UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação dos congêneres BDE-100 e BDE-153 de éteres difenílicos polibromados sobre a linhagem celular HepG2 e linfócitos humanos: efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos

Lílian Cristina Pereira

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação dos congêneres BDE-100 e BDE-153 de éteres difenílicos polibromados sobre a linhagem celular HepG2 e linfócitos humanos: efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Aluna: Lílian Cristina Pereira

Orientador: Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta

Coorientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 28/07/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2016

PEREIRA, L.C.	Avaliação dos congêneres BDE-100 e BDE-153 de éteres difenílicos polibromados sobre a linhagem celular HepG2 e linfócitos humanos: efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos		**DOUTORADO FCFRPUSP 2016**

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.

Pereira, Lílian Cristina

Avaliação dos congêneres BDE-100 e BDE-153 de éteres difenílicos polibromados sobre a linhagem celular HepG2 e linfócitos humanos: efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. Ribeirão Preto, 2016.

210 p. : Il. ; 90 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Dorta, Daniel Junqueira

Coorientadora: de Oliveira, Danielle Palma

1. Retardantes de Chama. 2. Éteres de difenilas polibromadas. 3. Citotoxicidsde

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lílian Cristina Pereira

Avaliação dos congêneres BDE-100 e BDE-153 de éteres difenílicos polibromados sobre a linhagem celular HepG2 e linfócitos humanos: efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta

Coorientadora: Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Bel Pesce

DEDICATÓRIA

À Deus

Dedico este trabalho principalmente a Ele, que possui espaço especial em minha vida. Agradeço pelas conversas, e por ter me escutado, atendido e instruído em diversas vezes. Eu sei que estará sempre comigo e por isso caminho confiante.

À minha Família

Dedico este trabalho também aos meus pais, **Paulo e Celina** que sempre me apoiaram incondicionalmente. Seus ensinamentos de honra, ética, honestidade e perseverança sempre caminham comigo. E aos meus irmãos, **Paulo e Letícia**. Por mais que estejamos separados pela distância estaremos sempre juntos pelo coração.

Ao meu Esposo Evandro Luiz Marciano

Gostaria também de dedicar este trabalho ao **Evandro**. Meus dias se tornam mais alegres e coloridos com você ao meu lado. Obrigada por me apoiar. Obrigada pelo seu amor, paciência, compreensão, incentivo, companheirismo e dedicação, sobretudo nas horas difíceis.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador professor Dr. Daniel Junqueira Dorta, que tenho muito respeito e admiração. E a minha Coorientadora professora Dra. Danielle Palma de Oliveira. Obrigada por confiarem e acreditarem no meu potencial, pelos conhecimentos partilhados, pela amizade e pelas contribuições importantes no desenvolvimento do meu conhecimento científico. Competência e profissionalismo sempre serão minhas referências.

Apreciei imensamente a colaboração de meus colegas de laboratório: Alana, Alecssandra, Bárbara, Camila, Elisa, Flávia, Gabriela, Giovana, Maria Julia, Mariana, Murilo, Otávio, Raul, Raíssa, Vítor. Obrigada por tornarem a minha rotina de laboratório alegre e promissora nestes anos de convivência. Sempre me lembrarei dos ensinamentos fundamentais para execução deste trabalho, bem como das brincadeiras e momentos de descontração.

Um agradecimento muito especial não poderia faltar para os funcionários do Laboratório de Bioquímica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP: Alcides Silva Pereira, Ana Cristina Morseli Polisello, Ana Elisa Azzolini, Ieda Maria Razaboni Prado e Nadir Mazzucato pela companhia durante os anos. Agradeço também as várias contribuições de Klaus Accoroni e Sônia Dreossi, técnicos do Laboratório de Toxicologia Ambiental. E também, as secretárias da Pós-Graduação Rosemary Ioshimine Gerolineto e Rosana Florencio pela atenção e prestatividade.

Sou profundamente grata aos membros do MITOLAB – da Universidade de Coimbra – Departamento de Ciências da Vida, que me receberam, acolheram e acompanharam durante o doutorado sanduíche em Portugal.

Além do conhecimento, a ciência também é palco de grandes encontros. Durante este tempo, várias foram às amizades construídas e que serão cultivadas pelo resto da vida. Agradeço a Deus estes encontros: Ana Teresa Inácio Varela (Lato Latinho); João Rito (com Laínha); Filipe Valente Duarte (Inspetor Bugiganga) e Marta Baptista (com o Bonga); João Soeiro e Ana Simões (agora com a pequena Helena) e Anabela Rolo. Vocês todos tornaram os oito meses do outro lado do atlântico maravilhosamente "fixes". Passaram rápido, mas se calhar foi o tempo suficiente para tornar esta amizade muito "gira".

Agradeço a Agência de Fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido a este projeto (Processo n. 2012/13123-0) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxilio concedido para a realização do doutorado sanduíche por meio do programa Ciências sem Fronteiras (Processo n. PVE – A018/2013)

RESUMO

PEREIRA, L.C. **Avaliação dos congêneres BDE-100 e BDE-153 de éteres difenílicos polibromados sobre a linhagem celular HepG2 e linfócitos humanos: efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. 210 f.** Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Os retardantes de chama bromados são substâncias utilizadas em bens de consumo para aumentar sua resistência ao fogo e/ou altas temperaturas. Para este fim os Éteres Difenílicos Polibromados (PBDEs do inglês *polybrominated diphenyl ether*) representam a classe mais utilizada tendo em vista sua eficiência no controle da propagação da chama e baixo custo. Estes compostos são considerados persistentes, bioacumuláveis, podem ser transportados para longas distâncias e apresentam toxicidade podendo causar desregulação endócrina, entretanto os mecanismos de toxicidade ainda não foram bem estabelecidos. Desta forma, o presente projeto utilizou linhagens celulares de Hepatoblastoma Humano (HepG2), HeLa, Hepatócitos e linfócitos humanos a fim de elucidar seus mecanismos de toxicidade. Os resultados significativos demonstram a capacidade destes compostos em induzir dano primário no DNA (0,5 µmol/L para o BDE-153 e 5 µmol/L para o BDE-100) monitorado pelo teste do cometa, que não foi reparado após 24 horas de exposição. No entanto, não se observou um aumento de micronúcleos em HepG2 e linfócitos após exposição aos congêneres (0,1 – 25 µmol/L) nem mesmo mutagenicidade no ensaio de *Salmonella typhimurium*. Contudo, os compostos apresentam capacidade de diminuir a redução do brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT), proliferação e interferem no ciclo celular nos cultivos celulares avaliados. Estes efeitos de citotoxicidade estão relacionados com a disfunção mitocondrial, uma vez que ambos PBDEs geram dissipação do potencial de membrana mitocondrial, formação e acúmulo de espécies reativas, culminando em morte celular apoptótica, demonstrada pela manutenção da fosfatidil serina na face externa da membrana celular, pela condensação e fragmentação nuclear, presença de fatores pró-apoptóticos no citosol da célula, tais como citocromo C e AIF além da ativação de caspases 3 e 9. Estes dados corroboram com o fato de não ter liberação de lactato desidrogenase intracelular, excluindo a morte celular por necrose. E por fim, foi possível observar que a exposição aos compostos ativa o processo autofágico, a princípio como um mecanismo de citoproteção observado pela conversão de LC3I em LC3II e acúmulo de p62 (marcadores autofágicos) além de marcações imunicitoquímicas para LC3II e co-localização de lisossomos no padrão pontuado, indicanto acúmulos da proteína LC3 e lisossomos, formando os autofagossomos. Em conjunto nossos resultados apresentam a capacidade de induzir instabilidade genômica e citotoxicidade desta classe de compostos, reforçando a idéia de que os PBDEs representam risco à população exposta.

Palavras-chave: Retardantes de chama, Éteres de difenilas polibromadas (PBDEs), Citotoxicidade, Genotoxicidade e Autofagia.

ABSTRACT

PEREIRA, L.C. **Evaluation of the effects of polybrominated diphenyl ethers congeners, BDE-100 and BDE-153, on the HepG2 cell line. 210 f.** Tesis (Doctor). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The brominated flame retardants are substances used in consumer goods to increase its fire resistance and/or high temperatures. Due to, the polybrominated diphenyl ethers (Polybrominated diphenyl ether) are the most commonly used class in view of its efficiency in controlling the spread of flame and low cost. These compounds are considered persistent, bioaccumulative, can be transported over long distances and have toxicity. However the toxic mechanisms of action have not been well established. Thus, this project held cytotoxic, genotoxic and mutagenic assays in HepG2, HeLa, hepatocytes and human lymphocytes cells in order to elucidate the mechanisms of toxicity. The results demonstrate the ability of these compounds to induce primary DNA damage (0.5 µM for BDE-153 and 5 µM for BDE-100) monitored by the comet assay, it was not repaired after 24 hours of exposure. However, there was not observed nether increase in micronuclei in HepG2 cells and lymphocytes after exposure to the congeners (0.1 - 25 µM) even in the Salmonella typhimurium mutagenicity assay. However, the compounds show the ability to reduce MTT reduction, proliferation, and interfere with cell cycle evaluated in cell cultures. These cytotoxic effects are related to mitochondrial dysfunction, since both PBDE generate dissipation of the mitochondrial membrane potential, accumulation of reactive oxygen species, resulting in apoptotic cell death, demonstrated by the maintenance of serine phosphatidyl on the external surface of the cell membrane, by condensation and nuclear fragmentation, the presence of pro-apoptotic factors in the cytosol of the cell, such as cytochrome c and AIF plus activating caspase 3 and 9. These data corroborate the fact of not having to intracellular lactate dehydrogenase release, excluding death cell necrosis. Finally, it was observed that exposure to the active compounds the autophagic process, at first as a cytoprotective mechanism observed by LC3I conversion in LC3II and accumulation of p62 (autophagic markers) plus imunicitoquímicas markings for LC3II and co-location lysosomes in dotted pattern, indicanto accumulations of LC3 protein and lysosomes, forming autophagosomes. Together our results show the ability to induce genomic instability and cytotoxicity of this class of compounds, reinforcing the idea that PBDEs pose a risk to the exposed population.

