UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-USP

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Alecsandra Oliveira de Souza

Avaliação das alterações celulares em linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2) induzidas pelos principais representantes da classe de éteres difenílicos polibromados (PBDE)

Dissertação apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Ribeirão Preto-SP
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-USP

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Alecsandra Oliveira de Souza

Avaliação das alterações celulares em linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2) induzidas pelos principais representantes da classe de éteres difenílicos polibromados (PBDE)

Dissertação apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área: **Química.**
Orientador: Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta

Ribeirão Preto-SP
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE.

Souza, Alecsandra Oliveira de

Avaliação das alterações celulares em linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2) induzidas pelos principais representantes da classe de éteres difenílicos polibromados (PBDE)

100 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia,

Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química

Orientador: Dorta, Daniel Junqueira

1. PBDE. 2. Contaminantes Emergentes. 3. Células HepG2

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alecsandra Oliveira de Souza

Avaliação das alterações celulares em linhagem de hepatocarcinoma humano (HepG2) induzidas pelos principais representantes da classe de éteres difenílicos polibromados (PBDE)

Dissertação apresentada a Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química
Orientador: Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta

Aprovado em:____/ ____/ ____

Banca examinadora

Profº(a) Drº (a)_____

Instituição_____Assinatura_____

Profº(a)Drº(a)._____

Instituição_____Assinatura_____

Profº (a) Drº (a)._____

Instituição_____Assinatura_____

Dedicatória

*Dedico este trabalho a minha grande amiga, **Elise Marques Freire Cunha,** que embora não seja tão grande em tamanho, possui um coração repleto de gestos e atitudes de uma verdadeira gigante.*

Muitas pessoas contribuíram para esta realização, mas você foi a primeira e a principal idealizadora de tudo.

Obrigada pelas inúmeras vezes que pude me apoiar em seu ombro para continuar seguindo. Obrigada pela amizade de tantos anos; pelo apoio no início desta etapa e principalmente por acreditar em mim quando nem eu acreditava.

Ao subirmos ladeiras eu costumo te empurrar para que você caminhe mais rápido. E agora, se eu estou subindo mais um degrau nessa jornada é por que você deu o empurrão inicial.

"Se enxerguei mais longe foi por que me apoiei nos ombros de gigantes."

Issac Newton

Dedicatória

*Ao meu filhotinho persa, **Beijamim**. Apesar de ser apenas um felino, foi o melhor companheirinho durante as longas noites de preparação para o Mestrado.*

E embora, eu não o veja novamente, o meu peito se enche de alegria ao lembrar suas travessuras e, infelizmente, meus olhos transbordam de lágrimas ao saber que nem pude me despedir, escovar seus pêlos ou coçar sua barriguinha pela última vez.

Mas, me conforta imaginar que ainda possam existir pessoas capazes de te amar e te dar a proteção que eu não pude. Que São Francisco de Assis, protetor dos animais, tenha te guiado em segurança até ao encontro de um novo lar.

"A vida é valor absoluto. Não existe vida menor ou maior, inferior ou superior. Engana-se quem mata ou subjuga um animal por julgá-lo um ser inferior. Diante da consciência que abriga a essência da vida, o crime é o mesmo."

(Olympia Salete)

Agradecimento Especial

Ao meu Orientador ***Daniel Junqueira Dorta,*** *pela amizade, apoio, confiança e pelas inúmeras oportunidades de crescimento e amadurecimento profissional, compartilhadas ao longo deste trabalho.*

E, principalmente, por me ensinar a ser responsável sem nunca perder a essência e a alegria da juventude.

Agradecimentos

À Deus por tudo que me proporciona nesta passagem terrena e pelas amizades que ele pôs em meu caminho.

Aos novos e grandes amigos adquiridos ao longo desta jornada: Ana Paula, Camila, Rafael, Renato, Bruno, Bárbara e Vivian por me acolherem com tanto carinho e por compartilharem comigo boas gargalhadas.

Meu agradecimento especial ao ***Malson Neilson de Lucena****, por me acolher com tanto carinho, pelos inúmeros conselhos e apoio científico nas horas de apuros, por compartilhar bons momentos no Bandejão, por ser cuidadoso, ciumento e acima de tudo, pela prontidão e mão erguida sempre que eu precisei.*

À ***Mariana Costa Nascimento,*** *pelo carinho, amizade e paciência com minhas bobagens e pela cumplicidade nos sorvetes a caminho do Centro Espírita.*

Que nosso vínculo de amizade se fortaleça com o tempo e nos torne realmente uma grande família.

"Bons Amigos são a família que Deus nos permitiu escolher"

William Shakespeare

Ao casal de amigos Jamile e Roger pelo apoio pessoal e profissional.

Ao programa de moradia estudantil do campus da USP de Ribeirão Preto pela oportunidade de instalação durante a pesquisa

As poucas, mais ótimas amizades adquiridas na casa 13 Nicole, Flavia e Iracema pela oportunidade de amadurecimento diante a convivência e respeito às nossas diferenças.

A alteza do reino das Cotinhas, Letícia Cota, pela imensa disposição em ajudar e acabar sempre atrapalhando tudo, mais o que vale é a boa vontade.

Aos Colegas do programa de pós-graduação em Química e a secretaria do Departamento de Química da FFCLRP pelo convívio, disponibilidade e atenção.

A Profª. Drª. Danielle Palma de Oliveira pelo apoio no desenvolvimento da etapa experimental deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Ambiental, Gisele, Thalita, Eloísa, Gabriela, Elisa e Farah, pela disposição e cumplicidade nas experiências trocadas no convívio do laboratório.

Ao técnico Klaus pelo apoio em socorrer sempre que surgia um problema técnico nos experimentos.

A irmã de PBDE e Orientador, Lilian Cristina, pelo apoio incondicional nas experiências convividas na busca pelo conhecimento.

A aluna de Iniciação Científica, Maria Júlia, pela disposição nos experimentos finais.

Aos técnicos e alunos do laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela orientação nas horas de incertezas.

Ao Cássio Prinholato pela ajuda incondicional durante no cultivo de células.

A Fabiana pela ajuda nas análises de citometria e pelas experiências trocadas na espera de cada análise.

Ao técnico e aos alunos no laboratório de Imunologia da FCFRP pela colaboração na finalização deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado e a FAPESP pela colaboração com os recursos financeiros durante a pesquisa.

Obrigada.

Tudo o que fazemos produz efeito e causa algum impacto.

Dalai Lama

RESUMO

A grande evolução tecnológica tem sido responsável pela introdução de diferentes contaminantes no ambiente, dentre os quais estão os éteres difenílicos polibromados (PBDEs). Os PBDEs representam uma importante classe de retardantes de chama adicionada aos diversos bens de consumo da vida moderna com a finalidade de retardar o processo de ignição e impedir a propagação de chamas. Atualmente, a crescente presença desses compostos em compartimentos ambientais e em amostras de fluídos biológicos tem levantado preocupações relacionadas com os possíveis efeitos tóxicos à saúde, no entanto tais efeitos são incertos devido à baixa disponibilidade de dados relacionados com a ação direta sobre o organismo humano. Desta forma, esse trabalho objetivou investigar os efeitos dos principais representantes de PBDEs: congênere PBDE-209, PBDE-99 e PBDE-47 sobre células de hepatoblastoma humano (HepG2) na faixa de concentração de 0.1-25µmol/L, em períodos de 24 e 48 horas, como uma alternativa de esclarecer os efeitos tóxicos dos PBDEs sobre a saúde humana, bem como correlacionar os efeitos entre os diferentes congêneres. As células HepG2 foram escolhidas devido as semelhanças com o metabolismo das células hepáticas normais. Também foi investigado o potencial dos três congêneres em induzir a morte celular após exposição aos PBDEs, sendo demonstrado potencial citotóxico diferenciado de acordo com o congênere investigado. Pela avaliação de ensaios de proliferação celular (SRB) e viabilidade celular (MTT) foi obtido que o congênere PBDE-209 induz morte celular em altas concentrações (10µmol/L, 25µmol/L) sendo esses efeitos iniciados primeiramente, por mecanismos citostáticos em concentrações menores. Enquanto isso, os PBDE-99 e PBDE-47 demonstraram elevado potencial citotóxico de forma concentração dependente, apresentando diferenças nas intensidades das concentrações avaliadas, relacionando-as com a facilidade de absorção e com os possíveis metabólitos formados. A investigação dos mecanismos citotóxicos foi realizada pelos ensaios de avaliação do potencial de membrana mitocondrial, exposição da fosfatidilserina na membrana externa celular e fragmentação nuclear. Esses ensaios evidenciaram que os congêneres investigados agem por indução de mecanismos apoptóticos, sendo os maiores resultados relacionados com os menores congêneres investigados. A avaliação dos mecanismos por vias necróticas foi realizada pela avaliação da atividade da LDH devido ao rompimento da membrana celular característico de mecanismos necróticos, não sendo obtidos resultados significativos. A avaliação do acúmulo de EROs ocasionado pela exposição aos congêneres demonstrou que os compostos investigados apresentam elevado potencial para induzir o estresse oxidativo, sendo inclusive relacionado com os efeitos citostáticos preliminares do congênere PBDE-209. A diferença dos resultados obtidos entre os três congêneres foi relacionada com as diferenças estruturais, as quais facilitam a absorção dos menores congêneres e com os possíveis metabólitos oriundos formados. Concluindo, estes resultados mostram os efeitos tóxicos dos PBDEs em células hepáticas e sugere a presença de efeitos adversos à saúde. Além disso, embora os congêneres PBDE-99 e PBDE-47 apresentem os maiores potenciais tóxicos, o efeito do congênere PBDE-209 não deve ser ignorado uma vez que o mesmo pode se intensificado com a exposição prolongada.

ABSTRACT

Technologic demand has increased the different pollutants released in the environment. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) is an important class of the flame retardants added in several good products with a wide range of toxic effects on biotic and abiotic systems. These compounds are release into environment through the loss during manufacture and of products containing PBDEs. Their toxic mechanisms on biologic systems still have not understood due to the existence of several different congeners, with different chemical and biological characteristics in the environment, and absence of their effects on the body. Therefore, in this study we examine effects of congeners PBDE-209, PBDE-99 and PBDE-47 on HepG2 cell line in order to understand their mechanism of action and their effects on the human health. Firstly, we evaluated citotoxic mechanism by SRB assay followed by MTT assay. This way, we showed that all tested PBDEs seem to cause cell death although PBDE-209 also causes cystostatic mechanism in lower concentration. The cytotoxic mechanism was observed in higher concentrations and it was suggested be evidences of apoptosis. Apoptotic mechanism was investigated by mitochondrial membrane potential, phosphatidyl serine exposure and nuclear fragmentation. Our results showed that all tested congeners were able to decrease mitochondrial membrane potential, to cause phosphatidyl serine exposure and a nuclear fragmentation with higher results found for BDE-99 and BDE-47 due structural difference that may facilities their absorption and their toxic metabolites Exclusion of necrotic mechanism was performed by LDH release assay. We evaluated reactive oxygen species (ROS) production and it was showed that apoptotics mechanisms is followed by oxidative stress in all congeners tested and suggest cytostatic mechanism is also mediated by ROS. These results are evidences of toxic effects of PBDEs on the cell line and health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ação química dos retardantes de chamas halogenados.....24

Figura 2. Estrutura Geral dos Éteres difenílicos polibromados (PBDEs).....26

Figura 3. Estrutura dos éteres difenílicos polibromados com maior incidência ambiental e em fluídos biológicos. As estruturas foram confeccionadas com software ChemDraw 10.0.....29

Figura 4. Efeito do congênere PBDE-209 sobre a proliferação celular da linhagem HepG2 após 24 e 48 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001, **p < 0.01 e *p < 0,05.....47

Figura 5. Efeito do congênere PBDE-209 sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 após 24 e 48 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com **p < 0.01 e *p < 0,05.....48

Figura 6. Efeito do congênere PBDE-99 sobre a proliferação celular da linhagem HepG2 após 24 e 48 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001, ***p < 0.01 e *p < 0,05.....49

Figura 7. Efeito do congênere PBDE-99 sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 após 24 e 48 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001, ***p < 0.01 e *p < 0,05.....50

Figura 8. Efeito do congênere PBDE-47 sobre a proliferação celular da linhagem HepG2 após 24 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001, ***p < 0.01 e *p < 0,05.....50

Figura 9. Efeito do congênere PBDE-47 sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 após 24 e 48 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001, **p < 0.01 e *p < 0,05.....51

Figura 10. Efeito do congênere PBDE-209 sobre o potencial de membrana mitocondrial da linhagem HepG2. O gráfico A representa o comportamento após 24 horas de exposição e em B é representado o comportamento em 48 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com **p < 0.01.....52

Figura 11. Efeito do congênere PBDE-99 sobre o potencial de membrana mitocondrial da linhagem HepG2. O gráfico A representa o comportamento após 24 horas de exposição e em B é representado o comportamento em 48 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 e *p < 0.05.....53

Figura 12. Efeito do congênere PBDE-47 sobre o potencial de membrana mitocondrial da linhagem HepG2. O gráfico A representa o comportamento após 24 horas de exposição e em B é representado o comportamento em 48 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 , **p < 0.01 e *p < 0.05.....53

Figura 13. Acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) na linhagem HepG2 ocasionado pela exposição ao PBDE-209. O gráfico A representa o comportamento após 24 horas de exposição e em

B é representado o comportamento em 48 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001, **p < 0.01 54

Figura 14. Acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) na linhagem HepG2 ocasionado pela exposição ao PBDE-99. O gráfico A representa o comportamento após 24 horas de exposição e em B é representado o comportamento em 48 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 e **p < 0.01.....55

Figura 15. Acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) na linhagem HepG2 ocasionado pela exposição ao PBDE-47. O gráfico A representa o comportamento após 24 horas de exposição e em B é representado o comportamento em 48 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 56

Figura 16. Efeito do congênere PBDE-209 sobre a exposição da fosfatidilserina da membrana externa de células HepG2 após 24 horas de exposição. As figuras são representativas de triplicatas de experimentos independentes.....57

Figura 17. Exposição da fosfatidilserina ocasionada pelo PBDE-209 após 24 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com *p < 0.05.....58

Figura 18. Efeito do congênere PBDE-209 sobre a fosfatidilserina da membrana de células HepG2 após 48 horas de exposição. As figuras são representativas de triplicatas de experimentos independentes.....59

Figura 19. Exposição da fosfatidilserina ocasionada pelo PBDE-209 após 48 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001, **p < 0.01 e *p < 0.05.....60

Figura 20. Efeito do congênere PBDE-99 sobre a fosfatidilserina da membrana de células HepG2 após 24 horas de exposição. As figuras são representativas de triplicatas de experimentos independentes.....61

Figura 21. Exposição da fosfatidilserina ocasionada pelo PBDE-99 após 24 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 e *p < 0.05.....62

Figura 22. Exposição da fosfatidilserina ocasionada pelo PBDE-99 após 48 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 e **p < 0.01.....63

Figura 23. Efeito do congênere PBDE-99 sobre a fosfatidilserina da membrana de células HepG2 após 48 horas de exposição. As figuras são representativas de triplicatas de experimentos independentes.....64

Figura 24. Efeito do congênere PBDE-47 sobre a fosfatidilserina da membrana externa de células HepG2 após 24 horas de exposição. As figuras são representativas de triplicatas de experimentos independentes.....65

Figura 25. Exposição da fosfatidilserina ocasionada pelo PBDE-47 após 24 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 e **p < 0.001**.....66

Figura 26. Efeito do congênere PBDE-47 sobre a fosfatidilserina da membrana externa de células HepG2 após 48 horas de exposição. As figuras são representativas de triplicatas de experimentos independentes.....67

Figura 27. Exposição da fosfatidilserina ocasionada pelo PBDE-47 após 48 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 e **p < 0.001.....68

Figura 28. Liberação da enzima lactato desidrogenase ocasionada pela exposição de 24 horas aos congêneres PBDE-209 (A), PBDE-99 (B) e PBDE-47 (C). A atividade da enzima foi avaliada durante intervalo de tempo de 4 minutos e os gráficos representam média de triplicatas.....69

Figura 29. Liberação da enzima lactato desidrogenase ocasionada pela exposição de 48 horas aos congêneres PBDE-209 (A), PBDE-99 (B) e PBDE-47 (C). A atividade da enzima foi avaliada durante intervalo de tempo de 4 minutos e os gráficos representam média de triplicatas.....70

Figura 30. Efeito do PBDE-209 sobre a condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 incubadas por 24 horas, coradas com Hoechst 33342 e analisadas por microscopia de fluorescência. As setas indicam núcleos fragmentados e/ou condensados.....71

Figura 31. Porcentagem de células com características apoptóticas, coradas com Hoechst 33342 e quantificadas por microscopia de fluorescência,ocasionadas pela exposição de 24 horas ao PBDE-209. As barras representam média de triplicatas com resultados estatisticamente significativos de ***p < 0.001.....72

Figura 32. Efeito do PBDE-209 sobre a condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 incubadas por 48 horas, coradas com Hoechst 33342 e analisadas por microscopia de fluorescência. As setas indicam núcleos fragmentados e/ou condensados.....73

Figura 33. Porcentagem de células com características apoptóticas, coradas com Hoechst 33342 e quantificadas por microscopia de fluorescência, após exposição de 48 horas ao PBDE-209. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 e *p < 0.05.....73

Figura 34. Efeito do PBDE-99 sobre a condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 incubadas por 24 horas, coradas com Hoechst 33342 e analisadas por microscopia de fluorescência. As setas indicam núcleos fragmentados e/ou condensados.....74

Figura 35. Efeito do PBDE-99 sobre a condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 incubadas por 48 horas, coradas com Hoechst 33342 e analisadas por microscopia de fluorescência. As setas indicam núcleos fragmentados e/ou condensados.....75

Figura 36. Efeito do PBDE-47 sobre a condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 incubadas por 24 horas, coradas com Hoechst 33342 e analisadas por microscopia de fluorescência. As setas indicam núcleos fragmentados e/ou condensados.....76

Figura 37. Efeito do PBDE-47 sobre a condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 incubadas por 48 horas, coradas com Hoechst 33342 e analisadas por microscopia de fluorescência. As setas indicam núcleos fragmentados e/ou condensados.....77

Figura 38. Porcentagem de células com características apoptóticas, coradas com Hoechst 33342 e quantificadas por microscopia de fluorescência, ocasionadas pela exposição ao PBDE-99. A representa a exposição de 24 horas e B representa a exposição de 48 horas. As barras representam média de triplicatas com resultados estatisticamente significativos de ***p < 0.001 e **p < 0.001.....78

Figura 39. Porcentagem de células com características apoptóticas, coradas com Hoechst 33342 e quantificadas por microscopia de fluorescência, ocasionadas pela exposição ao PBDE-47. A representa a exposição de 24 horas e o B representa a exposição de 48 horas. As barras representam média de triplicatas com resultados estatisticamente significativos de ***p < 0.001 e **p < 0.01.....78

ABREVIATURAS

ATP: adenosina 5`trifosfato
c-DDP: cisplatina
CM-H_2DCFDA: 5,6-clorometil- 2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato, acetil éster
DecaBDe: decabromodifenil éter
MEM: Minimun Essential Medium
DMSO: dimetilsulfóxido
EROs: espécies reativas de oxigênio
HBCD: hexabromociclodecano
Hoechst 33342: 2′-(4-Etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)- tri-hidrocloreto de 2,5′-bi-1H-benzimidazol
LDH: lactato desidrogenase
MTT: brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2-il) - 2,5 difenil tetrazolium
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NAD+: nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
OctaBDE: octabromodifenil éter
PBS: solução tampão-fosfato.
PBDE: éteres difenílicos polibromados
PBDE-47: 2,2’,4,4’ tetrabromodifenil éter
PBDE-99: 2,2’,4,4’,5 pentabromodifenil éter
PBDE-209: 2,2’,3,3’,4,4’,5,5’,6,6’ decabromodifenil éter
PCB: bifenila policlorada
PentaBDE: pentabromodifenil éter
PI: iodeto de propídeo
PMM: potencial de membrana mitocondrial
POP: poluentes orgânicos prioritários
PFHP: produtos farmacêuticos e de higiene pessoal
Rnase: ribonuclease A
SBF: soro bovino fetal
SRB: sulforodamina B
T3: triiodotironina
T4: tiroxina
TBBPA: tetrabromobisfenol A
TBHP: terc-butil hidro-peróxido
TMRM: tetrametilrodamina metil éster
Tris: tris-(hidroximetil) aminometano

SUMÁRIO

Introdução ____ *19*

1.1 Tecnologias e seus Impactos Futuros ____ 20

1.2 Contaminantes Emergentes ____ 21

1.3 Retardantes de Chamas ____ 23

1.3.1 Éteres Difenílicos Polibromados (PBDE) ____ 26

Objetivos ____ *35*

Material e Métodos ____ *37*

3.1. Reagentes ____ 38

3.2. Cultivo de Células ____ 38

3.3. Proliferação Celular ____ 39

3.4. Viabilidade Celular ____ 40

3.5. Potencial de Membrana Mitocondrial ____ 40

3.6. Acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) ____ 41

3.7. Exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana celular ____ 42

3.8. Integridade da Membrana Celular ____ 42

3.9. Fragmentação Nuclear ____ 44

3.10. Análise Estatística ____ 44

Resultados ____ *46*

4.1. Proliferação e Viabilidade Celular ____ 47

4.2. Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM) ____ 51

4.3. Acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) ____ 54

4.4. Exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana celular ____ 56

4.5. Integridade da Membrana Celular ____ 68

4.6. Fragmentação Nuclear ____ 71

Discussão ____ *79*

Conclusão ____ *88*

Referências Bibliográficas ____ *90*

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tecnologias e seus Impactos Futuros

O homem busca compreender, modificar e explorar o universo que o rodeia, visando satisfazer suas próprias necessidades e assim, garantir melhores condições de adaptação ao ambiente. Dessa forma, foram obtidos os primeiros avanços no desenvolvimento da sociedade, sendo a busca por conhecimento um dos fatores primordiais para o desenvolvimento de grandes transformações ao longo dos séculos.

O conhecimento científico foi, e ainda é, o principal combustível para o surgimento e desenvolvimento do Mundo Moderno. Isso ocorre, principalmente, devido à evolução tecnológica, sendo dentre outros, o responsável pelo acelerado avanço tecnológico obtido, do qual se estima haver uma duplicação nos seus índices de produção em cada período entre 10 e 15 anos. No entanto, é observado que embora os grandes progressos obtidos produzam relevantes benefícios à sociedade moderna (modo de organização da sociedade, transportes mais eficientes, instrumentos de comunicações mais ágeis, equipamentos portáteis, além dos grandes avanços nas áreas médica e farmacêutica), é visível o crescimento acelerado de diferentes impactos sobre a saúde e o ambiente.

Atualmente, é de total conhecimento da sociedade que o elevado número de transformações necessárias para satisfazer a demanda mundial contribui diretamente com os danos ao ambiente por meio da degradação dos recursos naturais, tal como desmatamento acelerado, destruição da biota, bem como o lançamento de poluentes na atmosfera, solo e nos ambientes aquáticos. Essas ações têm contribuído para o aumento das preocupações relacionadas aos antigos impactos ambientais: aquecimento global, efeito estufa, inversão térmica, ilhas de calor e poluição dentre outros. No entanto, além desses impactos, outros fatores oriundos da popularização da tecnologia tornaram-se preocupantes devidos aos seus índices de exposição à população.

Entre estes, está o aumento da demanda do lixo eletrônico também conhecido por lixo tecnológico, equivalente atualmente a 5% de todo o lixo produzido pela humanidade resultante do descarte inadequado e acelerado de diversos equipamentos eletrônicos. A massa de resíduos tecnológicos também é considerada um problema ambiental, pois tais equipamentos são constituídos por compostos tóxicos, dentre eles, metais como zinco, cobre, chumbo e platina responsáveis por danos aos aparelhos reprodutivo, respiratório e neurológico, além do desenvolvimento de câncer (FERREIRA *et al*., 2010).

Além da problemática do lixo tecnológico, outras substâncias são lançadas diariamente ao ambiente, sendo alvo de preocupações devido a seus índices de acumulação, exposição e prováveis efeitos tóxicos à saúde e ao ambiente. Essas substâncias podem ser encontradas em diversos produtos do cotidiano, sendo suas ações tóxicas responsáveis por alterações nos organismos, inclusive, na espécie humana, mostrando assim, que embora o desenvolvimento científico e tecnológico seja uma ferramenta indispensável no atual contexto do mundo, é necessário avaliar seus riscos e buscar alternativas para minimizar os danos ocasionados visando, uma vida confortável no presente e no futuro.

1.2 Contaminantes Emergentes

Contaminantes são agentes introduzidos nos diversos ambientes com potencial nocivo à saúde ou ao bem estar da população e do ambiente. Mundialmente, são conhecidos um total de onze milhões de substâncias químicas sintéticas, das quais, três mil são produzidas em larga escala, gerando uma quantidade elevada de agentes com potencial tóxico liberados no ambiente (FONTENELE *et al*., 2010). Essa diversidade de compostos é responsável por um ritmo crescente de investigações relacionadas à ação dos mesmos, visando esclarecer seus efeitos e minimizar os danos ocasionados, bem como fornecer dados que auxiliem na criação de legislações pertinentes às regras de manuseio e exposição, uma vez que esses dados ainda são escassos ou conflituosos.

Atualmente, observa-se que os percentuais de exposição de algumas classes de compostos químicos presentes em produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal, praguicidas, surfactantes e produtos industriais têm aumentado rapidamente tanto no ambiente, quanto no sistema biótico, gerando uma necessidade de atenção aos seus efeitos sobre a biota.

O termo contaminante emergente é por isso caracterizado por compostos químicos de origem sintética ou natural, previamente desconhecidos ou não reconhecidos como prejudiciais à saúde ou ao ambiente devido à escassez de resultados que comprovem seus efeitos e/ou à ausência de legislação que controle sua utilização. Tais compostos estão presentes em diferentes produtos do cotidiano da sociedade moderna, sendo os mais comuns classificados como produtos farmacêuticos e higiene pessoal (PFHP), surfactantes, plastificante, praguicidas e retardantes de chamas (YAN *et al*., 2011).

A quantidade de alguns contaminantes emergentes encontradas nos diferentes compartimentos ambientais ($ng.L^{-1}$ a $pg.L^{-1}$) (SODRÉ *et al*., 2007) ainda é considerada abaixo das mínimas concentrações tóxicas avaliadas nos diferentes ensaios de toxicidade. Apesar disso, a presença desses compostos é alarmante, principalmente, devido ao seu acelerado ritmo de introdução e baixo potencial de degradação que proporciona uma relação entre essas grandezas em unidades inversamente proporcionais, trazendo preocupações relacionadas aos possíveis níveis destes compostos nas gerações futuras, além é claro, da associação da sua presença com efeitos tóxicos à saúde.

Dentre as alterações já evidenciadas pela presença dos ditos contaminantes emergentes podem ser citadas a forte interferência endócrina, tanto em animais quanto em humanos, ocasionada pela presença de diferentes PFHP e plastificantes no ambiente; o surgimento de populações microbianas resistentes devido às adaptações genéticas ocasionadas pela presença de medicamentos de uso veterinário e humano (CÓLON *et al*., 2000; NALLI *et al*., 2002, 2006; RICHARDSON; TERNES, 2005; BOLONG *et al*., 2009; EDWARDS, *et al*., 2009; MARTINEZ, 2009) além da ação estrogênica de surfactantes, o quais têm ocasionado a feminilização de espécies causando o comprometimento da reprodução (CESPEDES *et al*., 2005; BRIX, *et al*., 2010; GONZALÉZ, *et al*., 2012).

Não obstante, também é relatado que o contato com diferentes praguicidas ocasiona o desenvolvimento de alterações neurotóxicas, associadas com a incidência de enfermidades colinérgicas, deformidades neurodegenerativas do sistema nervoso central, tal como síndrome de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (COLLIS; NEAFSEY, 2002; JOKANOVIC; KOSANOVIC 2010; JETT, 2011) além do elevado potencial genotóxico responsável pelo surgimento de alterações cromossômicas em linfócitos sanguíneos, em células do epitélio bucal humano (GIRI, *et al*., 2002; BORTOLI, *et al*., 2009), danos no DNA de células sanguíneas de peixes e decréscimo de células mitóticas de ratos (GIRI, *et al*., 2002; ALTINOK, *et al*., 2011).

Atualmente, o foco emergente está voltado para incidência de retardantes de chamas no ambiente ocasionada pela necessidade da presença destes compostos em diferentes produtos do cotidiano, fato que os tornam mais resistentes e proporcionam

maior segurança nos casos de incêndios. Desta forma, maior enfoque será dado a esta classe de contaminantes.

1.3 Retardantes de Chamas

Os contaminantes representados pelos retardantes de chamas abrangem compostos adicionados em uma infinidade de produtos, principalmente materiais poliméricos, com o propósito de torná-los mais resistentes às altas temperaturas e assim, evitar a ignição dos mesmos ou diminuir a propagação de chamas e fumaças durante a fase inicial da combustão.

No entanto, algumas dessas substâncias não permanecem fixas nos materiais que as contêm, sendo lentamente liberadas para o ambiente contaminando o ar, reservas de água, bem como alimentos e finalmente acumulando-se sobre os organismos, sendo a presença dos mesmos associada com o aumento de alterações endócrinas, incidência de câncer e alterações neuro-comportamentais.

Estima-se a existência de mais de 175 substâncias utilizadas como retardantes de chamas, havendo a classificação das mesmas em retardantes de chamas orgânicos halogenados, os quais contêm átomos de cloro e bromo em sua constituição, retardantes de chamas nitrogenados, fosforados e inorgânicos (BIRNBAUM; STASKAL, 2004; MOROSE, 2006).

Os retardantes halogenados apresentam maior eficiência sobre os demais compostos, devido ao seu mecanismo de ação química que atua sobre os radicais livres do processo de ignição diminuindo, rapidamente, a energia do sistema (Figura 1). No entanto, nesse processo há a produção de gases tóxicos e a incidente liberação de retardantes ao meio ambiente após o aquecimento dos materiais.

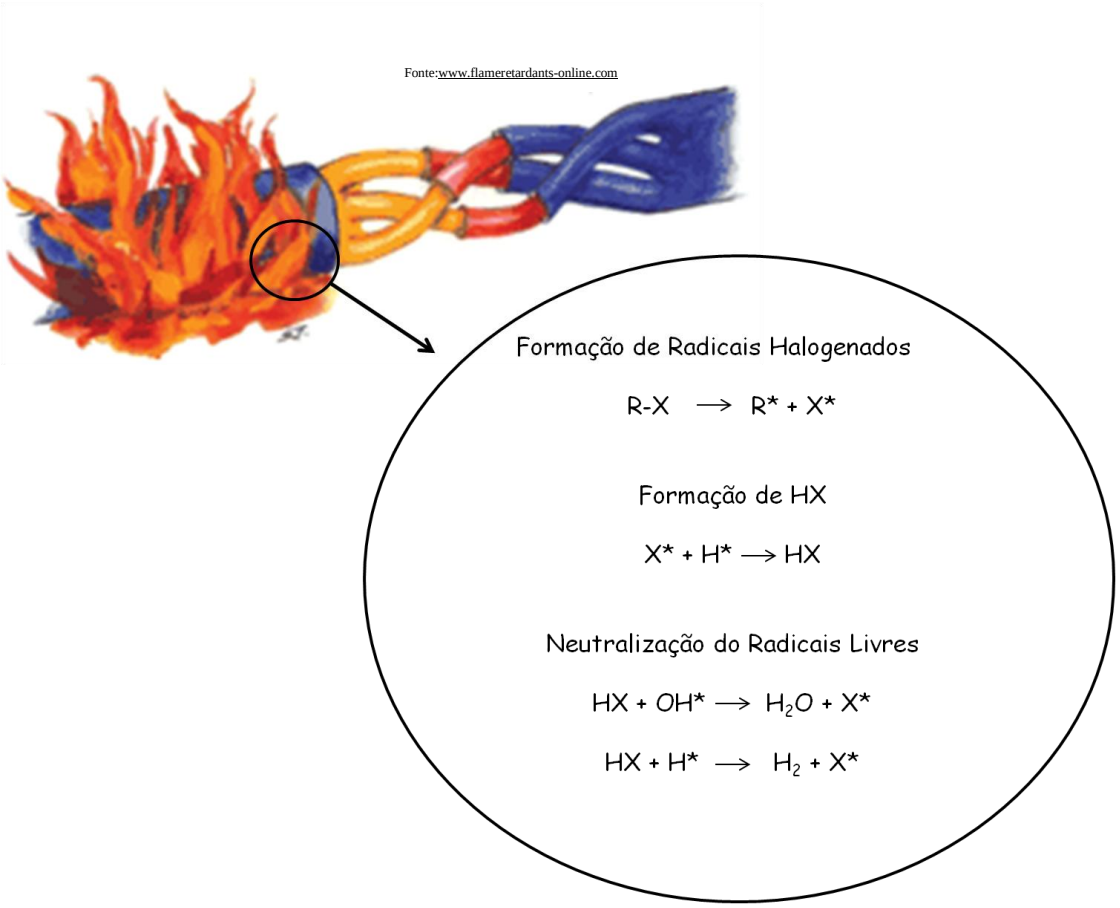


Figura 1. Mecanismo de ação química dos retardantes de chamas halogenados.

