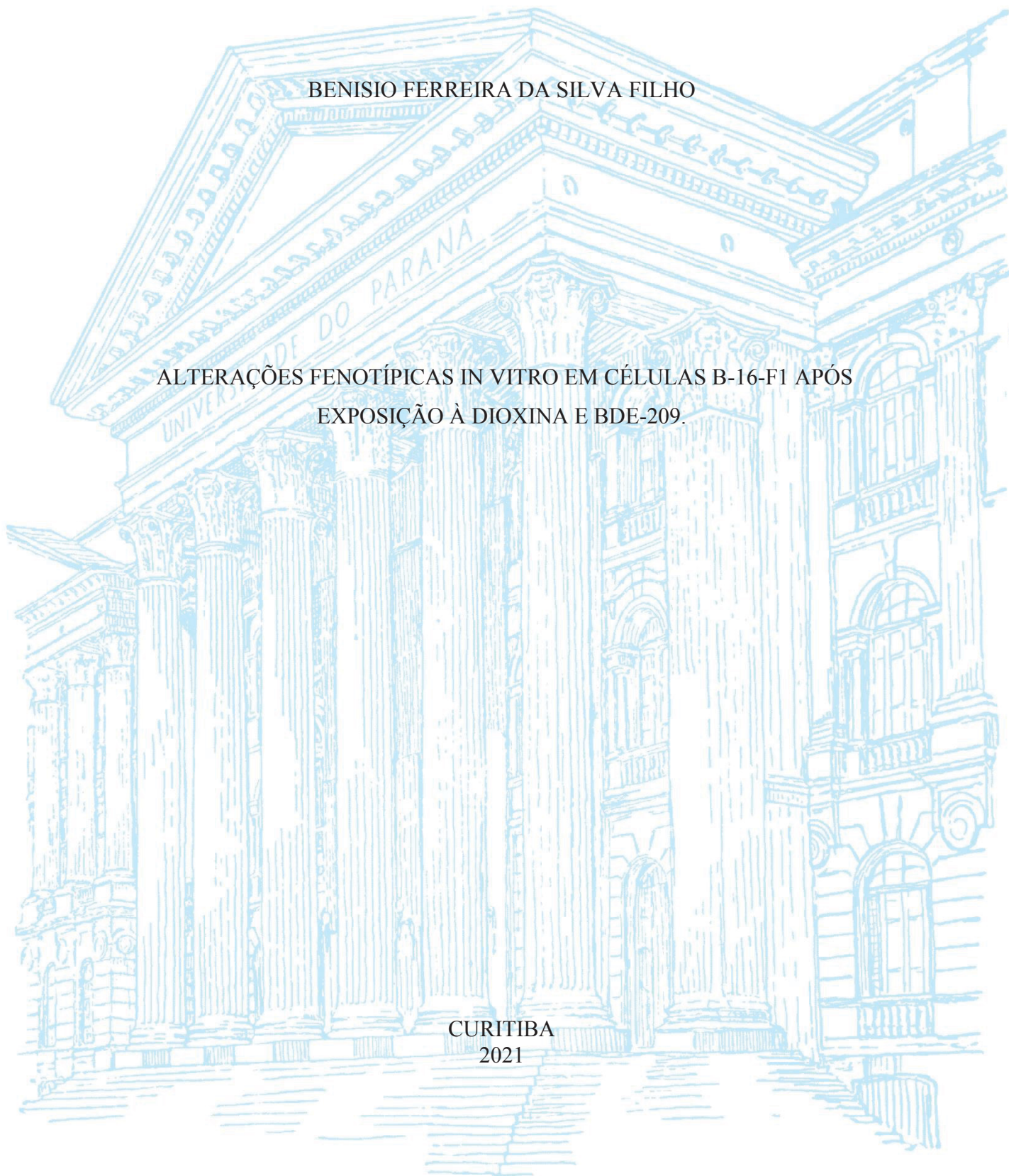


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BENISIO FERREIRA DA SILVA FILHO

ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS IN VITRO EM CÉLULAS B-16-F1 APÓS
EXPOSIÇÃO À DIOXINA E BDE-209.

CURITIBA
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BENISIO FERREIRA DA SILVA FILHO

ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS IN VITRO EM CÉLULAS B-16-F1 APÓS
EXPOSIÇÃO À DIOXINA E BDE-209.

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

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

CURITIBA
2021

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

Silva Filho, Benisio Ferreira da.

Alterações fenotípicas in vitro em células B-16-F1 após exposição à dioxina e BDE-209. / Benisio Ferreira da Silva Filho. – Curitiba, 2021. 1 recurso on-line : PDF.

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

1. Dioxinas. 2. Metaloproteases. 3. Transição Epitelial-Mesenquimal. 4. Melanoma. 5. Transformação celular neoplásica. 6. Tumores. I. Ribeiro, Ciro Alberto de Oliveira, 1960-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. III. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **BENISIO FERREIRA DA SILVA FILHO** intitulada: **ALTERAÇÕES FENOTÍPICAS IN VITRO EM CÉLULAS B16-F1 APÓS EXPOSIÇÃO À DIOXINA E BDE-209**, sob orientação do Prof. Dr. CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 15 de Março de 2021.

Assinatura Eletrônica

16/03/2021 10:06:37.0

CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

16/03/2021 10:09:06.0

DANIEL BUSSOLARO

Avaliador Externo (INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

17/03/2021 16:48:25.0

MARIA CRISTINA LEME GODOY DOS SANTOS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

16/03/2021 16:25:40.0

LUIZA HELENA GREMSKI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

18/03/2021 14:28:48.0

RODRIGO DE CASSIO DA SILVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

AGRADECIMENTOS

Por ter sido criado em ambiente católico e estudado em escolas religiosas, meu primeiro agradecimento vai a Deus, pois, se estou terminando esse Doutorado após tantos acontecimentos duros e difíceis de serem administrados, isso se deve aos momentos em que minha fé, me deu força para continuar enfrentando cada uma das situações adversas. Agradeço então a Deus por ter me dado força nessa trajetória e do seu modo, dado chances e alternativas para finalizar da melhor forma.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira muito obrigado pela paciência e ensinamentos. Já disse isso a ele uma vez e deixo aqui registrado: Copio e emulo os bons ensinamentos. Pelo cansaço e pelas dores do ano mais louco da minha vida, achei que iria desistir. Além de orientador, um grande Líder, não desistiu do seu orientando. Levo esse exemplo para o resto da vida.

Aos Professores Francisco Filipak Neto e Marco Randi. O Professor “Chico” é um exemplo a ser seguido. O Marco Randi um grande “Jedi” que apresentou uma aula sobre Biologia celular como um dos meus melhores professores. Ambos sabem fazer seus alunos pensarem e ensinam que esse é o caminho. Obrigado aos dois.

A professora Magda por me acolher em seu laboratório e permitir realizar os experimentos da melhor forma possível. Muito obrigado.

Aos meus amigos de laboratório, Andressa, Ludiana, Marcelle, Dandie, Patricia, Daniele, Tug (Tugstênio), Fernanda, Joelma, Jessica, Gisleine, por tudo que aprendi com vocês e por nunca terem reclamado das minhas pizzas!

A Micheli de Marchi e ao Erick Moggio que pela proximidade, trabalho e oportunidade de passar algumas coisas que aprendi. Espero ter sido útil a vocês e desejo que cresçam e sejam grandes profissionais. Foram ótimos os momentos com vocês dois.

A *Ana Clara por permitir ajudas importantíssimas em momentos decisivos.

A Angela, Lidia e Maria Beatriz. Sempre estiveram do meu lado passando tranquilidade e força. Amo vocês três.

Aos meus pais, pelo mais simples dos ensinamentos: Sempre procure saber e fazer bem. E nunca desista. Eu achei que iria desobedecer dessa vez, mas tive a oportunidade de não o fazer. Agradeço.

Aos meus novos amigos da UFRJ do laboratório de Laboratório de Glicobiologia Estrutural e Funcional pelos ensinamentos e parceria em alguns experimentos. Grande abraço ao Levi, que foi um ótimo novo amigo na minha vida científica e ao Miguel de Lucena que me ensinou novas técnicas. E sem esquecer claro da Professora Adriane, pesquisadora fantástica, em apenas uma semana, aprendi muito.

Ao secretário Lucas do programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular; aos funcionários da UFPR, técnicos e administrativos; e a todos que de alguma forma contribuíram nessa trajetória tão importante da minha vida.

"Let me tell you something you already know. The world ain't all sunshine and rainbows. It's a very mean and nasty place and I don't care how tough you are it will beat you to your knees and keep you there permanently if you let it. You, me, or nobody is gonna hit as hard as life. But it ain't about how hard you hit, It's about how hard you can get hit and keep moving forward. How much you can take and keep moving forward. That's how winning is done"

(Sylvester Stallone – Rocky Balboa, 2006)

RESUMO

O TCDD e o BDE-209 são dois tipos de Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs) amplamente utilizados em atividades industriais e estão comprovadamente relacionados a doenças. Esses compostos são dificilmente degradados no ambiente apresentam características de natureza lipofílica e sendo assim encontram-se presentes em diversos extratos ambientais, aumentando potencialmente o risco de exposição à populações humanas. O TCDD tem sido descrito como carcinogênico, características não ainda definida para o BDE-209, no entanto, os estudos sobre os efeitos dessas substâncias no desenvolvimento do câncer constitui uma nova abordagem no estudo da toxicidade dos POPs. O câncer é um dos principais problemas de saúde pública onde o câncer de pele é mais comum e o melanoma sua forma mais grave devido à sua capacidade metastática e rápida progressão. Nesse trabalho, foi utilizado o modelo experimental de células de melanoma murino nas linhagens B16F1 e B16F10 para avaliar o fenótipo dessas células após a exposição ao BDE-209 e ao TCDD. Nosso objetivo foi avaliar o papel desses POPs em células B16-F1 (menos agressivas) e células B16-F10 (mais agressivas) através da viabilidade celular, expressão de proteínas relacionadas a transição epitélio-mesenquimal (TEM) e expressão de genes relacionados a metastases. Para isso, as células foram expostas a diferentes concentrações (0,01nM/mL; 0,1nM/mL e 1,0nM/mL) pelo período de 24h (exposição aguda) e 15 dias (exposição crônica). Como resultado da análise de ultraestrutura observamos que a exposição ao BDE-209 induz a liberação de exossomos em células B16-F1 depois de 24h de exposição a concentração de 0,1nM. Os resultados também mostram que a exposição ao TCDD e ao BDE-209 não alteram a viabilidade, porém há uma evidente mudança de expressão de proteínas relacionadas a TEM principalmente quando expostas ao BDE-209. O resultado mais relevante no entanto, é a *upregulation* dos genes para as metaloproteinases e uma *dowregulation* dos genes de inibição dessas proteínas. Observando-se o perfil de expressão dos genes observamos que as células B16-F1 apresentam um perfil similar ao das células B16-F10 mais agressiva. O mesmo perfil foi observado para as proteínas relacionadas a TEM. Esses dados indicam fortemente que uma célula menos agressiva como B16-F1 adquire características fenotípicas semelhantes às encontradas em células mais agressivas como B16-F10. O TCDD apresenta essas mesmas características, no entanto, de forma menos evidente. O conjunto dos resultados mostram que células neoplásicas expostas ao BDE-209 não são afetadas pelos poluentes testados nesse estudo, mas apresentam alterações fenotípicas que modulam a expressão de moléculas mais comuns em células com um perfil mais metastático.

Palavras Chaves: Dioxina, BDE-209, Metaloproteinases, transição epitélio mesenquimal (TEM), Melanoma, B16F1, B16-F10

ABSTRACT

TCDD and BDE-209 are two types of Persistent Organic Pollutants (POPs) widely used in industrial activities and are proven to be related to diseases. These compounds are hardly degraded in the environment, they have characteristics of a lipophilic nature and therefore are present in several environmental extracts, potentially increasing the risk of exposure to human populations. TCDD has been described as a carcinogen, characteristics not yet defined for BDE-209, however, studies on the effects of these substances on the development of cancer constitute a new approach in the study of POP toxicity. Cancer is one of the main public health problems where skin cancer is more common and melanoma its most severe form due to its metastatic capacity and rapid progression. In this work, the experimental model of murine melanoma cells in lines B16F1 and B16F10 was used to evaluate the phenotype of these cells after exposure to BDE-209 and TCDD. Our objective was to evaluate the role of these POPs in B16-F1 cells (less aggressive) and B16-F10 cells (more aggressive) through cell viability, expression of proteins related to epithelial-mesenchymal transition (TEM) and expression of genes related to metastases. For this, the cells were exposed to different concentrations (0.01nM / mL; 0.1nM / mL and 1.0nM / mL) for a period of 24 hours (acute exposure) and 15 days (chronic exposure). As a result of the ultrastructure analysis, we observed that exposure to BDE-209 induces the release of exosomes in B16-F1 cells after 24h of exposure to 0.1nM concentration. The results also show that exposure to TCDD and BDE-209 do not alter viability, however there is an evident change in the expression of TEM-related proteins, especially when exposed to BDE-209. The most relevant result, however, is the upregulation of genes for metalloproteinases and a downregulation of the genes for inhibiting these proteins. Observing the expression profile of the genes, we observed that the B16-F1 cells present a profile similar to that of the more aggressive B16-F10 cells. The same profile was observed for TEM-related proteins. These data strongly indicate that a less aggressive cell like B16-F1 acquires phenotypic characteristics similar to those found in more aggressive cells like B16-F10. The TCDD has these same characteristics, however, less clearly. The set of results show that neoplastic cells exposed to BDE-209 are not affected by the pollutants tested in this study, but show phenotypic changes that modulate the expression of more common molecules in cells with a more metastatic profile.

Keywords: persistent organic pollutants (POPs), metalloproteinases, inhibitors, melanoma, B16F1, B16-F10

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 BDE-209.....	23
2.2 TCDD	25
2.3 O MELANOMA COMO MODELO DE ESTUDO.....	27
2.4 EXPRESSÃO GÊNICA E MELANOMA: GENES ESTUDADOS	30
2.5 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL.....	34
3 JUSTIFICATIVA.....	37
4 HIPÓTESE	38
5 OBJETIVO GERAL.....	39
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
6 MATERIAIS E MÉTODOS	40
6.1 CULTIVO DAS CÉLULAS DAS LINHAGENS <i>B16-F1</i> E <i>B16-F10</i>	40
6.2 CONCENTRAÇÕES DE POLUENTES E PREPARO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	40
6.3 ULTRAESTRUTURA CELULAR	41
6.4 ENSAIO MTT	42
6.5 ENSAIO VERMELHO NEUTRO.....	42
6.6 ENSAIO CRISTAL VIOLETA.....	43
6.7 WESTERNBLOTTING.....	43
6.8 DESENHO DOS <i>PRIMERS</i> PARA ANÁLISE DE QPCR.....	44
6.9 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E CONVERSÃO PARA CDNA.....	45
6.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA – QPCR	45
6.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
7 RESULTADOS.....	47
7.1 VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA E CRÔNICA AOS CONTAMINANTES	47
7.2 WESTERNBLOTTING.....	50
7.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE METALOPROTEINASES E SEUS INIBIDORES.....	51

7.4 ULTRAESTRUTURA CELULAR DE <i>B16-F1</i> EXPOSTA A 0,1 NM DE BDE-209 POR 24H.....	54
8 DISCUSSÃO	59
8.1 BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE BDE-209 E TCDD NÃO COMPROMETEM A VIABILIDADE CELULAR DE B16-F1 E B16-F10.....	60
8.2 EXPOSIÇÃO AO BDE-209 E TCDD PROMOVE EM CÉLULAS B16 AUMENTO DE VIMENTINA E DIMINUIÇÃO DE E-CADERINA CARACTERIZANDO TRANSIÇÃO EPITELIO-MESENQUIMAL ESPECIALMENTE EM B16-F1	64
8.3 EXPOSIÇÃO AO BDE-209 E AO TCDD AUMENTAM A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A PROGRESSÃO TUMORAL.	67
8.4 EXPOSIÇÃO AO BDE-209 E TCDD LEVA CÉLULAS B16-F1 A UMA CONFIGURAÇÃO COMPATÍVEL A DE CÉLULAS MAIS AGRESSIVAS COMO B16-F10	69
8.5 ANÁLISE DE IMAGENS DA ULTRAESTRUTURA APÓS EXPOSIÇÃO AO BDE-209 0,1NM POR 24HR	71
9 COMENTÁRIOS FINAIS.....	76
10 CONCLUSÕES	79
11 REFERÊNCIAS:	80

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA DEMONSTRANDO A HIPÓTESE A SER TESTADA DE QUE APÓS A EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES ESTUDADOS OCORRE UM AUMENTO DA AGRESSIVIDADE DE CÉLULAS DO MELANOMA B16-F1 E B16F10	19
FIGURA 2 – ESTRUTURA MOLECULAR DO BDE-209.....	23
FIGURA 3 – MOLÉCULA DE TCDD (2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO-P-DIOXINA).....	25
FIGURA 4 – CÉLULAS B16F1 DE MELANOMA MURINO.....	28
FIGURA 5 – POTENCIAL DE PROGRSSÃO TUMORAL.....	35
FIGURA 6 – ENSAIOS COM CÉLULAS B16F1 POR 24 HORAS (A, C e E) E 15 DIAS (B,D,e F)	47
FIGURA 7 - ENSAIOS COM CÉLULAS B16F10 POR 24 HORAS (A, C e E) E 15 DIAS (B, D e F).....	48
FIGURA 8 - WESTERNBLOTTING PARA DETECÇÃO E COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE E-CADERINA E VIMENTINA EM CÉLULAS B16-F1 APÓS EXPOSIÇÃO CRÔNICA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BDE-209 E TCDD.....	49
FIGURA 9 - WESTERNBLOTTING PARA DETECÇÃO E COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE E-CADERINA E VIMENTINA EM CÉLULAS B16-F10 APÓS EXPOSIÇÃO CRÔNICA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BDE-209 E TCDD.....	50
FIGURA 10 - NÍVEIS DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS B16-F1	51
FIGURA 11 - NÍVEIS DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS B16-F10.....	52
FIGURA 12- ULTRAESTRUTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16-F1) APÓS CULTURA DE 24H.....	54
FIGURA 13 – ULTRAESTRUTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16-F1) APÓS EXPOSIÇÃO A BDE-209 POR 24H.....	56
FIGURA 14 - NÍVEIS DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS B16-F1 E B16-F10 MOSTRANDO OS PERFIS DE EXPRESSÃO DE CADA GENE PARA CÉLULAS CONTROLE E AS DE CADA TRATAMENTO.....	69
FIGURA 15 – APÓS A EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES ESTUDADOS OCORRE UM AUMENTO DA AGRESSIVIDADE DE CÉLULAS B16-F1 E DAS B16-F10, ESPECIALMENTE APÓS A EXPOSIÇÃO AO BDE-209.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

μL - Microlitro

μm - Micrômetro

μM - Micromolar

M - Molar

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATSDR - *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

BDE – Éteres difenis polibromados

BDE-209 – Decabromodifenil éter

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs - Espécies reativas de oxigênio

g - Grama

kg - Quilograma

L - Litro

LPO - Peroxidação lipídica

MMP – Metaloproteinases de Matriz

PGK1 – Fosfoglicerato quinase 1

mg - Miligrama

mL - Mililitro

NaCl - Cloreto de sódio

ng - Nanograma

nmol - Nanomolar

PBDEs – Éteres difenilos polibromados

POPs – Poluentes orgânicos persistentes

RECK – Proteína Rica em Cisteína

ROS - Espécies reativas de oxigênio

TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteinases

UFPR - Universidade Federal do Paraná

WHO - *World Health Organization*

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SEQUÊNCIA DOS PRIMERS DESENHADOS PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE INTERESSE	36
---	-----------

1 INTRODUÇÃO

Começamos a apresentação deste trabalho falando da parte que mais me chamou atenção ao ter o primeiro contato com o assunto: o meio possuindo compostos capazes de potencializarem uma condição patológica, piorando uma condição. É como se o meio possuísse algo que poderia torná-lo um lugar que não oferece proteção, ele possui algo que exige que nós nos protejamos e assim, pensemos em um ambiente específico, longe desses compostos. Isolar o indivíduo do meio ambiente comum, pois ele é nocivo. É uma situação difícil, já que estamos cercados de compostos químicos, principalmente, se você vive em ambiente urbano.

Segundo o que apresenta o pensamento hipocrático, que na Grécia antiga substituiu idéias míticas e irracionais por um pensamento racional da saúde – *tékhnē-iatrikē* – em que a natureza participa diretamente da saúde do indivíduo, sendo a enfermidade e o enfermo partes, existe uma necessidade de harmonia entre o indivíduo e o ambiente natural, pois as causas das doenças podem ser também ambientais. Já existia naquele tempo a ideia do ambiente influenciando a saúde do indivíduo (MAGALHAES, 2014; COLAO, 2016).

A contaminação ambiental por compostos químicos é a consequência direta do rápido avanço da sociedade na busca por tecnologias de ponta, alimento e fortalecimentos das economias, acabando por representar um grande risco para o ambiente e para a saúde humana em diversas regiões do globo (RABITTO, 2010). Transformar a natureza a seu favor é uma particularidade do homem e usamos essa capacidade com intuito de desenvolvimento e sobrevivência. Através desse uso e transformação, são criados produtos para todos os segmentos da sociedade, principalmente nos últimos 100 anos, e nesse sentido, a indústria química contribuiu muito para o desenvolvimento, aumentando exponencialmente a produção de novos compostos.

Dentre os compostos provenientes das atividades antropogênicas estão diversas moléculas conhecidas por seus efeitos nocivos sobre a saúde humana, levando ao desenvolvimento de diversas doenças (BILA E DEZZOTI, 2007; AITKEN e LEWIS, 2004). Pode-se pensar então que qualquer elemento presente no meio seria um potencial risco para surgimento de doenças, dentre elas as neoplasias, popularmente conhecidas como câncers (BILA E DEZZOTI, 2007; AITKEN e LEWIS, 2004). As causas do câncer são variadas podendo ser externas ou internas ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As causas externas relacionam-se ao meio ambiente e aos hábitos ou

costumes próprios de um ambiente social e cultural. De acordo com o que apresentaram McGuinn e colaboradores (2012), existem discrepâncias no relato da causa ambiental do câncer e os limites de inferência na interpretação das estimativas de risco atribuíveis ao ambiente. De forma muito lúcida esses pesquisadores concluem que em vez de chegar a um consenso sobre uma definição única para a relação entre a exposição ambiental a poluentes e o surgimento e progressão de neoplasias, sugerem que o foco seja a transparência para quaisquer riscos ambientais atribuíveis, estabelecendo assim o que é de fato que está no meio ambiente e é o responsável pela doença.

Há um entendimento de que a poluição ambiental pode causar doenças e, segundo a Organização Mundial de Saúde, a poluição do ar é responsável por cerca de 4,2 milhões de mortes por ano devido a derrames, doenças cardíacas, doenças respiratórias crônicas e câncer de pulmão. Mas não só a poluição atmosférica estamos expostos. Diversas outras formas de exposição seja via hídrica, alimentar ou dérmica são fontes significativas de absorção de poluentes presentes no meio ambiente. Nesse contexto, a gestão de águas quando realizada de forma inadequada em áreas urbanas, industriais e agrícolas é um fator a mais e interfere na saúde de milhões de pessoas, dado seu uso para consumo direto, para irrigação e para produção animal (WHO, 2020).

Além da exposição não intencional à substâncias provenientes da indústria e agricultura, em ambiente urbano, e principalmente, próximo a áreas industriais, há mais um agravante pela produção e deposição de resíduos ilegais, contendo produtos químicos perigosos como por exemplo metais como chumbo, mercúrio e resíduos de alumínio que já tiveram associação com maior risco de câncer gástrico (Di CIAULA *et al.*, 2016; MOHANKUMAR *et al.*, 2016; STEINDOR *et al.*, 2016).

Uma boa parte dos produtos utilizados hoje são produzidos e lançados no ambiente sem tratamento prévio, e infelizmente alguns destes compostos são altamente estáveis permanecendo no ambiente por muito tempo, resistindo à degradação química, física e biológica e portanto, conhecidos como Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs). Os POPs são substâncias químicas que apresentam potencial de transporte a longa distância, alta persistência no ambiente, capacidade de biogmagnificação e interação com o sistema endócrino de organismos (USEPA, 2009; UNEP, 2013). Devido a sua estabilidade, são dispersados e transportados por longas distâncias pelas correntes marinhas, atmosféricas ou pelos próprios animais visto que são biocumulativos, isto é, podem se acumular em organismos vivos, fazendo com que, essas substâncias se movimentem pelos diferentes

níveis tróficos da cadeia alimentar, até atingir o homem pelo alimento (NUNES *et al.*, 2018). Esses níveis de transferência são constantes ao longo da cadeia alimentar e podem nas populações humanas serem detectados no plasma, leite materno, ou mesmo no sangue do cordão umbilical (ESPOSITO *et al.*, 2009; GIOVANNINI *et al.*, 2014; PULKRABOV *et al.*, 2016).

São classificados como POPs os bifenis policlorados (PCBs), os éteres difenílicos polibromados (PBDEs), pesticidas organoclorados como o DDT e os dioxinas dibenzofuranos policlorados (dioxinas), sendo esta última classe resultante do processo de incineração na indústria. Esses compostos são hidrofóbicos, por isso, é observado sua distribuição em compartimentos lipofílicos, com destaque para o tecido adiposo (LA MERRILL *et al.*, 2013; LEONEL *et al.*, 2014). Devido a ampla gama de POPs, este trabalho irá investigar a correlação entre os PBDEs e as dioxinas (TCDD) e o surgimento e progressão de neoplasias de pele.

Os PBDEs constituem um importante grupo de retardantes de chamas utilizados em diversos produtos para reduzir os riscos de combustão e propagação de chamas. Eles têm sido massivamente produzidos e extensivamente utilizados em inúmeros produtos do cotidiano, como por exemplo dispositivos eletrônicos, mobília, espumas, plásticos e têxteis, o que proporciona uma diminuição na inflamabilidade e confere mais segurança aos consumidores caso estes produtos sofram combustão (BESIS; SAMARA, 2012; MCDONALD *et al.*, 2002; PING *et al.*, 2011). Infelizmente, os PBDEs estão acumulados nos ambientes naturais devido ao seu volume de produção, uso generalizado e sua persistência ambiental, tornando-os contaminantes onipresentes, tóxicos e persistentes (HORRI *et al.*, 2018; HU *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2007). Além disso, são encontrados em sedimentos, tecidos de mamíferos marinhos, peixes, ovos de pássaros e também em leite materno, soro e tecido adiposo humanos (DARNERUD *et al.*, 2009).