Keyword: Flame retardants, Polybrominated difenilas Ethers (PBDEs), Cytotoxicity, Genotoxicity and Autophagy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Poluentes Orgânicos Persistentes	2
FIGURA 2	Estrutura química geral dos PBDEs	6
FIGURA 3	Comparação entre as estruturas do BDE-100 e hormônios endógenos	9
FIGURA 4	Representação das principais funções do fígado	12
FIGURA 5	Representação da microestrutura do fígado	13
FIGURA 6	Influência de substâncias químicas na Fosforilação Oxidativa	20
FIGURA 7	Representação dos mecanismos de interações de compostos químicos com implicações toxicológicas	22
FIGURA 8	Representação simplificada das vias de extrínseca e intrínseca de indução de morte celular por apoptose desencadeada por xenobióticos	25
FIGURA 9	Vias de sinalização e controle da autofagia	29
FIGURA 10	Cometa analisado em software, demostrando o parâmetro Tail Moment (TM)	32
FIGURA 11	Micrografias de Micronúcleos, único, e múltiplos, vistos sob a luz	33
FIGURA 12	Possíveis morfologias de células cultivadas com bloqueio de citocinese, após a exposição a agentes genotóxicos/citotóxicos	34
FIGURA 13	Efeito do BDE-100 (A) e BDE-153 (B) sobre o DNA	69
FIGURA 14	Efeito dos congêneres de BDE-100 (A) e BDE-153 (B) sobre a capacidade de redução do MTT pela linhagem celular HepG2	76
FIGURA 15	Efeito dos congêneres de BDE-100 (A) e BDE-153 (B) sobre a quantidade de proteína celular da linhagem HepG2	77
FIGURA 16	Efeito sobre o ciclo Celular após exposição ao BDE-100	79

FIGURA 17	Efeito sobre o ciclo Celular após exposição ao BDE-153	80
FIGURA 18	Efeito do BDE-100 sobre o potencial de membrana mitocondrial da linhagem HepG2, em 24 e 48 horas de exposição	82
FIGURA 19	Efeito do BDE-153 sobre o potencial de membrana mitocondrial da linhagem HepG2, em 24 e 48 horas de exposição	83
FIGURA 20	Efeito dos congêneres BDE-100 (A) e BDE-153 (B) sobre a produção e acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERONs) na linhagem de células HepG2, em 24 e 48 horas de exposição	85
FIGURA 21	Exposição da Fosfatidil serina após exposição ao BDE-100 por 24 (A) e 48 horas (B) de exposição	87
FIGURA 22	Exposição da Fosfatidil serina após exposição ao BDE-153 por 24 (A) e 48 horas (B) de exposição	88
FIGURA 23	Efeito dos congêneres de BDE-100 (A) e BDE-153 (B) sobre a condensação e fragmentação nuclear das células HepG2	90
FIGURA 24	Micrografias de microscopia de Fluorescência para condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 após 24 horas de exposição ao BDE-100	91
FIGURA 25	Micrografias de microscopia de Fluorescência para condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 após 48 horas de exposição ao BDE-100	92
FIGURA 26	Micrografias de microscopia de Fluorescência para condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 após 24 horas de exposição ao BDE-153	93
FIGURA 27	Micrografias de microscopia de Fluorescência para condensação e fragmentação nuclear das células HepG2 após 48 horas de exposição ao BDE-153	94
FIGURA 28	Efeito dos congêneres de BDE-100 (A) e BDE-153 (B) sobe a liberação da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) para o meio de cultura das células HepG2	95
FIGURA 29	Efeito do BDE-100 sobre a ativação da Pró-Caspase 3 em Caspase 3 nas células HepG2 incubadas por 24 e	97

48 horas de exposição

FIGURA 30 Efeito do BDE-153 sobre a ativação da Pró-Caspase 3 em Caspase 3 nas células HepG2 incubadas por 24 e 48 horas de exposição 98

FIGURA 31 Efeito do BDE-100 sobre a ativação da Pró-Caspase 9 em Caspase 9 nas células HepG2 incubadas por 24 e 48 horas de exposição 99

FIGURA 32 Efeito do BDE-153 sobre a ativação da Pró-Caspase 9 em Caspase 9 nas células HepG2 incubadas por 24 e 48 horas de exposição 100

FIGURA 33 Efeito do BDE-100 sobre a liberação de citocromo *c* pelas mitocôndrias na linhagem celular HepG2 incubadas por 24 e 48 horas de exposição 101

FIGURA 34 Efeito do BDE-153 sobre a liberação de citocromo *c* pelas mitocôndrias na linhagem celular HepG2 incubadas por 24 e 48 horas de exposição 102

FIGURA 35 Efeito do BDE-100 sobre a translocação da proteína Bax para a membrana das mitocôndrias nas células HepG2 incubadas por 24 e 48 horas de exposição 103

FIGURA 36 Efeito do BDE-153 sobre a translocação da proteína Bax para a membrana das mitocôndrias nas células HepG2 incubadas por 24 e 48 horas de exposição 104

FIGURA 37 Efeito do BDE-100 sobre a liberação da proteína AIF das mitocôndrias nas células HepG2 incubadas por 24 e 48 horas de exposição 105

FIGURA 38 Efeito do BDE-153 sobre a liberação da proteína AIF das mitocôndrias nas células HepG2 incubadas por 24 e 48 horas de exposição 106

FIGURA 39 Monitoramento da localização dos lisossomos no citosol de células HepG2 após exposição ao BDE-100 por 24 e 48 horas de exposição 108

FIGURA 40 Monitoramento da localização dos lisossomos no citosol de células HepG2 após exposição ao BDE-153 por 24 e 48 horas de exposição 109

FIGURA 41 Efeito do BDE-100 sobre a conversão da proteína de LC3I para LC3II nas células HepG2 expostas ao BDE- 111

100 por 24 e 48 horas de exposição

FIGURA 42 Efeito do BDE-153 sobre a conversão da proteína de LC3I para LC3II nas células HepG2 expostas ao BDE-100 por 24 e 48 horas de exposição 112

FIGURA 43 Análise quantitativa do efeito do BDE-100 (A) e BDE-153 (A) sobre a conversão da proteína de LC3I para LC3II nas células HepG2 113

FIGURA 44 Efeito do BDE-100 sobre a conversão da proteína de LC3I para LC3II nas células HepG2 114

FIGURA 45 Efeito do BDE-153 sobre a conversão da proteína de LC3I para LC3II nas células HepG2 115

FIGURA 46 Efeito do BDE-100 sobre a proteína p62 nas células HepG2 116

FIGURA 47 Efeito do BDE-153 sobre a proteína p62 nas células HepG2 117

FIGURA 48 Efeito do BDE-100 sobre a viabilidade celular dos hepatócitos 119

FIGURA 49 Efeito do BDE-153 sobre a viabilidade celular dos hepatócitos 120

FIGURA 50 Efeito dos congêneres de BDE-100 (A) e BDE-153 (B) sobre a capacidade de redução do MTT pelos Hepatócitos 121

FIGURA 51 Efeito dos congêneres BDE-100 (A) e BDE-153 (B) sobre o potencial de membrana mitocondrial em Hepatócitos 123

FIGURA 52 Micrografias do efeito do BDE-100 (A) e BDE-153 (B) sobre o potencial de membrana mitocondrial em Hepatócitos 124

FIGURA 53 Efeito dos congêneres de BDE-100 (A) e BDE-153 (B) sobre a capacidade de redução do MTT pelas células Hela 126

FIGURA 54 Efeito dos congêneres BDE-100 (A) e BDE-153 (B) sobre o potencial de membrana mitocondrial nas células Hela 128

FIGURA 55 Efeito do congênere BDE-100 sobre a organização e co-localização da rede mitocondrial em células Hela transfectadas com mtRFP 130

FIGURA 56 Efeito do congênere BDE-153 sobre a organização e co-localização da rede mitocondrial em células Hela transfectadas com mtRFP 131

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Propriedades físico-químicas, fórmula química e estrutura dos dois PBDEs utilizados	7
TABELA 2	Características genéticas das linhagens de Salmonella typhimurium utilizadas no teste Salmonella/microssoma	36
TABELA 3	Efeito dos congênere de PBDEs (-100 e -153) sobre a frequência de micronúcleos em células HepG2 binucleadas e o Índice de Bloqueio de Proliferação de Citocinese (IBPC) após 72 horas de exposição.	71
TABELA 4	Avaliação dos efeitos mutagênicos do PBDEs (-100 e -153) sobre os Linfócitos pelo ensaio de micronúcleos e citoma com bloqueio da citocinese.	73
TABELA 5	Resultados Obtidos para o ensaio Salmonella/microssoma com o BDE-100 e BDE-153 para a Salmonella typhimurium TA 98 and TA100 realizados na presença e ausência de sistema de metabolismo exógeno (S9)	74

LISTA DE ABREVIATURAS

β-ME	B- mercaptoetanol
$\Delta\psi$	Gradiente eletroquímico
3-MA	3-metiladenina
ADP	Adenosina Difosfato
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
APAF	Fator ativador de proteases apoptóticas
Atgs	Genes relacionados à autofagia
ATP	Adenosina-Trifosfato
BDE-100	2,2’, 4,4’,6- penta-bromo difenil éter
BDE-153	2,2’, 4,4’,5,5’- hexa-bromo difenil éter
BDE-154	2,2’, 4,4’,5,6’- hexa-bromo difenil éter
BDE-209	Deca-bromo difenil éter
BDE-47	2,2’, 4,4’-tetra-bromo difenil éter
BDE-99	2,2’, 4,4’,5-penta-bromo difenil éter
Bid	Subfamílias de proteínas pró-apoptóticas
BN	Binucleadas
BSA	Albumina Soro Bovino
CBMN	Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese
CCCP	carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona
CCCP	Cianeto de Carbonila Clorofenilhidrazona
CEP	Comitê de ética em pesquisa
Cit C	Citocromo C
CM-H_2DCFDA	2’,7’-diclorodihidrofluoresceína diacetato
CYP	Isoenzima Citocromo p450
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
Deca-BDE	Éter decabromodifenílico
DMEM	Meio Essencial Mínimo modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido

DNA	Ácido Desoxiribonucleíco
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERONs	Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADD	Domínio de morte associado a Faz
FAS	proteína transmembrana ligante para TNF
FASL	proteína transmembrana ligante para TNF
FCCP	Carbonyl Cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FIA	Fator indutor de apoptose
flip-flop	Flippases ATP-dependentes
GST	glutationa-S-transferase
H 2 O 2	Peróxido de Hidrogênio
HBCD	hexabromociclododecano
hexa-BDE	Éter Hexabromodifenílico
His-	Histidina
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IBPC	Índice de Bloqueio de Proliferação de Citocinese
LC3	Proteína relacionada a autofagia
LDH	Enzima citosólica Lactato Desidrogenase
MMS	Metanossulfonato de Metila
MN	Micronúcleo
mtDNA	Ácido Desoxiribonucleíco mitocondrial
mtRFP	Células transfectadas com a proteína mitocondrial RFP
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD(P)H	(Ta certo esse?)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NaOH	Hidróxido de Sódio
nona- BDE	Éter Nonabromodifenílico
octaBDE	éter Octabromodifenílico
p62	sequestrossoma – SQSTM1
PBB	Bifenilas Polibromadas

PBDEs	Éter difenilicos polibromados
PBS	Solução tampão de fosfato
PCBs	bifenilas policloradas
pentaBDE	Éter pentabromodifenílico
PI	Iodeto de Propídeo
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
PS	Fosfatidilserina
PTPM	Poro de transição de permeabilidade mitocondrial
PVDF	Fluoreto Polivinidileno
RCBs	Retardantes de Chama Bromados
RIPA	Tampão de lise
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SBF	Soro bovino fetal
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SRB	Sulforodamina B
T3	Triiodotironina
TBBPA	Tetrabromobisfenol-A
TBid	Subfamílias de proteínas pró-apoptóticas
tetra-BDE	Éter tetrabromodifenílico
TM	*Tail Moment*
TMRM	Tetrametilrodamina Metil Ester
TNF	Fator de necrose tumoral
TPM	Transição de Permeabilidade Mitocondrial
V-FITC	Fluorescente da anexina

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO 1

1.1 - Contaminantes Ambientais Emergentes 1

1.2 - Retardantes de Chama 3

1.3 - Éteres Difenílicos Polibromados (PBDEs) 5

1.4 - O fígado como alvo principal de toxicantes 10

1.5 - O cultivo de células HepG2 e suas aplicações em toxicologia 14

1.6 - A utilização de mitocôndrias para avaliação de toxicidade de xenobióticos 16

