilidade foram realizados. As células foram incubadas com meio de cultura fresco (livre de soro fetal bovino-SFB) contendo os corantes específicos de cada ensaio.

4.6.1 Retenção do vermelho neutro

As células foram incubadas com corante vermelho neutro (Sigma-Aldrich, ref. N4638) ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e mantidas sob incubação a 37°C em incubadora com atmosfera umidificada e 5% de CO_2 por 2 horas. Após esse período, as células foram submetidas a duas lavagens com PBS, sendo na sequência adicionados $100 \mu\text{L}$ da solução de extração (composição: $49,5 \text{ mL}$ de H_2O ultrapura; $49,5 \text{ mL}$ etanol PA e 1 mL de ácido acético glacial) e aguardado repouso de 15 min. Após, realizou-se a homogeneização do conteúdo dos poços e aguardou-se mais 5 min para então realizar a leitura de absorbância a 540 nm em leitor Varioskan Lux Termo Scientific (ATES et al., 2017; ROQUE et al., 2023).

4.6.2 Metabolismo do MTT

As células foram incubadas com corante MTT (Amresco, ref. 0793) ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) e mantidas a 37°C em incubadora com atmosfera umidificada e 5% de CO_2 . Após 1 hora, o meio foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS, então adicionou-se $100 \mu\text{L}$ de DMSO (Synt, ref. D1011.01BJ), aguardado o período de 10 min para solubilização e realizou-se a leitura de absorbância a 550 nm em leitor Varioksan Lux Termo Scientific. (GRELA, KOZŁOWSKA e GRABOWIECKA, 2018; ROQUE et al., (2023).

4.6.3 Cristal violeta

Após o período de exposição, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS. Na sequência, as células foram fixadas com 100 µl de metanol durante 10 min e então foram adicionados 50 µl de cristal violeta (Millipore, ref. 1159400025) (0,25 mg ml⁻¹) em cada poço com incubação por 10 min à temperatura ambiente. Após, a solução foi removida e os poços lavados duas vezes com água ultrapura. Para solubilizar o corante, foram adicionados 100 µl de ácido acético 33% (Synth, ref. A101901BJ) e aguardado o período de 20 min para então realizar a leitura de absorbância a 570 nm em leitor Varioskan Lux Termo Scientific (ROQUE et al., 2023; DA LUZ, 2024).

4.7 Atividade dos transportadores de efluxo de drogas

Os transportadores ABC, que atuam como reguladores nas membranas plasmáticas de células saudáveis, desempenham um papel fundamental no efluxo de diversas substâncias no organismo. Devido a capacidade desses transportadores de mover ativamente compostos contra gradientes de concentração, foi possível o desenvolvimento de ensaios funcionais para medir seu nível e eficácia (LEBEDEVA, PANDE e PATTON, 2011).

Os testes de efluxo de drogas são empregados para investigar as atividades dos transportadores localizados na membrana, como P-gp, MRP1, ABCG2. Esses ensaios são realizados *in vitro*, analisando diretamente a fluorescência do meio extracelular (ou intracelular) para avaliar as concentrações de sondas fluorescentes. Após a adição de corantes lipofílicos que se difundem nas membranas celulares, a intensidade da fluorescência observada varia em função da atividade dos transportadores: células com alta atividade dos transportadores ABC, mostrarão intensidades mais altas da sonda no meio extracelular, devido ao efluxo que ocorre para fora das células (WU et al., 2014; EMRAN et al., 2022).

As células foram subcultivadas em placas de 96 poços na densidade de $1,5 \times 10^4$ por poço. Após 24 horas (para adesão das células), foram expostas aos contaminantes (experimento de 24 horas) e re-expostas (experimento de 15 dias). Então, os ensaios de efluxo de drogas foram realizados. Todos os procedimentos

descritos a partir da incubação com os corantes fluorescentes, foram protegidos da incidência direta de luz de modo a minimizar a perda de fluorescência.

4.7.1 Rodamina B

Avaliação da atividade de efluxo principalmente pela P-gp. As células foram incubadas por 30 min com 200 μ L da solução contendo rodamina B (1 μ M) em PBS. Dado o tempo de incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS, e incubados com 200 μ L de PBS por 10 min. Em seguida, os 200 μ L foram transferidos para uma microplaca preta para medir a intensidade de fluorescência em leitor Varioskan Lux Termo Scientific (λ_{ex} = 540nm; λ_{em} = 580nm). Alguns poços foram incubados concomitantemente com um inibidor relativamente específico de P-gp (Verapamil 60 μ M) (DE SOUZA SALGADO et al., 2018; ROQUE et al., 2023).

4.7.2 Calceína-AM

Avaliação da atividade da proteína MRP1. As células foram incubadas durante 1 hora com 100 μ l meio (livre de SFB) contendo calceína-AM (0,5 μ M). Após o término da incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS, e incubados com 200 μ L de PBS por 10 min. Então, os 200 μ l foram transferidos para uma microplaca preta, e a intensidade de fluorescência foi medida em leitor Varioskan Lux Termo Scientific (λ_{ex} = 488 nm; λ_{em} = 530 nm). Alguns poços foram incubados concomitantemente com um inibidor relativamente específico da atividade de MRPs (Indometacina 25 μ M) A metodologia seguida foi adaptada de De Marchi et al. (2021) e Roque et al. (2023).

4.7.3 Hoechst 33342

O ensaio foi desenvolvido para a avaliação da atividade da proteína BCRP (ABCG2). As células foram incubadas por 1 hora com 100 μ L de meio (livre de SFB) contendo Hoechst (0,5 μ g/mL). Na sequência, os poços foram lavados duas vezes com PBS, e incubados com 200 μ L de PBS por 10 min. Então, os 200 μ L foram transferidos para uma microplaca preta, e a intensidade de fluorescência foi medida em leitor Varioskan Lux Termo Scientific (λ_{ex} = 460 nm; λ_{em} = 490 nm). Alguns poços foram incubados concomitantemente com um inibidor relativamente específico da atividade da BCRP(ABCG2) (Elacridar 25 μ M-Cat. No. 4646) (SATO et al. 2015; KIM

et al. 2002; SCHARENBERG, HARKEY e STORB, 2002). Metodologia adaptada de Seigel e Campbel (2004), Hooijberg et al. (2006).

4.8 Avaliação de mecanismos relacionados à progressão tumoral

4.8.1 Ensaio de migração (scratch)

As células foram subcultivadas na densidade de 5×10^4 por poço em placas de 96 poços. Após o tempo de exposição, realizou-se a substituição do meio de cultura por meio fresco (livre de SFB) contendo mitomicina C ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$), com incubação de 2 horas. Em seguida, foi realizado um “risco” na vertical no centro de cada poço com o auxílio de uma ponteira de $10 \mu\text{L}$. Então, o meio de incubação foi descartado e os poços lavados duas vezes com meio de cultura sem SFB. Depois das lavagens, foi adicionado $200 \mu\text{L}$ de meio de cultura sem SFB e as imagens foram capturadas em microscópio invertido (Leica Microsystems, Wetzlar, HE, Alemanha, modelo DMIL LED, software Leica Application Suite 3.0.0) nos tempos 0, 24 e 48 horas. A porcentagem de fechamento da área aberta foi determinada por meio do software ImageJ® (<http://im.ajej.nih.gov/ij/>). O ensaio foi realizado conforme Liang et al. (2007) e Roque et al. (2023) com algumas modificações.

4.8.2 Formação de colônias: ensaio clonogênico bidimensional 2D

As células foram subcultivadas em placas de 24 poços na densidade de 150 células por poço. Decorrido o período de exposição, o meio de cultura no qual as células foram semeadas foi substituído por meio de cultura fresco. As placas foram incubadas (37°C e 5% de CO_2) durante 6 dias, substituindo o meio de cultura a cada 3 dias. Após os 6 dias, as colônias foram fixadas com $200 \mu\text{L}$ de paraformaldeído (PFA) 4% em PBS por 30 min. Após fixação, as células foram lavadas com PBS e coradas com cristal violeta ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) durante 15 min. Depois, realizou-se mais uma lavagem com PBS. Finalizando, as imagens das colônias foram capturadas em estereomicroscópio Discovery.V12, com câmera AxioCam 503 acoplada e software Zen pro 2.6 (Zeiss) para posterior realização da contagem de colônias e análise de área ocupada por meio do software ImageJ®. A capacidade clonogênica foi determinada pela contagem de colônias formadas por 50 células ou mais. A avaliação

da formação de colônias foi avaliada conforme descrito por Franken et al. (2006) e Roque et al. (2023), com algumas modificações.

4.8.3 Ensaio de invasão

A capacidade de invasão das células da linhagem MDA-MB-231 foi avaliada de acordo com o protocolo descrito por Gonçalves et al. (2021) e Roque et al. (2023), com algumas modificações.

1° dia- Com o auxílio de uma pinça previamente esterilizada foram distribuídos os insertos (Ref. 662638 - Greiner) em uma placa de 24 poços, a placa foi vedada com Parafilm, envolvida em saco plástico e alocada a -20 °C overnight, juntamente com as caixas de ponteiras que seriam necessárias para o ensaio no dia seguinte. As alíquotas de Matrigel (Ref. 356234 - Corning) ficam armazenadas no congelador, e para o ensaio, foram descongeladas em geladeira dentro de uma caixa de isopor contendo gelo.

2° ao 4° dia- No dia do ensaio, primeiro foi preparado um recipiente contendo gelo, embalado em plástico e esterilizado com álcool 70% para utilização dentro da cabine biológica e utilizado para finalizar o preparo dos insertos com Matrigel na placa de 24 poços. As alíquotas de Matrigel (8,4 mg mL⁻¹) foram diluídas em meio de cultura gelado (sem SFB) para uma solução de trabalho (2,6 mg mL⁻¹). Após, 50 µL desta solução foi colocado em cada inserto presente na placa (8,36 mm de área e poros de 8 µm). Novamente a placa foi vedada e foi realizada manualmente uma agitação vigorosa para espalhar bem o Matrigel no inserto e evitar a formação de um halo central. A placa foi incubada sob agitação a 800 rpm a 30 °C por 1,5h em agitador de microplacas, com agitação manual a cada 15 minutos. Para finalizar, a placa foi colocada na incubadora a 37°C pelo período de 1 hora antes do recebimento das células. Com auxílio de cell scraper (espátula de raspagem de células), as células foram desaderidas das garrafas. Na sequência, a suspensão foi centrifugada a 1300 rpm por 3 min, o sobrenadante descartado e o pellet de células ressuspendido em meio de cultura RPMI 1640 (sem SFB). As células foram contadas na câmara de Neubauer e então a suspensão foi ajustada para 6x10⁴ células em 300 µL de meio de cultura livre de SFB. Este volume foi transferido para a parte superior do inserto anteriormente recoberta com Matrigel. Na parte de fora do inserto foram adicionados

500 μL de meio de cultura com 10% de SFB, com a finalidade de atrair as células, e a placa foi então incubada a 37 °C e 5% de CO_2 pelo período de 48h.

5° dia- Após o período da incubação, ocorreu a lavagem (2x) dos insertos com PBS a 37 °C e fixação com paraformaldeído (PFA) a 4% durante 30 min. Passado o tempo de fixação, os insertos foram novamente lavados (2x) com PBS e permeabilizados com Triton X-100 (0,5%) por 15 min. Lavou-se novamente os insertos (2x com PBS) e foram bloqueadas as ligações inespecíficas com albumina sérica bovina (BSA, 1%) durante 30 minutos. Os insertos foram lavados novamente (2x com PBS) e incubados com DAPI (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) por 15 minutos. Finalizando as incubações, os insertos foram novamente lavados (2x com PBS) e a parte interior dos insertos foi limpa com o auxílio de hastes de algodão, para retirada total das células que não invadiram. Utilizando um bisturi, o fundo dos insertos foi removido para a montagem na lâmina. Na lâmina, foi colocado Fluoromount e a membrana do inserto foi acondicionada em cima desta gota, com a parte que contém as células voltada para cima. Em seguida, para acondicionar a lamínula, foi adicionado mais uma gota de Fluoromount e posto a mesma suavemente. As lâminas foram acondicionadas na horizontal dentro de caixas de lâminas protegidas da incidência de luz *overnight* na geladeira.

6° dia- Foram coladas as lamínulas com as lâminas. As imagens foram escaneadas em Scanner de lâminas Zeiss/MetaSystems e microscópio Zeiss Axio Imager Z2 do Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF) da UFPR. A quantificação das células que invadiram (núcleos/área) foi realizada por meio do software ImageJ®.

4.8.4 Ensaio de proliferação celular por marcação com CellTrace™ far Red

A análise da proliferação celular foi feita por marcação com CellTrace™ far Red- CTFR (ThermoFischer Scientific-REFC34564). O CTFR é um marcador intracelular fluorescente utilizado para verificar a taxa de proliferação de células em cultura. A marcação é feita inicialmente com o fluoróforo e as células são tratadas e incubadas para a divisão celular. Conforme essas células sofrem o processo de divisão celular, as proteínas marcadas são distribuídas entre as células-filhas, sendo possível observar uma redução da fluorescência do CTFR (ZHOU et al., 2016).

Para o ensaio, foram utilizadas 10×10^4 células separadas em tubos de 15 mL, lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS a 37°C, seguido da adição de 1 μL de

CellTrace™ e incubadas por 20 minutos a 37°C e protegidas da luz. Após isso, o volume foi completado com 5 mL de meio de cultivo completo para diluir qualquer corante não ligado e as células incubadas ao abrigo da luz por 5 minutos. As células foram centrifugadas a 123 g por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio completo pré-aquecido a 37°C.

Para avaliar os efeitos sobre a atividade proliferativa das células tumorais, após a marcação com o corante, estas foram cultivadas em placas de 6 poços e incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ durante 5 dias. Transcorrido esse tempo, o meio de cultura foi removido, o poço foi lavado com PBS e as células foram removidas por tripsinização. Após centrifugação e descarte do meio com tripsina, as células foram fixadas com 1000 µL de paraformaldeído (PFA) 4% em PBS durante 30 minutos. Depois da fixação, centrifugou-se novamente o tubo contendo as células e o pellet foi ressuspensão em 1 mL de PBS para a leitura e análise por citometria de fluxo, utilizando excitação em 630 nm e a emissão em 661 nm, realizada no citômetro de fluxo FACS Calibur – 2 lasers com capacidade para análise simultânea de até 6 parâmetros (4 cores, FSC e SSC). Para analisar os dados do ensaio de proliferação, foram utilizados os softwares FCS Express Research e FlowJo 7.6.2.

4.9 Transcrição reversa – qPCR (RT-qPCR)

4.9.1 Seleção dos genes

A seleção dos genes foi baseada em achados na literatura e ainda, alguns genes que precisávamos testar, como as metaloproteinases, pois seria realizado um ensaio de zimografia em gel se a expressão das metaloproteinases 2 e 9 estivesse alterada. Foram utilizados os genes ANKRD17, GAPDH e B-ACTINA como genes de referência. Os genes selecionados para os ensaios de RT-qPCR constam na Tabela 1.

Tabela 1. Tabela contendo os genes selecionados, as sequências, a quantidade de pares de bases e o número de referência da sequência (RefSeq).

Genes	Sequências (5'- 3')	Amplicons	RefSeq
HSPA8	F: 5'-ACCTACTCTTGTGTGGGTGTT-3' R: 5'-GACATAGCTTGGAGTGGTTCG-3'	87pb	NM_006597.6

ABCG2	F: 5'-TGGCTGTCATGGCTTCAGTA-3' R: 5'-GCCACGTGATTCTTCCACAA-3'	206pb	NM_004827.3
AKT1	F: 5'-GTCATCGAACGCACCTTCCAT-3' R: 5'-AGCTTCAGGTACTCAAACCTCGT-3'	218pb	NM_005163.2
BRCA1	F: 5'-CTGAAGACTGCTCAGGGCTATC-3' R: 5'-AGGGTAGCTGTTAGAAGGCTGG-3'	152pb	NM_001408467.1
STAT3	F: 5'-TCCATCAGCTCTACAGTGACAGC-3' R: 5'-TCCCAGGAGATTATGAAACACC-3'	134pb	NM_001384993.1
VEGFA	F: 5'-CTACCTCCACCATGCCAAGT-3' R: 5'-GCAGTAGCTGCGCTGATAGA-3'	109pb	NM_001025366.3
β -TUBULINA	F: 5'-CACAGGCAGTTACCATGGAG-3' R: 5'-GTCTGAAGATCTGGCCGAAG-3'	164pb	NM_001310315.2
MMP2	F: 5'-AGCGAGTGGATGCCGCCTTTAA-3' R: 5'-CATTCCAGGCATCTGCGATGAG-3'	138pb	NM_001302510.2
MMP9	F: 5'-GCCACTACTGTGCCTTTGAGTC-3' R: 5'-CCCTCAGAGAATGCCAGTACT-3'	124pb	NM_004994.3
ANKRD17	F: 5'-AATGTTGCCACCACTCTTCC-3' R: 5'-TGCAGCTGTGCATTCTTTTC-3'	200pb	NM_001286771.3
GAPDH	F: 5'-ACAACCTTTGGTATCGTGGAAAGGAC-3' R: 5'-CAGGGATGATGTTCTGGAGAGC-3'	129pb	NM_001357943.2
B-ACTINA	F: 5'-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3' R: 5'-AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT-3'	135pb	NM_001101.5
AR	F: 5'-CCCATCTATTTCCACACCCA-3' R: 5'-GCAAAGTCTGAAGGTGCCAT-3'	259pb	NM_000044.3
RPS6	F: 5'-CATGAAGCAGGGTGTCTTGA-3' R: 5'-ACAATGCAACCACGAAGTGA-3'	120pb	NM_001010.3
SYNCRIP	F: 5'-CTGGTCTCAATAGAGTTATGCG-3' R: 5'-TCCGTTGGTGGTATAAAATGAC-3'	244pb	NM_001410938.1
ESR1	F: 5'-ACTGCGGGCTCTACTTCATC-3' R: 5'-GGCTGTTCCCAACAGAAGAC-3'	275pb	NM_000125.3
ESR2	F: 5'-CTCTTTTGCCTGAAGCAACG-3' R: 5'-CTGGGCAGTTAAGGAGACCA-3'	269pb	NM_001040275.1

Estas proteínas foram selecionadas com base no seu papel na progressão do tumor e em processos importantes para o câncer: **HSPA8**: Proteína da Família Hsp70, Membro 8; **ABCG2**: Membro 2 da Subfamília G da Cassetes de Ligação de ATP; **AKT1**: Quinase de Serina/Treonina AKT 1; **BRCA1**: Proteína de Suscetibilidade ao Câncer de Mama Tipo 1; **STAT3**: Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3; **VEGFA**: Fator de Crescimento Endotelial Vascular A; **β -TUBULINA**: Beta Tubulina; **MMP2**: Metaloproteinase da Matriz 2; **MMP9**: Metaloproteinase da Matriz 9; **ANKRD17**: Domínio de Repetição de Ankyrina 17; **GAPDH**: Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase; **B-ACTINA**: Beta Actina; **AR**: Receptor de Andrógeno; **RPS6**: Proteína Ribossômica S6; **SYNCRIP**: Proteína Interagente com RNA Citoplasmática Ligada à Sinaptotagmina; **ESR1**: Receptor de Estrogênio 1; **ESR2**: Receptor de Estrogênio 2. **Primers**: HSPA8 (Annamaneni et al. 2019), ABCG2 (Hu et al. 2020), AKT1 (Mohamadzade et al. 2021), BRCA1 (Chatterjee et al. 2019), STAT3 (Zhang et al. 2011), VEGFA (Kalinina et al. 2021), β -TUBULIN (Saussede-Aim et al. 2009), MMP2 (Wang et al. 2021), MMP9 (Wang et al. 2021), ANKRD17 (Kalinina et al. 2021), GAPDH (Kalinina et al. 2021), β -ACTIN (Wang et al. 2021), AR (Stecca et al. 2016), RPS6 (Hu et al. 2017), SYNCRIP (Zhang et al. 2020), ESR1 (Stecca et al. 2016), ESR2 (Stecca et al. 2016), SYMPK (Tilli et al. 2016).

4.9.2 RT-qPCR

Foi investigada a expressão de um grupo de genes (Tabela 2) que estão associados a processos importantes na tumorigênese da mama, com metodologia adaptada de Da Luz (2023). Após o período de exposição de 15 dias, o meio de cultura foi removido, o poço foi lavado com PBS e as células foram removidas por tripsinização. Após centrifugação e descarte do meio com tripsina, as células foram contadas na câmara de Neubauer e um total de 8×10^6 células foram ressuspensas em RNAlater™ (Invitrogen, ref. AM7021) e armazenadas a -80°C . Para a extração do RNA, as células foram centrifugadas a 123 g durante 3 min à temperatura ambiente e o RNA total foi extraído utilizando Trizol® e clorofórmio, seguido de um segundo passo de purificação utilizando o PureLink® RNA mini Kit (Ref. 12183018A-Invitrogen). O RNA foi quantificado por fluorimetria ($\lambda_{\text{ex/em}} = 492/540$ nm) utilizando o QuantiFluor® RNA System (Ref. E3310 - Promega) e a pureza avaliada por espectrofotometria ($\lambda = 230, 260$ e 280 nm) para contaminação proteica (razão $260/280$ nm) e fenol e outros contaminantes (razão $260/230$ nm), com valores limite de $\sim 2,0$ e $1,8-2,2$, respectivamente (DESJARDINS e CONKLIN, 2011). A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%. A conversão do RNA em cDNA foi realizada utilizando o SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen, ref. 18091050) e o Veriti™ Thermal Cycler. Para RT-qPCR, utilizou-se o PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Ref. A25776-Applied Biosystems) e o StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Ref. 4.376.600-Applied Biosystems™), configurado para as condições de termociclagem recomendadas. Para cada reação de $10 \mu\text{L}$, foram utilizados 10 ng de cDNA e 500 nM de primers (Tabela 2). A ausência de contaminação do DNA de outras fontes ou a presença de dímeros de iniciadores foram verificadas através da estratégia de controle sem modelo (NTC), em que o DNA modelo foi omitido das reações. Os dados foram processados utilizando o servidor LinRegPCR (<https://www.gear-genomics.com/rdml-tools/index.html>) (UNTERGASSER et al. 2021).

4.10 Análise estatística

Foram conduzidos cinco experimentos independentes para cada teste. As

médias das replicações técnicas de cada experimento independente foram calculadas e usadas para comparar os contaminantes avaliados com seus respectivos controles. A normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias foram verificadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Brown-Forsythe, respectivamente. Os dados paramétricos foram analisados utilizando ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett, e apresentados como média. Para dados não paramétricos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações múltiplas, sendo os resultados expressos em mediana. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Molecular docking e screening de concentrações

Após a seleção dos ligantes e alvos, utilizou-se o programa Autodock Vina para verificar as possíveis energias de ligação dos alvos com os compostos químicos. As afinidades foram selecionadas com base nos estudos de Montes-Grajales et al. (2020), e um valor de corte, representando aproximadamente 95% da especificidade (-7,0 kcal / mol), foi usado para distinguir os complexos com as melhores pontuações de afinidade, onde os que possuem valores de ligação maior que -7,0 kcal / mol são considerados com alta afinidade e os que possuem valores de -6,9 a -6,0 kcal / mol são considerados com energias médias de ligação. Abaixo de -5,9 kcal / mol são considerados não ligantes. A Tabela 2 mostra os resultados do *screening* com o programa Autodock Vina.

Tabela 2. Screening molecular com base nas energias de ligação determinadas pelo programa AUTODOCK VINA entre as proteínas e contaminantes químicos selecionados.

Alvos	ID. PDB	Triclosan	Octilfenol	Mtx	Bp1	Endosulfan	Bpa	Lindano	Hexacloro benzeno	Pfoa	Paration
1-AKT	1Q0R	-5.1	-5.7	-5.8	-6.5	-6	-6.8	-4.6	-6.2	-7.1	-5.5
2-Ciclina D1	3AY5	-5.2	-5.5	-6.2	-6.3	-5.2	-7.2	-4.1	-4.2	-7.7	-5
3-Bcl-2	6VO4	-5.3	-5.2	-6.5	-6.5	-6	-6.5	-4.6	-4.3	-6.8	-4.8
4-BclXL	7Y8D	-5.2	-5.7	-6.7	-6.5	-5.3	-7.3	-4.4	-4.6	-6.9	-5.8
5-MMP2	1RTG	-5.4	-6.4	-7.2	-6.9	-6.8	-7.1	-4.9	-5.3	-7.1	-5.7
6-MMP9	1L6J	-5.9	-6	-5.9	-6.4	-5.8	-6.4	-5.5	-5.8	-7.5	-5.7
7-Survivina	1F3H	-5.6	-6.6	-5.6	-5.4	-6	-5.6	-4.5	-4.6	-6.6	-6
8-Vimentina	4YPC	-4.6	-6.3	-6.4	-6.9	-7	-7	-5.4	-5.2	-8.1	-5.6
9-N-caderina	4ZT1	-5.9	-4.9	-6	-5.8	-5.6	-6.2	-4.1	-4.7	-6.6	-5.3

10-ERK2	4G6N	-4.8	-5.6	-6.1	-6.1	-6.6	-6.6	-3.8	-4.4	-7.3	-5.5
11-ESR1	2OUZ	-4.6	-5.2	-5.2	-7.4	-5	-5.5	-5.7	-5.7	-6.2	-5.3
12-EGFR	2GS2	-3.6	-3.9	-5.4	-4.9	-4.9	-5.6	-3.7	-3.6	-5.6	-4.6
13-CDK2	1W98	-5.6	-5.2	-6.6	-6.9	-6.5	-6.4	-4.6	-5.3	-8.4	-5.7
14-Ras 1	6CERA	-4.6	-5.2	-6.1	-6.7	-5.4	-7.6	-4.2	-4.1	-7.1	-5.1
15-c-RAF	3OMV	-4.9	-5.4	-5.7	-8	-6.2	-6.9	-4	-5.8	-7.9	-5.3
16-P38	1WFC	-5	-5.3	-6.2	-6.1	-6.2	6.6	-4.8	-5.2	-7.1	-5.4
17-Mdm2	4HFZ	-6.1	-6.1	-6.8	-7	-5.6	-7.7	-4.6	-4.4	-7.3	-5.6
18-mTOR	3JBZ	-5.6	-5.8	-6.8	-6.1	-6.8	-6.5	-5	-5.6	-7.1	-6
19-VEGFA	1VR2	-4.1	-5	-4.7	-5.8	-5.2	-6	-3.9	-4.1	-6.1	-5.4
20-TGFB1	5VQP	-5.3	-5.2	-6.5	-6.5	-5.3	-8.1	-5.4	-4.8	-7	-5.6
21-MDR1	2CBZ	-4.7	-6.8	-7.5	-7.3	-5.6	-6.7	-4.7	-5.4	-7.1	-5.1
22-NF-κB	4OT9	-5	-5.9	-5.7	-6.2	-5.6	-6.2	-4.3	-5	-6.9	-6.2
23-CDC25	1C25	-4.6	-4.2	-4.9	-5	-5.4	-6.2	-4.2	-4.4	-5.5	-5.7
24-CDC42	1KZG	-5.2	-6.9	-7.8	-7.6	-5.9	-7.5	-5.1	-5.5	-8.4	-5.4
25-PI3K	7PG5	-6.7	-6.2	-6.3	-6.7	-6.5	-5.6	-5.5	-5.6	-7.6	-5.7
26-ATM	6K9K	-6.5	-6.6	-7.4	-7.4	-7.3	-7.6	-5.3	-5.4	-8.6	-6.3
27-RhoA	1A2B	-4.9	-4.8	-5.4	-5.1	-5.1	-5.6	-4.1	4.2	6.4	-4.6
28-ROCK	7JOU	-5.4	-6.1	-7.2	-6.8	-5.3	-6.4	-5.4	-5.3	-7.7	-5.3
PR Receptor	1A28	-4.9	-6.7	-6.8	-6.7	-6.2	-7	-6.2	-4.4	-8.8	-5.6
30-HER2	3PP0	-5.3	-7.3	-7.2	-6.1	-5.8	-7.6	-5.8	-5.9	-7.2	-5

31-BCRP	5NJ3	-5.4	-5.4	-5.8	-8.4	-6.5	-6.6	-4.7	-6.3	-6.9	-6
32-TIMP-1	1UEA	-5,5	-7	-6,1	-7,7	-6,4	-7,9	-5,5	-4,5	-9,6	-6,4
33-TIMP-2	1BR9	-5,8	-6,2	-6,6	-7,3	-6,4	-6,7	-4,8	-4,9	-6,9	-5,1
34-ATR	5YZ0	-6,1	-7,1	-6,6	-6,8	-6,8	-7,4	-5,5	-5,4	-8,4	-5,7
35-GPR30	Q63ZY2	-5.7	-5.7	-6.1	-6.2	-5.8	-6.4	-4.6	-4.8	-6.8	-5.3
Valores de referência em kcal/mol		-3.0 a -4.9			-5.0 to -5.9	-6.0 a 6.9			-7.0 a -8		-8.1 a - 10

As cores indicam se a energia de ligação é baixa (azul), média (rosa claro) ou alta (rosa escuro e vermelho).

Com base na Tabela 2, os compostos que apresentaram ligação forte com um maior número de proteínas específicas foram o metoxicloro, 2,4-dihidroxibenzofenona (benzofenona 1), bisfenol A e o ácido perfluorooctanóico. Esses compostos foram selecionados para a realização dos ensaios *in vitro*. As maiores energias de ligação foram observadas para o composto ácido perfluorooctanóico (Pfoa), com ligações com as proteínas TIMP-1 (-9,6 kcal / mol) e ATR (-8,4 kcal / mol).