A exposição de organismos vivos aos PBDEs pode ser muito prejudicial, uma vez que há relatos de efeitos nocivos causados por alguns congêneres deste grupo. Os principais efeitos relatados acerca da exposição a estes compostos são a desregulação endócrina (DEODATI *et al.*, 2016), a hepatotoxicidade (COWENS *et al.*, 2015), as alterações imunológicas (Liu *et al.*, 2015) e a neurotoxicidade (CHEVRIER *et al.*, 2016). Estes efeitos tóxicos podem ocorrer devido à capacidade de alguns PBDEs causarem um aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio dentro das células, como visualizado por Hu e colaboradores (2009) com o BDE-47 e por Souza

e colaboradores (2013) com o BDE-99, e cujos trabalhos correlacionaram este aumento nas espécies reativas de oxigênio com a morte celular observada após o tratamento com estes compostos. Um estudo realizado entre 2002 e 2003 com 157 mulheres australianas investigou a presença de PBDEs no leite materno. Em todas as amostras estudadas foram encontrados diferentes congêneres, (TOMS *et al.*, 2007). Esta presença de PBDEs em leite materno é muito preocupante, pois no trabalho de Koenig e colaboradores (2012) com roedores, eles confirmaram que a exposição perinatal ao BDE-47 através da lactação pode ter consequências neurológicas e representar um risco enorme para o desenvolvimento.

As dioxinas são compostos químicos aromáticos tricíclicos, de função éter e estrutura parcialmente plana, constituindo subprodutos indesejáveis exclusivos das atividades antropogênicas sem nenhum outro propósito. Sua formação acontece em processos térmicos com temperaturas entre 200 e 400°C, envolvendo o cloro. São provenientes de processos metalúrgicos e siderúrgicos, indústria de celulose e de papel, produção de produtos clorados e queima de combustíveis (FIEDLER, 2006). As dioxinas causam uma série de efeitos, alguns dos quais, espécie dependentes. A dioxina (2,3,7,8-TCDD) é frequentemente descrita como a substância química mais tóxica já produzida pelo homem, devido a sua baixa dose letal (DL-50), de 1 µg/Kg de massa corporal para cobaias, podendo ser somente comparada à potência tóxica de algumas toxinas de bactérias (MCCONNELL *et al.*, 1978). Diversos estudos têm sido publicados sobre a toxicidade das dioxinas para o sistema endócrino e reprodutivo, mas pouco ainda se sabe sobre a relação destes poluentes com o câncer. O principal efeito associado à toxicidade da dioxina tem sido a cloracne que ocorre tanto pela exposição dérmica quanto sistêmica. A cloracne está relacionada à resposta à altas doses, sendo um indicador de exposição aguda à dioxina em seres humanos. Outros sintomas foram também observados após exposição intensa como alguns tipos específicos de câncer, concentrações aumentadas de colesterol e de triglicerídeos, hiperpigmentação da pele, dor de cabeça e dor muscular, desordens no aparelho digestivo, debilidade do estado geral de saúde (inapetência, fraqueza, perda de peso), neuropatias, perda da libido e desordens sensoriais (FINGERHUT *et al.*, 1991; PEPER *et al.*, 1993).

Após esse entendimento de que compostos presentes no ambiente podem causar doenças, é importante uma melhor classificação do seu potencial tóxico e o risco de exposição tanto para biota como para as populações humanas. No entanto, os estudos têm focado nesses aspectos e a possibilidade dessas substâncias interferirem com o tratamento

de doenças conhecidas não tem sido abordada. Esse é portanto, o foco principal de uma linha de pesquisa que começou no Laboratório de Toxicologia Celular há aproximadamente 10 anos. Alguns trabalhos já foram realizados com estudos tanto *in vitro* como *in vivo*, e os dados obtidos até hoje deixam claro que alguns poluentes podem sim interferir com o prognóstico de doenças importantes como o câncer.

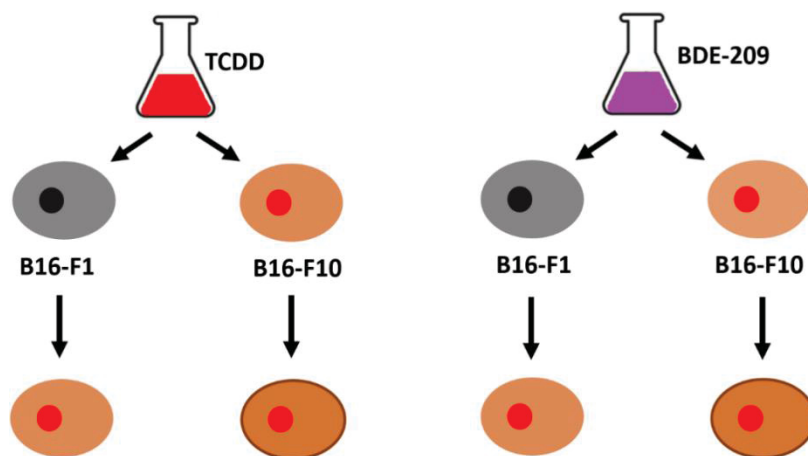
O desenvolvimento da sociedade, aumento das áreas urbanas e a maneira como o homem tem utilizados seus recursos naturais em prol do desenvolvimento e do acúmulo de riquezas e poder está relacionado com o aumento dos casos de cânceres (FIDLER *et al.*, 2018). O ambiente urbano aumenta a acessibilidade do indivíduo a essas moléculas e consequentemente contribui para a exposição e dispersão dos poluentes. Boa parte da população mundial vive atualmente em áreas urbanas e estima-se que em 2100, 90% da população esteja em ambiente urbano (WRAY; MINAKER, 2019). Considerando esta projeção estima-se um contato cada vez maior com moléculas tóxicas, principalmente através de uma exposição crônica.

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células mutadas que invadem os tecidos e órgãos adjacentes e que pode espalhar-se para outras regiões do corpo através da circulação linfática e sanguínea. Quando estas células se dividem rapidamente, tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que são estruturas sólidas. Os tumores podem ser benignos ou malignos. Os benignos ficam restritos a uma área localizada que, tratados, geralmente não causam grandes problemas. Os malignos podem se espalhar e, se desmembrados do tumor original, podem formar novos tumores chamados metástases (SPEECHLEY e ROSENFELD, 2000). Embora classicamente considerada uma doença decorrente do envelhecimento, é possível observar que nas faixas etárias menores as neoplasias já são considerável causa de morte. Neste contexto devemos considerar que a exposição a fatores ambientais e genética são relevantes no desenvolvimento e progressão neoplásica. Segundo o INCA (2008), de todos os casos, cerca de 80% dos cânceres estão associados a fatores ambientais. Entende-se por ambiente, o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (indústrias químicas e afins), o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos) e o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida).

O tipo de câncer mais comum em todo o mundo é o câncer de pele e sua incidência cresce ano após ano. O câncer de pele se divide em subtipos: carcinoma espinocelular,

carcinoma basocelular e melanoma, sendo este último o tipo mais grave, com maior incidência de metastástase e pior prognóstico. Os tipos não melanoma são menos letais e mais frequentes, chegando a 90% dos cânceres de pele (MESQUITA *et al.*, 2020). Há na literatura inúmeras informações sobre outros compostos químicos provocando doenças e com potencial carcinogênico. Faz-se necessário, no entanto, uma melhor compreensão do risco de exposição a esses compostos dentro de um aspecto ainda não muito estudado, que é a capacidade desses compostos interferirem no fenótipo de células tumorais tornando-as mais agressivas e metastáticas. Se isso for observado será este um dos poucos indícios de que estes POPs aqui estudados (BDE-209 e TCDD) são capazes de potencializar o melanoma (Figura 1).

FIGURA 1 - ESQUEMA DEMONSTRANDO A HIPÓTESE A SER TESTADA DE QUE APÓS A EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES ESTUDADOS OCORRE UM AUMENTO DA AGRESSIVIDADE DE CÉLULAS DO MELANOMA B16-F1 E B16-F10.



FONTE: O autor (2021).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente vivemos um paradigma: cada vez mais precisamos de tecnologia, seja para o conforto humano ou para o progresso da sociedade e cada vez mais precisamos dos recursos naturais que o ambiente nos oferece. Nessa corrida pelo desenvolvimento tecnológico, a cada dia geramos resíduos que são depositados, intencional ou não intencionalmente no ambiente, degradando seus recursos. Ou seja, quanto mais precisamos dos recursos ambientais para nos desenvolvermos enquanto sociedade, mais degradamos estes recursos, muitas vezes de forma irracional e inconsciente. Além da degradação e consumo dos recursos ambientais, o desenvolvimento humano gera resíduos que são constantemente depositados no ambiente, degradando ainda mais o meio em que vivemos.

De acordo com a Associação Brasileira de Empresas de Tratamento, Recuperação e Disposição de Resíduos Especiais (ABETRE), dos 2,9 milhões de toneladas de resíduos industriais perigosos gerados anualmente no Brasil, somente 600 mil toneladas recebem tratamento adequado (coprocessamento, incineração, aterro classe I). Os 78% restantes são depositados indevidamente em lixões, sem qualquer tipo de tratamento (NASCIMENTO; CRUZ, 2015), representando um risco enorme de exposição humana direta ou indireta, pela contaminação do solo e da água.

Os Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), reúnem um grandioso número de substâncias químicas que são de grande preocupação devido à sua persistência, bioacumulação e toxicidade. Por volta dos anos 70, os pesquisadores sugeriram pela primeira vez, que os POPs têm a capacidade de se dispersar através das correntes marítimas e atmosféricas. Além disso, dada a sua propensão para o transporte de longo alcance, eles são distribuídos globalmente em vários ambientes em todo o mundo (RIGÉT *et al.*, 2016).

Como forma de combate a este problema, a Convenção Global de Estocolmo sobre POP,s realizada em 2001, que entrou em vigor em maio de 2004, apresentou instrumentos que incluem produtos químicos e o controle para evitar a disseminação dos POPs no ambiente. Ficou estabelecido nessa convenção que os países potencialmente poluidores deveriam adotar medidas de controle relacionadas a todas as etapas do ciclo de produção, importação, exportação, disposição e uso, das substâncias classificadas como POPs (UNEP, 2009). Medidas como a proibição ou severa restrição da produção e

uso dos POPs intencionalmente, restrições a exportação e importação, disposições sobre o descarte e redução das emissões estão entre outros mecanismos de controle apresentados (UNIÃO EUROPEIA, 2004).

No Brasil houve um trabalho de implementação das resoluções discutidas e aprovadas na convenção de Estocolmo, uma vez que, como país signatário, deve realizar a aplicação das obrigações estabelecidas e cumprir os compromissos assumidos no âmbito do tratado. A primeira etapa do projeto de implementação foi realizada com o seminário inicial na Companhia Ambiental do estado de São Paulo (CETESB) em São Paulo, nos dias 23, 24 e 25 de Março de 2010 (CETESB, 2021). Mesmo assim, embora regulamentados quanto à produção, uso ou descarte, os POPs continuam presentes no ambiente e os efeitos da exposição a estes xenobióticos não são completamente conhecidos. Insere-se nesse contexto a classe dos éteres de difenil polibromados (PBDEs), das policloradas (PCBs), das dioxinas e outros compostos comprovadamente tóxicos, os quais constituem hoje um desafio ambiental e de saúde pública a elaboração do risco de exposição (BRAUNE *et al.*, 2005).

O atual aumento da demanda por novos produtos industrializados é necessário, mas também bastante preocupante pois, lança grandes quantidades de substâncias químicas nos ambientes naturais. Dentre essa diversidade de moléculas liberadas, o BDE-209, que pertence a classe dos PBDEs, e o TCDD, que pertence à classe das dioxinas (ambos POPs estudados neste trabalho), apresentam estabilidade, são encontrados nos ambientes naturais e são considerados um desafio ambiental para o futuro (ALMEIDA *et al.*, 2007; BRAUNE *et al.*, 2005).

O BDE-209 é liberado facilmente na natureza, sendo detectado no ar, em ambientes abertos e fechados, solo, água e animais (aves, peixes, mamíferos marinhos e outros mamíferos). O TCDD, produto da combustão de resíduos (como incineradores municipais) e do processamento industrial, é encontrado no ambiente e é considerado, junto com o BDE-209, contaminante ambiental tóxico, persistente e onipresente. Por serem estáveis, lipofílicos e biocumulativos, esses compostos são alvos de grande preocupação mundial por parte dos toxicologistas, uma vez que vão continuamente se depositando e dispersando no ambiente e a sua presença nos diferentes extratos ambientais é uma realidade contemporânea e de risco global para biota e populações humanas (FIORITO *et al.*, 2017; PESATORI *et al.*, 2009).

Estudos realizados no Japão descrevem um aumento do nível de bioacumulação de PBDEs em tecido adiposo em populações humanas, onde os valores quantitativos de congêneres de PBDE relatados em 2003 e 2004, foram relativamente mais elevados que os encontrados no ano de 2000 (KUNISUE *et al.*, 2007). Quanto ao potencial tóxico dos PBDEs, estes compostos podem agir como hepatotóxicos, provocar alterações imunológicas, neurotoxicidade, distúrbios endócrinos bem como podem promover o desenvolvimento de câncer, embora não esteja completamente esclarecido o mecanismo pelo qual este fenômeno ocorre (HOFFMAN *et al.*, 2017; ZHOU *et al.*, 2001). De acordo com estudos realizados por Hooper e McDonald (2000), a população humana é exposta aos PBDEs através da ingestão de alimentos que contenham alto teor de gordura, visto que esses compostos presentes no ar, água, solo e sedimento, podem ser bioacumulados através da cadeia trófica, num processo conhecido como biomagnificação. Neste processo os poluentes lipofílicos se acumulam no tecido adiposo dos animais, sendo que a sua concentração aumenta ao longo dos diferentes níveis tróficos.

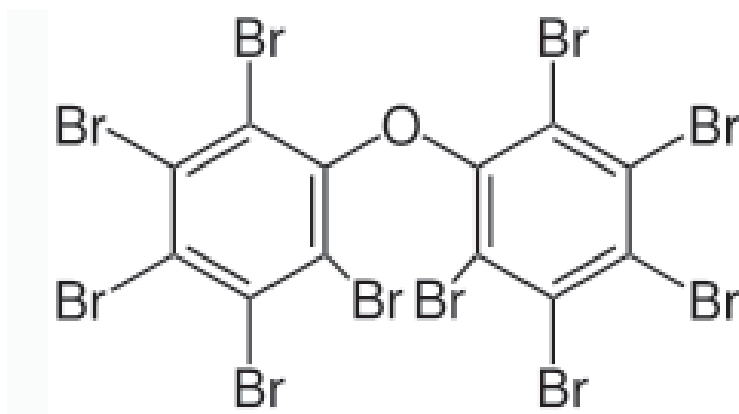
Do total de 210 dioxinas conhecidas, apenas 17 compostos apresentam importância em relação à toxicidade, sendo tóxicas as substâncias com átomos de cloro nas posições 2,3,7,8; entre os quais destaca-se a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (2,3,7,8-TetraCDD ou TCDD) com a toxicidade aguda mais elevada. Pesquisas têm mostrado que a exposição de animais ao TCDD produz efeitos carcinógenos em diversos pontos do organismo e estudos epidemiológicos em saúde ocupacional indicam que estes compostos também são carcinógenos em humanos (WHO, 2016). A exposição humana às dioxinas ocorrem por meio de concentrações traço no ambiente, exceto em contaminações acidentais. Elas encontram-se em baixa quantidade no ar e são pouco solúveis em água, mas assim como os PBDEs, são lipossolúveis e sofrem bioacumulação e biomagnificação. Cerca de 90% da exposição da população humana a estes compostos ocorrem por meio da alimentação de origem animal, como peixe, carne bovina e leite que pode conter grandes quantidades destes poluentes armazenadas em seu tecido adiposo (WHO, 2016).

2.1 BDE-209

A bromação, na síntese de PBDEs, é conduzida pela adição subsequente de bromo em posições específicas na molécula, formando assim diferentes outros congêneres até a

formação do 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromodifenil éter, chamado também de BDE-209 (Figura 2) ou decabromado (ZHANG; BUEKENS; LI, 2016).

FIGURA 2 - ESTRUTURA MOLECULAR DO BDE-209.



FONTE: Wikipedia 2021

O desenvolvimento de retardantes de chama, especialmente os bromados, é um reflexo do uso de sistema de queima na indústria tanto para o desenvolvimento e transformação de elementos, quanto para construção de ferramentas, peças e por fim, incineração de resíduos (NASCIMENTO; CRUZ, 2015). O BDE-209 é utilizado pelas indústrias em larga escala, principalmente para a produção de produtos e componentes eletrônicos onde são adicionados a esses, principalmente nas estruturas inflamáveis para que funcionem como retardantes de chamas, ou seja que tornem a combustão mais lenta. Por esse motivo, esse composto polibromado é bastante encontrado em amostra coletadas em área com grande atividade industrial e/ou com descarte de lixo (CHEN *et al.*, 2012; HARDY *et al.*, 2002; KIERKEGAARD; SELLSTRÖM; MCLACHLAN, 2009).

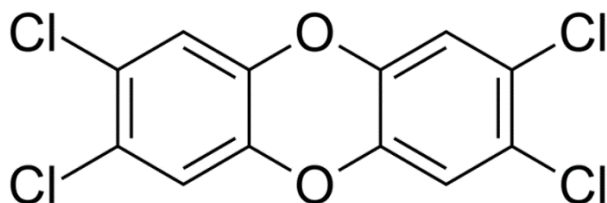
Semelhante aos demais PBDEs, o BDE-209, é capaz de se acumular nos tecidos de organismos vivos e é ampliado nos níveis tróficos mais altos da cadeia alimentar, apresentando efeitos bastante adversos para os organismos que são expostos, incluindo as populações humanas. Em sedimentos marinhos, por exemplo, o BDE-209 é encontrado no pescado e frutos do mar, sendo o consumo desses animais é uma importante via de exposição para populações humanas (MANUGUERRA *et al.*, 2019; YU; HAN; LIU, 2019).

Estudos recentes de Manuguerra e colaboradores (2019) mostram que o BDE-209 causa estresse oxidativo em tecidos alvos demonstrando seu potencial citotóxico, bem como altera a resposta endócrina da tireóide em peixes e mamíferos. Outros congêneres do PBDEs são capazes ainda de afetar o comportamento, crescimento, sistema reprodutivo e funções hepáticas e renais, ou mesmo o sistema imunológico de peixes. Esse composto é portanto, capaz de alterar a homeostasia dos organismos vivos e se apresentam com a causa de algumas doenças, pelas suas propriedades citotóxicas, neurotóxicas e carcinogenicidade (ABDALLAH e HARRAD, 2014). Na China, alguns estudos com exposição humana ao BDE-209, descrevem a detecção do composto no leite materno, cabelo, soro sanguíneo, sangue do cordão umbilical e placenta (HU *et al.*, 2007; MANUGUERRA *et al.*, 2019; ZHANG; LIU; CHEN, 2010; ZHI *et al.*, 2019). Esses dados são extremamente preocupantes pois revelam a exposição humana já ocorre nos primeiros estágios de desenvolvimento e acompanha o indivíduo em todo o desenvolvimento do seu ciclo de vida.

2.2 TCDD

Além dos PBDEs acima apresentados, outros produtos que também são produzidos com as atividades industriais e considerado nesse estudo, são as dioxinas. As dioxinas constituem uma classe de compostos químicos organoclorados com 210 congêneres, sendo que apenas 17 são comprovadamente tóxicos, com destaque ao TCDD um dos mais estudados. A molécula de TCDD (Figura 3) com seus quatro átomos de cloro é um subproduto de processos industriais como a fabricação de pesticidas, branqueamento de celulose e papel e a incineração de plástico e resíduos hospitalares. Esses procedimentos aumentam a exposição humana a esta molécula, pois o TCDD pode ser inalado, absorvido pela pele e ingerido por meio de água contaminada, além de estar presente em alimentos ricos em gordura como leite queijos, carnes e até mesmo no leite materno (FOSTER *et al.*, 2010).

FIGURA 3 - MOLÉCULA DE TCDD (2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO-P-DIOXINA).



FONTE: Wikipedia (2021).

O composto TCDD é o membro mais tóxico da família das dioxinas e representa um contaminante ambiental presente em praticamente todos os ambientes naturais ou urbanos e industriais (PESATORI *et al.*, 2009). A produção das dioxinas pode se dar através de subprodutos de diversas reações químicas, principalmente na produção de pesticidas, ou de atividades industriais. Além disso, esse composto pode ser liberado através de eventos naturais como erupções vulcânicas e incêndios florestais (ASSUNCAO; PESQUERO, 1999). Segundo Xu e colaboradores (2018), de uma maneira geral, na toxicidade do TCDD se destacam as alterações no desenvolvimento e reprodução, teratogenicidade, imunotoxicidade e carcinogenicidade, além de uma série de efeitos toxicológicos neurais.

Quando essas moléculas são halogenadas em posições laterais específicas, elas assumem uma conformação planar e são capazes de se ligar a um receptor específico no citoplasma de células conhecido como receptor de hidrocarboneto de arila (AhR). Entre os ligantes de AhR, o TCDD é particularmente tóxico porque é resistente à degradação metabólica e, assim, induz a ativação prolongada destes receptores alterando a expressão gênica. Como o TCDD atua através de um mecanismo baseado em receptores, a potência desses produtos químicos para induzir toxicidade é muito alta em relação a muitos outros xenobióticos. Os principais alvos desse contaminante são os sistemas reprodutivo, imunológico (MARANGHI *et al.*, 2013) e endócrino, sendo que neste último o TCDD é reconhecido por afetar a função, fisiologia e morfologia da tireoide, tanto em animais adultos quanto em humanos. No entanto, a toxicidade do TCDD tem grandes diferenças interespecíficas, onde depende diretamente de estruturas e funções de AhR das espécies (WANG *et al.*, 2013; YOSHIOKA; PETERSON; TOHYAMA, 2011).

Esse composto policlorado apresenta uma meia-vida longa em seres humanos, sendo associada a uma série de efeitos na saúde. Uma pesquisa transversal entre 245 ex-funcionários de uma fábrica de pesticidas expostos ao TCDD na Nova Zelândia, detectou uma concentração sérica média de TCDD ≥ 10 pg/g de lipídios. Nesta população estudada, a contaminação por TCDD foi associada a um risco aumentado de diabetes e uma variedade de respostas subclínicas em sistemas múltiplos (sistema nervoso periférico, sistema imunológico, hormônios tireoidianos e metabolismo lipídico) (MANNETJE *et al.*, 2018). Estudos experimentais com animais em laboratório (*Mus musculus*) expostos ao TCDD mostraram o grande potencial tóxico desse produto para os mamíferos, incluindo teratogenicidade, toxicidade reprodutiva, disfunção immune, carcinogenicidade e transtornos neurocomportamentais (FUJISAWA *et al.*, 2018). Esses dados mostram que as populações humanas estão expostas ao TCDD, o qual se mostra biodisponível e capaz de afetar a saúde humana com danos adversos e difíceis de serem mensurados, dada a complexidade tanto da exposição como dos efeitos.

O Brasil é um país com um parque industrial desenvolvido em algumas regiões e em desenvolvimento em outras, mas embora nos deparemos com uma legislação reconhecidamente forte, falta estrutura que a aplique e monitore adequadamente o manejo de resíduos industriais, urbanos e agrícolas. Isso é uma preocupação constante do ponto de vista ambiental e de saúde pública, visto que ainda faltam dados sobre o risco de exposição aos vários poluentes, bem como faltam estudos sobre o prognóstico desses compostos em células doentes como o câncer.

2.3 O MELANOMA COMO MODELO DE ESTUDO

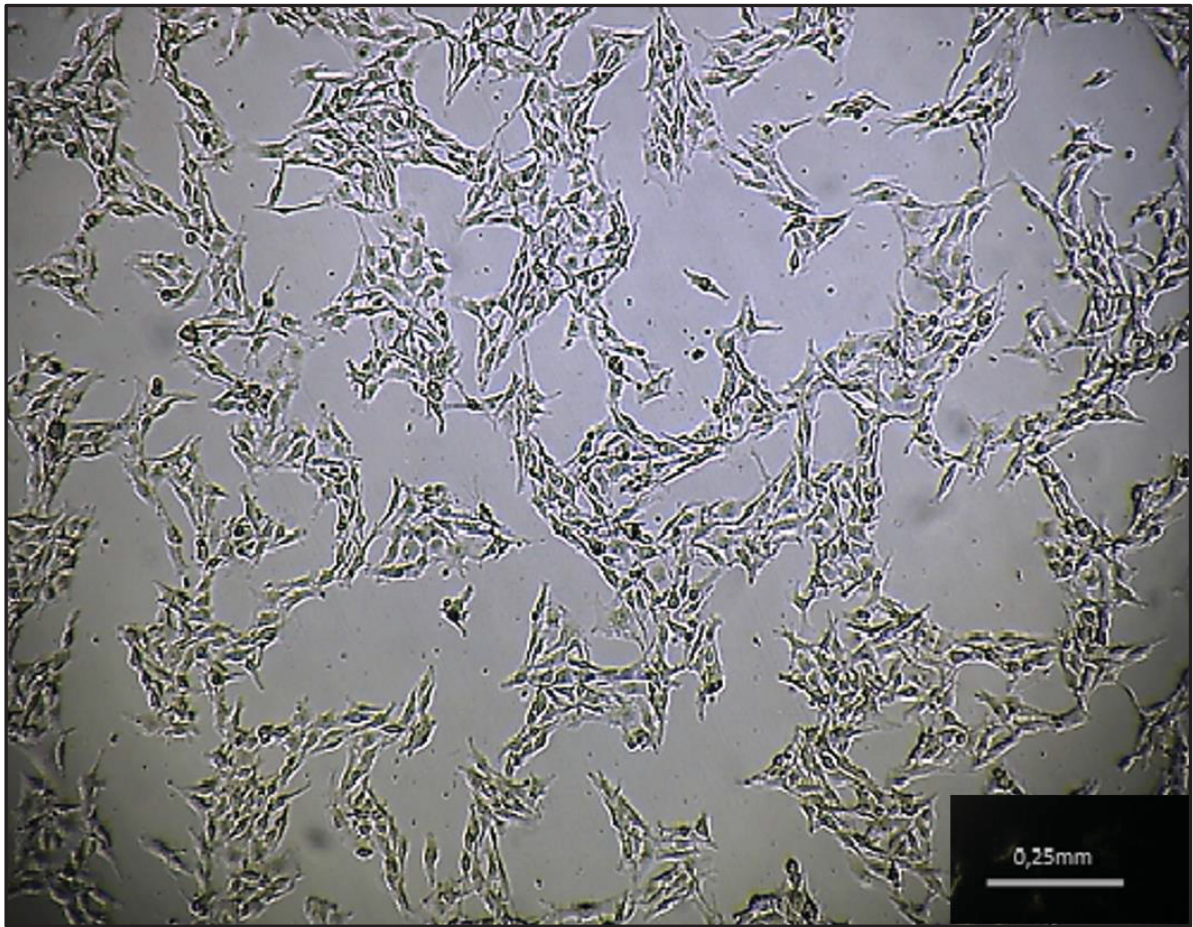
O fato do BDE-209 bem como do TCDD apresentarem uma distribuição ambiental diversificada e em concentrações relativamente altas, possibilita uma exposição diária e constante à população humana. Embora o potencial tóxico dessas moléculas seja já relativamente bem descrito, há poucos dados na literatura que relacionem essas substâncias com alterações fenotípicas em células tumorais, favorecendo sua malignidade pelo aumento da invasividade. Dessa forma, com base na literatura e resultados prévios do Grupo de Pesquisa em Toxicologia celular, esse estudo avaliou se a exposição *in vitro* ao BDE-209 e TCDD presentes no meio seria capaz de interferir com o desenvolvimento do melanoma, tornando suas células mais agressivas e, portanto, mais metastáticas.