1.7 - Avaliação de Citotoxicidade 21

1.8 - Avaliação Toxicogenética 30

2 – OBJETIVOS 38

3 – METODOLOGIA 39

3.1 – Obtenção / Manutenção / Preparo dos modelos necessários para os ensaios 39

3.1.1 – Linhagem de células HepG2 41

3.1.2 – Linfócitos Humanos 42

3.1.3 – Salmonella typhimurium 43

3.1.4 – Hepatócitos isolados de Fígado de Ratos 44

3.1.5 – Linhagem de células Hela 45

3.2 - Ensaio Genotóxico 45

3.2.1 - Teste do Cometa 45

3.3 - Ensaio Mutagênico 47

3.3.1- Ensaio de Micronúcleos em cultura de células HepG2 com bloqueio da citocinese 47

3.3.2 - Ensaio de Micronúcleos em cultura de linfócitos humanos com bloqueio da citocinese 49

3.2.3 - Ensaio de mutagênicidade com Salmonella typhimurium 49

3.4 - Ensaios Citotóxicos 51

3.4.1 - Ensaio de citotoxicidade em cultura de células HepG2 51

3.4.2 - Ensaio de citotoxicidade em cultura de células primárias de fígado de rato – Hepatócitos 64

3.4.3 - Ensaio de citotoxicidade em cultura de células Hela 65

3.5 - Análise Estatística 67

4 – RESULTADOS 68

4.1 - Ensaios para avaliação de genotoxicidade 68

4.2 - Ensaios para avaliação de mutagenicidade 70

4.3 - Ensaios para avaliação de citotoxicidade com cultivo de HepG2 75

4.4 - Ensaios para avaliação de citotoxicidade com cultivo de Hepatócitos 118

4.5 - Ensaios para avaliação de citotoxicidade com cultivo de Células Hela transfectadas com a proteína mitocondrial mtRFP 125

5– DISCUSSÃO 132

6 – CONCLUSÃO 147

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 149

8 - ANEXOS 186

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - Contaminantes Emergentes de Preocupação Ambiental

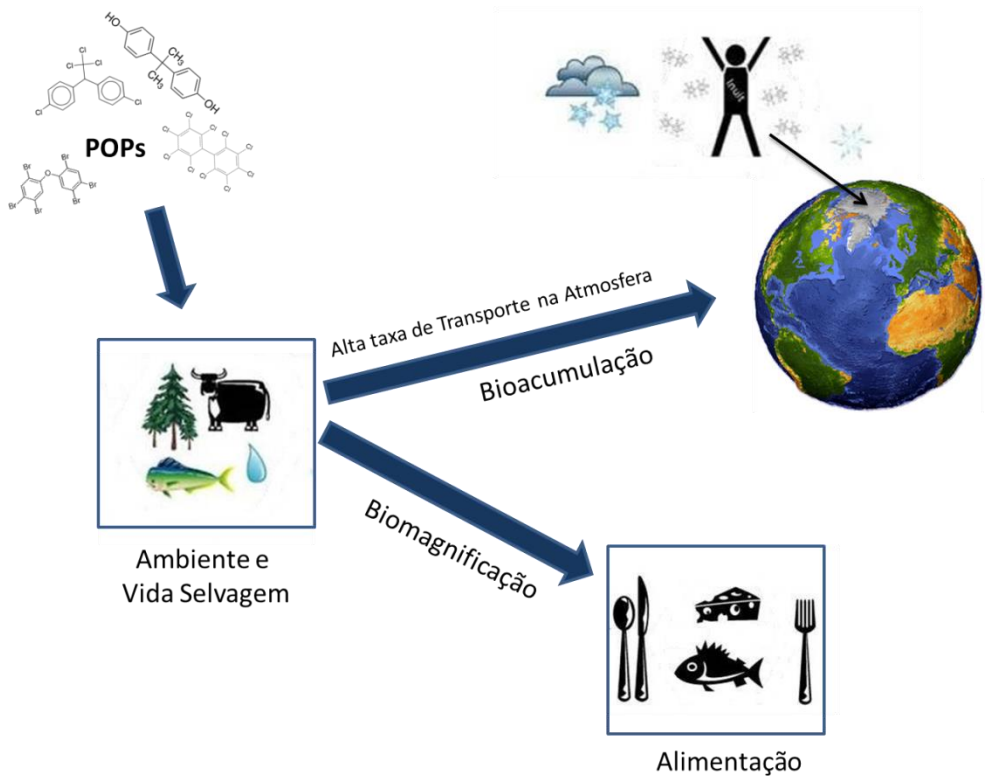
O ambiente consiste em todo o espaço que cerca o homem, incluindo: ar, água, terra, flora, fauna, seres humanos e suas inter-relações, sendo que os efeitos nocivos das atividades antropogênicas sobre a saúde e o ambiente são conhecidos há muito tempo. Contudo a consciência sobre esta questão é recente e remonta a segunda metade do século XX. Nas últimas décadas os compostos químicos passaram a fazer parte de nossas vidas de forma mais corriqueira e com isso os problemas ambientais decorrentes da presença destes compostos no ambiente tornaram-se críticos e frequentes, sendo hoje uma preocupação global. Em um mundo “industrial” a poluição ambiental aumentou consideravelmente e as consequências da ação humana têm atingido dimensões catastróficas e seus efeitos se refletem nas taxas de incidência de doenças e também toxicidade como consequência de bioacumulação e biomagnificação (KUNZ et al., 2002; LOGAR; VODOVNIK, 2007; DANIELS, 2013).

Até alguns anos atrás, a grande preocupação da Toxicologia Ambiental era com os compostos sabidamente tóxicos presentes no ambiente em quantidades elevadas. A preocupação pública a cerca da presença destes compostos no ambiente e a relação com os danos à saúde humana e ao ambiente iniciou em 1962 quando Rachel Carson publicou o livro Silent Spring (“Primavera silensiosa”, em tradução livre). Esta preocupação inicial estava direcionada principalmente ao praguicida Diclorodifeniltricloroetano (DDT) e aos compostos de hidrocarbonetos clorados, por exemplo, bifenilas policloradas (PCBs) (BAHE et al., 2006; ROSNER; MARKOWITZ, 2013).

Cerca de onze milhões de substâncias químicas são conhecidas em todo o mundo. Destas, três mil são produzidas em larga escala e, apenas 40 a 50 substâncias químicas são contempladas pelos parâmetros de potabilidade da água na maioria dos países, incluindo o Brasil (NETO, 2010). Além do mais, aproximadamente 40 mil compostos químicos têm sido identificados como poluentes orgânicos persistentes. Este número torna-se ainda mais

preocupante com o avanço tecnológico e descarte desenfreado dessas substâncias. Estes novos contaminantes devem ser estudados com cautela, pois englobam uma infinidade de substâncias diferentes e provenientes de fontes de emissão difusa com capacidade de persistirem no ambiente e de grande capacidade de transporte conforme representado na Figura 1 (BAHE et al., 2006). O número destes compostos assim chamados contaminantes emergentes aumentam ano a ano e inclui: produtos farmacêuticos, cosméticos, plastificantes, retardantes de chama, nanopartículas, praguicidas, dentre outros (DIAMOND, et al., 2011; RODIL, et al., 2012; PEREIRA et al., 2015).

FIGURA 1 – Poluentes Organicos Persistentes.



Legenda: Os diversos poluentes orgânicos persistentes (POPs) liberados no ambiente podem sofrer bioacumulação, tanto no reino animal quanto vegetal. Além disso, eles podem ser transportados para regiões distantes da sua produção, afetando até mesmo populações distantes através da bioacumulação. E por outro lado pode afetar diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar através da biomagnificação. Fonte: (PEREIRA et al., 2015)

Os “Contaminantes Emergentes” são definidos como material ou compostos químicos de origem sintética ou natural ou microorganismos, previamente conhecidos ou não, caracterizados por apresentar uma ameaça real ou potencial para a saúde humana ou para o ambiente. E ainda, apresentam escassez de dados que comprovem seus efeitos e também ausência de legislação que controle sua utilização (YAN et al., 2010; DORTA; OLIVEIRA, 2014; RICHARDSON; TERNES, 2014). Desta maneira, esses compostos fazem parte de uma longa lista de substâncias que inclui entre outros os retardantes de chama.

1.2 - Retardantes de Chama

Os retardantes de chama são compostos adicionados em diversos produtos como principal medida de segurança na prevenção de incêndios, particularmente nas indústrias de eletroeletrônicos, têxtil, automobilística e construção civil sendo empregados em materiais como madeira, plásticos, papéis, utensílios de cozinha, carpetes, roupas, etc. (DORTA; OLIVEIRA, 2014). Esses bens de consumo se queimam com muita facilidade, e uma vez iniciada a ignição, a combustão completa é rápida, reduzindo as chances de escape e aumentando os danos causados por queimaduras. Estes compostos são adicionados durante ou após o processo de fabricação a fim de tornar os materiais resistentes ao fogo ou à alta temperatura, inibindo ou suprimindo o processo de combustão e reduzindo o risco de lesões em casos de incêndio (BSEF, 2000; PESTANA et al., 2008; YAN, et al., 2010).

Existem hoje mais de 175 substâncias químicas classificadas como retardantes de chama. Essas substâncias existem desde a década de 60, e são classificados de acordo com sua estrutura química em: Fosforados, Inorgânicos, Óxidos Inorgânicos e Orgânicos Halogenados (clorados e bromados) (DORTA; OLIVEIRA, 2014). A demanda por retardantes de chama vem crescendo substancialmente; Em 1990, por exemplo, foi consumida cerca de 145.000 toneladas em todo o mundo (PETTIGREW, 1994). Já em 2000 houve um crescimento superior a 100% chegando a aproximadamente 310.000 toneladas (BSEF, 2000). Em 2009 já havia alcançado uma demanda de 1,7 milhões de toneladas e segundo a Freedonia Group (empresa que realiza

pesquisa de mercado para indústrias) a quantidade estimada de consumo mundial de retardantes de chama teria alcançado os 2,2 milhões de toneladas em 2014 (FREEDONIA GROUP, 2011).

Os cinco maiores Retardantes de Chama Bromados (RCBs) comercializados são o tetrabromobisfenol A, com o maior volume de produção, seguido por três misturas técnicas de éter de difenilicos polibromados (PBDEs), os quais são conhecidos como éter decabromodifenílico (decaBDE), éter octabromodifenílico (octaBDE) e éter pentabromodifenílico (pentaBDE) e ainda o hexabromociclododecano (HBCD) (WHO, 1995; WHO, 1997; BIRNBAUM, STASKAL, DILIBERTO, 2004). Eles são classificados de acordo com seu teor médio de bromo, penta, octa e deca – cinco, oito ou dez atómos de bromos respectivamente (ALAEE et al., 2003). Desde o ano 2000, os RCBs foram responsáveis por 38% da demanda global por bromo e do volume total de RCBs produzido, cerca de um terço é composto pelos PBDEs, um terço consiste de tetrabromobisfenol-A (TBBPA) e seus derivados, e o terço final inclui vários outros compostos bromados, tais como o HBCD (DORTA e OLIVEIRA, 2014).