O consumo mundial de retardantes de chamas mostra que os compostos orgânicos halogenados, mais precisamente, os retardantes bromados apresentam elevado índice de consumo nos países em desenvolvimento, devido a fatores como eficiência, baixos custos e principalmente a ausência de legislação que fiscalize a utilização dos mesmos, uma vez que na Europa e EUA, esse consumo é reduzido, pois é proibida a fabricação de produtos que contenham alguns representantes desta classe em sua formulação.

Os retardantes de chama bromados são divididos em aditivos e reativos, de acordo com o mecanismo de adição aos materiais, sendo o tetrabromobisfenol A (TBBPA), hexabromociclodecanos (HBCDs) e os éteres difenílicos polibrominados (PBDEs) os mais empregados nas indústrias, e também os responsáveis pela maior incidência de efeitos adversos sobre a saúde e o ambiente (BIRNBAUM; STASKAL, 2004).

O TBBPA é o retardante mais consumido mundialmente, podendo estar presente em chapas eletrônicas, fabricado na forma reativa, ou em materiais poliméricos, por simples mecanismos de adição ao polímero. Embora, na forma reativa ocorra a liberação lenta do TBBPA, estudos mostram que em ambas podem contribuir significativamente para a liberação do contaminante no ambiente.

O aumento da incidência do TBBPA e sua presença estão relacionados com o surgimento de alterações no metabolismo de hormônios tireoidianos, alterações reprodutivas, desregulação endócrina de espécies aquáticas e estresse oxidativo (DE WIT, 2002; RONIZ *et al*., 2004; HAMERS *et al*., 2006; SHI *et al*., 2010). No entanto, dentre os retardantes de chama investigados, o TBBPA é considerado o de menor risco, devido à prevalência da sua utilização em produtos na forma reativa.

O HBDC ocupa a terceira posição no mercado mundial de retardantes de chamas, sendo incorporado por simples adição aos polímeros e materiais têxteis, o que ocasiona a fácil liberação ao ambiente durante o manuseio, descarte inadequado e incineração, sendo facilmente encontrados nos tecidos adiposos, em amostras de leite e sangue humano (COVACI *et al*., 2006; ARNOT *et al*., 2009) e em alimentos (HIEBL; VETTER, 2007; FERNANDES *et al*., 2008). Estes dados são preocupantes, já que ensaios "in vivo" mostraram elevada toxicidade destes compostos após a inalação, exposição oral e dérmica (DANERUB, 2003).

Da mesma forma que o TBBPA, o HBCD interfere no funcionamento do sistema endócrino, principalmente das espécies aquáticas, além de provocar alterações sobre o sistema reprodutor, ao fígado, induzir estresse oxidativo em diversas linhagens celulares e apresentarem também fortes evidências relacionadas com o surgimento de tumores e neoplasia nos órgãos alvos (BIRNBAUM; STASKAL, 2004; YAMADA-OKABE *et al*., 2006).

Outra característica dos HBCD é sua persistência ambiental e elevado potencial de bioacumulação, sendo relatado forte potencial de acumulação na cadeia alimentar, contribuindo para o crescente aumento deste contaminante nas gerações futuras (YAMADA-OKABE *et al*., 2006; SCHRINK *et al*., 2006; EMA *et al*., 2008).

Esses compostos representam uma classe de retardantes de chamas amplamente utilizada como aditivos em plásticos, produtos têxteis, circuitos, equipamentos eletrônicos, materiais de construção e em uma infinidade de produtos presentes no

cotidiano da população. Assim como o HBCD, os PBDEs são compostos adicionados aos bens de consumo durante ou após o processo de fabricação, não havendo ligações químicas efetivas entre os envolvidos. Dessa forma, podem ser facilmente liberados ao ambiente durante o manuseio, disposição ou por meio de processos de descartes inadequados.

Os PBDEs também são retardantes considerados preocupantes devido ao aumento de evidências relacionadas à sua toxicidade, bem como de seus metabólitos. Isso se deve ao constante uso desses retardantes e à sua elevada incidência em compartimentos ambientais e fluídos biológicos.

1.3.1 Éteres Difenílicos Polibromados (PBDEs)

A estrutura química dos PBDEs é representada por uma ligação éter entre dois anéis fenílicos (Figura 2), os quais podem conter substituições de até 10 átomos de bromo. Os PBDEs são semelhantes estruturalmente às bifenilas policloradas (PCBs) considerados poluentes orgânicos prioritários (POPs), devido ao seu potencial tóxico a saúde e ao ambiente (PENTEADO;VAZ, 2001).

No entanto, tais compostos diferem das PCBs pela presença do átomo de oxigênio entre os anéis aromáticos que ocasiona diferenças nas propriedades químicas dessas moléculas (polaridade e estrutura tridimensional) podendo afetar os efeitos tóxicos do composto.

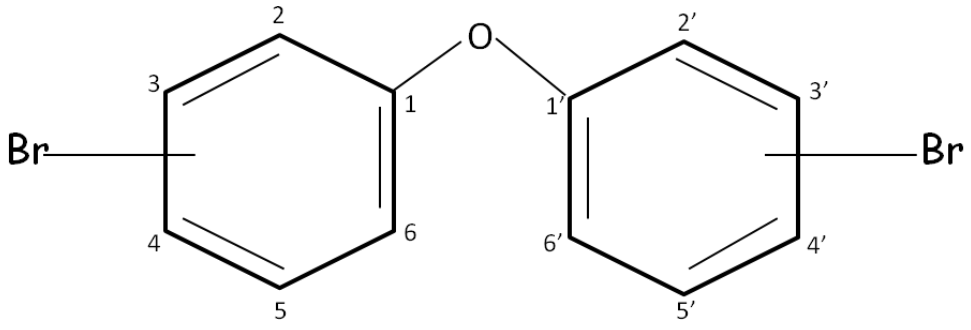


Figura 2. Estrutura geral dos éteres difenílicos polibromados (PBDEs).

Existem 209 diferentes congêneres de PBDEs sendo sua classificação e propriedades químicas influenciadas pela quantidade e posição das substituições de átomos de bromo. Os PBDEs são altamente lipofílicos fazendo com que sejam

facilmente acumulados em tecidos adiposos; possuem ainda baixa pressão de vapor e elevada afinidade por partículas conferindo a estes compostos uma forte tendência para acumulação em sedimentos.

Devido às suas características físico-químicas, após a liberação dos materiais de consumo, os PBDEs são depositados em amostras de sedimentos e alimentos, onde são absorvidos pelos organismos através da inalação, exposição dérmica ou ingestão, sendo relatado que as principais fontes de contaminação aos PBDEs são provenientes da poeira doméstica e da dieta humana (BRANCHI, *et al*., 2003; TALNESS, 2008; WEIHONG, *et al.*, 2008). Além disso, esses compostos são bioacumuláveis na cadeia alimentar o que aumenta sua contaminação pela alimentação. Ainda devido às características físico-químicas há a possibilidade de transporte para regiões distantes, já sendo detectada sua presença em amostras de tecido adiposo de animais das regiões árticas.

Os PBDEs são comercializados em três misturas químicas representadas, respectivamente, pelo pentabromodifenil éter (pentaBDE), octabromodifenil éter (octaBDE) e decabromodifenil éter (decaBDE). Devido à evidência de efeitos tóxicos a comercialização de produtos que contenham as formulações pentaBDE e octaBDE já é proibida na Europa e em alguns estados dos EUA (COSTA, *et al.*,2008). No entanto, a ausência de legislação específica não restringe a utilização dessas formulações, nos demais blocos econômicos e, além disso, o baixo custo dos PBDEs em relação aos demais retardantes impulsiona sua utilização.

Não há, até o momento, restrições para a utilização da mistura decaBDE pois os dados de sua toxicidade ainda são escassos e conflituosos (COSTA, *et al*.,2008; VERNER *et al*., 2011). No entanto, o contínuo uso da mistura decaBDE é preocupante, pois há relatos de que os maiores congêneres são passíveis de degradação pela ação do ambiente e podem contribuir para a entrada dos menores congêneres no ambiente.

Além disso, há alertas sobre a metabolização dos PBDEs nos organismos, pois embora as investigações sobre os efeitos tóxicos dos metabólitos de PBDEs estejam em fase inicial, já é mostrado que os menores congêneres e seus metabólitos apresentam maior toxicidade se comparada com as moléculas originais ou com congêneres mais substituídos.

O elevado potencial de acumulação e a persistência ambiental dos PBDEs contribuem para a deposição dos mesmos em fontes ambientais e biológicas sendo seu

elevado potencial lipofílico responsável pelos níveis desses compostos detectados em amostras de gorduras de animais, no sangue, na placenta, leite humano e em órgãos alvo do processo de desintoxicação ou que apresentem elevado teor de gordura na sua composição (HITES, *et al*., 2004; TOMS, *et. al*., 2007; LI, *et. al*., 2008; COVACI, *et. al*., 2008; SONNE, 2010; SHEN, *et al*., 2011; MA, *et. al*., 2011).

Dentre os efeitos gerais apresentados pela exposição aos PBDEs está a presença de forte potencial neurotóxico relacionado com o desenvolvimento de alterações comportamentais, deficiências cognitivas e motoras havendo inclusive, associações entre os fatores que contribuem para o desenvolvimento da disfunção global do desenvolvimento devido à exposição durante as fases de desenvolvimento do cérebro (BRANCHI, *et al.*, 2003; MADIA, *et al*., 2004; MERSSE, 2010; VERNE, *et al*., 2011).

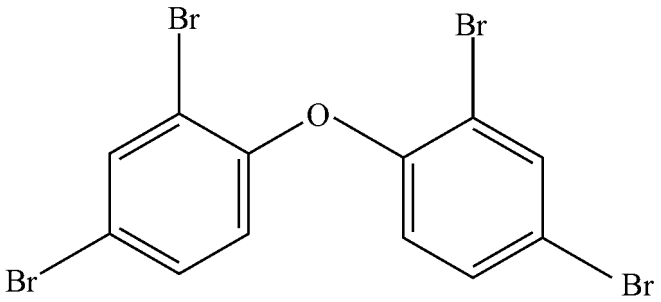
Outras evidências estão relacionadas com alterações no sistema endócrino atuando sobre os receptores de hormônios como estrogênio e progesterona além de diminuir os níveis de hormônios tireoidianos (MCDONALD, 2002; MADIA, *et. al*., 2004; LEMA, *et al*., 2008; COSTA; GIORDANO, 2007; COSTA, *et al*., 2008, ZHANG, X *et al*., 2008) e estarem associadas com a probabilidade de desenvolvimento de hepatotoxicidade e câncer (HU, *et al*., 2007; ALBINA, *et al*., 2010).

Embora sejam apontadas diversas evidências tóxicas da presença dos PBDEs, a pequena quantidade de dados sobre os mecanismos de ação tóxica destes compostos, atrelada a grande variedade de PBDEs presentes no cotidiano e os seus possíveis produtos de degradação metabólica representam alguns dos obstáculos no esclarecimento da toxicidade dos PBDEs na saúde humana.

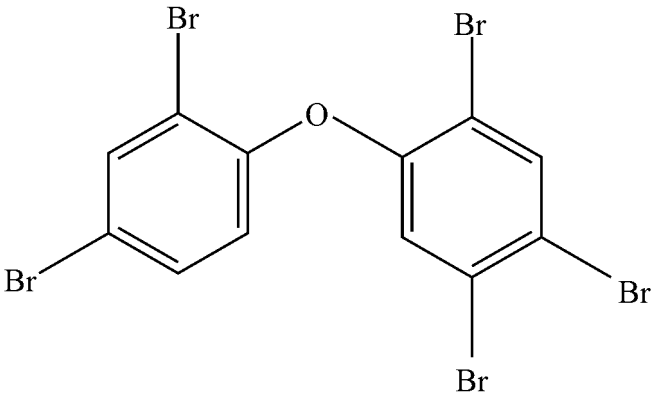
Desta forma, os congêneres 2,2’,4,4’ tetrabromodifenil éter (PBDE-47) e o 2,2’,4,4’,5’ pentabromodifenil éter (PBDE-99) demonstrados na Figura 3 representam os compostos com maior incidência nos compartimentos biológicos e possuem os maiores efeitos tóxicos nos ensaios avaliados até o momento. Enquanto isso, nos compartimentos ambientais é marcante a presença dos PBDE-47, PBDE-99 e 2,2’,3,3’,4,4’,5,5’,6,6’ decabromodifenil éter (PBDE-209) (COSTA; GIORDANO, 2007; COSTA, *et al*., 2008; HU *et al*., 2009).

Além da presença do PBDE-47 nos meios bióticos e abióticos, o composto é facilmente depositado sobre tecidos adiposos de animais pertencentes à fauna selvagem (BI, *et al*., 2006; LETCHER, *et al*., 2009; CARLSSON *et al*., 2011). A principal rota de entrada no ambiente ocorre através da comercialização e utilização da mistura

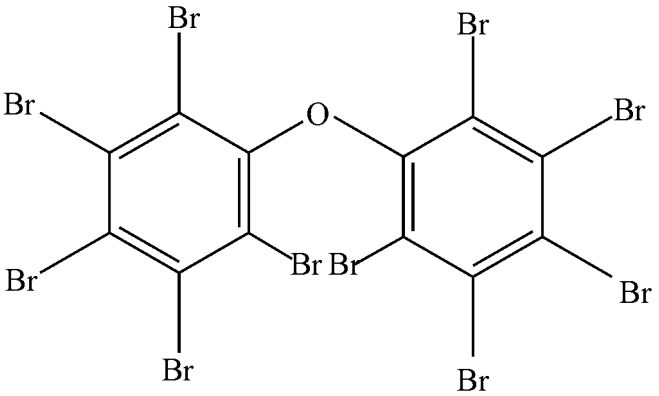
pentaBDE contendo aproximadamente 28% do composto que, após a absorção sofrem metabolismo, e são distribuídos pelo organismo sendo depositado sobre fígado, cérebro, pele e tecido adiposo (U.S. EPA, 2008).



2,2',4,4' Tetrabromodifenil éter
PBDE-47



2,2',4,4',5 Pentabromodifenil éter
PBDE-99



2,2',3,3',4,4',5,5',6',6 Decabromodifenil éter
PBDE-209

Figura 3. Estrutura dos éteres difenilicos polibromados com maior incidência ambiental e em fluídos biológicos. As estruturas foram confeccionadas com o software ChemDraw10.0.

A utilização da mistura pentaBDE também contribui para a entrada do congênere PBDE-99 no ambiente, pois esta contém 43% do composto, sendo demonstrado em ensaios *in vivo* que os órgãos alvos do PBDE-99 após a absorção são, principalmente, tecido adiposo e fígado. Os congêneres PBDE-99 e PBDE-47 são os mais persistentes ambientalmente e em amostras de alimento, sendo em virtude disso, absorvidos, principalmente, via oral (DOMINGO, *et al*., 2008; STAPLETON, et al., 2009; ALONSO, *et al*., 2010).

Ensaios *in vivo* demonstram que PBDE-47 e PBDE-99 atravessam facilmente a placenta afetando o desenvolvimento embrionário e provocando um elevado acúmulo destes compostos no fígado de embriões dos animais expostos durante a fase gestacional (STASKAL, *et al*., 2006, SHAO *et al*., 2008). Outras fontes de PBDEs podem ser encontradas em amostras de sangue de cordão umbilical, sendo relatado que em todos os casos as concentrações do congênere PBDE-47 são mais elevadas.

Outras ações do PBDE-47 estão relacionadas com a presença de metabólitos hidroxilados, os quais atuam como desreguladores endócrino, sendo demonstrado que em baixas concentrações podem interferir nos receptores de estrógeno induzindo o crescimento anormal nos órgãos reprodutores femininos, mamas e fígado (TALNESS, 2008); competir com os receptores de andrógenos, hormônios triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), causando alterações no desenvolvimento dos tecidos dependentes destes hormônios evidenciando a presença de potencial neurotóxico do PBDE-47 (MEERTS, *et al*., 2001; STOKER, *et al*., 2005).

As conseqüências neurotóxicas do composto estão associadas com o desenvolvimento de hiperatividade e declínio da aprendizagem devido à exposição pré ou pós-natal, além do elevado potencial citotóxico em linhagens derivadas de neuroblastoma humano e células neurais de roedores (HU *et al*., 2007; COSTA *et al*., 2008; SHAO *et al*., 2008; WEIHONG *et al*., 2008).

Apesar de poucas evidências genotóxicas, a presença do PBDE-47 e seus metabólitos têm sido associados com o aumento de carcinomas hepatocelulares e carcinomas de tireóide, já sendo relatada ação citotóxica em diversas linhagens de carcinomas incluindo células de hepatoblastoma e linfócitos.

As investigações sobre os mecanismos tóxicos dos PBDE mostram que as ações são diferentes dependendo do congênere analisado, pois enquanto o PBDE-47 interfere nas taxas de hormônios tireoidianos T3 e T4, não foram obtidos diferenças

significativas nas taxas de T4 livre nos organismos após tratamento com o congênere PBDE-99 (SKARMAN *et al*., 2005) e, em relação aos receptores de estrogênios e androgênios as alterações, quando observadas, não foram relevantes (KESTER *et al*., 2002; VILLENEUVE *et al*., 2002).

No entanto, é observado que o congênere PBDE-99 interfere nos hormônios sexuais testosterona e progesterona de roedores ocasionando a feminilização das espécies e a probabilidade de deficiência reprodutiva nas fêmeas devido ao atraso no amadurecimento dos órgãos reprodutores (LILIENTHAL, *et al*., 2006). Os mecanismos de ação do congênere PBDE-99 sobre os níveis de testosterona ainda são incertos, no entanto há evidências de que o congênere provoque a transformação da testosterona em estradiol via decréscimo da enzima aromatase, conforme observado nas células de carcinomas adrenocortical (CANTÓN, *et al*., 2008; TALNESS, 2008).

Enquanto isso, ensaios *in vivo* mostram que a exposição oral ao PBDE-99 ocasiona alterações no sistema reprodutor relacionadas com o decréscimo da quantidade de células espermáticas e alterações morfológicas sobre os ovários (CECCATELLI, *et al*., 2006; LILIENTHAL, *et al*., 2006; KURYAMA *et al*., 2005; TALSNESS, *et al*., 2005).

Conforme mencionado anteriormente, o congênere PBDE-99 apresenta evidências neurotóxicas, sendo observado que a exposição ocasiona alterações comportamentais e cognitivas em animais adultos expostos aos compostos durante a fase neonatal (ERIKSSON *et al*., 2002). Além da diminuição dos receptores de acetilcolina no cérebro, durante essa fase de crescimento, havendo associação entre esse decréscimo e o desenvolvimento de distúrbios comportamentais (VIBERG *et al*., 2005).

A ação neurotóxica do composto, também, tem sido investigada através de ensaios *in vitro* utilizando células imortalizadas de cérebro, sendo demonstrado que o congênere induz a apoptose em células neuroblastoma, além de afetar a expressão de proteínas específicas de cortex cerebral de roedores (MADIA *et al*., 2004; ALM, *et al*., 2008, 2010).

Em relação à utilização do PBDE-209 é demonstrado que a utilização do composto ocorre principalmente pela mistura decaBDE, a qual é composta por aproximadamente 97% do congênere PBDE-209 que, embora apresente baixo potencial de absorção pelos organismos, pode ser encontrado depositado sobre fígado, músculos e pele.

Diferentemente dos congêneres menos bromados, este composto não tem sido encontrado sobre os tecidos adiposos, sendo sugerido que isso ocorra devido à conformação e o alto peso molecular de sua estrutura (U.S. EPA, 2008; GOODMAN, 2009).

O PBDE-209 pode ainda ser metabolizado e formar congêneres com quantidade de bromo variando entre nove, oito ou sete substituintes na sua estrutura, os quais podem ser transferidos para os fetos durante o estágio gestacional ou através da alimentação maternal (FENG *et al*., 2010; CAI *et al*., 2011; ZHANG, W *et al*, 2011), no entanto, isto ocorre em menor quantidade em comparação com os demais congêneres (FREDERINKSEN, *et al*., 2010).

Assim, como ocorrido com os demais congêneres, a presença PBDE-209 é preocupante, pois tem se mostrado que este composto também apresenta indícios de desenvolvimento neurotóxico, ocasionado por interferências durante o estágio de crescimento do cérebro ou por alterações nos níveis dos hormônios da tireóide (KIM *et al*., 2009; VIBERG, *et al*., 2008). Dentre as alterações ocasionadas no desenvolvimento do cérebro têm sido relatado danos permanentes relacionados com a peroxidação lipídica e alteração sobre os níveis da enzima acetilcolinesterase (LIANG *et al*., 2010).

As principais alterações observadas após a exposição *in vivo* ao congênere estão relacionadas com distúrbios nas atividades locomotoras, comportamentais, decréscimo de aprendizagem e memória. Estudos *in vitro* têm confirmado as evidências neurotóxicas do PBDE-209 sendo observado o efeito citotóxico ocasionado sobre células de neuroblastoma humano ou células neurais de ratos e camundongos (XING et al., 2009; HUANG H *et al*., 2010; ZHANG W *et al*., 2011).

Além dos efeitos sobre o desenvolvimento do cérebro, a exposição crônica tem mostrado que órgãos como fígado e glândula tireóide também são afetados pelo congênere e os seus efeitos ainda estão sob investigação. No entanto, já foi demonstrado que o composto ocasiona a apoptose em células derivadas de hepatoblastoma humano, embora os mecanismos de indução desse efeito ainda não estejam totalmente esclarecidos (HU *et al*., 2007).

Apesar das evidências sobre o potencial tóxico dos PBDEs, os efeitos sobre a saúde humana são incertos, devido ao pouco conhecimento da ação direta sobre o organismo humano. Isto ocorre, pois as investigações relatadas, até o momento,

referem-se em grande parte, à quantificação desses compostos nos organismos ou aos seus efeitos em modelos animais. No entanto, conforme observado os efeitos e a quantidade dos PBDEs podem ser variados dependendo de fatores como: espécie, congênere investigado, sexo e idade, fato que pode ocasionar, em humanos, resultados diferentes dos observados, até o momento, em modelos animais.

Em virtude da variedade estrutural de PBDEs e seus prováveis metabólitos lançados ao ambiente, é importante avaliar a ação de diferentes congêneres sobre uma mesma espécie visando o esclarecimento dos mecanismos de ação desses compostos e as contribuições das diferenças estruturais de cada congênere na toxicidade desta classe de contaminantes.

Assim, a avaliação da ação de diferentes congêneres sobre o organismo humano poderia auxiliar no esclarecimento dos prováveis riscos da exposição aos PBDEs, pois não há a incidência isolada de um único congênere nos fluídos humanos, portanto, cada congênere pode contribuir de forma diferenciada para a toxicidade dos PBDEs à saúde.

Entre as primeiras ações do organismo, após absorção dos PBDEs, está a ativação de mecanismos de eliminação desses compostos, exercendo o fígado um papel central, pois é o principal alvo no metabolismo de agentes tóxicos. Além disso, este órgão tem sido apontado como um dos alvos afetados pela exposição aos PBDEs, devido a incidente deposição dos PBDEs e seus metabólitos sobre o mesmo. Portanto, as utilizações de modelos celulares oriundos deste órgão podem ser importantes ferramentas experimentais para investigação dos seus mecanismos de ação tóxica sobre a saúde.

As células HepG2 representam uma linhagem originada de um hepatoblastoma humano, amplamente utilizada em diversos ensaios *in vitro* relacionados com a toxicidade de xenobióticos. Esta linhagem é uma importante sugestão de modelo para investigação dos efeitos de contaminantes sobre a saúde humana, pois as HepG2 apresentam características semelhantes as células de um fígado normal, tal como: morfologia do parênquima hepático, síntese e excreção de diversas proteínas plasmáticas e conservação de enzimas ativas das fases I e II do metabolismo (Knasmuller *et al*., 1998; Uhl *et al*., 2000), além de apresentarem características experimentais adequadas para cultivo em tempo prolongado o que facilita a investigação em longos períodos de análise.

Em virtude da necessidade de esclarecimento dos riscos à saúde relacionados à

exposição aos PBDEs, é sugerido a investigação dos efeitos que os congêneres com maior incidência ambiental e nos fluídos biológicos possam ocasionar sobre a homeostase das células HepG2. Os congêneres PBDE-209, PBDE-99, PBDE-47 foram escolhidos devido a estas elevadas taxas de incidência e em virtude da grande diferença estrutural entre os compostos, visando assim, avaliar a influência das estruturas na toxicidade desta classe de contaminantes.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Investigar os efeitos de diferentes congêneres de PBDEs sobre a linhagem derivada de hepatoblastoma humano HepG2, utilizando como modelo os congêneres PBDE-47, PBDE-99 e PBDE-209, como alternativa de contribuir para a compreensão dos mecanismos de ação tóxica destes compostos para a saúde humana.

2.2 Objetivos específicos

i) Implantar ensaios de toxicidade dos PBDEs utilizando culturas de células HepG2;

ii) Avaliar o potencial dos PBDEs em interferir no crescimento celular após a exposição em diferentes tempos;

iii) Avaliar o potencial dos PBDEs em interferir na funcionalidade mitocondrial das células após exposição aos congêneres propostos;

iv) Avaliar o potencial dos PBDEs em provocar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular das HepG2;

v) Avaliar a integridade da membrana celular após exposição aos PBDEs;

vi) Avaliar o mecanismo de indução de morte celular (apoptose e/ou necrose) em cultura de células expostas aos PBDEs.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes

Os congêneres PBDE-209, PBDE-47 e PBDE-99 foram obtidos da AccuStard (EUA). Sulforodamina B (SRB), brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2-il) - 2,5 difenil tetrazolium (MTT), ribonuclease A (RNase), dimetilsulfóxido (DMSO), iodeto de propídeo (PI) , soro bovino fetal (SBF) Gibco-Invitrogen. antibiótico-antimicótico, piruvato de sódio, tripsina, Triton X–100, terc-butil hidro-peróxido (TBHP) e 2′-(4-Etoxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)- tri-hidrocloreto de 2,5′-bi-1H-benzimidazol (Hoechst 33342) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Tetrametilrodamina Metil Ester (TMRM), 5,6-clorometil- 2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato, acetil Ester (CM-H_2DCFDA) e meio de cultura celular "Minimum Essential Medium" (MEM) (GIBCO) foram obtidos da Life-Technologies (EUA). Kit para dosagem da desidrogenase láctica (LDH) foi adquirida da Labtest Diagnóstica S.A. Anexina-V-FITC foi obtida da Proteimax (Brasil). Cisplatina (cDDP) foi obtida da Cirúgica Mafra-Medicamentos e Materiais Hospitalares (Brasil). Os demais reagentes utilizados nesse trabalho são de grau analítico e as soluções foram preparadas usando água preparadas sucessivamente em aparelhos MilliRO e MilliQ (Millipore Co.,USA).

3.2. Cultivo de Células

As células HepG2 (American Type Culture Colletion, nº HB8065) foram cultivadas em estufa climatizada com atmosfera contendo 5% de CO_2 e 95% O_2 e temperatura de 37º C. As culturas foram realizadas, em frascos de cultivo, utilizando MEM (contendo l-glutamina 2mmol/L e sais de Earle ajustado com 1,5g/L de bicarbonato de sódio, aminoácidos não-essenciais 0,1 mmol/L e piruvato de sódio 1mmol/L) sendo suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibiótico-antimicótico 1,2g/L até atingirem confluência adequada (70 ou 80%) para o inicio dos testes. As células foram plaqueadas e cultivadas por um período de 24 horas antes de cada ensaio visando garantir uma boa aderência para início dos tratamentos.

As células foram então incubadas com as soluções dos três congêneres de PBDEs no mesmo meio de cultura com volumes nunca superiores a 10µL e as culturas controles receberam a mesma quantidade de DMSO. Ao término de cada tratamento as células foram lavadas com solução salina tamponada e submetidas aos procedimentos analíticos descritos a seguir (ZEGURA *et al*., 2004).

3.3. Proliferação Celular

O ensaio visando avaliar a proliferação celular diante de diferentes concentrações dos congêneres de PBDEs, foi realizado utilizando o corante sulforodamina B (SBR Assay) de acordo com o protocolo de Skenan *et al.* (1990). A sulforodamina B é um corante capaz de ligar-se estequiometricamente com os aminoácidos básicos da proteína celular (PAPAZISIS *et al*., 1997, VICHAI; KIRTIKARA, 2006), sendo portanto, amplamente utilizado nos ensaios de proliferação pois a quantidade de corante aderida na parede celular é proporcional ao número de células presentes ao final do ensaio.

Aproximadamente $5x10^4$ células/mL de meio de cultura foram incubadas com os PBDEs em placas de 24 poços perfazendo as concentrações finais de 0,1µmol/L; 0,5µmol/L; 1µmol/L; 5µmol/L; 10µmol/L e 25µmol/L por períodos de 24 e 48 horas. Cada concentração foi realizada em triplicata e após cada período de tratamento, o meio de cultivo foi descartado e as células lavadas com solução salina tamponada (Phosphate Buffered Saline-PBS) e posteriormente com água destilada para remoção de traços salinos oriundos da solução salina.

Após esta etapa, as células foram secas a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos e fixadas no interior das placas. A fixação foi realizada pela exposição das células a 1 ml de solução de 1% Metanol em Acido Acético (1%) por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, o meio foi descartado e as células fixadas foram marcadas com 500µL de solução 0,5% SBR em 1% Ácido Acético por 1 hora.

As células marcadas com sulforodamina B foram lavadas com solução ácido acético 1% para remoção do excesso de SRB contido no interior de cada poço e o corante aderido na membrana das células fixadas foi então, solubilizado utilizando 1 ml de solução de tampão Tris 10mmol/L com pH: 10.

Posteriormente, foi realizada a leitura da absorvância do corante solubilizado utilizando Espectrofotômetro UV Visível Cary 50 Bio com comprimento de onda de 540 nm e os resultados da absorvância obtidos foram expressos em porcentagem em relação ao grupo controle de análise sem adição de PBDEs.

3.4. Viabilidade Celular

A avaliação da viabilidade das células HepG2 foi realizada, utilizando o corante MTT - brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2-il) - 2,5 difenil tetrazolium, (MTT Assay), de acordo com o protocolo de Denizot e Lang (1986). Durante o ensaio o corante é clivado pelas desidrogenases mitocondriais das células funcionais, o que leva a redução do mesmo formando o composto "sal de Formazan" de coloração roxa. Sendo assim, neste procedimento a quantidade de Formazan produzida é utilizada como indicativo proporcional da quantidade de células viáveis no ensaio.

Aproximadamente $2x10^3$ células/200µL de meio de cultura foram incubadas com os PBDEs, em placas de cultivo contendo 96 poços, perfazendo as concentrações finais de 0,1µmol/L; 0,5µmol/L; 1µmol/L; 5µmol/L; 10µmol/L e 25µmol/L por períodos de 24 e 48 horas. Cada concentração foi realizada em triplicata e após cada período de tratamento, o meio de cultivo foi descartado, as células lavadas com solução da salina tamponada e, em seguida, foram adicionados 180µL de MEM sem vermelho de fenol e 20µL de solução MTT 0,5% em PBS (5mg/mL). A placa de cultura foi então, protegida da luz e incubada por 3 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO_2, a temperatura de 37º C.