Câncer é um termo que abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas que têm em comum o crescimento desordenado de células, que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos a distância. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo em um processo conhecido como metástase. Os diversos tipos de cânceres se diferenciam pelo tipo celular que os origina, pela velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes.

O melanoma cutâneo é um tumor melanocítico cuja incidência e mortalidade estão em ascensão em todo o mundo. É um dos cânceres mais comuns em adultos jovens e a morte ocorre numa idade mais precoce do que por qualquer outra malignidade, representando um problema substancial de saúde pública. O prognóstico dos pacientes com melanoma depende do estadio do tumor à época do diagnóstico e é normalmente baseado no microestadiamento e na avaliação clínico - radiológica para metástases (DADRAS *et al.*, 2005).

No presente estudo foi utilizado o modelo experimental de células de melanoma murino, nas linhagens *B16-F1* e *B16-F10* (Figura 4) adquiridas no BCRJ (Banco de Células do Rio de Janeiro). Essas células são originadas de células epiteliais da espécie *Mus musculus* as quais apresentam características de células aderentes, fusiformes e também capazes de produzir melanina *in vitro* (BCRJ, 2014).

FIGURA 4 - CÉLULAS B16F1 DE MELANOMA MURINO.



LEGENDA: Células de B16F1, cultivadas por 48h, em meio DMEM, com confluência de 50%.

FONTE: O autor (2018).

Esta linhagem de melanócitos surgiu de um tumor atrás da orelha de camundongo C57BL em 1954 no laboratório Jackson nos EUA. Essas células foram isoladas e mantidas em cultivo e chamadas de B16-F0. As B16F0 foram então injetadas em outros camundongos singênicos e metástases pulmonares deram origem as células B16-F1. Com novas injeções destas células B16-F1, sucessivas gerações foram criadas chegando até a linhagem B16-F10 (FIDLER *et al.*, 1975; NAKAMURA *et al.*, 2002).

A linhagem B16 é descrita como um bom modelo para estudos de melanoma humano, enquanto as células de melanócitos murinho da linhagem *B16-F1* são amplamente empregadas nos estudos da doença de melanoma tanto *in vitro* como *in vivo* (OVERWIJK; RESTIFO, 2001; BRITO *et al.*, 2020).

A variante mais comumente utilizada é a *B16-F10*, que é altamente agressiva e com um poder de metástase de um local subcutâneo primário para os pulmões, além de colonizar preferencialmente os pulmões após injeção intravenosa caudal em estudos *in vivo* com *Mus musculus*. A linha parental é denominada *B16-F1* mas existem outras variantes como a *B16-F0* pouco metastática e a *B16-F10* mais agressivas em relação as *B16-F1* por apresentarem maior taxa de proliferação, e maior comportamento metastático mas, são geneticamente menos estáveis que as *B16-F1*.

O Laboratório de Toxicologia Celular já possui os protocolos para o cultivo deste tipo celular, os quais vêm sendo empregados recentemente para o estudo de citotoxicidade de outras moléculas como pesticidas, herbicidas e nanopartículas metálicas, bem como seu papel na alteração da malignidade deste tipo celular. Nesse contexto, os contaminantes ambientais estudados neste trabalho, BDE-209 e TCDD, são interessantes do ponto de vista de toxicidade humana, visto que já foram detectados em estudos com essas populações em diferentes regiões do planeta. Constituem nesse estudo uma nova abordagem na avaliação toxicológica desse tipo de moléculas, trazendo de forma inovadora novos elementos para se discutir o risco de exposição aos poluentes orgânicos persistentes (POPs) em populações humanas.

2.4 EXPRESSÃO GÊNICA E MELANOMA: GENES ESTUDADOS

No presente estudo, com o intuito de conhecer a resposta celular após a exposição ao TCDD e ao BDE-209, foram escolhidos como alvos moleculares para avaliar alterações na expressão de oito genes relacionados a progressão tumoral (MMP2, MMP9, MMP14, PGK1, TIMP1, TIMP2, TIMP3 e RECK). Como controle endógeno a beta-actina foi utilizada.

As MMPs são endopeptidases contendo zinco com uma ampla gama de especificidades de substratos. Elas são responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular (ECM), como colágeno, fibronectina, elastina e proteoglicanos, desempenham um papel crucial na carcinogênese, regulando / afetando vários processos relacionados à progressão do tumor, incluindo a instituição do tumor, crescimento, angiogênese e metástase (PITTAYAPRUEK *et al.*, 2016).

Foram identificados 28 diferentes tipos de MMPs que desempenham papéis importantes em processos fisiológicos e patológicos como por exemplo, cicatrização de feridas, remodelamento esquelético, na inflamação, angiogênese e câncer. Além disso, as

MMPs também atuam sobre substratos importantes como fatores de crescimento, citocinas e quimosinas, moléculas de adesão celular e muitos outros tipos de receptores e glicoproteínas residentes na superfície celular. Estas moléculas despertam nosso interesse pois, além dos processos fisiológicos aqui apresentados de manutenção e remodelamento do microambiente tecidual, estão envolvidas no crescimento e expansão de tumores benignos, metástases e diversos tipos de câncer, além de influenciarem na angiogênese (HOFMANN *et al.*, 2000; SBARDELLA D., *et al.*, 2012 YADAV *et al.*, 2014).

Nesse estudo selecionamos três diferentes tipos de MMPs: duas gelatinases (MMP-2 e MMP-9) e uma MMP de membrana (MMP-14 ou MT-1MMP) que interagem entre si e influenciam seus comportamentos recíprocos. A invasão de células neoplásicas melanocíticas para o microambiente circundante, localmente e a uma distância do tumor primário, é facilitada pela expressão de proteases que degradam a matriz extracelular (FRANK *et al.*, 2012). As MMP2 e MMP9 são classificadas como gelatinases, ambas degradam o colágeno tipo I e IV e na carcinogênese atuam tanto na invasão tumoral quanto na angiogênese. A MMP14 é uma metaloproteinases de membrana, tem como função a ativar a MMP2 e está intimamente relacionada com invasão do tumor no melanoma, bem como com a angiogênese (SBARDELLA *et al.*, 2012).

Existe um papel fundamental da MMP14 no crescimento e progressão do melanoma, que é promover a invasão e migração por meio da ativação de MMP2 e RAC1; inibir a proteína supressora de tumor SPRY4; promover o crescimento de células de melanoma por meio da clivagem e ativação de Notch1. Dada a multiplicidade de funções que o MMP14 modula no melanoma e o fato de estar localizado na membrana plasmática, pode ser um alvo ideal para intervenção terapêutica (MARUSAK *et al.*, 2016).

A maioria das MMPs é convertida para atividade proteolítica por meio de vários processos regulatórios, que ocorrem a nível transcricional, traducional e pós traducional (HUNTLEY *et al.*, 2012). A ativação enzimática requer a remoção do domínio pró-peptídeo por meio da degradação por proteases, sua atividade pode ainda ser regulada por interação com diferentes inibidores proteolíticos como a α 2-macroglobulina, citocinas, hormônios, fatores de crescimento e por seus inibidores teciduais específicos (TIMPs - *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*).

A atividade das Metaloproteinases é modulada por uma família de TIMPs que ocorrem fisiologicamente. Até o momento, quatro membros diferentes estruturalmente relacionados (TIMP-1 a TIMP-4) foram caracterizados e inibem MMPs ativos pela ligação ao seu domínio catalítico. TIMP-1 e a TIMP-2 regulam a ativação de alguns proMMPs pela ligação ao domínio semelhante à hemopexina terminal COOH. O TIMP-1 inibe a ativação do proMMP-9, enquanto o TIMP-2 se liga e regula a ativação do proMMP-2. Em baixas concentrações, o TIMP-2 promove a formação de um complexo com proMMP-2 e MT1-MMP na superfície celular, levando à ativação de MMP-2. Assim, baixas concentrações de TIMP-2 promovem o processamento de MMP-2 para sua forma proteoliticamente ativa, mas altas concentrações de TIMP-2 inibem a ativação de MMP-2. Desta forma estas duas TIMPs impedem que os precursores de MMPs sejam ativados, inibindo os processos de progressão tumoral relacionados a estas metaloproteinases; quanto maior a expressão das TIMPs, menor a chance de metástases ocorrerem e portanto melhor o prognóstico do melanoma. O inverso também é verdadeiro: quanto menor o nível de TIMPs, maior a progressão metastática e pior o prognóstico dos melanomas. Desta forma o equilíbrio entre os níveis de MMP ativado e inibidores livres parece ser crítico para a atividade de MMP (HOFMANN *et al.*, 2000).

Os TIMPs exibem atividades anti-metastásicas ao inibir a angiogênese dependente de MMP. O TIMP3 afeta a angiogênese por meio da regulação direta da atividade do receptor-2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2) e da inibição dos efeitos mitogênicos do VEGF-A, enquanto os efeitos do TIMP2 são mais complexos, pois inibe o crescimento das células endoteliais e a migração destas células. A migração das células endoteliais é realizada através da interação TIMP2 com o receptor $\alpha 3\beta$ ou aumentando a expressão da proteína rica em cisteína indutora de reversão com motivo Kazal (RECK), que inibe várias biomoléculas a jusante, como MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, ADAM10, sendo o efeito final a perda da migração celular (ZURAC *et al.*, 2016)

A proteína PGK1 é uma enzima glicolítica relacionada com a glicólise e vias de metabolização dos açúcares. Em células neoplásicas é secretada para participar do processo de angiogênese, uma vez que reduz as ligações dissulfeto na protease da serina, a plasmina, que como consequência leva à liberação do inibidor dos vasos sanguíneos do tumor, a angiostatina. Sendo assim, é um dos marcadores de prognóstico do desenvolvimento do tumor (JUNG *et al.*, 2009). PGK1 é superexpresso em muitos cânceres humanos e regulado por vários mecanismos por isso foi incluída em nossa

pesquisa. Essa proteína é secretada por células tumorais, favorecendo a angiogênese e consequentemente a disseminação metastática (YAJUAN *et al.*, 2018).

A progressão dos tumores é caracterizada pelo aumento da secreção e ativação das MMPs produzidas pelas próprias células do tumor ou por células estromais, tais como os fibroblastos e macrófagos. Existem dados mostrando uma associação direta entre o aumento da expressão de MMPs e invasividade tumoral, metástase, reincidência de tumores e diminuição do tempo de sobrevivência do paciente. Células tumorais superexpressam proteases e/ou induzem a expressão dessas enzimas em células estromais adjacentes visando degradar a membrana basal e o tecido. No câncer, a regulação alterada da proteólise pelas MMPs favorece a degradação da MEC e consequentemente o processo de metástase (HOFMANN *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2003; ROY; YANG; MOSES, 2009; VALDIVIA *et al.*, 2011).

Estudos *in vitro* apontaram para relação de expressão de MT-MMP1 e TIMP-2 e a ativação de MMP-2 correlacionando com a progressão do tumor, tanto no modelo de xenoenxerto, como em lesões melanocíticas humanas, sugerindo que esses fatores são necessários para invasão e formação de metástases no melanoma. Foi visto também em estudos com pacientes, que a expressão elevada de MMP-2 está associada com o alto índice de Breslow (índice que mede em milímetros a espessura e profundidade do tumor primário, sendo um método anatomopatológico de prognóstico). O aumento da expressão de MMP-9 também já foi observado em pacientes com histórico familiar de melanoma e que tendem a queimadura solares devido a maior exposição e menor pigmentação da pele (COTIGNOLA *et al.*, 2007; HOFMANN *et al.*, 2000; REY; BONAMIGO; CARTELL, 2011).

A ação proteolítica das MMPs contribui para que ocorra o processo de metástase. O primeiro passo é a proteólise das proteínas de adesão célula-célula (E-caderinas e integrinas), começando então o processo de desprendimento de células da massa tumoral. Vale ressaltar que as junções entre células epiteliais são fundamentais para a manutenção da integridade e da homeostasia do órgão pele. Uma vez que as proteínas responsáveis por estas junções passam a serem degradadas, perde-se a integridade da barreira física da pele e também perde-se a homeostasia do órgão, dando início ao processo de disseminação metastática. O evento seguinte é a degradação dos componentes proteicos da matriz extracelular e da membrana basal. Dessa forma, existe um caminho facilitado pelas MMPs a ser seguido pelas células neoplásicas do tumor até a invasão dos vasos

sanguíneos e/ou linfáticos. Além disso, existem dados sugerindo que as MMPs possuam atividade angiogênica, e, portanto, participam dos primeiros eventos da tumorigênese, crescimento do tumor primário até a formação de tumores secundários (RHIM *et al.*, 2012; ROY; YANG; MOSES, 2009).

2.5 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL

O processo no qual células epiteliais mudam sua configuração para mesenquimais é a Transição Epitélio Mesenquimal (TEM). A transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês, epithelial-mesenchymal transition) é um processo biológico que permite que uma célula epitelial polarizada, que normalmente interage com a membrana basal por meio de sua superfície baso-lateral, sofra modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas, as quais resultam na aquisição de um fenótipo de célula mesenquimal, cuja capacidade de migração, invasão, resistência a apoptose aumentam. Esse fenômeno quando ocorre pode promover desde resistência a terapia contra o câncer deixando a célula mais resistente aos quimioterápicos até a metástase, já que a célula também consegue alterar drasticamente o microambiente em que está inserida (GARCIA-MAYEA *et al.*, 2019).

Alteração da expressão de proteínas relacionadas com adesão celular, caracteriza o processo de TEM onde células epiteliais imóveis e polarizadas começam a se tornar móveis, levando ao aumento da motilidade e invasão (CHAFFER *et al.*, 2016). Uma das características da TEM é a diminuição da proteína e-caderina e aumento da expressão da proteína vimentina.

E-caderina é uma proteína responsável pela adesão célula-célula dependente de cálcio com papel essenciais no comportamento da célula epitelial, formação de tecido e supressão do câncer. (VAN ROY; BERX, 2008). A redução ou ausência da expressão gênica ou proteica de E-caderina é comumente verificada durante a evolução tumoral em várias neoplasias de origens epiteliais e essa redução tem sido relacionada com a disseminação metastática, uma vez que resulta em perda de adesão de células neoplásicas. Porém, muitas pesquisas comprovam que várias proteínas estruturais relacionadas com as junções aderentes podem também intervir nas funções de sinalização intracelular da e-caderina. Com isso, a perda desta proteína pode proceder na ativação de uma cascata específica de sinalização, a qual atribui características às células tumorais que facilitam o término das fases posteriores da metástase (CLEVERS, 2006; ONDER *et al.* 2008).

A vimentina, também conhecida como filamento intermediário de fibroblasto, é o principal filamento intermediário encontrado em células não musculares (esses tipos de células incluem fibroblasto, células endoteliais, macrófagos, melanócitos, células de Schwann e linfócitos. *In vivo*, a vimentina geralmente não está presente em células epiteliais normais; no entanto, foi cultivado *in vitro* em células epiteliais e também pode mostrar expressão em células tumorais de origem epitelial (BERNICE; AARON, 2006). Vários tipos de células apresentam vimentina, como os fibroblastos, linfócitos, células endoteliais, neutrófilos e macrófagos (EVANS, 1998). O citoesqueleto é remodelado, após perda da polaridade celular, resultando em mudança do filamento intermediário de citoqueratina para vimentina, a qual se torna um importante marcador de alteração da morfologia celular (THOMPSON *et al.* 2005; THIERY, 2002). A vimentina é o marcador mesenquimal mais comum ligado à TEM. O aumento acentuado na expressão desta proteína está relacionado à maior migração e invasividade das células neoplásicas e menor expressão dos marcadores epiteliais, como é esperado para a TEM (GILLES *et al.* 2003; KORSCHING *et al.* 2005). Isso sugere que a vimentina deve desempenhar um papel importante na progressão do tumor e servir como um biomarcador potencial para a metástase. Ainda existem alguns estudos sobre a superexpressão aberrante de vimentina e sua relação com a metástase do melanoma (LI *et al.*, 2010).

A redução do marcador epitelial e-caderina, acompanhado por expressão aumentada de marcadores mesenquimais, como a vimentina, caracteriza a TEM (Figura 5) que desempenha um papel crítico na invasão tumoral e na metástase (CRAENE; BERX, 2013; YILMAZ; CHRISTOFORI, 2009).

FIGURA 5 – POTENCIAL DE PROGRESSÃO TUMORAL.



FONTE: Ilustração adaptada de CHAFFER *et al.*, 2016, incluindo os pops BDE-209 e TCDD.

3 JUSTIFICATIVA

Dados anteriores e publicados pelo nosso grupo (Laboratório de Toxicologia Celular/UFPR) mostram que células de carcinoma hepático HepG2, quando expostas a concentrações de cilindrospermopsina, apresentaram aumento no seu metabolismo, nos níveis de espécies reativas de oxigênio e na proliferação celular (LIEBEL *et al.*, 2015). A cilindrospermopsina é uma toxina produzida por cianobactérias, descrita na literatura como potente inibidor de síntese proteica e genotóxica, capaz de ativar diferentes isoformas da citocromo P450, bem como, em células de mamíferos provocar a redução da síntese de glutathione (FROSCIO *et al.*, 2009; HUMPAGE *et al.*, 2005; NEUMANN; BAIN; SHAW, 2007).

Florações decorrentes de eutrofização de reservatórios de água como ocorre aqui no Brasil, fazem com que as cianobactérias produzam a cilindrospermopsina e a liberem na água (LIEBEL *et al.*, 2015). Esse é um exemplo de elemento presente no meio, influenciando um tipo celular específico, o que nos levou a pensar no BDE-209 e TCDD poderiam agir de forma semelhante em células *B16-F1* alterando o fenótipo dessas células.

Fundamentado nas informações acima, optamos por investigar as alterações moleculares no fenótipo dessas células após exposição ao BDE-209 e ao TCDD, com base na expressão e atividade de genes alvos específicos. Nossa intenção é entender se existe uma relação entre a exposição ao BDE-209 e ao TCDD e a progressão de neoplasias, bem como entender os possíveis mecanismos moleculares envolvidos nesta progressão.

Face ao exposto, avaliamos se os poluentes polibromados e/ou policlorados considerados interferem aumentando a malignidade das células, potencializando sua atividade metastática. Esse tipo de abordagem é totalmente original e inovadora, sendo que os únicos estudos nessa direção foram publicados pelo Grupo de Toxicologia Celular (SALGADO *et al.*, 2018; BRITO *et al.*, 2020, 2021). Esta possibilidade se demonstrada e confirmada, abre um extenso campo de investigação, trazendo novas informações para a discussão novas considerações para as políticas de saúde pública.

4 HIPÓTESE

A hipótese nula deste trabalho é de que o BDE-109 e o TCDD não alteram o fenótipo de células neoplásicas de melanoma e não interferem na progressão tumoral. A hipótese alternativa a ser comprovadas ou refutadas é de que a exposição ao BDE-209 e ao TCDD provocam mudanças nas células tumorais *B16-F1*, tornando-as mais agressivas e aumentando o seu potencial metastático. Ou seja, uma célula *B16-F1* após a exposição a estes compostos, pode apresentar alterações fenotípicas tornando-a semelhante a uma linhagem conhecidamente mais agressiva (*B16-F10*). Portanto, ao expor as células tumorais a estes contaminantes, essas se tornarão mais agressivas e metastáticas o que será detectado através de diferentes ensaios de viabilidade celular e da expressão diferencial de genes e proteínas aqui estudados.

5 OBJETIVO GERAL

Investigar se a exposição aos contaminantes ambientais BDE-209 e TCDD modula uma condição celular favorável à progressão metastática *in vitro*, tornando células *B16-F1* fenotipicamente semelhantes à células B16F10..

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar a ultraestrutura das células *B16-F1* após exposição ao contaminante BDE-209;
- II. Investigar *in vitro* a proliferação celular das células *B16-F1* e *B16-F10* quando expostas em diferentes tempos e concentrações de BDE-209 e TCDD;
- III. Avaliar *in vitro* a viabilidade das células *B16-F1* e *B16-F10* após exposição aguda de 24h e crônica de 15 dias em diferentes concentrações de BDE-209 e TCDD e se estes poluentes exibem efeitos citotóxicos sobre as mesmas;
- IV. Avaliar *in vitro* a mudança no perfil de expressão de proteínas relacionadas a transição epitélio-mesenquimal, vimentina e e-caderina, das células *B16-F1* e *B16-F10* quando expostas em diferentes tempos e concentrações de BDE-209 e TCDD;
- V. Avaliar *in vitro* a expressão de genes relacionados com a progressão da malignidade, MMP9, MMP2, MMP14, PGK1, TIMP1, TIMP2, TIMP3 e RECK, em células *B16-F1* e *B16-F10* quando expostas em diferentes tempos e concentrações de BDE-209 e TCDD

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 CULTIVO DAS CÉLULAS DAS LINHAGENS *B16-F1* E *B16-F10*

As células de melanoma murino, obtidas do banco de células do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 40µg/mL de Gentamicina, mantidas a 37°C em incubadora com atmosfera umidificada e 5% de CO₂. Após 24 horas da adesão as células foram expostas aos contaminantes.

6.2 CONCENTRAÇÕES DE POLUENTES E PREPARO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

A escolha das concentrações de ambos poluentes foram baseadas em dados encontrados na literatura. Para a concentração de BDE-209, nossas referências foram os valores no plasma materno e cordão umbilical detectáveis nos trabalhos de Frederiksen e colaboradores (2010) e de Van den Berg e colaboradores (2017) respectivamente, com concentrações entre 1 – 10 ng/g. Para a concentração de TCDD utilizamos os os valores apresentados Collins *et al.* (2006) que relatam uma concentração média de 6ppb no soro de trabalhadores expostos. Ajustamos esses valores para que pudessem ser utilizados em cultivo e acrescentamos para cada contaminante 10 vezes o valor para mais e para menos. Desta forma obtivemos as concentrações para nossa análise de BDE-209 e TCDD de 0,01; 0,1 e 1,0 nM. Ressaltamos que selecionamos concentrações próximas aos valores reais para ambos os poluentes, possibilitando assim comparar o papel de cada um deles isoladamente na progressão metastática.

As soluções-estoque dos contaminantes foram preparadas em DMSO e mantidas em frascos de vidro âmbar estéreis, a -20°C. A concentração final de DMSO no grupo controle e nos grupos expostos ao TCDD (Sigma-Aldrich) e BDE-209 (Sigma-Aldrich) foi de 0,1%. Para ambos os tempos de exposição foram mantidos dois grupos controles em paralelo, o grupo controle (células sem exposição) e o controle veículo (DMSO), com a concentração utilizada para solubilizar os contaminantes.

Para esse estudo as células foram expostas durante dois tempos diferentes, de 24 horas (exposição aguda) e 15 dias (exposição crônica). Para os ensaios de 24 horas de exposição, foram plaqueadas 6×10^3 células/poço (dependendo do tipo de ensaio), em microplaca de 96 poços, cada poço contendo 200 µl de meio DMEM. Em seguida, após 24 horas para a adesão das células, foi realizada a exposição aos contaminantes BDE-209

ou TCDD, nas concentrações 0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL por 24 horas. Após o período de exposição os diferentes ensaios, como descritos a seguir, foram processados.

Para os ensaios de 15 dias de exposição foram plaqueadas 1×10^5 células em garrafas médias, com 10mL de meio DMEM, com os contaminantes BDE-209 ou TCDD nas concentrações de 0,01; 0,1 e 1,0 nM/mL. As trocas de meio foram realizadas a cada 3 dias, mantendo os devidos contaminantes nas concentrações estabelecidas. Foram realizados de 3 a 4 subcultivos durante a exposição de 15 dias. No 15º dia de exposição, as células foram soltas das garrafas com tripsina e plaqueadas 6×10^3 células/poço (de acordo com o tipo de ensaio), em microplaca de 96 poços, cada poço com 200µl de meio DMEM suplementado com 10% de SFB.

Nos ensaios crônicos, esperava-se 24 horas para adesão das células na placa de 96 poços e então executavam-se os protocolos dos diferentes experimentos. Os experimentos foram realizados com no mínimo triplicatas provenientes de três experimentos independentes cada triplicata.

6.3 ULTRAESTRUTURA CELULAR

Para investigação da ultraestrutura celular, as células *B16-F1* foram cultivadas e expostas BDE-209, na concentração de 1 nM, em frascos de 75 cm² por 24 horas, removidas mecanicamente e centrifugadas em frascos de 2ml para formar um pellet celular. O pellet foi preservado quimicamente em solução fixadora (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% em tampão de ácido cacodílico de sódio - CaCo 0,1M, pH 7,2 - 7,4) por 1 hora em temperatura ambiente.

Depois de lavados com tampão de CaCo 0,1 M, os pellets foram pós fixados em tetróxido de ósmio a 1% (*Electron Microscopy Science*®) em solução tampão de CaCo 0,1 M (pH 7,2 - 7,4) por 1 h, lavados e CaCo 0,1M e desidratado em uma série crescente de etanol (Merck®) (40, 50, 60, 70, 80, 90 e 3X 100%), óxido de propileno (*Electron Microscopy Science*®) e incluído em resina PoliEmbed 812 DER736 (*Electron Microscopy Science*®).

As secções ultrafinas (70 nm) foram obtidas em ultramicrotomo e contrastadas com acetato de uranila (5%) (*Electron Microscopy Science*®) por 20 minutos e citrato de chumbo (*Electron Microscopy Science*®) por cinco minutos, e observadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL TEM 1200 EXII - Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná).