Os mecanismos de ação dos retardantes de chama se baseiam em princípios físicos (resfriamento ou diluição) ou químicos (formação de radicais, remoção por decomposição do polímero ou proteção devido à carbonização) (BSEF, 2000). A resistência à chama está intimamente ligada ao processo de combustão que é composto por uma fase de pré-aquecimento, pirólise ou decomposição/volatilização, ignição ou combustão e extinção (TROITZCH, 1990). A estabilidade química destas substâncias e a intensa utilização são as principais razões pelas quais os RCBs têm recebido destaques nos debates ambientais no cenário internacional. Além disso, devido a alta lipofilicidade, muitos destes compostos são persistentes e apresentam alto potencial de bioacumulação e biomagnificação (DORTA e OLIVEIRA, 2014). Outra preocupação é com a questão da contaminação ambiental decorrente da liberação dos retardantes de chama, uma vez que estes compostos são usados como aditivos aos bens de consumo, sendo misturados aos polímeros, porém nem sempre se ligam quimicamente com o produto final. Desta maneira, a liberação dos retardantes de chama pode ocorrer facilmente pela deposição inadequada em lixões de produtos, durante o aquecimento de produtos

eletrônicos que os contenham, durante a fabricação, a incorporação em produtos de resina ou polímeros, durante o tempo de uso do produto e ainda enquanto desempenham sua função principal durante um incêndio (DANISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1999; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2005).

1.3 - Éteres Difenílicos Polibromados (PBDEs)

Os PBDEs estão entre os retardantes de chama mais utilizados na prevenção de incêndios, particularmente nas indústrias de eletroeletrônicos, têxtil, automobilística e construção civil (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2004; COSTA et al., 2008). E como consequência de suas emissões durante seu processo de produção, de utilização e/ou despejo, estes compostos se tornaram poluentes ambientais (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2004).

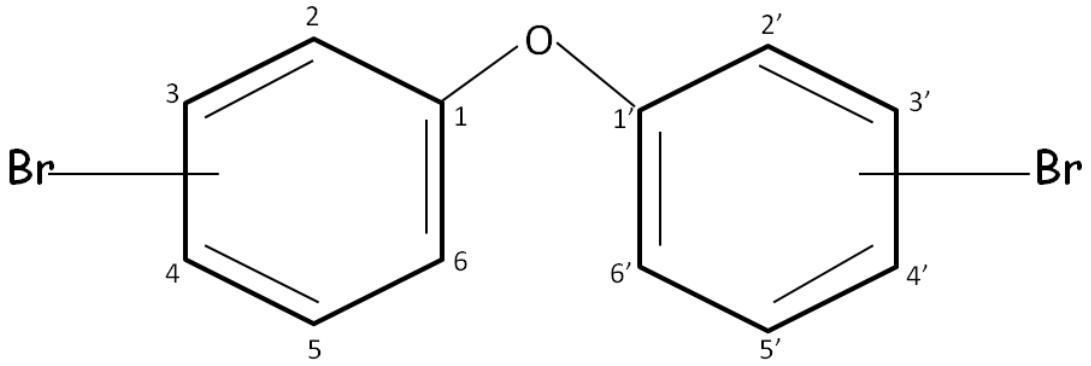
A eficácia dos PBDEs é devido ao seu mecanismo de ação atuar de duas formas distintas no processo de combustão: sobre aquecimento os PBDEs liberam na forma de radicais livres, os átomos de bromo de sua estrutura, os quais são altamente reativos com os demais radicais livres e moléculas presentes no processo de combustão e assim podem formar diferentes substâncias com a capacidade de interferir no processo de combustão. Umas dessas reações favorece a formação de moléculas de gás bromo (Br_2), o qual em virtude de sua maior densidade, substitui o gás oxigênio (O_2) necessário para o processo de ignição (USEPA, 2010). O outro mecanismo é relacionado com a atuação dos radicais de bromo sobre os radicais livres do processo de ignição diminuindo, rapidamente, a energia do sistema (ZHANG; BUEKENS; LI, 2016).

É evidente que a utilização dos PBDEs melhorou a segurança em ambientes com grande número de materiais poliméricos, por outro lado os níveis cada vez mais elevados desses compostos em amostras de leite humano (MEIRONITÉ; NORÉN e BERGMAN, 1999; LI et al., 2008; MA et al., 2012), amostras de sangue (SJÖDIN et al., 2004; HITES, 2004; SHEN et al.,

2010) e em espécies de vida selvagem (SELLSTRÖM et al., 1993; NORSTROM et al., 2002; LETCHER et al., 2010) são preocupantes.

Eles constituem uma classe de compostos formados por dois anéis fenílicos ligados entre si por um átomo de oxigênio, que podem apresentar se com 1 a 10 átomos de bromos na sua fórmula molecular (Figura 2). Desta maneira, podem existir até 209 diferentes congêneres de PBDEs com possíveis mecanismos de toxicidade diferenciados em função da variação em suas estruturas (SIDDIQI, 2003; PESTANA et al., 2008). Tal fato já foi também observado sob outros parâmetros como, por exemplo, diferenças de absorção, metabolismo e disposição entre classes diferentes de PBDEs (STAPLETON et al., 2009). Devido à semelhança estrutural com dibenzo-p-dioxinas e com PCBs, além de sua persistência no meio ambiente e o número crescente de relatos de toxicidade, esta classe de compostos tornou-se de grande interesse para toxicologia (HAKK, 2009).

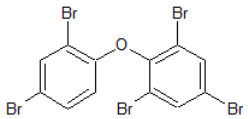
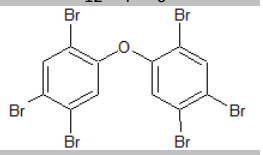
FIGURA 2 - Estrutura química geral dos PBDEs.



FONTE: Próprio autor

As propriedades físico-químicas dos compostos utilizados no projeto estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas, fórmula química e estrutura dos dois PBDEs utilizados

Propriedades	BDE-100	BDE-153
Fórmula Química	$C_{12}H_5Br_5O$	$C_{12}H_4Br_6O$
Estrutura		
Peso Molecular	564.7	643.6
Pressão de Vapor (Pa) a 25 °C	2.86×10^{-5}	5.8×10^{-6}
Ponto de Fusão (°C)	371,15	183
Solubilidade em água(µg/L)	40	1
Constante de Henry (atm m³ mol^{-1}) at 25°C	6.81×10^{-7}	6.61×10^{-7}
*Log K_{oa} at 25°C	7.24	7.9
**Log K_{oar} at 25°C	11.13	11.9
Referências	(ATSDR, 2004; USEPA, 2010)	(ATSDR, 2004; USEPA, 2008 USEPA, 2010;)

* Coeficiente de partição - Log óleo/água.

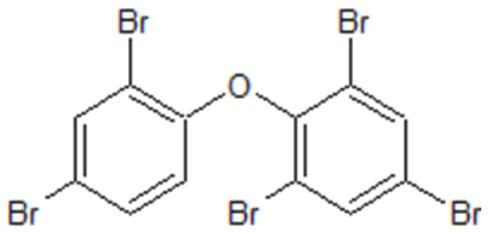
** Coeficiente de partição Log óleo/ar.

Apesar das evidências de toxicidade dos PBDEs em diferentes sistemas biológicos, incluindo a espécie humana, seus mecanismos tóxicos ainda não foram totalmente elucidados, devido sua grande variedade estrutural e o pequeno número de trabalhos publicados (LI, et al., 2008; HU, et al., 2007, 2009; YAN, et al.,2011). Recentemente, pesquisas científicas têm direcionado seu foco aos efeitos ocasionados pela exposição aos PBDEs devido sua incidência no ambiente e nos organismos (JIN, et al., 2010). Dentre todos os PBDEs, os menos bromados, nomeadamente os tetra, penta e os hexa-BDEs (com quatro, cinco e seis átomos de bromo em suas moléculas, respectivamente), têm sido objeto de maior preocupação devido ao aumento exponencial da sua concentração em amostras biológicas, principalmente em leite materno (STRANDMAN et al., 2000).

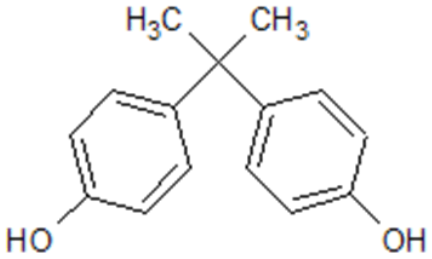
Neste contexto, os que são encontrados nos tecidos humanos com maior prevalência são: BDE-47 (tetra- BDE), BDE-99, BDE-100 (penta-BDE), BDE-153, BDE-154 (hexa-BDEs) e em alguns casos o congênere BDE-209 (deca-BDE). No entanto, em uma revisão sobre os aspectos toxicológicos dos PBDEs, Talsness (2008) reportou que os deca-BDEs podem gerar outros congêneres (tetra a nona – BDEs) por fotólise, metabolismo biótico e biotranformação (TALSNESS, 2008) e que dentre estes compostos, os congêneres de baixo peso molecular (tri a hexa-BDE) são considerados os mais importantes do ponto de vista toxicológico, pois são totalmente absorvidos, lentamente excretados e apresentam alto potencial de bioacumulação (RICHARDSON & TERNES, 2005). Estes compostos já são considerados Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), visto serem tóxicos, persistentes no ambiente, bioacumuláveis e transportados para longas distâncias (PALM et al., 2002), sendo a contaminação dos seres humanos por estes compostos passíveis de ocorrer por diversas formas: inalação de ar contaminado por PBDEs, absorção através da pele ou ainda através da ingestão de alimentos contendo estes compostos (LINDSTRÖM et al., 1999).

A toxicidade dos PBDEs foi primeiramente relacionada com alterações no sistema endócrino, mais precisamente sobre os receptores de hormônios tireoidianos, estrogênio, progesterona e androgênio, além de indução do crescimento anormal nos órgãos reprodutores femininos e mamas, bem como crescimento anormal de mamas em homens (MCDONALD, 2002; MADIA, et. al., 2004; COSTA; GIORDANO, 2007; COSTA, et al., 2008; TALNESS, 2008). Observando a estrutura dos PBDEs é possível encontrar uma similaridade entre suas moléculas e hormônios endógenos que apresentam grande importância na regulação do nosso metabolismo, da mesma forma como ocorrem com outros contaminantes, tais como o Bisfenol A, por exemplo, representado na Figura 3.

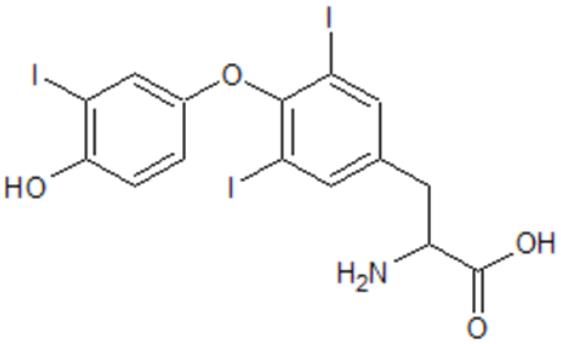
FIGURA 3 – Comparação entre as estruturas do BDE-100 e hormônios endógenos.