Para a seleção das concentrações dos contaminantes, realizou-se primeiramente uma pesquisa bibliográfica buscando artigos científicos que tivessem empregado os mesmos compostos juntamente com células tumorais, a fim de verificar quais resultados foram obtidos e quais concentrações foram utilizadas. Com esse levantamento e análise de bibliografia realizados, foi realizada a seleção das concentrações que seriam utilizadas e os testes de viabilidade realizados (MTT, vermelho neutro e cristal violeta), a fim de selecionar as concentrações para uso nos experimentos. Como houve demora na aquisição do contaminante benzofenona-1, realizou-se os testes de viabilidade somente com o Pfoa, Bpa e Mtx. Após a chegada da benzofenona-1, realizou-se a triagem através da literatura e foram selecionadas duas concentrações que apareciam em todos os artigos selecionados, sendo esta 1 e 10 μM .

A Figura 14 mostra os resultados obtidos no *screening* de concentrações. Para o bisfenol A (Bpa), foram selecionadas as concentrações em μM , com base nos achados da bibliografia. Com base nos resultados encontrados para o composto

bisfenol A, o ensaio do metabolismo do MTT (Fig. 14A) não houve efeitos significativos, o ensaio de retenção de vermelho neutro (Fig. 14B) a concentração 0,5 μM aumentou a viabilidade em comparação com o controle. Para o Cristal violeta (Fig. 14C), as concentrações 0,01, 0,05 e 0,5 μM resultaram em aumentos significativos. As concentrações que foram escolhidas para os experimentos seguintes foram 0,1 e 1 μM .

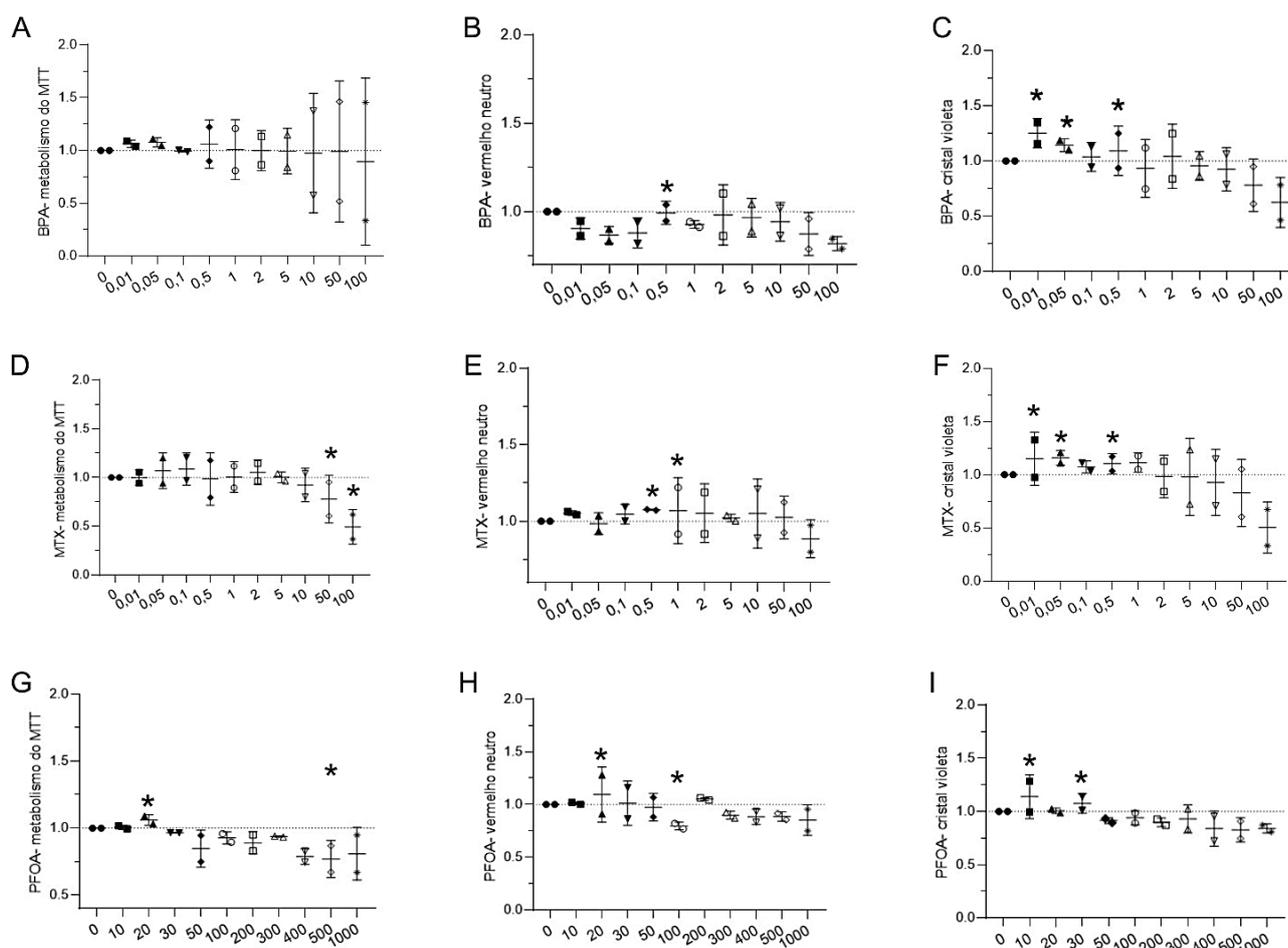


Figura 14 . Screening de concentrações para o Pfoa, Bpa e Mtx. A, D e G: metabolismo do MTT. B, E e H: retenção do corante vermelho neutro. C, F e I: densidade celular/cristal violeta. Média e SD. N = 2 experimentos independentes. Kruskal-Wallis + teste de Dunn para comparação das concentrações dos contaminantes em relação ao respectivo controle (linha pontilhada). * $p < 0,05$. FONTE: A autora (2024).

Para o metoxicloro (Mtx), no ensaio do MTT (Fig. 14D), as concentrações 50 e 100 μM demonstraram ser citotóxicas. As concentrações que foram escolhidas para os experimentos seguintes foram 0,1 e 1 μM . Para o ensaio de retenção de vermelho neutro (Fig. 14E), em comparação com o controle, foi possível detectar um aumento

na capacidade das células em reter o corante (0,5 e 1 μM) tendo um indicativo de declínio na concentração de 100 μM . Já para o ensaio do cristal violeta (Fig. 14F), as concentrações de 0,01, 0,05 e 0,5 μM tiveram aumentos significativos.

Para o ácido perfluorooctanóico (Pfoa), foram selecionadas as concentrações na faixa de concentração de nM, uma concentração numa escala mil vezes menor que a escolhida para o Mtx. No teste do MTT (Fig. 14G) a concentração de 20 nM teve um maior aumento com relação ao controle. No ensaio de vermelho neutro (Fig. 14H), os grupos contendo a concentração de 20 nM de Pfoa apresentaram um aumento significativo em relação ao controle. Nos resultados no ensaio de cristal violeta (Fig. 14I), destacam-se as concentrações de 10, 20 e 30 nM, com aumentos significativos.

5.2 Ensaio de viabilidade celular

5.2.1 Linhagem MCF10-A

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados com exposição aguda (24h) e crônica (15 dias), com cinco experimentos independentes. Para a linhagem não tumoral MCF10-A (Figura 15), a retenção do corante vermelho neutro (Fig. 15A) foi alterada significativamente somente nas exposições de 24 horas, com aumentos para Pfoa 1 μM (40%) e Bpa 0,1 μM (40%) e 1 μM (40%). Não houve alterações significativas no ensaio do cristal violeta (Fig. 15C) para nenhuma das exposições. Houve aumento no ensaio do metabolismo do MTT (Fig. 15E) somente na exposição de 15 dias para o composto Mtx 0,1 μM (70%) e 1 μM (100%).

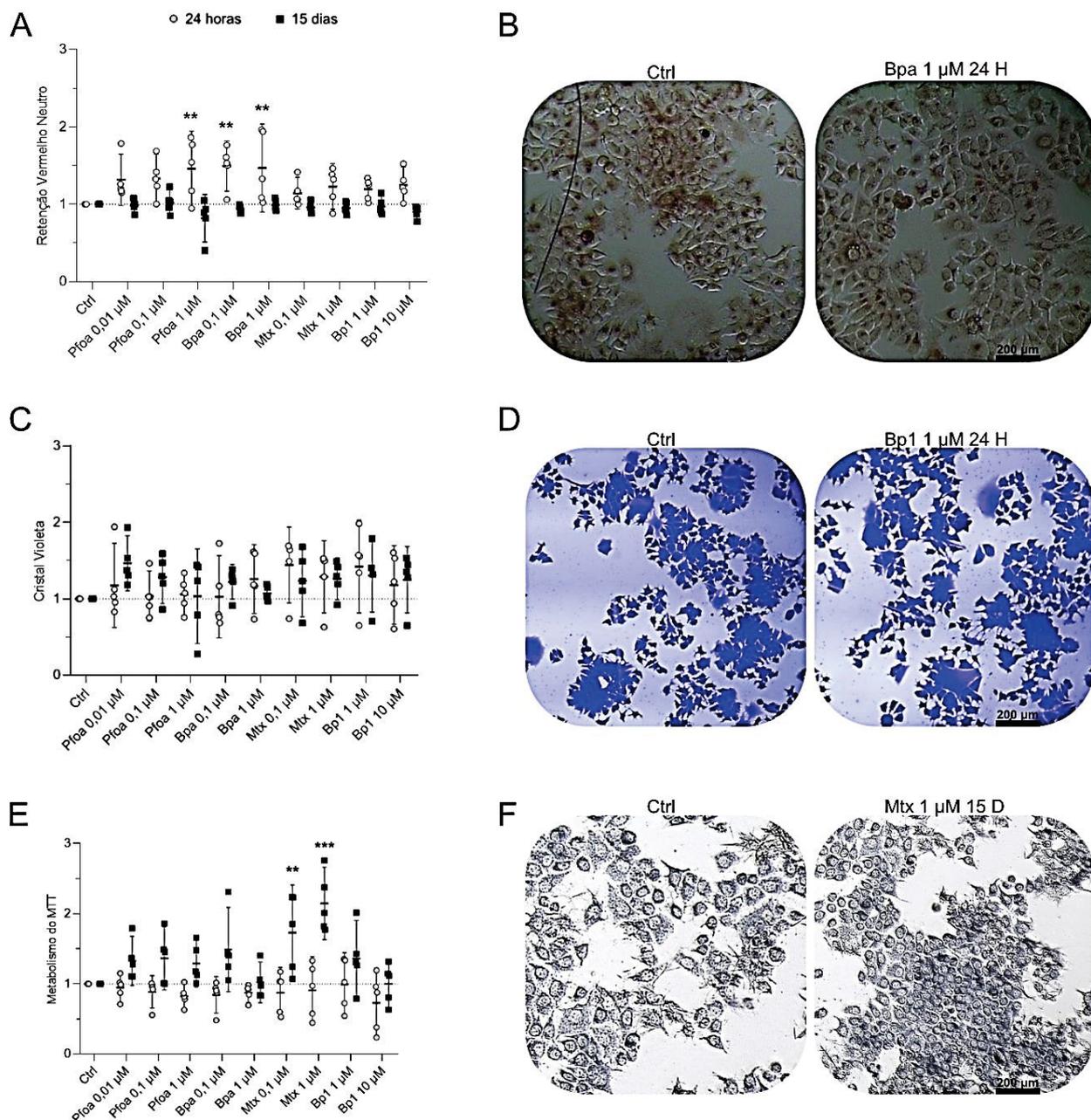


Figura 15. Ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular da linhagem MCF10-A. A: retenção de vermelho neutro (VN) B: imagens do ensaio de VN. C: Ensaio de adesão celular/cristal violeta (CV). D: imagens do ensaio de CV. E: metabolismo do MTT. F: imagens do ensaio de MTT. Exposição aguda (24h), círculos cinza; Exposição crônica (15 dias), quadrado preto. Barra horizontal: média e SD (ou CI95%); Cinco experimentos independentes. Resultados da ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste de Dunn para comparação das concentrações dos contaminantes em relação ao respectivo controle (linha pontilhada). * $p < 0,05$. FONTE: A autora (2024).

5.2.2 Linhagem MCF-7

Na linhagem MCF-7 houve alterações significativas nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular, somente na exposição de 15 dias (Figura 16). As maiores alterações foram vistas no ensaio de retenção do vermelho neutro (Fig. 16A) e no ensaio de cristal violeta (Fig. 16C), com aumentos em todas as concentrações, sendo que para o VN foram: Pfoa 0,01 μM (40%), 0,1 μM (40%) e 1 μM (50%), Bpa 0,1 μM (50%) e 1 μM (40%), Mtx 0,1 μM (60%) e 1 μM (50%) e Bp1 1 μM (50%) e 10 μM (50%).

Para o cristal violeta, houve aumento para Pfoa 0,01 μM (60%), 0,1 μM (60%) e 1 μM (50%), Bpa 0,1 μM (50%) e 1 μM (40%), Mtx 0,1 μM (40%) e 1 μM (50%) e Bp1 1 μM (50%) e 10 μM (50%). Os resultados do metabolismo do MTT (Fig. 16E) tiveram aumentos significativos para Bpa 1 μM (30%), Mtx 1 μM (30%) e Bp1 1 μM (40%).

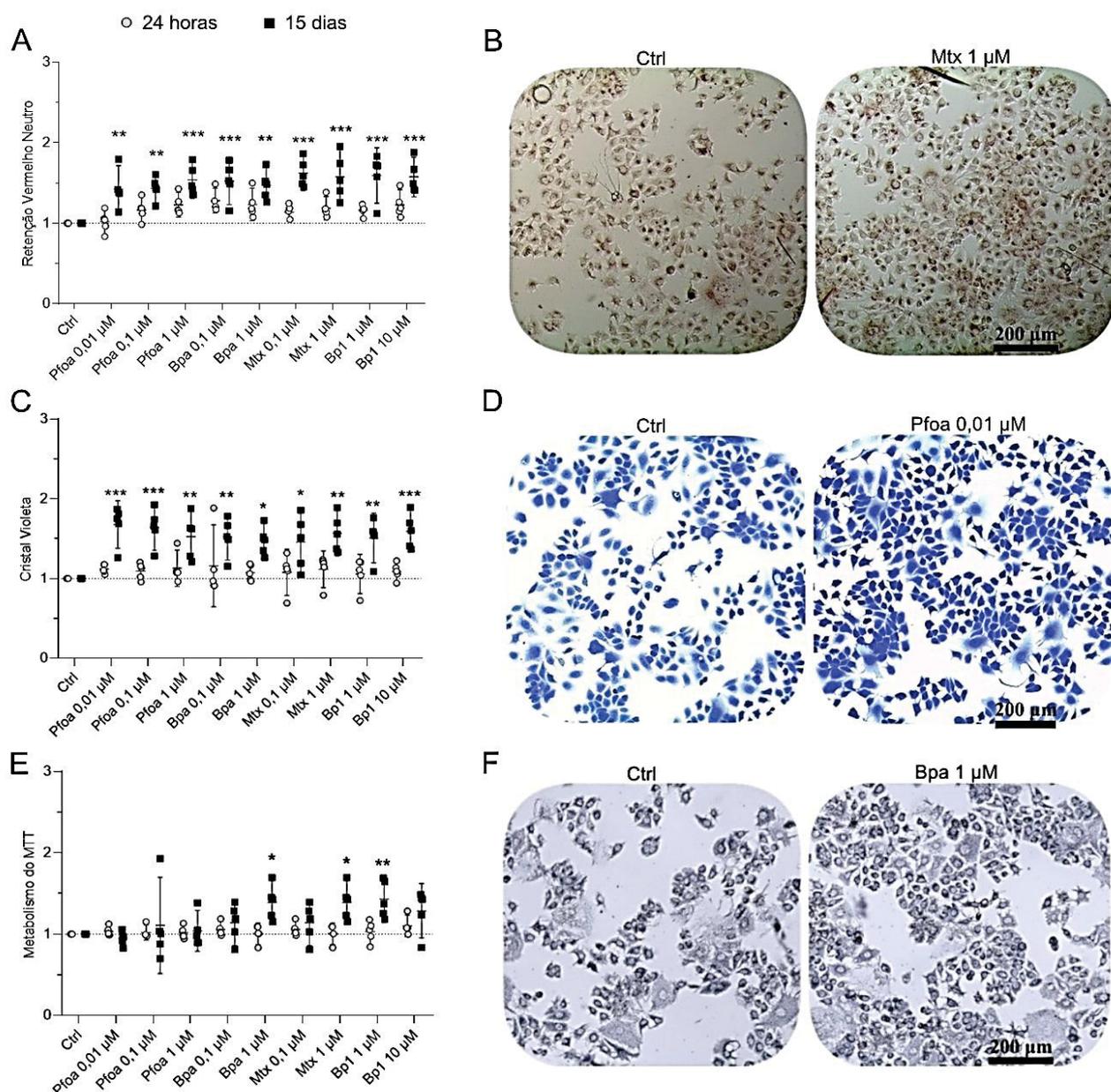


Figura 16. Ensaio de citotoxicidade e viabilidade celular da linhagem MCF-7. A: retenção de vermelho neutro (VN) B: imagens do ensaio de VN. C: Ensaio de adesão celular/cristal violeta (CV). D: imagens do ensaio de CV. E: metabolismo do MTT. F: imagens do ensaio de MTT. Exposição aguda (24h), círculos cinza; Exposição crônica (15 dias), quadrado preto. Barra horizontal: média e SD (ou CI95%); Cinco experimentos independentes. Resultados da ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste de Dunn para comparação das concentrações dos contaminantes em relação ao respectivo controle (linha pontilhada). * $p < 0,05$. FONTE: A autora (2024).

5.2.3 Linhagem MDA-MB-231

Para a linhagem triplo negativa MDA-MB-231 houve aumentos significativos nos ensaios realizados após a exposição de 24 horas e 15 dias (Figura 17), sendo que para a exposição de 24 horas os aumentos foram no ensaio de vermelho neutro (Fig. 17A) após exposição ao Bpa 0,1 μ M (50%) e Bp1 1 μ M (40%). Para as exposições de 15 dias houve aumento no ensaio do vermelho neutro (Fig. 17A) após exposição ao Bpa 0,1 μ M (50%) e 1 μ M (50%), Mtx 0,1 μ M (90%) e 1 μ M (70%) e Bp1 1 μ M (90%) e 10 μ M (90%). No ensaio do cristal violeta (Fig. 17C) ocorreu aumento após exposição ao Mtx 0,1 μ M (60%) e 1 μ M (90%) e Bp1 1 μ M (80%) e 10 μ M (90%); e no metabolismo do MTT (Fig. 17E) após exposição ao Pfoa 0,1 μ M (50%) e 1 μ M (50%), Bpa 0,1 μ M (50%), Mtx 0,1 μ M (50%) e 1 μ M (60%) e Bp1 1 μ M (50%) e 10 μ M (50%).

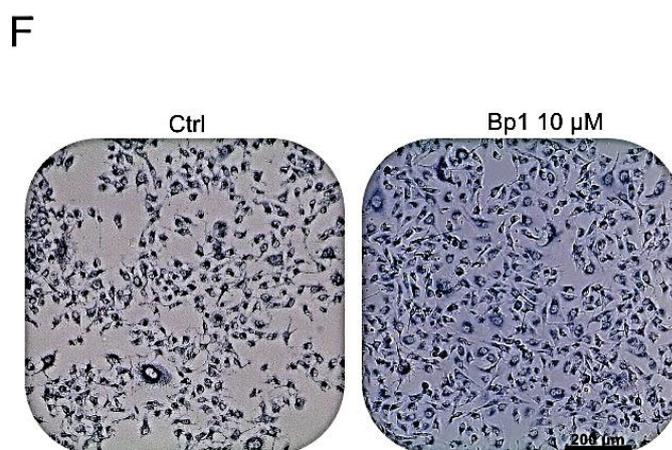
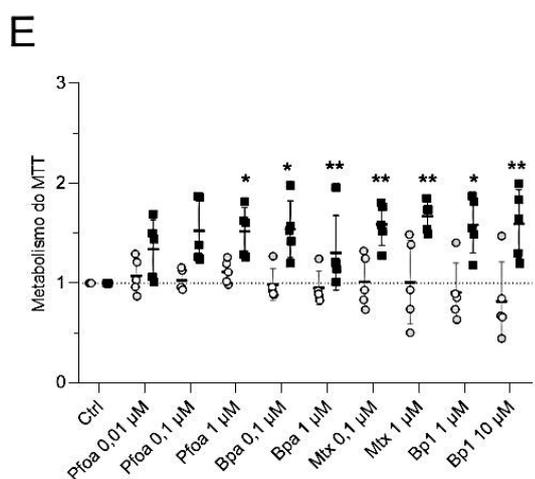
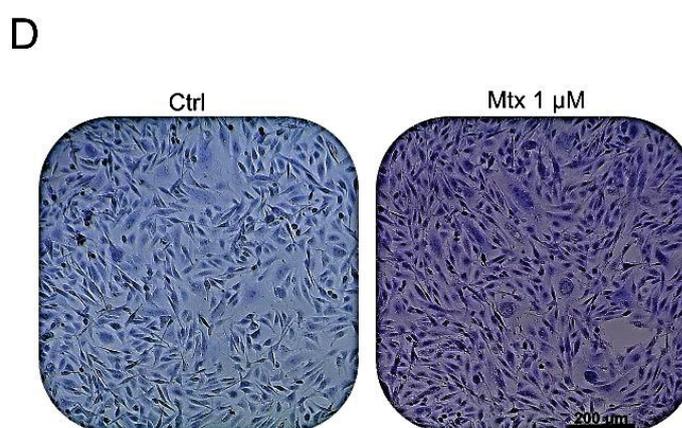
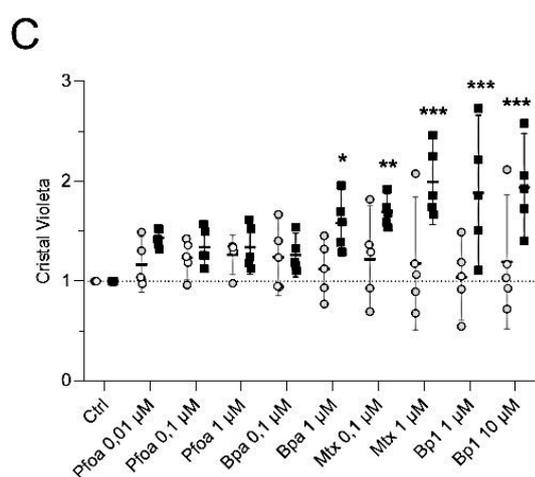
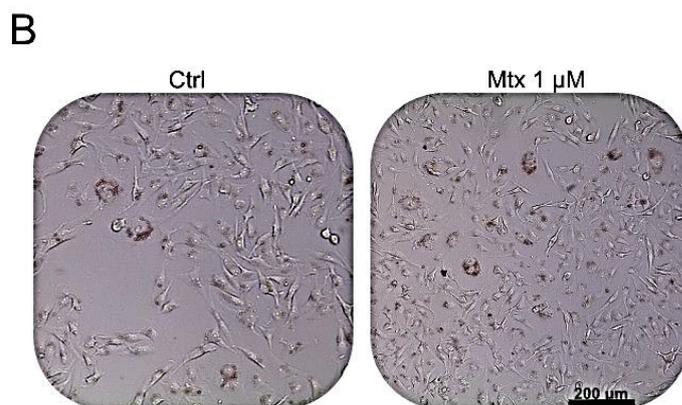
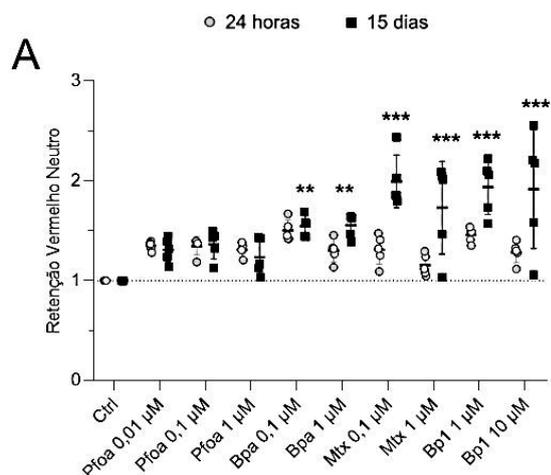


Figura 17. Ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular da linhagem MDA-MB-231. A: retenção de vermelho neutro (VN) B: imagens do ensaio de VN. C: Ensaio de adesão celular/cristal violeta (CV). D: imagens do ensaio de CV. E: metabolismo do MTT. F: imagens do ensaio de MTT. Exposição aguda (24h), círculos cinza; Exposição crônica (15 dias), quadrado preto. Barra horizontal: média e SD (ou

CI95%); Cinco experimentos independentes. Resultados da ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste de Dunn para comparação das concentrações dos contaminantes em relação ao respectivo controle (linha pontilhada). * $p < 0,05$. FONTE: A autora (2024).

5.3 Ensaios atividade dos transportadores ABC envolvidos no efluxo de drogas

5.3.1 Linhagem MCF10-A

Os resultados dos ensaios com os transportadores ABC da linhagem MCF10-A estão na Figura 18. O ensaio com fluoróforo calceína-AM (Fig. 18A) mostrou resultados significativos para a exposição aguda e crônica aos contaminantes, sendo que na exposição de 24 horas foi observado a diminuição da atividade após exposição ao Pfoa 1 μM (40%), Bpa 0,1 μM e 1 μM (50%), Mtx 0,1 μM e 1 μM (60%) e Bp1 1 μM e 10 μM (60%). Os ensaios realizados com o corante Hoechst 33342 (Fig. 18B) mostraram um aumento somente no composto Bp1 10 μM (80%) na exposição de 24 horas. Como pode ser visto, a atividade de efluxo de Rodamina B (Fig. 18C) não foi alterada significativamente nos tratamentos de 24 horas e 15 dias. Já na exposição crônica, a diminuição foi observada somente após exposição ao composto Bp1 10 μM (50%).

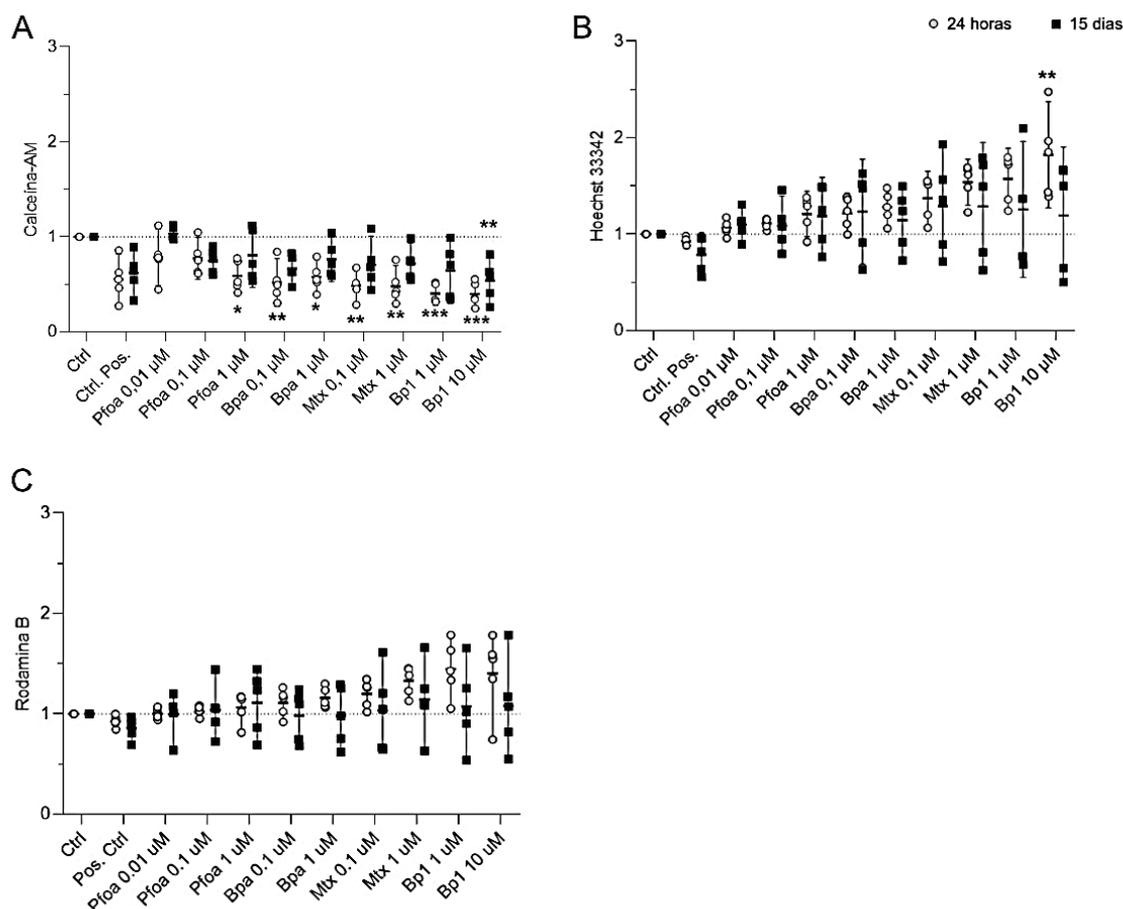


Figura 18. Ensaios de efluxo de drogas da linhagem MCF10-A. A: Calceína-AM. B: Hoechst 33342. C: Rodamina B. Exposição aguda (24h), círculos cinza; Exposição crônica (15 dias), quadrado preto. Barra horizontal: média e SD (ou CI95%); Cinco experimentos independentes. Resultados da ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste de Dunn para comparação das concentrações dos contaminantes em relação ao respectivo controle (linha pontilhada). * $p < 0,05$. FONTE: A autora (2024).

5.3.2 Linhagem MCF-7

Para a linhagem MCF-7 não foram observados resultados significativos para os ensaios com os fluoróforos rodamina B, hoechst 33342 e calceína-AM, tanto nos ensaios de 24 horas quanto nos ensaios realizados após a exposição de 15 dias (Figura 19).