6.4 ENSAIO MTT

As células cultivadas conforme descritos nos itens 6.1 e 6.2 foram utilizadas para os ensaios: MTT, vermelho neuro, cristal violeta e para a avaliação da expressão de e-caderina e viemntina por western blotting, bem como para a análise da expressão gênica por PCR em tempo real.

O método de MTT é um dos ensaios utilizados para avaliar a citotoxicidade, que baseia-se na capacidade de células viáveis reduzirem o 3 - [4,5-dimetil-2-il] -2, brometo de 5-difenil tetrazólio (MTT), através das desidrogenases encontradas nas mitocôndrias, formando assim os cristais de formazan que possuem cor roxa característica ao serem dissolvidos em DMSO, possibilitando quantificação por espectrofotometria (REILLY *et al.*, 1998).

Após o período de incubação e exposição o meio foi retirado e adicionado 200µL de solução de MTT, a qual foi incubada por 3 horas a 5% de CO₂ e 37°C. O MTT foi removido dos poços e estes foram lavados com PBS; os cristais intracelulares foram solubilizados com 100µL DMSO, e então foi realizando a leitura da absorbância em 550nm (BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988; MOSMANN, 1983).

6.5 ENSAIO VERMELHO NEUTRO

O ensaio de vermelho neutro avalia a captação e posterior acúmulo do corante pelos endossomos e lisossomos. O ensaio baseia-se na ligação do vermelho neutro, um corante supravital fracamente catiônico, à matriz lisossômica de células viáveis após sua incubação com agentes tóxicos (BABICH; BORENFREUND, 1990).

Após o período de exposição aos contaminantes, o meio DMEM foi retirado e adicionado um total de 200µL de solução de NR (Neutral red/ vermelho neutro a 50µg/mL) em cada poço e incubado a 37°C durante 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas com formol 0,5% e cálcio 0,1% em água ultrapura. Posteriormente foi adicionado uma solução de ácido acético 1% em etanol 50%. As células ficaram em repouso por 15 minutos e na sequência o conteúdo dos poços foi homogeneizado, aguardado-se mais 5 minutos. Em seguida foi realizado a leitura da absorbância a 540nm em espectrofotômetro (BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988; FOTAKIS; TIMBRELL, 2006; THITIMETHAROCH *et al.*, 2011).

6.6 ENSAIO CRISTAL VIOLETA

O cloreto de pararosanilina é um corante básico também conhecido como violeta de Genciana, que cora o núcleo das células, de forma que a taxa de crescimento celular/quantidade de células aderidas é refletida pela determinação colorimétrica das células coradas (GILLIES; DIDIER; DENTON, 1986). O ensaio de coloração nuclear que permite a determinação da taxa de crescimento e proliferação celular é denominado cristal violeta.

Após o período de tratamento as células plaqueadas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol por 30 minutos em temperatura de -8°C , coradas com 100 μL da solução de cristal violeta (0,25 mg/ml) em água Miliq durante 15 minutos, a temperatura ambiente, e em seguida lavadas com água Miliq. Fez-se a eluição do corante utilizando uma solução de ácido acético 33%, sob agitação constante, por 30 minutos; a leitura da absorbância foi realizada em 570nm em espectrofotômetro (GILLIES; DIDIER; DENTON, 1986).

6.7 WESTERNBLOTTING

Apenas as células provenientes do experimento crônico foram utilizadas para o ensaio de wester blot, visto que este ensaio avalia a expressão proteica e este é um processo lento pois depende de transcrição e tradução. Extratos de células provenientes da exposição a ambos poluentes foram fracionados em tampão redutor e tiveram suas proteínas totais quantificadas por Bradford (1976). Na sequências os extratos foram submetidos a eletroforese por SDS-PAGE (8% para e-caderina e 10% para vimentina e actina), seguida de transferência para membrana de difluoreto de polivinilideno utilizando um aparelho de transferência de acordo com os protocolos do fabricante (Bio-Rad). A membrana foi então incubada com de leite desnatado 5% em TBST (10 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5% Tween 20) por 60 min e lavada uma vez com TBST, Na sequência a membrana foi incubada com anticorpos anti-actina (1: 5000), anti-ecaderina ou anti-vimentina durante 12h. As membranas foram lavadas três vezes de 10 min cada com TBST para remoção de anticorpos não ligados e então incubadas com anticorpos secundários anti-IgG murina (1:3000) ou anticorpos anti-IgG de coelho (1:3000), ambos acoplados a peroxidase, durante 2h. As membranas foram novamente lavadas 3x de 10 min cada com TBST, para remoção de anticorpos secundários não ligados. A reação foi evidenciada utilizando-se sistema de revelação ECL (Amersham Biosciences) de acordo com os protocolos do fabricante.

6.8 DESENHO DOS *PRIMERS* PARA ANÁLISE DE QPCR

Os genes de interesse, os números de acesso no GenBank e os primers desenhados no Primer3web versão 4.1.0 tendo suas sequencias confirmadas no BLAST estão na Tabela 1.

TABELA 1 - SEQUÊNCIA DOS PRIMERS DESENHADOS PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE INTERESSE.

Gene	GenBank	Primers	Amplicon em pb
MMP9	NM_013599	F - 5' TGACAAGAAGTGGGGTTTCTG 3' R - 5' GGCACGCTGGAATGATCTA 3'	101
MMP2	NM_008610	F - 5' TGACCGGGATAAGAAGTATGG 3' R - 5' ACTTGTTGCCCAGGAAAGTG 3'	110
MMP14	NM_008608	F - 5' TATGGGCCCAACATCTGTG 3' R - 5' TCCATCACTTGGTTATTCCTCA 3'	113
PGK1	NM_008828	F - 5' GTGCCAAATGGAACACAGAG 3' R - 5' AACATTGCTGAGAGCATCCA 3'	113
TIMP1	NM_001044384	F - 5' GCGTACTCTGAGCCCTGCT 3' R - 5' TCACTCTCCAGTTTGCAAGG 3'	111
TIMP2	NM_011594	F - 5' AACAGGCGTTTTGCAATG 3' R - 5' GAATCCTCTTGATGGGGTTG 3'	105
TIMP3	NM_011595	F - 5' ACCTCACCTCCTTCCCATC 3' R - 5' CCAGTGCTAAATTTGCAAGAAA 3'	100
RECK	NM_016678	F - 5' ATAGGCTGCAAACCCATCAT 3' R - 5' TGTCACCTTAGCAATAGTGTCCA 3'	108
BETA ACTINA	NM_007393.5	F - 5' CCACCATGTACCCAGGCATT 3' R - 5' GAGTACTTGCGCTCAGGAGG 3'	106

FONTE: O autor (2021)

A PCR convencional foi realizada para avaliar os primers sintetizados, qualidade dos amplicons, e se estavam de acordo ao tamanho em pares de base de cada amplicon previsto nos testes *in silico* (GeneRunner versão 6.5.52). Por fim, foi realizado o desempenho em reação de qPCR com SYBRgreen. A concentração ideal de 6 picomol de primers e concentração do cDNA (5µM) foram utilizadas. Para escolha dos genes endógenos de referência foram testados o GAPDH e beta-2-microglobulina, porém se

mostraram instáveis após exposição aos contaminantes comprometendo a possibilidade de comparação, sendo o mais estável a Beta-Actina.

6.9 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E CONVERSÃO PARA CDNA

A extração do RNA total das amostras foi efetuada através do *Purelink RNA mini Kit* (*Applied Biosystems – Thermo Fisher*) utilizando protocolo recomendado pelo fabricante. O resultado apresentou RNA total de ótima qualidade, confirmado pela quantificação em espectrofotômetro através da razão da absorbância A260/A280, na qual, a razão mostrou um valor médio de 1,628, o que classifica o material como puro quanto ao conteúdo de RNA. Em seguida o material foi convertido em cDNA total utilizando o kit Superscript IV (*Applied Biosystems – Thermo Fisher*). Os procedimentos moleculares, foram realizados no Laboratório de Parasitologia Molecular do Departamento de Patologia Básica da UFPR

6.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA – QPCR

A análise da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real (qPCR) utilizando como gene endógeno a beta-actina murina como descrito em literatura, estabelecendo assim comparações nos níveis de expressão entre diferentes amostras antes e após a exposição aos contaminantes testados nesse estudo. As reações foram realizadas em termociclador *Step one fast system* (*Applied Biosystems*), utilizando o *SYBRgreen PCR Master Mix* para cada reação. Termociclagem de acordo com o recomendado pelo fabricante para o kit utilizado (40 ciclos – 94°C para desnaturar seguida da temperatura de ligação dos *primers* a 60°C).

6.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os ensaios *in vitro*, foram realizados três experimentos independentes para cada ensaio, com pelo menos três replicatas por grupo. Os dados representam as médias das pseudoréplicas de cada grupo experimental, num total de 3 valores por grupo experimental (equivalente aos 3 experimentos independentes) foram analisados através do teste não paramétrico de *Kruskall-Wallis* seguidos pelo pós-teste de *Dunns*, quando aplicável para comparação dos grupos expostos *versus* controle (veículo DMSO).

A análise por qPCR apresenta seu resultado de comparação dos níveis de mRNA dos alvos por $\Delta\Delta CT$, em relação ao controle endógeno, seguido da análise pelo teste não

paramétrico de *Kruskall-Wallis* e pós-teste de *Dunns* quando aplicável, para comparação dos níveis de mRNA dos grupos expostos *versus* controle (veículo DMSO). Nos gráficos os controles são equivalentes ao valor de 1, sendo que, são observadas as diferenças relativas em relação ao controle, porém, no texto foram mencionados os valores em porcentagem, para facilitar o entendimento do leitor.

7 RESULTADOS

7.1 VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA E CRÔNICA AOS CONTAMINANTES

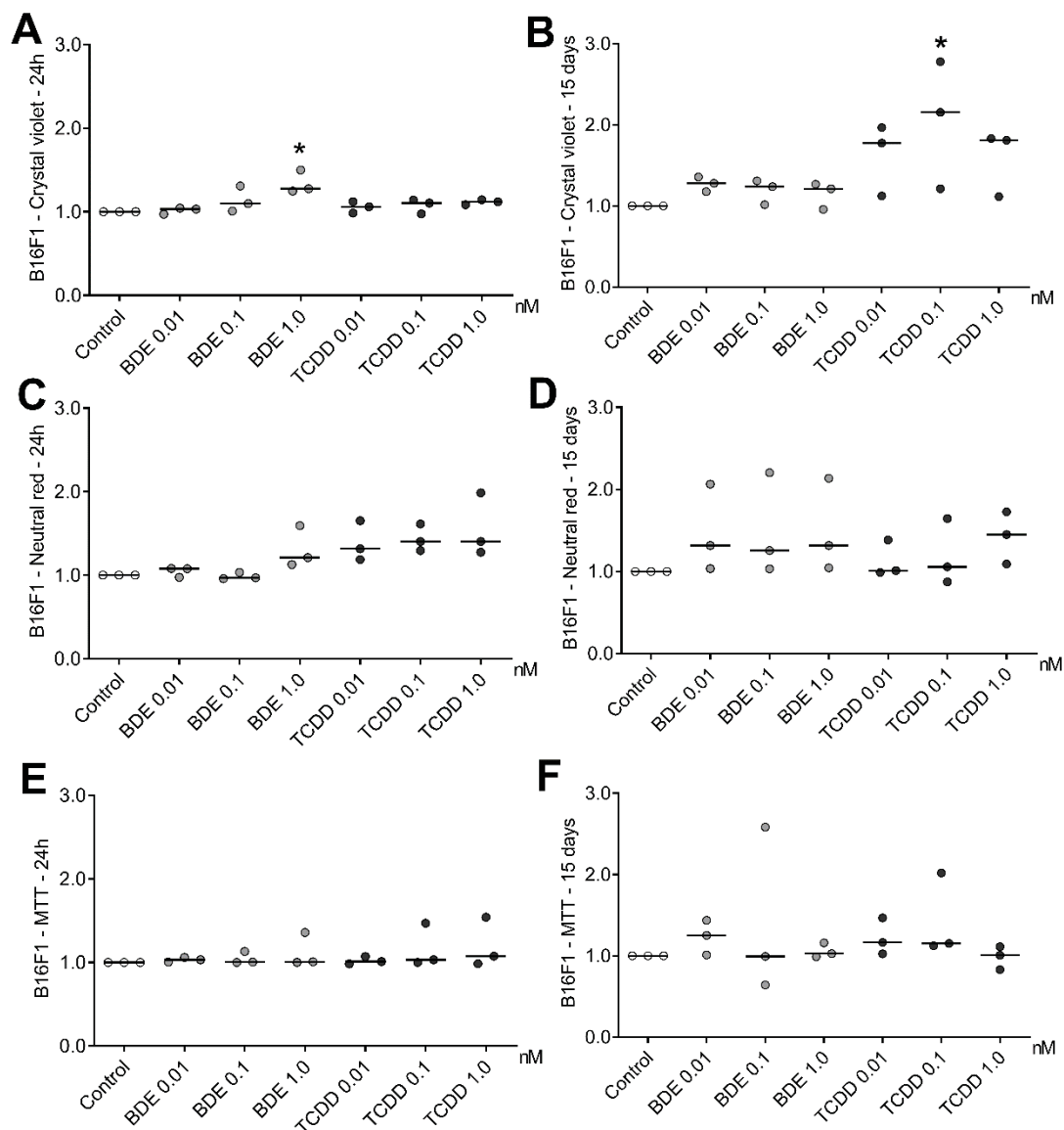
Após a expansão das células e congelamento, foram realizadas trélicas do experimento, sendo cada uma destas, proveniente de um tubo diferente de células descongeladas. Com objetivo de avaliar a condição do cultivo, foram realizados ensaios de cristal violeta após a exposição aguda (24h) e crônica (15 dias).

As passagens para cada um dos tipos celulares variaram entre 7 a 12. Durante os ensaios de 24hrs nenhum evento fora do planejado ocorreu que pudesse comprometer o trabalho. As células mostraram o nível de adesão esperado, um aumento de confluência e morfologia normais. Portanto, em termos visuais, pela microscopia de luz, nenhuma alteração foi verificada. As mudanças só puderam ser observadas mediante os resultados dos ensaios de viabilidade.

Alguns tratamentos apresentaram resultados idênticos aos do grupo controle e outros um aumento considerado inexpressível estatisticamente (variando de 1%, a 5%). Consideramos resultados biologicamente relevantes aqueles com aumento ou decréscimo superiores a 10% em relação ao controle.

Nossos resultados mostram, que a exposição aos contaminantes BDE-209 e TCDD não afetaram a viabilidade celular avaliada pelos ensaios de violeta de cristal, vermelho neutro e MTT na linhagem celular B16F1 em todas as doses e tempos de exposição (Figura 6). A exceção de deu para o ensaio do cristal violeta para a maior concentração de BDE-209 (1,0 nM) em 24 horas de exposição e o concentração intermediária de TCDD (0,1 nM) em 15 dias de exposição (Figura 6A-B). Em ambos os casos, o número de células coradas, determinado por ensaio de cristal violeta, aumentou (BDE-209: 25%, TCDD: 215%, fig. 6A-B).

FIGURA 6 - ENSAIOS COM CÉLULAS B16F1 POR 24 HORAS (A, C e E) E 15 DIAS (B, D e F)



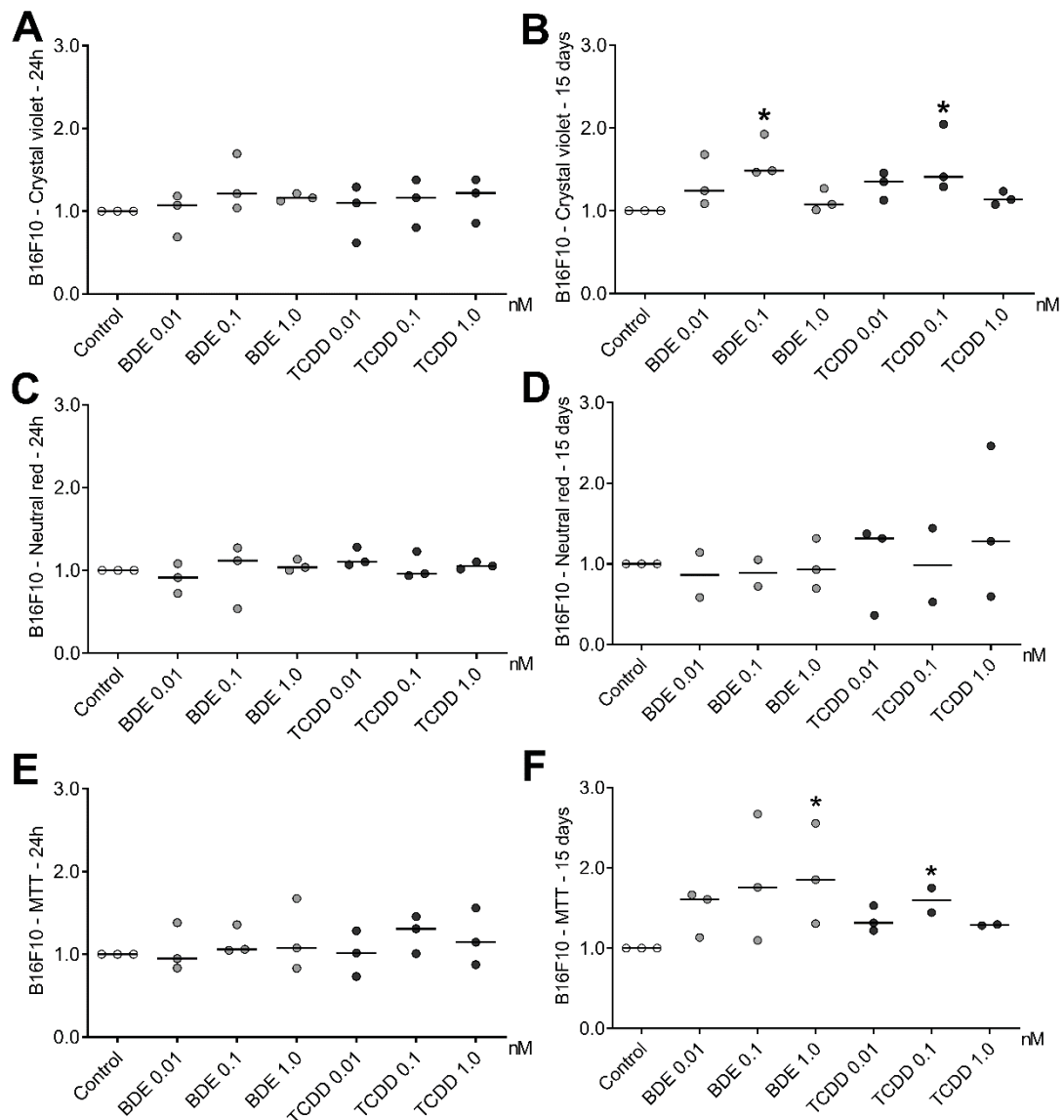
FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Três experimentos independentes foram realizados para todos os grupos. A análise estatística foi a ANOVA, pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunns quando aplicável. Um valor de $p < 0,05$ foi assumido como estatisticamente significativo.

Para as células B16-F10, a exposição de 24 horas aos contaminantes estudados, também não afetou a viabilidade celular (fig. 7A, C, E), mas os efeitos foram observados aos 15 dias de exposição. O número de células aderidas (ensaio do cristal violeta) aumentou após a exposição a BDE-209 (48%) e TCDD (41%), em concentração

intermediária (0,1 nM), bem como a conversão metabólica dependente de desidrogenase de MTT em formazan (ensaio do MTT) para a concentração mais alta de BDE-209 (1 nM, 85%) e a concentração intermediária de TCDD (0,1 nM, 60%). Nenhuma diferença estatística foi observada para a exposição de 15 dias no ensaio do vermelho neutro.

FIGURA 7 - ENSAIOS COM CÉLULAS B16F10 POR 24 HORAS (A, C e E) E 15 DIAS (B, D e F).



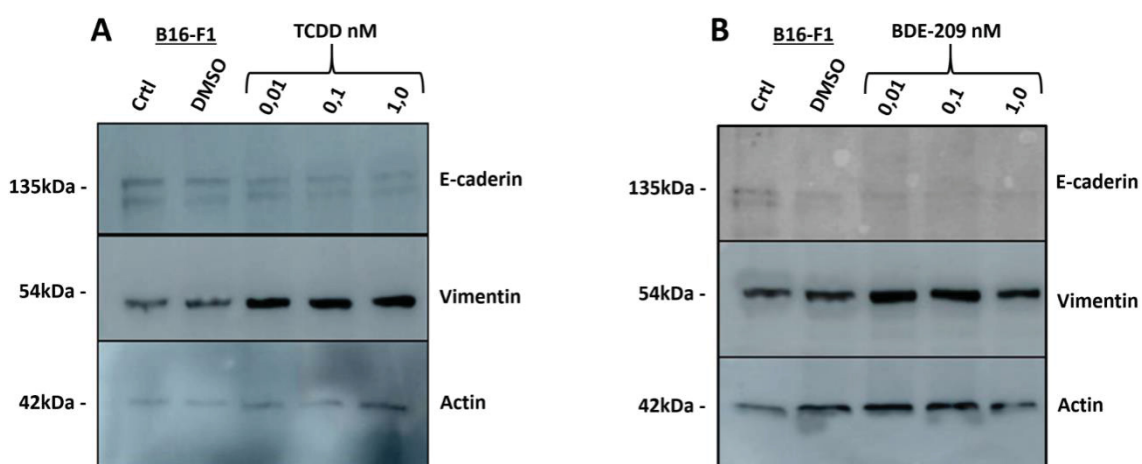
FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Três experimentos independentes foram realizados para todos os grupos. A análise estatística foi a ANOVA, pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunns quando aplicável. Um valor de $p < 0,05$ foi assumido como estatisticamente significativo.

7.2 WESTERNBLOTTING

Como resultados dos ensaios de westernblotting, pudemos observar um aumento da expressão de vimentina e diminuição de e-caderina em ambas linhagens de forma não dose-dependente, após 15 dias de exposição. O controle de actina mostrou-se constante ao em todos os grupos. A Figura 8 mostra os géis das células B16-F1 expostas ao BDE-209 e ao TCDD e a Figura 9 o resultado das células B16-F10.

FIGURA 8 - WESTERNBLOTTING PARA DETECÇÃO E COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE E-CADERINA E VIMENTINA EM CÉLULAS B16-F1 APÓS EXPOSIÇÃO CRÔNICA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BDE-209 E TCDD.

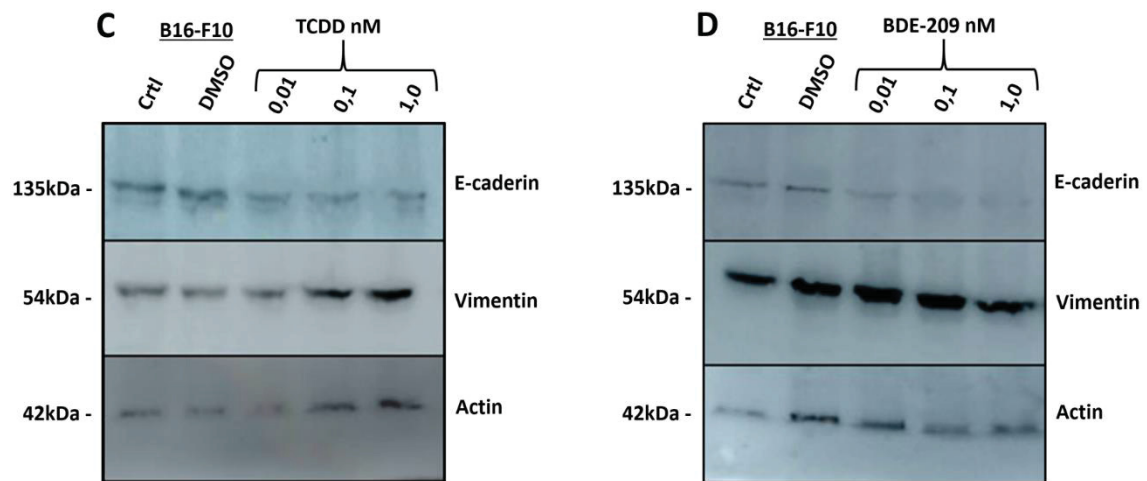


FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Em todos os resultados foi utilizado a actina como normalizador da quantificação e comparação entre os grupos. Em A, células B16-F1 expostas ao TCDD em diferentes concentrações; B células B16F1 expostas ao BDE-209 em diferentes concentrações.

FIGURA 9 - WESTERNBLOTTING PARA DETECÇÃO E COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE E-CADERINA E VIMENTINA EM CÉLULAS B16-F10 APÓS

EXPOSIÇÃO CRÔNICA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BDE-209 E TCDD.



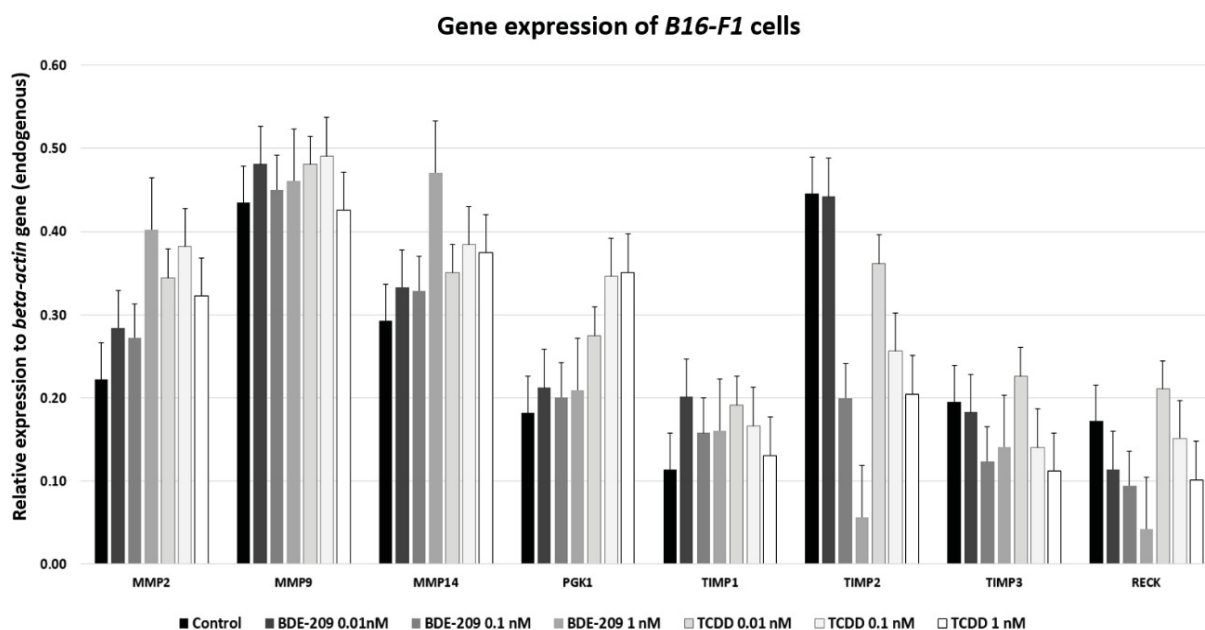
FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Em todos os resultados foi utilizado a actina como normalizador da quantificação e comparação entre os grupos. Em A, células B16F1 expostas ao TCDD em diferentes concentrações; B células B16F1 expostas ao BDE-209 em diferentes concentrações.