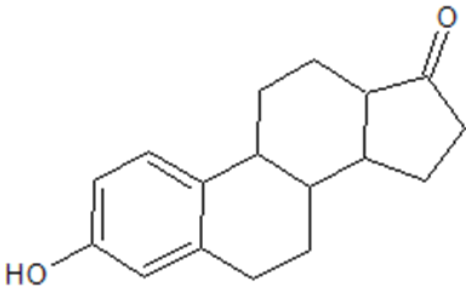
BDE-100



Bisfenol-A



Triiodotironina
(T3)



Estrona

Legenda : Similaridade estrutural entre o BDE-100 (representante dos retardantes de chama bromados) e do Bisfenol A (representante de plastificante) com hormônios endógenos tais como Triiodotironina (T3) e estrona

FONTE: (Pereira et al., 2015).

Embora existam pesquisas que demonstrem os possíveis mecanismos de toxicidade do BDE-99 (penta-BDE) e PBDE-47 (tetra-BDE) não há relatos sobre a toxicidade do PBDE-100, exceto como desregulador endócrino (ZHANG et al., 2011), e capacidade capaz de induzir danos mitocondriais (Pereira et a., 2013). Já é descrito na literatura que BDE-99 pode provocar um aumento na expressão de p53 em células astrogliais (MADIA et al., 2004), induz a translocação de PKC em neurônios granulares cerebelares (KODAVANTI et al., 2005) e diminui a absorção de cálcio em células de astrocitoma (COBURN; CURRAS-COLLAZO e KODAVANTI, 2008) além do mais, há evidências que o BDE-47 interfere na homeostase cálcica em mitocôndria de linhagens celulares PC12 bem como em mitocôndrias isoladas

de fígado de ratos (DINGEMANS et al., 2010; PAZIN; PEREIRA; DORTA, 2014; LIU et al., 2015), na despolarização da membrana mitocondrial em células Jurkat (YAN; HUANG; ZHANG, 2011) e também diminui a viabilidade de células hematopoiéticas (SHAO et al., 2007). Recentemente observou-se também que o PBDE-154 (hexa-BDE) leva ao desequilíbrio do estado redox em zebra mussel (Dreissena polymorpha) (PAROLINI; PEDRIALI; BINELLI, 2012) e também em HepG2 (SOUZA et al., 2016), entretanto não há na literatura relatos sobre o PBDE-153, também um hexa-BDE. Além do mais, já tem sido descrito na literatura, que os PBDEs apresentam evidências mutagênicas e carcinogênicas em modelos experimentais diferenciados (ZHANG., et al., 2008; QIU, et al., 2009; JIN, et al., 2010; AN, et al.,2011; PAROLINE; BINELLI, 2012). E foi recentemente classificado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) como pertencentes ao grupo 2A, ou seja, prováveis carcinógenos humanos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, v. 107; DORTA; OLIVEIRA, 2014).

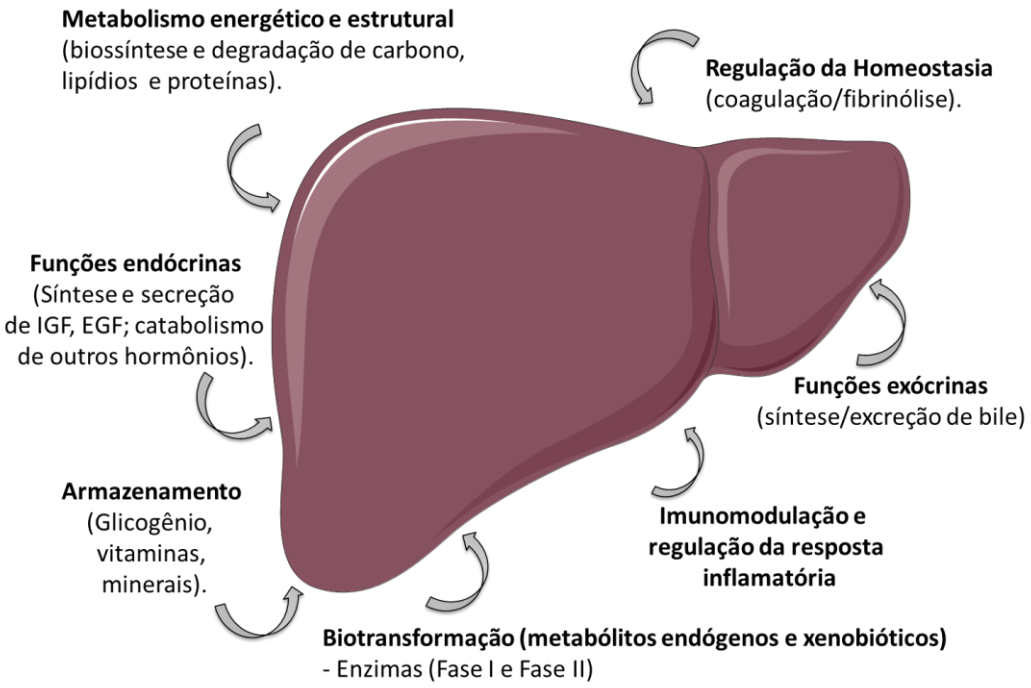
1.4 - O fígado como alvo principal de toxicantes

O fígado constitui cerca de 2-5% do peso do corpo no homem adulto (1400-1600 g) e 5% no neonato (GATES et al., 1961) e é considerado um dos maiores órgãos do corpo humano, com aproximadamente 300 bilhões de células. Sendo que destas, 80% do total são hepatócitos que constituem o parênquima hepático. As células endoteliais e células de Kupffer são células não parenquimatosas, e as demais constituem pequenas populações do volume total tecidual (BLOUIN, 1977), que apresentam grande significância no valor total e suportam e regulam o crescimento e também função do tecido hepático (LeCLUYSE et al., 2012). A estrutura do fígado o auxilia a exercer suas inúmeras funções primordiais para o funcionamento do organismo que estão representadas na Figura 4. Entre as funções hepáticas importantes estão a absorção de aminoácidos, hidratos de carbono, lipídeos, vitaminas e seu subsequente armazenamento, conversão metabólica e liberação para o sangue da bile (KODAVANTI, KODAVANTI, MEHENDALE, 1991). A biotransformação é outra importante função hepática. Este processo converte as substâncias hidrofóbicas em produtos solúveis em água que podem ser excretados na bile

ou urina. Embora o sistema de biotransformação também esteja presente em outros órgãos (por exemplo, rim, intestino delgado e órgãos endócrinos), a biotransformação realizada pelo fígado é a mais importante quantitativamente (MIYAI, 1991).

Estas funções desempenhadas pelo fígado requerem muita energia, tornando o fígado um órgão dependente de oxigênio e do metabolismo aeróbico (MALHI; GORES; LEMASTERS, 2006). Além do mais, o órgão possui fornecimento duplo de sangue por meio da veia porta e da artéria hepática e uma organização adequada do parênquima hepático e sistema microvascular para permitir a troca eficiente de sangue aos hepatócitos (MIYAI, 1979; MIYAI, 1991). Além disso, o fígado também desempenha papel importante na defesa do corpo contra macromoléculas e materiais particulados tais como as bactérias. As células de revestimento dos sinusóides hepáticos são quantitativamente o sítio mais eficaz de fagocitose de materiais particulados. Adicionalmente, a grande capacidade vascular do fígado serve como um reservatório na regulação do volume de sangue em fluxo através do corpo (JONES, SCHMUCKER, 1977; JONES, SPRING-MILLS, 1984).

FIGURA 4 – Representação das principais funções do fígado.

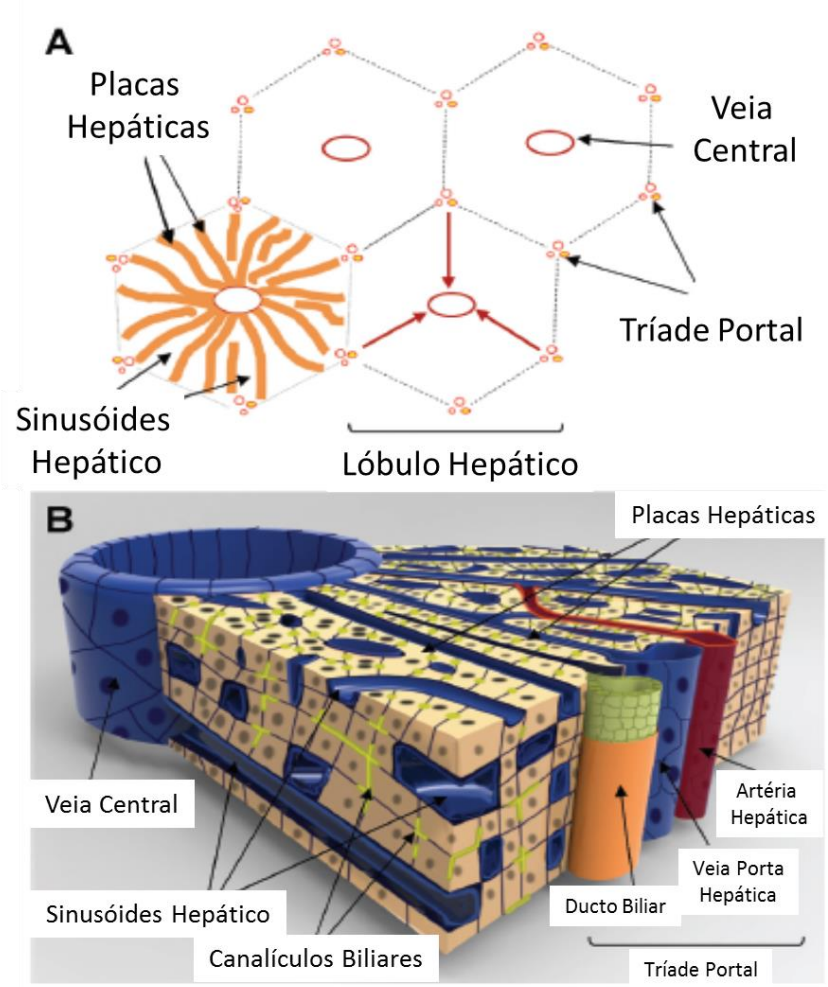


Legenda: O fígado é a maior glândula do corpo e de consistência dura, cor vermelho-escura. Possui funções múltiplas, indispensáveis à vida do organismo tais como; produção de bile, colesterol e proteínas; depósito de glicogênio, gorduras (fonte de energia); intervenção no metabolismo dos lipídios e metabolização de substancias.

FONTE: Próprio autor

A unidade clássica do fígado é denominada de lóbulo hepático, representado na Figura 5. Quando visto em secção transversal, o lóbulo tem a forma de um polígono, geralmente um hexágono. Nos cantos do polígono é possível observar a tríade portal, composta por artéria hepática, ducto biliar e veia porta. Enquanto que ao centro do lóbulo encontra-se a veia central. Os hepatócitos irradiam-se a partir da veia central para a periferia e define a base funcional do tecido hepático, também conhecida como ácino e são separados pelos sinusóides hepáticos, os “capilares hepáticos” que são revestidos por endotélio sinusoidal (BIOULAC-SÁBIO et al., 2007; KHAN et al., 2007).

FIGURA 5 – Representação da microestrutura do fígado.