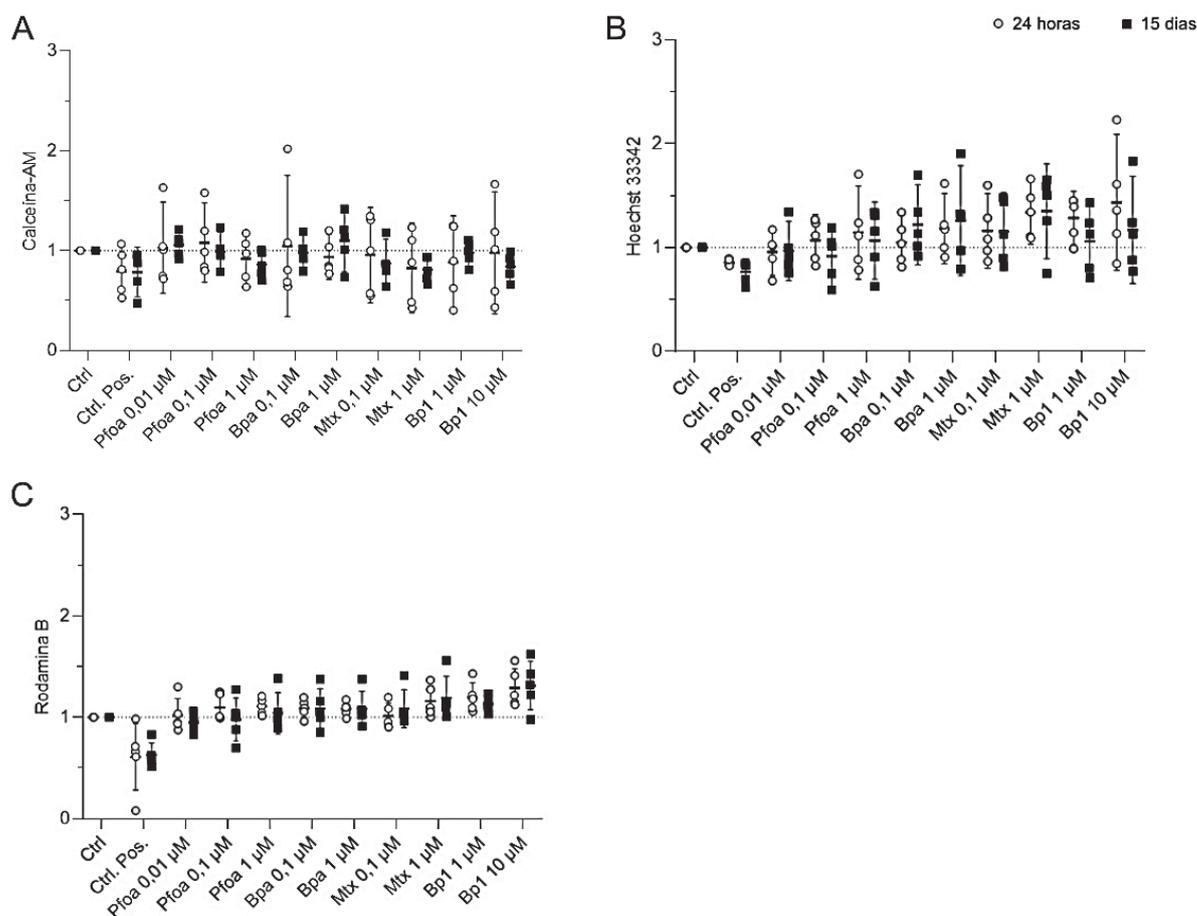


Figura 19. Ensaios de efluxo de drogas da linhagem MCF-7. A: Calceína-AM. B: Hoechst 33342. C: Rodamina B. Exposição aguda (24h), círculos cinza; Exposição crônica (15 dias), quadrado preto. Barra horizontal: média e SD (ou CI95%); Cinco experimentos independentes. Resultados da ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste de Dunn para comparação das concentrações dos contaminantes em relação ao respectivo controle (linha pontilhada). * $p < 0,05$. FONTE: A autora (2024).

5.3.3 Linhagem MDA-MB-231

Em relação ao ensaio de calceína-AM (Fig. 20A), um aumento significativo na atividade de efluxo foi observado após a exposição aguda a Bp1 1 μ M e 10 μ M (30%). Na exposição crônica ocorreu um aumento de 50% no efluxo de calceína-AM (Fig. 20A) nas concentrações de Pfoa (0,1 μ M), Bpa (1 μ M), Mtx (1 μ M) e Bp1 (1 μ M), já para Bp1 10 μ M o aumento foi de 40%. Para o ensaio com o corante Hoechst 33342 (Fig. 20B), o composto Mtx (0,1 μ M) provocou aumentos no efluxo tanto na exposição de 24 horas (30%), como na de 15 dias (30%) (Fig. 20B).

A atividade de efluxo de rodamina B (Fig. 20C) aumentou significativamente após a exposição aguda a Bp1 10 μ M (60%). Já na exposição crônica, houve aumento

na atividade para as células expostas a Bpa 1 μM (60%), Mtx 0,1 μM (80%) e 1 μM (90%) e Bp1 1 μM (90%) e 10 μM (100%) (Figura 20C).

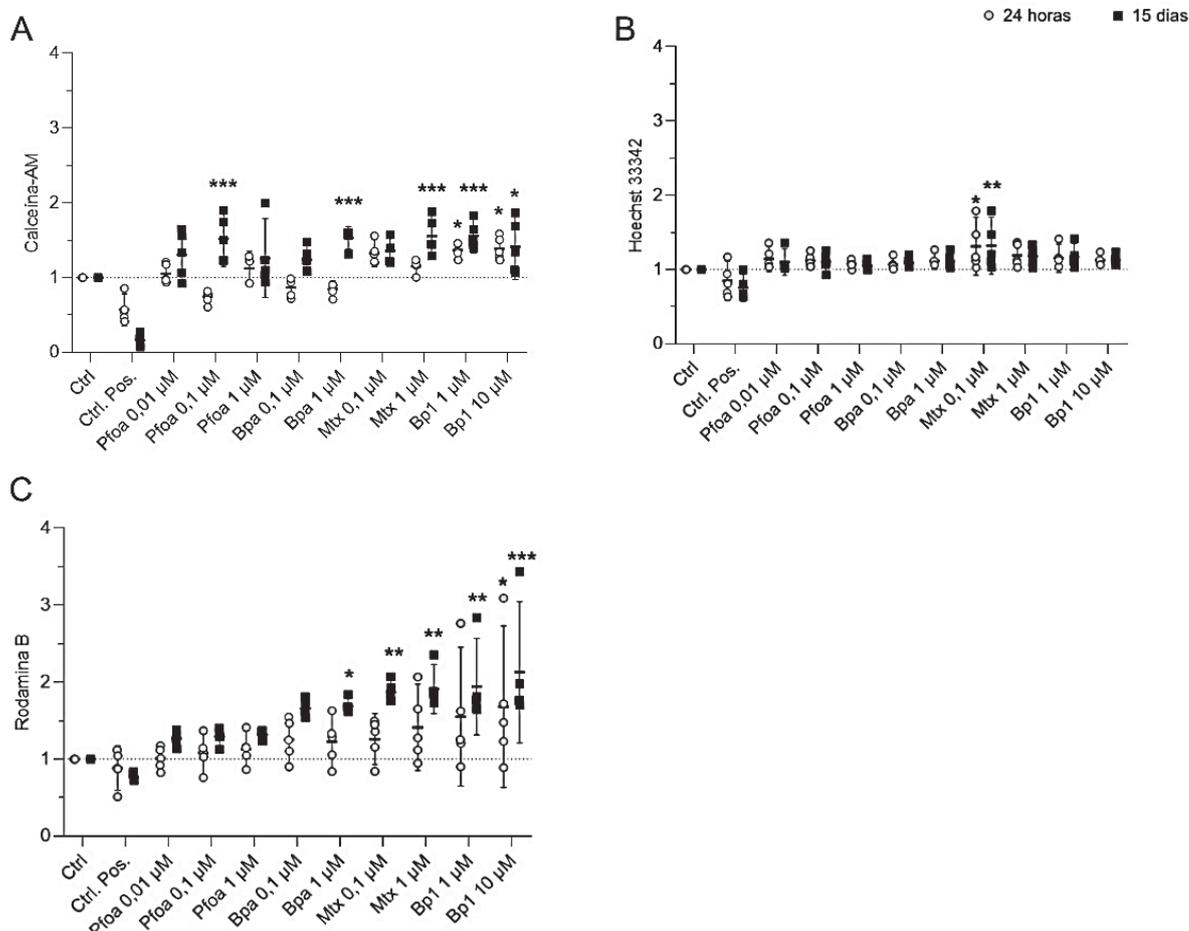


Figura 20. Ensaio de efluxo de drogas da linhagem MDA-MB-231. A: Calceína-AM. B: Hoechst 33342. C: Rodamina B. Exposição aguda (24h), círculos cinza; Exposição crônica (15 dias), quadrado preto. Barra horizontal: média e SD (ou CI95%); Cinco experimentos independentes. Resultados da ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste de Dunn para comparação das concentrações dos contaminantes em relação ao respectivo controle (linha pontilhada). * $p < 0,05$. FONTE: A autora (2024).

5.4 Avaliação de mecanismos relacionados à progressão tumoral

5.4.1 Formação de colônias: ensaio clonogênico 2D

A exposição aos contaminantes aumentou a capacidade de estabelecimento de colônias da linhagem MCF-7, indicando um aumento para as células expostas por

24 horas aos contaminantes Pfoa 0,1 μM (110%) e 1 μM (180%), já o Bpa 0,1 μM (100%) e 1 μM (160%), Mtx 0,1 μM (90%) e 1 μM (90%) e Bp1 1 μM (150%) e 10 μM (180%). A exposição de 15 dias resultou no aumento significativo do número de colônias para todos os grupos, sendo Pfoa 0,01 μM (100%), 0,1 μM (210%) e 1 μM (160%), Bpa 0,1 μM (170%) e 1 μM (190%), Mtx 0,1 μM (150%) e 1 μM (170%) e Bp1 1 μM (170%) e 10 μM (150%) (Figura 21).

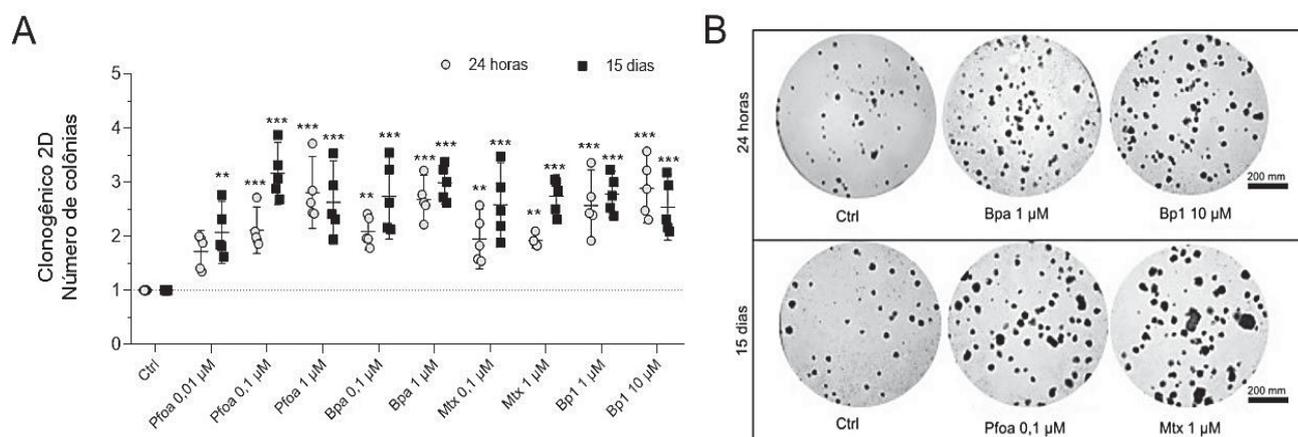


Figura 3. Ensaio clonogênico 2D da linhagem MCF-7. A: gráfico do ensaio clonogênico 2D (número de colônias). B: Imagens representativas do ensaio clonogênico 2D após o período de exposição de 24 horas e 15 dias. Círculos cinza: exposição aguda (24h); Quadrados pretos: exposição crônica (15 dias); Barra horizontal: média e SD (ou CI95%); Cinco experimentos independentes. Resultados da ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste de Dunn para comparação das concentrações dos contaminantes em relação ao respectivo controle (linha pontilhada). Para análise, apenas grupamentos com pelo menos 50 células foram consideradas como colônias. * $p < 0,05$. FONTE: A autora (2024).

A exposição não alterou a capacidade de estabelecer colônias da linhagem MCF10-A, tanto nas células expostas por 24 horas, como nas expostas durante 15 dias (Figura 22).

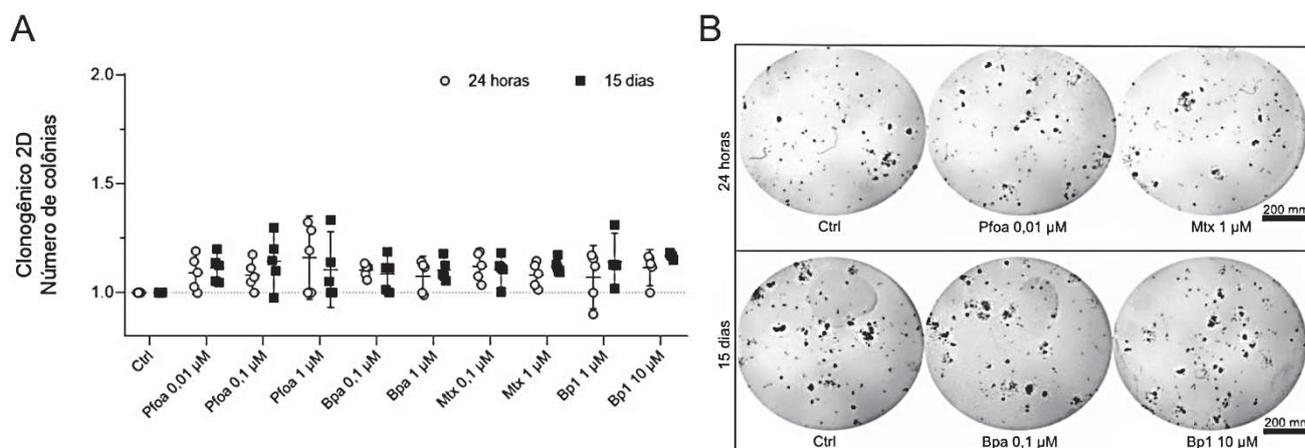


Figura 22. Ensaio clonogênico 2D da linhagem MCF10-A. A: gráfico do ensaio clonogênico 2D (número de colônias). B: Imagens representativas do ensaio clonogênico 2D após o período de exposição de 24 horas e 15 dias. Círculos cinza: exposição aguda (24h); Quadrados pretos: exposição crônica (15 dias); Barra horizontal: média e SD (ou CI95%); Cinco experimentos independentes. Resultados da ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste de Dunn para comparação das concentrações dos contaminantes em relação ao respectivo controle (linha pontilhada). Para análise, apenas grupamentos com pelo menos 50 células foram consideradas como colônias. * $p < 0,05$. FONTE: A autora (2024).

O mesmo foi observado para a linhagem MDA-MB-231, que não teve resultados alterados para a formação de colônias após exposição aos contaminantes por 24 horas e 15 dias (Figura 23). Contudo, observou-se que as células não estabeleciam colônias compactas com para as demais linhagens celulares, com grande número de células dispersas no fundo da placa de cultura.

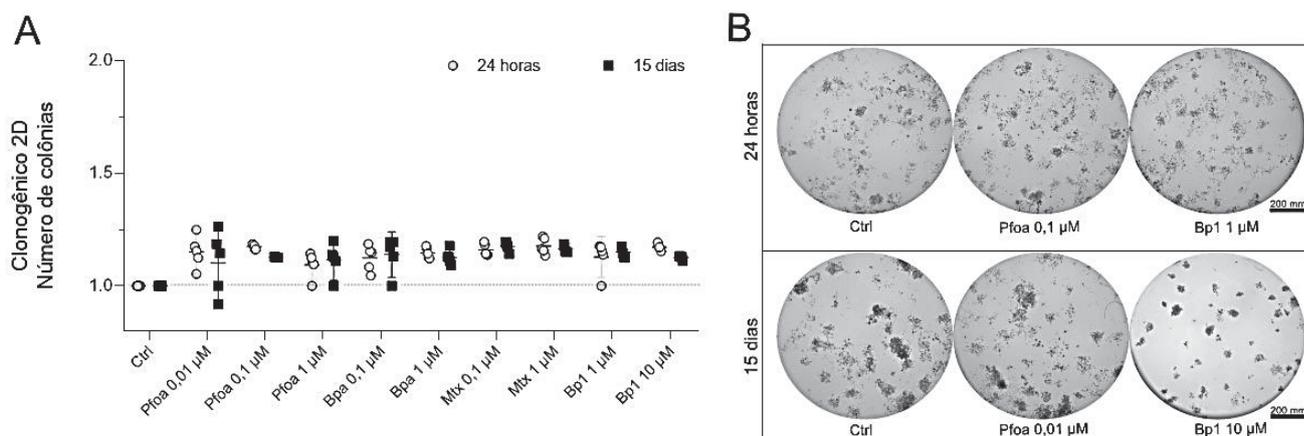


Figura 43. Ensaio clonogênico 2D da linhagem MDA-MB-231. A: gráfico do ensaio clonogênico 2D (número de colônias). B: Imagens representativas do ensaio clonogênico 2D após o período de exposição de 24 horas e 15 dias. Círculos cinza: exposição aguda (24h); Quadrados pretos: exposição crônica (15 dias); Barra horizontal: média e SD (ou CI95%); Cinco experimentos independentes.

Resultados da ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste de Dunn para comparação das concentrações dos contaminantes em relação ao respectivo controle (linha pontilhada). Para análise, apenas grupamentos com pelo menos 50 células foram consideradas como colônias. * $p < 0,05$. FONTE: A autora (2024).

5.4.2 Migração celular (scratch)

A migração das células foi avaliada por meio do ensaio de “scratch” (risco). Nesse ensaio, avaliou-se a capacidade das células de migrar para fechar o espaço criado pelo risco realizado no tempo 0 (T0) após 24 horas (T24) e 48 horas (T48).

A exposição das células MDA-MB-231 (Figura 24) aos contaminantes aumentou significativamente a migração celular no T24, no período de exposição de aguda (24 horas) para os contaminantes Pfoa 0,1 μM (90%) e 1 μM (80%), Bpa 0,1 μM (60%), Bpa 1 μM (60%), Mtx 0,1 μM (50%).

No tempo de 48 horas os resultados para a exposição aguda (24 horas) foram Pfoa 0,1 μM (90%) e 1 μM (80%), Bpa 0,1 μM (60%), Bpa 1 μM (80%), Mtx 0,1 μM (60%) e 1 μM (70%), Bp1 1 μM (70%) e 10 μM (30%) aumentando a capacidade das células de migrar e fechar o risco feito na placa (Fig. 24A)

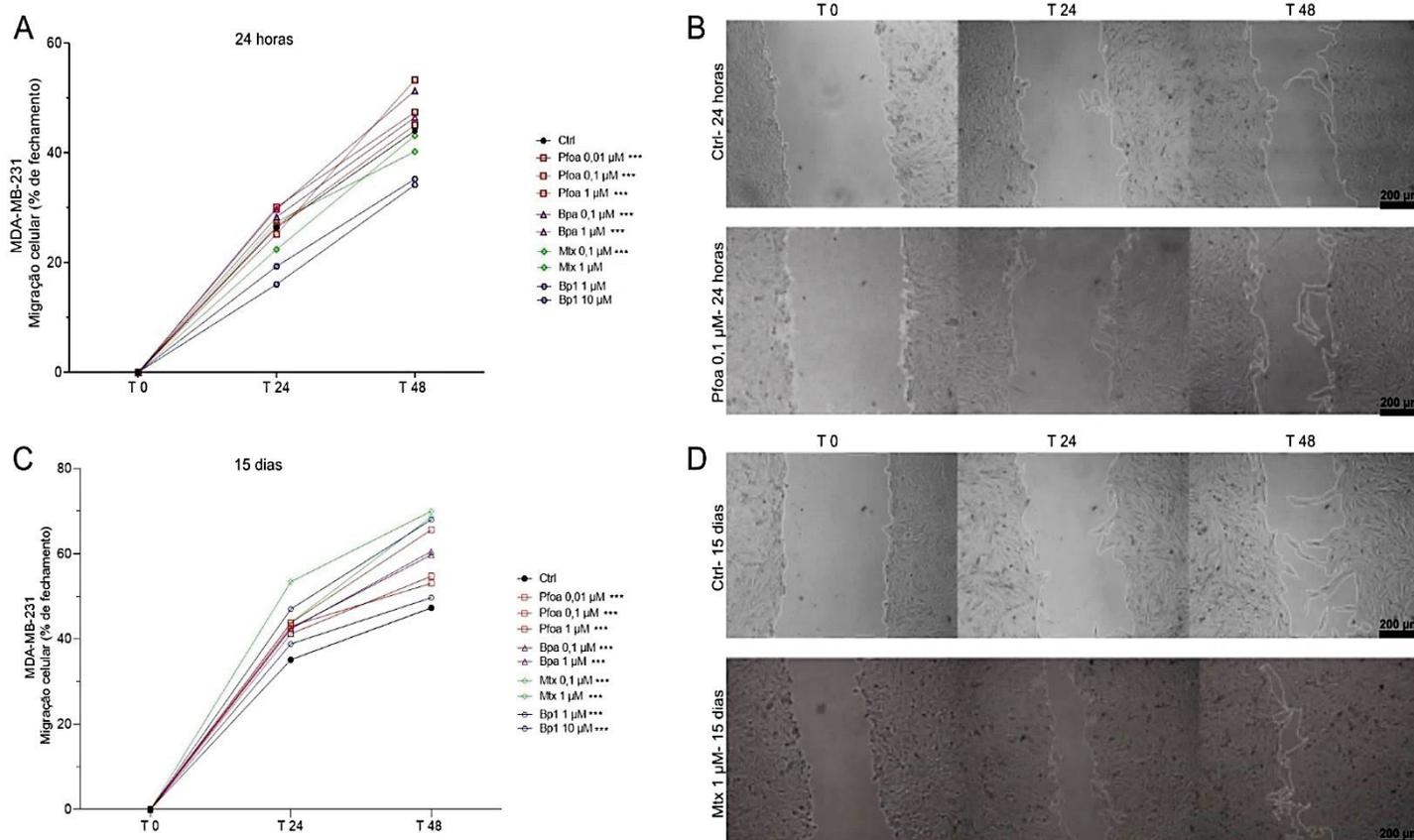


Figura 24. Migração de células MDA-MB-231 expostas aos contaminantes por 24 horas e 15 dias. A: gráfico do ensaio de migração. B: Imagens representativas do ensaio de migração scratch após o período de exposição de 24 horas e 15 dias. Círculo preto: controle. Quadrados pretos: composto Pfoa. Triângulo preto: composto Bpa. Losango preto: composto Mtx. Hexágono preto: composto Bp1. Barra horizontal: média e SD (ou CI95%); Cinco experimentos independentes. Resultados da ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste de Dunn para comparação das concentrações dos contaminantes em relação ao respectivo controle (linha pontilhada). * $p < 0,05$. FONTE: A autora (2024).

Para a linhagem não tumoral MCF10-A, a migração celular não aumentou, sendo assim, os resultados não foram significativos (Figura 25).

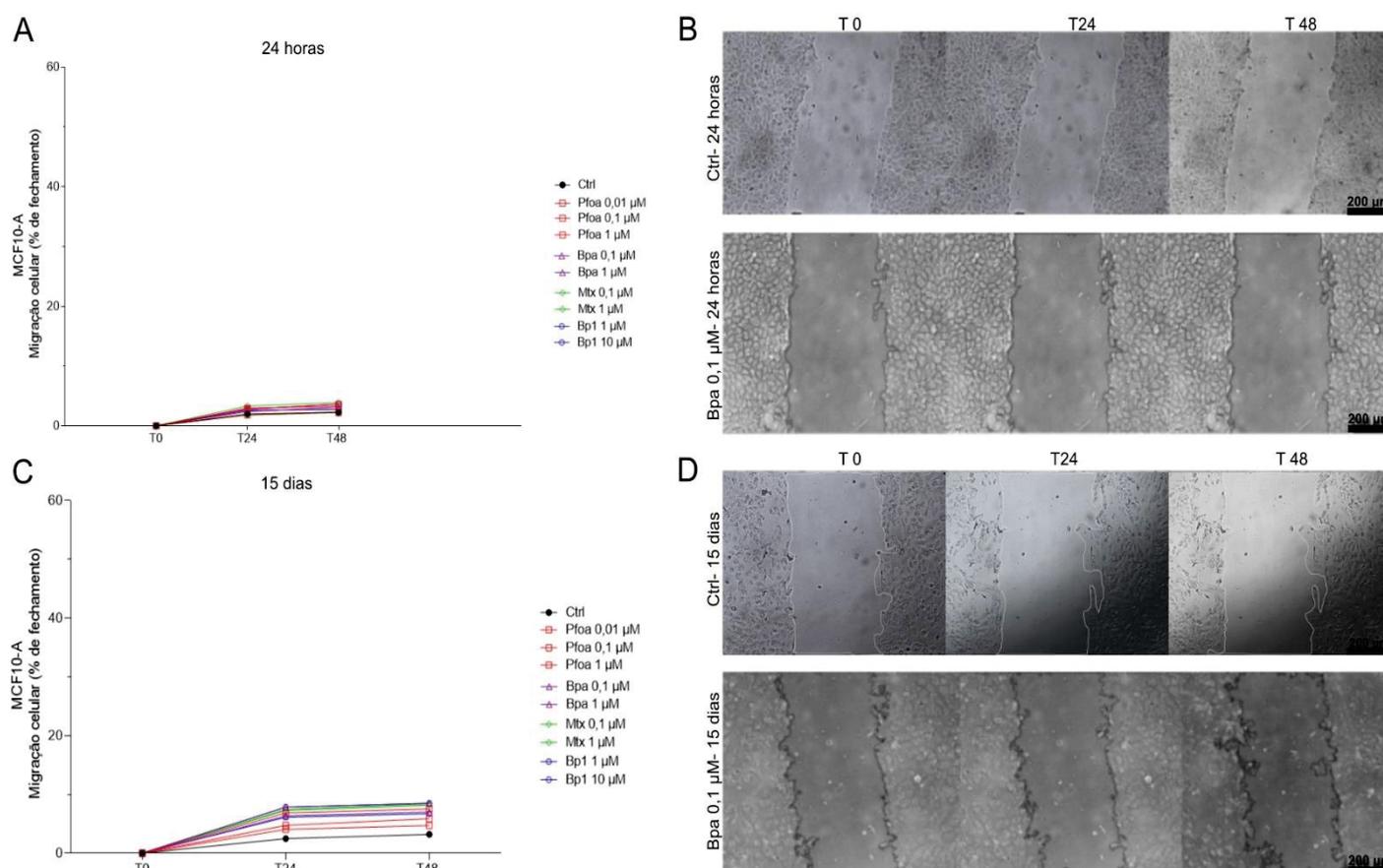


Figura 65. Migração de células MCF10-A expostas aos contaminantes por 24 horas e 15 dias. A: gráfico do ensaio de migração. B: Imagens representativas do ensaio de migração scratch após o período de exposição de 24 horas e 15 dias. Círculo preto: controle. Quadrados pretos: composto Pfoa. Triângulo preto: composto Bpa. Losango preto: composto Mtx. Hexágono preto: composto Bp1. Barra horizontal: média e SD (ou CI95%); Cinco experimentos independentes. Resultados da ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste de Dunn para comparação das concentrações dos contaminantes em relação ao respectivo controle (linha pontilhada). * $p < 0,05$. FONTE: A autora (2024).

O mesmo pôde ser observado para a linhagem MCF-7, que mesmo exposta aos contaminantes por 15 dias, não alterou nenhuma característica que aumentasse a migração destas células (Figura 26).