Ao término desta etapa, o conteúdo de cada poço foi descartado e adicionado 200µL de DMSO juntamente com 25µL de solução tampão glicina 0,2mol/L, pH: 10,2 para solubilização do "sal de Formazan" obtido. Para uma solubilização mais adequada foi realizado a homogeneização do conteúdo de cada poço e realizada a leitura da absorvância em comprimento de onda de 570 nm e os resultados da absorvância obtidos foram expressos em porcentagem em relação ao grupo controle de análise.

3.5. Potencial de Membrana Mitocondrial

O indicativo inicial de morte em culturas celulares pode ser avaliado através da despolarização mitocondrial, uma vez que o colapso do potencial de membrana compromete a manutenção da fosforilação oxidativa e conseqüentemente pode danificar a integridade celular. A despolarização mitocondrial pode ser avaliada pela fluorescência da Tetrametilrodamina Metil Ester (TMRM), um composto catiônico permeável à membrana celular, que é rapidamente seqüestrado pelas mitocôndrias intactas das células e produz uma relação estequiométrica entre a fluorescência da substância e o potencial de membrana mitocondrial da célula.

Aproximadamente $1x10^5$ células/mL de meio de cultura foram incubadas com os PBDEs em placas de cultivo contendo 12 poços perfazendo as concentrações finais representativas dos maiores resultados significativos nos ensaios de viabilidade e proliferação celular. Após o período de tratamento adequado (24 ou 48 horas) as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e incubadas, por 30 minutos a temperatura de 37 °C, com solução de TMRM perfazendo a concentração de 6,6µmol/L, Ao final desta etapa, as amostras foram centrifugadas a 200 *g* por 5 minutos, lavadas com meio de cultura e o sedimento ressuspendido com 2 mL de solução Triton X-100, 0,1% (v/v).

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2000 g por 5 mim e a fluorescência da TMRM captada e retida pelas mitocôndrias foi determinada no sobrenadante utilizando o espectrofluorímetro F-4500 (Hitachi, Tokyo, Japan) com comprimentos de ondas de excitação e emissão de 485 e 590 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem da intensidade da fluorescência (captação da TMRM) em relação ao grupo controle de amostras

3.6. Acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ocasionar estresse oxidativo citotóxico, levando a morte celular por necrose ou apoptose dependendo da quantidade de EROs produzida. A quantidade de EROs pode ser facilmente avaliada pelo emprego da 5,6-clorometil- 2',7'-diclorodihidrofluoresceina diacetato, acetil éster (CM-H_2DCFDA), indicador de espécies reativas de oxigênio, que se torna fluorescente com a oxidação do meio intracelular.

Aproximadamente $1x10^5$ células/mL de meio de cultura foram incubadas com os PBDEs em placas de cultivo contendo 12 poços perfazendo as concentrações finais representativas dos maiores resultados significativos nos ensaios de viabilidade e proliferação celular. Após o tratamento (24 ou 48 horas) as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e incubadas com solução de CM-H_2DCF-DA, 2mmol/L, a 37 °C, por 1 hora.

Após esse período, as células foram centrifugadas a 1000 *g* a temperatura de 4°C por 5 minutos, seguido pelo descarte do sobrenadante, lavagem e homogeneização das células aderentes utilizando PBS. A fluorescência da CM-H_2DCF-DA foi determinada utilizando o espectrofluorímetro F-4500 (Hitachi, Tokyo, Japan) com comprimentos de ondas de excitação e emissão de 503 e 528 nm, respectivamente.

Os resultados foram expressos em porcentagem de intensidade da fluorescência em relação ao grupo de amostras controle. Para indução do estresse oxidativo as células foram tratadas com solução de TBHP (terc-butil hidro-peróxido) a 100µmol/L por 2 horas em meio de cultura.

3.7. Exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana celular

A utilização de Anexina V, uma proteína com grande afinidade pelos fosfolipídeos da membrana celular, conjugada com agentes fluorescentes é amplamente utilizada para avaliar ensaios com evidências de morte celular por mecanismos de apoptose. Isto ocorre, principalmente, devido ao fato da exposição da fostatidilserina na face externa da membrana celular ser considerada um dos primeiros eventos indicativos de morte celular por via apoptótica (ZHIVOTOVSKY *et al*., 1999).

Desta forma, para realização do ensaio, aproximadamente $1x10^5$ células/mL foram cultivadas em placas de 12 poços e tratadas com os congêneres nas concentrações que apresentaram resultados significativos nos ensaios de viabilidade e proliferação celular. Após o período de tratamento (24 ou 48 horas) as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 750 g por 5 min.

Em seguida, as células foram lavadas novamente com PBS e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. As células aderentes foram ressuspensas em 200µL de solução contendo 0,25µg/mL de Anexina e 0,5µg/mL de iodeto de propídio (PI) e incubadas por 15 minutos em gelo. Posteriormente, as células foram analisadas no citômetro de fluxo FACscanto (Becto Dickson, San Jose, CA).

3.8. Integridade da Membrana Celular

A lactato desidrogenase (LDH, EC: 1.1.1.27) é uma enzima citosólica presente em vários organismos que atua no sistema glicolítico e no metabolismo anaeróbico através da catálise reversível de piruvato a lactato ao final da via glicolítica com o auxílio do sistema de coenzimas $NADH/NAD^+$ .Sendo assim, a perda da integridade da membrana pode ser medida pela quantificação da enzima LDH liberada no meio de cultivo através da reação a seguir:

$$\textbf{Piruvato} + \textbf{NADH} + \textbf{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \textbf{Lactato} + \textbf{NAD}^+$$

Nesse sistema ocorre o decréscimo da absorvância inicial devido à oxidação do NADH. O declínio da absorvância é proporcional a atividade da desidrogenase láctica liberada após a ruptura da membrana, (KOH; CHOI, 1987). Antigamente, esse ensaio se mostrava eficiente, apenas, em análises de morte celular necróticas, no entanto, o princípio, também, tem se mostrado útil na determinação de vias apoptóticas, baseando-se na velocidade da conversão das coenzimas (KOH; GOTMAN, 1992; GWAG *et al*., 1995; LI; ZHANG, 1997; LOBNER, 2000).

Portanto, neste ensaio, aproximadamente $1x10^5$ células/mL de meio de cultura foram incubadas com os PBDEs, em placas de cultivo contendo 12 poços, perfazendo as concentrações que apresentaram resultados significativos nos ensaios de viabilidade e proliferação celular. Após o período de tratamento (24 ou 48 horas), o meio de cultivo das células foi recolhido e mantido em gelo até o momento da detecção da atividade da LDH.

As células aderidas nas placas de culturas foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 750 g por 5 min. Posteriormente, as células com ruptura na membrana celular foram quantificadas pelo método de exclusão de azul de tripan.

A atividade da lactato desidrogenase, presente no meio de cultura, foi determinada com a utilização do substrato presente no kit comercial LDH UV (Labtest), contendo NADH 0,18 mmol/L, solução tampão 50 mmol/L, piruvato de sódio 0,61 mmol/L e azida sódica 1,5 mmol/L preparado imediatamente antes do uso. Sendo assim, 20µL do meio de cultivo, acondicionados em gelo, foram adicionados a uma cubeta, termostatizada a temperatura de 37°C, contendo 1 mL do substrato oriundo do kit comercial.

A leitura da absorvância da solução obtida (substrato + meio de cultivo) foi realizada utilizando comprimento de onda de 340 nm durante 4 minutos em espectrofotômetro Hitachi U-2910 e convertida em valores de atividade da LDH utilizando a fórmula de conversão, a seguir, sugerida no kit:

$$\textbf{Atividade (LDH)} = [(Abs_{inicial} - Abs_{final}) / \textbf{tempo de leitura}] \times \textbf{fator de conversão}$$

No controle positivo as células foram lisadas através da incubação, durante 15 minutos, a temperatura de 37°C, com solução de triton X-100 (0,2%). Após esse procedimento, o meio de incubação foi centrifugado a 755 *g* por 10 minutos e a

atividade da LDH no sobrenadante foi determinada pela leitura da absorvância do mesmo após contato com o substrato.

3.9. Fragmentação Nuclear

A morte celular por vias apoptóticas pode ser facilmente detectada pela visualização de fragmentos internucleossômicos do DNA, pois, este é um dos eventos característicos ocorridos durante os processos apoptóticos.

O Hoechst 33342 é um corante fluorescente, permeável a membrana celular, capaz de ligar- se com os ácidos nucléicos do DNA celular, mais especificamente com as porções ricas em timina e adenina, sendo útil na determinação dos fragmentos nucleares (POLLACK; CIANCIO, 1991). Portanto, neste ensaio, o núcleo celular é corado com solução de Hoechst 33342 e os fragmentos nucleares provenientes do processo apoptótico são quantificados por microscopia de fluorescência.

Desta forma, na realização desse ensaio, aproximadamente $1x10^4$ células/mL de meio de foram cultivadas e tratadas, com os PBDEs, sobre lamínulas em placas de cultivo contendo 12 poços, perfazendo as concentrações com resultados significativos nos ensaios de viabilidade e proliferação celular. Após o período de tratamento adequado (24 ou 48 horas), as células foram lavadas com PBS e fixadas sobre lamínulas com metanol por 2 horas em temperatura de -20ºC.

Posteriormente, procedeu-se a marcação das células com solução de Hoechst 33342 na concentração de 5µg/mL por período de 30 minutos em temperatura de 37 ºC, seguido pela montagem das mesmas sobre lâminas de vidro. O controle positivo do ensaio foi realizado pela incubação das células com cisplatina 1g/L, na concentração de 100µmol/L, por 2 horas e a análise da fragmentação nuclear foi realizada utilizando microscópio de fluorescência Leica DM5000 B e as imagens capturadas usando o programa LAS core 3.8. Foram quantificadas 300 células em cada ensaio e os núcleos com fragmentação foram expressos como porcentagem em relação ao número de células totais.

3.10. Análise Estatística

Os resultados dos dados experimentais foram avaliados pela análise da variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnet para comparação dos diversos grupos tratados em relação aos seus controle utilizando o programa GraphPrism, versão 5.0 para

Windows. Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

4. Resultados

4.1. Proliferação e Viabilidade Celular

O efeito ocasionado pela exposição ao congênere PBDE-209 sobre o crescimento das células HepG2, no período de 24 e 48 horas, pode ser visualizado na Figura 4. Observa-se que o composto interfere significativamente no crescimento celular em concentrações iniciais de 5µmol/L a qual é intensificada após exposição prolongada, além de ocasionar inibição em dosagens menores.

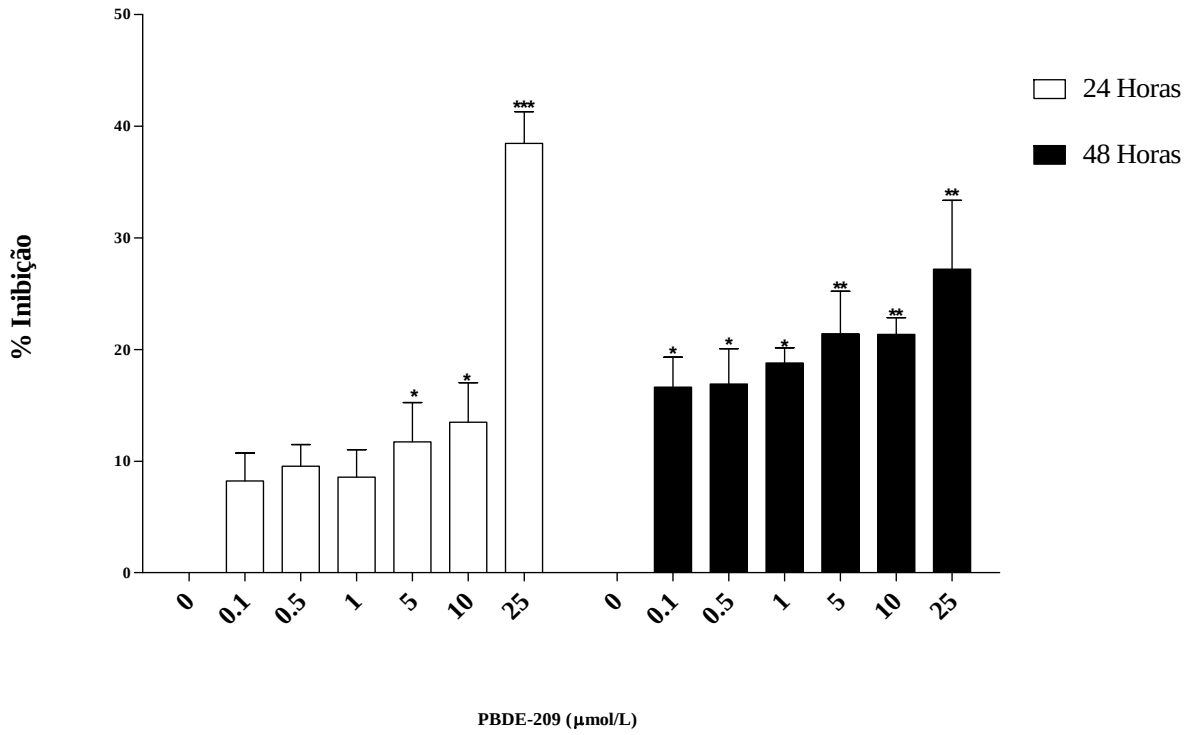


Figura 4. Efeito do congênere PBDE-209 sobre a proliferação celular da linhagem HepG2 após 24 e 48 horas de exposição. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle (sem adição de PBDEs) mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001, **p<0,01 e *p < 0,05.

Foi observado que a inibição é acompanhada pela tendência ao declínio da viabilidade e produz resultados significantes na concentração de 25µmol/L em ambos os períodos investigados (Figura 5). Além disso, nota se que o congênere provoca alterações na proliferação celular a partir da concentração de 0,1µmol/L, no entanto é observado decréscimo nas taxas de inibição total da maior concentração se, comparada com o período de exposição de 24 horas. Este fato pode ocorrer como conseqüência da instabilidade do composto, o qual pode sofrer degradação formando compostos de ação desconhecida e

sugerindo a necessidade de maiores investigações sobre a ação dos produtos do metabolismo deste congênere para esclarecer o efeito obtido nesta concentração.

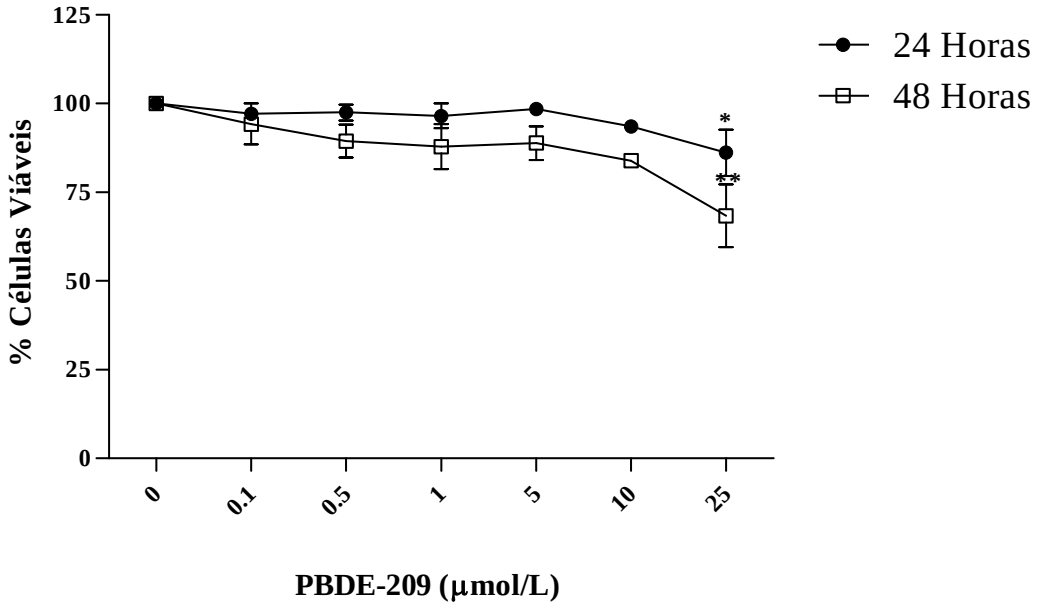


Figura 5. Efeito do congênere PBDE-209 sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 após 24 e 48 horas de exposição. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle (sem adição de PBDEs) mostrou resultados estatisticamente significativos com **p < 0.01 e *p < 0,05.

Desta forma, a análise do efeito provocado na homeostase celular fornece indícios de efeitos citostáticos em baixas concentrações, responsáveis, primeiramente, pela parada no crescimento celular, que pode com a exposição prolongada aumentar a sensibilidade das células, e ocasionar parada no crescimento celular em concentrações menores. Além dos efeitos citostáticos, é demonstrado que o composto apresenta um leve potencial citotóxico, uma vez que as taxas de inibição da concentração de 25 µmol/L observadas na Figura 4, em ambos os períodos de exposição, são acompanhadas significativamente pelo declínio da função mitocondrial avaliada pelo teste do MTT, sendo este um indicativo de morte celular.

Já as alterações ocasionadas pela exposição ao congênere PBDE-99, em ambos períodos de exposição (Figura 6), revelaram que o PBDE-99 apresenta potencial de inibição da proliferação celular significativo a partir da concentração de 10µmol/L após 24 horas de incubação com o composto, sendo acompanhado por um declínio significativo somente na maior concentração avaliada (Figura 7) .

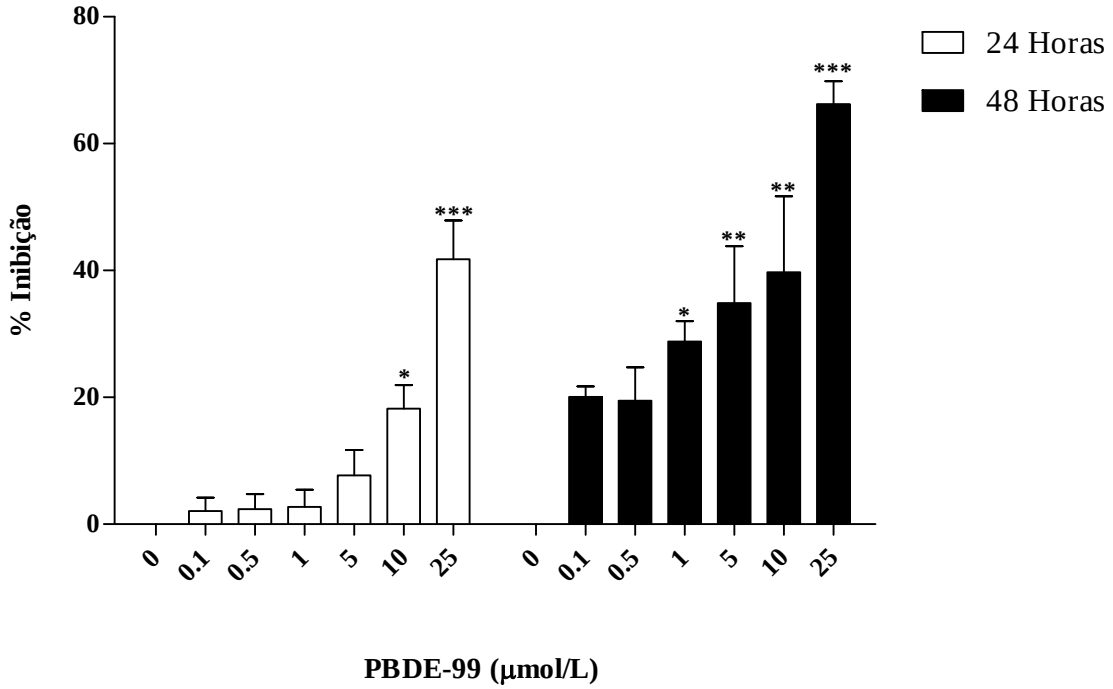


Figura 6. Efeito do congênere PBDE-99 sobre a proliferação celular da linhagem HepG2 após 24 e 48 horas de exposição. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle (sem adição de PBDEs) mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001, ***p < 0.01 e *p < 0,05.

Observa-se ainda que os efeitos do congênere PBDE-99 ocorrem de forma concentração e tempo dependente. Nestes mesmos períodos de exposição ao composto observou-se um decréscimo significativo na viabilidade celular, sugerindo assim, que o composto sob investigação apresenta forte potencial citotóxico sobre a linhagem HepG2, sendo seus efeitos agravados com a exposição por períodos prolongados.

Por fim, a análise do efeito do PBDE-47 sobre a proliferação e viabilidade das células HepG2 são demonstrados nas Figuras 8 e 9. É observado que o PBDE-47 interfere no crescimento celular a partir da concentração de 5µmol/L, demonstrando ser o congênere que apresenta resultados significativos em menor concentração dentre os três testados após 24 horas de exposição ao composto. Além disso, este congênere apresentou as maiores porcentagens de inibição da proliferação sendo obtidas taxas maiores que 50% em curto tempo de exposição e aumentando significativamente com a exposição a um tempo prolongado.

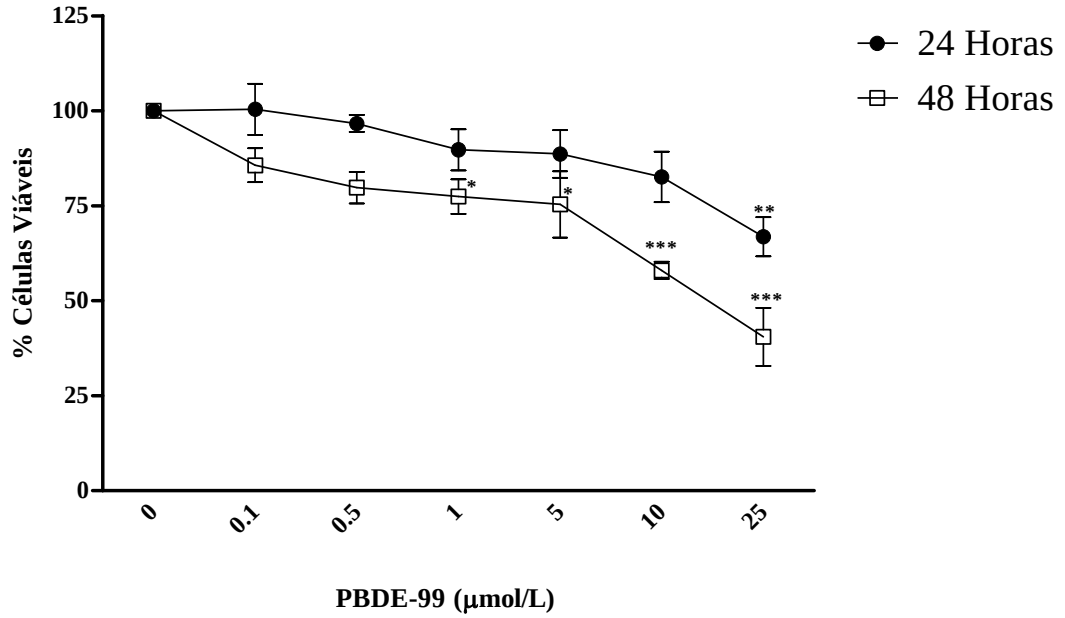


Figura 7. Efeito do congênere PBDE-99 sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 após 24 e 48 horas de exposição. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle negativo (sem adição de PBDEs) mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001, **p < 0.01 e *p < 0,05.

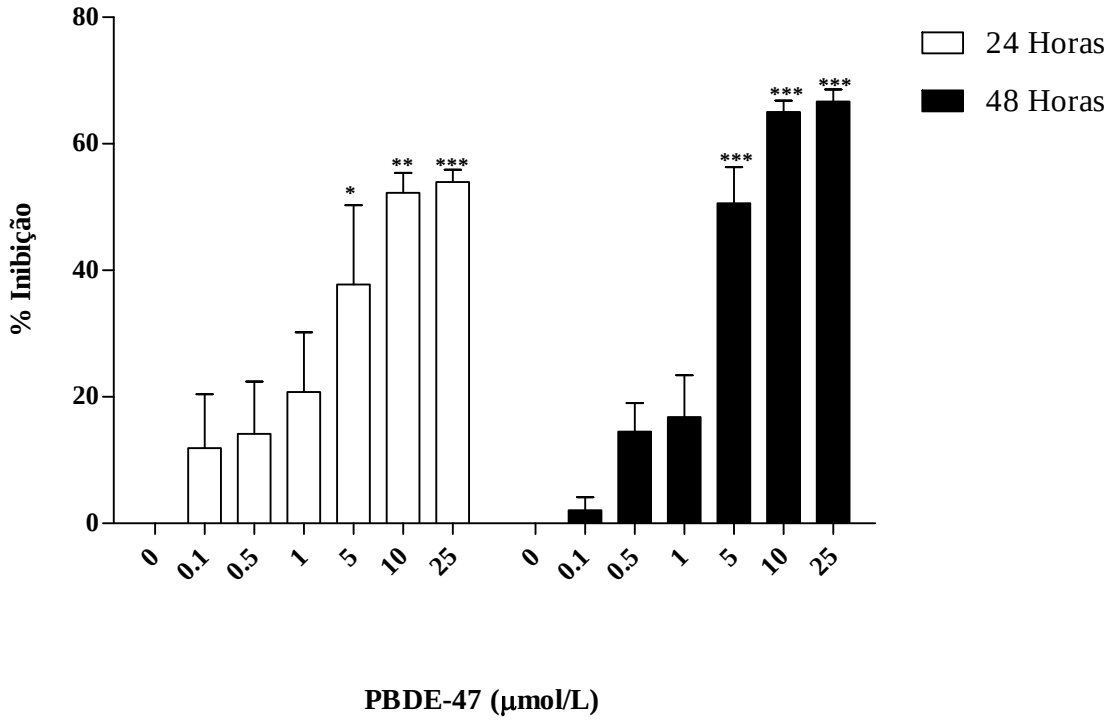


Figura 8. Efeito do congênere PBDE-47 sobre a proliferação celular da linhagem HepG2 após 24 e 48 horas de exposição. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle negativo (sem adição de PBDEs) mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001, **p < 0.01 e *p < 0,05.

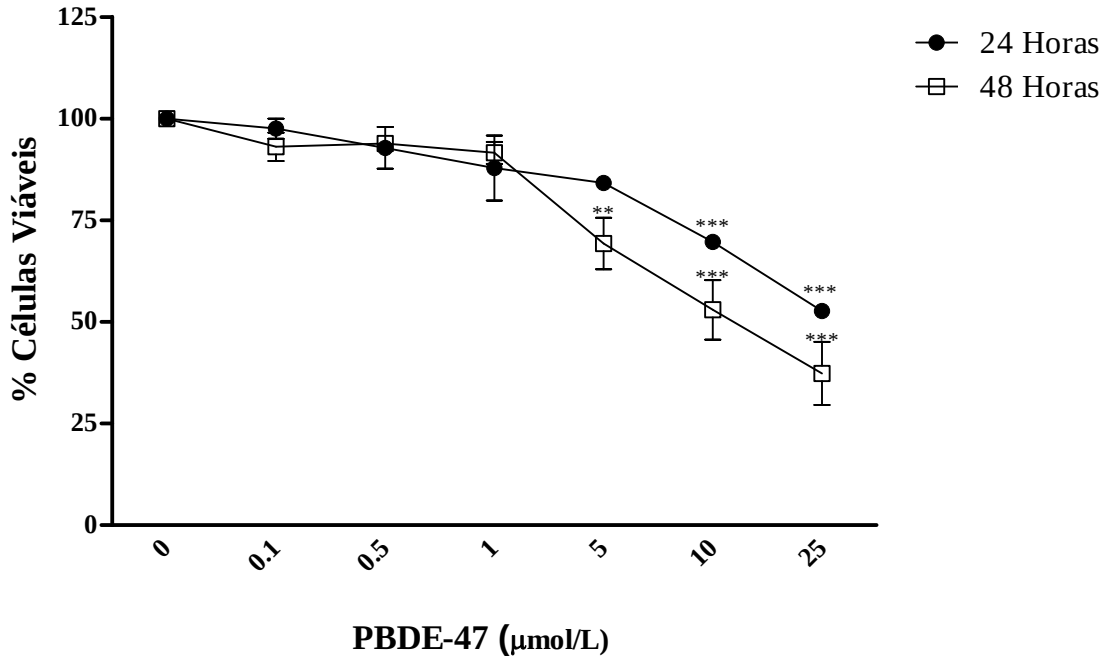


Figura 9. Efeito do congênere PBDE-47 sobre a viabilidade celular da linhagem HepG2 após 24 e 48 horas de exposição. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle negativo (sem adição de PBDEs) mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 e **p < 0.01.

A inibição do crescimento celular ocasionada pela exposição ao PBDE-47 foi acompanhada pelo declínio da viabilidade, sendo demonstrado que embora, ainda não seja possível visualizar, após 24 horas de exposição, resultados significativos na concentração de 5µmol/L, é visível a tendência ao declínio a partir desta dosagem.

Desta forma, observa-se que os congêneres PBDE-209, PBDE-99 e PBDE-47 podem interferir na proliferação celular de diversas maneiras sugerindo que a ação destes compostos esteja relacionada com mecanismos citostáticos e citotóxicos.

4.2. Potencial de Membrana Mitocondrial (PMM)

As alterações no potencial de membrana mitocondrial ocasionadas pela exposição ao PBDE-209 são representadas na Figura 10. Observa-se que o composto não provoca alterações significativas em curto período de avaliação (Figura 4A), no entanto, com o decorrer da exposição é possível visualizar decréscimo significativo na maior concentração analisada, reforçando a presença de indícios citotóxicos do composto.

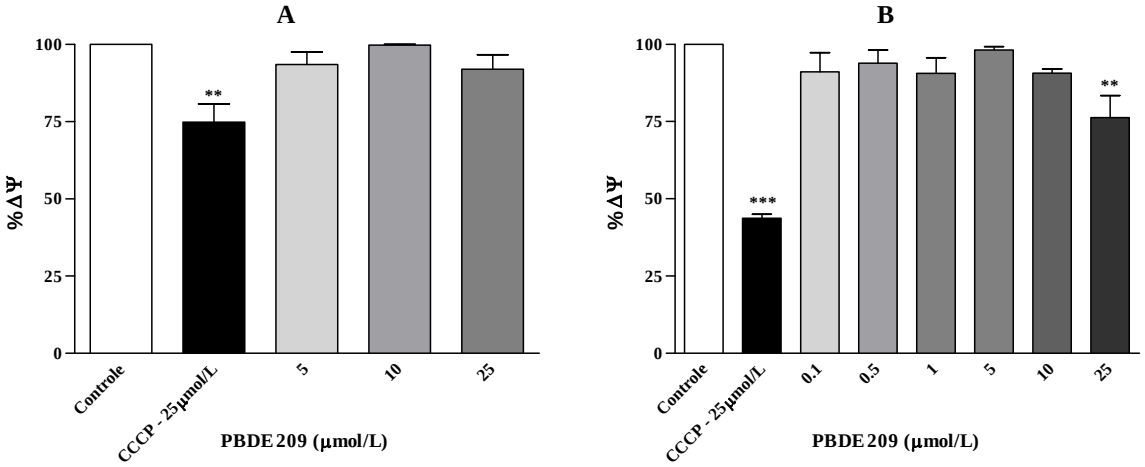


Figura 10. Efeito do congênere PBDE-209 sobre o potencial de membrana mitocondrial da linhagem HepG2. O gráfico A representa o comportamento após 24 horas de exposição e em B é representado o comportamento em 48 horas de exposição. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle negativo (Sem adição de PBDEs) mostrou resultados estatisticamente significativos com **p < 0.01. O controle positivo foi realizado utilizando CCCP (25µmol/L).

As ações do congênere PBDE-99 sobre o PMM das células HepG2 são demonstradas na Figura 11, onde é possível observar a tendência a diminuição do PMM em 24 horas de exposição nas menores concentrações resultando em decréscimos significativos com a concentração de 25µmol/L. A exposição prolongada a este congênere demonstrou que com o aumento da exposição a diminuição do PMM é mais intensa, sendo observado no período de 48 horas declínio nos valores totais do potencial de membrana mitocondrial em todas as concentrações investigadas.