Legenda: A) Diagrama do lóbulo hepático e da sua subestrutura básica – ácinos, mostrando a direção do fluxo de sangue da tríade portal em direção a veia central (setas vermelhas). B) Diagrama tridimensional da arquitetura hepática entre a tríade portal e a veia central, com os canalículos biliares (verde claro) e o fluxo de sangue por meio dos sinusóides hepáticos.
FONTE: (Adaptado de LeCLUYSE et al., 2012).

Devido às funções importantes que o fígado opera no organismo, principalmente a de biotransformação e metabolismo de xenobióticos, o fígado se torna um alvo principal dos mecanismos de toxicidade de xenobióticos o que consequentemente ocasiona perturbação da sua homeostase. As enzimas hepáticas que metabolizam xenobióticos para a detoxificação podem por outro lado ativar a toxicidade de outros. Em geral, vários mecanismos podem iniciar dano hepático ou agravar processos de lesão já em curso (JAESCHKE et al., 2002). A hepatotoxicidade continua a ser uma das principais razões para a retirada de fármacos do mercado ou para a não liberação de novos produtos,

uma vez que há muitos fatores diretos e indiretos que podem gerar lesão celular (LeCLUYSE et al., 2012).

Modelos *in vitro* de hepatócitos representam sistemas muito úteis na investigação básica, apresentando várias áreas de aplicação e ao longo dos anos trouxeram uma contribuição substancial para a compreensão da bioquímica, fisiologia e biologia celular do fígado saudável e/ou acometido por alguma patologia. Os hepatócitos executam a maior parte das funções fisiológicas comumente associadas ao fígado, incluindo biotransformação e eliminação de xenobióticos (RODÉS et al., 2007). Geralmente apresentam mitocôndrias em abundância e complexo de golgi localizado principalmente adjacente aos canalículos biliares (LeCLUYSE et al., 2012). No entanto eles são fenotipicamente instáveis e apresentam uma vida útil limitada (GUGUEN-GUILLOUZO; GUILLOUZO, 2010). A técnica de isolamento de hepatócitos por perfusão com colagenase, por exemplo, foi publicada em 1969 por Berry e seus colaboradores (BERRY; FRIEND, 1969). Desde então, as culturas primárias de hepatócitos são usadas durante décadas para fins de investigação farmacológica e toxicológica (GEBHARDT et al., 2003; HEWITT et al, 2007a.; HEWITT et al, 2007b.; GUILLOUZO E GUGUEN-GUILLOUZO, 2008; GOMEZ-LECHON et al., 2010).

1.5 - O cultivo de células HepG2 e suas aplicações em toxicologia

Sistemas *in vitro* mais sofisticados auxiliam na compreensão sobre o transporte, metabolismo e eliminação de xenobióticos pelo fígado e na interação e indução de hepatotoxicidade (GEBHARDT et al, 2003;. HOUCK et al,. 2009; JUDSON et al., 2010). Segundo JAESCHKE e colaboradores (2002), o fígado é o principal local de absorção e metabolismo de substâncias e, portanto, um importante alvo para os efeitos nocivos dos xenobióticos. Sendo assim, a utilização de uma linhagem celular derivada de um hapatoblastoma humano (HepG2), que apresenta morfologia semelhante ao parênquima hepático e que mantém as características de células normais do fígado humano (KNASMULLER et al., 1998) torna uma importante ferramenta

experimental para elucidar o mecanismo de ação dos PBDEs uma vez que o fígado é apontado como possível alvo de ação tóxica dos mesmos.

O cultivo da linhagem HepG2 é um dos modelos mais utilizados e bem caracterizado. Quando cultivadas crescem em monocamada e pequenos agregados, aderidas à superfície e são não-tumorigênicas. Outras características importantes é a capacidade de secretar proteínas típicas do plasma hepático, tais como albumina, transferrina, fibrinogênio, α2-macroglobulina e plasminogênio, assim como a capacidade de realizar a biotransformação de muitos, mas não todos xenobióticos (LeCLUYSE et al., 2012). Como revisado por Knasmuller e colaboradores (1998) as células HepG2 expressam uma vasta gama de enzimas de fase I, tais como o citocromo P450 (CYP) 1A1, 1A2, 2B, 2C, 3A e 2E1, nitro-redutases, N-desmetilases, catalases, peroxidases, NAD(P)H: citocromo c redutase, citocromo P450 redutase, e NAD(P)H, quinona oxidorredutase e enzimas de fase II como a epóxido hidrolase, sulfotransferase, glutationa-S-transferase (GST), uridina glucuronosil-transferase e N-acetil-transferase (KNASMULLER et al., 1998; ATCC).

Além do mais, são apontadas como células capazes de bioativar compostos mutagênicos e cancerígenos e por apresentarem a expressão da proteína 53 (p53) permitem ativar respostas ao dano na molécula de Ácido Desoxiribonucleíco (DNA) induzindo a parada no ciclo celular e início do processo de apoptótico (HSU et al., 1993; KNASMULLER et al., 1998; WILKENING et al., 2003).

Comparações entre os hepatócitos primários e o cultivo da linhagem de HepG2 mostram diferenças substanciais na expressão gênica. Por exemplo, HepG2 mostram maior expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular; DNA; Ácido Ribonucleico (RNA); metabolismo de nucleotídeos e transcrição e tradução de sinal. Em contraste, os níveis de expressão gênica de enzimas de biotransformação de fase 1 e 2 (CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2E1 E CYP3A4) são mais baixos em HepG2 (HARRIS et al., 2004; OLSAVSKY et al., 2007; LIGUORI et al., 2008).

Com relação à hepatotoxicidade dos PBDEs, ensaios *"in vivo"* demonstram que o acúmulo de PBDE no fígado está associado com o desenvolvimento de hepatotoxicidade e câncer (HU, et al., 2007; ALBINA, et

al., 2010), sendo também descrito que alguns congêneres podem ocasionar apoptose em células derivadas de hepatoblastoma humano (HU, et al., 2007). Recentemente, estudos têm demonstrado potenciais preocupações com relação à toxicidade hepática (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006; LORBER, 2008), porém, pouco se sabe sobre os reais mecanismos dessa toxicidade (ZHOU, et al., 2001). Desta forma é de grande valia a investigação detalhada desses congêneres individualmente visto que em nosso país ainda é permitido o uso indiscriminado de PBDEs.

1.6 - A utilização de mitocôndrias para avaliação de toxicidade de xenobióticos

A mitocôndria é uma organela intracelular responsável por transformar a energia dos alimentos em energia útil e transportável às células, através da molécula de adenosina-trifosfato (ATP). Sendo assim, as mitocôndrias, fonte primária de ATP, são fundamentais para a vida de células eucarióticas, com excessão do microorganismo anaeróbico *Monocercomonoides* sp. que recentemente foi descrito por ser o primeiro organismo eucarionte desprovido de mitocôndrias (KARNKOWSKA et al., 2016). Desde a segunda metade do século XX, foram exclusivamente consideradas como “a casa de força das células” e, com o passar dos anos, tornou-se claro que essas organelas também desempenham papel chave nas vias de sinalização e morte celular. Nos tempos contemporâneos, tornou-se ferramenta importante para a toxicologia, com a finalidade de entender e prever efeitos adversos de inúmeras substâncias, sendo que os danos mitocondriais são, frequentemente, considerados como causa ou efeito nas injúrias teciduais (CHANCE; WILLIANS, 1956; PEREIRA et al., 2013).

A diversidade de protocolos existentes, utilizando mitocôndrias como ferramenta experimental, revela a importância dessa organela na sobrevivência de células aeróbicas (LASH e JONES, 1993; DAGDA, ZHU e CHU, 2009; STETLER et al., 2012), tornando crucial o estudo de efeitos tóxicos de xenobióticos, que podem, direta ou indiretamente, afetar seu funcionamento. De fato, estudos em mitocôndrias isoladas podem fornecer informações sobre

o mecanismo de toxicidade de possíveis compostos tóxicos, sendo que, em muitos casos de toxicidade aguda, esses agentes atuam sobre as mitocôndrias, afetando sua integridade e prejudicando a síntese de ATP (BRAGADIN, 2006; DYKENS et al., 2008; Li et al., 2012; STACHOWICZ et al., 2012). Dessa forma, a integração das mitocôndrias com os demais constituintes celulares se estende muito além da formação de ATP, colocando essa organela no centro de muitos aspectos da biologia celular e reforçando ainda mais a sua importância em diversos campos da toxicologia.

As mitocôndrias apresentam parâmetros variáveis morfologicamente (tamanho, formato e quantidade), no entanto, é possível definir uma morfologia básica comum, com medidas variando de 0,5 a 1,0 µm de largura e até 10 µm de comprimento (LOGAN, 2006; STOWE; CAMARA, 2009). Mudanças morfológicas nessas organelas são também resultantes do processo celular de fissão e fusão mitocondrial (GALLOWAY; LEE; YOON, 2012). De maneira geral, sua estrutura consiste em duas membranas altamente especializadas (externa e interna), separada por um espaço intermembranas, que reveste o espaço interno denominado matriz mitocondrial (BENARD; ROSSIGNOL, 2008; STOWE; CAMARA, 2009; LIMA; DUARTE; SÁ, 2010). A mitocôndria consiste, principalmente, em proteínas e lipídios sendo que, na matriz mitocondrial, encontra-se também o mtDNA, ribossomos mitocondriais, RNAs, além de outras enzimas (SCHEFFLER, 1999; LENEFSKY et al., 2001).

A membrana externa é lisa e com tamanho de área superficial fixa, ao passo que a interna apresenta inúmeras invaginações, que podem assumir a forma de cristas ou túbulos que contribuem para aumentar sua superfície (SCHEFFLER, 1999; DING et al., 2012). A quantidade e morfologia das cristas são reflexos da responsabilidade da organela na demanda energética (SCHEFFLER, 1999; MANNELLA, 2006; ZICK; RABL; REICHERT, 2009) e, embora as cristas sejam predominantes, há formações tubulares nas mitocôndrias de células que sintetizam esteroides, por exemplo, delimitando, assim, uma matriz amorfa, rica em proteínas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

A membrana mitocondrial externa apresenta grande quantidade de proteína transportadora, chamada porina, a qual forma canais e torna a membrana permeável às moléculas com tamanho menores que 5 kilodaltons (STOWE; CAMARA, 2009). Além das porinas, outras proteínas presentes na

membrana externa desempenham importantes funções na mitocôndria, como a síntese de lipídeos ou conversão de substratos lipídicos para o metabolismo (ALBERTS et al., 1997; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; LIMA; DUARTE; SÁ, 2010;).

Em contrapartida, na membrana interna, devido à grande proporção de um duplo fosfolipídio chamado cardiolipina, a mesma se apresenta impermeável a íons e à maioria das pequenas moléculas carregadas, além de conter proteínas com três tipos de funções: proteínas da cadeia respiratória, que transferem elétrons; proteínas do complexo enzimático denominado ATP sintase, responsável por produzir ATP na matriz; e proteínas transportadoras específicas que regulam a passagem de metabólitos por essa membrana (ALBERTS et al., 1997; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; LIMA; DUARTE; SÁ, 2010). Muitos fármacos (as antraquinonas, por exemplo) apresentam grande afinidade pelas cardiolipinas presentes na porção interna da membrana (WALLACE; STARKOV, 2000), sendo assim, esses compostos se acumulam no interior da membrana mitocondrial e, devido a essa interação, levam ao mau funcionamento da organela.