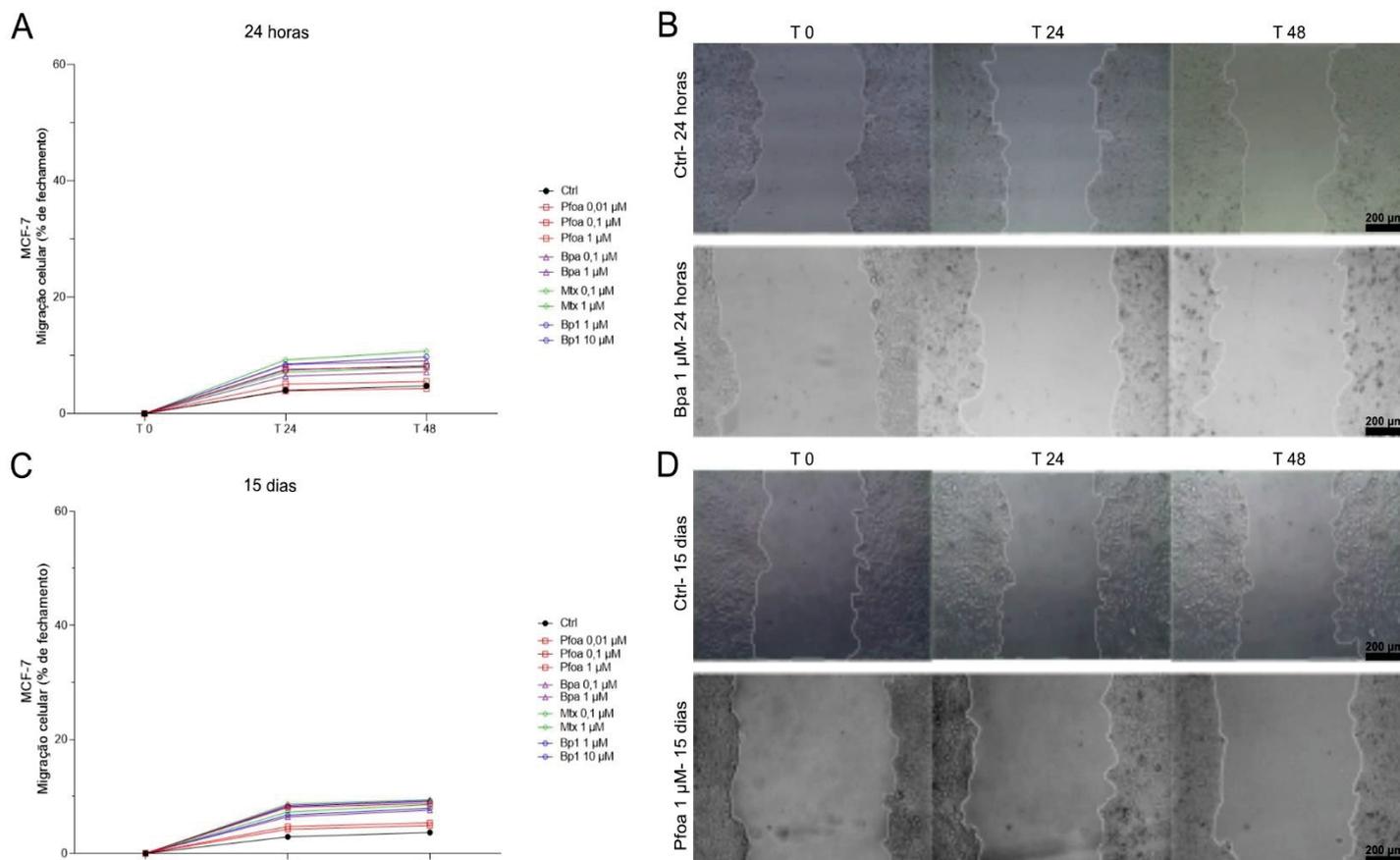


Figura 267. Migração de células MCF-7 expostas aos contaminantes por 24 horas e 15 dias. A: gráfico do ensaio de migração. B: Imagens representativas do ensaio de migração scratch após o período de exposição de 24 horas e 15 dias. Círculo preto: controle. Quadrados pretos: composto Pfoa. Triângulos pretos: composto Bpa. Losangos pretos: composto Mtx. Hexágonos pretos: composto Bp1. Barra horizontal: média e SD (ou CI95%); Cinco experimentos independentes. Resultados da ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste de Dunn para comparação das concentrações dos contaminantes em relação ao respectivo controle (linha pontilhada). * $p < 0,05$. FONTE: A autora (2024).

5.4.3 Invasão celular (*transwell*)

Como foram obtidos resultados significativos para a linhagem MDA-MB-231 no ensaio de migração, foi realizado então o ensaio de invasão em insertos *transwell*, com a finalidade de verificar a capacidade que as células possuem de atravessar uma matriz de matrigel, simulando o processo necessário para células tumorais invadirem outros tecidos. Com isso, realizou-se somente a exposição de 15 dias com a linhagem celular e foi observado um aumento significativo na capacidade de invasão para os compostos: Mtx 1 µM (20%), Bp1 1 µM (30%) e Bp1 10 µM (40%) (Figura 27).

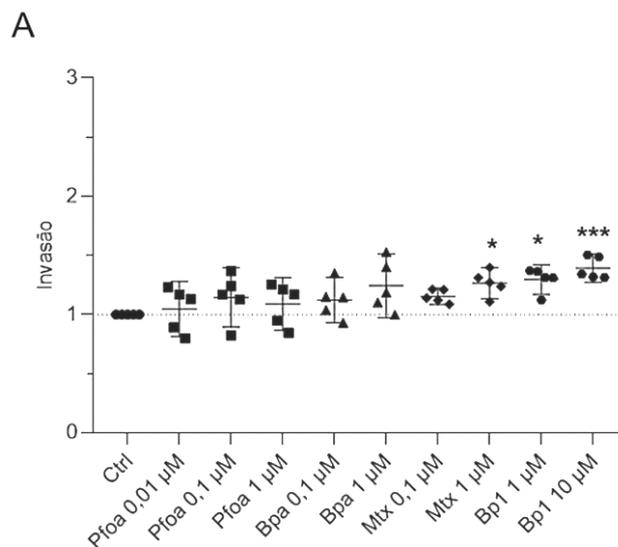


Figura 27. Ensaio de invasão transwell das células MDA-MB-231 expostas aos contaminantes por 15 dias. A: gráfico do ensaio de invasão. B: Imagens representativas do ensaio de invasão após o período de exposição de 15 dias. Círculo preto: controle. Quadrados pretos: composto Pfoa. Triângulos pretos: composto Bpa. Losangos pretos: composto Mtx. Hexágonos pretos: composto Bp1. Barra horizontal: média e SD (ou CI 95%); Cinco experimentos independentes. Resultados da ANOVA + teste de Dunnett para comparação das concentrações dos contaminantes em relação ao respectivo controle (linha pontilhada). * $p < 0,05$. FONTE: A autora (2024).

5.4.4 Proliferação celular (Cell Trace Far Red)

A proliferação das células foi mensurada através do ensaio utilizando um kit de proliferação celular Cell Trace Far Red, da Invitrogen. Com ele é possível determinar o índice de proliferação das células e o número de gerações celulares. Os ensaios foram realizados após exposições de 15 dias aos contaminantes.

A linhagem não tumoral MCF10-A mostrou diferenças significativas somente no índice de proliferação celular, com aumento nos compostos Bpa 1 μM (70%), Mtx 1 μM (80%) e Bp1 1 μM (80%, Fig. 28A), sem alteração no número de gerações (Fig. 28B).

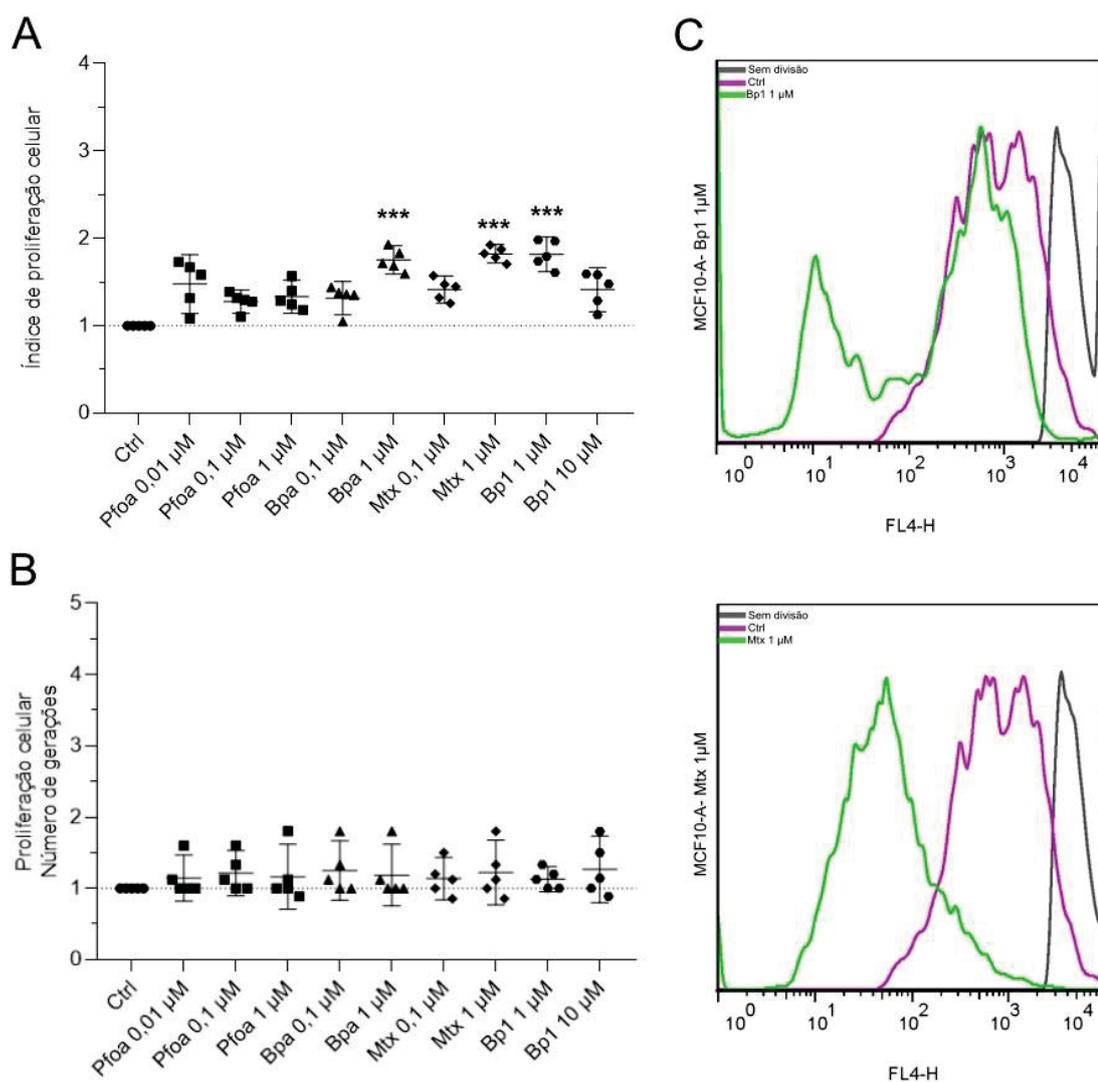


Figura 288. Ensaio de proliferação celular utilizando o marcador Cell Trace Far Red na linha celular MCF10-A. A: índice de proliferação celular. B: Proliferação celular, número de gerações. C: As células MCF10-A foram marcadas com Cell Trace Far Red-CTFR, pico com a linha escura: células que não se dividiram, linha azul: controle, linha laranja: células tratadas com os contaminantes. Exposição crônica (15 dias). Barra horizontal: média e DP (ou IC 95%); ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste post hoc de Dunn para comparar as células tratadas com o respectivo controle (linha tracejada). * $p < 0.05$. N = 5.

Semelhante ao que aconteceu com a linhagem MCF-10A, na qual não houve alterações no número de gerações celulares, houve somente um aumento significativo do índice de proliferação nas células MCF-7 (Fig. 29A) expostas ao Pfoa 0,1 µM (100%) e 1 µM (140%), Bpa 1 µM (110%), Mtx 1 µM (220%), Bp1 10 µM (90%), sem alteração no número de gerações (Fig. 29B).

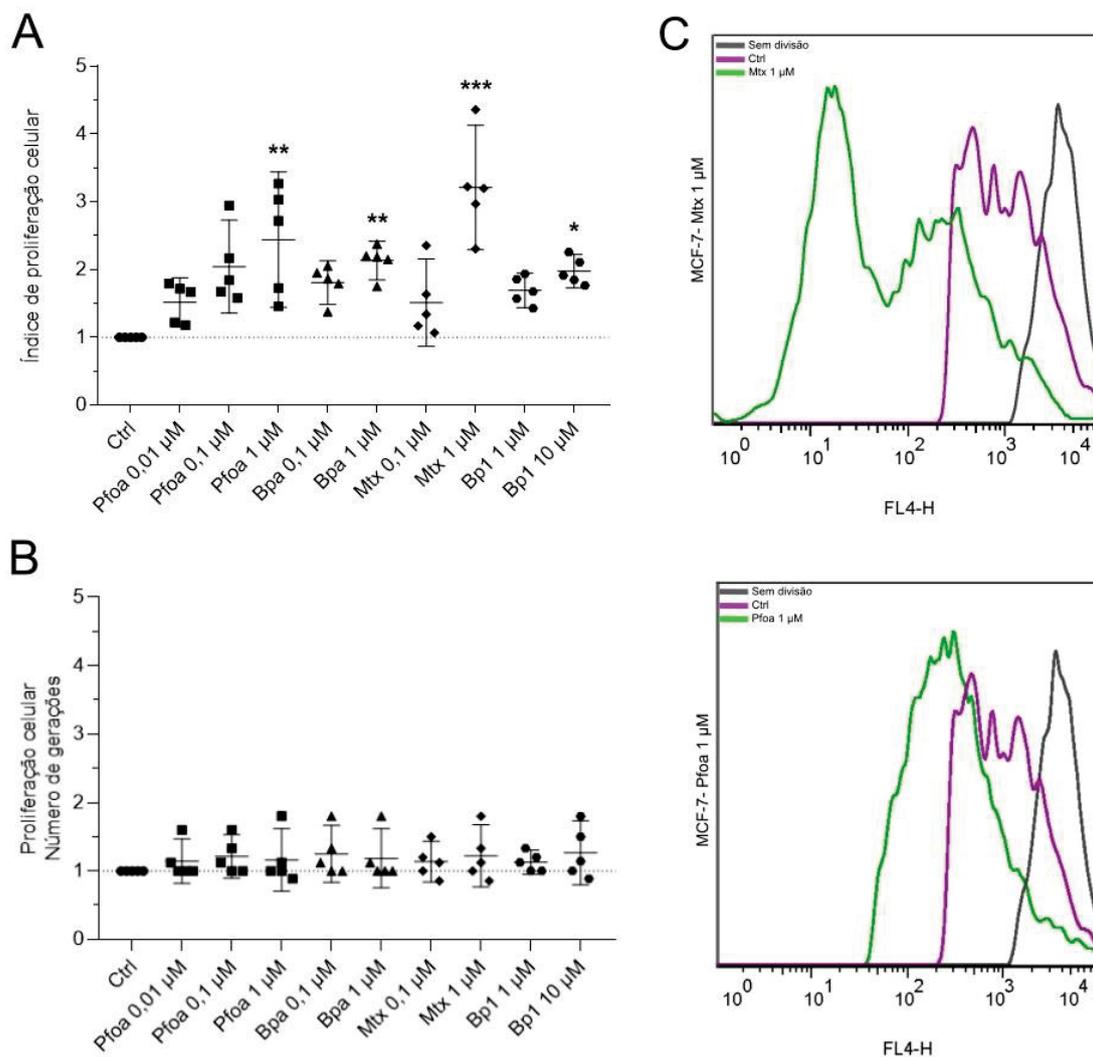


Figura 29. Ensaio de proliferação celular utilizando o corante Cell Trace Far Red na linhagem celular MCF-7. A: índice de proliferação celular. B: Proliferação celular, número de gerações. C: As células MCF-7 foram marcadas com Cell Trace Far Red-CTFR, pico vermelho: células que não se dividiram, linha azul claro: controle, linha laranja: células tratadas com os contaminantes. Exposição crônica (15 dias). Barra horizontal: média e DP (ou IC 95%); ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste post hoc de Dunn para comparar as células tratadas com o respectivo controle (linha tracejada). * $p < 0.05$. N = 5.

Na linhagem triplo negativa MDA-MB-231 houve aumentos significativos tanto no índice de proliferação como no número de gerações celulares. Para o índice de proliferação (Fig. 30A), houve aumento nas células expostas ao Pfoa 0,1 µM (40%) e 1 µM (50%), Bpa 0,1 µM (80%), Bpa 1 µM (70%), Mtx 0,1 µM (50%) e 1 µM (70%), Bp1 1 µM (100%) e Bp1 10 µM (100%). Já para o número de gerações celulares (Fig.

30B), houve aumentos significativos para células expostas ao Pfoa 1 μM (50%), Bpa 0,1 μM (40%), Bpa 1 μM (50%), Mtx 0,1 μM (50%) e Bp1 1 μM (50%).

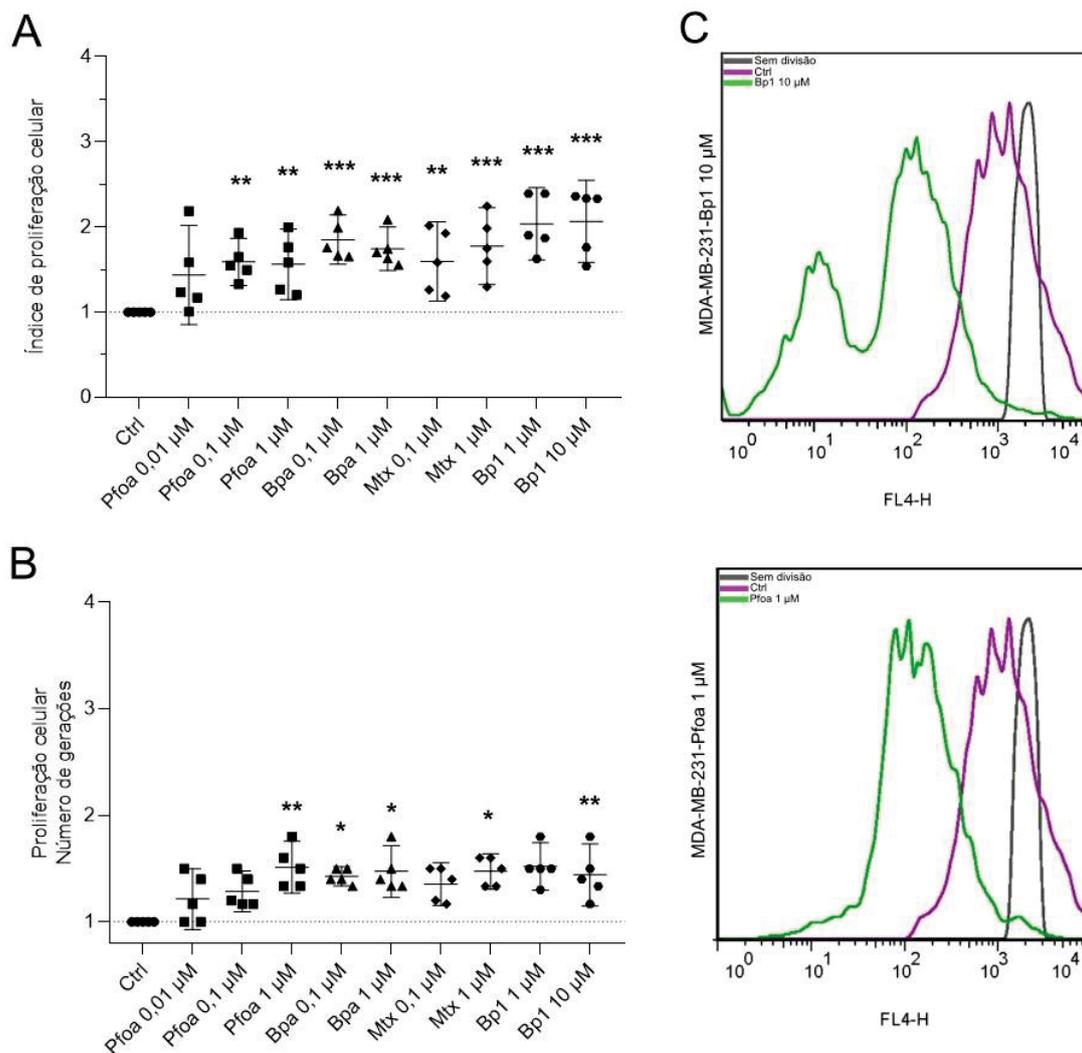


Figura 30. Ensaio de proliferação celular utilizando o corante Cell Trace Far Red na linha celular MDA-MB-231. A: índice de proliferação celular. B: Proliferação celular, número de gerações. C: As células MDA-MB-231 foram marcadas com Cell Trace Far Red-CTFR, pico vermelho: células que não se dividiram, linha azul claro: controle, linha laranja: células tratadas com os contaminantes. Exposição crônica (15 dias). Barra horizontal: média e DP (ou IC 95%); ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste post hoc de Dunn para comparar as células tratadas com o respectivo controle (linha tracejada). * $p < 0.05$. N = 5.

5.5 Expressão gênica- RT-qPCR

As análises de expressão gênica foram realizadas após exposição crônica (15 dias) nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. Na linhagem MCF-7 houve aumentos na expressão dos genes ABCG2 (Fig. 31D): Pfoa 1 μ M (17%), BRCA1 (Fig. 31F): Bp1 10 μ M (17%), ESR2 (Fig. 31G): Pfoa 1 μ M (18%) e Bpa 1 μ M (11%), STAT3 (Fig. 31H): Bpa 1 μ M (20%), Mtx 1 μ M (60%) e Bp1 10 μ M (20%) e VEGFA (Fig. 31I): Bpa 1 μ M (60%), Mtx 1 μ M (50%) e Bp1 10 μ M (50%), sem efeitos para os demais genes (Fig. 31).

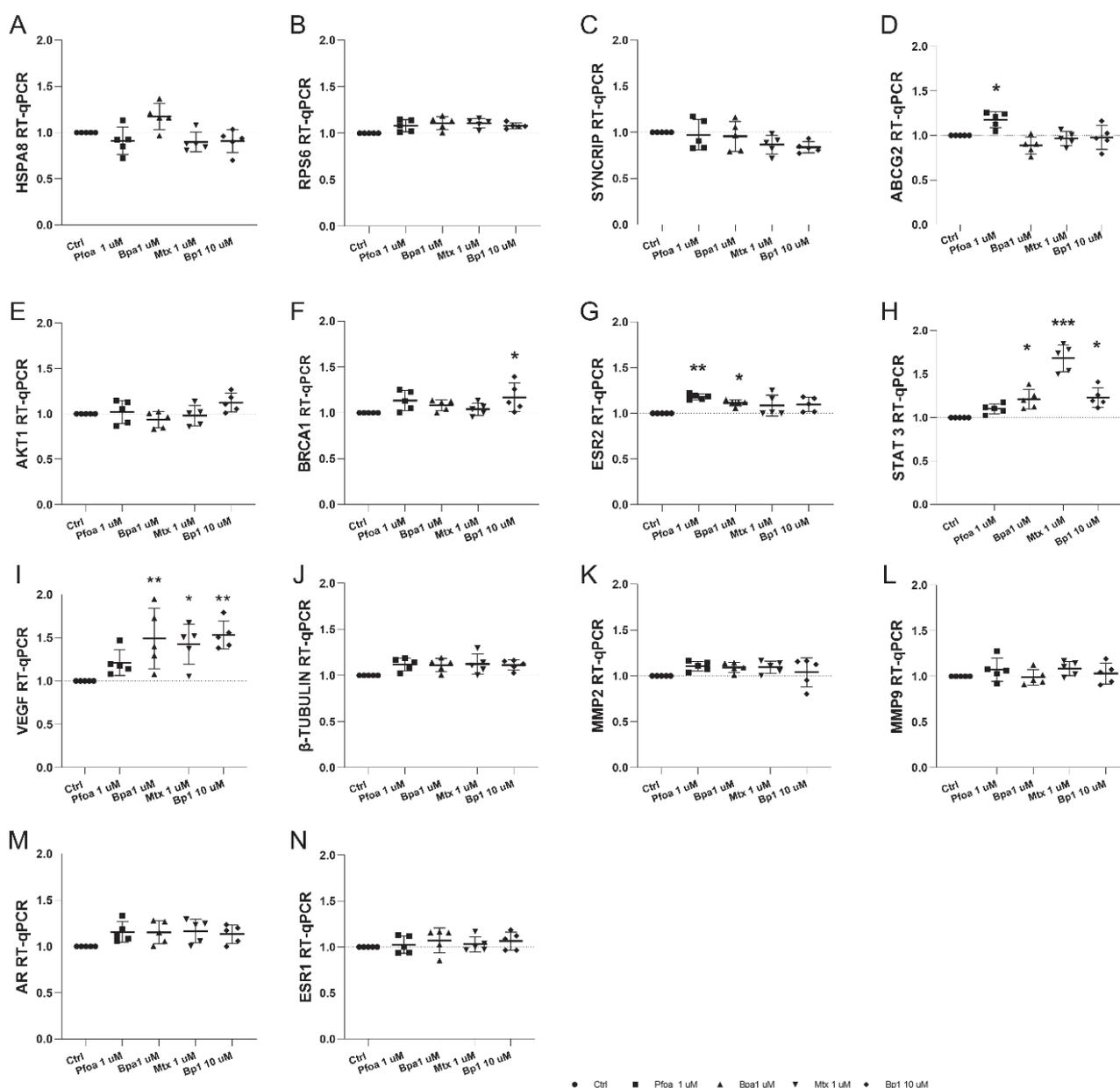


Figura 91. Expressão gênica avaliada por RT-qPCR da linhagem MCF-7. A-N: Expressão de genes relacionados com progressão tumoral. Exposição crônica (15 dias). Barra horizontal: média e DP (ou IC 95%); ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste post hoc de Dunn para comparar as células tratadas com o respectivo controle (linha tracejada). * $p < 0.05$. N = 5.

Para a linhagem MDA-MB-231, houve aumentos significativos para alguns genes (Fig. 32): RPS6 (Fig. 32B): Bp1 10 μM (40%), SYNCRIP (Fig. 32C): Pfoa 1 μM (70%), ESR2 (Fig. 32G): Bpa 1 μM (70%) e Mtx 1 μM (90%), VEGFA (Fig. 32I) Bp1 10 μM (20%). Devido ao fato desta linhagem ser triplo negativa, ela não expressa genes de alguns receptores hormonais, como os genes AR e ESR1 (dados não mostrados).

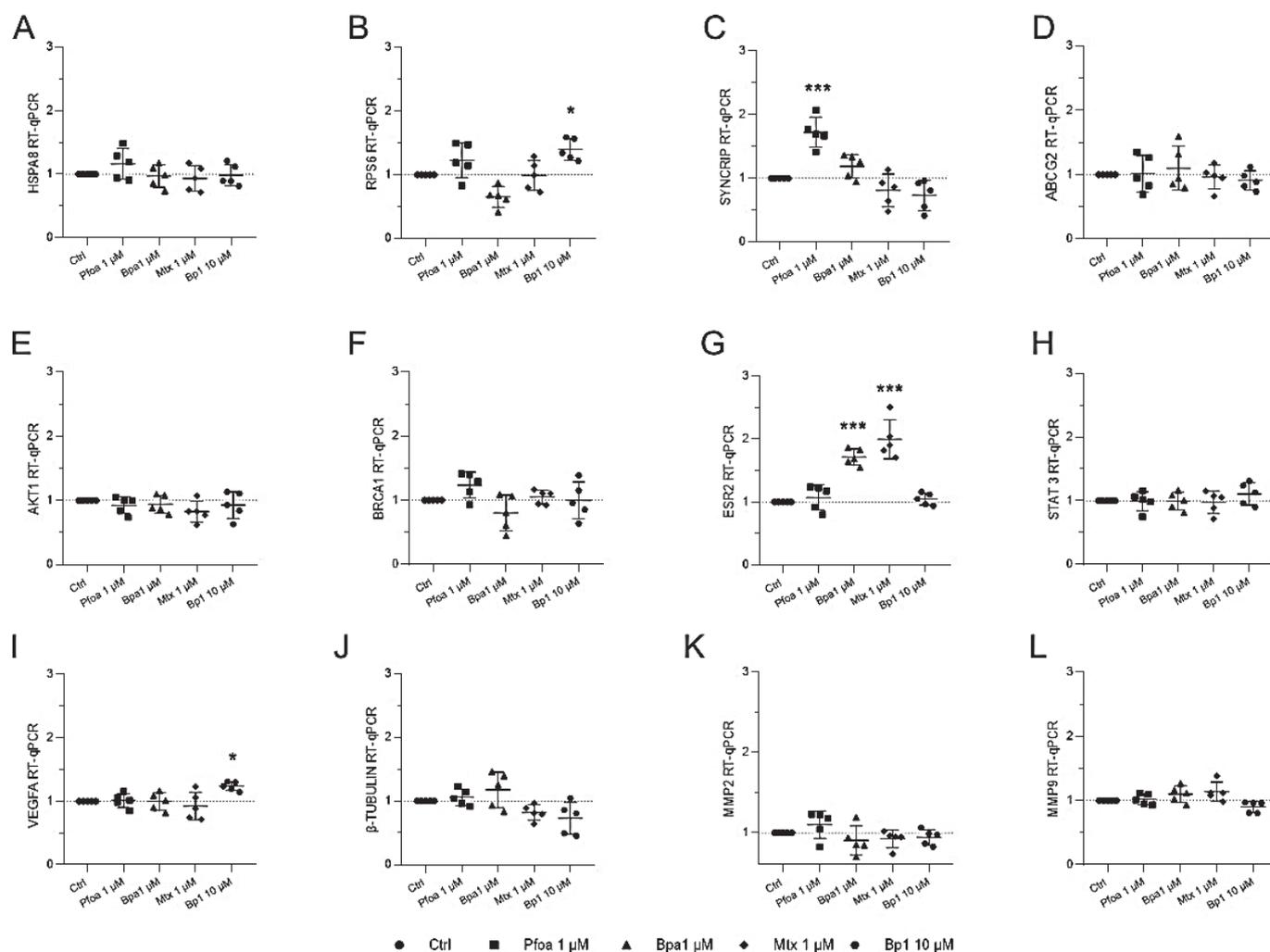


Figura 32. Expressão gênica avaliada por RT-qPCR da linhagem MDA-MB-231. A-L: Expressão de genes relacionados com progressão tumoral. Exposição crônica (15 dias). Barra horizontal: média e DP (ou IC 95%); ANOVA + teste de Dunnett ou Kruskal-Wallis + teste post hoc de Dunn para comparar as células tratadas com o respectivo controle (linha tracejada). * $p < 0.05$. N = 5.

6 DISCUSSÃO

A utilização e exposição frequente de diversos produtos químicos, juntamente com outros elementos associados ao seu uso, pode desencadear um ou mais mecanismos de ação carcinogênica, aumentando assim o risco para a progressão de tumores já existentes e trazendo dificuldades ao tratamento (SARPA e FRIEDRICH, 2022). Na rotina do dia, a população humana acaba exposta a diferentes substâncias químicas, que com o uso aumentado e descarte inadequado resultam no aumento da contaminação do meio ambiente e dos organismos vivos. Algumas dessas substâncias vêm atraindo interesse da comunidade científica, como os contaminantes emergentes, que possuem uma detecção difícil e descoberta e classificação mais recente, graças ao avanço das técnicas de análise (OLIVEIRA, GUILLEN E SILVA, 2022).

Na literatura são poucos os trabalhos que utilizam doses baixas de compostos químicos e estudam seus efeitos em células tumorais após um período de exposição prolongado. Sendo assim, o presente estudo mostrou que a exposição a contaminantes orgânicos (ácido perfluorooctanóico (Pfoa), bisfenol A (Bpa), metoxicloro (Mtx) e benzofenona 1 (Bp1)), que são utilizados em grande escala, alterou características celulares das linhagens tumorais MCF-7 e MDA-MB-231, características estas que estão relacionadas com o aumento da progressão tumoral, como a capacidade de estabelecer colônias, o aumento da proliferação e migração celular, aumento da atividade dos transportadores ABC e expressão de genes envolvidos em processos importantes na modulação do fenótipo celular.