Estes resultados demonstram que o PBDE-99 induz uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial de forma tempo e concentração dependente.

Não foram observados resultados significativos na diminuição do PMM após a incubação com 10µmol/L do composto por 24 horas, embora ocorra tendência ao declínio da viabilidade celular neste período. Isso sugere que a disfunção mitocondrial induzida pelo composto neste tempo e concentração seja de baixa intensidade, e sofra ação do sistema de restauração de dano celular, que pode eliminar as organelas defeituosas. No entanto, com o aumento do tempo de exposição, este sistema não é suficiente e os danos sobre o potencial de membrana mitocondrial podem ser visualizados.

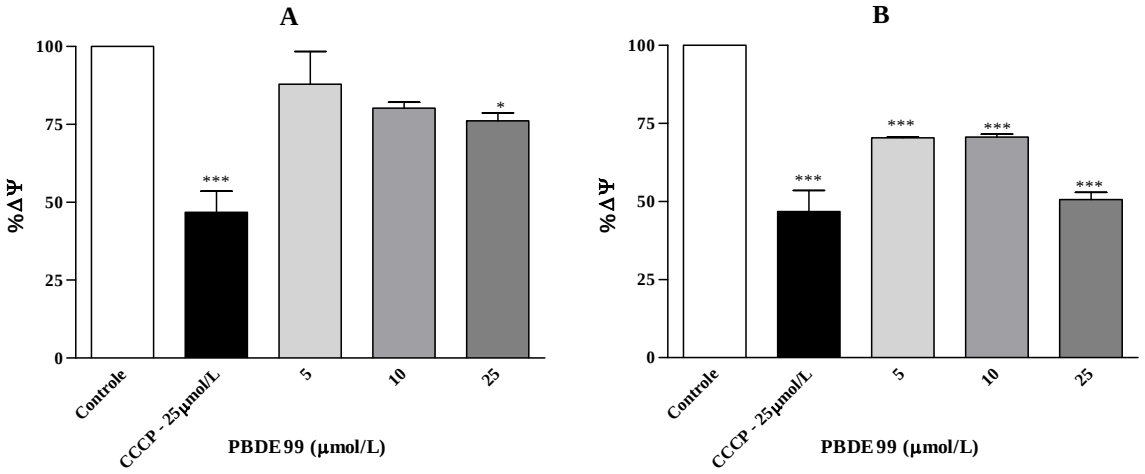


Figura 11. Efeito do congênere PBDE-99 sobre o potencial de membrana mitocondrial da linhagem HepG2. O gráfico A representa o comportamento após 24 horas de exposição e em B é representado o comportamento em 48 horas de exposição. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle negativo (sem adição de PBDE) mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 e *p < 0.05. . O controle positivo foi realizado utilizando CCCP (25µmol/L).

Os efeitos do congênere BDE-47 sobre o PMM obtidos (Figura 12) demonstraram uma queda no potencial de membrana mitocondrial, em ambos os períodos de análise investigados, utilizando as mesmas concentrações. Além disso, é possível perceber que o composto, assim como o congênere PBDE-99, provoca a diminuição do potencial de membrana mitocondrial de forma tempo e concentração dependentes.

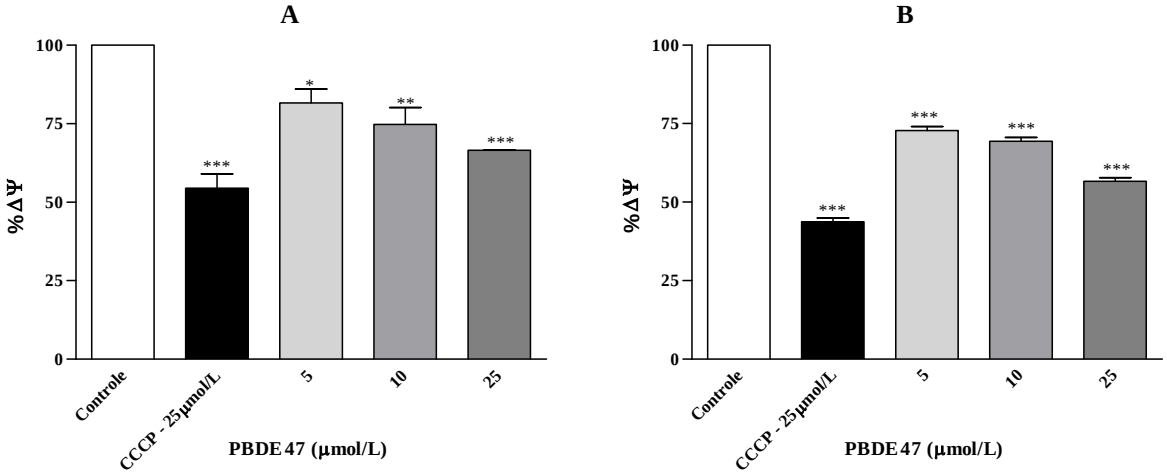


Figura 12. Efeito do congênere PBDE-47 sobre o potencial de membrana mitocondrial da linhagem HepG2. O gráfico A representa o comportamento após 24 horas de exposição e em B é representado o comportamento em 48 horas de exposição. Os gráficos representam média média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 , **p < 0.01 e *p < 0.05. O controle positivo foi realizado utilizando CCCP (25µmol/L).

Os resultados obtidos na análise do potencial de membrana mitocondrial dos três congêneres investigados corroboram os indícios do potencial tóxico, além de evidenciar os danos mitocondriais induzidos pelos PBDEs e sugerir uma via de morte celular ativada por mecanismos dependentes de falhas na mitocôndria.

4.3. Acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A avaliação do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) na linhagem HepG2 ocasionada pela exposição ao PBDE-209 é apresentada na Figura 13.

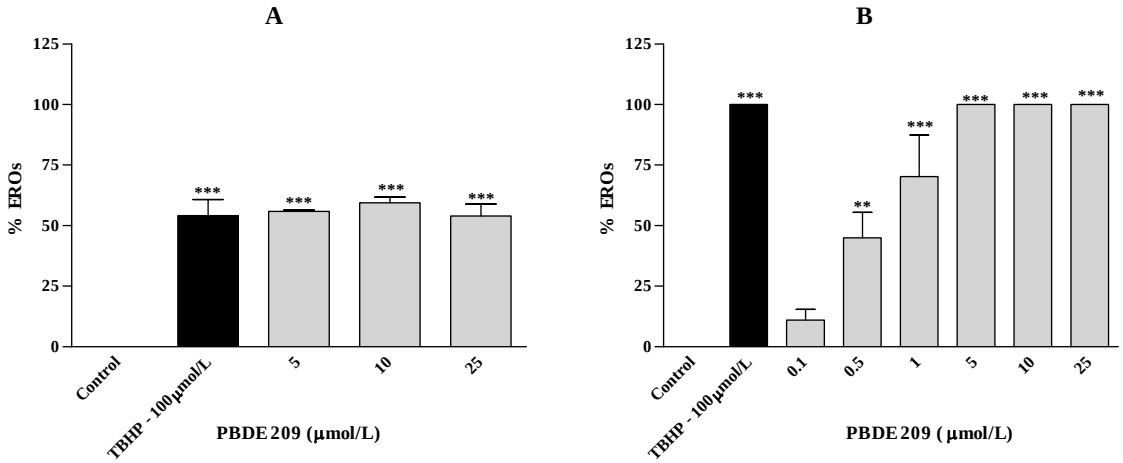


Figura 13. Acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) na linhagem HepG2 ocasionado pela exposição ao PBDE-209. O gráfico A representa o comportamento após 24 horas de exposição e em B é representado o comportamento em 48 horas de exposição. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle negativo (sem adição de PBDE) mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001, **p < 0.01. O controle positivo foi realizado utilizando TBHP (100µmol/L).

O congênere PBDE-209 mostrou ser responsável pelo acúmulo de EROs em taxas superiores a 50% nas concentrações de 5µmol/L, 10µmol/L e 25µmol/L, já após 24 horas de incubação com o composto. Com o aumento do tempo de exposição houve uma elevação do acúmulo de EROs de forma concentração dependente; observou-se também a capacidade de indução do acúmulo de EROs a partir da concentração de 0,5µmol/L.

A concentração de 25µmol/L demonstrou uma alta porcentagem de acúmulo de EROs (114 ±17,57) em relação ao grupo controle, mostrando assim, o forte potencial oxidativo do congênere, sendo sugerida uma relação entre esse resultado e o declínio do potencial de membrana mitocondrial obtido na mesma concentração.

O declínio do potencial de membrana mitocondrial pode ocasionar estresse oxidativo citotóxico, uma vez que, este decréscimo pode interferir na produção de ATP. É conveniente ressaltar que nas demais concentrações analisadas, também foram obtidas taxas significativas de acúmulo de EROs, sendo sugerido que este acúmulo também esteja envolvido com os efeitos citostático obtidos pela exposição ao composto.

O acúmulo de EROs ocasionado pela exposição ao PBDE-99 pode ser visualizado na Figura 14, onde se demonstra que o composto é responsável pelo acúmulo significativo de espécies reativas de oxigênio 25µmol/L (24 horas) e 5µmol/L (48 horas) em ambos os períodos investigados. Além disso, é possível visualizar que o efeito deste congênere é intensificado com o aumento do tempo de incubação.

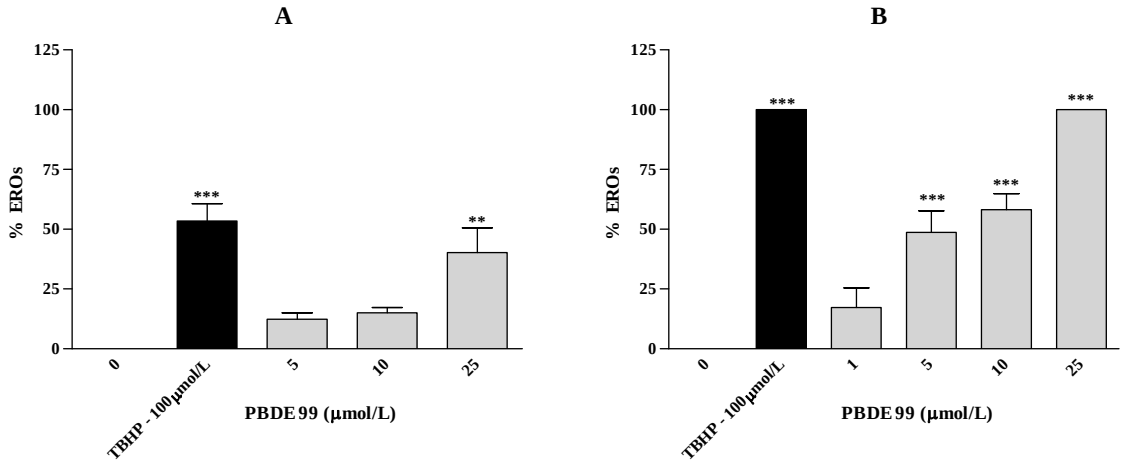


Figura 14. Acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) na linhagem HepG2 ocasionado pela exposição ao PBDE-99. O gráfico A representa o comportamento após 24 horas de exposição e em B é representado o comportamento em 48 horas de exposição. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle negativo (sem adição de PBDE) mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 e **p < 0.01. O controle positivo foi realizado utilizando TBHP (100µmol/L).

O congênere PBDE-47 também demonstrou potencial para acúmulo de EROS em ambos os períodos avaliados de forma concentração e tempo dependentes, conforme pode ser visualizado na Figura 15.

A análise do acúmulo de EROS mostrou a capacidade dos PBDEs em alterar o comportamento celular ocasionando uma elevação pronunciada destes compostos na célula, podendo o mesmo estar interligado com os mecanismos citotóxicos dos compostos, uma vez que a elevação dos níveis de EROs acima da capacidade redox das células pode resultar em estresse oxidativo citotóxico.

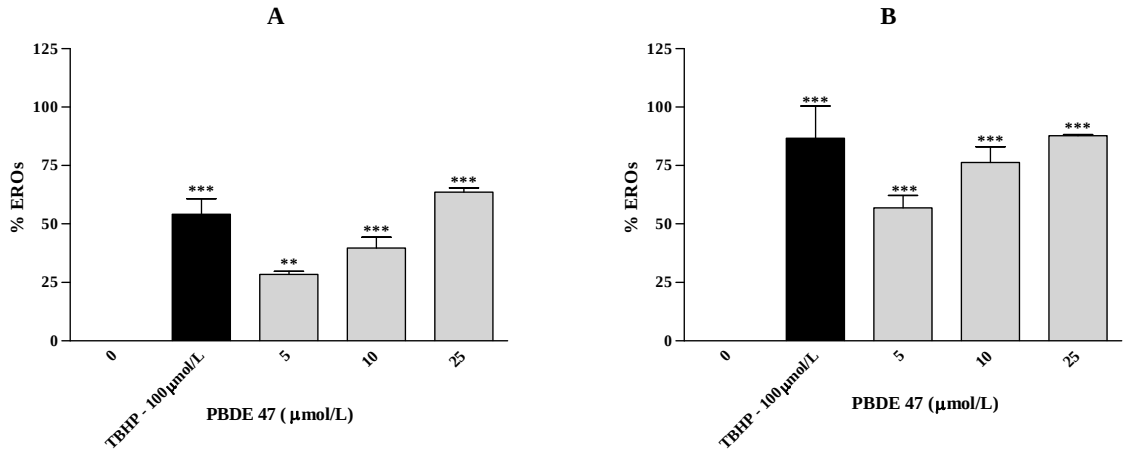


Figura 15. Acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) na linhagem HepG2 ocasionado pela exposição ao PBDE-47. O gráfico A representa o comportamento após 24 horas de exposição e em B é representado o comportamento em 48 horas de exposição. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle negativo (sem adição de PBDEs) mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001, **p < 0.01. O controle positivo foi realizado utilizando TBHP (100µmol/L).

4.4. Exposição da fosfatidilserina na face externa da membrana celular

Para a análise do tipo de morte celular induzida pelos PBDEs, o primeiro parâmetro analisado foi a exposição da fosfatidilserina. Os resultados referentes à incubação com o congênere PBDE-209 por 24 horas podem ser visualizados nas Figuras 16 e 17. Para a análise foi utilizada a concentração de 25µmol/L, pois foi a única a apresentar uma diminuição significativa no teste do MTT. Não foi observada a presença de células com danos necróticos visíveis em 24 horas de exposição e apenas uma pequena morte por apoptose indicada pela exposição da fosfatidilserina neste período. A exposição da fosfatidilserina induzida por este composto é, no entanto, intensificada com o aumento do tempo de incubação para 48 horas (Figuras 18 e 19), sendo possível a detecção deste efeito em concentração menor (10µmol/L) do que a obtida no período de incubação anterior, confirmando a presença de mecanismos apoptóticos nas maiores concentrações e em períodos de incubação prolongados.

As concentrações menores que 25µmol/L, no ensaio de 24 horas, e, 10µmol/L no ensaio de 48 horas, usando o PBDE-209 não foram avaliadas, pois as mesmas não induziram declínio da função mitocondrial pelo ensaio de MTT.

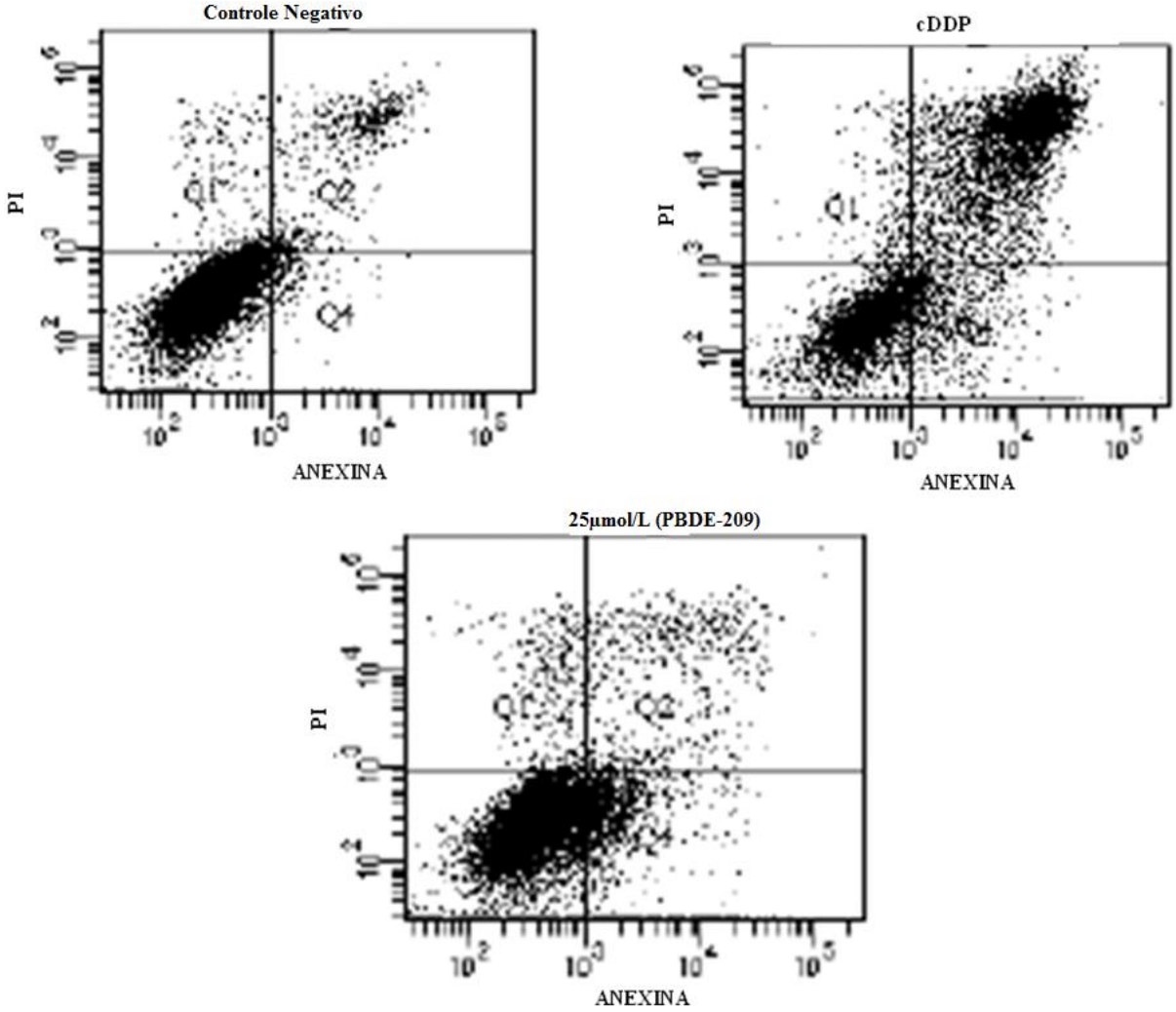


Figura 16. Efeito do congênere PBDE-209 sobre a exposição da fosfatidil serina da membrana externa de células HepG2 após 24 horas de exposição. As figuras são representativas de triplicatas de experimentos independentes. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

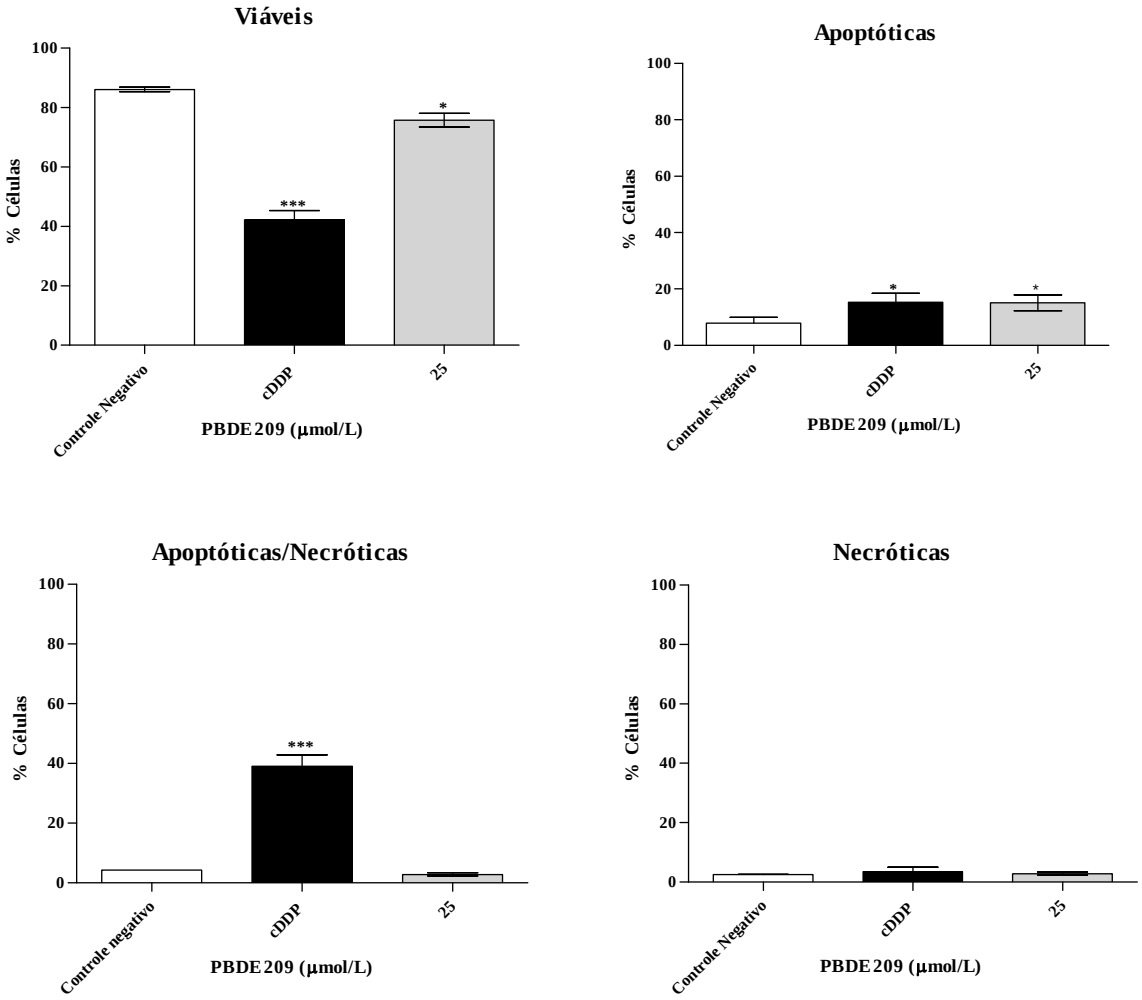


Figura 17. Exposição da fosfatidilserina ocasionada pelo PBDE-209 após 24 horas de exposição. Os gráficos representam média ±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle negativo mostrou resultados estatisticamente significativos com *p < 0.05. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

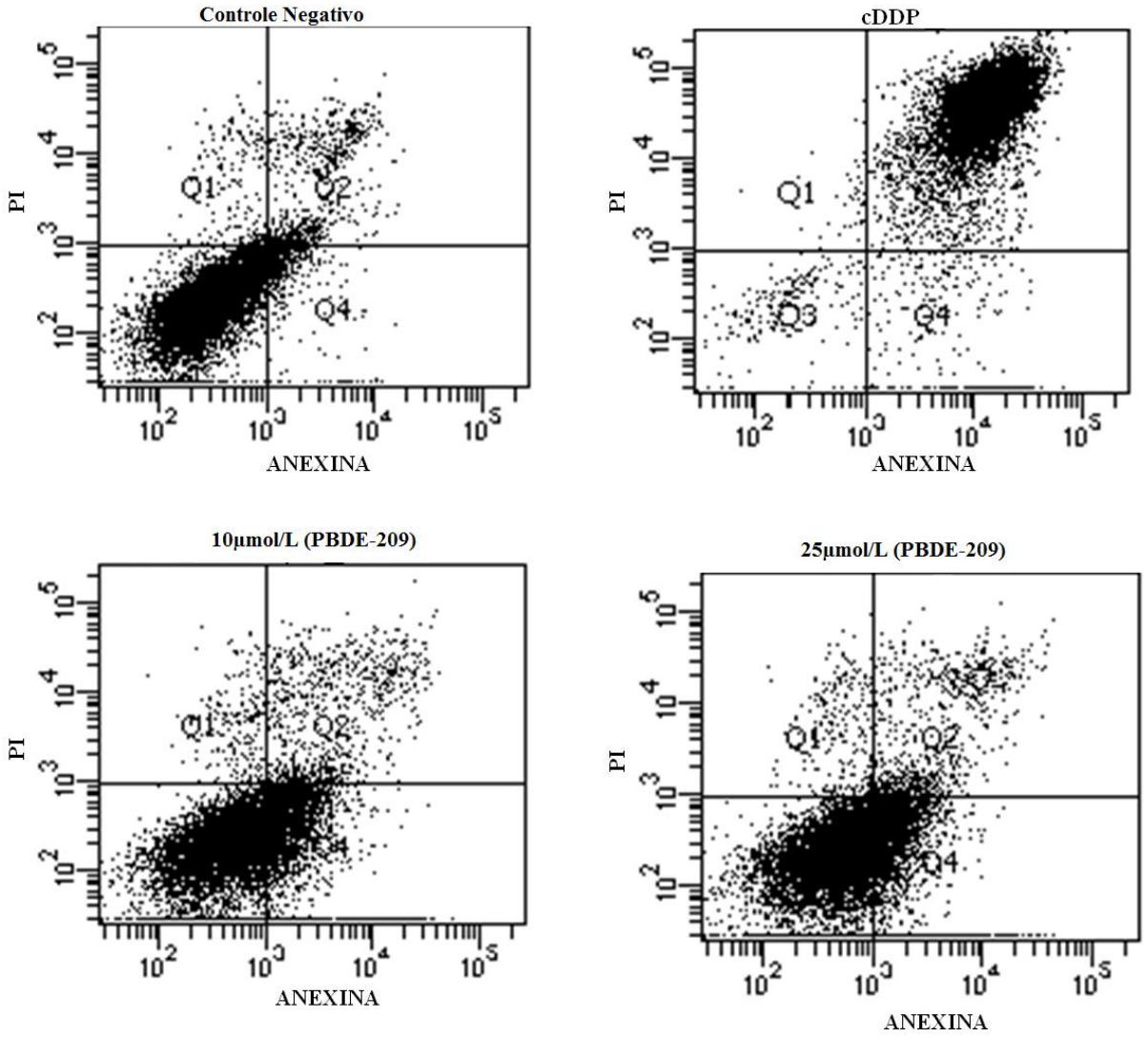


Figura 18. Efeito do congênere PBDE-209 sobre a exposição da fosfatidilserina da membrana externa de células HepG2 após 48 horas de exposição. As figuras são representativas de triplicatas de experimentos independentes. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

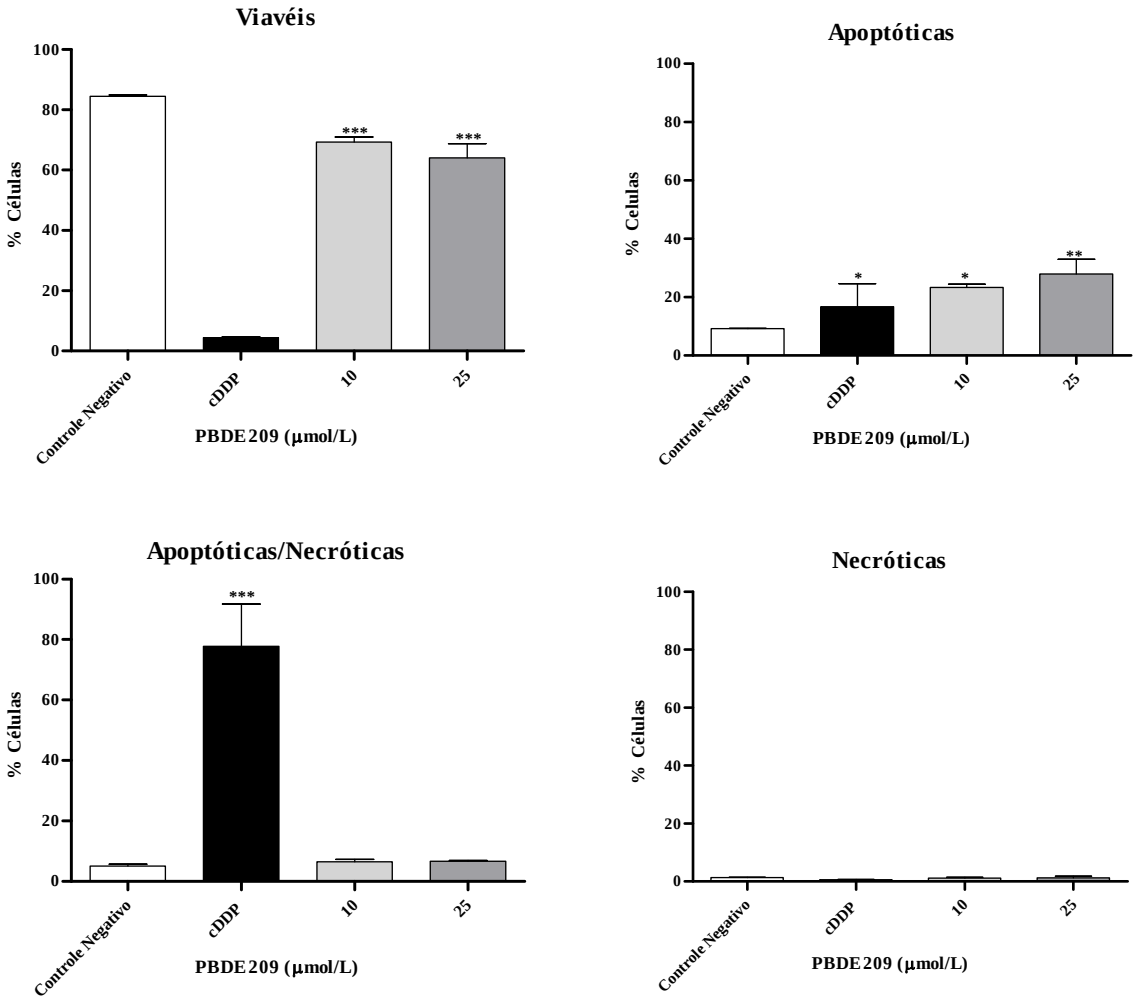


Figura 19. Exposição da fosfatidilserina ocasionada pelo PBDE-209 após 48 horas de exposição. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle negativo mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001, **p < 0.01 e *p < 0.05. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

Quando avaliamos a exposição ao PBDE-99, observamos que embora o composto não tenha provocado falhas na função mitocondrial a partir da concentração de 10µmol/L (Figura 7) foi observado que a exposição da fosfatidil serina já pode ser detectada a partir desta dosagem quando analisada no período de 24 horas (Figuras 20 e 21). Além disso, a análise após 48 horas de incubação mostrou que o composto atua de forma concentração e tempo dependente provocando aumento nas taxas apoptóticas proporcional as aumento das concentrações investigadas (Figuras 22 e 23).