Na membrana mitocondrial interna está localizado também o translocador de nucleotídeo adenina, um dos formadores do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM). Normalmente este poro encontra-se fechado. Contudo alguns compostos endógenos e alguns xenobióticos apresentam capacidade de induzir a sua abertura (Lemasters et al., 1998).

No espaço Inter-membranas, compreendido entre as duas membranas, há diferentes enzimas que utilizam o ATP gerado na matriz, para fosforilar nucleotídeos ou sinalizar o desencadeamento de morte celular por apoptose (ALBERTS et al., 1997; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; LIMA; DUARTE; SÁ, 2010). Enquanto isso, na matriz, observa-se centenas de enzimas dos processos metabólicos da organela como: as enzimas do ciclo do ácido cítrico, da oxidação dos ácidos graxos e da síntese de ATP (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; NAVARRO; BOVERIS, 2007).

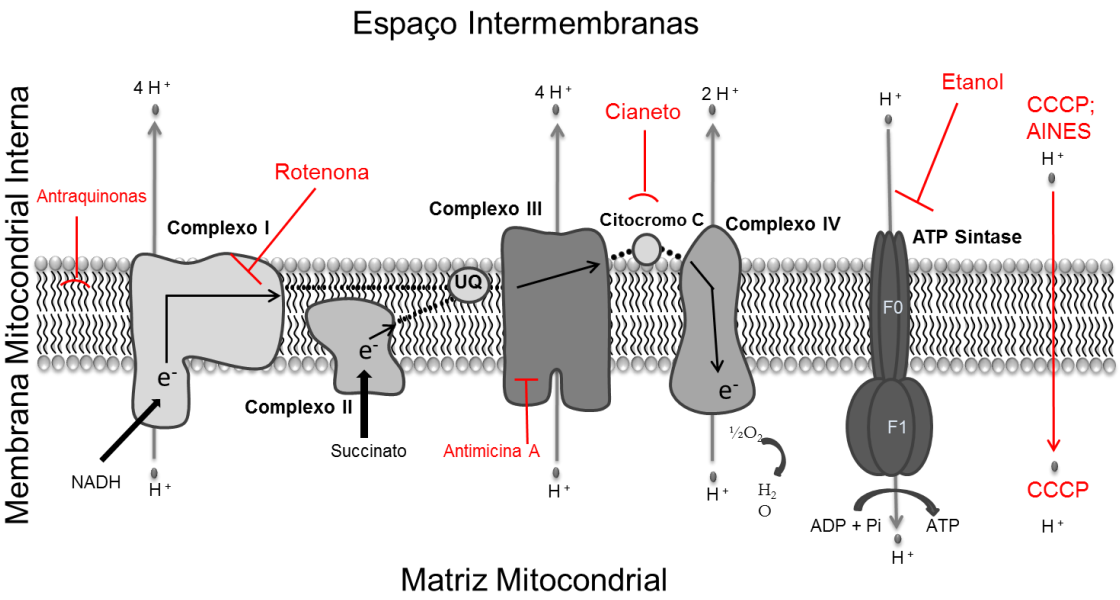
O metabolismo aeróbio é um mecanismo altamente eficiente para o organismo converter a energia proveniente dos nutrientes em trifosfato de adenosina (ATP). A produção de ATP na mitocôndria é o resultado da fosforilação oxidativa, onde o ADP é fosforilado em ATP como resultado do

transporte de elétrons ao longo da membrana interna da mitocôndria associado ao transporte de prótons pela membrana interna (LUFT, 1994; NELSON; COX; LEHNINGER, 2000; PEREIRA et al., 2012).

A cadeia transportadora de elétrons consiste em quatro complexos proteicos que por meio de reações sucessivas de transferência de oxido-redução, conduzem elétrons ao longo da membrana, de um complexo para outro até que os elétrons atinjam o seu aceptor final o oxigênio molecular (O_2), onde os elétrons se combinam com o O_2 reduzindo-o a duas moléculas de água (H_20). Os complexos I, III e IV funcionam como bombas de prótons, que se acumulam no espaço intermembranas criando uma diferença de potencial eletroquímico ou gradiente eletroquímico ($\Delta\psi$). O fluxo inverso de prótons para a matriz mitocondrial, pelo complexo enzimático ATP-sintase, é utilizado como força motriz para produção de ATP, ligando adenosina difosfato (ADP) e fosfato para catalisar ATP (PEREIRA et al., 2012). O ATP é posteriormente transportado para fora da mitocôndria com o concomitante transporte de ADP para dentro da mitocôndria, por meio de um canal antiporte (GALLUZZI et al., 2012).

As células humanas apoiam-se na produção de ATP pelas mitocôndrias para a execução de seus processos de crescimento, diferenciação e resposta a estímulos, incluindo interações com substâncias químicas. O funcionamento das mitocôndrias é complexo e altamente regulado, e a capacidade de interação de compostos químicos em diversos pontos deste sistema implica em disfunção mitocondrial e consequentemente lesão celular. Desta forma, a organela é alvo de vários agentes tóxicos por danos diretos ou indiretos (Figura 6).

FIGURA 6 – Influência de substâncias químicas na Fosforilação Oxidativa.



Legenda: Transferência de elétrons entre os complexos I, II, III e IV para o aceptor final (O_2). Concomitante há o bombeamento de prótons pelos complexos I, III e IV gerando um potencial eletroquímico entre o espaço intermembrana e matriz mitocondrial. Os prótons bombeados retornam à matriz mitocondrial com o auxilio da ATP sintase e a força motriz fosforila o ADP em ATP.

FONTE: Pereira et al., 2012.

Há muitas substâncias químicas capazes de desenvolver efeitos adversos interferindo na fosforilação oxidativa. Essas interações podem ocorrer pela simples presença de fármacos na membrana mitocondrial, como por exemplo, antraquinonas que possuem grande afinidade pelas cardiolipinas presentes na porção interna da membrana mitocondrial. Essa interação provoca alterações na fluidez da membrana, podendo acarretar prejuízos nos processos energéticos da organela, visto que os mesmos são sensíveis à organização estrutural da mitocôndria (HUBER et al., 1991; WALLACE; STARKOV, 2000). Além disso, existem exemplos de substâncias químicas que interagem como inibidores de proteínas específicas da cadeia transportadora de elétrons, como a Rotenona, Antimicina A e cianeto, que interagem com os complexos I, III e com o citocromo C oxigenase, respectivamente, assim como o consumo crônico de etanol pode ocasionar uma inibição na enzima ATP-sintase (TRAYER; RUBIN, 1979). A interferência na fosforilação pode se dar também por meio de substâncias que causam colapso no gradiente eletroquímico entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas, como

por exemplo, o carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) e também anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) como nimesulida e meloxicam (WALLACE; STARKOV, 2000; NADANACIVA; WILL, 2011).

Além disso, quando o fluxo de elétrons é inibido, bloqueando assim o processo de fosforilação oxidativa, uma pequena fração de O_2 disponível sofre redução incompleta, gerando assim radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), que podem se acumular no organismo e levar a uma situação denominada de estresse oxidativo que pode resultar em lipoperoxidação de membranas e biomoléculas (KOWALTOWSKI et al., 2009).

As mitocôndrias são alvos proeminentes para a hepatotoxicidade de muitos xenobióticos (JAESCHKE et al., 2002). Há tempos, a disfunção mitocondrial é reconhecida como o segundo mais importante mecanismo de lesão hepática induzida por xenobióticos (FROMENT; PESSAYRE, 1995; FROMENT et al., 1997), o primeiro mecanismo seria a formação de metabólitos reativos (PESSAYRE, 1995).

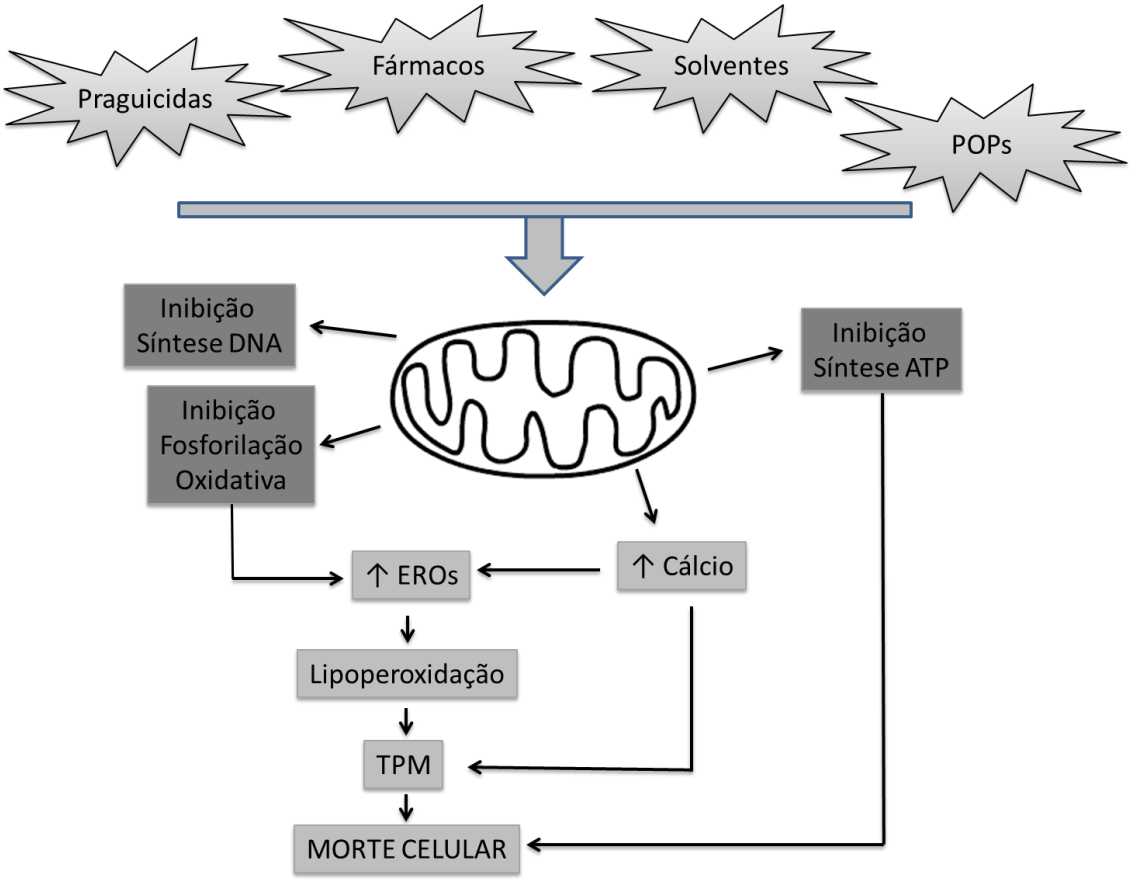
1.7 - Avaliação de Citotoxicidade

A expressão de efeitos adversos seja na estrutura ou função de um ou mais componente celular é denominada toxicidade. Os efeitos adversos podem ser exercidos pela maioria dos produtos químicos, incluindo os contaminantes emergentes (EKWALL, 1983). Os mecanismos pelos quais os compostos químicos induzem citotoxicidade são variados, dentre eles pode-se citar: interferência na integridade das membranas, interferência no metabolismo, degradação ou liberação de componentes celulares e na divisão celular (SEIBERT, 1996) entre outros. Neste contexto, a mitocôndria, como já dito anteriormente apresenta papel crucial na homeostasia celular e rege o processo de morte celular.