Os resultados apresentados neste estudo reforçam a necessidade de uma nova perspectiva no exame dos riscos associados à exposição a agentes e produtos químicos, aos quais estamos expostos diariamente. Isso indica que a simples investigação dos efeitos diretos ou indiretos da exposição não é suficiente. É essencial também considerar o papel desses contaminantes no prognóstico de doenças graves e de difícil controle, como o câncer.

6.1 As concentrações testadas dos contaminantes emergentes não interferiram na viabilidade das células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF10A.

De início, foi observado alguns sinais de modulação das células MDA-MB-231, MCF-7 e MCF10A pela exposição aos contaminantes emergentes. Esses sinais foram

vistos no aumento das células aderidas pelo ensaio do cristal violeta, metabolismo de desidrogenases celulares pelo ensaio de MTT e pela retenção do corante vermelho neutro nos compartimentos celulares do sistema endolisossomal, sugerindo uma proliferação celular maior ou maior resistência e diminuição da morte celular. As células expostas aos contaminantes em concentrações baixas e ambientalmente relevantes não foram afetadas negativamente; pelo contrário, apresentaram um aumento significativo nos ensaios de cristal violeta, vermelho neutro e MTT após exposição aos contaminantes por 15 dias.

Em especial, o ensaio de MTT avalia a atividade de desidrogenases celulares importantes que podem indicar disfunções de proliferação, diferenciação e morte celular, além de contribuir para a resposta que pode ser alterada quando as células entram em contato com contaminantes químicos (SEDLACKOVA e KOROLCHUK, 2019; XIA e WANG, 2024). O ensaio de retenção do vermelho neutro avalia principalmente a atividade dos lisossomos celulares, que são organelas importantes que abrigam diversas enzimas hidrolíticas, capazes de quebrar diferentes tipos de polímeros biológicos como proteínas, nucleotídeos, carboidratos e lipídios. Essas enzimas atuam em um meio ácido, mantido no interior do lisossomo, e desempenham um papel essencial na digestão interna da célula, na renovação de estruturas celulares e na decomposição de substâncias externas absorvidas por endocitose (ALBERTS, 2015; HU et al. 2015).

O aumento na retenção de vermelho neutro pode sugerir um mecanismo de autofagia que juntamente com outros mecanismos facilita a progressão tumoral promovendo os fenótipos malignos ao regular a proliferação, invasão e resistência a tratamentos, interferindo em fatores de crescimento e no fornecimento de nutrientes para as células (ZHANG et al. 2021; DAVIDSON e HEIDEN, 2017).

As células tumorais também fazem uso do processo de autofagia, muitas vezes de forma ainda mais intensa que as células e tecidos saudáveis. Ao funcionar como um sistema de controle de qualidade durante a falta de nutrientes e diversas outras situações de estresse celular, esse processo frequentemente auxilia na preservação da célula. Esse mecanismo pode favorecer tanto o desenvolvimento quanto a resistência do tumor por diversas vias. Um exemplo disso é o papel fundamental da autofagia na adaptação metabólica das células cancerosas e na sua capacidade de escapar da resposta imunológica. Diversas evidências indicam que uma autofagia desregulada pode promover a propagação das células precursoras do câncer,

apoiando a multiplicação das células malignas e impulsionando o avanço do tumor (WHITE, 2015; YUN e LEE, 2018; DAS, MANDAL E KÖGEL, 2018; ARIOSIA et al., 2021; DEBNATH, GAMMOH E RYAN, 2023).

Estudos indicam que a autofagia pode aumentar a agressividade dos tumores, facilitando a disseminação metastática. Além disso, como um mecanismo de proteção celular, a autofagia pode diminuir a eficácia da maioria dos tratamentos quimioterápicos. Em particular, a capacidade das células cancerosas de se adaptarem a diversas situações de estresse celular provocadas por terapias anticâncer é crucial para sua resistência aos tratamentos. Dentre os vários mecanismos de resistência terapêutica, a autofagia se destacou como um fator especialmente relevante para a sobrevivência das células malignas, comprometendo a eficácia de diversas abordagens terapêuticas. Dado que a resistência à quimioterapia pode ser influenciada pelo grau de agressividade das células tumorais, a função multifacetada da autofagia na regulação do crescimento e da metástase é de suma importância (DAS, MANDAL E KÖGEL, 2018; LI, HE e MA, 2020; TAM et al., 2021; QIN et al., 2023

Esses achados mostram que as concentrações testadas dos contaminantes, que são semelhantes às concentrações encontradas no plasma sanguíneo humano (MICHALOWICZ, 2014; CABRERA-RODRÍGUEZ et al. 2020; ARBUCKLE et al. 2013; WANG et al. 2016), não são citotóxicas *in vitro*.

6.2 Os contaminantes químicos alteram a atividade dos transportadores de efluxo de drogas, importantes na aquisição do fenótipo MDR.

A eficácia da quimioterapia é um desafio na oncologia clínica. A resistência a múltiplos fármacos (MDR) pode ser causada por vários mecanismos, contudo, nas células tumorais é caracterizada pela resistência e efluxo de uma variedade grande de medicamentos (ASSARAF et al. 2019; LI et al. 2016). As proteínas da superfamília ABC (*ATP binding cassette*) incluem vários transportadores de efluxo de drogas e xenobióticos, com destaque para a BCRP (proteína de resistência ao câncer de mama, codificada pelo gene ABCG2), a P-gp (glicoproteína-P, codificada pelo gene ABCB1) e a MRP1 (proteína 1 associada à resistência a múltiplas drogas, codificada pelo gene ABCC1) (MAO e UNADKAT, 2015).

O aumento na atividade dos transportadores de efluxo pode ter influenciado as células expostas aos contaminantes a estabelecer uma maior resistência ao estresse

químico e, ao conferir esta, o prognóstico do paciente com câncer tende a piorar, uma vez que a capacidade das células de reter o quimioterápico é comprometida, transportando maiores quantidades das drogas para o meio extracelular (POPOVA et al., 2019; ROBEY et al., 2018).

Ainda que os ensaios de efluxo de drogas da linhagem MCF-7 (Hoechst 33342, calceína-AM e Rodamina B) não tenham mostrado efeitos significativos, a expressão do gene ABCG2 foi alterada na exposição de 15 dias para o composto Pfoa, o que mostra um possível aumento da atividade de efluxo deste transportador e, conseqüentemente, maior resistência ao tratamento com alguns quimioterápicos. Pelo fato da MCF-7 ser uma linhagem que não possui características como capacidade de invasão e migração e não ser tão agressiva quando comparada com a linhagem MDA-MB-231, nota-se que o efluxo de drogas para esta linhagem não foi alterado como ocorreu com a linhagem triplo negativa (MDA-MB-231) que já possui uma maior resistência à quimioterapia e quando exposta aos contaminantes durante 15 dias, teve um aumento das atividades das proteínas P-gp, MRP e ABCG2, provavelmente tornando-se ainda mais resistente.

O aumento da atividade destas proteínas acima citadas, revela que a exposição crônica aos contaminantes químicos Pfoa, Bpa, Mtx e Bp1 pode estar associada à promoção da resistência aos quimioterápicos (ANIOGO, GEORGE e ABRAHAMSE, 2019). Além disso, isso é particularmente perigoso no caso do câncer de mama triplo negativo que normalmente já não responde bem aos tratamentos. Assim, com a exposição o prognóstico de uma pessoa acometida com esse câncer pode piorar.

Alguns trabalhos já relataram que a exposição a pesticidas e alguns poluentes persistentes modula a expressão dos transportadores de efluxo de drogas em células tumorais. Os compostos BDE-209 (decabromodifenil éter) e TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina) modulam a expressão de proteínas ligadas ao efluxo de drogas em células de melanoma murino B16-F1 (DE SOUZA SALGADO et al. 2018; DE MARCHI et al. 2021). O estudo realizado por Roque et al. 2023 mostrou que a exposição a pesticidas levou a uma regulação positiva dos genes ABCB1, ABCC1 e ABCC4, que codificam as proteínas P-gp, MRP1 e MRP4, demonstrando um aumento da atividade de efluxo destes transportadores. Ainda, a exposição de células tumorais durante 15 dias a compostos retardantes de chamas, como o BDE-47, levou ao aumento da expressão (níveis de mRNA) do transportador ABCC2 (MRP2) (STEIL et al. 2022). Ainda, estudos demonstram que os pesticidas organoclorados alteram a

expressão do transportador ABCG2 (BCRP) (BIRCSAK et al., 2012). No caso do referido trabalho, ocorreu um aumento na expressão deste transportador na linhagem MDA-MB231 após exposição ao composto metoxicloro, mas não houve aumento da expressão gênica de ABCG2 com a mesma linhagem.

Estudos descritos por Mazur e colaboradores (2012, 2014) mostraram que algumas substâncias químicas, incluindo o Bpa interagem com os transportadores ABC, agindo como potenciais substratos ou inibidores destes transportadores. No presente estudo, a exposição ao Bpa levou a um leve aumento no ensaio de efluxo da rodamina B (24 h) e aumento importante no ensaio da calceína-AM (15 dias). Com os resultados deste trabalho, nota-se que pode ocorrer uma maior atividade de efluxo de substâncias das células tumorais, o que pode incorrer em dificuldade no tratamento quimioterápico

Em tecidos saudáveis, os transportadores ABC protegem as células de xenobióticos tóxicos e permitem o efluxo de vários metabólitos endógenos como como ácidos biliares, hormônios esteróides, fosfolipídios e produtos de degradação de fármacos. Dessa forma, os transportadores ABC mantêm a homeostase celular e protegem o organismo contra potenciais danos. Além disso, realizam o transporte de mediadores inflamatórios e atuam na defesa contra o estresse oxidativo (NEDELJKOVIĆ et al., 2021). O presente estudo mostrou um aumento da atividade de efluxo de calceína-AM na exposição crônica da linhagem MCF10A ao contaminante químico BP1, podendo estar associada a um aumento do efluxo de solutos através da membrana das células. Na exposição aguda ocorreu uma diminuição significativa na atividade da proteína MRP, o que diminui a capacidade que a célula possui de proteção e transporte de substâncias, resultado este que não é contínuo, visto que com exceção de BP1, este resultado não se manteve na exposição mais prolongada.

6.3 Os contaminantes químicos alteram mecanismos relacionados com a progressão tumoral e expressão gênica

É de grande relevância entender como os mecanismos de migração das células funcionam pois, este processo pode gerar um quadro pior do prognóstico da doença e para o tratamento (FONTANELLA et al., 2015). A migração celular não foi alterada nas linhagens MCF-7 e MCF10-A, o que já era esperado pelo fato de as duas linhagens terem uma capacidade migratória bastante reduzida, o que muitas vezes

faz com que linhagem MCF-7 seja utilizada como um controle negativo de migração (COMSA, CÎMPEAN e RAICA, 2015).

No presente estudo, a migração foi avaliada em ambas as linhagens, MCF10-A e MCF-7, para testar a hipótese de que os contaminantes poderiam alterar a capacidade de migração das mesmas. Já para a linhagem MDA-MB-231, a exposição aos contaminantes emergentes aumentou a migração, o que é preocupante, dado que esta linhagem já possui capacidades altas de migração e invasão. Alguns compostos como Mtx e Bp1 levaram a uma atividade reduzida quando comparado ao controle na migração das células triplo negativas, quando expostas somente por 24 horas. No entanto, quando expostas a estes compostos por um tempo maior (15 dias), ocorreu o inverso; houve um aumento significativo da migração das células expostas.

Castilho Sanchez e colaboradores (2016) demonstraram que o composto Bpa promove aumento da migração através de uma via dependente de GPER, induzindo a ativação de vias de transdução de sinal, que medeiam a migração (FAK, Src e ERK2) em células de câncer de mama MDA-MB 231. Um estudo de 2023 relatou que o Pfoa pode promover a migração e invasão de células de câncer de mama ativando as vias PI3K/AKT e MAPK/ERK através de dois receptores de estrogênio, ER α e receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER) e alterando também as metaloproteinases de matriz 2 e 9 (LIU et al. 2023).

Os tumores de mama expressam GPER em 50-60% e sua expressão está associada ao aumento do tamanho do tumor, formação de metástases e mau prognóstico (HSU et al., 2019; PROSSNITZ e BARTON, 2014). Aqui, o molecular docking revelou uma energia alta de ligação dos compostos Pfoa, Bpa, Mtx e Bp1 para o receptor GPER, o que pode ter influenciado no aumento significativo da migração das células MDA-MB-231 (tabela 2).

Ainda, a exposição ao Bpa em linhagens triplo negativas pode aumentar a expressão de proteínas e mRNA de metaloproteinases de matriz (MMP2 e MMP9), interferido na capacidade de migração das células (ZHANG et al. 2016). Contudo, isso não foi observado no presente estudo. Embora a energia de ligação dos compostos seja alta (tabela 3), o que em princípio indicaria a possibilidade de interação com as MMP2 e 9, não ocorreu um aumento da expressão de ambas MMP. Ainda na Tabela 3, nota-se que além de ter uma energia de ligação com as MMP's, os compostos ainda possuem energias iguais ou superiores com os inibidores destas metaloproteinases, TIMP1 e TIMP2, o que pode ter corroborado para que a expressão das mesmas não

fosse significativa, uma vez que estariam sendo inibidas.

Um trabalho de docagem molecular relatou que o composto Bpa possui afinidades de ligação com metaloproteinase-13 (MMP-13) e inibidor de metaloproteinase 3 (TIMP-3) de $-8,0$ e $-8,4$ kcal/mol, e com o receptor de estrogênio (ER) de $-8,1$ kcal/mol (MONTES-GRAJALES E OLIVERO-VERBEL, 2013; KIM e CHOI, 2019), valor bem superior ao que encontramos no presente estudo.

Ainda que não tenha ocorrido alterações nos ensaios de migração das células MCF10-A e MCF-7, no ensaio de proliferação celular houve aumento do índice de proliferação das células, sugerindo uma taxa maior de crescimento celular. Segundo Calaf (2021), um aumento de proliferação celular pode refletir em um aumento e/ou surgimento de carcinogenicidade. Contudo, uma mudança para um fenótipo mais agressivo envolve diversas características das células, de modo que o aumento de proliferação observado para a linhagem não tumoral MCF10A, se não associado a outras alterações associadas a transformação celular, levaria a uma hiperplasia tecidual, isto é, aumento de células normais num tecido, ao invés de carcinogenicidade. Já para as linhagens MCF-7 e MDA-MB231, que representam células tumorais, esse aumento da proliferação pode levar a uma maior progressão tumoral. Ademais, outras características alteradas nessas duas linhagens celulares, suportam essa hipótese.

A taxa de proliferação celular influencia diretamente o crescimento tumoral e a agressividade do câncer. À medida que as células cancerosas multiplicam mais rapidamente, elas também tendem a desenvolver maior capacidade de migração, invasão de tecidos vizinhos e formação de colônias em locais distantes, facilitando o estabelecimento de metástases. Esse processo permite que as células tumorais não apenas cresçam no local original, mas também se espalhem para outras partes do corpo, formando novos tumores. Assim, a combinação entre alta proliferação celular e capacidade invasiva torna o câncer mais difícil de tratar e aumenta o risco de recidiva (NISHIDA et al., 2006; NORTON e POPEL, 2016; GALLAHER, BROWN e ANDERSON, 2019; LIU et al., 2023).

Alguns trabalhos já relataram que a exposição a estes compostos aumenta a capacidade de proliferação, formação de colônias e adesão das células tumorais, ainda que, diferente deste estudo, as concentrações tenham sido maiores ou o tempo de exposição tenha sido relativamente menor. Estudos realizados com o composto Benzofenona-1 demonstraram que ocorre um aumento de proliferação de células

tumorais (PARK et al. 2013; IN et al. 2015). Os compostos Bpa e Mtx também levaram a alterações na proliferação de células tumorais de mama, acelerando a progressão do ciclo celular (DENG et al. 2021; LEE et al. 2013).

Neste trabalho, utilizando concentrações menores do composto Pfoa não foi observado mudanças no fenótipo das células não tumorais da linhagem MCF10-A, no entanto, um estudo realizado com a mesma linhagem em 2018 notou tais mudanças (PIEROZAN, JERNEREN e KARLSSON,2018). Contudo as concentrações do composto eram bem maiores que as utilizadas neste trabalho (50 e 100 μM), sendo possível notar uma maior taxa de crescimento em comparação aos controles. O Pfoa promoveu a proliferação das células MCF10-A e aumentou os níveis de ciclina D1 e CDK4/6, concomitantemente com uma diminuição de p27 (PIEROZAN, JERNEREN e KARLSSON,2018). Ainda, o composto Bpa foi capaz de induzir transformações neoplásicas de células epiteliais mamárias normais, na concentração de 10 μM expostas durante 16 dias (FERNANDEZ e RUSSO, 2010). Como as concentrações dos compostos no presente estudo foram menores, não foram observadas alterações significativas na maioria dos ensaios com a linhagem de mama normal MCF10-A.

A expressão de genes como STAT3, BRCA1, RPS6 e SYNCRIP aumentaram na linhagem MCF-7 (STAT3 e BRCA1) e na linhagem triplo negativa MDA-MB231 (RPS6 e SYNCRIP). O ativador da transcrição 3 (STAT3) possui um papel importante na sobrevivência celular, proliferação, migração e respostas de diferenciação, assim como o BRCA1 possui funções importantes na instabilidade genômica e homeostase celular influenciando uma série de processos como a diferenciação das células. Ainda, nas duas linhagens ocorreu a expressão do gene VEGFA, que não é apenas um fator angiogênico potente, mas também um fator de sobrevivência para células endoteliais, e a sua ativação e de genes associados à proliferação está associada à progressão e desenvolvimento de tumores (RODRÍGUEZ-BARRUECO et al., 2015; ZENG et al., 2016; LIN et al., 2020; HEICHLER et al., 2020; WANG et al., 2023, ZHANG et al., 2023).

Um estudo realizado por Li et al. (2024) com linhagens celulares de câncer colorretal mostrou que o gene SYNCRIP está relacionado ao aumento da proliferação celular e à tumorigênese, o que pode estar relacionado por exemplo, com os aumentos no índice de proliferação e número de gerações e na migração da linhagem MDA-MB-231 exposta ao composto Pfoa, sendo que a exposição ao Pfoa resultou em aumento na expressão do gene SYNCRIP (LI et al., 2024).

O composto Bp1 também provocou alterações significativas no índice de proliferação e número de gerações, migração e invasão das células MDA-MB-231. Ainda, este composto levou a uma expressão alta do gene RPS6, que está relacionado com a regulação da parada do ciclo celular, proliferação celular, migração e invasão celular, apoptose, reparo de danos ao DNA, transformação maligna e tumorigênese (XU, XIONG e SUN, 2016; HIRASHITA et al., 2020; YI et al., 2021), o que pode ter influenciado nas alterações observadas nos ensaios com a linhagem MDA-MB-231.

Ainda, houve alterações na expressão do receptor de estrogênio 2. Muitas das preocupações que permeiam o uso e exposição a contaminantes químicos atualmente é a capacidade que estes possuem de desregulação endócrina, principalmente em tecidos responsivos a hormônios. Compostos considerados desreguladores endócrinos são capazes de "mimetizar" ou inibir ações de hormônios naturais, como o estrogênio. Alguns compostos como bisfenol-A, organoclorados como o Mtx, compostos fluorados como o Pfoa e benzofenonas são compostos que apresentam fortes atividades estrogênicas e afetam diversos processos fisiológicos em órgãos que respondem ao estrogênio (LECOMTE et al. 2017).

Neste estudo, a exposição aos compostos Pfoa, Bpa e Mtx aumentaram a expressão do receptor de estrogênio beta (ESR2) nas células MDA-MB-231 (triplo negativas) e MCF-7 (que são dependentes de hormônio), o que é bastante relevante, pois o receptor ESR2 pode afetar o crescimento tumoral e formação de metástases por meio de um aumento na proliferação, neovascularização e angiogênese por células endoteliais. Neste sentido, a regulação do fator pró-angiogênico VEGF pode representar uma das principais vias moleculares responsáveis pelo efeito angiogênico de ESR2 durante o desenvolvimento e progressão do câncer de mama (RAJORIA et al. 2011; ARNAL et al. 2017).

O papel do receptor de estrogênio beta (ESR2) no câncer de mama é controverso, uma vez que tanto funções proliferativas quanto antiproliferativas foram descritas, o que pode ser explicado pela existência de diferentes isoformas do receptor. No câncer de mama triplo negativo, o ER β está presente em 15-30% das amostras de tecido. Entre as isoformas, a mais bem estudada é a ER β 1, que parece inibir o crescimento e a metástase, enquanto a ER β 2, associada à degradação do ER α via proteassoma, está correlacionada com características agressivas e recorrência precoce do tumor (WIMBERLY et al., 2014; SELITTO et al., 2020;

MONACO et al., 2021; SHEN et al., 2023).

As isoformas ER β 2, ER β 4 e ER β 5 podem formar dímeros com ER β 1, modulando sua atividade transcricional e aumentando a sinalização hipóxica (mecanismo esse que frequentemente é associado à progressão e à agressividade tumoral, pois permite que as células cancerosas sobrevivam em ambientes com baixo oxigênio), um fator relacionado à agressividade tumoral. Embora o papel do ER β na sinalização de estrogênio ainda não seja completamente compreendido, variantes truncadas como ER β 2 e ER β 5 estão associadas à proliferação e migração das células triplo negativas, tornando-as alvos moleculares promissores para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas de precisão no tratamento do câncer triplo negativo (WIMBERLY et al., 2014; SELLITTO et al., 2020; MONACO et al., 2021; SHEN et al., 2023).

Pesquisadores argumentaram que o ER α não é o único fator relevante no papel do ER β no câncer de mama. Um estudo de 2022 mostrou o efeito do ER β dependente de ligantes e observou que em células MCF-7 o ER β estimulou a proliferação celular (SONG et al., 2022), o que pode estar influenciando no aumento da proliferação destas células, e os aumentos da migração, invasão e formação de colônias nas MCF-7 expostas aos contaminantes no presente estudo.

A formação de colônias depende principalmente da capacidade das células de se estabelecer e sobreviver em baixa densidade, e proliferar (STEIL et al. 2022), o que explica a relação mútua dos resultados de formação de colônias e de proliferação no nosso estudo. A linhagem não tumoral não apresentou resultados significativos na formação de colônias, o que pode estar associado, entre outros fatores, ao fato de representarem células normais (não tumorais) imortalizadas que possuem um tempo de duplicação prolongado e necessidade de muito mais ancoragem para se estabelecer e proliferar. No presente estudo, empregou-se a proposta de Vandersickel et al. (2011), que considera uma colônia celular um agrupamento de no mínimo 50 células, o que requer um total de pelo menos 6 ciclos celulares (6 divisões) consecutivos a partir de uma única célula para formar uma colônia.

Diante disso, dependendo do tipo de célula utilizada, pode haver uma demora de várias semanas até que seja possível avaliar a capacidade de formação de colônias, não somente os 6 dias do ensaio que foram realizados, e por mais que em algumas concentrações os compostos tenham alterado o índice de proliferação desta linhagem, não foi suficiente para fazer com que a mesma formasse colônias. O

contrário pôde ser observado na linhagem MDA-MB-231, que por ser mais agressiva, acabou não formando colônias características, e sim migrando bastante pela placa. Esta linhagem apresentou aumentos significativos no ensaio de cristal violeta, expressão de genes relacionados com proliferação celular, migração e invasão quando expostas aos contaminantes, e portanto, a agressividade da linhagem aumentou. Diante disso, podemos dizer que, ou os 6 dias do ensaio de formação de colônias representam muito tempo, pois as células desfazem as colônias e começam a migrar pela placa, ou devido ao fato do tempo ser curto, elas migrem logo após as divisões.

Já a linhagem MCF-7, como não possui a capacidade de migrar, acaba estabelecendo-se na placa e formando colônias conforme as células proliferam. Como os índices de proliferação desta linhagem foram alterados, alguns resultados do ensaio inicial de cristal violeta e expressão gênica também favorecem o aumento da proliferação destas células e maior capacidade de sobrevivência, refletindo no ensaio de formação de colônias. Um estudo realizado em 2023, mostrou que em uma exposição de 38 semanas ao composto Pfoa, as células desenvolveram colônias maiores e mais numerosas, além de aumentos significativos na expressão da proteína c-MYC e do regulador do ciclo celular ciclina D1 (QU et al. 2023). Concentrações nanomolares dos compostos Mtx e Bpa também aumentaram a formação de colônias da linhagem MCF-7 exposta por um período de 2 meses, além de aumentar a expressão do gene STAT3 (NAIR et al., 2020).

Os dados apresentados neste estudo indicam que as exposições a contaminantes químicos, frequentemente presentes em produtos de uso cotidiano e aos quais a população humana está exposta por diferentes vias, alteram o fenótipo das células tumorais de mama das linhagens MCF-7 e MDA-MB-231, além de modificarem algumas características da linhagem epitelial normal de mama MCF10-A. Esses resultados ressaltam a importância de investigar a ação dos contaminantes ambientais em tumores já estabelecidos, considerando que a maioria dos estudos se concentra no potencial carcinogênico desses compostos. Assim, a hipótese de que esses contaminantes modulam o fenótipo tumoral foi confirmada pelos resultados apresentados e discutidos. No entanto, são necessários mais experimentos para elucidar com maior precisão as vias envolvidas e os mecanismos dessas alterações. Estudos futuros *in vivo* ou com cultura celular tridimensional (esferoides) seriam valiosos para um entendimento mais aprofundado dessas mudanças.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo revelou que a exposição de 24 horas e 15 dias aos contaminantes emergentes (Pfoa, Bpa, Mtx e Bp1) que estão muito presentes no cotidiano da população e que já foram identificados em diferentes estratos (como solo e água) e ainda, detectados em amostras de sangue, leite, cordão umbilical, placenta e urina humana, modulou o fenótipo de células de tumor de mama MCF-7 e MDA-MB-231 tornando-as mais agressivas. Notavelmente, a expressão de genes relacionados com a progressão tumoral, como proliferação (VEGFA, STAT3, RPS6, SYNCRIP) e resistência a múltiplas drogas (ABCG2), a proliferação celular, atividade de transportadores envolvidos no efluxo de drogas, migração, invasão celular e formação de colônias indicam que há uma modulação do fenótipo das células de tumor mamário. Além disso, essa modulação foi maior nas células já muito agressivas (MDA-MB-231), intermediária nas células tumorais menos metastáticas e agressivas (MCF-7) e muito menor nas células não tumorais (MCF-10A). Assim, em conjunto, estes dados mostram que a exposição prolongada a contaminantes químicos pode influenciar e modular o fenótipo de malignidade tumoral, a progressão tumoral e ainda, dificultar o tratamento quimioterápico, caso a mesma modulação ocorra *in vivo*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o aumento da utilização de contaminantes químicos, a exposição aos mesmos vem crescendo cada vez mais. Em sua maioria, os contaminantes químicos emergentes e poluentes orgânicos persistentes possuem um descarte incorreto e são difíceis de detectar nas estações de tratamento de água e esgoto. Com isso, muitos destes contaminantes acabam entrando em contato com a população humana por diversas vias, ampliando as fontes de exposição humana. Os contaminantes químicos estudados neste trabalho já foram detectados em concentrações variáveis no sangue humano, cordão umbilical, leite materno, placenta, urina, entre outros. Muitos trabalhos estão relatando os efeitos da exposição a esses compostos na promoção e surgimento de tumores, no entanto, são poucos os trabalhos que analisam o comportamento dos contaminantes em tumores já estabelecidos.

No presente estudo, o papel dos contaminantes químicos Pfoa, Bpa, Mtx e Bp1 na progressão do câncer de mama foi investigado. Os resultados obtidos e apresentados mostram a capacidade destes compostos em modular o fenótipo das células de linhagens tumorais MCF-7, MDA-MB-231 e da linhagem de epitélio normal de mama MCF10-A na progressão tumoral *in vitro*, alterando processos associados com a malignidade tumoral, como aumento da proliferação celular, invasão e migração das células, formação de colônias e aumento nos ensaios de efluxo de drogas. Ainda foi verificado que ocorre alterações na expressão de moléculas relacionadas ao tratamento quimioterápico como ABCG2. A expressão de genes ainda mostrou aumentos para ESR2, VEGFA, STAT3, RPS6 e SYNCRIP.

Portanto, os resultados observados revelam a possibilidade de efeitos adversos referentes a exposição aos compostos Pfoa, Bpa, Mtx e Bp1, no prognóstico do câncer, principalmente o câncer de mama. Diante do exposto, o presente estudo reforça a necessidade de estudos sobre os efeitos de poluentes orgânicos persistentes e contaminantes emergentes na progressão de tumores. Ainda, pelo fato de muitos destes contaminantes não possuírem uma legislação que os limite, este trabalho ressalta a importância na fiscalização e monitoramento das concentrações permitidas, com a finalidade de assegurar a saúde da população humana e minimizar os impactos no meio ambiente.