7.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE METALOPROTEINASES E SEUS INIBIDORES

Para efeito de comparação foi realizada a análise da expressão gênica de células B16-F1 sem nenhuma exposição, desta forma podemos comparar com os perfis de expressão entre células que foram expostas aos diferentes tratamentos com o perfil das controle observando o aumento ou a diminuição dos níveis de expressão entre os tratamentos. A expressão dos genes nos diferentes tratamentos é apresentada na Figura 10.

FIGURA 10 - NÍVEIS DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS *B16-F1*.



FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Os perfis de expressão de cada gene para células controle e as de cada tratamento são apresentados. A expressão relativa (genes em relação ao endógeno Beta-Actina) após análise de 3 repetições independentes com duração de 15 dias (exposição crônica).

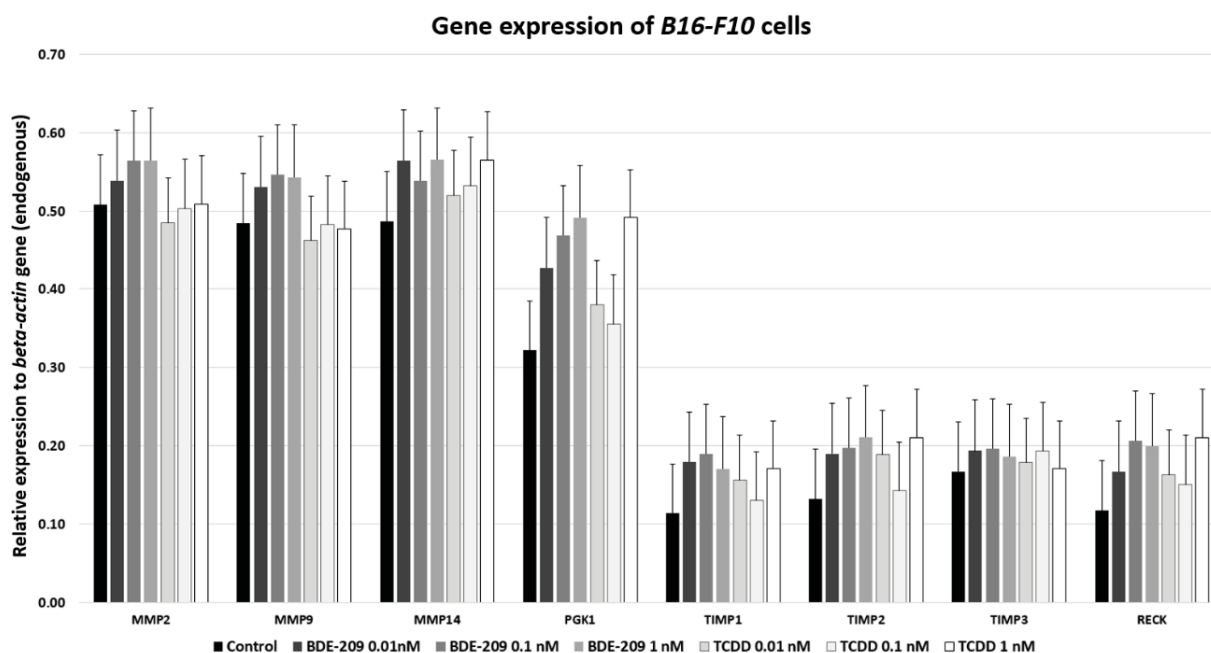
Os perfis gerados nos mostram que a exposição ao BDE-209 provoca uma mudança no perfil de expressão dos genes. A mudança mais evidente é a diminuição da expressão do gene TIMP2 após a exposição ao BDE-209 1 nM. De acordo com os resultados aparenta ser uma redução dose-dependente; quanto maior a concentração, menos expresso ele é. Há também um pequeno aumento de expressão dos genes MMP14 e MMP2 em 1nM. Os genes MMP9 e PGK1 não sofreram nenhuma mudança em qualquer uma das concentrações e os demais pequenas oscilações em valores próximos ao do grupo controle.

Quando as células foram expostas ao TCDD verificamos que há um perfil de expressão que persiste de acordo com o aumento da concentração. Na figura 11 vemos os perfis de expressão dos genes MMP2, MMP14 e PGK1 apresentando um aumento e os genes TIMP1, TIMP2, TIMP3 e RECK uma diminuição. Não há uma diminuição tão significativa de TIMP2 como a observada na exposição de BDE-209 1nM, mas é perceptível a diminuição em relação ao controle.

O perfil de expressão dos mesmos genes é diferente entre células B16-F1 e B16-F10 pois, a linhagem B16-F10 é mais metastática que as F1, logo era esperado observar

níveis de expressão dos inibidores menores que as metaloproteínas e PGK1, mas não sabíamos como era o perfil, que é o que está sendo apresentado na Figura 11.

FIGURA 11 - NÍVEIS DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS *B16-F10*.



FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Os perfis de expressão de cada gene para células controle e as de cada tratamento são apresentados. A expressão relativa (genes em relação ao endógeno Beta-Actina) após análise de 3 repetições independentes com duração de 15 dias (exposição crônica).

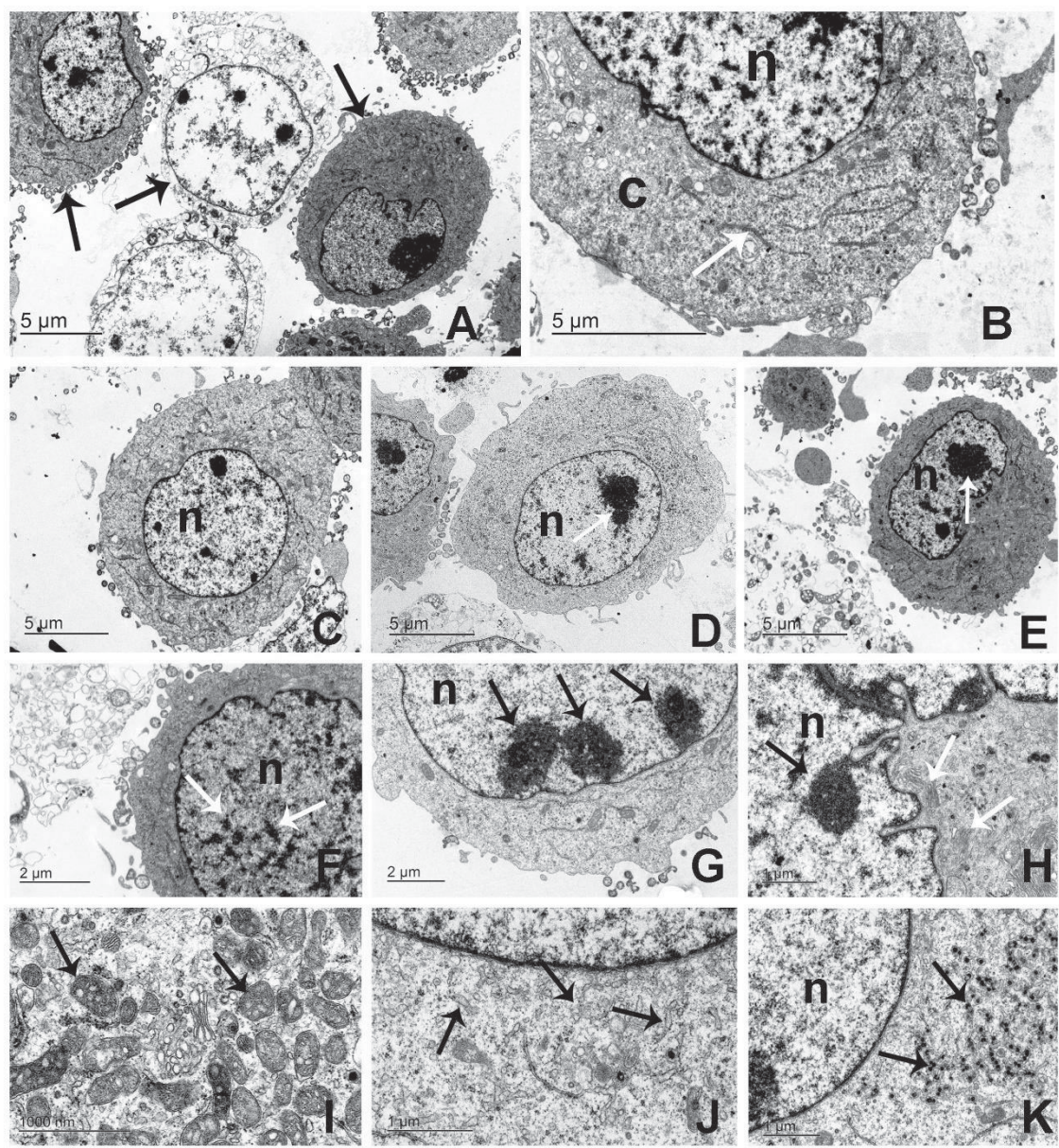
As células B16-F10 quando expostas as 3 concentrações aqui estudadas de BDE-209 não apresentaram grandes mudanças no padrão de expressão dos genes estudados. Mas há uma clara configuração em que os genes MMP9, MMP2, MMP14 e PGK1 apresentam uma expressão maior que os genes TIMP1, TIMP2, TIMP3 e RECK. Independente da concentração a diferença de expressão entre os grupos é muito pequena.

As células que foram expostas as 3 concentrações de TCDD apresentam um perfil de expressão para os genes estudados muito parecido com o perfil observado para BDE-209, a diferença é que o TCDD diminui um pouco mais que o BDE-209 a expressão dos genes TIMP1, TIMP2, TIMP3 e RECK.

7.4 ULTRAESTRUTURA CELULAR DE *B16-F1* EXPOSTA A 0,1 NM DE BDE-209 POR 24H.

Quando observadas ultraestruturalmente as células B16-F1 controle, em 24hs de cultivo, mostram uma população heterogênea com características morfológicas e com eletrondensidades distintas. Em geral algumas células encontram-se com um citoplasma mais eletrodenso, outras menos e um grupo de células apresentam um citoplasma pouco contrastado (Figura 12A). Em geral o núcleo é de aspecto arredondado, mas não é incomum a ocorrência de células com núcleos de formas diversificadas (Figuras 12A, C, D e E). É característico nessas células uma predominância de eucromatina e nucléolo destacado, podendo ser essa estrutura encontrada multiplicada (Figuras 12D, E e G). O núcleo também se caracteriza por apresentar uma organização peculiar da cromatina, com pequenas concentrações de heterocromatina distribuídas aleatoriamente, e não apresentam o arranjo comum de heterocromatina próximo ao envoltório nuclear (Figuras 12B e F). O citoplasma pode se encontrar, dependendo da célula, pobre em componentes citoplasmático ou organelas (Figuras 12B, C, D e E), como pode também se apresentar com uma grande quantidade de mitocôndrias (Figura 12I), complexo de Golgi desenvolvido (Figura 12H), bastante retículo endoplasmático liso (Figura 12J) ou com depósitos de glicogênio evidentes (Figura 12K). No entanto, curiosamente, o retículo endoplasmático granular não é abundante em praticamente todas as células (Figura 12B).

FIGURA 12 - ULTRAESTRUTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16-F1) APÓS CULTURA DE 24H.

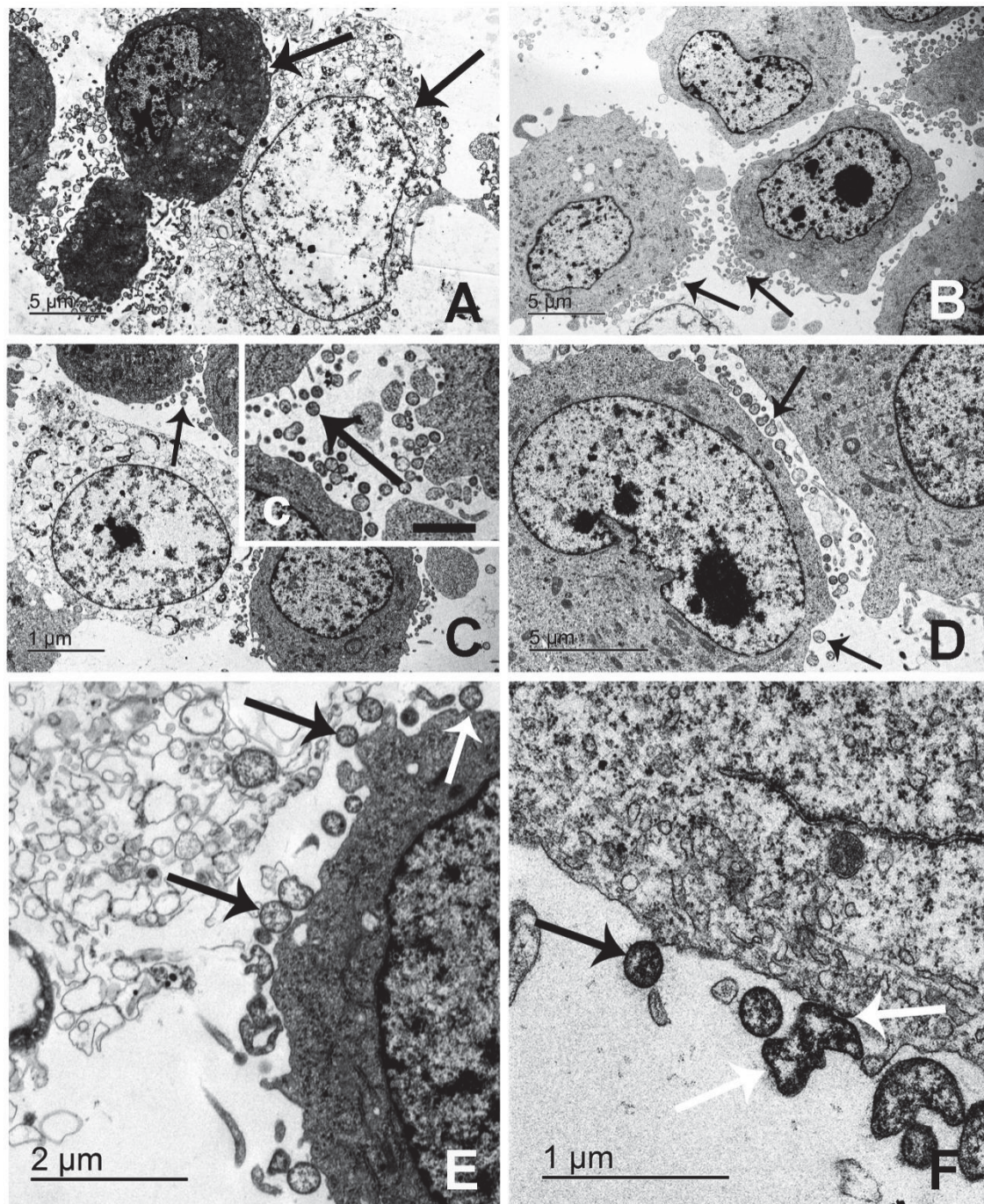


FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: A. Observe os diferentes tipos de células (setas) com eletrondensidades distintas. B. Características dos núcleos (n) com heterocromatina e citoplasma dispersos (c com poucas diversidades de organelas. C, D e E mostram três células distintas. Observe as diferenças entre os núcleos (n) e o contraste do citoplasma. As setas indicam o nucléolo. F. Observar a presença de “manchas” de heterocromatina sem a deposição típica no entorno do envelope nuclear. G. Observe a presença de múltiplos nucléolos. H. Observe a morfologia nuclear atípica (n), heterocromatina (seta preta) e um aparelho de Golgi desenvolvido (setas brancas). As setas em I indicam a mitocôndria, em J a presença de retículo liso e em K o acúmulo de glicogênio.

Após a exposição ao BDE-209 0,1 nM por 24h, são encontradas algumas células com os aspectos morfológicos descritos anteriormente enquanto outras demonstram um aspecto diferenciado (Figuras 13A e B): o núcleo tornou-se mais irregular, mas o padrão de distribuição da cromatina é o mesmo descrito antes da exposição, com uma predominância da eucromatina e nucléolos evidentes (Figuras 13A, B e D). Um aspecto morfológico evidente e não observado nas células controle é a ocorrência de microvesículas externas ou também denominadas de exossomas dependendo do tamanho que possuem, em grande quantidade ao redor das células que apresentam um citoplasma mais eletrodenso (Figuras 13A, B, C e D). A Figura 13A mostra uma célula em fase final de divisão, e mesmo assim essas vesículas encontram-se em grande quantidade. Essas microvesículas apresentam formas e tamanhos diversificados (Figura 13C), mas no geral são esféricas. Uma observação mais minuciosa sugere que essas estruturas são liberadas das células com citoplasma mais eletrodenso, como comentado acima, o que pode ser observado na Figura 13E, denominadas aqui de células doadoras. Essas micro ou nanovesículas, emergem dessas células e se dispersam pelo meio (Figura 13C), podendo entrar em contato com outras células e com elas se fundirem através da membrana plasmática (Figura 13F). A fusão das microvesículas ocorre com as células de citoplasma menos eletrodenso, denominadas aqui como células alvo.

FIGURA 13 - ULTRAESTRUTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO (B16-F1) APÓS EXPOSIÇÃO A BDE-209 POR 24H.



FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: A. As setas indicam duas células distintas. B. Observe a presença de microvesículas ao redor das células (setas). C. As microvesículas fora das células estão relacionadas com as células escuras (seta), observe no detalhe as microvesículas (seta) (scala = 0,5 μm). D. Novamente, uma diversidade grande de vesículas é observada ao redor das células. E. As setas mostram as vesículas emergentes da célula doadora, F. As setas mostram as vesículas emergentes da célula doadora, observe no detalhe as microvesículas (seta) (scala = 0,5 μm).

observe na seta branca o momento da exclusão da vesícula da célula. F. Observe a fusão de microvesículas com uma célula-alvo.

8 DISCUSSÃO

O modo de vida da sociedade moderna coloca o ser humano frente a uma situação paradoxal: se de um lado a cada dia temos mais tecnologia que gera mais conforto e qualidade de vida, de outro lado as substâncias utilizadas para gerar tal conforto e qualidade de vida deixam a população humana cada vez mais vulnerável e exposta a substâncias potencialmente tóxicas.

A presente discussão dos dados gerados suscita questões que muitas vezes superam a compreensão atual que temos de certos mecanismos celulares, uma vez que nossa abordagem é totalmente inovadora no campo da saúde, fazendo com que a explicação para os fatos relatados aqui seja ainda incipiente. Mesmo assim, observamos que ambos os poluentes selecionados para a continuidade desse tipo de abordagem toxicológica, surpreendentemente deixam evidências de que a exposição química pode ter um papel importante no surgimento, progressão e prognóstico de doenças como o câncer, que não deveriam ser negligenciadas. Liebel *et al.*, (2015) já levantou essa questão quando observou que a exposição de células de carcinoma hepáticas a uma cianotoxina (cilindropermopsina) apresentaram aumento nos parâmetros de viabilidade celular, sem demonstrar citotoxicidade como observado em células normais.

Os seres humanos estão constantemente expostos a uma imensa gama de poluentes, mas nem tudo a que estamos expostos é de fato absorvido e têm potencial tóxico para o organismo. Para que a exposição seja efetiva, o poluente deve ser capaz de se absorvido pelo organismo. Isto se dá por três vias principais: dérmica, inalatória e oral. As vias inalatórias e orais são de grande relevância para estudos populacionais, dado que são as vias mais comuns de exposição e pelas quais a entrada de poluentes é mais expressiva, devido aos processos de bioacumulação e biomagnificação. No entanto, para o presente estudo, a via dérmica é a mais relevante, dado que esta é praticamente a única forma pela qual as células epiteliais estão expostas, já que o tecido epitelial é avascular e portanto irrisoriamente afetado pelas substâncias presentes na circulação sistêmica. O INCA em sua última edição do boletim de Vigilância Epidemiológica para exposição ocupacional, menciona diversos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de pele, entre eles a exposição ocupacional. Neste relatório fica claro que a exposição dérmica a certos poluentes é facilitada em trabalhadores dado o grande número de horas que passam em contato com tais substâncias. Agentes como arsênio, alcatrão, creosoto, fuligem, luz solar, hidrocarbonetos policíclicos, óleo mineral, ortoarsenicais, radiação ultravioleta,

quimioterápicos antineoplásicos, radiação ionizante, óleo de xisto e bifenilas policloradas foram amplamente descritas e discutidas como causadoras de câncer de pele. Profissões como mineiro, canteiro, pedreiro, soldador, trabalhador rural, salva-vidas, agentes de saúde, pescador, guarda de trânsito, farmacêutico, químico, instalador telefone/telégrafo, piloto de avião foram relatadas como as de maior risco de exposição dérmica. Isto demonstra a ampla gama de produtos e possibilidade de exposição via dérmica, aumento ainda mais a relevância social do presente trabalho.

8.1 BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE BDE-209 E TCDD NÃO COMPROMETEM A VIABILIDADE CELULAR DE B16-F1 E B16-F10

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados com a intenção de verificar o surgimento de mudanças, nos tempos de exposição aguda e na crônica, como por exemplo, no número de células (ensaio do cristal violeta), atividade de desidrogenases celulares (ensaio MTT) e na integridade do sistema endolisossomal (ensaio do vermelho neutro). Desse modo, esses ensaios em conjunto fornecem dados a respeito da viabilidade celular,. Não observamos alterações morfológicas, quali e quantitativas pela microscopia de luz, nas diferentes concentrações e tempos quando comparamos expostos e controles. As diferenças na viabilidade só puderam ser avaliadas mediante os resultados dos ensaios realizados para este fim.

O ensaio do cristal violeta (cloreto de pararosanilina) é um corante básico também conhecido como violeta de Genciana, que cora o núcleo das células, de forma que a taxa de crescimento celular/quantidade de células aderidas é refletida pela determinação colorimétrica das células coradas (GILLIES; DIDIER; DENTON, 1986). O ensaio de vermelho neutro avalia a captação e posterior acúmulo do corante nos endossomos e lisossomos, indicando a integridade do sistema endolisossomal. Este ensaio baseia-se na ligação do vermelho neutro, um corante supravital fracamente catiônico, à matriz lisossômica de células viáveis após sua incubação com agentes tóxicos (BABICH; BORENFREUND, 1990). O MTT é um dos ensaios usados para avaliar a citotoxicidade e baseia-se na capacidade de células viáveis reduzirem o MTT (3 - [4,5-dimetil-2-il] -2, brometo de 5-difenil tetrazólio), através das desidrogenases formando cristais de formazan que possuem cor roxa característica ao serem dissolvidos em DMSO, possibilitando quantificação por espectrofotometria (REILLY *et al.*, 1998).

Em relação ao grupo controle a exposição aguda ao BDE-209 tanto para as células B16-F1 e B16-F10 apresentam aumento muito discreto na proliferação avaliada pelo ensaio de cristal violeta na concentração 1,0nM e 0,1 nM de BDE-209 respectivamente; o TCDD não apresentou nenhuma alteração importante em ambas linhagens e todas as doses estudadas. Na exposição crônica de B16F1 a 0,1nM de TCDD e de B16F10 a 0,1 nM de BDE e 1,0 nM de TCDD observou-se uma aumento da proliferação pelo ensaio do cristal violeta. Nossas concentrações estão de acordo com o que foi detectado *in vivo* por outros pesquisadores em humanos (Frederiksen *et al.*, 2010; Van den Berg *et al.*, 2017) e não apresentaram respostas significativas quanto a proliferação celular. Zhi e colaboradores (2012), usaram concentrações de BDE-209 até 100 vezes maiores que as usadas no nosso estudo (5, 15, 25, 50 e 100 nM) por 24h e neste caso, observaram aumento dos parâmetros proliferativos em células Hela, MCF-7/ADR, OVCAR-3 e CHO. É importante ressaltar que cada linhagem celular possui características próprias, tornado a comparação entre tipos celulares distintos mais complexa. Zhi *et al* (2012) utilizou células neoplásicas de útero, adrenal e ovário, sendo que em todas os mecanismos celulares são dependentes de hormônios esteróis. Já os melanomas, por serem células epidérmicas, sofrem pouca ou nenhuma influência hormonal, o que torna o mecanismo de respostas deste tipo celular distinto dos avaliados pelo supracitado autor, dificultando a comparação dos resultados. Segundo Gao e colaboradores (2016) um aumento da capacidade de proliferação celular foi observado em células epiteliais expostas ao TCDD. Os autores revelam que ocorre um aumento no avanço da fase G1 para S, em células epiteliais fetais do palato humano (hFPECs) expostas ao TCDD nas concentrações de 0.01, 0.1, 0.5 or 1 nM por até 5 dias, bem como um aumento de volume celular quando estas células iniciam a fase G2/M. As concentrações utilizadas por Gao e colaboradores (2016) são similares a utilizadas neste estudo e o tipo celular possui características e origem embrionária semelhantes, facilitando a comparação. Em seu estudo, Gao e colaboradores demonstraram um aumento da proliferação celular epitelial após a exposição ao TCDD de forma dose dependente; além disso observaram que esta proliferação estava relacionada ao aumento das proteínas e-caderina, vimentina e fibronectina, porém sem causar aumento na migração celular. Células epiteliais não neoplásicas não possuem características migratórias, diferentes de células epiteliais de melanoma, que possuem alto poder migratório e de invasão tecidual. Já De Marchi (2019) avaliando células de B16F1 expostas às mesmas doses de DBE-209 e TCDD por 24h não identificou alterações na proliferação e/ou adesão celular, no entanto, quando

expostas às diferentes concentrações de TCDD foi observado um aumento significativo na proliferação/adesão celular (~23%) para todas as concentrações testadas. De Marchi (2019) teve resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho: em ambos trabalhos, nos ensaios crônicos, foi observado nas células expostas à concentração 0,01 de BDE-209 um aumento dos níveis de proliferação/adesão celular, enquanto houve uma redução desses mesmos níveis nas células expostas à concentração de TCDD 0,1. É interessante ressaltar que tanto o presente trabalho, quanto o trabalho de De Marchi (2019) encontraram resultados congruentes para a dose de 0,1 nM de TCDD, mas que a mesma alteração não pode ser observada para a maior dose. Isso pode ser explicado em parte pelo fenômeno de hormese. Diferente dos fenômenos dose-dependentes, em que o aumento da dose aumenta a toxicidade, no fenômeno de hormese a resposta é dita bifásica: em certas doses pode haver um efeito protetor/ estimulador que desaparece ou se torna tóxico com o aumento da dose (COOK; CALABRESE, 2017)

O teste do vermelho neutro para linhagem B16-F1 não evidenciou aumento no acúmulo do corante nas células, nem na exposição aguda nem na crônica de forma significativa para ambos poluentes testados. O que chama atenção é que na exposição por 24 h, nas concentrações de BDE-209 0,1 nM, há uma tendência adiminuição no acúmulo deste corante, evidenciando uma diminuição da integridade do sistema endolisossomal. De Marchi (2019) verificou um aumento significativo na atividade do sistema endossoma lisossoma de células B16F1 expostas por 24h, na concentração de BDE-209 0,01 nM/mL (~20%) e nas concentrações do TCDD 0,1 e 1,0 nM/mL; a autora ainda evidenciou que para a exposição crônica de 15 dias houve uma redução da retenção do corante pelo sistema após as exposições ao BDE-209 e ao TCDD. As células B16-F10 não respondem aumentando a captação do corante de forma significativa tanto na exposição aguda e crônica para ambos os compostos. O TCDD é uma molécula conhecidamente tóxica para a célula, no entanto, nenhuma alteração estatisticamente significativa foi observada no sistema endolisossomal após exposição crônica e aguda de ambas linhagens aqui estudadas.