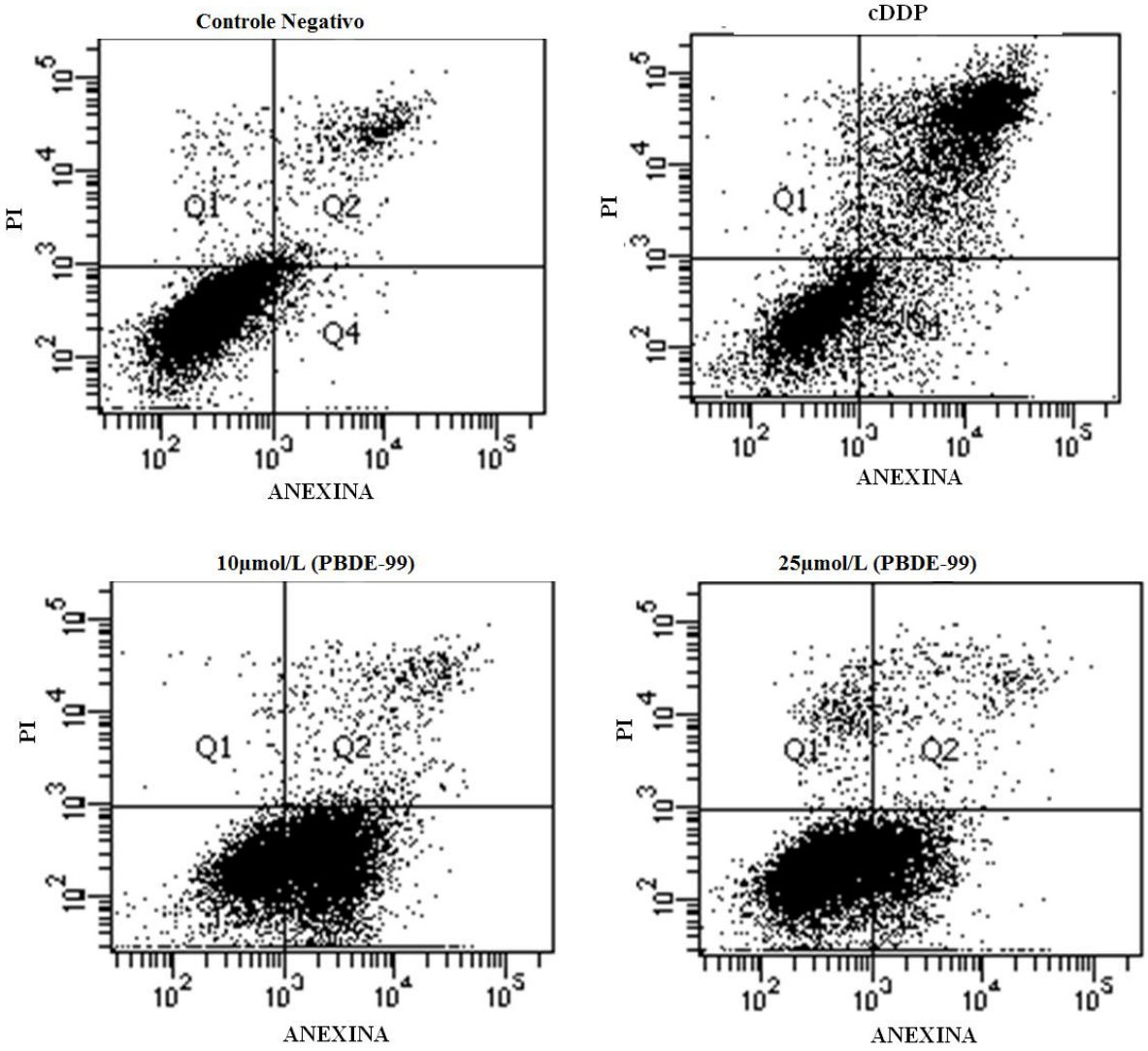


Figura 20. Efeito do congênere PBDE-99 sobre a exposição da fosfatidilserina da membrana externa de células HepG2 após 24 horas de exposição. As figuras são representativas de triplicatas de experimentos independentes. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

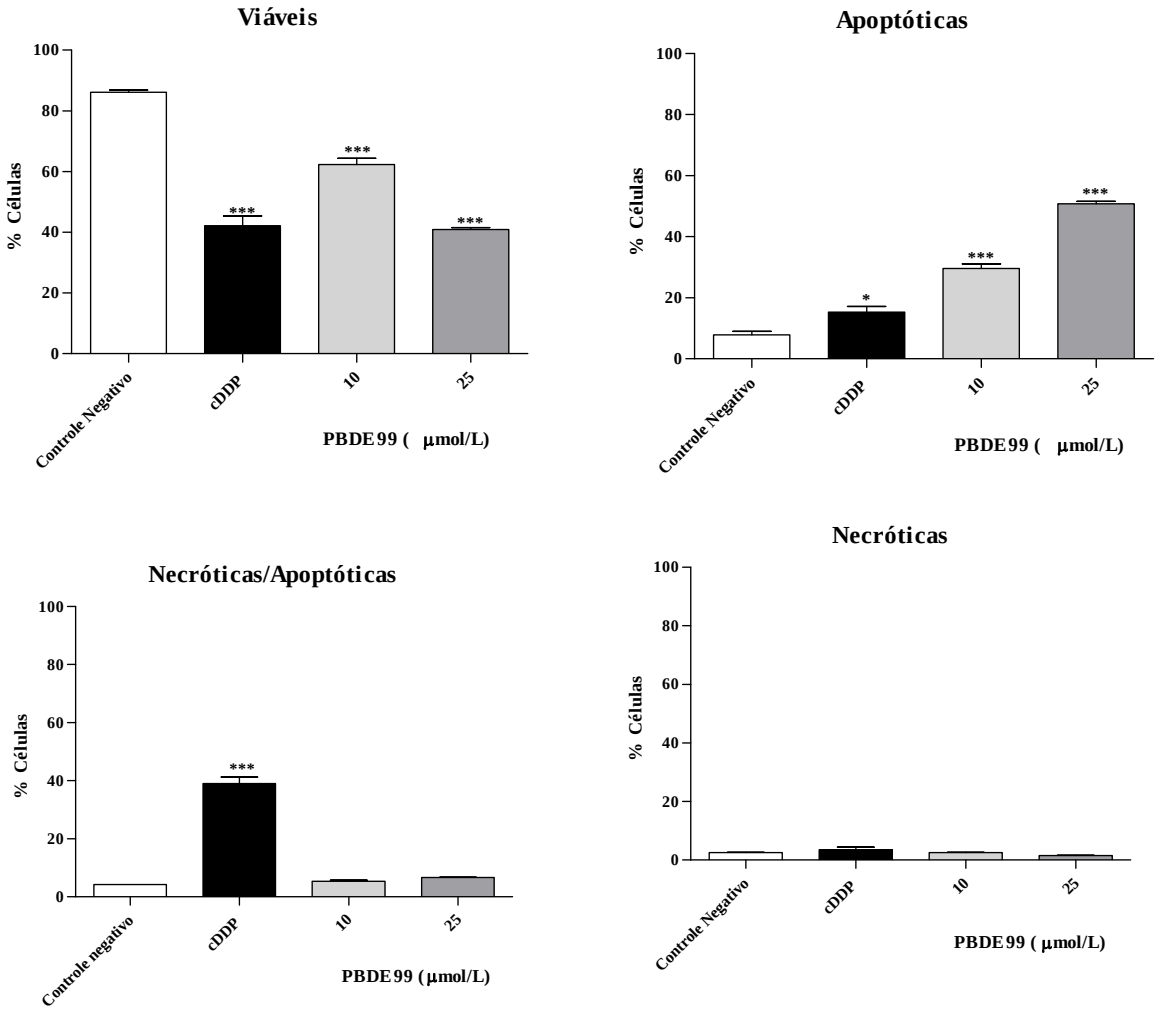


Figura 21. Exposição da fosfatidilserina ocasionada pelo PBDE-99 após 24 horas de exposição. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle negativo mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 e *p < 0.05. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

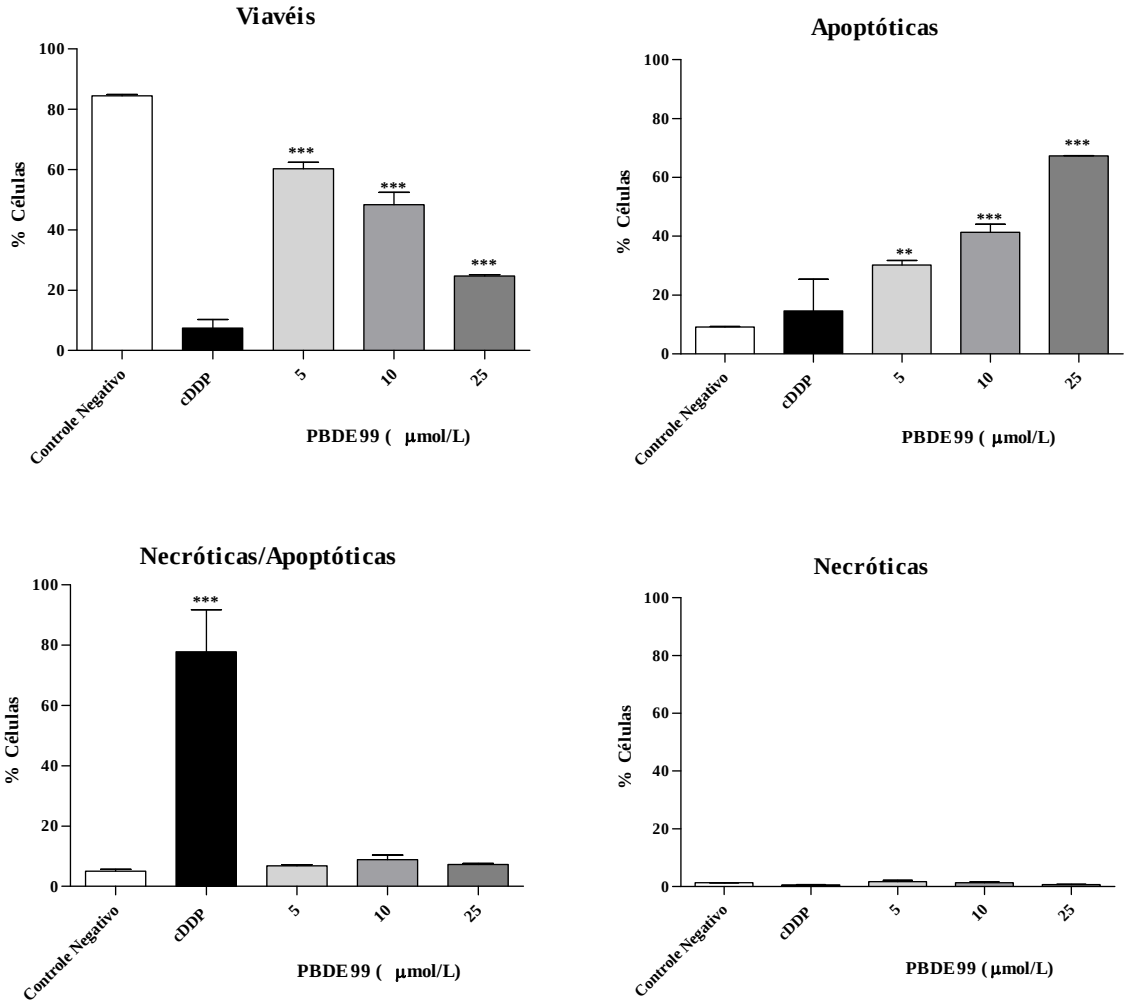


Figura 22. Exposição da fosfatidilserina ocasionada pelo PBDE-99 após 48 horas de exposição. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle negativo mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 e **p < 0.01. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

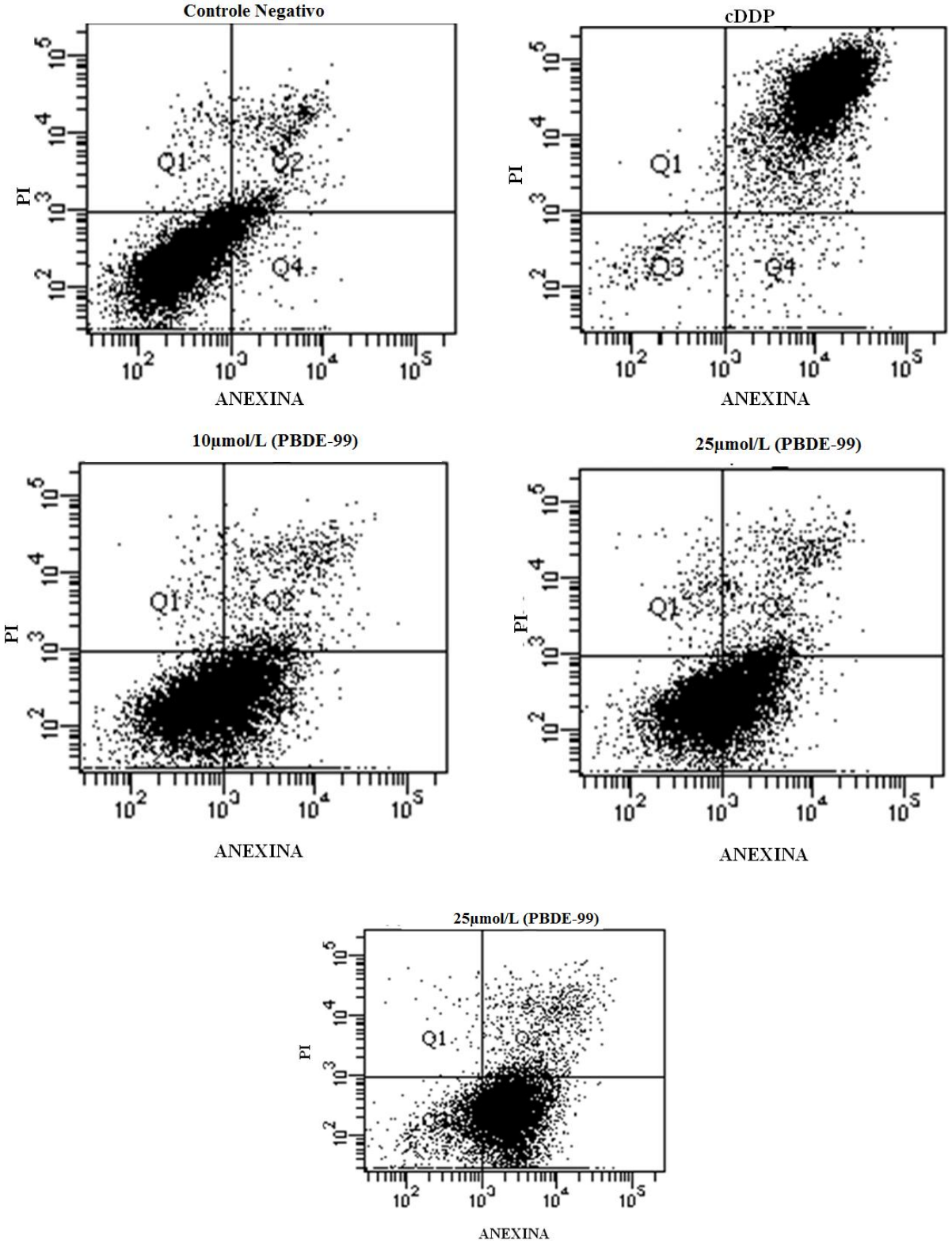


Figura 23. Efeito do congênere PBDE-99 sobre a exposição da fosfatidilserina da membrana externa de células HepG2 após 48 horas de exposição. As figuras são representativas de triplicatas de experimentos independentes. . Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

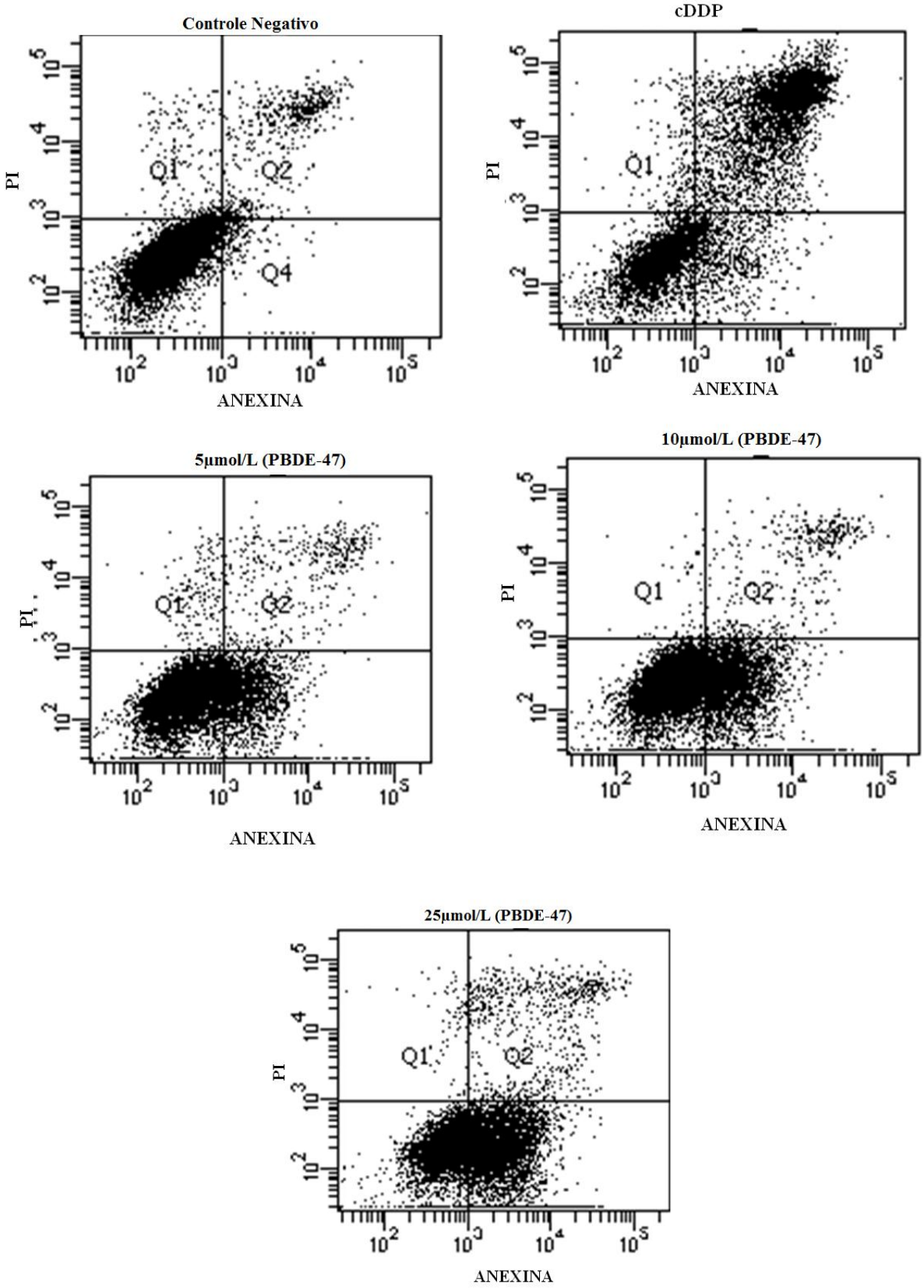


Figura 24. Efeito do congênere PBDE-47 sobre a exposição da fosfatidilserina da membrana externa de células HepG2 após 24 horas de exposição. As figuras são representativas de triplicatas de experimentos independentes. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

Já as alterações na membrana celular ocasionada pela exposição ao PBDE-47 após 24 horas podem ser visualizadas nas Figuras 24 e 25, onde observa-se que nas concentrações com decréscimo da função mitocondrial, analisadas pelo ensaio do MTT, ocorre a predominância da exposição de fosfatidilserina na face externa da membrana celular, que, assim como ocorrido com os outros congêneres, se manteve até 48 horas (Figuras 26 e 27).

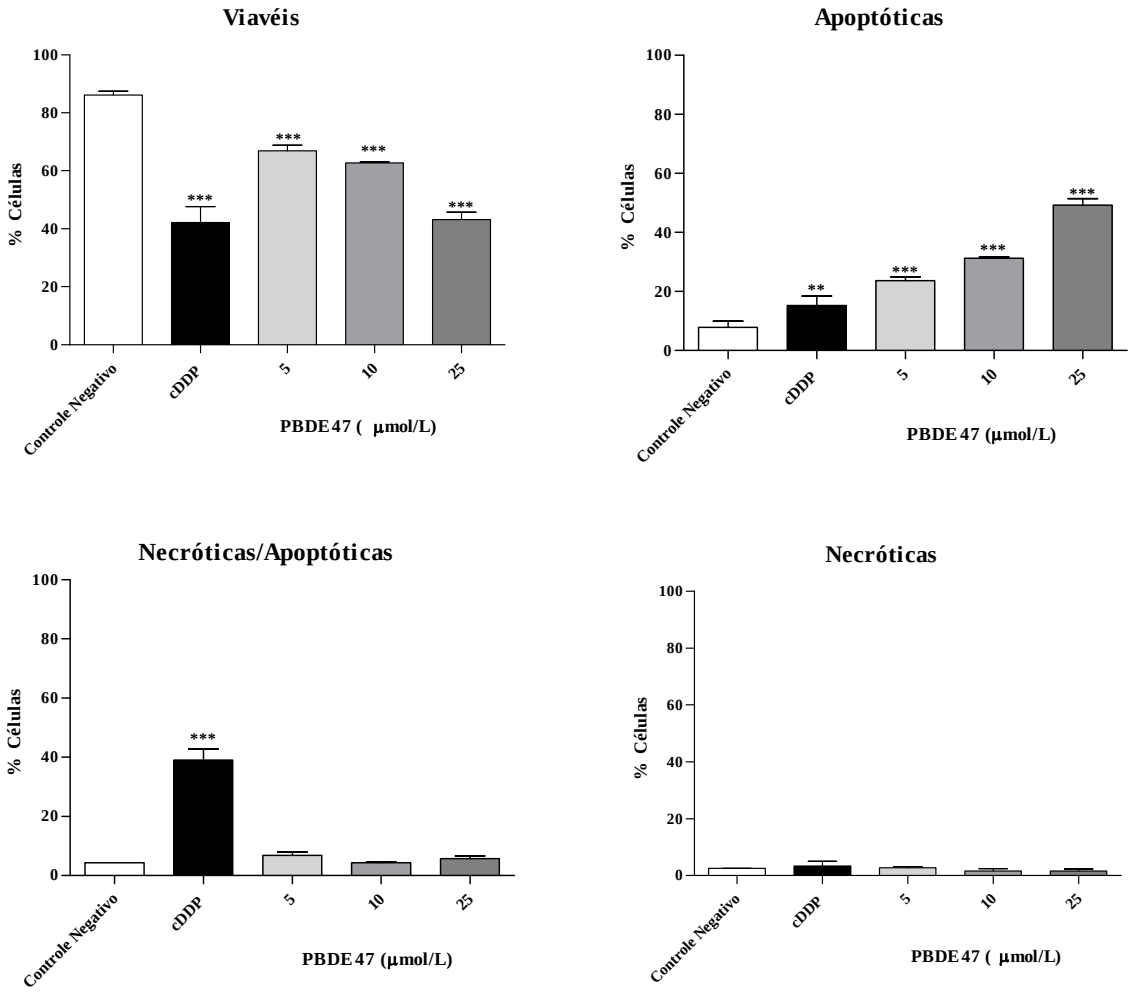


Figura 25. Exposição da fosfatidilserina ocasionada pelo PBDE-47 após 24 horas de exposição. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle negativo mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 e *p < 0.05. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

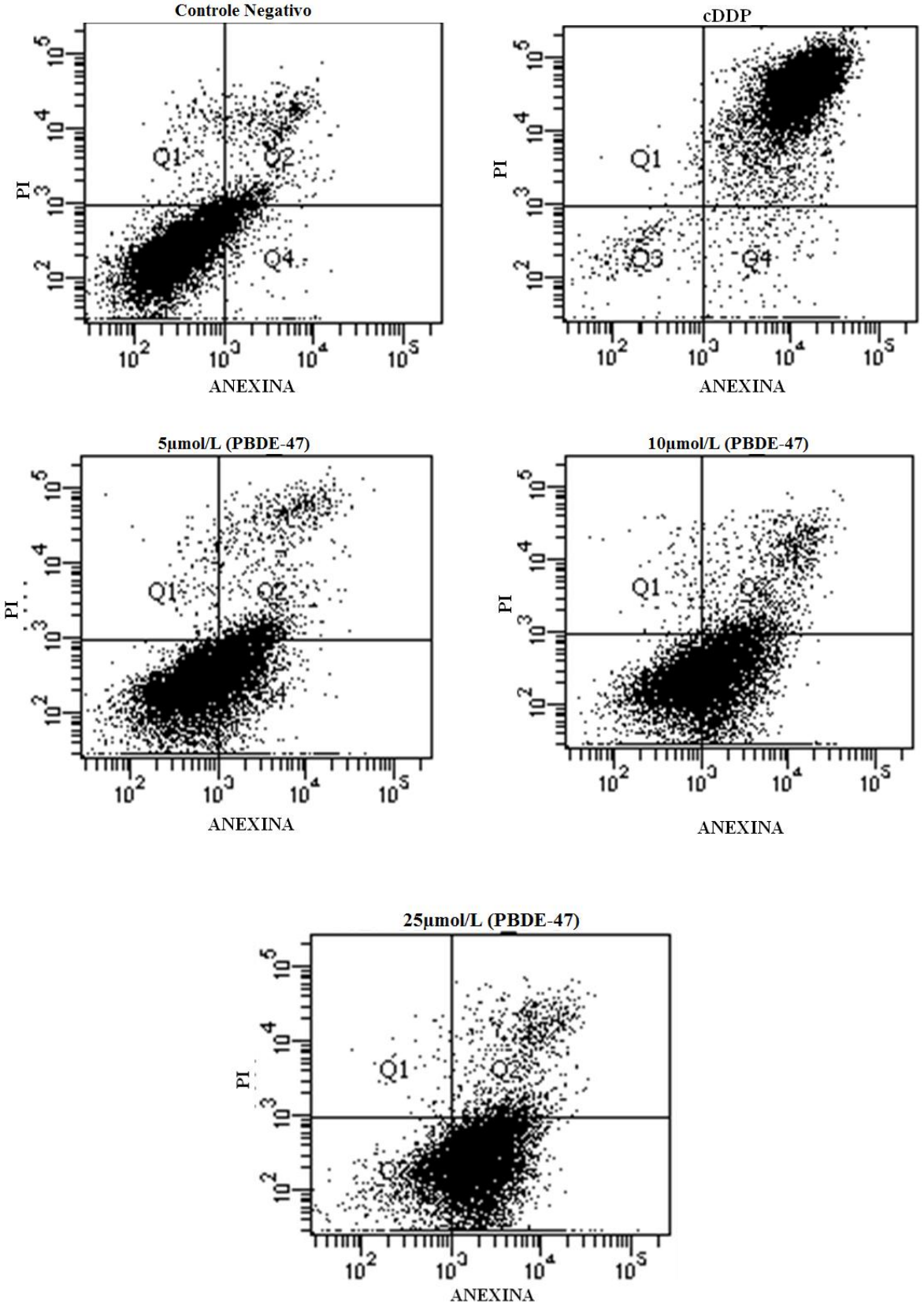


Figura 26. Efeito do congênere PBDE-47 sobre a exposição da fosfatidil serina da membrana externa de células HepG2 após 48 horas de exposição. As figuras são representativas de triplicatas de experimentos independentes. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

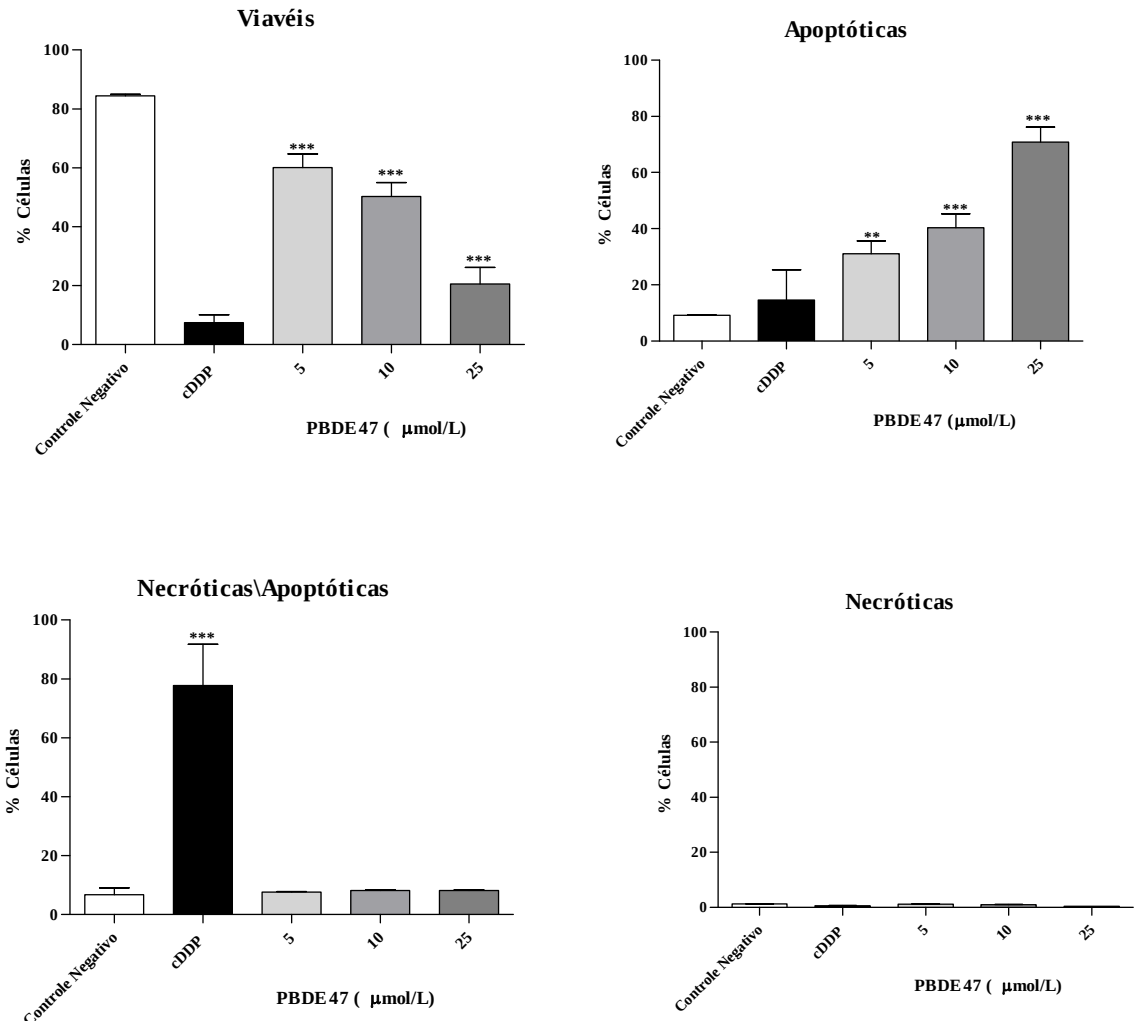


Figura 27. Exposição da fosfatidilserina ocasionada pelo PBDE-47 após 48 horas de exposição. Os gráficos representam média de triplicatas e a comparação em relação ao grupo controle mostrou resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 e **p < 0.001. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

4.5. Integridade da Membrana Celular

A avaliação da liberação da enzima lactato desidrogenase pode ser uma ferramenta útil na diferenciação dos mecanismos apoptóticos ou necróticos. Sendo assim, os efeitos dos PBDEs sobre integridade da membrana das células HepG2, medida pela liberação da lactato desidrogenase, podem ser observados nas Figuras 28 e 29.