Em conjunto, os dados apresentados corroboram a hipótese de que a exposição constante a esses contaminantes ambientais pode influenciar o fenótipo de

malignidade tumoral e dificultar a resposta quimioterápica de pacientes com câncer de mama. Embora muitas questões ainda precisem ser elucidadas para uma compreensão mais completa, os resultados dão suporte a uma linha de pesquisa inovadora dentro de uma nova abordagem toxicológica, pois apontam várias questões que merecem ser investigadas.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, Anupam; DAS, Basanta Kumar; GANGULY, Satabdi; NAG, Subir Kumar; SADHUKHAN, Debalina; RAUT, Subhashree Subhasmita. Emerging contaminant triclosan incites endocrine disruption, reproductive impairments and oxidative stress in the commercially important carp, Catla (*Labeo catla*): An insight through molecular, histopathological and bioinformatic approach. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 268, p. 109605, jun. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109605>.
- AHN, Changhwan; JEUNG, Eui-Bae. Endocrine-Disrupting Chemicals and Disease Endpoints. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5342, mar. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24065342>.
- AKINRINADE, Olumide Emmanuel; AGUNBIADE, Foluso O.; ALANI, Rose; AYEJUJO, Olusegun O. Implementation of the Stockholm Convention on persistent organic pollutants (POPs) in Africa – progress, challenges, and recommendations after 20 years. **Environmental Science: Advances**, v. 3, n. 5, p. 623–634, 2024. <https://doi.org/10.1039/D3VA00347G>.
- AKKUS, Mervener; CEYLAN, Hamid. Identification and verification of promising diagnostic genes in bisphenol A-associated breast cancer development via in silico analysis. **Frontiers in Life Sciences and Related Technologies**, v. 4, n. 2, p. 72–78, ago. 2023. <https://doi.org/10.51753/flsrt.1223888>.
- ALAMER, Maha; DARBRE, Philippa D. Effects of exposure to six chemical ultraviolet filters commonly used in personal care products on motility of MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells in vitro. **Journal of Applied Toxicology**, v. 38, n. 2, p. 148–159, fev. 2018. <https://doi.org/10.1002/jat.3525>.
- ALSHEMMARI, Hassan; AL-KASBI, Mohammed M.; KAVIL, Yasar N.; ORIF, Mohammed I.; AL-HULWANI, Ebtessam K.; AL-DARII, Rawya J.; AL-SHUKAILI, Suleiman M.; AL-BALUSHI, Fawaz A. A.; CHAKRABORTY, Paromita. New and legacy pesticidal persistent organic pollutants in the agricultural region of the Sultanate of Oman. **Journal of Hazardous Materials**, v. 459, p. 132205, out. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132205>.
- ALVES, Marcelo; STREIT, Livia; PIZZOLATO, Tânia. UTILIZAÇÃO DE MODELOS IN SILICO PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS, FÁRMACOS E METABÓLITOS EM ÁGUAS NATURAIS. **Química Nova**, 2023. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20230062>.
- ANIOGO, Eric Chekwube; GEORGE, Blassan Plackal Adimuriyil; ABRAHAMSE, Heidi. The role of photodynamic therapy on multidrug resistant breast cancer. **Cancer Cell International**, v. 19, n. 1, p. 91, dez. 2019. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0815-0>.
- ANNAMANENI, Sandhya; VISHWAKARMA, Sandeep Kumar; MEKA, Phani Bhushan; KHAN, Aleem Ahmed; NALLARI, Pratibha. Regulation of heat shock protein-70 gene transcripts in breast cancer cells during hypo and hyperthermia exposure. **Meta Gene**, v. 20, p. 100548, jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2019.100548>.
- ARBUCKLE, Tye E.; KUBWABO, Cariton; WALKER, Mark; DAVIS, Karelyn; LALONDE, Kaela; KOSARAC, Ivana; WEN, Shi Wu; ARNOLD, Douglas L. Umbilical cord blood levels of perfluoroalkyl acids and polybrominated flame retardants. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, n. 2, p. 184–194, mar. 2013a. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.03.004>.
- ARBUCKLE, Tye E.; KUBWABO, Cariton; WALKER, Mark; DAVIS, Karelyn; LALONDE, Kaela; KOSARAC, Ivana; WEN, Shi Wu; ARNOLD, Douglas L. Umbilical cord blood levels of perfluoroalkyl acids and polybrominated flame retardants. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, n. 2, p. 184–194, mar. 2013b. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2012.03.004>.
- ARIENZO, Michele. Progress on the Impact of Persistent Pollutants on Marine Turtles: A Review. **Journal of Marine Science and Engineering**, v. 11, n. 2, p. 266, jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/jmse11020266>.

ARIOSIA, Aileen R.; LAHIRI, Vikramjit; LEI, Yuchen; YANG, Ying; YIN, Zhangyuan; ZHANG, Zhihai; KLIONSKY, Daniel J. A perspective on the role of autophagy in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1867, n. 12, p. 166262, dez. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166262>.

ASSARAF, Yehuda G.; BROZOVIC, Anamaria; GONÇALVES, Ana Cristina; JURKOVICOVA, Dana; LINĚ, Aija; MACHUQUEIRO, Miguel; SAPONARA, Simona; SARMENTO-RIBEIRO, Ana Bela; XAVIER, Cristina P.R.; VASCONCELOS, M. Helena. The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer. **Drug Resistance Updates**, v. 46, p. 100645, set. 2019a. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.100645>.

ASSARAF, Yehuda G.; BROZOVIC, Anamaria; GONÇALVES, Ana Cristina; JURKOVICOVA, Dana; LINĚ, Aija; MACHUQUEIRO, Miguel; SAPONARA, Simona; SARMENTO-RIBEIRO, Ana Bela; XAVIER, Cristina P.R.; VASCONCELOS, M. Helena. The multi-factorial nature of clinical multidrug resistance in cancer. **Drug Resistance Updates**, v. 46, p. 100645, set. 2019b. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.100645>.

ATES, Gamze; VANHAECKE, Tamara; ROGIERS, Vera; RODRIGUES, Robim M. Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. In: GILBERT, Daniel F.; FRIEDRICH, Oliver (orgs.). **Cell Viability Assays**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2017a. v. 1601, p. 19–26. DOI [10.1007/978-1-4939-6960-9_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_2). Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6960-9_2. Acesso em: 30 out. 2024.

ATES, Gamze; VANHAECKE, Tamara; ROGIERS, Vera; RODRIGUES, Robim M. Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay. In: GILBERT, Daniel F.; FRIEDRICH, Oliver (orgs.). **Cell Viability Assays**. New York, NY: Springer New York, 2017b. v. 1601, p. 19–26. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6960-9_2. Acesso em: 3 set. 2024.

ATES, Gamze; VANHAECKE, Tamara; ROGIERS, Vera; RODRIGUES, Robim M. Assaying Cellular Viability Using the Neutral Red Uptake Assay. In: GILBERT, Daniel F.; FRIEDRICH, Oliver (orgs.). **Cell Viability Assays**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2017c. v. 1601, p. 19–26. DOI [10.1007/978-1-4939-6960-9_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_2). Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6960-9_2. Acesso em: 30 out. 2024.

BACKHAUS, Thomas. Commentary on the EU Commission's proposal for amending the Water Framework Directive, the Groundwater Directive, and the Directive on Environmental Quality Standards. **Environmental Sciences Europe**, v. 35, n. 1, p. 22, mar. 2023. <https://doi.org/10.1186/s12302-023-00726-3>.

BALWIERZ, Radosław; BIERNAT, Paweł; JASIŃSKA-BALWIERZ, Agata; SIODŁAK, Dawid; KUSAKIEWICZ-DAWID, Anna; KUREK-GÓRECKA, Anna; OLCZYK, Paweł; OCHĘDZAN-SIODŁAK, Wioletta. Potential Carcinogens in Makeup Cosmetics. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, n. 6, p. 4780, mar. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijerph20064780>.

BĂNĂDUC, Doru; CURTEAN-BĂNĂDUC, Angela; BARINOVA, Sophia; LOZANO, Verónica L.; AFANASYEV, Sergey; LEITE, Tamara; BRANCO, Paulo; ISAZA, Daniel F. Gomez; GEIST, Juergen; TEGOS, Aristoteles; OLOSUTEAN, Horea; CIANFANGLIONE, Kevin. Multi-Interacting Natural and Anthropogenic Stressors on Freshwater Ecosystems: Their Current Status and Future Prospects for 21st Century. **Water** 2024, Vol. 16, Page 1483, v. 16, n. 11, p. 1483, maio 2024. <https://doi.org/10.3390/W16111483>.

BLAAUBOER, Bas J. In vitro, ex vivo, in vivo toxicology, the terminology issue. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 45, n. Pt 1, p. iii–iv, dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.09.028>.

BOTELLA, Begoña; CRESPO, Jorge; RIVAS, Ana; CERRILLO, Isabel; OLEA-SERRANO, Maria Fátima; OLEA, Nicolás. Exposure of women to organochlorine pesticides in Southern Spain. **Environmental Research**, v. 96, n. 1, p. 34–40, set. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2003.10.001>.

BRAY, Freddie; LAVERSANNE, Mathieu; SUNG, Hyuna; FERLAY, Jacques; SIEGEL, Rebecca L.; SOERJOMATARAM, Isabelle; JEMAL, Ahmedin. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 74, n. 3, p. 229–263, maio 2024. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.

BRITO, Patricia Manuitt; BISCAIA, Stelée Marcela Petris; DE SOUZA, Tugstenio Lima; RAMOS, Amandia Batscheuer; LEÃO-BUCHIR, Joelma; DE ALMEIDA ROQUE, Aliciane; DE LIMA BELLAN, Daniel; DA SILVA TRINDADE, Edvaldo; FILIPAK NETO, Francisco; DE OLIVEIRA RIBEIRO, Ciro Alberto. Oral exposure to BDE-209 modulates metastatic spread of melanoma in C57BL/6 mice inoculated with B16-F10 cells. **Chemosphere**, v. 260, p. 127556, dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127556>.

BURKS, Hope; PASHOS, Nicholas; MARTIN, Elizabeth; MCLACHLAN, John; BUNNELL, Bruce; BUROW, Matthew. Endocrine disruptors and the tumor microenvironment: A new paradigm in breast cancer biology. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 457, p. 13–19, dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.12.010>.

CABRERA-RODRÍGUEZ, Raúl; LUZARDO, Octavio P.; GONZÁLEZ-ANTUÑA, Ana; BOADA, Luis D.; ALMEIDA-GONZÁLEZ, Maira; CAMACHO, María; ZUMBADO, Manuel; ACOSTA-DACAL, Andrea Carolina; RIAL-BERRIEL, Cristian; HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ, Luis Alberto. Occurrence of 44 elements in human cord blood and their association with growth indicators in newborns. **Environment International**, v. 116, p. 43–51, jul. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.048>.

CALAF, Gloria M. Role of organophosphorous pesticides and acetylcholine in breast carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 76, p. 206–217, nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.03.016>.

CAMARILLO, Ignacio G.; XIAO, Funian; MADHIVANAN, S.; SALAMEH, Therese; NICHOLS, Maxine; REECE, Lisa M.; LEARY, James F.; OTTO, Kevin; NATARAJAN, Arutselvan; RAMESH, A.; SUNDARARAJAN, Raji. Low and high voltage electrochemotherapy for breast cancer: an in vitro model study. **Electroporation-Based Therapies for Cancer**. [S. l.]: Elsevier, 2014. p. 55–102. <https://doi.org/10.1533/9781908818294.55>.

CAO, Jun; ZHANG, Mengdi; WANG, Bin; ZHANG, Long; ZHOU, Fangfang; FANG, Meiyu. Chemoresistance and Metastasis in Breast Cancer Molecular Mechanisms and Novel Clinical Strategies. **Frontiers in Oncology**, v. 11, jul. 2021. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.658552>.

CARSTENSEN, Lale; BEIL, Stephan; BÖRNICK, Hilmar; STOLTE, Stefan. Structure-related endocrine-disrupting potential of environmental transformation products of benzophenone-type UV filters: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 430, p. 128495, maio 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128495>.

CASTILLO SANCHEZ, Rocio; GOMEZ, Rocio; PEREZ SALAZAR, Eduardo. Bisphenol A Induces Migration through a GPER-, FAK-, Src-, and ERK2-Dependent Pathway in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 29, n. 3, p. 285–295, 21 mar. 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00457>.

CHATTERJEE, Biji; GHOSH, Krishna; KANADE, Santosh R. Resveratrol modulates epigenetic regulators of promoter histone methylation and acetylation that restores BRCA1, p53, p21^{CIP1} in human breast cancer cell lines. **BioFactors**, v. 45, n. 5, p. 818–829, set. 2019. <https://doi.org/10.1002/biof.1544>.

CHAUDHRY, Gul-e-Saba; AKIM, Abdah Md; SUNG, Yeong Yik; SIFZIZUL, Tengku Muhammad Tengku. Cancer and apoptosis: The apoptotic activity of plant and marine natural products and their potential as targeted cancer therapeutics. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, ago. 2022. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.842376>.

CHAVES, Marisa; BARBOSA, Sergiane; PRIMEL, Ednei; CASTRO, Ítalo. Emerging Contaminants in Sediments as Markers of Anthropogenic Inputs in Santos Estuarine System: Analytical Method and

Occurrence Data. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2023. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20220106>.

CHEN, Daniel S.; MELLMAN, Ira. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. **Nature**, v. 541, n. 7637, p. 321–330, jan. 2017. <https://doi.org/10.1038/nature21349>.

CHEN, G. Methoxychlor. **Encyclopedia of Toxicology**. [S. l.]: Elsevier, 2014. p. 254–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00162-7>.

CHEN, Simiao; CAO, Zhong; PRETTNER, Klaus; KUHN, Michael; YANG, Juntao; JIAO, Lirui; WANG, Zhuoran; LI, Weimin; GELDSETZER, Pascal; BÄRNIGHAUSEN, Till; BLOOM, David E.; WANG, Chen. Estimates and Projections of the Global Economic Cost of 29 Cancers in 204 Countries and Territories From 2020 to 2050. **JAMA Oncology**, v. 9, n. 4, p. 465, 1 abr. 2023. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2022.7826>.

CHENG, Lin; SONG, Weiguo; RAO, Qinxiong; ZHOU, Junliang; ZHAO, Zhihui. Bioaccumulation and toxicity of methoxychlor on Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 221, p. 89–95, jul. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.04.002>.

CLUSAN, Léa; FERRIÈRE, François; FLOURIOT, Gilles; PAKDEL, Farzad. A Basic Review on Estrogen Receptor Signaling Pathways in Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6834, abr. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24076834>.

COMPTON, Carolyn. **Cancer: The Enemy from Within**. [S. l.]: Springer International Publishing, 2020. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-40651-6>.

COMȘA, ȘERBAN; CÎMPEAN, ANCA MARIA; RAICA, MARIUS. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. **Anticancer Research**, v. 35, n. 6, p. 3147–3154, 2015.

DAI, Xiaofeng; CHENG, Hongye; BAI, Zhonghu; LI, Jia. Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 16, p. 3131–3141, 2017. <https://doi.org/10.7150/jca.18457>.

DARBRE, Philippa D. Endocrine disrupting chemicals and breast cancer cells. [S. l.: s. n.], 2021. p. 485–520. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2021.04.006>.

DAS, Chandan Kanta; MANDAL, Mahitosh; KÖGEL, Donat. Pro-survival autophagy and cancer cell resistance to therapy. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 37, n. 4, p. 749–766, dez. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10555-018-9727-z>.

DAVIDSON, Shawn M.; VANDER HEIDEN, Matthew G. Critical functions of the lysosome in cancer biology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 57, n. 1, p. 481–507, 6 jan. 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010715-103101>.

DE ALMEIDA ROQUE, Aliciane; DA LUZ, Jessica Zablocki; SANTURIO, Michelle Thays Khun; NETO, Francisco Filipak; DE OLIVEIRA RIBEIRO, Ciro Alberto. Complex mixtures of pesticides and metabolites modulate the malignant phenotype of murine melanoma B16-F1 cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 16, p. 47366–47380, 4 fev. 2023. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25603-7>.

DE MARCHI, Micheli; MOGGIO, Erick E.; FILIPAK NETO, Francisco; BRITO, Patricia E.M.; F. SILVA FILHO, Benisio; RIBEIRO, Ciro A. Oliveira. 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 and Therapy**, , p. 1–7, 2 set. 2021. <https://doi.org/10.31487/j.IJCST.2021.02.01>.

DE SOUZA SALGADO, Yvanna Carla; BOIA FERREIRA, Marianna; ZABLOCKI DA LUZ, Jessica; FILIPAK NETO, Francisco; OLIVEIRA RIBEIRO, Ciro Alberto De. Tribromophenol affects the metabolism, proliferation, migration and multidrug resistance transporters activity of murine melanoma cells B16F1. **Toxicology in Vitro**, v. 50, p. 40–46, ago. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.02.005>.

DEBNATH, Jayanta; GAMMOH, Noor; RYAN, Kevin M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 24, n. 8, p. 560–575, ago. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00585-z>.

DENG, Ping; TAN, Miduo; ZHOU, Wei; CHEN, Chunhai; XI, Yu; GAO, Peng; MA, Qinlong; LIANG, Yidan; CHEN, Mengyan; TIAN, Li; XIE, Jia; LIU, Mengyu; LUO, Yan; LI, Yanqi; ZHANG, Lei; WANG, Liting; ZENG, Youlong; PI, Huifeng; YU, Zhengping; ZHOU, Zhou. Bisphenol A promotes breast cancer cell proliferation by driving miR-381-3p-PTTG1-dependent cell cycle progression. **Chemosphere**, v. 268, p. 129221, abr. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129221>.

DUARTE, Joyce Auxiliadora Paiva; RIBEIRO, Anny Kelly Nascimento; DE CARVALHO, Priscilla; BORTOLINI, Jascieli Carla; OSTROSKI, Indianara Conceição. Emerging contaminants in the aquatic environment: phytoplankton structure in the presence of sulfamethoxazole and diclofenac. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 16, p. 46604–46617, 31 jan. 2023. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25589-2>.

DUH-LEONG, Carol; MAFFINI, Maricel V.; KASSOTIS, Christopher D.; VANDENBERG, Laura N.; TRASANDE, Leonardo. The regulation of endocrine-disrupting chemicals to minimize their impact on health. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 19, n. 10, p. 600–614, out. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41574-023-00872-x>.

E SILVA, Juliana; PEDROSO, Raissa; PELLOSO, Fernando; CARVALHO, Maria; SANTOS, Thais; DUTRA, Amanda; STEVANATO, Kely; MARQUES, Vladimir; DE ANDRADE, Luciano; ARAÚJO, Daniela; DOS SANTOS, Lander; PELLOSO BORGHESAN, Deise; RIBEIRO, Helena; CANPAROTO, Camila; TEIXEIRA, Jorge; MARQUES, Fernanda; PELLOSO, Sandra. Mortality of Young Women due to Breast Cancer in Low, Middle and High-Income Countries: Systematic Literature Review and Meta-Analysis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 25, n. 7, p. 2219–2227, 1 jul. 2024. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2024.25.7.2219>.

EBELE, Anekwe Jennifer; ABDALLAH, Mohamed Abou-Elwafa; HARRAD, Stuart. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. **Emerging Contaminants**, v. 3, n. 1, p. 1–16, mar. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>.

ELDAKROORY, S. A.; MORSI, DA EI; ABDEL-RAHMAN, R. H.; ROSHDY, S.; GOUIDA, M. S.; KHASHABA, E. O. Correlation between toxic organochlorine pesticides and breast cancer. **Human & Experimental Toxicology**, v. 36, n. 12, p. 1326–1334, dez. 2017. <https://doi.org/10.1177/0960327116685887>.

EMRAN, Talha Bin; SHAHRIAR, Asif; MAHMUD, Aar Rafi; RAHMAN, Tanjilur; ABIR, Mehedy Hasan; SIDDIQUEE, Mohd Faijanur-Rob; AHMED, Hossain; RAHMAN, Nova; NAINU, Firzan; WAHYUDIN, Ely; MITRA, Saikat; DHAMA, Kuldeep; HABIBALLAH, Mahmoud M.; HAQUE, Shafiqul; ISLAM, Ariful; HASSAN, Mohammad Mahmudul. Multidrug Resistance in Cancer: Understanding Molecular Mechanisms, Immunoprevention and Therapeutic Approaches. **Frontiers in Oncology**, v. 12, jun. 2022. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.891652>.

ENGIN, Ayse Basak; ENGIN, Atilla. The effect of environmental Bisphenol A exposure on breast cancer associated with obesity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 81, p. 103544, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103544>.

FARES, Jawad; FARES, Mohamad Y.; KHACHFE, Hussein H.; SALHAB, Hamza A.; FARES, Youssef. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 28, mar. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>.

FARTO, Cindy; JÚNIOR, Gilson; SENA, Rennio; ROSENHAIM, Raul. Contaminantes de preocupação emergente no Brasil na década 2010-2019 - Parte I: ocorrência em diversos ambientes aquáticos. **Revista de Gestão de Água da América Latina**, v. 18, n. 1, p. 6–0, maio 2021. <https://doi.org/10.21168/reg.v18e6>.

FEOKTISTOVA, Maria; GESERICK, Peter; LEVERKUS, Martin. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 4, p. pdb.prot087379, abr. 2016. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>.

FERLAY, Jacques; COLOMBET, Murielle; SOERJOMATARAM, Isabelle; PARKIN, Donald M.; PIÑEROS, Marion; ZNAOR, Ariana; BRAY, Freddie. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International Journal of Cancer**, v. 149, n. 4, p. 778–789, ago. 2021. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>.

FERNANDEZ, S. V.; RUSSO, J. Estrogen and Xenoestrogens in Breast Cancer. **Toxicologic Pathology**, v. 38, n. 1, p. 110–122, jan. 2010. <https://doi.org/10.1177/0192623309354108>.

FLODROVA, Dana; TOPOROVA, Lucia; MACEJOVA, Dana; LASTOVICKOVA, Marketa; BRTKO, Julius; BOBALOVA, Janette. A comparative study of protein patterns of human estrogen receptor positive (MCF-7) and negative (MDA-MB-231) breast cancer cell lines. **General physiology and biophysics**, v. 35, n. 03, p. 387–392, 2016. <https://doi.org/10.4149/gpb.2016009>.

FONTANELLA, Caterina; FANOTTO, Valentina; RIHAWI, Karim; APRILE, Giuseppe; PUGLISI, Fabio. Skeletal metastases from breast cancer: pathogenesis of bone tropism and treatment strategy. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 32, n. 8, p. 819–833, dez. 2015. <https://doi.org/10.1007/s10585-015-9743-0>.

FRANKEN, Nicolaas A P; RODERMOND, Hans M; STAP, Jan; HAVEMAN, Jaap; VAN BREE, Chris. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, dez. 2006. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.

FUJIWARA, Natsumi; YAMASHITA, Shohei; OKAMOTO, Motoki; COOLEY, Marion A.; OZAKI, Kazumi; EVERETT, Eric T.; SUZUKI, Maiko. Perfluorooctanoic acid-induced cell death via the dual roles of ROS-MAPK/ERK signaling in ameloblast-lineage cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 260, p. 115089, jul. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115089>.

GAJEWSKI, Ewa; GAUR, Shikha; AKMAN, Steven A.; MATSUMOTO, Linda; VAN BALGOOY, Josephus N.A.; DOROSHOW, James H. Oxidative DNA base damage in MCF-10A breast epithelial cells at clinically achievable concentrations of doxorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 12, p. 1947–1956, jun. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.03.022>.

GALLAHER, Jill A.; BROWN, Joel S.; ANDERSON, Alexander R. A. The impact of proliferation-migration tradeoffs on phenotypic evolution in cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2425, fev. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39636-x>.

GAO, Chong-jing; LIU, Li-yan; MA, Wan-li; ZHU, Ning-zheng; JIANG, Ling; LI, Yi-Fan; KANNAN, Kurunthachalam. Benzonphenone-type UV filters in urine of Chinese young adults: Concentration, source and exposure. **Environmental Pollution**, v. 203, p. 1–6, ago. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.036>.

GATENBY, Robert A.; BROWN, Joel. Mutations, evolution and the central role of a self-defined fitness function in the initiation and progression of cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1867, n. 2, p. 162–166, abr. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.03.005>.

GELLATLY, Nichola; SEWELL, Fiona. Regulatory acceptance of in silico approaches for the safety assessment of cosmetic-related substances. **Computational Toxicology**, v. 11, p. 82–89, ago. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.comtox.2019.03.003>.

GILEADI, Talia E.; SWAMY, Abhyuday K.; HORE, Zoe; HORSWELL, Stuart; ELLEGOOD, Jacob; MOHAN, Conor; MIZUNO, Keiko; LUNDEBYE, Anne-Katrine; GIESE, K. Peter; STOCKINGER, Brigitta; HOGSTRAND, Christer; LERCH, Jason P.; FERNANDES, Cathy; BASSON, M. Albert. Effects of Low-Dose Gestational TCDD Exposure on Behavior and on Hippocampal Neuron Morphology and Gene Expression in Mice. **Environmental health perspectives**, v. 129, n. 5, p. 57002, maio 2021. <https://doi.org/10.1289/EHP7352>.

GOGOLA, Justyna; HOFFMANN, Marta; PTAK, Anna. Persistent endocrine-disrupting chemicals found in human follicular fluid stimulate the proliferation of granulosa tumor spheroids via GPR30 and IGF1R

but not via the classic estrogen receptors. **Chemosphere**, v. 217, p. 100–110, fev. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.018>.

GONÇALVES, Jenifer P.; DA CRUZ, Anderson F.; NUNES, Ábner M.; MENEGHETTI, Mario R.; DE BARROS, Heloíse R.; BORGES, Beatriz S.; DE MEDEIROS, Lia C.A.S.; SOARES, Maurílio J.; DOS SANTOS, Mayara P.; GRASSI, Marco T.; ROSSI, Gustavo R.; BELLAN, Daniel L.; BISCAIA, Stelée M.P.; CRISTAL, Aline M.; BUZZO, João L.A.; RIBEIRO, Yasmin C.; ACCO, Alexandra; CARDOSO, Mateus B.; SIMAS, Fernanda F.; ... DE OLIVEIRA, Carolina C. Biocompatible gum arabic-gold nanorod composite as an effective therapy for mistreated melanomas. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 551–561, ago. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.172>.

GRELA, Ewa; KOZŁOWSKA, Joanna; GRABOWIECKA, Agnieszka. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 4, p. 303–311, maio 2018. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>.

GUTIÉRREZ-NOYA, Verónica Margarita; GÓMEZ-OLIVÁN, Leobardo Manuel; RAMÍREZ-MONTERO, María del Carmen; ISLAS-FLORES, Hariz; GALAR-MARTÍNEZ, Marcela; GARCÍA-MEDINA, Sandra. Survival and malformations rates, oxidative status in early life stages of *Cyprinus carpio* due to exposure to environmentally realistic concentrations of paracetamol. **Science of The Total Environment**, v. 768, p. 144585, maio 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144585>.

HEICHLER, Christina; SCHEIBE, Kristina; SCHMIED, Anabel; GEPPERT, Carol I.; SCHMID, Benjamin; WIRTZ, Stefan; THOMA, Oana-Maria; KRAMER, Viktoria; WALDNER, Maximilian J.; BÜTTNER, Christian; FARIN, Henner F.; PEŠIĆ, Marina; KNIELING, Ferdinand; MERKEL, Susanne; GRÜNEBOOM, Anika; GUNZER, Matthias; GRÜTZMANN, Robert; ROSE-JOHN, Stefan; KORALOV, Sergei B.; ... NEUFERT, Clemens. STAT3 activation through IL-6/IL-11 in cancer-associated fibroblasts promotes colorectal tumour development and correlates with poor prognosis. **Gut**, v. 69, n. 7, p. 1269–1282, 1 jul. 2020. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319200>.

HIRASHITA, Teijiro; HIRASHITA, Yuka; IWASHITA, Yukio; ENDO, Yuichi; KIYONAGA, Maki; MATSUMOTO, Shunro; HIJIYA, Naoki; MORIYAMA, Masatsugu; MURAKAMI, Kazunari; INOMATA, Masafumi. S6 ribosomal protein phosphorylation is associated with malignancy of intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. **Annals of gastroenterological surgery**, v. 4, n. 5, p. 571–579, set. 2020. <https://doi.org/10.1002/ags3.12367>.

HOOIJBERG, J. H.; PETERS, G. J.; KASPERS, G. J. L.; WIELINGA, P. R.; VEERMAN, A. J. P.; PIETERS, R.; JANSEN, G. Online fluorescent method to assess bcrp/abcg2 activity in suspension cells. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 23, n. 8–9, p. 1451–1454, 31 dez. 2004a. <https://doi.org/10.1081/NCN-200027672>.

HOOIJBERG, J. H.; PETERS, G. J.; KASPERS, G. J. L.; WIELINGA, P. R.; VEERMAN, A. J. P.; PIETERS, R.; JANSEN, G. Online Fluorescent Method to Assess BCRP/ABCG2 Activity in Suspension Cells. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 23, n. 8–9, p. 1451–1454, 31 dez. 2004b. <https://doi.org/10.1081/NCN-200027672>.

HSU, Li-Han; CHU, Nei-Min; LIN, Yung-Feng; KAO, Shu-Huei. G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 306, 14 jan. 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20020306>.

HU, Hejing; ASWETO, Collins Otieno; WU, Jing; SHI, Yanfeng; FENG, Lin; YANG, Xiaozhe; LIANG, Shuang; CAO, Lige; DUAN, Junchao; SUN, Zhiwei. Gene expression profiles and bioinformatics analysis of human umbilical vein endothelial cells exposed to PM 2.5. **Chemosphere**, v. 183, p. 589–598, set. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.153>.

HU, Jing; ZHANG, Hui; LIU, Long; HAN, Bo; ZHOU, Gengyin; SU, Peng. TRPS1 Confers Multidrug Resistance of Breast Cancer Cells by Regulating BCRP Expression. **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 934, 30 jun. 2020. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00934>.

HU, Wentao; CULLOTY, Sarah; DARMODY, Grainne; LYNCH, Sharon; DAVENPORT, John; RAMIREZ-GARCIA, Sonia; DAWSON, Kenneth; LYNCH, Iseult; DOYLE, Hugh; SHEEHAN, David.

Neutral red retention time assay in determination of toxicity of nanoparticles. **Marine Environmental Research**, v. 111, p. 158–161, out. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.05.007>.

HUANG, Peixin; YANG, John; NING, Jie; WANG, Michael; SONG, Qisheng. Atrazine triggers dna damage response and induces dna double-strand breaks in mcf-10a cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14353–14368, 24 jun. 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms160714353>.