A exposição ao BDE-209 também não apresenta para as células B16-F1 um aumento da atividade de redução do MTT durante a exposição aguda e crônica. As B16-F10 apresentam o mesmo comportamento não respondendo a exposição se assemelhando ao grupo controle, exceto para a exposição crônica a 1 nM de BDE-209. Jin e

colaboradores (2010) expuseram células RTG-2 a doses variadas de BDE-209 (1 a 100 μ M) e também não observaram alterações na viabilidade celular através do teste de MTT.

Foram realizadas exposições de curta duração (24h) e longa duração (15 dias) para simular células expostas aguda e cronicamente aos contaminantes estudados e não há em nossos dados, algo que mostre que houve uma ação citotóxica significativa, para ambas linhagens, tempos de exposição e poluentes. Na literatura, no entanto, são encontrados alguns resultados divergentes aos que foram observados nesse estudo para as células B16. Por exemplo, em células SH-SY5Y de neuroblastoma humano foram expostas ao BDE-209 por 24h em concentrações de 1, 2, 4, 8 μ g/mL e apresentaram efeitos característicos de citotoxicidade como a diminuição da viabilidade afetando o teste de MTT (WEIHONG *et al.*, 2008); neste exemplo a ressalva fica por conta da comparação entre tipos celulares tão distintos quanto melanomas e neuroblastomas. Apesar de ambas serem linhagens tumorais e possuírem origem ectodérmica, são células morfológica, fisiológica e bioquimicamente completamente distintas. Shiwei e colaboradores (2010) também realizaram exposição de células RTG-2 ao BDE-209 por 72 h nas concentrações de 1–100 μ M e identificaram interferência na viabilidade celular inclusive diminuição dos resultados de MTT. Este segundo exemplo demonstra o potencial citotóxico do BDE-209 em células gonadais de peixes. Aqui a ressalva fica por conta novamente do tipo celular, cujo metabolismo é hormônio dependente o que pode influenciar drasticamente no padrão de resposta celular. Expondo células HepG2 por 24h e 48h ao BDE-209 na concentração de 0,5 μ M ou 5 μ M, Pereira e colaboradores (2017), mostraram que houve diminuição da viabilidade das células, observando a presença de apoptose e disfunção mitocondrial, aumento dos níveis das espécies reativas de oxigênio e fragmentação do DNA. A linhagem PC-12 (glândula adrenal de *Ratus norvegicus*) exposta ao BDE-209 por Liu e colaboradores (2017) em diferentes concentrações por 48h também apresentavam estresse oxidativo o que leva a comprometimento celular e consequentemente a viabilidade observada *in vitro* diminui. Esse comprometimento da viabilidade não foi observado em *B16-F1* e *B16-F10* após exposição ao BDE-209, apesar de neste estudo não terem sido avaliados os danos relacionados ao estresse oxidativo. Isto demonstra a necessidade de ampliar a linha de pesquisa e realizar mais estudos futuros a fim de corroborar os dados aqui apresentados bem como elucidar os possíveis mecanismos moleculares associados.

Após a análise dos nossos resultados sobre viabilidade, acreditamos que as concentrações usadas em nosso trabalho não são capazes de afetar as células, mantendo-as ativas e multiplicando-se, respondendo a exposição do BDE-209, de outras formas não perceptíveis pelos ensaios de viabilidade.

Para o ensaio do MTT, o TCDD apresentou um aumento das enzimas de metabolização na exposição crônica, dose de 0,1 nM, para a linhagem B16F10. Kim e colaboradores (2009) observaram um aumento na atividade das enzimas que reduzem o MTT em células de insulinoma de ratos quando expostas ao TCDD por apenas 6 h numa concentração de 100 nM. Corroborando com a idéia da concentração, o trabalho de Zhou e colaboradores (2017) mostra uma atenuação dessa atividade após exposição ao TCDD em concentrações de 0,01 nM, 1 nM, 5 nM e 10 nM, por 24 h. Devido aos cuidados necessários para manutenção do experimento por 15 dias e pelos tempos encontrados, acreditamos que a exposição crônica não é o motivo destes resultados apresentarem poucas variações em testes de viabilidade, e sim, que o BDE-209 e o TCDD não são citotóxicos a ponto de comprometer as células *B16-F1* e *B16-F10*.

De forma similar o TCDD não afetou as células com as concentrações usadas aqui neste trabalho. Comparando nossos resultados com outros dados na literatura, existe uma forte evidência de que essas concentrações não são tóxicas as células melanocíticas B16. O mais importante é que essas concentrações, tanto de BDE-209 e de TCDD são encontradas em amostras humanas, o que levanta a preocupação, pois elas não são citotóxicas e ainda podem potencializar as características neoplásicas das células como será apresentado nos próximos resultados aqui discutidos.

8.2 EXPOSIÇÃO AO BDE-209 E TCDD PROMOVE EM CÉLULAS B16 AUMENTO DE VIMENTINA E DIMINUIÇÃO DE E-CADERINA CARACTERIZANDO TRANSIÇÃO EPITELIO-MESENQUIMAL ESPECIALMENTE EM B16-F1

Uma das características da EMT é a diminuição da proteína e-caderina e aumento da expressão da proteína vimentina. E-caderina é uma proteína responsável pela adesão célula-célula dependente de cálcio com papel essenciais no comportamento da célula epitelial, formação de tecido e supressão do câncer (VAN ROY; BERX, 2008). A vimentina, também conhecida como filamento intermediário de fibroblasto, é o principal filamento intermediário encontrado em células não musculares. Esses tipos de células

incluem fibroblasto, células endoteliais, macrófagos, melanócitos, células de Schwann e linfócitos. *In vivo* a vimentina geralmente não está presente em células epiteliais normais, no entanto, foi observada *in vitro* em células epiteliais e também pode mostrar expressão em células tumorais de origem epitelial (ROBINSON-BENNETT; HAN, 2006).

Os resultados observados para a expressão destas duas moléculas tem a ver com a transição epitélio-mesenquimal (EMT), processo no qual células epiteliais mudam sua configuração para mesenquimais. Esse fenômeno quando ocorre pode promover desde resistência a terapia contra o câncer deixando a célula mais resistente até a metástase já que a célula também consegue alterar drasticamente o microambiente ao seu redor (GARCIA-MAYEA *et al.*, 2019).

Por se tratarem de células neoplásicas, era esperado encontrar naturalmente uma maior expressão da vimentina e uma diminuição da e-caderina. Nossos resultados corroboram o esperado e demonstraram uma diminuição acentuada da e-caderina e um aumento da vimentina em células expostas ao BDE-209, especialmente as B16-F1 nas seguintes concentrações 0,1nM e 1nM. A redução da e-caderina indica que as células estão menos aderidas umas as outras. A perda da adesão célula-células é o primeiro passo para o início do processo metastático, dado que é necessário o desprendimento de células do tumor primário para então invadir a circulação sanguínea ou linfática. Já o aumento da vimentina indica uma mudança fenotípica das células, que deixam de exibir características de células epiteliais e passam a exibir características de células de tecido conjuntivo, mais especificamente fibroblastos. A expressão de marcadores mesenquimais como a fibronectina e a vimentina indicam que estas células possuem um maior potencial migratório. (CRAENE; BERX, 2013).

Gae e colaboradores (2016) expuseram células epiteliais de palato embrionário ao TCDD e demonstraram um aumento da proliferação celular e do processo de EMT. Neste estudo, assim como no nosso, foi evidenciado um aumento da e-caderina. Estudos realizados por Imura *et al* (2010) demonstraram que a exposição a TCDD em camundongos levou à formação de fenda palatina em uma taxa elevada sendo que a etiologia envolveu a hiperproliferação e a hipermigração desordenada de células epiteliais. Desta forma, fica evidente a capacidade do TCDD em reduzir a adesão celular e induzir a proliferação e migração em células epiteliais, com um enorme potencial promotor de metastases.

No nosso estudo os efeitos do BDE-209 sobre a expressão da vimentina e da e-caderina foram similares. Song *et al* (2014), estudando células progenitoras de sistema nervoso expostas ao BDE-209 observaram uma redução da expressão da vimentina. Neste caso a redução da expressão do marcador mesenquimal se deveu a toxicidade do poluente para células do sistema nervoso. Em nosso estudo não observamos tal toxicidade, mesmo tendo utilizado doses similares, o que nos leva a concluir que diferentes tipos celulares tem diferentes sensibilidades a uma mesma dose do poluente. Qu *et al* (2015) expondo células neoplásicas de câncer de pulmão ao BDE-47, observou redução de e-caderina e aumento da vimentina, corroborando nosso achados mesmo que para outro poluente da classe dos PBDEs.

Foi observado que a redução do marcador epitelial e-caderina, acompanhado por expressão aumentada de vimentina, característico da EMT, está ocorrendo de forma acentuada nos tratamentos quando comparados as células controle, evidenciados uma perda da adesão celular acompanhada de uma modificação fenotípica que favorece a migração. Ambas alterações observadas permitem concluir que exposição ao TCDD e ao BDE-209 aumenta o potencial metastático dos melanomas por reduzir marcadores de adesão celular e aumentar a expressão de marcadores mesenquimais. A TEM está bem documentada para desempenhar um papel crítico na invasão tumoral e na metástase (CRAENE; BERX, 2013).

Esses dados mostram que as células não apresentam diminuição por exemplo, como demonstrado em nossos resultados, de suas capacidades de proliferação e de atividades bioquímicas baseadas nos ensaios de viabilidade. Porém, fenotipicamente mudam a quantidade de proteínas que estão sendo expressas, sendo essas proteínas chave para o comportamento delas no microambiente favorecendo a dispersão e invasão das células para o ambiente adjacente.

Se as células estão apresentando uma mudança de expressão de proteínas relacionada ao aumento da metástase, os resultados dos genes analisados neste trabalho permite indagar, se a exposição aos contaminantes está deixando as células mais metastáticas e ainda permite suscitar a seguinte questão: Podem as células B16-F1 após a exposição adquirirem um perfil de uma célula mais agressiva como a B16-F10?

8.3 EXPOSIÇÃO AO BDE-209 E AO TCDD AUMENTAM A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A PROGRESSÃO TUMORAL.

Estudo preliminares do nosso grupo de pesquisa demonstraram que no ensaio clonogênico, ambas linhagens aqui estudadas quando expostas ao TCDD e ao BDE-209, não apresentaram crescimento ou aumento das colônias dos grupos em relação ao controle. Esses resultados demonstram que, apesar dos contaminantes, nestas concentrações, não interferiram com a proliferação celular (ensaio do Cristal violeta), geraram algum tipo de mudança a ponto de visualmente percebermos uma mudança de ocupação no poço. As células não formavam mais colônias elas estavam mais dispersas em pequenos grupos. Se os testes de viabilidade não apresentavam mudanças significativas, nossos resultados de expressão gênica mostram uma mudança do padrão de expressão após as exposições.

A configuração apresentada pela expressão dos genes das células controle de B16-F1 e B16-F10 era esperada. Células tumorais com capacidade metastática caracterizam-se além de outros parâmetros bioquímicos pela secreção e ativação das MMPs produzidas pelas próprias células do tumor ou por células estromais, tais como fibroblastos e macrófagos. Isto porque o grande papel das metaloproteinases é a degradação da matriz extra celular, favorecendo e facilitando o processo de migração celular essencial para que ocorram as metastases. Há uma associação entre o aumento da expressão de MMPs e invasividade tumoral e o processo de metástase, já que seus inibidores (TIMPs) estão diminuídos. Células tumorais superexpressam proteases, sendo esta regulação alterada o que favorece a degradação da Matriz extracelular (MEC) (HOFMANN *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2003; ROY; YANG; MOSES, 2009; VALDIVIA *et al.*, 2011).

A invasão de células neoplásicas melanocíticas para o microambiente circundante, localmente e a uma distância do tumor primário, é facilitada pela expressão de proteases que degradam a matriz extracelular (FRANK *et al.*, 2012). Após as exposições, observamos que essas características de expressão aumentaram, apresentando um perfil de expressão bem definido com aumento das MMPs e PGK1 e diminuição dos seus inibidores e RECK.

A diminuição da expressão do gene TIMP2 após a exposição aos contaminantes, principalmente após a exposição ao BDE-209 é um dado significativo, pois representa em nossos resultados a maior diminuição em B16-F1. É um dado que merece atenção pois, de acordo com Neidhart colaboradoress (2016), TIMP2 é um inibidor

das metaloproteinases da matriz (incluindo MMP2) e reduz o potencial invasivo dessas células tumorais. Curiosamente, em nossos resultados de exposição das células B16-F1 ao BDE-209, não só diminuíram TIMP2 como aumentaram MMP2.

Ainda observando a mudança de expressão em B16-F1, a concentração de 1 nM de BDE-209, promove um aumento em MMP14. A atividade catalítica de MMP14 é necessária para promover metástases e que possivelmente seus inibidores podem ser eficazes na prevenção da disseminação do melanoma. Shaverdashvili e colaboradores (2014), usaram um modelo de melanoma murino ortotópico onde mostraram que a MMP14 é necessária para metástase e que na ausência desta MMP não ocorria tal processo. Também descrito neste trabalho, onde a MMP-2 é ativada por MMP14. A atividade catalítica de MMP14 é necessária para promover metástases e que possivelmente seus inibidores podem ser eficazes na prevenção da disseminação do melanoma.

Essa relação é observada em todas as exposições em que proporcionalmente MMP2 e MMP14 aumentam na mesma proporção nos tratamentos em relação ao controle nas duas linhagens de células utilizadas.

Tanto o BDE-209 quanto o TCDD, de acordo com os resultados, aumentam a expressão de MMP2 e MMP9, diferente do que foi apresentado por Shi e colaboradores (2015), que utilizaram o modelo murino de melanoma intraocular apresentando como resultado a inibição do crescimento do tumor no grupo de ratos tratados com b-elemene, demonstrando que diferentes poluentes são capazes de suscitar diferentes respostas moleculares. Shi et al, observaram que a expressão de MMP-2 e MMP-9 foi mais baixa em relação ao grupo controle o que claramente configura como uma ação de inibição do processo metastático, justamente o que eles queriam mostrar. Esse dado apenas corrobora com a ideia de que BDE-209 e TCDD estimulam a progressão metastática.

A proteína expressa pelo gene RECK está envolvida na modulação de MMP2, MMP9 e MMP14 (DONG *et al.*, 2010). Esse gene sofre grande mudança (*down regulation*) quando exposto ao BDE-209 em células B16-F1, no entanto, as mudanças observadas em B16-F10 são menores. Isso porque a linhagem B16F10 já possui características altamente metastáticas quando comparada a linhagem B16F1. Desta forma, nossos resultados quanto a expressão de MMP2, MMP9 e MMP14 nos levam a hipotetizar que a exposição ao BDE-209 principalmente, altera o padrão de expressão

gênica de células tumorais melanocíticas, tornando-as mais agressivas e com maior potencial metastático.

A exposição ao TCDD não provoca em células B16F1 mudanças tão significativas como as observadas após exposição ao BDE-209, porém observa-se a diminuição dos TIMPs e RECK, aumentando a diferença de expressão entre metaloproteinases e seus inibidores. Olhando rapidamente vemos que os resultados mostram uma influência maior do BDE-209 nas células B16F1 em relação a exposição do TCDD.

As células B16-F10 são consideradas mais agressivas em relação às B16-F1 por apresentarem maior taxa de proliferação e maior comportamento metastático mas são geneticamente menos estáveis que as B16-F1(OVERWIJK; RESTIFO, 2001). Por isso mesmo o seu perfil de expressão dos genes aqui estudados mostra uma maior e mais definida expressão dos genes das MMPs e PGK1 em relação aos inibidores. Após a exposição aos contaminantes as células B16-F10 apresentam variações similares as B16-F1, mas não tão marcantes, pois já possuíam elevado potencial agressivo e metastático antes mesmo da exposição ao xenobióticos. As B16-F1, especialmente nos grupos expostos a BDE-209 1nM, TCDD 0,1 nM e 1 nM, adquirem um perfil de expressão que se assemelha a B16-F10, sugerindo um avanço em seu poder metastático.

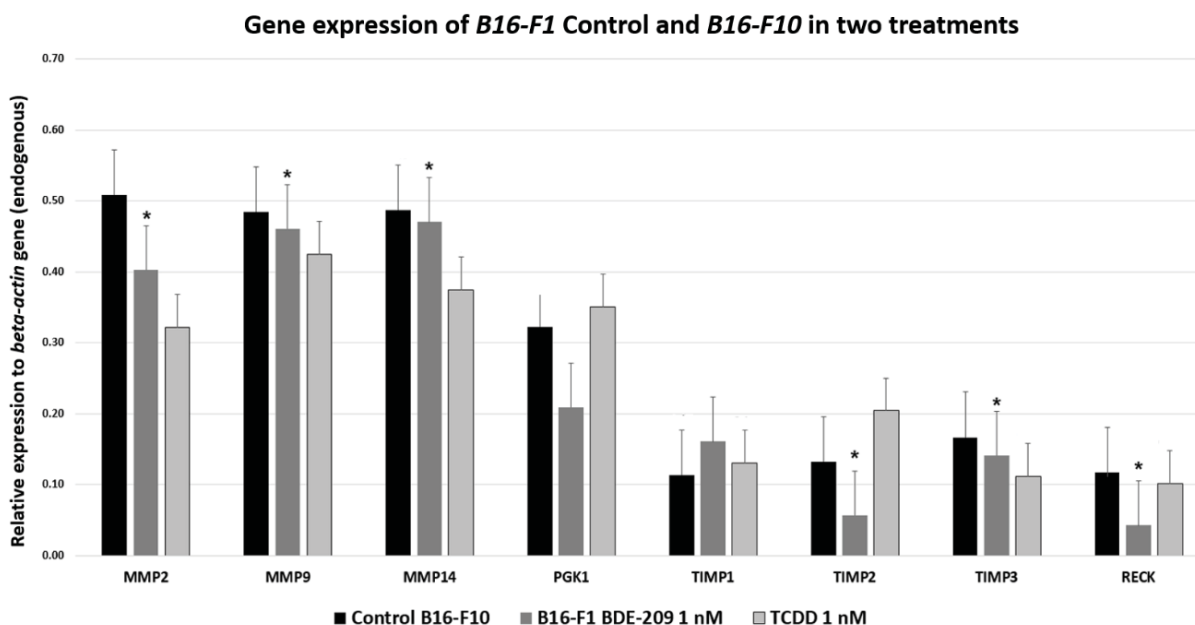
Acompanhando o observado nos testes de viabilidade e investigamos se realmente estava ocorrendo uma potencialização da capacidade metastática através da expressão de proteínas relacionadas a este comportamento a e-caderina e a vimentina. O aumento da expressão da vimentina e a redução da expressão da e-caderina corroboram estes resultados, demonstrando uma perda da adesão celular e um incremento da expressão de marcadores mesenquimais, favorecendo o processo de transição epitelio mesenquimal.

8.4 EXPOSIÇÃO AO BDE-209 E TCDD LEVA CÉLULAS B16-F1 A UMA CONFIGURAÇÃO COMPATÍVEL A DE CÉLULAS MAIS AGRESSIVAS COMO B16-F10

A Figura 14 reúne dados apresentados anteriormente nos permite comparar os perfis de expressão de células *B16-F1* expostas ao BDE-209 e ao TCDD com o perfil de célula *B16-F10* muito mais agressiva indicando que a mudança de perfil corroborando como nossa hipótese que é a de que a exposição ao BDE-209 e ao TCDD nestas

concentrações aqui estudadas, podem mudar o fenótipo de uma célula B16-F1 tornando-a mais agressiva como uma B16-F10.

FIGURA 14. NÍVEIS DE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS *B16-F1* E *B16-F10* MOSTRANDO OS PERFIS DE EXPRESSÃO DE CADA GENE PARA CÉLULAS CONTROLE E AS DE CADA TRATAMENTO.



FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: A expressão relativa (genes em relação ao endógeno Beta-Actina) após análise de 3 repetições independentes com duração de 15 dias (exposição crônica). Em destaque os níveis de expressão de *B16-F1* com alterações mais significativas quando comparadas as expressões de *B16-F10*.

Nossos resultados corroboram com os apresentados pelo nosso grupo de pesquisa, e publicados por Brito e colaboradores (2020) recentemente. Neste trabalho foram realizadas exposição de camundongos C57BL via oral de BDE-209 na concentrações de (0.08; 0.8; 8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ utilizando óleo de milho como veículo) por 45 dias e dois grupos controle um com o óleo de milho e o outro sem nenhum tratamento. Após o período de exposição, foram inoculadas células *B16-F10* via caudal nos camundongos C57BL/6. Após a inoculação inicial, os indivíduos dos cinco grupos previamente expostos ao BDE-209 receberam quatro doses adicionais de BDE-209 a cada cinco dias até o final do experimento (20 dias) para posterior coleta de órgãos para observar existência de metástases.

Brito e colaboradores (2020) demonstraram que a exposição ao BDE-209 pode aumentar a incidência de metástases no cérebro, fígado, rim e gônadas de camundongos, pois o esperado eram apenas metástases pulmonares, resultado comum neste tipo de experimento. Observaram que a exposição ao BDE-209 aumentava drasticamente a disseminação de metástases na periferia e dentro do cérebro além de, fígado, rim e gônadas. Diferente dos que encontramos na literatura em trabalhos que mostram outros tipos celulares, utilizando concentrações superiores as nossas, e células tendo sua viabilidade afetada de forma negativa, nossas concentrações mostram que as células tornam-se mais metastáticas. Esse trabalho aqui citado, utiliza concentrações compatíveis as nossas, não observando inviabilidade celular, pelo contrário, as metástases aumentaram e atingiram pontos não esperados.

Se nós estamos aqui mostrando a mudança de expressão de E-caderina e Vimentina e o aumento de genes de Metaloproteínases e a diminuição da expressão de seus inibidores, este trabalho é a prova de que nestas concentrações há a possibilidade do aumento da disseminação de células neoplásicas *in vivo* devido a exposição aos contaminantes. Da mesma forma que, nosso trabalho consegue explicar o que porquê da observação do aumento de metástases no experimento de Brito e colaboradores (2020).

8.5 ANÁLISE DE IMAGENS DA ULTRAESTRUTURA APÓS EXPOSIÇÃO AO BDE-209 0,1NM POR 24HR

Células secretam uma variedade de pequenas vesículas muitas vezes denominadas como exossomos, microvesículas, micropartículas ou nanovesículas. As microvesículas ou nanovesículas são conhecidas também por exossomas, apresentam forma esférica e tamanho variado podendo chegar a 1000 nm de diâmetro: quando o diâmetro está entre 40 e 100 nm, são denominadas nanovesículas; para diâmetros de 100 a 200 nm recebem a denominação de microvesículas ou exossomas (PANT; HILTON; BURCZYNSKI, 2011).

Exossomos são vesículas membranosas que possuem em torno de 40 a 100 nm de diâmetro de origem endocítica, liberadas por uma variedade de células para o espaço extracelular (SIMPSON; JENSEN; LIM, 2008). Como estas estruturas são derivadas de compartimento endossomal celular presume-se que o conteúdo dos exossomos seja de origem citoplasmática (PANT; HILTON; BURCZYNSKI, 2011). Independente da

classificação de acordo com o tamanho, essas estruturas apresentam uma diversidade grande quanto a sua origem, podendo ser diretamente da célula de origem ou mesmo de outras microvesículas. Apresentam também uma membrana de composição lipoproteica e podem conter ácidos nucleicos no seu interior (mRNA, miRNA, RNAs não codificados ou mesmo DNA) (KOSAKA *et al.*, 2016). Apresentam em suas membranas, proteínas transmembranas ou ancoradas, responsáveis pela fusão de membranas entre a vesícula da célula doadora e a membrana plasmática da célula receptora; além da fusão entre membranas, os exossomos podem ainda serem fagocitados pela célula receptora (WEIDLE *et al.*, 2017). Os exossomos podem transferir seu conteúdo para células vizinhas ou distantes com a preservação das suas funções moleculares (LEE *et al.*, 2012).

Segundo Tkach e Théry (2016) as vesículas extracelulares, como as denominam, são um forte mecanismo de comunicação celular a curta e longa distância. A classificação em geral deve-se à sua origem e a nomenclatura de exossomos segundo esses autores, é aplicada às vesículas acima de 200 nm de diâmetro. Segundo os mesmos autores, a fusão com a célula alvo se dá via receptores de ligação com a membrana plasmática podendo ser endocitada ou liberar seu conteúdo no citosol da célula alvo. Observa-se portanto, o essencial papel destas vesículas em processo de comunicação intercelular.