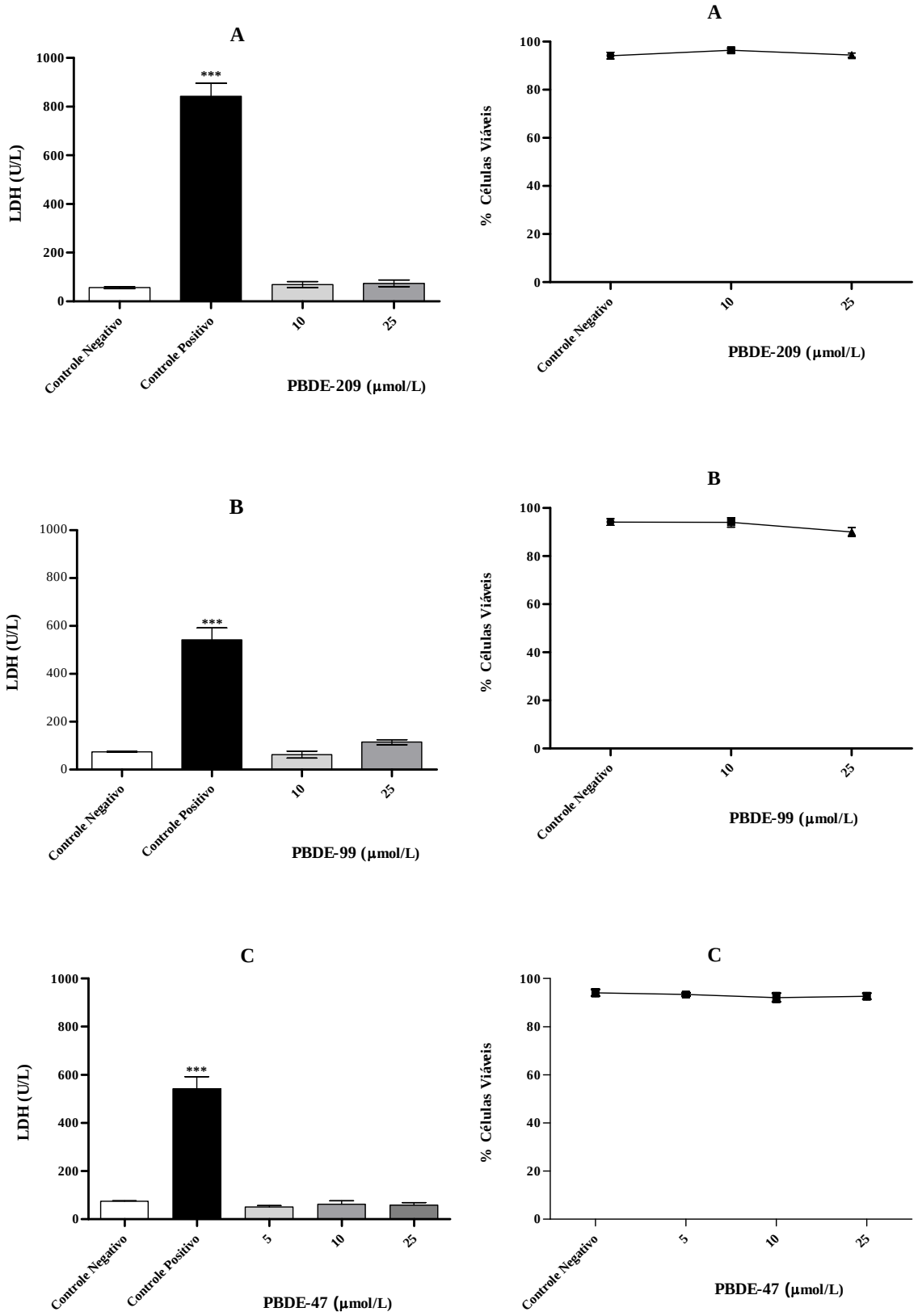


Figura 28. Liberação da enzima lactato desidrogenase ocasionada pela exposição de 24 horas aos PBDE-209 (A), PBDE-99 (B) e PBDE-47 (C). A atividade da enzima foi avaliada durante intervalo de tempo de 4 minutos e os gráficos representam média±E_r de triplicatas. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

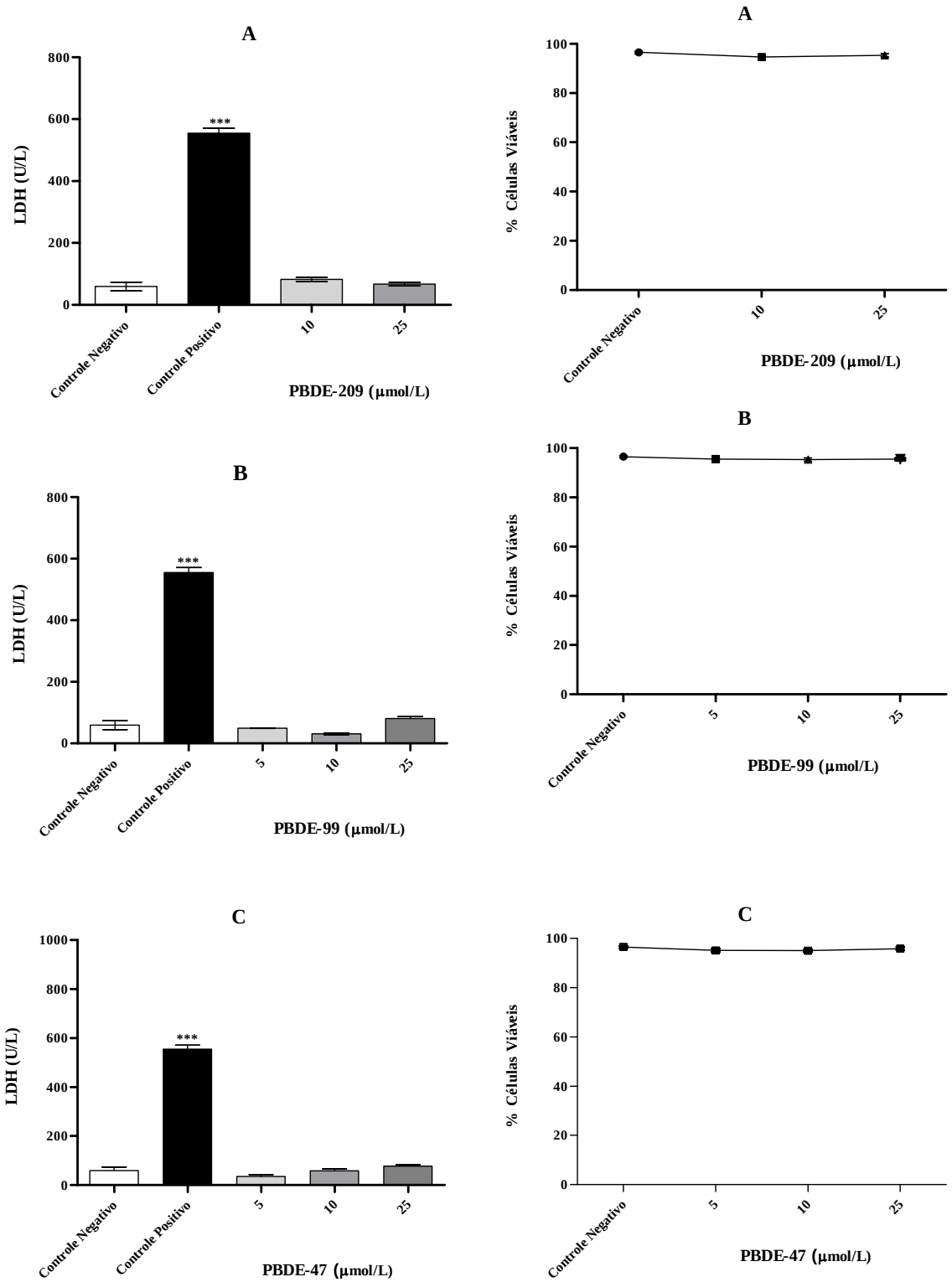


Figura 29. Liberação da enzima lactato desidrogenase ocasionada pela exposição de 48 horas aos PBDE-209 (A), PBDE-99 (B) e PBDE-47 (C). A atividade da enzima foi avaliada durante intervalo de tempo de 4 minutos e os gráficos representam média de triplicatas. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

Os congêneres avaliados não induziram danos na membrana celular em ambos períodos investigados, pois, não foram observados aumento significativos na atividade enzimática da LDH em relação aos controles. No entanto, é possível observar um declínio da quantidade de LDH presente no meio reacional (Figuras 28e 29), sugerindo que este decréscimo ocorra devido ao número reduzido de células restantes no meio reacional após a exposição aos PBDEs.

Estes resultados confirmam os indícios de prevalência dos mecanismos de morte celular por vias apoptóticas, corroborando com os resultados obtidos com a análise da exposição de fosfatidilserina, uma vez que, não há extravassamento do conteúdo celular, indicando um mecanismo de morte sem rompimento da membrana.

4.6. Fragmentação Nuclear

Para confirmação da indução de morte celular pela via apoptótica induzida pelos PBDEs avaliou-se a condensação e fragmentação nuclear nas células HepG2, após 24 e 48 horas de incubação, corados com o reagente Hoechst 33342. No tempo de 24 horas observou-se que o congênere PBDE-209 induz, levemente, a fragmentação nuclear, estando de acordo com os indícios apoptóticos obtidos nos ensaios anteriores (Figuras 30 e 31).

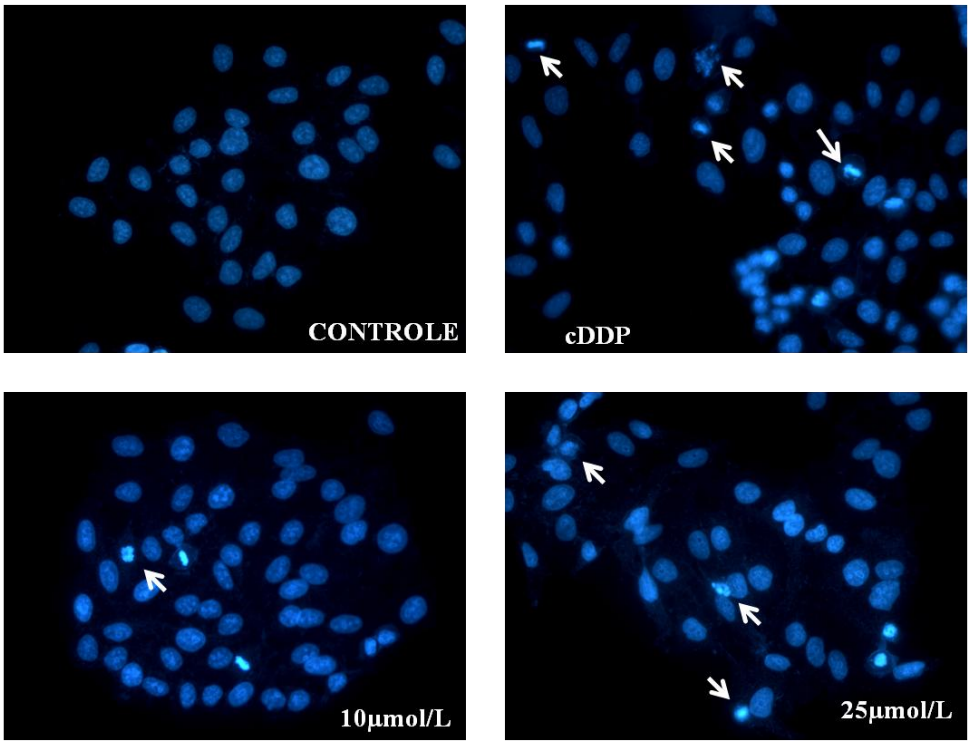


Figura 30. Efeito do PBDE-209 sobre a condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 incubadas por 24 horas, coradas com Hoechst 33342 e analisadas por microscopia de fluorescência. As setas indicam núcleos fragmentados e/ou condensados. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

Embora não tenha sido analisada a investigação dos efeitos do congênere sobre a exposição da fosfatidilserina na concentração de 10µmol/L em período de 24 horas de exposição foi observado que a fragmentação nuclear nesta concentração já é significativa, sugerindo uma leve tendência à apoptose nesta concentração, confirmando os resultados observados pela análise do ensaio de MTT e a tendência ao declínio do PMM nesta dosagem.

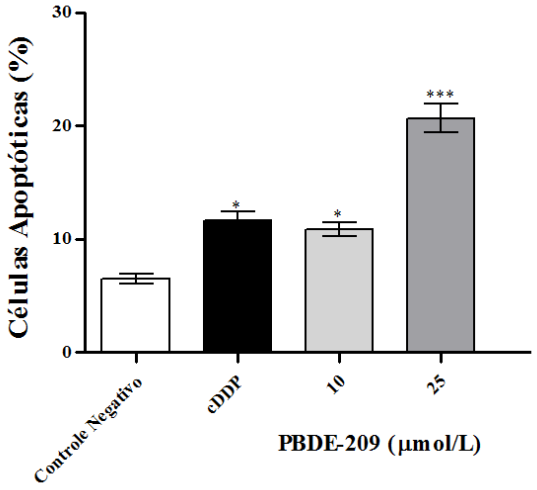


Figura 31. Porcentagem de células apresentado características apoptóticas , coradas com Hoechst 33342 e quantificadas por microscopia de fluorescência, ocasionadas pela exposição de 24 horas ao PBDE-209. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas com resultados estatisticamente significativos de ***p < 0.001 e *p < 0.05. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

A fragmentação nuclear induzida por este congenere ocorre de maneira concentração e tempo dependentes, pois é observado que há aumentos significativos nas quantidades de células fragmentadas com o aumento do tempo de exposição (Figuras 32 e 33).

Os congêneres PBDE-99 e PBDE-47 também ocasionaram a condensação e/ou fragmentação nuclear em ambos períodos investigados, confirmando as evidências de ativação de vias de apoptose por todos os congêneres avaliados.

A fragmentação nuclear induzida pela exposição ao PBDE-99 em período de 24 horas (Figuras 34 e 38A) está de acordo com os indícios apoptóticos dos ensaios anteriores, sendo demonstrado que o potencial citotóxico do composto ocorre de forma concentração e tempo dependente (Figuras 35 e 38B)

Já o congênere PBDE-47 demonstrou induzir a fragmentação nuclear originando as maiores taxas entre os compostos investigados e confirmando o elevado potencial citotóxico deste congênere (Figuras 36 e 37). Este efeito apresentado também ocorreu de maneira concentração e tempo dependente (Figura 39).

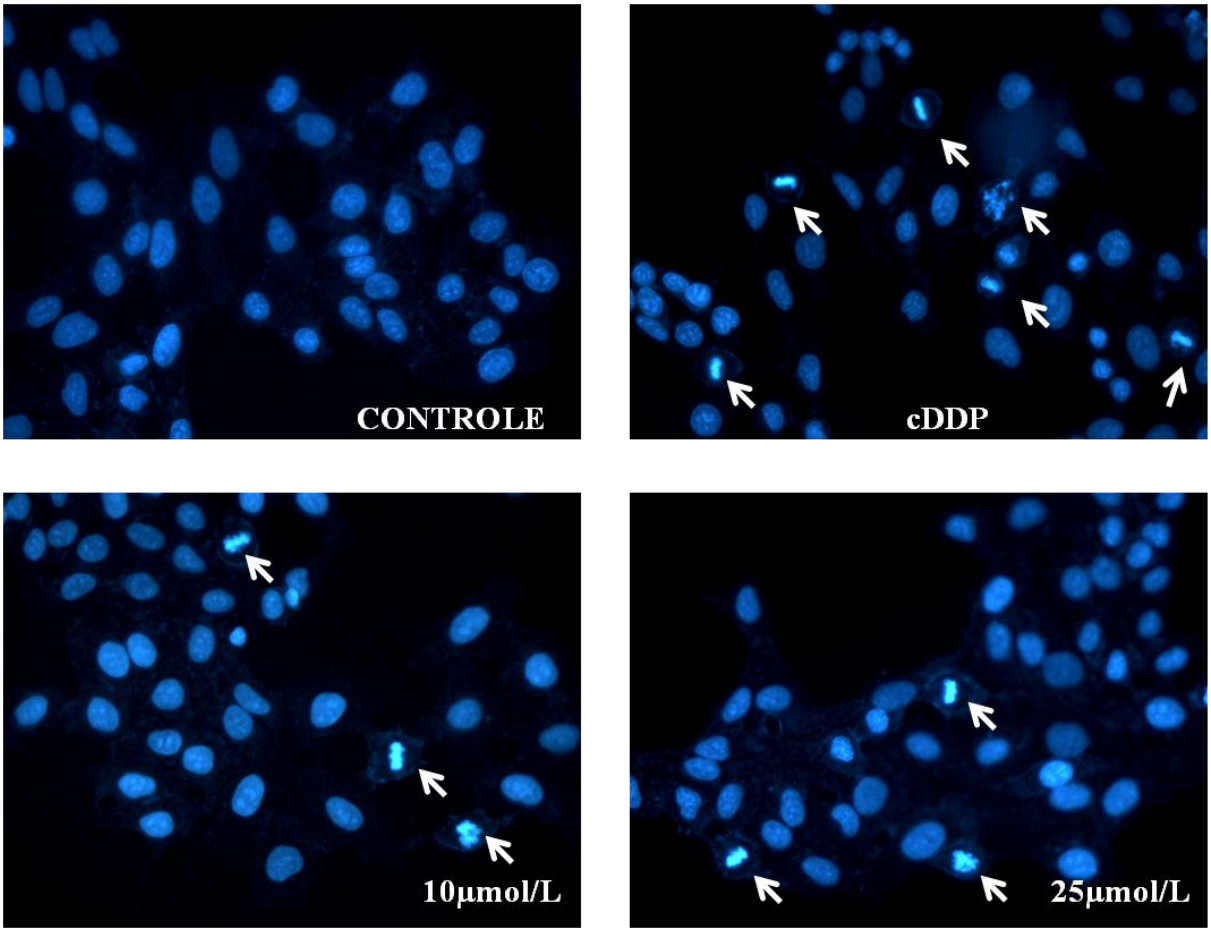


Figura 32. Efeito do PBDE-209 sobre a condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 incubadas por 48 horas, coradas com Hoechst 33342 e analisadas por microscopia de fluorescência. As setas indicam núcleos fragmentados e/ou condensados Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

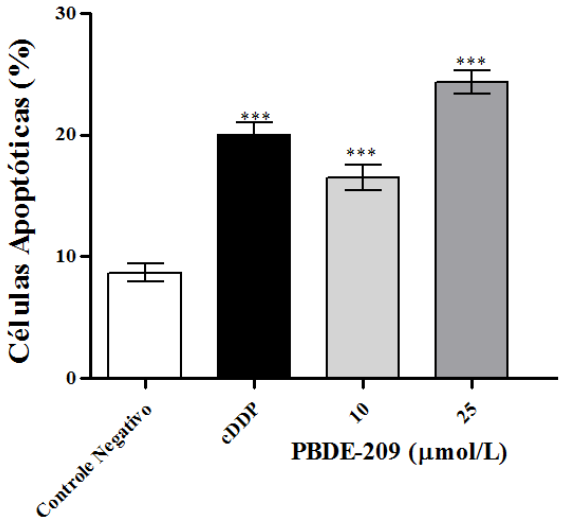


Figura 33. Porcentagem de células apresentado características apoptóticas, coradas com Hoechst 33342 e quantificadas por microscopia de fluorescência, ocasionadas pela exposição de 48 horas ao PBDE-209. Os gráficos representam média±E_r de triplicatas com resultados estatisticamente significativos de ***$p < 0.001$ e *$p < 0.05$. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

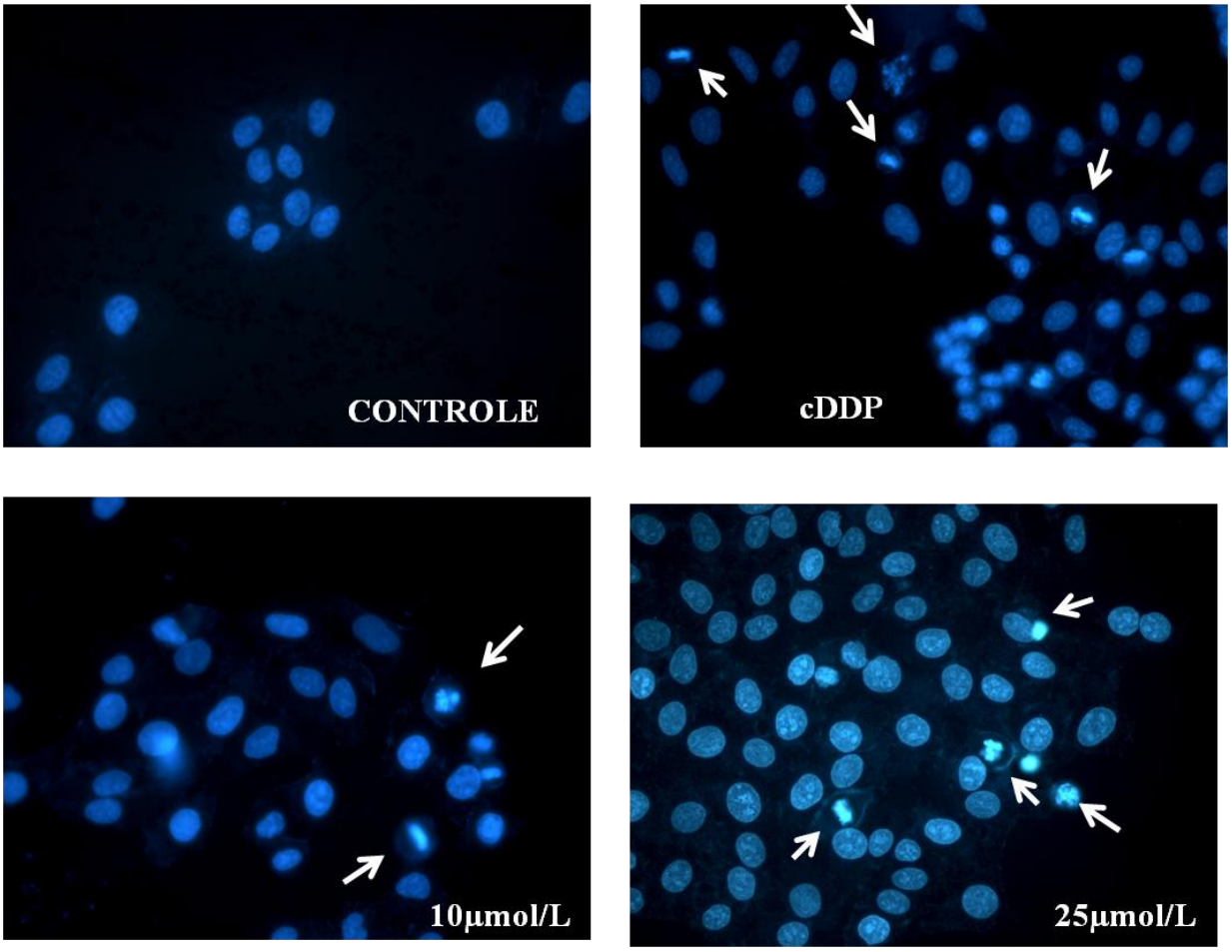


Figura 34. Efeito do PBDE-99 sobre a condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 incubadas por 24 horas, coradas com Hoechst 33342 e analisadas por microscopia de fluorescência. As setas indicam núcleos fragmentados e/ou condensados. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

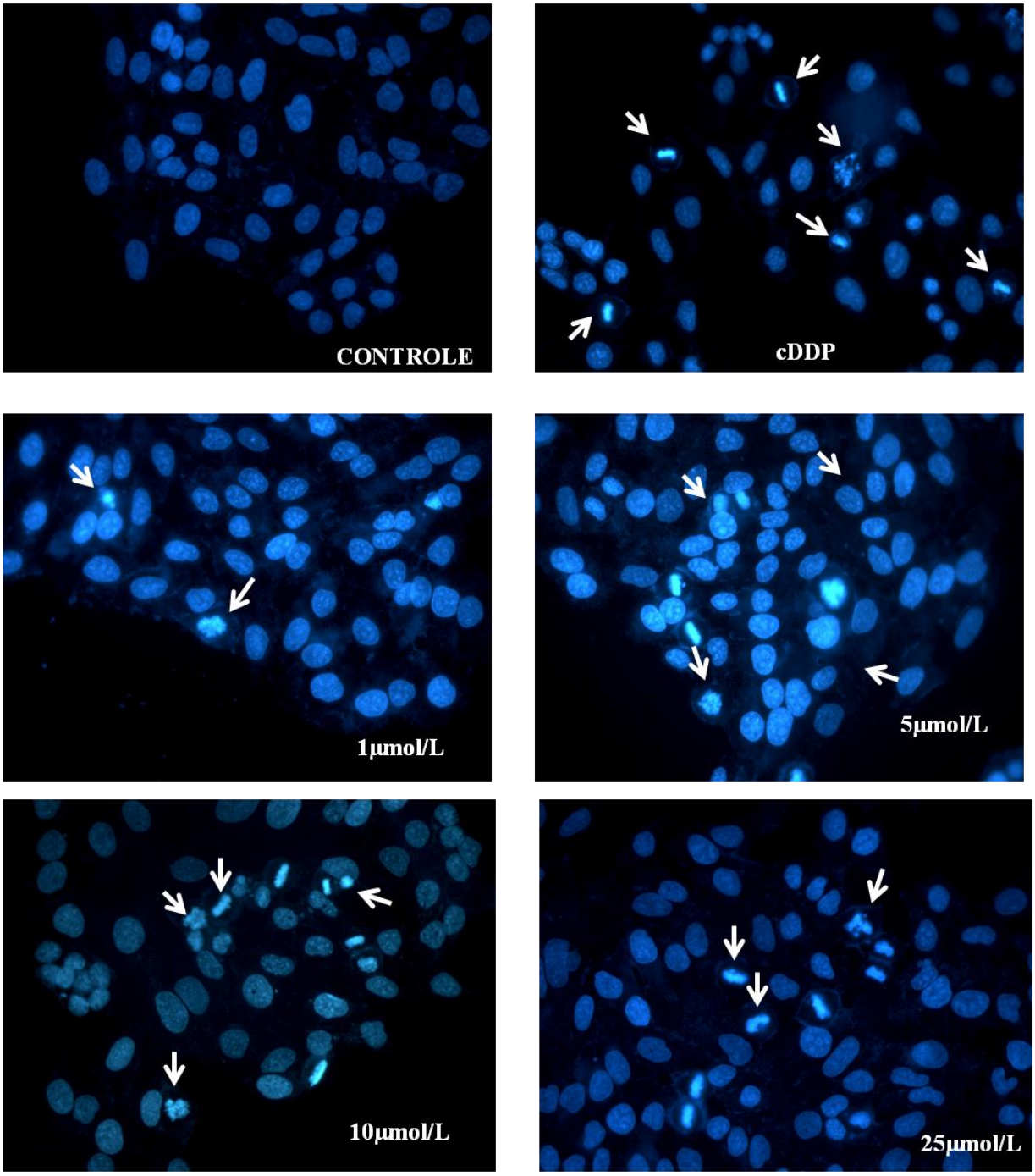


Figura 35. Efeito do PBDE-99 sobre a condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 incubadas por 48 horas, coradas com Hoechst 33342 e analisadas por microscopia de fluorescência. As setas indicam núcleos fragmentados e/ou condensados. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

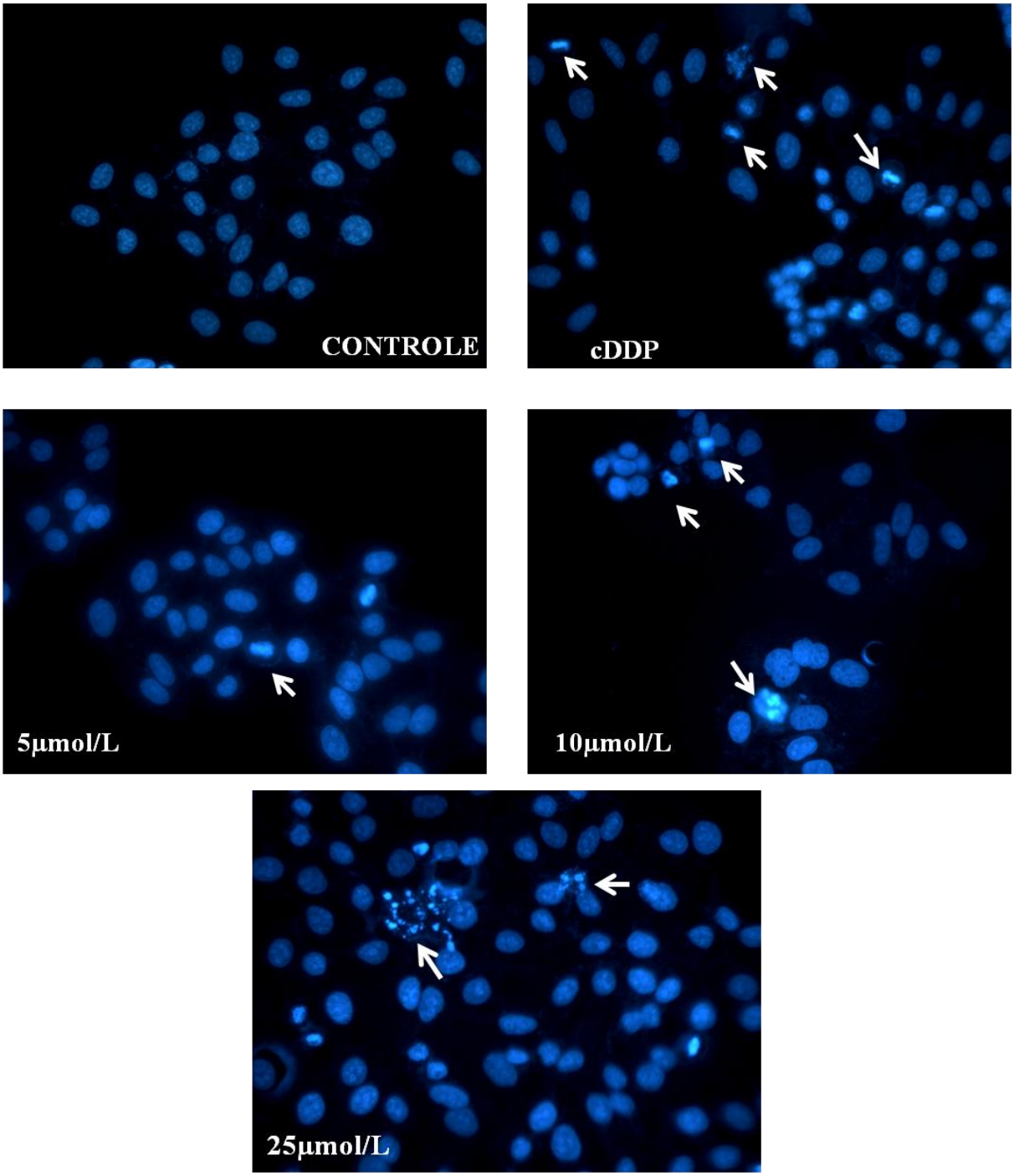


Figura 36. Efeito do PBDE-47 sobre a condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 incubadas por 24 horas, coradas com Hoechst 33342 e analisadas por microscopia de fluorescência. As setas indicam núcleos fragmentados e/ou condensados. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

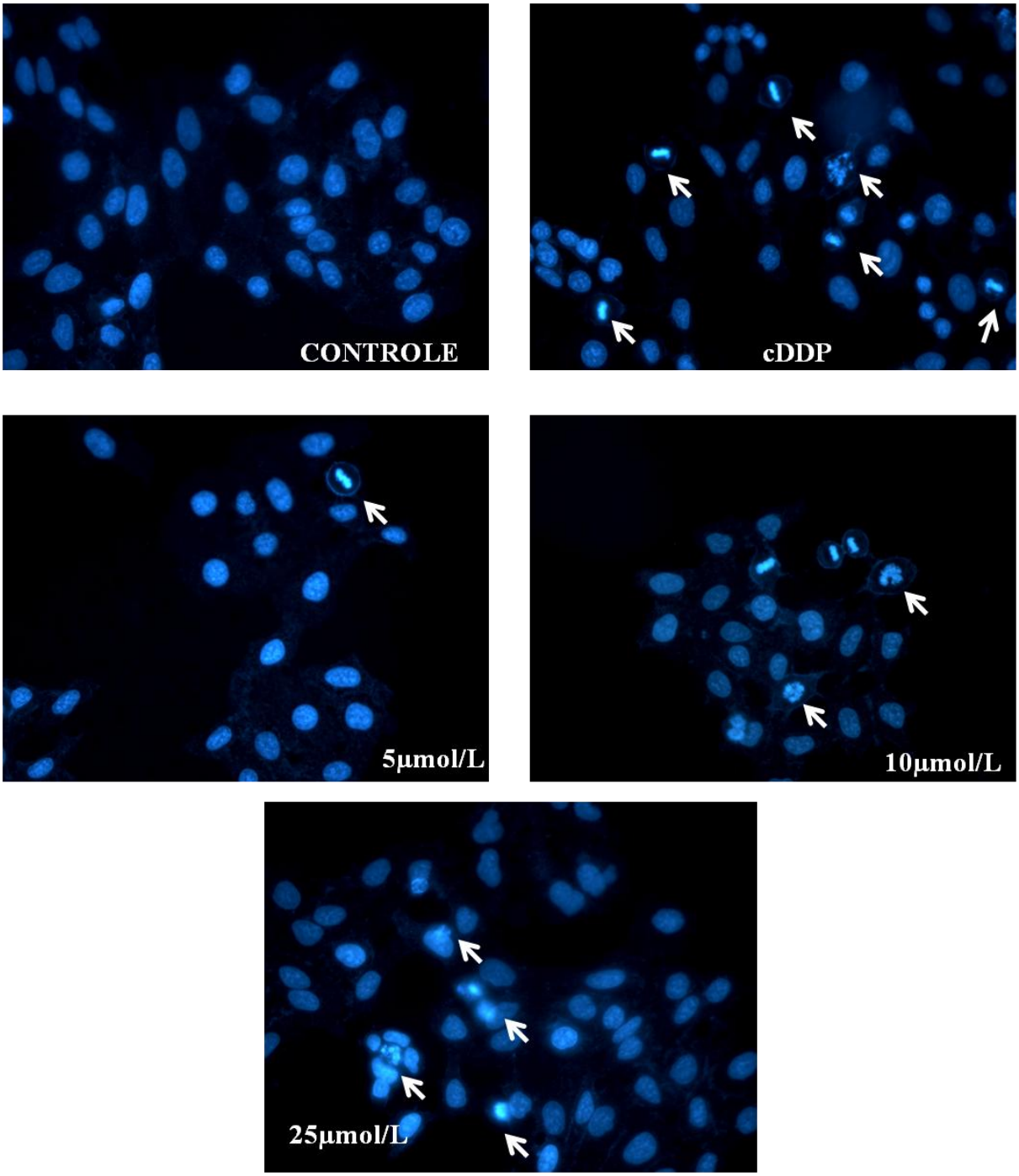


Figura 37. Efeito do PBDE-47 sobre a condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 incubadas por 48 horas, coradas com Hoechst 33342 e analisadas por microscopia de fluorescência. As setas indicam núcleos fragmentados e/ou condensados. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

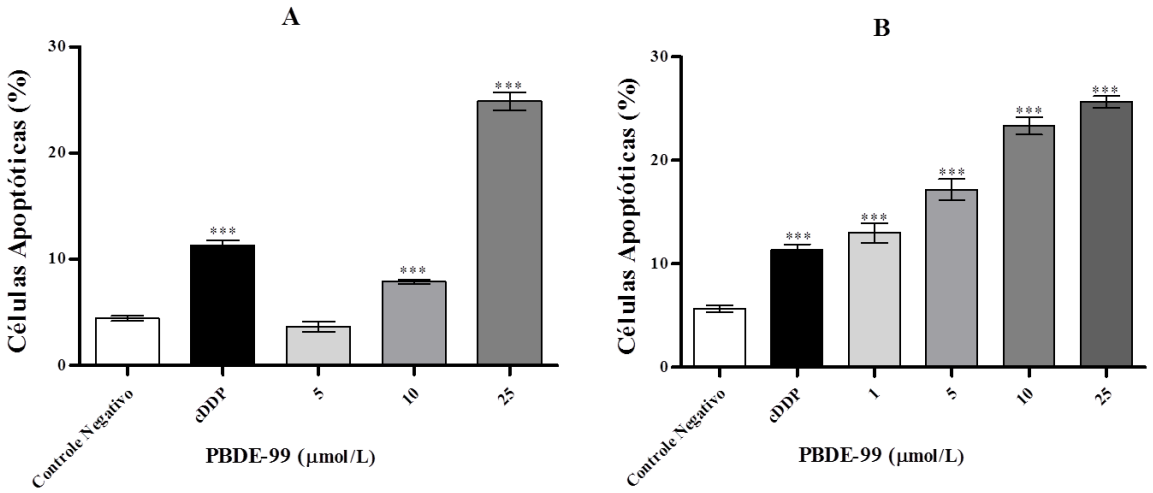


Figura 38. Porcentagem de células apresentado características apoptóticas, coradas com Hoechst 33342 e quantificadas por microscopia de fluorescência, ocasionadas pela exposição ao PBDE-99. O gráfico A representa a exposição de 24 horas e o gráfico B representa a exposição de 48 horas. As barras representam média±E_r de triplicatas com resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001. Controle Negativo (cultura sem adição de PBDEs) e Controle Positivo usando cDDP (1mg/mL).