HUANG, Wenhao; AI, Weiming; LIN, Weiwei; FANG, Fang; WANG, Xuedong; HUANG, Haishan; DAHLGREN, Randy A.; WANG, Huili. Identification of receptors for eight endocrine disrupting chemicals and their underlying mechanisms using zebrafish as a model organism. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 204, p. 111068, nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111068>.

IMBALZANO, Karen M.; TATARKOVA, Iva; IMBALZANO, Anthony N.; NICKERSON, Jeffrey A. Increasingly transformed MCF-10A cells have a progressively tumor-like phenotype in three-dimensional basement membrane culture. **Cancer Cell International**, v. 9, n. 1, p. 7, 2009. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-9-7>.

IN, Sol-Ji; KIM, Seung-Hee; GO, Ryeo-Eun; HWANG, Kyung-A.; CHOI, Kyung-Chul. Benzophenone-1 and Nonylphenol Stimulated MCF-7 Breast Cancer Growth by Regulating Cell Cycle and Metastasis-Related Genes Via an Estrogen Receptor α -Dependent Pathway. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 78, n. 8, p. 492–505, abr. 2015. <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1010464>.

JAIN, Urvish; JAIN, Bhav; FAYANJU, Oluwadamilola M.; CHINO, Fumiko; DEE, Edward Christopher. Disparities in timely treatment among young women with breast cancer. **The American Journal of Surgery**, v. 224, n. 2, p. 811–815, ago. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2022.01.019>.

JEYASINGH, Janet Reshma; I, Glory Josephine. The Emergence of In-Silico Models in Drug Target Interaction System: A Comprehensive Review. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 21, n. 1, p. 11–24, mar. 2024. <https://doi.org/10.13005/bbra/3198>.

KALININA, Tatiana S.; KONONCHUK, Vladislav V.; GULYAEVA, Lyudmila F. Expression of estrogen-, progesterone-, and androgen-responsive genes in MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with α , β -DDT, γ , δ -DDT, or endosulfan. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 1–8, jun. 2021. <https://doi.org/10.1002/jbt.22773>.

KANNAMPUZHA, Sandra; GOPALAKRISHNAN, Abilash Valsala. Cancer chemoresistance and its mechanisms: Associated molecular factors and its regulatory role. **Medical Oncology**, v. 40, n. 9, p. 264, ago. 2023. <https://doi.org/10.1007/s12032-023-02138-y>.

KAO, Cheng-Chih; QUE, Danielle E.; BONGO, Sayre J.; TAYO, Lemmuel L.; LIN, Yi-Hsien; LIN, Chun-Wen; LIN, Sheng-Lun; GOU, Yan-You; HSU, Wen-Li; SHY, Cherng-Gueih; HUANG, Kuo-Lin; TSAI, Ming-Hsien; CHAO, How-Ran. Residue Levels of Organochlorine Pesticides in Breast Milk and Its Associations with Cord Blood Thyroid Hormones and the Offspring's Neurodevelopment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 8, p. 1438, abr. 2019. <https://doi.org/10.3390/ijerph16081438>.

KAR, Supratik; LESZCZYNSKI, Jerzy. Exploration of Computational Approaches to Predict the Toxicity of Chemical Mixtures. **Toxics**, v. 7, n. 1, p. 15, mar. 2019. <https://doi.org/10.3390/toxics7010015>.

KENNY, Paraic A.; LEE, Genee Y.; MYERS, Connie A.; NEVE, Richard M.; SEMEIKS, Jeremy R.; SPELLMAN, Paul T.; LORENZ, Katrin; LEE, Eva H.; BARCELLOS-HOFF, Mary Helen; PETERSEN, Ole W.; GRAY, Joe W.; BISSELL, Mina J. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. **Molecular Oncology**, v. 1, n. 1, p. 84–96, jun. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.02.004>.

KEREN, Leeat; BOSSE, Marc; MARQUEZ, Diana; ANGOSHTARI, Roshan; JAIN, Samir; VARMA, Sushama; YANG, Soo-Ryum; KURIAN, Allison; VALEN, David Van; WEST, Robert; BENDALL, Sean C.; ANGELO, Michael. A Structured Tumor-Immune Microenvironment in Triple Negative Breast Cancer Revealed by Multiplexed Ion Beam Imaging. **Cell**, v. 174, n. 6, p. 1373-1387.e19, set. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.039>.

KHAN, Muhammad Idrees; BOUYAHYA, Abdelhakim; HACHLAFI, Naoufal E. L.; MENYIY, Naoual El; AKRAM, Muhammad; SULTANA, Sabira; ZENGIN, Gokhan; PONOMAREVA, Lilya; SHARIATI, Mohammad Ali; OJO, Oluwafemi Adeleke; DALL'ACQUA, Stefano; ELEBIYO, Tobiloba Christiana. Anticancer properties of medicinal plants and their bioactive compounds against breast cancer: a review on recent investigations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 17, p. 24411–24444, abr. 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17795-7>.

KHAN, Muhammad Muzamil; YALAMARTY, Satya Siva Kishan; RAJMALANI, Bharat Ashok; FILIPCZAK, Nina; TORCHILIN, Vladimir P. Recent strategies to overcome breast cancer resistance. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 197, p. 104351, maio 2024. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2024.104351>.

KIM, Don-Kyu; CHOI, Hueng-Sik. Emerging role of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor gamma in liver metabolic diseases. **Liver Research**, v. 3, n. 2, p. 99–105, jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2019.03.001>.

KIM, Joo-Young; YI, Bo-Rim; GO, Ryeo-Eun; HWANG, Kyung-A.; NAM, Ki-Hoan; CHOI, Kyung-Chul. Methoxychlor and triclosan stimulates ovarian cancer growth by regulating cell cycle- and apoptosis-related genes via an estrogen receptor-dependent pathway. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 3, p. 1264–1274, maio 2014. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.04.013>.

KIM, Min; TURNQUIST, Heth; JACKSON, John; SGAGIAS, Magda; YAN, Ying; GONG, Maokai; DEAN, Michael; SHARP, John G.; COWAN, Kenneth. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 8, n. 1, p. 22–28, jan. 2002.

KIM, Seung-Hee; HWANG, Kyung-A; SHIM, Soon-Mi; CHOI, Kyung-Chul. Growth and migration of LNCaP prostate cancer cells are promoted by triclosan and benzophenone-1 via an androgen receptor signaling pathway. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 568–576, mar. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.01.003>.

KLEIN, Christoph A. Cancer progression and the invisible phase of metastatic colonization. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 11, p. 681–694, nov. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00300-6>.

KOUAL, Meriem; TOMKIEWICZ, Céline; CANO-SANCHO, German; ANTIGNAC, Jean-Philippe; BATS, Anne-Sophie; COUMOUL, Xavier. Environmental chemicals, breast cancer progression and drug resistance. **Environmental Health**, v. 19, n. 1, p. 117, dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12940-020-00670-2>.

KWON, Youngjoo. Potential Pro-Tumorigenic Effect of Bisphenol A in Breast Cancer via Altering the Tumor Microenvironment. **Cancers**, v. 14, n. 12, p. 3021, jun. 2022. <https://doi.org/10.3390/cancers14123021>.

LANDEROS, Natalia; CASTILLO, Iván; PÉREZ-CASTRO, Ramón. Preclinical and Clinical Trials of New Treatment Strategies Targeting Cancer Stem Cells in Subtypes of Breast Cancer. **Cells**, v. 12, n. 5, p. 720, fev. 2023. <https://doi.org/10.3390/cells12050720>.

LEBEDEVA, Irina V.; PANDE, Praveen; PATTON, Wayne F. Sensitive and Specific Fluorescent Probes for Functional Analysis of the Three Major Types of Mammalian ABC Transporters. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e22429, jul. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022429>.

LECOMTE, Sylvain; HABAUZIT, Denis; CHARLIER, Thierry; PAKDEL, Farzad. Emerging estrogenic pollutants in the aquatic environment and breast cancer. **Genes**, v. 8, n. 9, p. 229, 15 set. 2017. <https://doi.org/10.3390/genes8090229>.

LEE, Hye-Rim; HWANG, Kyung-A.; PARK, Min-Ah; YI, Bo-Rim; JEUNG, Eui-Bae; CHOI, Kyung-Chul. Treatment with bisphenol A and methoxychlor results in the growth of human breast cancer cells and alteration of the expression of cell cycle-related genes, cyclin D1 and p21, via an estrogen receptor-

dependent signaling pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, fev. 2012. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.903>.

LEE, Youn Ju; KIM, Min-Kyun; BAE, Jisuk; YANG, Jae-Ho. Concentrations of perfluoroalkyl compounds in maternal and umbilical cord sera and birth outcomes in Korea. **Chemosphere**, v. 90, n. 5, p. 1603–1609, fev. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.08.035>.

LI, Chenglong; LU, Tailiang; CHEN, Hongxi; YU, Zhige; CHEN, Chaowu. The up-regulation of SYNCRIP promotes the proliferation and tumorigenesis via DNMT3A/p16 in colorectal cancer. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 21570, set. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59575-6>.

LI, Wen; ZHANG, Han; ASSARAF, Yehuda G.; ZHAO, Kun; XU, Xiaojun; XIE, Jinbing; YANG, Dong-Hua; CHEN, Zhe-Sheng. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. **Drug Resistance Updates**, v. 27, p. 14–29, jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.05.001>.

LI, Xiaohua; HE, Shikun; MA, Binyun. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. **Molecular Cancer**, v. 19, n. 1, p. 12, dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-1138-4>.

LI, Xiaozhao; BAO, Chunyu; MA, Zhinan; XU, Boqun; YING, Xiaoyan; LIU, Xiaoqiu; ZHANG, Xuesen. Perfluorooctanoic acid stimulates ovarian cancer cell migration, invasion via ERK/NF- κ B/MMP-2/-9 pathway. **Toxicology Letters**, v. 294, p. 44–50, set. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.05.009>.

LI, Yi-Fan; HAO, Shuai; MA, Wan-Li; YANG, Pu-Fei; LI, Wen-Long; ZHANG, Zi-Feng; LIU, Li-Yan; MACDONALD, Robie W. Persistent organic pollutants in global surface soils: Distributions and fractionations. **Environmental Science and Ecotechnology**, v. 18, p. 100311, mar. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ese.2023.100311>.

LI, Zhe; REN, Yun; LI, Xuan; WANG, Wenwen. KDM2A interacts with estrogen receptor α to promote bisphenol A and S-induced breast cancer cell proliferation by repressing TET2 expression. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 262, p. 115132, set. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115132>.

LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y; GUAN, Jun-Lin. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, fev. 2007. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>.

LIN, Yan; HE, Ziqin; YE, Jiazhou; LIU, Ziyu; SHE, Xiaomin; GAO, Xing; LIANG, Rong. Progress in understanding the il-6/stat3 pathway in colorectal cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 13, p. 13023–13032, 2020. <https://doi.org/10.2147/OTT.S278013>.

LIU, Dongge; YAN, Shuqi; WANG, Pingwei; CHEN, Qianqian; LIU, Yanping; CUI, Jiajing; LIANG, Yujun; REN, Shuping; GAO, Ying. Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure in relation to the kidneys: A review of current available literature. **Frontiers in Physiology**, v. 14, jan. 2023. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1103141>.

LIU, Zhen-Ling; CHEN, Huan-Huan; ZHENG, Li-Li; SUN, Li-Ping; SHI, Lei. Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 198, maio 2023. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01460-1>.

LOCATELLI, Marcello; FURTON, Kenneth G.; TARTAGLIA, Angela; SPERANDIO, Elena; ULUSOY, Halil I.; KABIR, Abuzar. An FPSE-HPLC-PDA method for rapid determination of solar UV filters in human whole blood, plasma and urine. **Journal of Chromatography B**, v. 1118–1119, p. 40–50, jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.028>.

LOPEZ-RODRIGUEZ, David; FRANSSSEN, Delphine; BAKKER, Julie; LOMNICZI, Alejandro; PARENT, Anne-Simone. Cellular and molecular features of EDC exposure: consequences for the GnRH network. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 17, n. 2, p. 83–96, fev. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-00436-3>.

ŁUKASIEWICZ, Sergiusz; CZECELEWSKI, Marcin; FORMA, Alicja; BAJ, Jacek; SITARZ, Robert; STANISŁAWEK, Andrzej. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. **Cancers**, v. 13, n. 17, p. 4287, ago. 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>.

MA, Ya; LIU, Haohao; WU, Jinxia; YUAN, Le; WANG, Yueqin; DU, Xingde; WANG, Rui; MARWA, Phelisters Wegesa; PETLULU, Pavankumar; CHEN, Xinghai; ZHANG, Huizhen. The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. **Environmental Research**, v. 176, p. 108575, set. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108575>.

MACEDO, Sofia; TEIXEIRA, Elisabete; GASPAR, Tiago Bordeira; BOAVENTURA, Paula; SOARES, Mariana Alves; MIRANDA-ALVES, Leandro; SOARES, Paula. Endocrine-disrupting chemicals and endocrine neoplasia: A forty-year systematic review. **Environmental Research**, v. 218, p. 114869, fev. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114869>.

MANCINI, Francesca Romana; CANO-SANCHO, German; GAMBARETTI, Juliette; MARCHAND, Philippe; BOUTRON-RUAULT, Marie-Christine; SEVERI, Gianluca; ARVEUX, Patrick; ANTIGNAC, Jean-Philippe; KVASKOFF, Marina. Perfluorinated alkylated substances serum concentration and breast cancer risk: Evidence from a nested case-control study in the French E3N cohort. **International Journal of Cancer**, v. 146, n. 4, p. 917–928, fev. 2020. <https://doi.org/10.1002/ijc.32357>.

MAO, Qingcheng; UNADKAT, Jashvant D. Role of the breast cancer resistance protein (Bcrp/abcg2) in drug transport—an update. **The AAPS Journal**, v. 17, n. 1, p. 65–82, jan. 2015. <https://doi.org/10.1208/s12248-014-9668-6>.

MARCHI, Micheli De; MOGGIO, Erick Laurent; LUZ, Jessica Zablocki Da; BRITO, Patricia Manuitt; SANDRI, Silvana; FARSKY, Sandra Helena Poliselli; BISCAIA, Stelée Marcela Petris; FILIPAK NETO, Francisco; OLIVEIRA RIBEIRO, Ciro Alberto De. BDE-209 exposure in murine melanoma (B16–f1) cells modulates tumor malignancy and progression in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 184, p. 114350, fev. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.114350>.

MARTINI, Mariangela; FROMENT, Pascal; FRANCESCHINI, Isabelle; PILLON, Delphine; GUIBERT, Edith; CAHIER, Claude; MHAOUTY-KODJA, Sakina; KELLER, Matthieu. Perinatal Exposure to Methoxychlor Affects Reproductive Function and Sexual Behavior in Mice. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, set. 2020. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00639>.

MARUMURE, Jerikias; SIMBANEGAVI, Tinoziva T.; MAKUVARA, Zakio; KARIDZAGUNDI, Rangarirayi; ALUFASI, Richwell; GOREDEMA, Marvelous; GUFÉ, Claudious; CHAUKURA, Nhamo; HALABOWSKI, Dariusz; GWENZI, Willis. Emerging organic contaminants in drinking water systems: Human intake, emerging health risks, and future research directions. **Chemosphere**, v. 356, p. 141699, maio 2024. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141699>.

MATEI, Mădălina; ZAHARIA, Roxana; PETRESCU, Silvia-Ioana; RADU-RUSU, Cristina Gabriela; SIMEANU, Daniel; MIERLIȚĂ, Daniel; POP, Ioan Mircea. Persistent Organic Pollutants (POPs): A Review Focused on Occurrence and Incidence in Animal Feed and Cow Milk. **Agriculture**, v. 13, n. 4, p. 873, abr. 2023. <https://doi.org/10.3390/agriculture13040873>.

MERRILL, Michele A. La; VANDENBERG, Laura N.; SMITH, Martyn T.; GOODSON, William; BROWNE, Patience; PATISAUL, Heather B.; GUYTON, Kathryn Z.; KORTENKAMP, Andreas; COGLIANO, Vincent J.; WOODRUFF, Tracey J.; RIESWIJK, Linda; SONE, Hideko; KORACH, Kenneth S.; GORE, Andrea C.; ZEISE, Lauren; ZOELLER, R. Thomas. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 16, n. 1, p. 45–57, jan. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>.

METCALFE, C.D.; BAYEN, S.; DESROSIERS, M.; MUÑOZ, G.; SAUVÉ, S.; YARGEAU, V. An introduction to the sources, fate, occurrence and effects of endocrine disrupting chemicals released into the environment. **Environmental Research**, v. 207, p. 112658, maio 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112658>.

MICHAELS, Elena; WORTHINGTON, Rebeca Ortiz; RUSIECKI, Jennifer. Breast Cancer. **Medical Clinics of North America**, v. 107, n. 2, p. 271–284, mar. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2022.10.007>.

MICHAŁOWICZ, Jaromir. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 2, p. 738–758, mar. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.003>.

MIRET, Noelia V.; PONTILLO, Carolina A.; BUJÁN, Sol; CHIAPPINI, Florencia A.; RANDI, Andrea S. Mechanisms of breast cancer progression induced by environment-polluting aryl hydrocarbon receptor agonists. **Biochemical Pharmacology**, v. 216, p. 115773, out. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115773>.

MISHRA, Arti; KUMARI, Moni; SWATI; KUMAR, Rajiv; IQBAL, Khushboo; THAKUR, Indu Shekhar. Persistent organic pollutants in the environment: Risk assessment, hazards, and mitigation strategies. **Bioresource Technology Reports**, v. 19, p. 101143, set. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101143>.

MLADKOVA, Jana; SANDA, Miloslav; MATOUSKOVA, Eva; SELICHAROVA, Irena. Phenotyping breast cancer cell lines EM-G3, HCC1937, MCF7 and MDA-MB-231 using 2-D electrophoresis and affinity chromatography for glutathione-binding proteins. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, p. 449, dez. 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-449>.

MODICA, R.; BENEVENTO, E.; COLAO, A. Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) and cancer: new perspectives on an old relationship. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 46, n. 4, p. 667–677, dez. 2022. <https://doi.org/10.1007/s40618-022-01983-4>.

MOHAMADZADE, Zahra; M.SOLTANI, Bahram; GHAEMI, Zahra; HOSEINPOUR, Parisa. Cell specific tumor suppressor effect of Hsa-miR-1226-3p through downregulation of HER2, PIK3R2, and AKT1 genes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 134, p. 105965, maio 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2021.105965>.

MONACO, Alessandra; LICITRA, Fabrizio; GISI, Martina Di; GALASSO, Giovanni; DONATO, Marzia Di; GIOVANNELLI, Pia; MIGLIACCIO, Antimo; CASTORIA, Gabriella. ERβ in Triple-Negative Breast Cancer: Emerging Concepts and Therapeutic Possibilities. **Endocrines**, v. 2, n. 3, p. 356–365, set. 2021. <https://doi.org/10.3390/endocrines2030033>.

MONTAGNER, Cassiana C.; VIDAL, Cristiane; ACAYABA, Raphael. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, 11 jul. 2017. DOI [10.21577/0100-4042.20170091](https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170091). Disponível em: http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=6640&nomeArquivo=RV20170146.pdf. Acesso em: 30 out. 2024.

MONTES-GRAJALES, Diana; OLIVERO-VERBEL, Jesus. Computer-aided identification of novel protein targets of bisphenol A. **Toxicology Letters**, v. 222, n. 3, p. 312–320, out. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.08.010>.

MONTES-GRAJALES, Diana; PUERTA-GUARDO, Henry; ESPINOSA, Diego A.; HARRIS, Eva; CAICEDO-TORRES, William; OLIVERO-VERBEL, Jesus; MARTÍNEZ-ROMERO, Esperanza. In silico drug repurposing for the identification of potential candidate molecules against arboviruses infection. **Antiviral Research**, v. 173, p. 104668, jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104668>.

MORRIS, Garrett M.; HUEY, Ruth; LINDSTROM, William; SANNER, Michel F.; BELEW, Richard K.; GOODSSELL, David S.; OLSON, Arthur J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.

MOSCHEM, Jorge Da Cruz; GONÇALVES, Paola Rocha. Toxicologia in silico como possibilidade para análise de impacto toxicológico. **Health and Biosciences**, v. 3, n. 2, p. 42–63, ago. 2022. <https://doi.org/10.47456/hb.v3i2.38633>.

MURATA, Masaharu; KANG, Jeong-Hun. Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 311–327, jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.002>.

MUSHEBENGE, Aganze Gloire-Aimé; UGBAJA, Samuel Chima; MBATHA, Nonkululeko Avril; KHAN, Rene B.; KUMALO, Hezekiel M. Assessing the Potential Contribution of In Silico Studies in Discovering Drug Candidates That Interact with Various SARS-CoV-2 Receptors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 21, p. 15518, out. 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms242115518>.

NAGAR, Nupur; SAXENA, Harshi; PATHAK, Aakanksha; MISHRA, Amit; POLURI, Krishna Mohan. A review on structural mechanisms of protein-persistent organic pollutant (POP) interactions. **Chemosphere**, v. 332, p. 138877, ago. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138877>.

NAGHDI, Shaghayegh; SHAHRESTANI, Masoumeh Moheb; ZENDEHBAD, Mohammad; DJAHANIANI, Hoorieh; KAZEMIAN, Hossein; EDER, Dominik. Recent advances in application of metal-organic frameworks (MOFs) as adsorbent and catalyst in removal of persistent organic pollutants (POPs). **Journal of Hazardous Materials**, v. 442, p. 130127, jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130127>.

NAIR, Vidhya A.; VALO, Satu; PELTOMÄKI, Päivi; BAJBOUJ, Khuloud; ABDEL-RAHMAN, Wael M. Oncogenic Potential of Bisphenol A and Common Environmental Contaminants in Human Mammary Epithelial Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 3735, maio 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21103735>.

NASCIMENTO, Renan Gomes Do; OTONI, Kaléu Mormino. Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know? **Mastology**, v. 30, p. e20200024, 2020. <https://doi.org/10.29289/25945394202020200024>.

NEVE, Richard M.; CHIN, Koei; FRIDLAND, Jane; YEH, Jennifer; BAEHNER, Frederick L.; FEVR, Tea; CLARK, Laura; BAYANI, Nora; COPPE, Jean-Philippe; TONG, Frances; SPEED, Terry; SPELLMAN, Paul T.; DEVRIES, Sandy; LAPUK, Anna; WANG, Nick J.; KUO, Wen-Lin; STILWELL, Jackie L.; PINKEL, Daniel; ALBERTSON, Donna G.; ... GRAY, Joe W. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer Cell**, v. 10, n. 6, p. 515–527, dez. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008>.

NISHIDA, Naoyo; YANO, Hirohisa; NISHIDA, Takashi; KAMURA, Toshiharu; KOJIRO, Masamichi. Angiogenesis in cancer. **Vascular Health and Risk Management**, v. 2, n. 3, p. 213–219, ago. 2006. <https://doi.org/10.2147/vhrm.2006.2.3.213>.

NIU, Huixia; XU, Manjin; TU, Pengcheng; XU, Yunfeng; LI, Xueqing; XING, Mingluan; CHEN, Zhijian; WANG, Xiaofeng; LOU, Xiaoming; WU, Lizhi; SUN, Shengzhi. Emerging Contaminants: An Emerging Risk Factor for Diabetes Mellitus. **Toxics**, v. 12, n. 1, p. 47, jan. 2024. <https://doi.org/10.3390/toxics12010047>.

NOLAN, Emma; LINDEMAN, Geoffrey J.; VISVADER, Jane E. Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. **Cell**, v. 186, n. 8, p. 1708–1728, abr. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.01.040>.

NORTON, Kerri-Ann; POPEL, Aleksander S. Effects of endothelial cell proliferation and migration rates in a computational model of sprouting angiogenesis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36992, nov. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep36992>.

OBEAGU, Emmanuel Ifeanyi; OBEAGU, Getrude Uzoma. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. **Medicine**, v. 103, n. 3, p. e36905, jan. 2024. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000036905>.

OH, Jiwon; SHIN, Hyeong-Moo; NISHIMURA, Tomoko; RAHMAN, Mohammad Shafiur; TAKAHASHI, Nagahide; TSUCHIYA, Kenji J. Perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate in umbilical cord blood and child cognitive development: Hamamatsu Birth Cohort for Mothers and Children (HBC Study). **Environment International**, v. 163, p. 107215, maio 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107215>.

OLAYIWOLA, Yusuff; GOLLAHON, Lauren. Natural Compounds and Breast Cancer: Chemo-Preventive and Therapeutic Capabilities of Chlorogenic Acid and Cinnamaldehyde. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 3, p. 361, mar. 2024. <https://doi.org/10.3390/ph17030361>.

OLIVEIRA, José Carlos de; GUILLEN, Rubens Diego Marineli; SILVA, Daniel de Souza. Portaria nº 888, de 04 de maio de 2021 do ministério da saúde: o ponto de partida para enfrentamento aos contaminantes emergentes / Ordinance No. 888, of may 04, 2021 from the ministry of health: the starting point for confronting emerging contaminants. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 4, p. 30890–30901, abr. 2022. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n4-530>.

OLIVEIRA, Thiessa M. A.; MANSANO, Adrislaine S.; HOLANDA, Carlos A.; PINTO, Tiago S.; REIS, Jonas B.; AZEVEDO, Eduardo B.; VERBINNEN, Raphael T.; VIANA, José Lucas; FRANCO, Teresa C. R. S.; VIEIRA, Eny M. Occurrence and Environmental Risk Assessment of Contaminants of Emerging Concern in Brazilian Surface Waters. **Environmental Toxicology and Chemistry**, jul. 2024. <https://doi.org/10.1002/etc.5953>.

ORAL, Didem; YIRUN, Anil; ERKEKOGLU, Pinar. Safety Concerns of Organic Ultraviolet Filters: Special Focus on Endocrine-Disrupting Properties. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 39, n. 3, p. 201–212, 2020. <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2020033188>.

ORRANTIA-BORUNDA, Erasmo; ANCHONDO-NUÑEZ, Patricia; ACUÑA-AGUILAR, Lucero Evelia; GÓMEZ-VALLES, Francisco Octavio; RAMÍREZ-VALDESPINO, Claudia Adriana. Subtypes of Breast Cancer. **Breast Cancer**. [S. l.]: Exon Publications, 2022. p. 31–42. <https://doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer-subtypes>.

PAMPLONA-SILVA, Maria Tereza; MAZZEO, Dânia Elisa Christofolletti; BIANCHI, Jaqueline; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Estrogenic Compounds: Chemical Characteristics, Detection Methods, Biological and Environmental Effects. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 5, p. 144, maio 2018. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3796-z>.

PANIS, Carolina; LEMOS, Bernardo. Pesticide exposure and increased breast cancer risk in women population studies. **Science of The Total Environment**, v. 933, p. 172988, jul. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.172988>.

PARK, Min-Ah; HWANG, Kyung-A.; LEE, Hye-Rim; YI, Bo-Rim; JEUNG, Eui-Bae; CHOI, Kyung-Chul. Benzophenone-1 stimulated the growth of BG-1 ovarian cancer cells by cell cycle regulation via an estrogen receptor alpha-mediated signaling pathway in cellular and xenograft mouse models. **Toxicology**, v. 305, p. 41–48, mar. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.12.021>.

PASTORINO, Paolo; PREARO, Marino; BARCELÓ, Damià. Ethical principles and scientific advancements: In vitro, in silico, and non-vertebrate animal approaches for a green ecotoxicology. **Green Analytical Chemistry**, v. 8, p. 100096, mar. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.greeac.2024.100096>.

PELLACANI, Davide; TAN, Susanna; LEFORT, Sylvain; EAVES, Connie J. Transcriptional regulation of normal human mammary cell heterogeneity and its perturbation in breast cancer. **The EMBO Journal**, v. 38, n. 14, jul. 2019. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100330>.

PIEROZAN, Paula; JERNEREN, Fredrik; KARLSSON, Oskar. Perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure promotes proliferation, migration and invasion potential in human breast epithelial cells. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 5, p. 1729–1739, maio 2018. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2181-4>.

POLLACK, A. Z.; LOUIS, G. M. Buck; CHEN, Z.; SUN, L.; TRABERT, B.; GUO, Y.; KANNAN, K. Bisphenol A, benzophenone-type ultraviolet filters, and phthalates in relation to uterine leiomyoma. **Environmental Research**, v. 137, p. 101–107, fev. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.06.028>.

POMMERENKE, Claudia; NAGEL, Stefan; HAAKE, Josephine; KOELZ, Anne Leena; CHRISTGEN, Matthias; STEENPASS, Laura; EBERTH, Sonja. Molecular Characterization and Subtyping of Breast

Cancer Cell Lines Provide Novel Insights into Cancer Relevant Genes. **Cells**, v. 13, n. 4, p. 301, fev. 2024. <https://doi.org/10.3390/cells13040301>.

POPOVA, Margarita; MIHAYLOVA, Rositsa; MOMEKOV, Georgi; MOMEKOVA, Denitsa; LAZAROVA, Hristina; TRENDAFILOVA, Ivalina; MITOVA, Violeta; KOSEVA, Neli; MIHÁLYI, Judith; SHESTAKOVA, Pavletta; ST. PETKOV, Petko; ALEKSANDROV, Hristiyan A.; VAYSSILOV, Georgi N.; KONSTANTINOV, Spiro; SZEGEDI, Ágnes. Verapamil delivery systems on the basis of mesoporous ZSM-5/KIT-6 and ZSM-5/SBA-15 polymer nanocomposites as a potential tool to overcome MDR in cancer cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 142, p. 460–472, set. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.07.021>.

POSE-JUAN, Eva; FERNÁNDEZ-CRUZ, Tania; SIMAL-GÁNDARA, Jesús. State of the art on public risk assessment of combined human exposure to multiple chemical contaminants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 55, p. 11–28, set. 2016. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2016.06.011>.

PRASAD, Chandra Prakash; TRIPATHI, Satyendra Chandra; KUMAR, Manish; MOHAPATRA, Purusottam. Passage number of cancer cell lines: Importance, intricacies, and way-forward. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 120, n. 8, p. 2049–2055, ago. 2023. <https://doi.org/10.1002/bit.28496>.