A comunicação intercelular consiste em uma característica essencial de organismos multicelulares e pode ser mediada pelo contato direto célula-célula ou através da transferência de moléculas secretadas diretamente ou entregues por meio de vesículas, os exossomos. Estas vesículas de secreção são estruturas complexas compostas por uma bicamada lipídica que contém proteínas transmembranares e engloba componentes hidrofílicos solúveis derivados do citoplasma da célula doadora. As moléculas contidas no interior destas vesículas têm sido apontadas como capazes de afetar a fisiologia das células receptoras vizinhas de diversas maneiras, a partir da indução da sinalização intracelular desencadeada após sua ligação com receptores, para conferir novas propriedades celulares adquiridas com a aquisição de outros receptores, enzimas ou mesmo material genético das VEs (THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009).

De modo geral, exossomos exercem os seus variados efeitos biológicos ativando diretamente receptores de superfície celular, através de proteínas e ligantes lipídicos bioativos, fundindo seus conteúdos na membrana plasmática da célula receptora e entregando efetores às mesmas, que incluem fatores de transcrição,

oncogenes, pequenos e grandes RNAs reguladores não codificantes (tais como miRNAs), RNAm e partículas infecciosas (RATAJCZAK et al., 2006; EL ANDALOUSSI et al., 2013; LEE et al., 2013). As moléculas sinalizadoras transferidas por meio de vesículas participam de eventos fisiológicos normais, promovendo a manutenção e plasticidade de células tronco, reparação tecidual, ativação imunológica e coagulação sanguínea, além de atuarem como complexos de sinalização multifuncionais no controle das funções celulares e biológicas essenciais (RATAJCZAK et al., 2006; GATTI et al., 2011; EL ANDALOUSSI et al., 2013). No entanto, devido a ampla gama de moléculas transportadas, não é de se surpreender que os exossomos desempenhem também um papel fundamental na patogênese de determinadas doenças entre elas o câncer (EL ANDALOUSSI et al., 2013).

Recentemente, diversos autores têm demonstrado a transmissão de moléculas por meio de exossomos de células neoplásicas, para células não neoplásicas (KAHLERT; KALLURI, 2013; WEBBER; YEUNG; CLAYTON, 2015). A transmissão de exossomos secretados por células cancerosas para outros tipos celulares representa uma sofisticada e recíproca forma de comunicação intercelular, através da qual são entregues cargas de composição complexa (KAHLERT; KALLURI, 2013; WEBBER; YEUNG; CLAYTON, 2015). Deste modo, cada vez mais evidências indicam que os exossomos derivados de células neoplásicas desempenham funções pleiotrópicas no microambiente tumoral ao atuarem como mensageiros eficientes na comunicação entre as células tumorais e estromais, promovendo o recrutamento de células inflamatórias, angiogênese e a degradação da matriz extracelular (MEC) (GUO; GUO, 2015). A descrição exossomos no melanoma iniciou-se com Sloane et al (1986), que associou a liberação de fragmentos da membrana plasmática com o aumento da capacidade metastática de células das linhagens B16 de melanoma murino [Sloane BF et al, 1986]. Contudo, os estudos sobre a atuação dessas vesículas na progressão do tumor ainda são pouco explorados. Conforme demonstrado pelo nosso trabalho, células de baixo potencial metastático como as B16F1, passam a exibir um fenótipo mais metastático conforme evidenciado pela expressão da e-caderina, vimentina e dos genes relacionados às MMPs e Às TIMPs. Além disso, evidenciamos a secreção de exossomos entre células B16F1, corroborando a hipótese de que moléculas secretas por uma célula podem estar interferindo no desenvolvimento e progressão tumoral, por meio da comunicação intercelular.

Os exossomos são secretados em grandes quantidades pelas células cancerosas em comparação com células normais. São envolvidos com a iniciação, crescimento, progressão e resistência dos tumores ao tratamento quimioterápico, pela alteração do microambiente como a transferência de proteínas oncogênicas e ácidos nucleicos. O papel dos exossomos na metástase é muito amplo e vai desde a intermediação das células tumorais com fibroblastos, células endoteliais, astrócitos e adipócitos até fatores relacionados com a imunossupressão e organotropismo. Segundo Tkach and Théry (2016), os exossomos de tumores podem diretamente modificar intrinsecamente a capacidade de mobilidade e invasividade das células do próprio tumor. Esse pode ser o mecanismo que explique talvez a alteração observada na expressão dos genes metastáticos no presente estudo que fizeram com que as células alterassem o seu fenótipo pela exposição ao BDE-209.

A comunicação célula-célula é essencial para a regulação de vários fenômenos biológicos em organismos multicelulares, incluindo o desenvolvimento e a homeostase. A desregulação dessas interações leva à comunicação célula-célula inadequada, resultando no desenvolvimento de doenças. As células cancerosas se comunicam intimamente com as células em seu microambiente, e esta comunicação promove malignidade por meio de crescimento anormal, invasão, resistência aos medicamentos e metástases. Assim compreender as interações célula-célula no câncer é essencial para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer ou o papel dos poluentes no prognóstico dessa doença. Como resultado, investigar as ferramentas de comunicação utilizadas pelas células cancerosas parece ser um caminho sem volta para a compreensão dessas interações e o próprio desenvolvimento e tratamento do câncer.

Nesse trabalho, o papel dos exossomos na compressão dos efeitos de poluentes como BDE-209 e o TCDD no desenvolvimento do câncer são incipientes, porém promissores, abrindo uma nova possibilidade de investigação para estudos futuros. No entanto, é sabido que vários aspectos relacionados ao câncer são mediados por exossomos, sendo assim propomos que focar estudos nessas informações pode representar uma nova estratégia de estudo para avaliação dos efeitos de poluentes em populações humanas.

Esses são eventos altamente complexos e baseados na interação entre uma célula tumoral e outros tipos celulares e nossos resultados, apesar de promissores, são apenas o passo inicial para o desenvolvimento de uma nova linha de pesquisa futura. No entanto, o

fato do BDE-209 induzir uma grande quantidade de exossomas nas células B16-F1 não deve ser negligenciada, e com base no exposto anteriormente, é um resultado que corrobora uma série de outros dados obtidos nesse estudo e em outros trabalhos *in vitro* e *in vivo*, recentes do nosso grupo de pesquisa. Foi observado nesse trabalho que as células menos agressivas (B16-F1) apresentam um fenótipo modulado pela presença do BDE-209 se aproximando de um comportamento de células mais agressivas como as B16-F10. Não bastasse isso, os resultados *in vivo* do trabalho de Brito *et al.*, (2020 e 2021), mostraram que o tratamento com BDE-209 leva a uma maior dispersão de nódulos tumorais em camundongos, bem como aumenta a resistência quimioterápica ao medicamento dacarbazina. É possível portanto, que a grande quantidade de exossomas liberados pelas células B16-F1 possam ser uma das explicações possíveis para entender o efeito do BDE-209 em promover aumento de metástases nos estudos *in vivo*.

9 COMENTÁRIOS FINAIS

Os cuidados e o rigor que foram tomados durante os experimentos com a manutenção do cultivo, a continuidade da exposição até os 15 dias para simular uma população de células mais homogênea, estudos em triplicata e com três experimentos independentes, estamos certos que após sucessivas exposições nas concentrações testadas, não há interferência experimental que nos leve a questionar a acurácia dos resultados apresentados. Foram realizadas nesse estudo análises *in vitro* de exposição de células B16-F1 e B16-F10 aos contaminantes BDE-209 e TCDD. O TCDD é descrito na literatura como um conhecido carcinogênico enquanto para o BDE-209 existem ainda muitas dúvidas quanto ao seu papel na modificação do fenótipo celular. Após analisar os nossos resultados, foi muito interessante perceber que o BDE-209 apresenta uma maior capacidade de modular as células tumorais da linhagem do melanoma, influenciando e potencializando seu potencial metastático conforme demonstrado pela expressão de genes relacionados à invasividade e proteínas relacionadas à transição epitélio-mesenquimal, quando comparado ao TCDD. Isso foi possível porque foram testadas as mesmas concentrações, tempos e condições experimentais para os dois poluentes. Além disso, as concentrações testadas (0,01 nM, 0,1 nM e 1 nM) não se apresentaram citotóxicas a ponto de comprometer a viabilidade das células de melanoma, o que confere robustez aos nossos resultados de mudança de fenótipo, pois são concentrações realísticas com base na detecção no plasma, leite materno de populações humanas e no alimento.

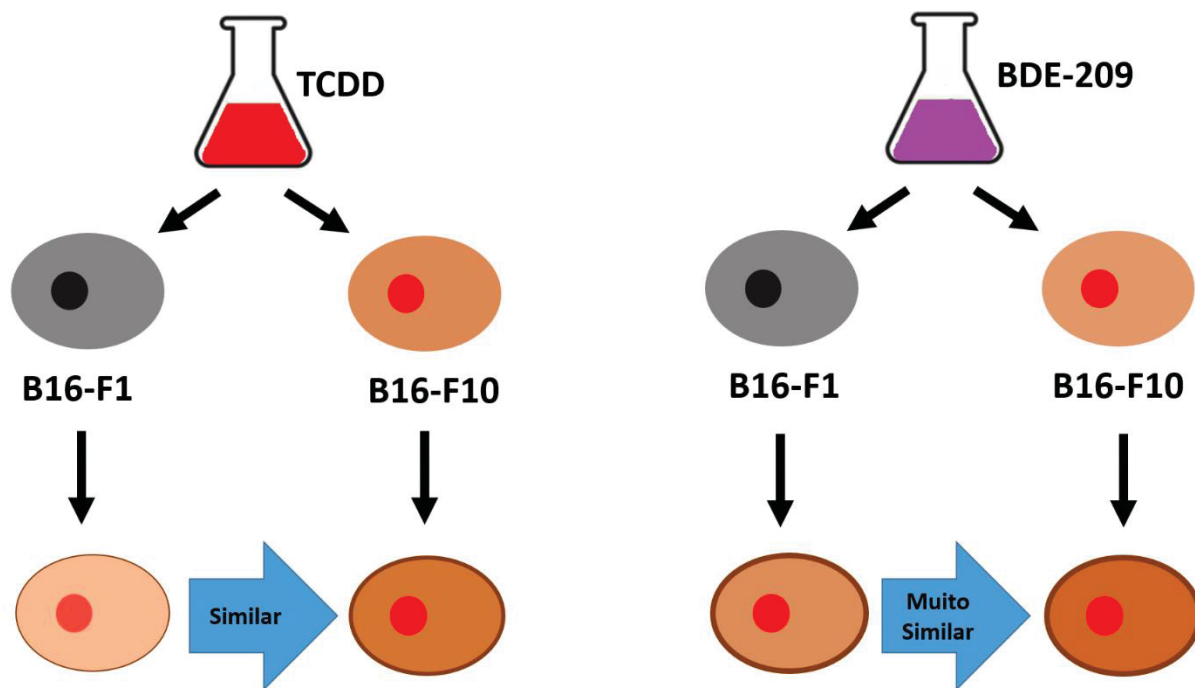
Após análise dos nossos dados e comparando com resultados já apresentados pelo grupo de Toxicologia Celular especialmente o trabalho de Brito e colaboradores (2020), fica evidente que o BDE-209 modula a mudança de fenótipo em células de melanoma murino favorecendo um maior capacidade metastática dessas células, não observado com a mesma evidência para o TCDD. Esse é um dado importante do ponto de vista toxicológico, pois demonstra que apesar do TCDD apresentar efeitos genotóxicos conhecidos, não apresenta o mesmo potencial de modulação neoplásica que o BDE-209.

Foi observado que a exposição ao BDE-209 na concentração de 1 nM levou a uma alteração no perfil de expressão de moléculas promotoras e inibidoras de progressão tumoral em células *B16-F1*, modulando o perfil de expressão de genes relacionados à capacidade invasiva, potencialmente favorecendo uma mudança de comportamento celular de uma células menos agressiv e de menor potencial metastático para uma célula mais agressiva e de maior potencial metastático. Isso se deu por dois motivos: primeiro

pela utilização das mesmas concentrações teste em ambas as linhagens e segundo porque as células *B16-F10* são naturalmente mais agressivas, funcionando nesse estudo como um “controle positivo” que pudesse confirmar a nossa hipótese.

Tais resultados são um forte indício de que células do melanoma quando expostas ao BDE-209 não sofrem nenhum efeito citotóxico, no entanto, após a exposição adquirem um perfil de expressão gênica e de proteínas que as deixam com um maior potencial metastático. O TCDD, apesar de apresentar características similares às descritas para o BDE-209, apresentou alterações rmenos acentuadas. Sendo assim, essa mudança singular aqui observada onde uma célula menos agressiva ganha características de uma mais agressiva nos leva a pensar que a exposição prolongada aos poluentes estudados, pode levar a uma progressão do melanoma, acentuando o estado da doença no caso de uma exposição de pacientes, bem como interferindo negativamente com o seu tratamento.

FIGURA 15. APÓS A EXPOSIÇÃO AOS CONTAMINANTES ESTUDADOS OCORRE UM AUMENTO DA AGRESSIVIDADE DE CÉLULAS B16-F1 E DAS B16-F10, ESPECIALMENTE APÓS A EXPOSIÇÃO AO BDE-209.



FONTE: O autor (2021).

10 CONCLUSÕES

- A exposição aguda e crônica aos contaminantes BDE-209 e TCDD nas concentrações de 0,01 nM, 0,1 nM e 1 nM não comprometem a viabilidade das células da linhagem do melanoma murino B16-F1 e B16-F10;
- A exposição ao BDE-209 induz a liberação de exossomos em células B16-F1 depois de 24 h de exposição.
- Após a exposição aos contaminantes BDE-209 e ao TCDD nas concentrações estudadas, a expressão das proteínas relacionadas à transição epitélio-mesenquimal é potencializada fazendo com que a E-caderina diminua muito sua expressão e a Vimentina aumente;
- Após a exposição aos contaminantes BDE-209 e ao TCDD nas concentrações estudadas, a expressão dos genes MMP2, MMP9, MMP14, PGK1, TIMP1, TIMP2, TIMP3 e RECK é alterada, principalmente nas células B16-F1. A alteração observada em células B16-F10 é muito pequena quando comparada as B16-F1.
- Células B16-F1 quando expostas ao TCDD nas concentrações estudadas apresentam uma mudança de expressão dos genes menor quando comparada a exposição ao BDE-209.
- Células B16-F1 quando expostas ao BDE-209 na concentração de 0,1 nM apresentam uma mudança de perfil de expressão especialmente nos genes MMP2, MMP9, MMP14 e PGK1 que aumentam sua expressão e TIMP2, TIMP3 e RECK que diminuem sua expressão criando um perfil muito similar aos das células B16-F10.
- A concentração de 0,1 nM de BDE-209 apresenta o maior poder de mudança de expressão de proteínas, genes e não diminui parâmetros de viabilidade dando a células B16-F1 características de que se tornaram mais metastáticas.

11 REFERÊNCIAS:

- ABDALLAH, M. A.; HARRAD, S. (2014). Polybrominated diphenyl ethers in UK human milk: implications for infant exposure and relationship to external exposure. *Environment international*, 63, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.009>
- ALAEI, M., ARIAS, P.; SJÖDIN, A.; BERGMAN, A.. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment International*, v. 29, n. 6, p. 683–689, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00121-1).
- ALMEIDA, F. V., CENTENO, A. J., BISINOTI, M. C., JARDIM, W. F., 2007. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. *Química Nova*, 30, 1976–1985, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000800033>.
- Assunção, J.; Pesquero, C. Dioxinas e furanos: origem e riscos. *Rev. Saúde Pública*, 33, p. 523–30, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89101999000500014>
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, GA, 1998.
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. (1990). Cells in Culture as Determined with the Neutral Red Assay. *SAGE Journals* n. 0, p. 6–8. <https://doi.org/10.1177/026119299001800116.1>
- BCRJ, B. D. C. D. R. D. J. B16F1 e B16F10. Disponível em: <<http://bcrj.org.br/celula/B16F1-Melanoma-Mouse>>.
- BESIS, A., SAMARA, C., (2012). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the indoor and outdoor environments - A review on occurrence and human exposure. *Environmental Pollution*, 169, 217–229. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.04.009>.
- Borenfreund, E., Babich, H., & Martin-Alguacil, N. (1988). Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 2(1), 1–6. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(88\)90030-6](https://doi.org/10.1016/0887-2333(88)90030-6)
- BRADFORD M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- BRAUNE, B. M., OUTRIDGE, P. M., FISK, A. T., MUIR, D. C., HELM, P. A., HOBBS, K., HOEKSTRA, P. F., KUZYK, Z. A., KWAN, M., LETCHER, R. J., LOCKHART, W. L., NORSTROM, R. J., STERN, G. A., & STIRLING, I. (2005). Persistent organic pollutants and mercury in marine biota of the Canadian Arctic: an overview of spatial and temporal trends. *The Science of the total environment*, 351-352, 4–56. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.10.034>
- BRITO, P.M, BISCAIA, S.M.P, DE SOUZA, T.L, RAMOS, A.B., LEÃO-BUCHIR J., DE ALMEIDA ROQUE A., DE LIMA BELLAN, .D, DA SILVA TRINDADE E., FILIPAK NETO, F., DE OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. (2020). Oral exposure to BDE-209 modulates metastatic spread of melanoma in C57BL/6 mice inoculated with B16-F10 cells. *Chemosphere*, 260. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127556>
- CAS. A DIVISION OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (CAS). Disponível em: <<http://www.cas.org/content/counter>>. Acesso em: 7 nov. 2017.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Implementação da Convenção de Estocolmo no Brasil, Plano nacional de Implementação (NIP), disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/centroregional/a-convencao/implementacao-da-convencao-de-estocolmo-no-brasil/> acesso em 05/01/2021
- CHEN, S. C., LIAO, T. L., WEI, Y. H., TZENG, C. R., & KAO, S. H. (2010). Endocrine disruptor, dioxin (TCDD)-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in human trophoblast-like JAR cells. *Molecular human reproduction*, 16(5), 361–372. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq004>

COLAO, A., MUSCOGIURI, G., & PISCITELLI, P. (2016). Environment and Health: Not Only Cancer. *International journal of environmental research and public health*, 13(7), 724. <https://doi.org/10.3390/ijerph13070724>

CHAFFER, C. L., SAN JUAN, B. P., LIM, E., & WEINBERG, R. A. (2016). EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer metastasis reviews*, 35(4), 645–654. <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9648-7>

CHEN, H., TANG, X., ZHOU, B., XU, N., & WANG, Y. (2016). Mechanism of Deca-BDE-induced apoptosis in Neuro-2a cells: Role of death-receptor pathway and reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Journal of environmental sciences (China)*, 46, 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.02.015>

CHEN, Y., LI, J., LIU, L., & ZHAO, N. (2012). Polybrominated diphenyl ethers fate in China: a review with an emphasis on environmental contamination levels, human exposure and regulation. *Journal of environmental management*, 113, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.08.003>

COLLINS, J. J., BUDINSKY, R. A., BURNS, C. J., LAMPARSKI, L. L., CARSON, M. L., MARTIN, G. D., & WILKEN, M. (2006). Serum dioxin levels in former chlorophenol workers. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 16(1), 76–84. <https://doi.org/10.1038/sj.jea.7500439>

COTIGNOLA, J., REVA, B., MITRA, N., ISHILL, N., CHUAI, S., PATEL, A., SHAH, S., VANDERBEEK, G., COIT, D., BUSAM, K., HALPERN, A., HOUGHTON, A., SANDER, C., BERWICK, M., & ORLOW, I. (2007). Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) polymorphisms in patients with cutaneous malignant melanoma. *BMC medical genetics*, 8, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-8-10>

COVACI, A., HARRAD, S., ABDALLAH, M. A., ALI, N., LAW, R. J., HERZKE, D., & DE WIT, C. A. (2011). Novel brominated flame retardants: a review of their analysis, environmental fate and behaviour. *Environment international*, 37(2), 532–556. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.11.007>

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

DARNERUD, P. O., ERIKSEN, G. S., JÓHANNESSON, T., LARSEN, P. B., & VILUKSELA, M. (2001). Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environmental health perspectives*, 109 Suppl 1(Suppl 1), 49–68. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s149>

DAVIS, L. E., SHALIN, S. C., & TACKETT, A. J. (2019). Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer biology & therapy*, 20(11), 1366–1379. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1640032>

INCA: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Câncer de pele melanoma [Internet] 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma#:~:text=O%20c%C3%A2ncer%20de%20pele%20melanoma,de%20manchas%2C%20pintas%20ou%20sinais>.

DI CIAULA A. (2016). Increased deaths from gastric cancer in communities living close to waste landfills. *International journal of environmental health research*, 26(3), 281–290. <https://doi.org/10.1080/09603123.2015.1109069>

Ding, W. X., & Yin, X. M. (2012). Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biological chemistry*, 393(7), 547–564. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0119>

DONG, Q., YU, D., YANG, C. M., JIANG, B., & ZHANG, H. (2010). Expression of the reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs and matrix metalloproteinase-14 in neuroblastoma and the role in tumour metastasis. *International journal of experimental pathology*, 91(4), 368–373. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2010.00724.x>

EGELAND, G. M., SWEENEY, M. H., FINGERHUT, M. A., WILLE, K. K., SCHNORR, T. M., & HALPERIN, W. E. (1994). Total serum testosterone and gonadotropins in workers exposed to dioxin.

American journal of epidemiology, 139(3), 272–281. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a116994>

ESPOSITO, M., CAVALLO, S., SERPE, F. P., D'AMBROSIO, R., GALLO, P., COLARUSSO, G., PELLICANÒ, R., BALDI, L., GUARINO, A., & SERPE, L. (2009). Levels and congener profiles of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls in cow's milk collected in Campania, Italy. *Chemosphere*, 77(9), 1212–1216. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.011>

ESPINOSA RUIZ, C., MANUGUERRA, S., CUESTA, A., SANTULLI, A., & MESSINA, C. M. (2019). Oxidative Stress, Induced by Sub-Lethal Doses of BDE 209, Promotes Energy Management and Cell Cycle Modulation in the Marine Fish Cell Line SAF-1. *International journal of environmental research and public health*, 16(3), 474. <https://doi.org/10.3390/ijerph16030474>

EUROPEAN UNION – POPs Poluentes Orgânicos Persistentes, disponível em https://ec.europa.eu/environment/archives/pops/index_en.htm, acesso em 05/01/2021

FIDLER I. J. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer research*, 35(1), 218–224.

FIDLER, M. M., BRAY, F., & SOERJOMATARAM, I. (2018). The global cancer burden and human development: A review. *Scandinavian journal of public health*, 46(1), 27–36. <https://doi.org/10.1177/1403494817715400>

FOSTER, WARREN G., MAHARAJ-BRICEÑO, SERENA, & CYR, DANIEL G. (2011). Dioxin-induced changes in epididymal sperm count and spermatogenesis. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16(6), 2893–2905. <https://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232011000600027>

FIORITO, F., IOVANE, V., MARULLO, A., COSTAGLIOLA, A., GRANATO, G. E., & DE MARTINO, L. (2017). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin influences bovine herpesvirus 1 replication through upregulation of SIRT3 and cytoskeletal reorganization. *Veterinary research communications*, 41(4), 299–306. <https://doi.org/10.1007/s11259-017-9701-1>

FOTAKIS, G., & TIMBRELL, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*, 160(2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>

FRANK, A., DAVID, V., AURELIE, T. R., FLORENT, G., WILLIAM, H., & PHILIPPE, B. (2012). Regulation of MMPs during melanoma progression: from genetic to epigenetic. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 12(7), 773–782. <https://doi.org/10.2174/187152012802650228>

FREDERIKSEN, M., THOMSEN, C., FRØSHAUG, M., VORKAMP, K., THOMSEN, M., BECHER, G., & KNUDSEN, L. E. (2010). Polybrominated diphenyl ethers in paired samples of maternal and umbilical cord blood plasma and associations with house dust in a Danish cohort. *International journal of hygiene and environmental health*, 213(4), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.04.008>

FROMME, H., HILGER, B., KOPP, E., MISEROK, M., & VÖLKEL, W. (2014). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), hexabromocyclododecane (HBCD) and "novel" brominated flame retardants in house dust in Germany. *Environment international*, 64, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.017>

FROSCIO, S. M., HUMPAGE, A. R., WICKRAMASINGHE, W., SHAW, G., & FALCONER, I. R. (2008). Interaction of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin with the eukaryotic protein synthesis system. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 51(2), 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.09.001>

FROSCIO, S. M., CANNON, E., LAU, H. M., & HUMPAGE, A. R. (2009). Limited uptake of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin by Vero cells. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 54(6), 862–868. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.019>

FUJISAWA, N., YOSHIOKA, W., YANAGISAWA, H., & TOHYAMA, C. (2018). Roles of cytosolic phospholipase A₂α in reproductive and systemic toxicities in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-exposed

mice. *Archives of toxicology*, 92(2), 789–801. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2081-z>

FURUMOTO, K., ARII, S., MORI, A., FURUYAMA, H., GORRIN RIVAS, M. J., NAKAO, T., ISOBE, N., MURATA, T., TAKAHASHI, C., NODA, M., & IMAMURA, M. (2001). RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse-inducing--cysteine-rich protein with Kazal motifs. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 33(1), 189–195. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.21048>

GAO, Z., BU, Y., ZHANG, G., LIU, X., WANG, X., DING, S., WANG, E., SHI, R., LI, Q., FU, J., & YU, Z. (2016). Effect of TCDD on the fate of epithelial cells isolated from human fetal palatal shelves (hFPECs). *Toxicology and applied pharmacology*, 305, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.06.016>

GAO, Z., BU, Y., LIU, X., WANG, X., ZHANG, G., WANG, E., DING, S., LIU, Y., SHI, R., LI, Q., FU, J., & YU, Z. (2016). TCDD promoted EMT of hFPECs via AhR, which involved the activation of EGFR/ERK signaling. *Toxicology and applied pharmacology*, 298, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.03.005>

GARCIA-MAYEA, Y., MIR, C., MUÑOZ, L., BENAVENTE, S., CASTELLVI, J., TEMPRANA, J., MAGGIO, V., LORENTE, J., PACIUCCI, R., & LLEONART, M. E. (2019). Autophagy inhibition as a promising therapeutic target for laryngeal cancer. *Carcinogenesis*, 40(12), 1525–1534. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgz080>

GASCON, M., VRIJHEID, M., MARTÍNEZ, D., FORNS, J., GRIMALT, J. O., TORRENT, M., & SUNYER, J. (2011). Effects of pre and postnatal exposure to low levels of polybromodiphenyl ethers on neurodevelopment and thyroid hormone levels at 4 years of age. *Environment international*, 37(3), 605–611. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.12.005>

GILLIES, R. J., DIDIER, N., & DENTON, M. (1986). Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical biochemistry*, 159(1), 109–113. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90314-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90314-3)

GIOVANNINI, A., RIVEZZI, G., CARIDEO, P., CECI, R., DILETTI, G., IPPOLITI, C., MIGLIORATI, G., PISCITELLI, P., RIPANI, A., SALINI, R. (2014). Dioxins levels in breast milk of women living in Caserta and Naples: Assessment of environmental risk factors. *Chemosphere*, 94, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.017>

HARDY M. L. (2002). A comparison of the properties of the major commercial PBDPO/PBDE product to those of major PBB and PCB products. *Chemosphere*, 46(5), 717–728. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(01\)00236-3](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(01)00236-3)

HE, P., WANG, A., NIU, Q., GUO, L., XIA, T., & CHEN, X. (2011). Toxic effect of PBDE-47 on thyroid development, learning, and memory, and the interaction between PBDE-47 and PCB153 that enhances toxicity in rats. *Toxicology and industrial health*, 27(3), 279–288. <https://doi.org/10.1177/0748233710387002>

HE, W., HE, P., WANG, A., XIA, T., XU, B., & CHEN, X. (2008). Effects of PBDE-47 on cytotoxicity and genotoxicity in human neuroblastoma cells in vitro. *Mutation research*, 649(1-2), 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.08.001>

HOFFMAN, K., LORENZO, A., BUTT, C. M., HAMMEL, S. C., HENDERSON, B. B., ROMAN, S. A., SCHERI, R. P., STAPLETON, H. M., & SOSA, J. A. (2017). Exposure to flame retardant chemicals and occurrence and severity of papillary thyroid cancer: A case-control study. *Environment international*, 107, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.06.021>

HOFMANN, U. B., WESTPHAL, J. R., ZENDMAN, A. J., BECKER, J. C., RUITER, D. J., & VAN MUIJEN, G. N. (2000). Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. *The Journal of pathology*, 191(3), 245–256. [https://doi.org/10.1002/1096-9896\(2000\)9999:9999<::AID-PATH632>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH632>3.0.CO;2-#)

HOOPER, K., & MCDONALD, T. A. (2000). The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs. *Environmental health perspectives*, 108(5), 387–392. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108387>

HORRI, K., ALFONSO, S., COUSIN, X., MUNSCHY, C., LOIZEAU, V., AROUA, S., BÉGOUT, M. L., & ERNANDE, B. (2018). Fish life-history traits are affected after chronic dietary exposure to an environmentally realistic marine mixture of PCBs and PBDEs. *The Science of the total environment*, 610-611, 531–545. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.083>

HOU, Y., FU, J., SUN, S., JIN, Y., WANG, X., & ZHANG, L. (2019). BDE-209 induces autophagy and apoptosis via IRE1 α /Akt/mTOR signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 253, 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.030>

HU, G., XU, G., DAI, J., MAI, B., CAO, H., WANG, J., SHI, J., XU, M. (2010). Distribution of polybrominated diphenyl ethers and decabromodiphenylethane in surface sediments from Fuhe River and Baiyangdian Lake, North China. *Journal of Environmental Sciences*, 22 (12)12, 833–1839. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60328-4](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60328-4).