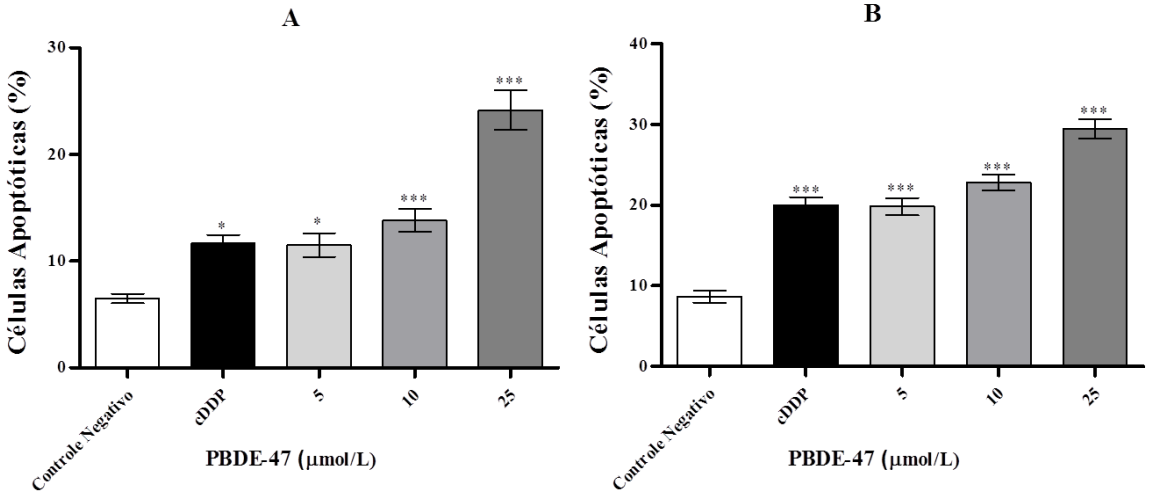


Figura 39. Porcentagem de células apresentado características apoptóticas, coradas com Hoechst 33342 e quantificadas por microscopia de fluorescência, ocasionadas pela exposição ao PBDE-47. O gráfico A representa a exposição de 24 horas e o gráfico B representa a exposição de 48 horas. As barras representam média de triplicatas com resultados estatisticamente significativos com ***p < 0.001 e **p < 0.05.

Discussão

5. Discussão

Os efeitos tóxicos que os contaminantes podem ocasionar sobre a saúde dos indivíduos têm sido amplamente investigados através de análises que avaliem as alterações ocorridas sobre as funções básicas de diferentes linhagens celulares derivadas dos órgãos alvos da ação tóxica de contaminantes específicos (MADIA *et al*., 2004). A proliferação celular, processo fundamental na manutenção da homeostasia dos tecidos vivos, é uma das primeiras funções sensíveis às alterações após exposição aos agentes contaminantes, pois é através desta função que a célula demonstra seu potencial de divisão e crescimento em condições normais.

As alterações sobre o crescimento celular podem ser utilizadas como um indicativo do estado fisiológico das células devido à existência fundamental de relações entre a coordenação, balanço, crescimento e morte celular (GUO; HAY, 1999). Essas mudanças podem ocorrer de duas maneiras distintas relacionadas ou com crescimento desordenado responsável pelo aparecimento de tumores (GELDERBLOM *et al*., 2001; SILVA; SILVA, 2005; HANNELIEN *et al*., 2012), ou com efeitos antiproliferativos (PILÁTOVA *et al*., 2005; MINORICS *et al*., 2011) através de mecanismos citostáticos e/ou citotóxico, devido ao bloqueio do ciclo celular e indução de morte, respectivamente.

A toxicidade de diferentes contaminantes ambientais revela que compostos pertencentes à classe dos plastificantes, praguicidas, bifenilas policloradas e alguns retardantes de chamas são capazes de provocar efeitos antiproliferativos diferenciados em função da linhagem avaliada, sendo na maioria dos casos associados com a presença de mecanismos citotóxicos (GHISARI *et al*., 2005; PTAK *et al*., 2009; HUANG H *et al*., 2010; VENKATESHA *et al*., 2010).

De acordo com o exposto, nossos resultados revelam comportamento semelhante para os congêneres avaliados, sendo observado potencial destes compostos em interferir com a proliferação normal das células HepG2. A classificação e a intensidade do efeito obtido foram diferenciadas com o tipo de congênere investigado. No entanto, apesar de prevalência dos mecanismos citotóxicos é possível observar a indução de mecanismos citostáticos.

Os resultados relacionados ao congênere BDE-209 demonstram que o composto exibe efeitos citotóxicos sobre as células HepG2 da mesma forma observada para as células neurais de roedores, de espécies aquáticas ou hepáticas humanas e estes estudos demonstraram que a toxicidade deste congênere está relacionada à exposição a elevadas concentrações (HU *et al*., 2007; CHEN J *et al*., 2010; JIN *et al*., 2010).

No entanto, de acordo com nossos resultados os efeitos do congênere sobre as células HepG2 são inicialmente relacionados a uma interferência citostática em concentrações menores através do bloqueio do crescimento celular. Apesar disso, foi observado um decréscimo na intensidade do efeito em função do tempo provavelmente devido à metabolização, produzindo diversos subprodutos com características químicas e toxicológicas diversificadas em relação aos produtos originais (BOTARO; TORRES, 2007). Esta hipótese é reforçada, pois, este efeito anômalo sobre a proliferação celular não foi obtido em relação aos congêneres PBDE-47 e PBDE-99, que possuem maior estabilidade estrutural não sofrendo redução de sua estrutura química.

A presença, primeiramente, dos efeitos citostáticos também pode ser ocasionada pelas diferenças na estrutura tridimensional de cada congênere, sendo sugerido que a mesma possa interferir nas características tóxicas dos compostos, pois os estudos sobre os efeitos das bifenilas policloradas (PCBs) relatam que o grau de toxicidade destes contaminantes está relacionado com as diferenças estruturais das moléculas, sendo os efeitos tóxicos mais pronunciados obtidos com as moléculas com menor quantidade de substituintes nas posições orto devido ao impedimento estérico de cada estrutura tridimensional, o qual dificulta a interação destes compostos com a célula (YILMAZ *et al*., 2006 ; AZEVEDO E SILVA, *et al*., 2007; CHEN Y *et al*., 2010; SHEN *et al*., 2011,).

Portanto, em virtude das semelhanças estruturais entre os PBDEs e os PCBs é sugerido que os substituintes da posição orto da molécula do PBDE-209 dificulte a interação desse composto com a célula e ocasione efeito de menor intensidade em relação aos demais congêneres investigados (STAPLETON *et al*., 2008; ERRÁTICO *et al*., 2011), sendo necessário maior concentração do composto e maior tempo de contato para ocorrer danos mais significativos.

A influência dos produtos do metabolismo é sugerida uma vez que apesar da ausência de dados toxicológicos sobre os verdadeiros metabólitos originados pelo congênere PBDE-209, recentes estudos sobre a toxicidade dos PBDEs mostram que os metabolitos podem influenciar nos efeitos tóxicos de cada composto. E em virtude disso, esses metabólitos são alvo de pesquisas que visem esclarecer o potencial tóxico dos PBDEs, uma vez que, suas prováveis ações são diferenciadas em função do congênere e do organismo envolvido.

Desta forma, a avaliação da toxicidade do PBDE-209 ainda é conflituosa mas já foi evidenciado que a administração oral ou intravenosa do congênere PBDE-209 em ratos é responsável pela presença de metabólitos metoxilados, acetilados e hidroxilados na bile,

fezes, plasma e fígado dos animais expostos ao composto (MORK *et al*., 2003; SANDHOLM e*t al*., 2003; RIU *et al*., 2008). Em culturas de hepatócitos humanos, embora esses metabólitos sejam ausentes, foi observada alta expressão de genes responsáveis pela ativação enzimas necessária para toxicodinâmina de xenobióticos (STAPLETON *et al*., 2009). E, além disso, os níveis de metabólitos hidroxilados no sangue de crianças que vivem em regiões expostas aos PBDEs são extremamente alarmantes (ATHANASIADOU *et al*., 2008). Portanto, embora os efeitos de tais metabólitos sejam incertos, sua presença é bem evidenciada.

Além dos metabólitos, outros subprodutos podem ser obtidos a partir do PBDE-209 devido à grande instabilidade do composto em sofrer redução no número de substituintes em sua estrutura formando compostos com nove e oito átomos de bromos e com ação tóxica ainda não esclarecida. (SODERTROM *et al*., 2004; STAPETLON *et al*., 2008; FREDERIKSEN *et al*., 2010). Esta diversidade de subprodutos obtidos pode estar relacionada com o amplo efeito citostático observado na exposição em baixas concentrações e, portanto, são necessárias investigações mais detalhadas com relação a toxicidade individual de cada subproduto.

Em relação às altas concentrações avaliadas, a ação do efeito do PBDE-209 mostrou que inibição do crescimento celular obtida foi acompanhada pelo início de falhas na função mitocondrial das células, com queda do seu potencial de membrana, as quais se não forem reparadas pela maquinaria intracelular poderão ocasionar morte celular por mecanismos apoptóticos conforme foi descrito por Hu *et al*., 2007.

O decréscimo da quantidade de substituintes em torno da estrutura aromática dos PBDEs demonstrou que os PBDE-99 e PBDE-47 produzem efeitos antiproliferativos diferenciado em relação ao PBDE-209, sendo observada a inibição do crescimento celular a partir de concentrações menores àquelas observadas para o BDE-209. No entanto, o declínio da viabilidade nas mesmas concentrações demonstra que a inibição do crescimento celular está relacionada com a presença de morte celular.

Além disso, é sugerido que a intensidade do efeito dos congêneres com menor número de substituintes em sua estrutura (PBDE-99 e PBDE-47) ocorra devido à estrutura tridimensional coplanar destes compostos associada com o decréscimo do peso molecular, que facilitam sua absorção e contribuem para os elevados indícios toxicológicos destes congêneres, uma vez que, os compostos com menor peso molecular apresentam maior

incidência em compartimentos ambientais e nos organismos (AZEVEDO E SILVA, *et al*., 2007; SHEN *et al*., 2011).

Os PBDE-99 e PBDE-47 são metabolizados por rotas oxidativas, as quais produzem, em mamíferos, metabólitos hidroxilados que podem está interligados com o aumento, em função do tempo, da intensidade dos efeitos obtidos sobre as células HepG2, pois é relatado que tais metabólitos, apresentam potencial tóxico mais pronunciado em relação as moléculas originais (HAKK *et al*., 2003; CHEN *et al*., 2006; MARSH *et al*., 2006; STASKAL *et al*., 2006; STAPLETON *et al*., 2009; DONG *et al*., 2010; ERRÁTICO *et al*., 2010; WISEMAN *et al*., 2011).

A comparação dos mecanismos de ação entre PBDE-99 e PBDE-47 mostrou que, a princípio, o menor congênere apresenta evidências citotóxicas mais intensas nas concentrações avaliadas. Conforme relatado anteriormente, este fato ocorre devido à maior facilidade de absorção do PBDE-47. No entanto, a exposição prolongada provoca o aumento da sensibilidade das células ao PBDE-99, aumentando o efeito desta substância sobre as células HepG2.

Isso pode ter ocorrido devido ao fato de que após a absorção, a metabolização do PBDE-99 é mais favorecida em relação ao PBDE-47, conforme descrito por Qiu et al., (2009) que avaliaram a capacidade de produção de metabólitos hidroxilados dos congêneres PBDE-99, PBDE-47 e PBDE-100. Da mesma forma, Erratico *et al* (2011) demonstraram que o metabolismo de PBDE-99 por enzimas hepáticas microssomais de ratos é mais pronunciado se comparado ao PBDE-47. Apesar disso, em relação à intensidade dos efeitos obtidos, o PBDE-47 manteve os elevados indícios toxicológicos em ambos os períodos investigados, sugerindo que a toxicidade dos três congêneres avaliados esteja relacionada com a estrutura tridimensional, tamanho da molécula e metabólitos produzidos.

Diferentes propriedades do funcionamento celular podem ser medidas na investigação dos mecanismos tóxicos dos PBDEs, portanto, além da inibição do crescimento celular e o decaimento da viabilidade, outras funções da célula foram avaliadas com intuito de elucidar os efeitos ocasionados pela exposição a esses agentes tóxicos.

O decaimento da viabilidade das células HepG2, medido por meio da formação de sal de formazan, é um indicativo da presença de falhas no funcionamento mitocondrial, as quais podem, inclusive, ser acompanhadas pela despolarização mitocondrial comprometendo o funcionamento normal das células e desencadeando apoptose. O declínio no potencial de membrana mitocondrial é relacionado com o indicativo da citotoxidade de diversos

compostos, incluindo os PCBs, devido à diminuição na produção de ATP gerando o comprometimento da principal fonte de energia necessária para manutenção da vida celular, sendo o desenvolvimento de estresse oxidativo um dos principais responsáveis por este efeito (GUA *et al*., 2006; TAKEHIJO, 2006; DOROSHENKO N; DOROSHEKO P, 2007; LI *et al*., 2007; ROGALSKA *et al*., 2008; VALMAS *et al*., 2008; LUKANDU *et al*., 2009; BEMBA-MEKA *et al*., 2011; JIANG *et al*., 2011; KUZNETSOV *et al*., 2011).

De forma semelhante, em nossos resultados foram observados que as falhas na funcionalidade celular ocasionada pela exposição aos diferentes congêneres de PBDEs estão interligadas com a despolarização mitocondrial e com o desenvolvimento de elevado estresse oxidativo, sugerindo que os três congêneres induzem a morte celular. Dessa forma, o decaimento do potencial de membrana mitocondrial e o estresse oxidativo ocorrido pela exposição ao congênere deca-substituído, somente na maior concentração analisada vão ao encontro dos danos na função mitocondrial obtidos pelo ensaio de MTT, uma vez que esses dados são mais intensos com o decorrer da exposição, confirmando a citotoxidade deste composto, conforme relatado por Hu *et al*, (2007).

Além disso, é possível observar que o acúmulo de EROs não está envolvido, somente, com os indícios citotóxicos, pois o mesmo já é pronunciado em curto tempo de exposição, demonstrando que o acúmulo de EROs provoca, primeiramente, a parada do crescimento celular que evolui, com o decorrer do tempo, para estresse oxidativo citotóxico. Esses resultados são possíveis, pois compostos com potencial de elevar a produção de EROs acima da capacidade redox das células podem alterar a homeostase celular através do comprometimento dos níveis de ATP, oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucléicos ocasionando danos ao DNA.

Entretanto, dependendo da intensidade dos danos, como forma de sobrevivência, primeiramente as células bloqueiam o crescimento celular e se os mecanismos de defesa intracelular não forem capazes de superar os danos ocasionados, o efeito culminará na morte celular (LI *et al*., 2007; KUZNETSOV *et al*., 2011).

Estudos recentes sobre a toxicidade dos congêneres com menor quantidade de bromos na estrutura química demonstram que os mecanismos *in vivo* e *in vitro*, também são mediados pela presença de estresse oxidativo, sendo que a exposição do PBDE-99 sobre células hepáticas e renais de roedores ocasiona danos oxidativos que afetam a despolarização mitocondrial (ALBINA *et al*., 2010), enquanto que o PBDE-47 induz a apoptose de células imortalizadas de linfócitos e neuroblastoma por mecanismos de acúmulo

de EROs e queda do potencial de membrana mitocondrial (WEIHONG *et al*., 2008; YAN *et al*., 2011) e tais achados são corroborados pelos nossos resultados.

Além disso, baseado no exposto acima, o declínio do potencial de membrana mitocondrial e o acúmulo de EROs ocasionado pela exposição aos PBDEs sugerem a indução de morte celular apoptótica das células hepáticas, sendo o processo desencadeado por estresse oxidativo.

Durante a apoptose é possível observar uma série de alterações bioquímicas e morfológicas que ocasionam o colapso da estrutura celular, sendo observadas, principalmente, alterações sobre o citoesqueleto com marginalização de fosfolipídeos, condensação da cromatina e fragmentação nuclear. As alterações sobre a membrana plasmática são ativadas por um grupo de proteases com potencial para comprometer a estrutura da membrana e permitir a translocalização do aminofosfolipídeo fosfatidilserina para a face externa da membrana servindo de mecanismo sinalizador do processo apoptótico, pois essa externalização é um dos eventos iniciais do processo (ENGELAND *et al*., 1998; KRYSKO *et al*., 2007).

Em virtude disso, os ensaios sobre a toxicidade em diferentes linhagens celulares mostram que a quantificação das fosfatidilserina externalizada na membrana é útil na diferenciação dos mecanismos de morte celular de compostos sobre investigação terapêutica ou na avaliação da toxicidade de contaminantes (RUIZ *et al*., 1999; CHANGLIN *et al*., 2008; CHEN J *et al*., 2010). Dessa forma, pôde se observar que as evidências de morte celular apoptótica obtidas nos ensaios anteriores através da exposição dos diferentes congêneres de PBDE são acompanhadas pelo aumento da externalização das fosfatidilserina, as quais reforçam a teoria de desencadeamento de ativação de vias de apoptose.

Os potenciais de indução de morte celular de cada congênere seguiram os padrões obtidos nos ensaios anteriores, sendo observados no congênere PBDE-209 os menores potenciais apoptóticos. Esses resultados estão de acordo com os achados de Hu et al., 2007 que propôs a presença de morte celular apoptótica de células HepG2 após exposição ao congênere decabrominado, porém não haviam evidências sobre as alterações a nível de membrana celular. Além disso, o mecanismo de ação apoptótica deste congênere, já foi proposta em outros ensaios de toxicidade utilizando linhagens celulares diferentes (HUANG H, *et al*., 2010; JIN *et al*., 2010; COSTA; GIORDANO, 2011).

Em relação aos congêneres PBDE-99 e PBDE-47 nossos resultados confirmam as evidências do elevado potencial apoptótico dos compostos em células hepáticas, conforme

evidenciado em nossos ensaios anteriores e com o potencial apoptótico de ambos congêneres em outras linhagens (MADIA *et al*., 2004; JIN *et al*., 2010; TAGLIAFERI *et al*., 2010; YAN *et al*., 2011).

A exclusão dos mecanismos de morte celular por vias necróticas foi BASEADA primeiramente na ausência de células com quantificação nuclear por iodeto de propídeo no ensaio da exposição da fosfatidilserina, indicando ausência de rompimento da membrana celular, e o extravasamento do conteúdo citosólico permitindo assim, a marcação do DNA com agentes fluorescentes, característica da morte celular necrótica. Portanto, a ausência de núcleos marcados com iodeto de propídeo é uma sinalização da ausência de células necróticas devido a manutenção da integridade da membrana, demonstrando assim, que os mecanismos necróticos dos congêneres investigados sobre as células HepG2 são pequenos ou imperceptíveis nos períodos e concentrações avaliados.

Outra forma para verificar a presença de mecanismos necróticos pode ser realizada pela da quantificação dos níveis da enzima LDH liberados no meio extracelular devido à relação existente entre a liberação da enzima e a integridade da membrana celular, uma vez que conforme mencionado anteriormente, durante a necrose há extravasamento intracelular. Sendo assim, a toxicidade de alguns compostos, incluídos os PBDEs têm sido investigados via mecanismos de liberação da LDH.

A liberação da LDH foi avaliada em ensaios visando investigar a toxicidade dos PBDE-99 e PBDE-47 em células de neuroblastoma humano. Ambos congêneres investigados induziram a presença de mecanismos apoptóticos, no entanto, neste ensaio o congênere PBDE-47 provocou a liberação da enzima LDH durante a apoptose (MADIA *et al*., 2004; WEIGHON, *et al*., 2008).

De forma semelhante, em alguns estudos sobre os mecanismos apoptóticos dos congêneres PBDE-209 e PBDE-47, foi observado a liberação da enzima LDH sendo sugerido que este resultado esteja relacionado com a apoptose tardia, a qual pode conter pequenos traços necróticos, já que a fagocitose durante os ensaios *in vitro* pode ocorrer lentamente e ocasionar a liberação de LDH (HU *et al*., 2007, 2009). Em contradição, nossos ensaios mostraram que os PBDEs avaliados não promovem o rompimento da membrana plasmática, pois não houve liberação da LDH significativa para o meio extracelular.

Além disso, não foram visualizadas células com membrana celular marcadas pelo corante azul de tripan, confirmando a ausência de rompimento da membrana celular e

conseqüentemente, a exclusão da morte celular necrótica, confirmando que a morte celular induzida pelos PBDEs ocorre por mecanismos apoptóticos.

Os potenciais apoptóticos dos PBDEs têm sido evidenciados por meio das alterações morfológicas sobre a membrana celular de linhagens derivadas de peixes, neuroblastomas e hepatoblastomas humanos (Hu *et al*., 2007, 2009). No entanto, existem poucos relatos de alterações sobre o núcleo celular.

Conforme mencionado anteriormente, a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear são características específicas de alterações morfológicas do processo apoptótico e a visualização destes fragmentos nucleares por técnicas de microscopia de fluorescência são úteis como métodos de sinalização do evento apoptótico sendo utilizado na determinação de toxicidade de alguns contaminantes.

Desta forma, nossos resultados confirmam a apoptose das células HepG2 após exposição aos três congêneres investigados, devido ao aumento de núcleos fragmentados. A diferença entre os potenciais apoptóticos de cada congênere seguiu a prioridade observada nos experimentos anteriores, confirmando que os menores congêneres apresentam a maior toxicidade sobre os organismos e sobre a linhagem hepática. Além disso, foi observado que as alterações sobre cada funcionalidade celular contribuem para a ativação das vias de apoptose de forma tempo dependente, embora este resultado não seja visualizado nos ensaios individualizados.

Portanto, de acordo com nossos resultados, os congêneres PBDE-209, PBDE-99, PBDE-47 induzem a ativação de morte celular por vias de apoptose mediadas por despolarização mitocondrial e acúmulo de EROS. No entanto, ainda é necessário investigar os efeitos desses congêneres na ativação de outras vias apoptóticas.

.

Conclusão

6. Conclusão

Neste trabalho, foi realizada a avaliação dos efeitos tóxicos dos principais congêneres de éteres difenílicos polibromados: PBDE-209, PBDE-99, PBDE-47 sobre células de hepatoblastoma humano visando contribuir para a compreensão dos mecanismos de ação tóxica dessa classe de retardante de chamas sobre a saúde humana.

De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que os três congêneres estudados induzem a morte das células HepG2 por via apoptótica, representando sérios riscos a saúde, pois são crescentes os níveis encontrados desses compostos no organismo humano.

A toxicidade foi diferenciada para cada congênere e características como peso molecular, coplanaridade da estrutura tridimensional, número e posição de substituintes podem influenciar nos efeitos tóxicos dos PBDEs, sendo os maiores efeitos relacionados com os congêneres com menor número de substituintes e com estrutura tridimensional coplanar.

O congênere PBDE-209 ocasiona a apoptose celular mediado por mecanismos que envolvem o decréscimo do potencial de membrana mitocondrial e elevado acúmulo de radicais livres. No entanto, este efeito ocorre lentamente, sendo observada inicialmente a parada do crescimento celular que evolui com o decorrer do tempo e culmina em apoptose celular. Enquanto isso, nos congêneres PBDE-99 e PBDE-47, o efeito citotóxico parece ocorrer diretamente, sendo observados os maiores efeitos apoptóticos.

O menor potencial apoptótico do congênere PBDE-209 em relação aos demais ocorre devido ao elevado número de substituintes, os quais dificultam sua absorção e causam impedimento estérico devido ao elevado número de ligantes da posição orto da estrutura tridimensional que dificulta a interação do composto com os componentes celulares.

A exposição da fosfatidilserina, condensação e fragmentação nuclear, características clássicas do processo apoptótico, além de uma diminuição da função mitocondrial e presença de estresse oxidativo indica que este processo parece ser iniciado pela via mitocondrial. Entretanto, é necessário investigar a influência de outros mecanismos ativadores de apoptose para o total esclarecimento dos mecanismos de toxicidade dos retardantes de chama bromados.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

ALBINA, M. L.; ALONSO, V.; LINARES, V.; BELLÉS, M.; SIRVENT, J. J.; DOMINGO, J. S.; SÁNCHEZ, D. Effects of exposure to BDE-99 on oxidative status of liver and kidney in adult rats. **Toxicology**, 271, 51-56, 2010.

ALM, H.; KULTIMA, K.; SCHOLZ, B.; NILSON, A.; ANDRÉN, P. E.; FEX-SVENNINGSEN, A.; DENCKER, L.; STIGSON, M. Exposure to brominated flame retardant PBDE-99 affects cytoskeletal protein expression in the neonatal mouse cerebral cortex. **Neurotoxicology**, 29, 628-637, 2006.

ALM, H.; SCHOLZ, B.; KULTIMA, K.; NILSON, A.; ANDRÉN, P. E.; SAVITSKI, M. M.; BERGMAN, A.; STIGSON, M.; FEX-SVENNINGSEN, A.; DENCKER, L. In vitro neurotoxicity of PBDE-99: Immdediate and Concentration-Dependent effects on Protein Expression in Cerebral cortex Cells. **Journal of Proteome Research**, 9, 1226-1235, 2010.

ALONSO, V.; LINARES, V.; BELLÉS, M.; ALBINA, M. L.; PUJOT, A.; PUJOT, A.; DOMINGO, J. L.; SÁNCHEZ, D. J. Effects on BDE-99 on the hormone homeostasis and biochemical parameters in adult male rats. **Food and Chemical Toxicology**. 48, 2206-2211, 2010.

ATHANASIOADOU, M,; CUADRA, S. N.; MARSH, G.; BERGMAN, A.; JAKOBSSON, K. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Bioaccumulative hydroxylated PBDE metabolites in Yong Humans from Managua, Nicarágua. **Environmental Health Perspectives,** 116(2), 400-408, 2008.

ALTINOK, I.; CAPKIN, E.; BORAN, H. Mutagenic, genotoxic and enzyme inhibitory effects of carbosulfan in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Pesticides Biochemistry and Physiology**. 102, 61-67, 2011.

ARNOT, J.; MCCARTY, L.; ARMITAGE, J.; REID-TOOSE, L.; WANIA, F.; COUSINS, I. An evaluation of hexabromocyclododecane (HBCD) for persistent pollutant (POP) properties and the potential for adverse effects in the environment. [Data de Acesso: 15.11.2011]. Disponível em: http://chm.pops.int/Convention/POPsReviewCommittee, 2009.

AZEVEDO E SILVA, C. E.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. Toxicologia das Bifenilas Policloradas. **Oecologia Brasiliensis**. 11(2), 179-187, 2007.

BEMBA-MEKA, P. M.; LEMIEUX, N.; CHAKRABARTI, S. K. Role of oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and calcium homeostasis in nickel subsulfide-induced human lymphocyte death in vitro. **Science of the Total Environmental**. 396, 21-34, 2006.

BI, X.; QU, W.; SHENG, G..; ZHANG, W.; MAI, B.; CHEN, D.; YU, L.; FU, J. Polybrominated diphenyl ethers in the cerebral cortex of wild river others (*Lonta canadensis).* **Environmental Pollution**. 149, 25-30, 2006.

BIRNBAUM, L. S.; STASKAL, D. F. Brominated Flame Retardants: Cause for Concern? Environmental Health Perspectives. 112 (1), 9-17, 2004.

BOLONG, N.; ISMAIL, A. F.; SALIM, M. R.; MATSUURA, T. A review of the effects of emerging contaminants in the wastewater and options for their removal. **Desalination**, 239, 229-246, 2009.

BORTOLI, G. M.; AZEVEDO, M. B.; SILVA, L. B. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells of Soybean Growers. **Mutation Research**, 1-4, 2009.

BOTARO, D; TORRES, J. P. M.Difenil Éteres Polibromados (PBDES) – Novos poluentes, Antigos Desafios. **Oecologia Brasiliensis**, 11(2) 167-178, 2007.

BRANCHI, I.; CAPONE, F.; ALLEVA, E.; COSTA. L. G. Polybrominated Diphenyl Ethers: Neurobehavioral Effects following Developmental Exposure. **Neurotoxicology**, 24, 449-462, 2003.

BRIX, R.; POSTIGO, C.; GONZALEZ, S.; VILLAGRASA, M.; NAVARRO, A.; KUSTER, M.; DE ALDA, M. J. L.; BARCELO, D. Analysis and occurrence of alkylphenolic compounds and estrogens in a European River basin and an evaluation of their importance as priority pollutants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 396, 1301-1309, 2010.