PROSSNITZ, Eric R.; BARTON, Matthias. Estrogen biology: New insights into GPER function and clinical opportunities. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 389, n. 1–2, p. 71–83, maio 2014. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.02.002>.

PROVENZANO, Elena; ULANER, Gary A.; CHIN, Suet-Feung. Molecular Classification of Breast Cancer. **PET Clinics**, v. 13, n. 3, p. 325–338, jul. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.004>.

PULEO, Julieann; POLYAK, Kornelia. The MCF10 Model of Breast Tumor Progression. **Cancer Research**, v. 81, n. 16, p. 4183–4185, ago. 2021. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-1939>.

PURI, Mehak; GANDHI, Kavita; KUMAR, M. Suresh. Emerging environmental contaminants: A global perspective on policies and regulations. **Journal of Environmental Management**, v. 332, p. 117344, abr. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117344>.

QIN, Yi; ASHRAFIZADEH, Milad; MONGIARDINI, Vera; GRIMALDI, Benedetto; CREA, Francesco; RIETDORF, Katja; GYÓRFFY, Balázs; KLIONSKY, Daniel J.; REN, Jun; ZHANG, Wei; ZHANG, Xianbin. Autophagy and cancer drug resistance in dialogue: Pre-clinical and clinical evidence. **Cancer Letters**, v. 570, p. 216307, ago. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216307>.

QU, Wei; YAN, Yitang; GERRISH, Kevin; SCAPPINI, Erica; TUCKER, Charles J.; DIXON, Darlene; MERRICK, B. Alex. Chronic PFOA exposure in vitro causes acquisition of multiple tumor cell characteristics in rat liver cells. **Toxicology in Vitro**, v. 89, p. 105577, jun. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105577>.

QU, Ying; HAN, Bingchen; YU, Yi; YAO, Weiwu; BOSE, Shikha; KARLAN, Beth Y.; GIULIANO, Armando E.; CUI, Xiaojiang. Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0131285, jul. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131285>.

R. DESJARDINS, Philippe; CONKLIN, Deborah S. Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 93, n. 1, jan. 2011. DOI [10.1002/0471142727.mba03js93](https://doi.org/10.1002/0471142727.mba03js93). Disponível em: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142727.mba03js93>. Acesso em: 30 out. 2024.

RAMÍREZ-MORALES, Didier; PÉREZ-VILLANUEVA, Marta E.; CHIN-PAMPILLO, Juan S.; AGUILAR-MORA, Paula; ARIAS-MORA, Víctor; MASÍS-MORA, Mario. Pesticide occurrence and water quality assessment from an agriculturally influenced Latin-American tropical region. **Chemosphere**, v. 262, p. 127851, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127851>.

RIM, Kyung-Taek. In silico prediction of toxicity and its applications for chemicals at work. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 12, n. 3, p. 191–202, set. 2020. <https://doi.org/10.1007/s13530-020-00056-4>.

ROBEY, Robert W.; PLUCHINO, Kristen M.; HALL, Matthew D.; FOJO, Antonio T.; BATES, Susan E.; GOTTESMAN, Michael M. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 7, p. 452–464, jul. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8>.

RODRIGUEZ-BARRUECO, Ruth; YU, Jiyang; SAUCEDO-CUEVAS, Laura P.; OLIVAN, Mireia; LLOBET-NAVAS, David; PUTCHA, Preeti; CASTRO, Veronica; MURGA-PENAS, Eva M.; COLLAZO-LORDUY, Ana; CASTILLO-MARTIN, Mireia; ALVAREZ, Mariano; CORDON-CARDO, Carlos; KALINSKY, Kevin; MAURER, Matthew; CALIFANO, Andrea; SILVA, Jose M. Inhibition of the autocrine IL-6–JAK2–STAT3–calprotectin axis as targeted therapy for HR–/HER2+ breast cancers. **Genes & Development**, v. 29, n. 15, p. 1631–1648, 1 ago. 2015. <https://doi.org/10.1101/gad.262642.115>.

RODRÍGUEZ-GÓMEZ, R.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; CAMINO-SÁNCHEZ, F. J.; BALLESTEROS, O.; NAVALÓN, A. Gas chromatography and ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the determination of selected endocrine disrupting chemicals in human breast milk after stir-bar sorptive extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1349, p. 69–79, jul. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.100>.

ROSENFELD, Cheryl S.; COOKE, Paul S. Endocrine disruption through membrane estrogen receptors and novel pathways leading to rapid toxicological and epigenetic effects. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 187, p. 106–117, mar. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.11.007>.

ROY, Madhuchhanda; FOWLER, Amy M.; ULANER, Gary A.; MAHAJAN, Aparna. Molecular Classification of Breast Cancer. **PET Clinics**, v. 18, n. 4, p. 441–458, out. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2023.04.002>.

RUDRAPAL, Mithun; KHAIRNAR, Shubham J.; JADHAV, Anil G. Drug Repurposing (DR): An Emerging Approach in Drug Discovery. **Drug Repurposing—Hypothesis, Molecular Aspects and Therapeutic Applications**. [S. l.]: IntechOpen., 2020. p. 234.

SAKAI, Genki; HIRAO-SUZUKI, Masayo; KOGA, Takayuki; KOBAYASHI, Takananobu; KAMISHIKIRYO, Jun; TANAKA, Michitaka; FUJII, Kiyonaga; TAKIGUCHI, Masufumi; SUGIHARA, Narumi; TODA, Akihisa; TAKEDA, Shuso. Perfluorooctanoic acid (PFOA) as a stimulator of estrogen receptor-negative breast cancer MDA-MB-231 cell aggressiveness: Evidence for involvement of fatty acid 2-hydroxylase (FA2H) in the stimulated cell migration. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 47, n. 4, p. 159–168, 2022. <https://doi.org/10.2131/jts.47.159>.

SARPA, Marcia; FRIEDRICH, Karen. Exposição a agrotóxicos e desenvolvimento de câncer no contexto da saúde coletiva: o papel da agroecologia como suporte às políticas públicas de prevenção do câncer. **Saúde em Debate**, v. 46, n. spe2, p. 407–425, 2022. <https://doi.org/10.1590/0103-11042022e227>.

SARVARI, Pourya; SARVARI, Pouya; RAMÍREZ-DÍAZ, Ivonne; MAHJoubi, Frouzandeh; RUBIO, Karla. Advances of Epigenetic Biomarkers and Epigenome Editing for Early Diagnosis in Breast Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9521, ago. 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23179521>.

SATO, Hiromi; SIDDIG, Sana; UZU, Miaki; SUZUKI, Sayumi; NOMURA, Yuki; KASHIBA, Tatsuro; GUSHIMIYAGI, Keisuke; SEKINE, Yuko; UEHARA, Tomoya; ARANO, Yasushi; YAMAURA, Katsunori; UENO, Koichi. Elacridar enhances the cytotoxic effects of sunitinib and prevents multidrug resistance in renal carcinoma cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 746, p. 258–266, jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.11.021>.

SAUSSEDE-AIM, Jennifer; MATERA, Eva-Laure; FERLINI, Cristiano; DUMONTET, Charles. β 3-Tubulin is induced by estradiol in human breast carcinoma cells through an estrogen-receptor dependent pathway. **Cell Motility**, v. 66, n. 7, p. 378–388, jul. 2009. <https://doi.org/10.1002/cm.20377>.

SCHARENBERG, Christian W.; HARKEY, Michael A.; TOROK-STORB, Beverly. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. **Blood**, v. 99, n. 2, p. 507–512, 15 jan. 2002. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.2.507>.

SEARSON, Peter C. The Cancer Moonshot, the role of in vitro models, model accuracy, and the need for validation. **Nature Nanotechnology**, v. 18, n. 10, p. 1121–1123, out. 2023. <https://doi.org/10.1038/s41565-023-01486-0>.

SEDLACKOVA, Lucia; KOROLCHUK, Viktor I. Mitochondrial quality control as a key determinant of cell survival. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1866, n. 4, p. 575–587, abr. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.12.012>.

SEIGEL, Gail M.; CAMPBELL, Lorrie M. High-throughput microtiter assay for Hoechst 33342 dye uptake. **Cytotechnology**, v. 45, n. 3, p. 155–160, jul. 2004. <https://doi.org/10.1007/s10616-004-7256-9>.

SELLITTO, Assunta; D'AGOSTINO, Ylenia; ALEXANDROVA, Elena; LAMBERTI, Jessica; PECORARO, Giovanni; MEMOLI, Domenico; ROCCO, Domenico; COVIELLO, Elena; GIURATO, Giorgio; NASSA, Giovanni; TARALLO, Roberta; WEISZ, Alessandro; RIZZO, Francesca. Insights into the Role of Estrogen Receptor β in Triple-Negative Breast Cancer. **Cancers**, v. 12, n. 6, jun. 2020. <https://doi.org/10.3390/cancers12061477>.

SELWE, Kgato P.; THORN, Jessica P. R.; DESROUSSEAU, Alizée O. S.; DESSENT, Caroline E. H.; SALLACH, J. Brett. Emerging contaminant exposure to aquatic systems in the Southern African Development Community. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 41, n. 2, p. 382–395, fev. 2022. <https://doi.org/10.1002/etc.5284>.

SHAATH, Hibah; ELANGO, Ramesh; ALAJEZ, Nehad M. Molecular Classification of Breast Cancer Utilizing Long Non-Coding RNA (lncRNA) Transcriptomes Identifies Novel Diagnostic lncRNA Panel for Triple-Negative Breast Cancer. **Cancers**, v. 13, n. 21, p. 5350, out. 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13215350>.

SHARMA, A.; KUMAR, V.; THUKRAL, A. K.; BHARDWAJ, R. Responses of Plants to Pesticide Toxicity: an Overview. **Planta Daninha**, v. 37, 2019. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582019370100065>.

SHEN, Heqing; MAIN, Katharina M.; VIRTANEN, Helena E.; DAMGGARD, Ida N.; HAAVISTO, Anne-Maarit; KALEVA, M.; BOISEN, K.A.; SCHMIDT, Ida M.; CHELLAKOOTY, Marla; SKAKKEBAEK, Niels E.; TOPPARI, Jorma; SCHRAMM, Karl-Werner. From mother to child: Investigation of prenatal and postnatal exposure to persistent bioaccumulating toxicants using breast milk and placenta biomonitoring. **Chemosphere**, v. 67, n. 9, p. S256–S262, abr. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.05.106>.

SHEN, Kang; YU, Huiguang; XIE, Baohua; MENG, Qiuyu; DONG, Chune; SHEN, Kun; ZHOU, Hai-Bing. Anticancer or carcinogenic? The role of estrogen receptor β in breast cancer progression. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 242, p. 108350, fev. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108350>.

SINGH, Gurudatta; SINGH, Anubhuti; MISHRA, Virendra Kumar. A critical review of occurrence, sources, fate, ecological risk, and health effect of emerging contaminants in water and wastewater. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 22, p. 100994, dez. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2024.100994>.

SINGH, Sandeep; RAWAT, Meenakshi; MALYAN, Sandeep K.; SINGH, Rajesh; TYAGI, Vinay Kumar; SINGH, Kaptan; KASHYAP, Sujata; KUMAR, Sumant; SHARMA, Manish; PANDAY, B. K.; PANDEY, R. P. Global distribution of pesticides in freshwater resources and their remediation approaches. **Environmental Research**, v. 225, p. 115605, maio 2023. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2023.115605>.

SMITH, Martyn T.; GUYTON, Kathryn Z.; GIBBONS, Catherine F.; FRITZ, Jason M.; PORTIER, Christopher J.; RUSYN, Ivan; DEMARINI, David M.; CALDWELL, Jane C.; KAVLOCK, Robert J.; LAMBERT, Paul F.; HECHT, Stephen S.; BUCHER, John R.; STEWART, Bernard W.; BAAN, Robert A.; COGLIANO, Vincent J.; STRAIF, Kurt. Key Characteristics of Carcinogens as a Basis for Organizing Data on Mechanisms of Carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, v. 124, n. 6, p. 713–721, jun. 2016. <https://doi.org/10.1289/ehp.1509912>.

SONG, Dandan; HE, Huan; INDUKURI, Rajitha; HUANG, Zhiqiang; STEPANAUSKAITE, Lina; SINHA, Indranil; HALDOSÉN, Lars-Arne; ZHAO, Chunyan; WILLIAMS, Cecilia. ER α and ER β Homodimers in the Same Cellular Context Regulate Distinct Transcriptomes and Functions. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, jul. 2022. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.930227>.

SOULE, H. D.; MALONEY, T. M.; WOLMAN, S. R.; PETERSON, W. D.; BRENZ, R.; MCGRATH, C. M.; RUSSO, J.; PAULEY, R. J.; JONES, R. F.; BROOKS, S. C. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. **Cancer research**, v. 50, n. 18, p. 6075–86, set. 1990. .

SOUZA, Deisi N. de; MOUNTEER, Ann H.; ARCANJO, Gemima S. Estrogenic compounds in drinking water: A systematic review and risk analysis. **Chemosphere**, v. 360, p. 142463, jul. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142463>.

STARLING, Maria Clara V. M.; AMORIM, Camila C.; LEÃO, Mônica Maria D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 372, p. 17–36, jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.043>.

STECCA, Laura; TAIT, Sabrina; CORRADO, Federica; ESPOSITO, Mauro; MANTOVANI, Alberto; LA ROCCA, Cinzia. Development of an in vitro test battery model based on liver and colon cancer cell lines to discriminate PCB mixtures by transcription factors gene expression analysis. **Toxicology in Vitro**, v. 34, p. 204–211, ago. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.04.009>.

STEIL, Gisleine Jarenko; BUZZO, João Luiz Aldinucci; RIBEIRO, Ciro Alberto de Oliveira; NETO, Francisco Filipak. Polybrominated diphenyl ethers BDE-47 and BDE-99 modulate murine melanoma cell phenotype in vitro. **Environmental science and pollution research international**, v. 29, n. 8, p. 11291–11303, fev. 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16455-0>.

STILLWATER, Barbara J.; BULL, Ashleigh C.; ROMAGNOLO, Donato F.; NEUMAYER, Leigh A.; DONOVAN, Micah G.; SELMIN, Ornella I. Bisphenols and Risk of Breast Cancer: A Narrative Review of the Impact of Diet and Bioactive Food Components. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, nov. 2020. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.581388>.

SUZUKI, Tomoharu; KITAMURA, Shigeyuki; KHOTA, Ryuki; SUGIHARA, Kazumi; FUJIMOTO, Nariaki; OHTA, Shigeru. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 203, n. 1, p. 9–17, fev. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.07.005>.

SWEENEY, M. F.; HASAN, N.; SOTO, A. M.; SONNENSCHNEIN, C. Environmental endocrine disruptors: Effects on the human male reproductive system. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 16, n. 4, p. 341–357, dez. 2015. <https://doi.org/10.1007/s11154-016-9337-4>.

TAM, Chit; RAO, Shitao; WAYE, Mary Miu Yee; NG, Tzi Bun; WANG, Chi Chiu. Autophagy signals orchestrate chemoresistance of gynecological cancers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1875, n. 2, p. 188525, abr. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188525>.

TILLI, Tatiana M.; CASTRO, Cláudio Da Silva; TUSZYNSKI, Jack A.; CARELS, Nicolas. A strategy to identify housekeeping genes suitable for analysis in breast cancer diseases. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 639, dez. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2946-1>.

TORRES-ALAMILLA, Pablo; CASTILLO-SANCHEZ, Rocio; CORTES-REYNOSA, Pedro; GOMEZ, Rocio; SALAZAR, Eduardo Perez. Bisphenol A increases the size of primary mammary tumors and promotes metastasis in a murine model of breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 575, p. 111998, set. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111998>.

TRAN, Ngoc Han; REINHARD, Martin; GIN, Karina Yew-Hoong. Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. **Water Research**, v. 133, p. 182–207, abr. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.029>.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

UNTERGASSER, Andreas; RUIJTER, Jan M.; BENES, Vladimir; VAN DEN HOFF, Maurice J. B. Web-based LinRegPCR: application for the visualization and analysis of (Rt)-qPCR amplification and melting data. **BMC Bioinformatics**, v. 22, n. 1, p. 398, dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04306-1>.

VANDERSICKEL, Veerle; SLABBERT, Jacobus; THIERENS, Hubert; VRAL, Anne. Comparison of the colony formation and crystal violet cell proliferation assays to determine cellular radiosensitivity in a repair-deficient MCF10A cell line. **Radiation Measurements**, v. 46, n. 1, p. 72–75, jan. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.radmeas.2010.08.003>.

VARGO-GOGOLA, Tracy; ROSEN, Jeffrey M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 9, p. 659–672, set. 2007. <https://doi.org/10.1038/nrc2193>.

VÉLEZ, Verónica Patricia Pinos; ESQUIVEL-HERNÁNDEZ, Germain; CIPRIANI-AVILA, Isabel; MORA-ABRIL, Enma; CISNEROS, Juan Fernando; ALVARADO, Andrés; ABRIL-ULLOA, Victoria. Emerging Contaminants in Trans-American Waters. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 14, n. 6, p. 1, nov. 2019. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2436>.

WAKS, Adrienne G.; WINER, Eric P. Breast Cancer Treatment. **JAMA**, v. 321, n. 3, p. 288, jan. 2019. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>.

WANG, Fang; XIANG, Leilei; LEUNG, Kelvin Sze-Yin; ELSNER, Martin; ZHANG, Ying; GUO, Yuming; PAN, Bo; SUN, Hongwen; AN, Taicheng; YING, Guangguo; BROOKS, Bryan W.; HOU, Deyi; HELBLING, Damian E.; SUN, Jianqiang; QIU, Hao; VOGEL, Timothy M.; ZHANG, Wei; GAO, Yanzheng; SIMPSON, Myrna J.; ... TIEDJE, James M. Emerging contaminants: A One Health perspective. **The Innovation**, v. 5, n. 4, p. 100612, jul. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2024.100612>.
WANG, Hongqiang; GAO, Xing; ZUO, Yanqiu. Research and Application of Water Treatment Technologies for Emerging Contaminants (ECs): A Pathway to Solving Water Environment Challenges. **Water**, v. 16, n. 13, p. 1837, 27 jun. 2024a. <https://doi.org/10.3390/w16131837>.

WANG, Hongqiang; GAO, Xing; ZUO, Yanqiu. Research and Application of Water Treatment Technologies for Emerging Contaminants (ECs): A Pathway to Solving Water Environment Challenges. **Water**, v. 16, n. 13, p. 1837, 27 jun. 2024b. <https://doi.org/10.3390/w16131837>.

WANG, Huan; ZHANG, Hongchang; HU, Shuangqing; XU, Ting; YANG, Yiheng; CAO, Miao; WEI, Sheng; SONG, Yiqun; HAN, Jing; YIN, Daqiang. Insight into the differential toxicity of PFOA and PFBA based on a 3D-cultured MDA-MB-231 cell model. **Journal of Hazardous Materials**, v. 465, p. 133499, mar. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133499>.

WANG, Luming; HU, Danping; XU, Jinming; HU, Jian; WANG, Yifei. Complex in vitro model: A transformative model in drug development and precision medicine. **Clinical and Translational Science**, v. 17, n. 2, fev. 2024. <https://doi.org/10.1111/cts.13695>.

WANG, Qian; SCHULTZ, Bruce D. Cholera toxin enhances Na⁺ absorption across MCF10A human mammary epithelia. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 306, n. 5, p. C471–C484, mar. 2014. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00181.2013>.

WANG, Teng; HAN, Jun; DUAN, Xing; XIONG, Bo; CUI, Xiang-Shun; KIM, Nam-Hyung; LIU, Hong-Lin; SUN, Shao-Chen. The toxic effects and possible mechanisms of Bisphenol A on oocyte maturation of porcine in vitro. **Oncotarget**, v. 7, n. 22, p. 32554–32565, 31 maio 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8689>.

WANG, Yanjun; KANG, Jing; WANG, Rui; RAMEZANI, Keyvan; BONAKDAR, Moein; MOGHIMI, Niusha; SALIMI, Maryam; YAO, Yongfeng; WANG, Kai. Bisphenol A interacts with DLGAP5 and regulates IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway to promote tumorigenesis and progression of osteosarcoma. **Chemosphere**, v. 312, p. 136545, jan. 2023a. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136545>.

WANG, Yanjun; KANG, Jing; WANG, Rui; RAMEZANI, Keyvan; BONAKDAR, Moein; MOGHIMI, Niusha; SALIMI, Maryam; YAO, Yongfeng; WANG, Kai. Bisphenol A interacts with DLGAP5 and regulates IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway to promote tumorigenesis and progression of osteosarcoma. **Chemosphere**, v. 312, p. 136545, jan. 2023b. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136545>.

WANG, Yawei; SUN, Yingying; SHANG, Chao; CHEN, Lili; CHEN, Hongyu; WANG, Dake; ZENG, Xianlu. Distinct Ring1b complexes defined by DEAD-box helicases and EMT transcription factors synergistically enhance E-cadherin silencing in breast cancer. **Cell Death & Disease**, v. 12, n. 2, p. 202, 19 fev. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03491-4>.

WANG, Zhanyun; WALKER, Glen W.; MUIR, Derek C. G.; NAGATANI-YOSHIDA, Kakuko. Toward a Global Understanding of Chemical Pollution: A First Comprehensive Analysis of National and Regional Chemical Inventories. **Environmental Science and Technology**, v. 54, n. 5, p. 2575–2584, mar. 2020. https://doi.org/10.1021/ACS.EST.9B06379/ASSET/IMAGES/LARGE/ES9B06379_0002.JPEG.

WELSH, JoEllen. Animal Models for Studying Prevention and Treatment of Breast Cancer. **Animal Models for the Study of Human Disease**. [S. l.]: Elsevier, 2013. p. 997–1018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415894-8.00040-3>.

WHITE, Eileen. The role for autophagy in cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 1, p. 42–46, jan. 2015. <https://doi.org/10.1172/JCI73941>.

WIMBERLY, Hallie; HAN, Gang; PINNADUWAGE, Dushanthi; MURPHY, Leigh C.; YANG, Xiaohong Rose; ANDRULIS, Irene L.; SHERMAN, Mark; FIGUEROA, Jonine; RIMM, David L. ER β splice variant expression in four large cohorts of human breast cancer patient tumors. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 146, n. 3, p. 657–667, ago. 2014. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3050-3>.

WITEK, Patrycja; ENGUITA, Francisco J.; GRZESIAK, Malgorzata; COSTA, Marina C.; GABRIEL, André; KOZIOROWSKI, Marek; SLOMCZYNSKA, Maria; KNAPCZYK-STWORA, Katarzyna. Effects of neonatal exposure to methoxychlor on corpus luteum in gilts: A transcriptomic analysis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 88, n. 3, p. 238–248, mar. 2021. <https://doi.org/10.1002/mrd.23463>.

WITT, Brittany L.; TOLLEFSBOL, Trygve O. Molecular, Cellular, and Technical Aspects of Breast Cancer Cell Lines as a Foundational Tool in Cancer Research. **Life**, v. 13, n. 12, p. 2311, dez. 2023. <https://doi.org/10.3390/life13122311>.

WU, Qiong; YANG, Zhiping; NIE, Yongzhan; SHI, Yongquan; FAN, Daiming. Multi-drug resistance in cancer chemotherapeutics: Mechanisms and lab approaches. **Cancer Letters**, v. 347, n. 2, p. 159–166, jun. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.013>.

XIA, Yiteng; WANG, Wen-Xiong. Subcellular responses of fish cells to sewage effluents: Cell line-based and whole-animal based approaches. **Science of The Total Environment**, v. 906, p. 167528, jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167528>.

XU, Xilong; XIONG, Xiufang; SUN, Yi. The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity. **Science China Life Sciences**, v. 59, n. 7, p. 656–672, jul. 2016. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-0018-0>.

YAMASAKI, Kanji; TAKEYOSHI, Masahiro; SAWAKI, Masakuni; IMATANAKA, Nobuya; SHINODA, Kazutoshi; TAKATSUKI, Mineo. Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. **Toxicology**, v. 183, n. 1–3, p. 93–115, fev. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00445-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00445-6).

YI, Yong Weon; YOU, Kyu Sic; PARK, Jeong-Soo; LEE, Seok-Geun; SEONG, Yeon-Sun. Ribosomal Protein S6: A Potential Therapeutic Target against Cancer? **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 1, dez. 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms23010048>.

YUN, Chul Won; LEE, Sang Hun. The Roles of Autophagy in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3466, nov. 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19113466>.

YUSUF, Mohd. Insights into the in-silico research: Current scenario, advantages, limits, and future perspectives. **Life in Silico**, v. 1, n. 1, p. 13–25, 2023.

ZAHIR, Nastaran; SUN, Ruping; GALLAHAN, Daniel; GATENBY, Robert A.; CURTIS, Christina. Characterizing the ecological and evolutionary dynamics of cancer. **Nature Genetics**, v. 52, n. 8, p. 759–767, ago. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0668-4>.

ZENG, Fan-Chang; ZENG, Ming-Qiang; HUANG, Liang; LI, Yong-Lin; GAO, Ben-Min; CHEN, Jun-Jie; XUE, Rui-Zhi; TANG, Zheng-Yan. Downregulation of VEGFA inhibits proliferation, promotes apoptosis, and suppresses migration and invasion of renal clear cell carcinoma. **OncoTargets and therapy**, v. 9, p. 2131–41, 2016. <https://doi.org/10.2147/OTT.S98002>.

ZHANG, Lei; ZHANG, Yuan; LI, Xin; GAO, Huijuan; CHEN, Xiatian; LI, Peifeng. CircRNA-miRNA-VEGFA: an important pathway to regulate cancer pathogenesis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1049742, 10 maio 2023. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1049742>.

ZHANG, Pengbo; CAO, Meng; ZHANG, Yi; XU, Lei; MENG, Fanchao; WU, Xinquan; XIA, Tianfang; CHEN, Qun; SHI, Guodong; WU, Pengfei; CHEN, Lei; LU, Zipeng; YIN, Jie; CAI, Baobao; CAO, Shouji; MIAO, Yi; JIANG, Kuirong. A novel antisense lncRNA NT5E promotes progression by modulating the expression of SYNCRIP and predicts a poor prognosis in pancreatic cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 18, p. 10898–10912, set. 2020. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15718>.

ZHANG, Qian; WANG, Jianan; CHEN, Chen; KONG, Yi; YAN, Hong; DUAN, Jinyan; WANG, Chi; SHA, Yingjiao; WEN, Xinyu; WANG, Chengbin. Perfluorooctanoic acid induces migration and invasion and inhibits apoptosis through the PI3K/AKT signaling pathway in human rhabdomyosarcoma cells. **Oncology Reports**, 6 ago. 2019. DOI [10.3892/or.2019.7265](https://doi.org/10.3892/or.2019.7265). Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2019.7265>. Acesso em: 9 ago. 2024.

ZHANG, Weidong; WANG, Fengliang; XU, Pengfei; MIAO, Chen; ZENG, Xin; CUI, Xianwei; LU, Cheng; XIE, Hui; YIN, Hong; CHEN, Fei; MA, Jingjing; GAO, Sheng; FU, Ziyi. Perfluorooctanoic acid stimulates breast cancer cells invasion and up-regulates matrix metalloproteinase-2/-9 expression mediated by activating NF-κB. **Toxicology Letters**, v. 229, n. 1, p. 118–125, ago. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.06.004>.

ZHANG, Xiao-Lin; LIU, Na; WENG, Shan-Fan; WANG, Hong-Sheng. Bisphenol A Increases the Migration and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells via Oestrogen-related Receptor Gamma. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 119, n. 4, p. 389–395, out. 2016. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12591>.

ZHANG, Ziqi; YUE, Pengfei; LU, Tianqi; WANG, Yang; WEI, Yuquan; WEI, Xiawei. Role of lysosomes in physiological activities, diseases, and therapy. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 14, n. 1, p. 79, 14 maio 2021. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01087-1>.

ZHANG, Wei., FANG, Yanqiu., SHI, Xu., ZHANG, Minglei ., WANG, Xiaoqi., & TAN, Yan. (2011). Effect of bisphenol A on the EGFR-STAT3 pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.583>

ZHAO, Hongzhi; HUO, Wenqian; LI, Jiufeng; MA, Xinli; XIA, Wei; PANG, Zhengji; XIE, Mingyi; XU, Shunqing; CAI, Zongwei. Exposure to benzophenones, parabens and triclosan among pregnant women in different trimesters. **Science of The Total Environment**, v. 607–608, p. 578–585, dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.003>.

ZHENG, Daitian; CHEN, Lingzhi; TIAN, Huiting; YANG, Qiuping; WU, Jinyao; JI, Zeqi; CAI, Jiehui; CHEN, Yexi; LI, Zhiyang. A scientometric analysis of research trends on emerging contaminants in the field of cancer in 2012–2021. **Frontiers in Public Health**, v. 10, p. 1034585, 25 nov. 2022a. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1034585>.

ZHENG, Daitian; CHEN, Lingzhi; TIAN, Huiting; YANG, Qiuping; WU, Jinyao; JI, Zeqi; CAI, Jiehui; CHEN, Yexi; LI, Zhiyang. A scientometric analysis of research trends on emerging contaminants in the field of cancer in 2012–2021. **Frontiers in Public Health**, v. 10, p. 1034585, 25 nov. 2022b. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1034585>.

ZHOU, Wenjun; KANG, Hee Chol; O'GRAD, Mike; CHAMBER, Kevin M.; DUBBEL, Brad; MELQUIS, Penny; GEE, Kyle R. CellTrace™ Far Red & CellTracker™ Deep Red. **Journal of Biological Methods**, v. 3, n. 1, p. 1, mar. 2016. <https://doi.org/10.14440/jbm.2016.113>.

ZOU, Mengting; QI, Yumeng; QU, Ruijuan; AL-BASHER, Gadah; PAN, Xiaoxue; WANG, Zunyao; HUO, Zongli; ZHU, Feng. Effective degradation of 2,4-dihydroxybenzophenone by zero-valent iron powder (Fe⁰)-activated persulfate in aqueous solution: Kinetic study, product identification and theoretical calculations. **Science of The Total Environment**, v. 771, p. 144743, jun. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144743>.