HU, X. Z., XU, Y., HU, D. C., HUI, Y., & YANG, F. X. (2007). Apoptosis induction on human hepatoma cells Hep G2 of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209). *Toxicology letters*, 171(1-2), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.04.002>

HUMPAGE, A. R., FONTAINE, F., FROSCIO, S., BURCHAM, P., & FALCONER, I. R. (2005). Cyindrospermopsin genotoxicity and cytotoxicity: role of cytochrome P-450 and oxidative stress. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 68(9), 739–753. <https://doi.org/10.1080/15287390590925465>

HUNTLEY G. W. (2012). SYNAPTIC CIRCUIT REMODELLING BY MATRIX METALLOPROTEINASES IN HEALTH AND DISEASE. *NATURE REVIEWS. Neuroscience*, 13(11), 743–757. <https://doi.org/10.1038/nrn3320>

IRIGARAY, P., NEWBY, J. A., CLAPP, R., HARDELL, L., HOWARD, V., MONTAGNIER, L., EPSTEIN, S., & BEMPOMME, D. (2007). Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 61(10), 640–658. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2007.10.006>

JIN, S., YANG, F., HUI, Y., XU, Y., LU, Y., & LIU, J. (2010). Cytotoxicity and apoptosis induction on RTG-2 cells of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) and decabrominated diphenyl ether (BDE-209). *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 24(4), 1190–1196. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.02.012>

JUNG, Y., SHIOZAWA, Y., WANG, J., WANG, J., WANG, Z., PEDERSEN, E. A., LEE, C. H., HALL, C. L., HOGG, P. J., KREBSBACH, P. H., KELLER, E. T., & TAICHMAN, R. S. (2009). Expression of PGK1 by prostate cancer cells induces bone formation. *Molecular cancer research : MCR*, 7(10), 1595–1604. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0072>

KIM, Y. H., SHIM, Y. J., SHIN, Y. J., SUL, D., LEE, E., & MIN, B. H. (2009). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces calcium influx through T-type calcium channel and enhances lysosomal exocytosis and insulin secretion in INS-1 cells. *International journal of toxicology*, 28(3), 151–161. <https://doi.org/10.1177/1091581809336885>

KORASHY, H. M., & EL-KADI, A. O. (2008). Modulation of TCDD-mediated induction of cytochrome P450 1A1 by mercury, lead, and copper in human HepG2 cell line. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 22(1), 154–158. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.08.003>

KOSAKA N. (2016). Decoding the Secret of Cancer by Means of Extracellular Vesicles. *Journal of clinical medicine*, 5(2), 22. <https://doi.org/10.3390/jcm5020022>

- KOVALOVA, N., NAULT, R., CRAWFORD, R., ZACHAREWSKI, T. R., & KAMINSKI, N. E. (2017). Comparative analysis of TCDD-induced AhR-mediated gene expression in human, mouse and rat primary B cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 316, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.11.009>
- KIERKEGAARD, A., SELLSTRÖM, U., & MCLACHLAN, M. S. (2009). Environmental analysis of higher brominated diphenyl ethers and decabromodiphenyl ethane. *Journal of chromatography. A*, 1216(3), 364–375. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.058>
- KUNISUE, T., TAKAYANAGI, N., ISOBE, T., TAKAHASHI, S., NOSE, M., YAMADA, T., KOMORI, H., ARITA, N., UEDA, N., & TANABE, S. (2007). Polybrominated diphenyl ethers and persistent organochlorines in Japanese human adipose tissues. *Environment international*, 33(8), 1048–1056. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.06.006>
- LA MERRILL, M., EMOND, C., KIM, M. J., ANTIGNAC, J. P., LE BIZEC, B., CLÉMENT, K., BIRNBAUM, L. S., & BAROUKI, R. (2013). Toxicological function of adipose tissue: focus on persistent organic pollutants. *Environmental health perspectives*, 121(2), 162–169. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205485>
- LEE, H. S., MIAU, L. H., CHEN, C. H., CHIOU, L. L., HUANG, G. T., YANG, P. M., & SHEU, J. C. (2003). Differential role of p38 in IL-1alpha induction of MMP-9 and MMP-13 in an established liver myofibroblast cell line. *Journal of biomedical science*, 10(6 Pt 2), 757–765. <https://doi.org/10.1159/000073963>
- LEE, Y., EL ANDALOUSSI, S., & WOOD, M. J. (2012). Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Human molecular genetics*, 21(R1), R125–R134. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd317>
- LEONEL, J., SERICANO, J. L., SECCHI, E. R., BERTOZZI, C., FILLMANN, G., & MONTONE, R. C. (2014). PBDE levels in franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*): temporal trend and geographical comparison. *The Science of the total environment*, 493, 405–410. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.003>
- LEONETTI, C., BUTT, C. M., HOFFMAN, K., HAMMEL, S. C., MIRANDA, M. L., & STAPLETON, H. M. (2016). Brominated flame retardants in placental tissues: associations with infant sex and thyroid hormone endpoints. *Environmental health : a global access science source*, 15(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0199-8>
- LI, Z. H., LIU, X. Y., WANG, N., CHEN, J. S., CHEN, Y. H., HUANG, J. T., SU, C. H., XIE, F., YU, B., & CHEN, D. J. (2012). Effects of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in regulation of growth and apoptosis of breast, ovarian, and cervical cancer cells. *Environmental health perspectives*, 120(4), 541–546. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104051>
- LIEBEL, S., DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., DE MAGALHÃES, V. F., DA SILVA, R., ROSSI, S. C., RANDI, M. A., & FILIPAK NETO, F. (2015). LOW CONCENTRATIONS OF CYLINDROSPERMOPIN INDUCE INCREASES OF REACTIVE OXYGEN SPECIES LEVELS, METABOLISM and proliferation in human hepatoma cells (HepG2). *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 29(3), 479–488. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.12.022>
- LIN, S. M., CHEN, F. A., HUANG, Y. F., HSING, L. L., CHEN, L. L., WU, L. S., LIU, T. S., CHEN, K. C., CHAO, H. R. (2011) Negative associations between PBDE levels and thyroid hormones in cord blood. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214 (2), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.10.002>
- LIU, Q., WANG, K., SHAO, J., LI, C., LI, Y., LI, S., LIU, X., & HAN, L. (2017). Role of Taurine in BDE 209-Induced Oxidative Stress in PC12 Cells. *Advances in experimental medicine and biology*, 975 Pt 2, 897–906. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1079-2_71
- MACHANA, S., WEERAPREEYAKUL, N., BARUSRUX, S., NONPUNYA, A., SRIPANIDKULCHAI, B., & THITIMETHAROCH, T. (2011). Cytotoxic and apoptotic effects of six herbal plants against the human hepatocarcinoma (HepG2) cell line. *Chinese medicine*, 6(1), 39. <https://doi.org/10.1186/1749-8546->

- MANNETJE, A., ENG, A., WALLS, C., DRYSON, E., DOUWES, J., BERTAZZI, P., RYDER-LEWIS, S., SCOTT, D., BROOKS, C., MCLEAN, D., CHENG, S., & PEARCE, N. (2018). Morbidity in New Zealand pesticide producers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Environment international*, 110, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.09.018>
- MANUGUERRA, S., ESPINOSA RUIZ, C., SANTULLI, A., & MESSINA, C. M. (2019). Sub-lethal Doses of Polybrominated Diphenyl Ethers, in Vitro, Promote Oxidative Stress and Modulate Molecular Markers Related to Cell Cycle, Antioxidant Balance and Cellular Energy Management. *International journal of environmental research and public health*, 16(4), 588. <https://doi.org/10.3390/ijerph16040588>
- MARANGHI, F., TASSINARI, R., MORACCI, G., ALTIERI, I., RASINGER, J. D., CARROLL, T. S., HOGSTRAND, C., LUNDEBYE, A. K., & MANTOVANI, A. (2013). Dietary exposure of juvenile female mice to polyhalogenated seafood contaminants (HBCD, BDE-47, PCB-153, TCDD): comparative assessment of effects in potential target tissues. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 56, 443–449. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.056>
- MARINKOVIĆ, N., PAŠALIĆ, D., FERENČAK, G., GRŠKOVIĆ, B., & STAVLJENIĆ RUKAVINA, A. (2010). Dioxins and human toxicity. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 61(4), 445–453. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-61-2010-2024>
- MARUSAK, C., BAYLES, I., MA, J., GOOYIT, M., GAO, M., CHANG, M., & BEDOGNI, B. (2016). The thiirane-based selective MT1-MMP/MMP2 inhibitor ND-322 reduces melanoma tumor growth and delays metastatic dissemination. *Pharmacological research*, 113(Pt A), 515–520. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.09.033>
- MAZDAI, A., DODDER, N. G., ABERNATHY, M. P., HITES, R. A., & BIGSBY, R. M. (2003). Polybrominated diphenyl ethers in maternal and fetal blood samples. *Environmental health perspectives*, 111(9), 1249–1252. <https://doi.org/10.1289/ehp.6146>
- MCDONALD T. A. (2002). A perspective on the potential health risks of PBDEs. *Chemosphere*, 46(5), 745–755. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(01\)00239-9](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(01)00239-9)
- MCGUINN, L. A., GHAZARIAN, A. A., ELLISON, G. L., HARVEY, C. E., KAEFER, C. M., & REID, B. C. (2012). Cancer and environment: definitions and misconceptions. *Environmental research*, 112, 230–234. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.10.009>
- MESQUITA, L. G., DINIZ, S. F., QUEIROZ, F. T. H. DE, SOUZA, L. A. DE M. E, PAVANI, T. A. E S., SANT'ANNA, L. B., PÉREZ, M. DE A., PÉREZ, L. K., & TAVARES, C. P. (2020). Câncer de Pele e Renda Familiar: um Estudo Ecológico. *Revista Brasileira De cancerologia*, 66(4), e-07949. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2020v66n4.949>
- MOHANKUMAR, K., HARIHARAN, V., & RAO, N. P. (2016). Heavy Metal Contamination in Groundwater around Industrial Estate vs Residential Areas in Coimbatore, India. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(4), BC05–BC7. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/15943.7527>
- MOSMANN T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- MUNSHI A., HOBBS M., MEYN R.E. (2005) Clonogenic Cell Survival Assay. In: Blumenthal R.D. (eds) Chemosensitivity. *Methods in Molecular Medicine*, vol 110. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-869-2:021>
- NASCIMENTO, C., & CRUZ, M. (2017). RESÍDUOS INDUSTRIAIS E A INVISIBILIDADE DE SEUS RISCOS SOCIOAMBIENTAIS. *Revista da ANPEGE*, 11(15), 257-279. [doi:https://doi.org/10.5418/RA2015.1115.0010](https://doi.org/10.5418/RA2015.1115.0010)
- NAKAMURA, K., YOSHIKAWA, N., YAMAGUCHI, Y., KAGOTA, S., SHINOZUKA, K., &

KUNITOMO, M. (2002). Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life sciences*, 70(7), 791–798. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(01\)01454-0](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(01)01454-0)

NEIDHART, B., KOWALSKA, M., VALENTIN, J., GALL, F. M., REN, Q., RIEDL, R., POT, S., & ROTTMAR, M. (2021). Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) Peptidomimetic as an Adjunctive Therapy for Infectious Keratitis. *Biomacromolecules*, 22(2), 629–639. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01473>

NEUMANN, C., BAIN, P., & SHAW, G. (2007). Studies of the comparative in vitro toxicology of the cyanobacterial metabolite deoxycylindrospermopsin. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 70(19), 1679–1686. <https://doi.org/10.1080/15287390701434869>

Nunes, H. C. (2018). Potencial de diferenciação de células-tronco mesenquimais tecido adiposo humanas expostas ao 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) e bisfenol A (BPA) / Helga Caputo Nunes. - Botucatu, São Paulo, Brazil.

OVERWIJK, W. W., & RESTIFO, N. P. (2001). B16 as a mouse model for human melanoma. *Current protocols in immunology, Chapter 20*, Unit–20.1. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2001s39>

Pereira, L. C., Souza, A. O., Tasso, M. J., Oliveira, A. M. C., Duarte, F. V., Palmeira, C. M., & Dorta, D. J. (2017). Exposure to decabromodiphenyl ether (BDE-209) produces mitochondrial dysfunction in rat liver and cell death. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 80(19-21), 1129–1144. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1357370>

PESATORI, A. C., CONSONNI, D., RUBAGOTTI, M., GRILLO, P., & BERTAZZI, P. A. (2009). Cancer incidence in the population exposed to dioxin after the "Seveso accident": twenty years of follow-up. *Environmental health : a global access science source*, 8, 39. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-8-39>

PITTAYAPRUEK, P., MEEPHANSAN, J., PRAPAPAN, O., KOMINE, M., & OHTSUKI, M. (2016). Role of Matrix Metalloproteinases in Photoaging and Photocarcinogenesis. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 868. <https://doi.org/10.3390/ijms17060868>

PULKRABOVA, J., STUPAK, M., SVARCOVA, A., ROSSNER, P., ROSSNEROVA, A., AMBROZ, A., SRAM, R., & HAJŠLOVA, J. (2016). Relationship between atmospheric pollution in the residential area and concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human breast milk. *The Science of the total environment*, 562, 640–647. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.013>

RANJAN, A., & KALRAIYA, R. D. (2014). Invasive potential of melanoma cells correlates with the expression of MT1-MMP and regulated by modulating its association with motility receptors via N-glycosylation on the receptors. *BioMed research international*, 2014, 804680. <https://doi.org/10.1155/2014/804680>

REILLY, T. P., BELLEVUE, F. H., 3RD, WOSTER, P. M., & SVENSSON, C. K. (1998). Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. *Biochemical pharmacology*, 55(6), 803–810. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(97\)00547-9](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(97)00547-9)

REY, M. C., BONAMIGO, R. R., CARTELL, A., FURIAN, R., BONFÁ, R., & BONFÁ, R. (2011). MMP-2 and TIMP-2 in cutaneous melanoma: association with prognostic factors and description in cutaneous metastases. *The American Journal of dermatopathology*, 33(4), 413–414. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e3181e2e8d6>

RHIM, A. D., MIREK, E. T., AIELLO, N. M., MAITRA, A., BAILEY, J. M., MCALLISTER, F., REICHERT, M., BEATTY, G. L., RUSTGI, A. K., VONDERHEIDE, R. H., LEACH, S. D., & STANGER, B. Z. (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*, 148(1-2), 349–361. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.025>

RIGÉT, F., VORKAMP, K., BOSSI, R., SONNE, C., LETCHER, R. J., & DIETZ, R. (2016). Twenty years of monitoring of persistent organic pollutants in Greenland biota. A review. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 217, 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.006>

ROBINSON, B. B.; HAN, A. (2006). Role of Immunohistochemistry in Elucidating Lung Cancer Metastatic to the Ovary from Primary Ovarian Carcinoma, in Hayat, M. A. Handbook of Immunohistochemistry and in Situ Hybridization of Human Carcinomas (4) 537-545, [https://doi.org/10.1016/S1874-5784\(05\)80116-3](https://doi.org/10.1016/S1874-5784(05)80116-3).

ROY, R., YANG, J., & MOSES, M. A. (2009). Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(31), 5287–5297. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.5556>

SANABRIA, M. (2014) TOXICOLOGIA REPRODUTIVA DE RATOS ADULTOS EXPOSTOS AO 2,3,7,8-TETRACLORODIBENZO-P-DIOXINA (TCDD) In útero – Botucatu, São Paulo, Brazil.

SALGADO, Y. C., BOIA FERREIRA, M., ZABLOCKI DA LUZ, J., FILIPAK NETO, F., & OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. (2018). Tribromophenol affects the metabolism, proliferation, migration and multidrug resistance transporters activity of murine melanoma cells B16F1. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 50, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.02.005>

SBARDELLA D, FASCIGLIONE GF, GIOIA M, CIACCIO C, TUNDO GR, MARINI S, COLETTA M. Human matrix metalloproteinases: an ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. *Mol Aspects Med.* 2012 Apr;33(2):119-208. doi: 10.1016/j.mam.2011.10.015. Epub 2012 Nov 10. PMID: 22100792.

SHAVERDASHVILI, K., WONG, P., MA, J., ZHANG, K., OSMAN, I., & BEDOGNI, B. (2014). MT1-MMP modulates melanoma cell dissemination and metastasis through activation of MMP2 and RAC1. *Pigment cell & melanoma research*, 27(2), 287–296. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12201>

SHI, H., LIU, L., LIU, L., GENG, J., ZHOU, Y., & CHEN, L. (2014). β -Elemene inhibits the metastasis of B16F10 melanoma cells by downregulation of the expression of uPA, uPAR, MMP-2, and MMP-9. *Melanoma research*, 24(2), 99–107. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000043>

STEINDOR, K. A., FRANIEL, I. J., BIERZA, W. M., PAWLAK, B., & PALOWSKI, B. F. (2016). ASSESSMENT OF HEAVY METAL POLLUTION IN SURFACE SOILS AND PLANT MATERIAL IN THE POST-INDUSTRIAL CITY Of Katowice, Poland. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 51(5), 371–379. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.1120509>

TKACH, M., & THÉRY, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell*, 164(6), 1226–1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>

VALDIVIA, A., PERALTA, R., MATUTE-GONZÁLEZ, M., GARCÍA CEBADA, J. M., CASASOLA, I., JIMÉNEZ-MEDRANO, C., AGUADO-PÉREZ, R., VILLEGAS, V., GONZÁLEZ-BONILLA, C., MANUEL-APOLINAR, L., IBÁÑEZ, M., & SALCEDO, M. (2011). Co-expression of metalloproteinases 11 and 12 in cervical scrapes cells from cervical precursor lesions. *International journal of clinical and experimental pathology*, 4(7), 674–682. PMID: PMC3209608

VAN DEN BERG, M., REMKO, L., HEATHER, C., ROCIO, T., CATHRINE, B., GEORG, A.P., MAR, D., JORDI, S., B, B.J. (2017). Serum levels of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in women from different European countries and possible relationships with lifestyle and diet. *Environment International*. 107. 16-24. [10.1016/j.envint.2017.06.014](https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.06.014).

Van Roy, F., & Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65(23), 3756–3788. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8281-1>

WANG, Y., JIANG, G., LAM, P. K., & LI, A. (2007). Polybrominated diphenyl ether in the East Asian environment: a critical review. *Environment international*, 33(7), 963–973. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.03.016>

WANG, Y., WANG, Q., WU, B., LI, Y., & LU, G. (2013). Correlation between TCDD acute toxicity and aryl hydrocarbon receptor structure for different mammals. *Ecotoxicology and environmental safety*, 89, 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.016>

WANG, Y., SHAORUI W., YUE, X., CHUNLING, L., JUN, L., GAN, Z. (2015) Characterization of the exchange of PBDEs in a subtropical paddy field of China: A significant inputs of PBDEs via air-foilage exchange. *Environmental Pollution*, 205, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.05.016>.

WHO (World Health Organization), 2020. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs225/en/>, accessed on November 4, 2020.

WRAY, A., & MINAKER, L. M. (2019). Is cancer prevention influenced by the built environment? A multidisciplinary scoping review. *Cancer*, 125(19), 3299–3311. <https://doi.org/10.1002/cncr.32376>

WU, N., HERRMANN, T., PAEPKE, O., TICKNER, J., HALE, R., HARVEY, L. E., LA GUARDIA, M., MCCLEAN, M. D., & WEBSTER, T. F. (2007). Human exposure to PBDEs: associations of PBDE body burdens with food consumption and house dust concentrations. *Environmental science & technology*, 41(5), 1584–1589. <https://doi.org/10.1021/es0620282>

WU, Z., XIE, M., LI, Y., GAO, G., BARTLAM, M., & WANG, Y. (2018). Biodegradation of decabromodiphenyl ether (BDE 209) by a newly isolated bacterium from an e-waste recycling area. *AMB Express*, 8(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0560-0>

XU, P., LOU, X., DING, G., SHEN, H., WU, L., CHEN, Z., HAN, J., & WANG, X. (2015). Effects of PCBs and PBDEs on thyroid hormone, lymphocyte proliferation, hematology and kidney injury markers in residents of an e-waste dismantling area in Zhejiang, China. *The Science of the total environment*, 536, 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.025>

XU, T., XIE, H. Q., LI, Y., XIA, Y., SHA, R., WANG, L., CHEN, Y., XU, L., & ZHAO, B. (2018). Dioxin induces expression of hsa-miR-146b-5p in human neuroblastoma cells. *Journal of environmental sciences (China)*, 63, 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.06.038>

YADAV, L., PURI, N., RASTOGI, V., SATPUTE, P., AHMAD, R., & KAUR, G. (2014). Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 15(3), 1085–1091. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.3.1085>

YANG, S. C., WU, C. H., TU, Y. K., HUANG, S. Y., & CHOU, P. C. (2018). Exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases the activation of aryl hydrocarbon receptor and is associated with the aggressiveness of osteosarcoma MG-63 osteoblast-like cells. *Oncology letters*, 16(3), 3849–3857. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9098>

YILMAZ, M., & CHRISTOFORI, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer metastasis reviews*, 28(1-2), 15–33. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9169-0>

YOSHIOKA, W., PETERSON, R. E., & TOHYAMA, C. (2011). Molecular targets that link dioxin exposure to toxicity phenotypes. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 127(1-2), 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.12.005>

YU, L., HAN, Z., & LIU, C. (2015). A review on the effects of PBDEs on thyroid and reproduction systems in fish. *General and comparative endocrinology*, 219, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.12.010>

ZHANG, C., LIU, X., & CHEN, D. (2010). Role of brominated diphenyl ether-209 in the differentiation of neural stem cells in vitro. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 28(6), 497–502. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2010.06.002>

ZHANG, Y., YU, G., CHU, H., WANG, X., XIONG, L., CAI, G., LIU, R., GAO, H., TAO, B., LI, W., LI, G., LIANG, J., & YANG, W. (2018). Macrophage-Associated PGK1 Phosphorylation Promotes Aerobic Glycolysis and Tumorigenesis. *Molecular cell*, 71(2), 201–215.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.023>

ZHANG, M.; BUEKENS, A.; LI, X. Brominated flame retardants and the formation of dioxins and furans in fires and combustion. *Journal of Hazardous Materials*, v. 304, p. 26–39, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.10.014>

ZHI, H., YUAN, N., WU, J. P., LU, L. M., CHEN, X. Y., WU, S. K., & MAI, B. X. (2019). MicroRNA-21 attenuates BDE-209-induced lipid accumulation in THP-1 macrophages by downregulating Toll-like receptor 4 expression. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 125, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.044>

ZHOU, T., ROSS, D. G., DEVITO, M. J., & CROFTON, K. M. (2001). Effects of short-term in vivo exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 61(1), 76–82. <https://doi.org/10.1093/toxsci/61.1.76>

ZHOU, B., WANG, X., LI, F., WANG, Y., YANG, L., ZHEN, X., & TAN, W. (2017). Mitochondrial activity and oxidative stress functions are influenced by the activation of AhR-induced CYP1A1 overexpression in cardiomyocytes. *Molecular medicine reports*, 16(1), 174–180. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6580>

ZURAC, S., NEAGU, M., CONSTANTIN, C., CIOPLEA, M., NEDELCU, R., BASTIAN, A., POPP, C., NICHITA, L., ANDREI, R., TEBEICA, T., TANASE, C., CHITU, V., CARUNTU, C., GHITA, M., POPESCU, C., BODA, D., MASTALIER, B., MARU, N., DAHA, C., ANDREESCU, B., TSATSAKIS, A. M. (2016). Variations in the expression of TIMP1, TIMP2 and TIMP3 in cutaneous melanoma with regression and their possible function as prognostic predictors. *Oncology letters*, 11(5), 3354–3360. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4391>