CAI, Y.; ZHANG, W.; HU, J.; SHENG, G.; CHEN, D.; FU, J. Characterization of maternal transfer of decabromodiphenyl ether (BDE-209) administered to pregnant Sprague-Dawley rats. **Reproductive Toxicology**, 31, 106-110, 2011.

CANTÓN, R. F.; SCHOLTEN, D. E. A.; MARSH, G.; JONH, P. C.; BERG, M. V. Inhibition of human placental aromatase activity by hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs). **Toxicology and Applied Pharmacology**, 227, 68-75, 2008.

CARLSSON, P.; HERZKE, D.; WEDBORG, M.; GABRIELSEN, G. W. Environmetal pollutants in the Swedish Marine ecosystem, with special emphasis on polybrominated diphenyl ethers (PBDE). **Chemosphere**, 82, 1286-1292, 2011.

CECCATELLI, R.; FAASS, O.; SCHLUMPF, M.; LICHTENSTEIGER, W. Gene expression and estrogen sensitivity in rat uterus after developmental exposure to the polybrominated diphenyl ether PBDE 99 and PCB. **Toxicology**, 220, 104–116, 2006.

CESPEDES, R.; LACORTE, S.; RALDUA, D.; GINEBREDA, A.; BARCELO, D.; PIÑA B. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, Ne Spain). **Chemosphere**, 61, 1710-1719, 2005.

CHANGLIN, Z.; FEIGUO, Z.; CHUNFANG, G.; HAO, W.; LINGLING, X.; LINGZHENG, Z.; JIE, C. Biological effects od extract from newborn porcine liver on hepatocytes, hepatic stellate cells, and hepatoma cell line. **Journal of medical Colleges of PLA**, 23, 336-345, 2008.

CHEN, L. J.; LEBETKIN, E. H.; SANDERS, J. M.; BURKA, L. T. Metabolism and disposition of 2,2',4,4',5-Pentabromodiphenyl ether (BDE99) following a single or repeated administration to rats or mice. **Xenobiotica**, 36(6), 515-534, 2006.

CHEN, J.; LIUFU, C.; SUN, W.; SUN, K.; CHEN, D. Assessment of the neurotoxic mechanism of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209) in primary cultured neonatal rat hippocampal neurons includes alterations in second messenger signaling and oxidative stress. **Toxicology Letters**, 192, 431-439, 2010.

CHEN, Y.; SHEN, K.; SHEN, C.; CHEN, L.; CHEN, X. Comparison of structure-dependent hermetic cytotoxicity induced by coplanar and non-coplanar PCB congeners. **Journal of Hazardous Materials**, 180, 773-776, 2010.

COLLINS, M. A.; NEAFSEY, E. J. Potential Neurotoxic "agents provocateurs" in Parkinson disease. **Neurotoxicology and Teratology**, 24, 571-577, 2002.

CÓLON, I.; CARO, D.; BOURDONY, C. I. Identification of Phthalate ester in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. **Environment Health Perspectives**, 108 (9), 895-900, 2000.

COSTA, L. G.; GIORDANO, G. Developmental neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) Flame Retardant. **Neurotoxicity**, 28, 1047-1067, 2007.

COSTA, L. G.; GIORDANO, G. Is decabromodiphenyl ether (BDE-209) a developmental neurotoxicant? **Neurotoxicology**, 32, 9-24, 2011.

COSTA, L. G.; GIORDANO, G.; TAGLIAFERRI, S.; CAGLIERI, A.; MUTTI, A. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants: environmental contaminants, human body burden and potential adverse health effects. **Acta**

Biomedica. 79, 172-183, 2008.

COVACI, A.; GERECKE, A.; LAW, R. J.; VOORSPOELS, S.; KOHLER, M.; LESLIE, L. HBCD in the environmental and humans: a review. **Environmental Sciencies & Technology,** 40, 3679-3688, 2006.

COVACI, A.; VOORPOELS, S.; ROOSENS, L.; JACOBS, W.; BLUST, R.; NEELS, H. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polybrominated biphenyls (PCBs) in human liver and adipose tissue samples from Belgium. **Chemosphere**, 73, 170-175, 2008.

DANERUB, P. O. Toxic Effect of Brominated Flame Retardant in man and wildlife. **Environmental International.** 29,841-853, 2003.

DE WIT, C. A. An Overview of Brominated Flame Retardants in the Environment. **Chemosphere**, 46, 583-624, 2002.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid Colorimetric Assay for cell growth and survival modifications to the tetrazólium dye procedure giving improved sensitivity and reability, **Immunology Methods**, 22, 89(2), 271-277, 1986.

DOMINGO, J. L.; CÍD-MARTÍ, R.; CASTELL, V.; LLOBET, J. M. Human exposure to PBDEs through the diet in Catalonia, Spain: Temporal trend. A review of recent literature on dietary PBDE intake. **Toxicology**, 248, 25-32, 2008.

DONG, H.; LI, Z.; MAN, X.; ZHOU, J.; LU, H.; WANG, S. Identification of the metabolites of polybrominated diphenyl ether 99 and its related cytrochrome P450s. **Journal of Biomedical Research**, 223-232, 2010.

DOROSHENKO, N.; DOROSHENKO, P. Lanthanum suppresses arachidonic acid-induced cell death and mitochondrial depolarization in PC-12. **European Journal of Pharmacology**. 567, 36-42, 2007.

EDWARDS, M.; TOPP, E.; METCALFE, C. D.; LI, H.; GOTTSCHALL, N.; BOLTON, P.; CURNOE, W.; PAYNE, M.; BECK, A.; KLEYWEGT, S.; LAPEN, D. R. Pharmaceutical and personal care products in tile drainage following surface spreanding and injection of dewatered municipal biosolids to an agricultural field. **Science of Total Environment**, 405, 4220-4230, 2009.

EMA, M.; FUJII, S.; HIRATA-KOIZUMI, M.; MATSUMOTO, K. Two-generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabromocyclododecane in rats. **Reproductive Toxicology**, 25, 335-351, 2008.

ENGELAND, M. V.; NIELAND, L. J. W.; RAMAEKERS, F. C. S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. AnexinV-Affinity Assay: A Review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, 31, 1-9, 1998.

ERRÁTICO, C. A.; MOFFAT, S. C.; BANDIERA, S. M. Comparative Oxidative Metabolism of BDE-47 and BDE-99 by rat hepatic microsomes. **Toxicological Sciences**, 123 (1), 37-47, 2011.

ERIKSSON, P.; VIBERG, H.; JAKOBSSON, E.; ORN, U.; FREDRIKSON, A. A brominated flame retardant, 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether: uptake, retention, and induction of neurobehavioural alterations in mice during a critical phase of neonatal brain development. **Toxicological Sciencies**, 67(1), 98-103, 2002.

FENG, C.; XU, Y.; HE, Y.; LUO, Q.; ZHA, J.; WANG, Z. Debrominated and methoxylated polybrominated diphenyl ether metabolites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to decabromodiphenyl ether. **Journal of Environmental Sciences**, 22, 1425-143, 2010.

FERNANDES, A.; DICKS, P.; MONTINER, P.; GEM, M.; SMITH, F.; DRIFFIELD, M.; WHITE, S.; ROSE, M. Brominated and Chlorinated dioxins, PCBs and brominated flame retardant in Scottish Shellfish: Methodology, occurrence and

human dietary exposure. **Molecular Nutrition & Food Research**, 52, 238-249, 2008.

FERREIRA, D. C.; SILVA, J. B.; GALDINO, J. C. S. Reciclagem do lixo eletrônico. **Holos**, 26 (5), 104-112, 2010.

FONTENELE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P; JÚNIOR, M. M. R. Contaminantes ambientais e interferentes endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, 54(1) 6-16, 2010.

FREDERIKSEN, M.; VORKAMP, K.; MATHIESEN, L.; MOSE, T.; KNUDSEN, L. E. Placental transfer of the polybrominated diphenyl ethers BDE-47, BDE-99, BDE-209 in a human placenta perfusion system: an experimental study. **Environmental Health**, 9 (32), 2010.

GUA, S.; JIANG, B.; BAO, Y. M.; AN, L. J. Protocatechuic acid suppresses MPP^+-induced mitochondrial dysfunction and apoptotic cell death in PC-12 cells. **Food and Chemical Toxicology**, 44, 1659-1666, 2006.

GELDERBLOM, W. C. A.; GALENDO, D.; ABEL, S.; SWANEVELDER, S.; MARASAS, W. F. O.; WILD, C. P. Cancer initiation by fumonisin B_1 in rat liver-role of cell proliferation. **Cancer** Letter, 169, 127-137, 2001.

GHISARI, M.; BONEFELD-JORGENSEN, E. C. Impact of environmental chemicals on the thyroid hormone function in pituitary rat GH3 cells. **Molecular and Cellular Endocrinology,** 244, 31-41, 2005.

GIRI, S.; GIRI, A.; SHARMA, G. D.; PRASAD, S. B. Mutagenic effects of carbosulfan, a carbamate pesticide. **Mutation Research**, 519, 75-82, 2002.

GOODMAN, J. E. Neurodevelopmental effects of decabromodiphenyl ether (BDE-209) and implications for the reference dose. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 54(1), 91-104, 2009.

GONZALÉZ, S.; ROLDÁN–LÓPEZ, R.; CORTINA, J. L. Presence and Biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: A Review. **Environmental Pollution**,161, 83-92, 2012.

GUO, M.; HAY, B. Cell proliferation and apoptosis. **Current Opinion in Cell Biology**, 11, 745-752, 1999.

GWAG, B. J.; LOBNER, D.; KOH, J. Y.; WIE, M. B.; CHOI, D. W. Blockade of glutamate receptor unmasks neuronal apoptosis after oxigen-glucose deprivation in vitro. **Neuroscience.** 68, 615-619, 1995.

HAKK, H.; LETCHER, R. J. Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardant- a review. **Environmental International**, 29. 801-828, 2003.

Hanneliem, V.; Karel, G.; Jo, V. D.; Sofie, S. The role of CXC chemokines in the transition of chronic inflammation to esophageal and gastric cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Reviews on Cancer,** 1825, 117-129, 2012.

HAMERS, T.; KAMSTRA, J. H.; SONNEVELD, E.; MURK, A. J.; KESTER, A. H. M.; ANDERSON, P. L.; LEGLER, J.; BROUWER, A. In vitro Profiling of the endocrine–disrupting potency of brominated flame retardant. **Toxicology Sciences**, 92 (1), 157-173, 2006.

HEIBL, J.; VETTER, W. Detection of hexabromocyclododecane and its metabolite pentabromocyclodedecane in chicken egg and fish from the official food control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 3319-3324, 2007,

HITES, R. A.; FORAN, J. A.; CARPENTER, D. O.; HAMILTON, C. M.; KNUTH, B. A.; SCWAGER, S. J. Cancer Risk and Salmon intake. **Science**, 68, 478, 2004.

HORN, O.; NALLI, S.; COOPER, D.; NICELL, J. Plasticizer metabolites in the environment. **Water Research**, 38, 3693-3698, 2004.

HUANG, H. C., GIORDANO, G., COSTA, L.G. Comparative Cytotoxicity and intracellular accumulation of five polybrominated diphenyl congeners in mouse cerebellar granule neurons. **Toxicological Sciences**, 114(1), 124-132, 2010.

HUANG, J. F.; SHUI, K. J.; LI, H. Y.; HU, M. Y.; ZHONG, G. H. Antiproliferative effect of azadirachtin A on Spodoptera litura Sl-11 cell line through cell cycle arrest abd apoptosis induced by up-regulation of p53. **Pesticide Biochemistry and Phisiology**, 99, 16-24, 2011.

HU, X.; XU, Y.; HU, D. C.; HUI, Y.; YANG, F.X. Apoptosis induction on human hepatoma cells HepG2 of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209). **Toxicology Letters**, 171, 19–28, 2007.

HU, X.; HU, D. XU, D. Effects of tetrabrominated diphenyl ether and hexabromocyclododecanes in single and complex exposure to hepatoma HepG2 cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 27, 327-337, 2009.

JETT, A. D. Neurotoxic Pesticides and Neurologic Effects. **Neurologic Clinics** 29, 667–677, 2011.

JIANG, Y.; ZHOU, X.; CHEN, X.; YANG, G.; WANG, Q.; RAO, K.; XIONG, W. Benzo(a)pyrene-induced mitochondrial dysfunction and cell death in p53-null Hep3B cells. **Mutation Reseach**,762, 75-83, 2011.

JIN, S.; YANG, F.; HUI, Y.; XU, Y.; LU, Y.; LIU, J. Cytotoxicity and apoptosis induction on RTG-2 cells of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) and decabromodiphenyl ether (BDE-209). **Toxicology in Vitro**, 24, 1190-1196, 2010.

JOKANOVÍC, K.; KOSANOVÍC, M. Neurotoxic effects in patients poisoned with organosphosphosrus pesticides. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 29, 195-201, 2010.

KNASMULLER, S.; PARZEFAL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH–SUNDERMANN, V.; WILLIANISON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUDI, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatom cell for the detection od mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, 402: 185–202, 1998.

KESTER, M. H.; BULDUK, S.; VAN TOOR, H. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated metabolites of polyhalogenated aromatic hydrocarbons reveals alternative mechanism for estrogenic activity of endocrine disrupters. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 87(3), 1142-1150, 2002.

KIM, T. H.; LEE, Y. J.; LEE, E.; KIM, M. S.; KWACK, S. J.; KIM, K. B.; CHUNG, K. K.; KANG, T. S.; HAN, S. Y.; LEE, J.; LEE, B. M.; KIM, H. S. Effects of Gestacional Exposure to decabromodiphenyl ether on reproductive parameter, thyroid hormone levels, and neuronal development is Sprague-Dawley Rats Offspring. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A**, 72, 21-22, 1296-1303, 2009.

KOH, J. Y.; CHOI, D. W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. **Journal Neuroscience Methods**, 20, 83-90, 1987.

KOH, J. Y.; COTMAN, C. W. Programmed cell death: its possible role in calcium channel antagonist neurotoxicity. **Brain Research**, 587, 233-240, 1992.

KRYSKO, D. V.; BERGHE, T. V.; D`HERDE, K. VANDERNABEELE, P. Apoptosis and Necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, 44, 205-221, 2008.

KURIYAMA, S. N.; TALNESS, C. E.; GROTE, K.; CHAHOUD, I. Developmental Exposure to low-dose PBDE-99: Effects on male fertility and neurobehavior in rat offspring. **Environmental Health Perpectives**, 113(2), 149-154, 2005.

KUZNETSOV, A. V.; MARGREITER, R.; AMBERGER, A.; SAKS, V.; GRIMM, M. Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death. **Biochimica at Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research**, 1813, 1144-1152, 2011.

LEMA, S. C.; DICKEY, J. T.; SCHUTZ, I. R.; SWANSON, O. Dietary Exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) alters thyroid status and thyroid hormone-regulated gene transcription in the pituitary and brain. **Environmental Health Perspectives**, 116(2), 1694-1699, 2008.

LETCHER, R. J.; GEBBINK, A.; SONNE, C.; BORN, E. W.; MCKINNEY, M. A.; DIETZ, R. Bioaccumulation and Biotransformation of brominated and Chlorinated contaminants and their metabolites in ringes seals (*Pusa hispida)* and polar bears (*Ursus maritimus*) from East Greenland. **Environment International**, 35, 1118-1124, 2009.

LI, J.; ZHANG, J. Inhibition of apoptosis by ginsenoide Rg1 in cultured cortical neurons. **Chinese Medical Journal (English Edition)**, 110, 535-539, 1997.

LI, J.; CHEUNG, H. Y.; ZHANG, Z.; CHAN, G. K. L.; FONG, W. F. Andrographolide induces cell cycle arrest at G2/M phase and cell death in HepG2 cells via alteration of reactive oxiden species. **European Journal of Pharmacology**, 568, 31-44, 2007.

LI, J.; YU, H.; ZHAO, Y.; ZHANG, G.; WU, Y. Levels of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in breast milk from Beijing, China. **Chemosphere**, 73, 182-186, 2008.

LIANG, S. X.; GAO, H. X.; ZHAO, Y. Y.; MA, X. M.; SUN, H. W. Effects of repeated exposure to decabrominated diphenyl ether (BDE- 209) on mice nervous system and its self repair. **Environmental Toxicology and Pharmaceutical**, 29, 297-301, 2010.

LILIENTHAL, H.; HACK, A.; ROTH-HARER, A.; GRANDE, S. W.; TALNESS, C. E. Effects of Developmental Exposure to 2,2',4,4',5 pentabromodiphenyl ether (PBDE-99) on sex steroids, sexual developmental, and sexually dimorphic behavior in rats. **Environmental Health Perspectives**, 14 (2), 194-201, 2006.

LUKANDU, O. M.; BREDHOLT, T., NEPPELBERG, E.; GJERTSEN, B. T,; JOHANNESSEN, A. C.; VINTERMYR, O. K.; COSTEA, D. E. Early loss of mitochondrial inner trnasmembrane potential in khat-induced cell death of primary normal human cells. **Toxicology**, 263, 108-116, 2009.

LOBNER, D. Comparison of LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? **Journal of Neuroscience Methods**, 96, 147-152, 2000.

MA, S.; YU, Z.; ZHONG, X.; REN, G.; PENG, P.; SHEN, G.; FU, J. Levels and congeners profiles of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in breast milk from Shangai: Implications for exposure route of higher brominated BDEs. **Environmental International**, 47, 72-77, 2011.

MADIA, F.; GIORDANO, G.; FATTORI, V.; VITALONE, A.; BRANCHI, I.; CAPONE, F. Differential in vitro neurotoxicity of the flame retardant PBDE-99 and of the PCB Aroclor 1254 in human astrocytoma cells. **Toxicology Letters**, 154, 11-21, 2004.

MARSH, G.; ATHANASIADOU, M.; ATHANASSIADIS, I.; SANDHOLM, A. Identification of hydroxylated metabolites in 2,2',4,4' tetra-bromodiphenyl Ether exposed rats. **Chemosphere**, 63, 690-697, 2006.

MARTINEZ, J. L. Environmental Pollution by antibiotics and by antibiotics resistance determinants. **Environmental Pollution**, 157, 2893-2902, 2009.

MCDONALD, THOMAS A. A perspective on the potential health risks of PBDEs. **Chemosphere**, 46, 745-755, 2002.

MESSER. A. Mini-Review: Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardant as potential autism risk factor. **Physiology & Behavior**, -100, 245-249, 2010.

MEERTS, I. A. T. M.; LETCHER, R. J.; HOVINF, S.; MARSH, G.; BERGMAN, A.; LEMMEN, J. G.; VAN DER BURG, B.; BROUWER, A. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxilated PBDE, and polybrominated bisphenol A compounds. **Environmental Health Perspectives**, 109, 399-407, 2001.

MORCK, A; HAKK, H; ORN, U; KLASSON, W. E. Decabromodiphenyl ether in the rat: absorption, distribution, metabolism, and excretion. **Drug Metabolism and Disposition**, 31, 900–907, 2003.

MOROSE, G. An Overview of Alterantives to Tetrabrombisphenol A(TBBPA) and Hexabromocyclododecane (HBCD). **A publication of the Lowell Center for Sustainable Production.** 2006. [Data de Acesso: 15.11.2011]. Disponível em: www. Sustainableproduction.org

MINORICS, R.; SZEKERES, T.; KRUPITZA, G.; SAIKO, P.; GIESSTIGLS, B.; WOLFLING, J.; FRANK, E.; ZUPKÓ, I. Antiproliferative effects of some novel synthetic solanidine analogs on HL-60 human leukemia cells in vitro. **Steroids**, 6, 156-162, 2011.

NALLI, S.; COOPER, D. G.; NICELL, J. A. Biodegradation of Plasticizer by *Rhodococcus rhodochrous*. **Biodegradation**, 13, 343-352, 2002.

NALLI, S.; HORN, O. J.; GROCHOWALSKI, A. R.; COOPER, D. G.; NICELL, J. A. Origin of 2-ethyllhexanol as a VOC. **Environmental Pollution**, 140, 181-185, 2006.

PAPAZISIS, K. T.; GEROMICHALOS, G. D.; DIMITRIADIS, K. A.; KORTSARIS, A. H. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. Journal of **Immunological Methods**, 208(2), 151-158, 1997.

PENTEADO, J. C. P.; VAZ, J. M. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). **Química Nova**, 24(3), 390-398, 2001.

PILATOVÁ, M.; SARISSKY, M.; KUTSCHY, P.; MIROSSAY, A.; MEZENCEV, R.; CURILLOVA, Z.; SUCHÝ, M.; MONDE, K.; MINOSSAY, L.; MOJZIS, J. Cruciferous phytoalexins: antiproliferative effects in T-Jurkat leukemic cells. **Leukemia Research**, 29, 415-421, 2005.

PTAK, A.; GUT, P.; BLACHUTA, M.; RAK, A.; GREGORASZCZUK, E. L. Direct inhibition of ERK1/2 phosphorylation as a possible mechanism for the antiproliferative action of 3,4-diOH-PCB3 in the MCF-7 cell line. **Toxicology Letters**, 190, 187-192, 2009.

POLLACK, A.; CIANCIO, G. Cell Cycle phase-specific analysis of cell viability using Hoechst 33342 and propidium iodide after ethanol preservation. In Z Darzyn Kiewin & HA Crissman (eds). **Flow Cytometer, Academic Press,** 19-24, 1991.

QIU, X.; BIGSBY, R. M.; HITES, R. A. Hydroxylated Metabolites of Polibrominated Diphenyl Ethers in Human Blood Samples from United States. **Environmental Health Perspectives,** 117 (1), 93-98, 2009.

RICHARDSON, S. D.; TERNES, T. A. Water analysis: Emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, 77, 3807-3838, 2005.

RIU, A.; CRAVEDI, J.P.; DEBRAUWER, L.; GARCIA, A.; CANLET, C.; JOUANIN, I.; ZALKO, D. Disposition and metabolic profiling of [14C]-decabromodiphenyl ether in pregnant Wistar rats. **Environment International**, 34, 318–329, 2008.

ROGALSKA, A.; CHYLA, A.K.; JOZWIAK, Z. Aclarubicin-induced ROS generation and collapse of mitochondrial membrane potential in human cancer cell lines. **Chemico-Biological Interaction**, 176, 58-70, 2008.

RONIZ, D.; FARMEN, E.; FINNE, E.; KARLSSON, H.; FÖRLIN, L. Sublethal effects of the flame retardants hexabromocyclododecane (HBCD), and tetrabromobisphenol A (TBBPA), on hepatic enzymes and other biomarkers in juvenile rainbow trout and fetal eelpout. **Aquatic Toxicology,** 69, 229-245, 2004.

RUIZ, L.; INÉS, A.; LAVIADA, D. Δ^9-Tetrahydrocamabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism. **FEBS Letters**, 458, 400-404, 1999.

SANDHOLM, A; EMANUELSSON, B-M; KLASSON-WEHLER, E. Bioavailability and half-life of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in rat. **Xenobiotica** 33(22),1149-1158, 2003.

SCHRIKS, M.; ZNINAVASHE, E.; FURLOW, J. D.; MURK, A. J. Disruption of thyroid hormone-mediated *Zenopus laevis* tadpole tail tip regression by hexabromocyclododecane (HBCD) and 2,2',3,3',4,4',5,5', 6-nona brominated diphenyl ether (BDE-206). **Chemosphere**, 65, 1904-1908, 2006.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, v.82, p. 1107-1112, 1990.

SHAO, J.; WHITE, C. C.; DABROWSKI, M. J.; KAVANAGH, T. J.; ECKERT, M. L.; GALLAGHER, E. P. The role of mitochondrial and oxidative injury in BDE 47 toxicity to human fetal liver hematopoietic stem cells. **Toxicological Sciences**. 101(1), 81-90, 2008.

SHEN, K.; SHEN, C.; YU. J.; YU, C.; CHEN, L.; SHI, D.; CHEN, Y. PCB congeners induced mitochondrial dysfunction in Vero cells. **Journal of Hazardous Materials**, 185, 24-28, 2011.

SHI, K.; QIAN, L.; GUO, S.; ZHANG, X.; LUI, J.; CAO, Q. Teratogenic effects of tetrabromobisphenol A on *Xenopus tropicalis* embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C**, 152, 62-68, 2010.

SKARMAN, E.; DARNERUD, P.O.; OHRVIK, H.; OSKARSSON, A. Reduced thyroxine levels in mice perinatally exposed to polybrominated diphenyl ethers. **Environmental Toxicology Pharmacology**, 19, 273-281, 2005.

Sodré, F. F.; LOCATELLI, M. A. F.; MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais. **Caderno Temático**-Volume 6. 2007. [Data de Acesso: 15.11.2011]. Disponível em: http://lqa.iqm.unicamp.br/cadernos/caderno6.pdf.

SONNE, C. Health effects from range transported contaminants in Ártic top predator: An integrated review based on studies of polar bear and relevant model species. **Environment International**, 36, 461-491, 2010.

STASKAL, D. F.; HAKK H.; BAUER, D.; DILIBERTO, J. J.; BIRNBAUM, L. S. Toxicokinetics of polybrominated diphenyl ether congeners, 47, 99, 100 and 153 in mice. **Toxicological Sciences**, 94(1), 28-37, 2006.

STAPLETON, H. M.; DODDER, N. G. Photodegradation of decabromodiphenyl ether in house dust by natural sun light. **Environmental Toxicological and Chemistry**, 27 (2), 306-312, 2008.

STAPLETON, H. M.; KELLY, S. M.; PEI, R.; LETCHER, R. J.; GUNSCH, C. Metabolism of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by human hepatocytes in Vitro. **Environmental Health Persperctives**, 117 (2), 190-202, 2009.

STOKER, T. E.; COOPER, R. L.; LAMBRIGHT, C.S.; WILSON, V. S.; FURR, J.; GRAY, L. E. In vivo and in vitro anti-androgenic effects of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture. **Toxicology and Applied**

Pharmacology, 207, 78-88, 2005.

SILVA, M. M.; SILVA, V. H. Envelhecimento: importante fator de risco para o câncer. **Arquivos Medicos do ABC**, 30(1), 11-18, 2005.

SODERSTROM, G.; SELLSTROM, U.; DE WIT, C.; TYSKLIND, M. Photolytic Debromination of Decabromodiphenyl Ether (BDE 209). **Environmental Science and Technology**, 38, 127-132, 2004.

TAGLIAFERI, S.; CAGLIERI, A.; GOLDONI, M.; PINELLI, S.; ALINOVI, R.; POLI, D.; PELLACANI, C.; GIORDANO, G.; MUTTI, A.; COSTA, L. G. Low Concentrations of teh brominated flame retardants BDE-47 and BDE-99 induce synergistic in human neurobçastoma cells. **Toxicology in vitro**, 24, 116-122, 2010.

TAKEHIKO, I. Mitochondrial Membrane Potential and ischemic neuronal death. **Neuroscience Research**, 55, 234-243, 2006.

TALSNESS, C. F.; SHAKIBAEI, M.; KURIYAMA, S. Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. **Toxicology Letters**, 157, 189-202, 2005.

TALNESS, C. E. An overview of Toxicological aspects of Polibrominated diphenyl ethers a flame-retardant additive in several consumer products. **Environmental Research**, 108, 158-167, 2008,

TOMS, L. M. L.; HARDEN, F. A.; SYMONS, R. K.; BURNISTON, D.; FURST, P.; MULLER, J. F. Polybrominated diphenyl ether (PBDEs) in human milk from Australia. **Chemosphere**, 68, 797-803, 2007.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMUELLER, S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cell. **Mutation Research**, 2000. 468 (2), 213-225.

U.S. EPA (2008) Toxicological Review of 2,2',4,4' – Tetrabromodiphenyl ether (BDE-47). **EPA/635/R-07/005F**. [Data de Acesso: 15.11.2011]. Disponível em: www.epa.gov/iris.

VALMAS, N.; ZURYN, S.; EBERT, P. R. Mitochondrial uncouplers act synergistically with the fumigant phosphine to disrupt mitochondrial membrane potential and cause cell death. **Toxicology**, 252, 33-39, 2008.

VENKATESHA, V. A.; KALEN, A. L.; SARSOUR, E. H.; GOSWAMI, P. C. PCB-153 exposure coordinates cell cycle progression and cellular metabolism in human mammary epithelial cells. **Toxicology Letters**, 196. 110-116, 2010.

VERNER, M-A.; BOUCHARD, M.; FRITSCHE, E.; CHARBONNEAU, M.; HADDAS, S. In Vitro neurotoxicity data in human risk assessment of polybrominated diphenyl ethers (PBDE): Overview and Perspectives. **Toxicology in Vitro**, 25, 1509-1515, 2011.

VIBERG, H; FREDRIKSSON, A; ERIKSSON, P. Deranged spontaneous behavior and decrease in cholinergic muscarinic receptors in hippocampus in the adult rat, after neonatal exposure to the brominated flame-retardant, 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (PBDE 99). **Environmental Toxicology and Pharmacology,** 20, 283-288, 2005.

VIBERG, H., MUNDY, W., ERIKSSON, P. Neonatal exposure to decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) results in changes in BDNF, CaMKII and GAP-43, biochemical substrates of neuronal survival, growth, and synaptogenesis. **Neurotoxicology**, 29, 152-159, 2008.

VICHAI,V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, 1, 1112-1115, 2006.

VILLENEUVE, D. L.; KANNAN, K.; PRIEST, B. T. In vitro assessment of potential mechanism-specific effects of polybrominated diphenyl ethers. **Environmental and Toxicology Chemistry**, 21 (11), 2431-2433, 2002.

XING, T.; CHEN, T.; TAO, Y.; WANG, W.; CHEN, J.; RUAN, D. Y. Effects of decabrominated diphenyl ether (BDE-209) exposure at different developmental periods on synaptic plasticity in the dentate gyrus of adults rats in vivo. **Toxicological Sciences**. 110 (2), 401-410, 2009.

WISEMAN, S. B.; WAN, Y.; CHANG, H.; ZHANG, X.; HECKER, M.; JONES, P. D.; GIESEY, J. P. Polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated/metoxilated analogs. Environmental Sources, metabolic relationships abd relative toxicities. **Marine Pollution Bulletin**, 63, 179-188, 2011.

WEIHONG, H.; PING, H.; AIGUO, W.; TAO, X.; BAYI, X.; XUEMIM, C. Effects of PBDE-47 on citotoxicity and genotoxicity in human neuroblastoma in vitro. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 649, 62-70, 2008.

YAMADE-OKABE, T.; SAKAI, H.; KASHIMA, Y.; YAMADA-OKABE, H. Modulation at cellular level of thyroid hormone receptor-mediated gene expression by 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane (HBCD), 4,4'-diiodobiphenyl(DIB), and nitrofen (NIP). **Toxicology Letters**, 155, 127-133, 2005.

YAN, C.; HUANG, D.; ZHANG, Y. The involvement of ROS overproduction and mitochondrial dysfunction in PBDE-47-induced apoptosis on Jurkat cells. **Experimental Toxicologic Pathology**, 63 (11), 413-417, 2011.

YILMAZ, B.; SANDAL, S.; CHEN, C. H.; CARPENTER, D. O. Effects of PCB 52 and PCB 77 on cell viability, [Ca^{2+}], levels and membranes fluidity in mouse thynocytes. **Toxycology**, 217, 184-193, 2008.

ZEGURA, B.; LAH, T. T.; FELIPIC, M. The Role of reactive oxigen species in microcystin-LR-induced DNA-damage. **Toxicology**, 200, 59-68, 2004.

ZHANG, X.; YANG, F.; XU, C.; LIU, W.; WEN, S.; XU, Y. Cytotoxicity evaluation of three pairs of hexabromocyclododecane (HBCD) enantiomers on Hepg2 cell. **Toxicology in Vitro**, 22, 1520-1527, 2008.

ZHANG, W.; CAI, Y.; SHENG, G.; CHEN, D.; FU, J. Tissue distribution of decabrominated diphenyl ether (BDE-209) and its metabolites in sucking rat pups after prenatal and/or postnatal exposure. **Toxicology**, 283, 49-54, 2011.

ZHIVOTOVSKY B.; SAMALI, A.; GAHM, A.; ORRENIUS, S. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, 6 (7), 644-651, 1999.