Vários compostos químicos são descritos por ocasionarem citotoxicidade por consequência de disfunção mitocondrial. Agentes tóxicos com ação sob as mitocôndrias incluem, não apenas os que perturbam diretamente a cadeia transportadora de elétrons, como por exemplo, desacopladores, mas também compostos que interferem com o transporte e/ou

oxidação de substratos que fornecem elétrons à cadeia respiratória mitocondrial (Figura 7) (PEREIRA et al., 2012).

Figura 7 - Representação dos mecanismos de interações de compostos químicos com implicações toxicológicas.



Legenda: Incluindo ação direta: Inibição da Fosforilação oxidativa; Inibição de alvos moleculares da biogênese mitocondrial através da inibição da síntese de mtDNA e ATP. Em adição, mecanismos indiretos representados pelo aumento da (Ca^{+2}) e de Espécies reativas de oxigênio (EROS) que culmina em Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM), resultando em morte celular (citotoxicidade).

FONTE: Pereira et al., 2012.

A elucidação dos efeitos tóxicos que um contaminante emergente pode ocasionar sobre a saúde dos indivíduos tem sido amplamente investigada através de análises que avaliam as alterações ocorridas sobre as funções básicas de diferentes linhagens celulares (MADIA et al., 2004). A proliferação

celular, processo fundamental na manutenção da homeostasia dos tecidos vivos, é uma das primeiras funções sensível 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 (OLIVEIRA et al., 2013).

Assim, cultura de tecidos e de células em um ambiente *in vitro* para a manutenção, manipulação, e avaliação de sua homeostasia sob condições controladas são excelentes ferramentas para estudar os efeitos da resposta toxicológica à exposição de xenobióticos. Um ambiente *in vitro* que imita as propriedades inerentes e relação natural de tecidos e células como as que existem *in vivo* geralmente proporcionam uma interpretação mais precisa de eventos primários e secundários, dependendo na complexidade celular e molecular do sistema (LeCLUYSE et al., 2012). Desta forma, a realização de testes *in vitro* para detectar hepatotoxicantes, são ferramentas fáceis, baratas e efetivas para reduzir o número de moléculas químicas que avançam para as pesquisas em animais e etapas de estudo clínicos (VAN DEN HOF et al., 2014).

As alterações sobre a homeostasia celular variam desde um evento inicial, que pode ser reversível ou não até o aumento do número de eventos característicos de morte celular até mesmo o desenvolvimento de câncer. Tais eventos são distinguíveis, por alterações morfológicas e bioquímicas que caracterizam os principais tipos de morte celular e são definidas como apoptose e necrose (GRIVICICH, et al., 2007). Sendo que a morte celular pode ser desencadeada por diferentes estímulos, e muitas vezes estão relacionadas com o mecanismo de toxicidade de xenobióticos. Neste contexto, alguns processos mitocondriais, com ênfase na transição de permeabilidade mitocondrial, têm sido frequentemente associados à morte celular tanto por necrose quanto por apoptose (KROEMER, DALLAPORTA, RESCHE-RIGON, 1998; SKULACHEV, 2000).

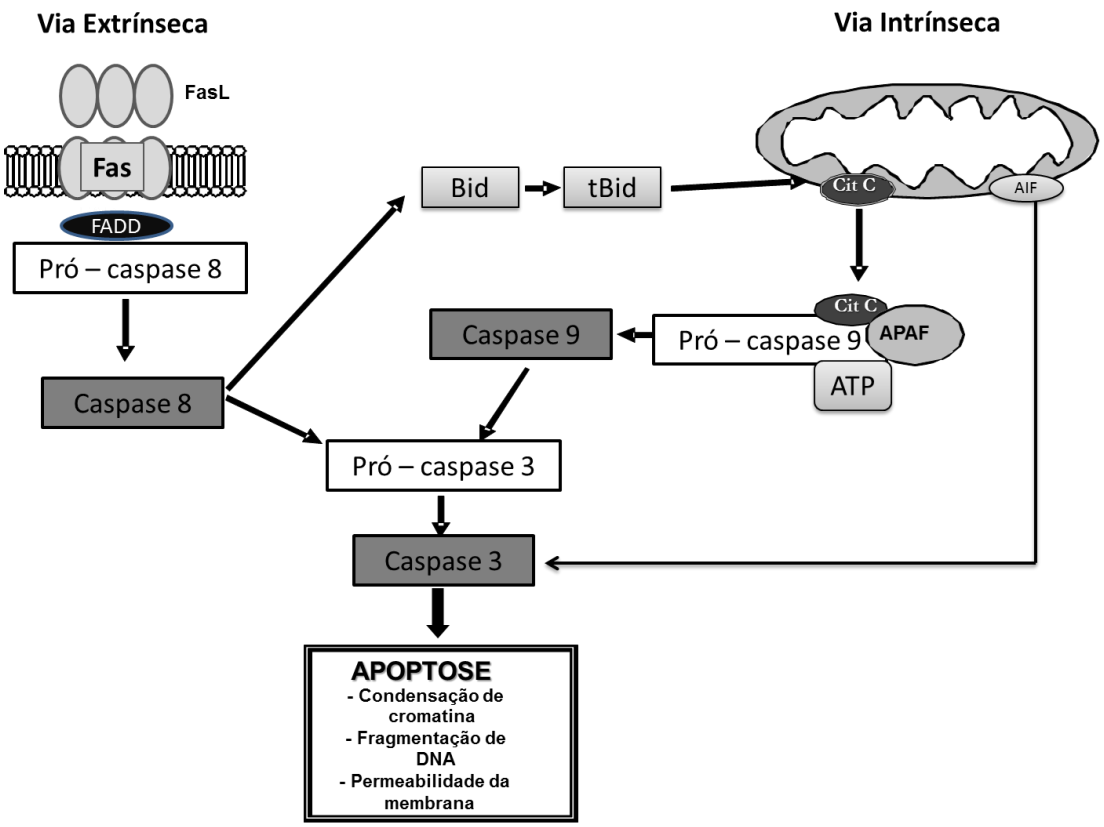
1.7.1 – Mecanismos de Morte Celular por apoptose e necrose

Apoptose é um processo coordenado e dependente de energia para que ocorra a ativação de um grupo de cisteína proteases (caspases) e uma complexa cascata de eventos, demonstrada de forma simplificada na figura 8.

O processo apoptótico pode ser induzido por duas, entre elas, a via extrínseca, que é iniciada com a ativação de receptores de morte localizados na membrana celular das células por polipeptídeos sinalizadores encontrados na família do fator de necrose tumoral (TNF) (AFFORD; RANDHAWA, 2000). Este processo pode também ser induzido pela via intrínseca, como consequência de danos ao DNA, ou eventos que levem a perda de permeabilidade da membrana mitocondrial (HAUPT et al., 2003).

Proteínas moduladoras da apoptose compartimentadas na mitocôndria, tais como citocromo *c* integrante da cadeia transportadora de elétrons localizada na membrana mitocondrial interna, o fator indutor de apoptose (FIA) e o Smac/DIABLO são liberadas da organela para o citosol em resposta a diferentes estímulos apoptóticos. Uma vez no citosol, o citocromo *c* se complexa ao Apaf-1 aumentando sua afinidade pelo complexo de ATP/dATP. A ligação desses nucleotídeos ao complexo citocromo *c*/Apaf-1 promove a oligomerização formando o apoptossoma, que recruta moléculas de pro-caspase-9, promovendo sua auto clivagem em caspase-9. Somente as moléculas de caspase-9 que estão ligadas ao apoptossoma são capazes de clivar e ativar caspases efetoras, como caspase-3, tornando-as hábeis em clivar macromoléculas celulares e desencadeando a apoptose, conforme ilustrado na figura 8 (ZOU et al., 1999; HENGARTNER, 2000; WANG, 2001; KROEMER, 2003; ASHE; BERRY, 2003).

Figura 8 - Representação simplificada das vias de extrínseca e intrínseca de indução de morte celular por apoptose desencadeada por xenobióticos.



Legenda: FasL e Fas: proteína transmembrana ligante para TNF; FADD: Domínio de morte associado a Fas; Bid e tBid: subfamílias de proteínas pró-apoptóticas; Cit C: Citocromo C; APAF: Fator ativador de proteases apoptóticas; ATP: Adenosina Trifosfato.
FONTE: Pereira et al., 2012.

A proteína Smac/Diabo também atua ativando a caspase-3, porém por via distinta. Enquanto que o efeito do FIA, parece ser independente da ativação de caspases, uma vez liberado no citosol ele é conduzido ao núcleo, onde promove fragmentação parcial do DNA e condensação da cromatina. Membros pró-apoptóticos da subfamília Bax oligomerizam-se na membrana externa formando canais pelos quais as proteínas moduladoras da apoptose são liberadas (WOLTER et al., 1997; GROSS et al., 1999). As vias descritas acima podem ainda sofrer regulação pelo gene supressor de tumores, p53, capaz de promover apoptose via ativação direta da Bax (KROEMER, 2003; ASHE; BERRY, 2003).

Desta forma a apoptose é caracterizada por ativação de endonucleases e caspases, além do mais, envolve externalização de fosfatidilserina na membrana plasmática, encolhimento celular, condensação

de cromatina e fragmentação do DNA nucleossomal com quebras em pares de bases específicos contendo cerca de 180 nucleotídeos caracterizado de padrão (ladder), que é resultante da clivagem dos nucleossomos e alterações morfológicas da célula que incluem a formação de prolongamentos na membrana plasmática, reorganização do citoesqueleto e formação de corpos apoptóticos prontamente fagocitados por macrófagos ou células vizinhas responsáveis pela remoção das células mortas (EGUCHI; SHIMIZU; TSUJIMOTO, 1997; GOZUACIK; KIMCHI, 2004; AFFORD; RANDHAWA, 2000; BRAS; QUEENAN; SUSIN, 2005; ELMORE, 2007, PEREIRA et al., 2012).

Por outro lado, o processo de morte celular por necrose é caracterizado por alterações metabólicas que causam depleção súbita do ATP (ou seja, é um processo independente de energia), quebra do equilíbrio iônico, alterações morfológicas devido ao intumescimento mitocondrial e celular, além de ativação de enzimas de degradação resultando em rompimento da membrana citoplasmática e ocasionando um rápido vazamento do conteúdo celular que resulta em resposta inflamatória na região da célula morta (EGUCHI; SHIMIZU; TSUJIMOTO, 1997; BRAS; QUEENAN; SUSIN, 2005; ELMORE, 2007; GOLSTEIN; KROEMER, 2007; BOUJRAD et al., 2007HAN; KIM; KIM, 2008).

Apesar de existirem diferentes tipos de morte celular, tais como apoptose, necrose, necroptose, autofagia, etc. e cada um dos tipos apresentarem características morfológicas e bioquímicas diferentes, algumas dessas características são comuns a mais de um tipo de morte celular (GALLUZZI et al., 2012). Por exemplo, assim como na apoptose, a transição de permeabilidade (TPM) tem uma grande importância na morte celular por necrose. A necrose ocorre quando a TPM promove a rápida depleção de ATP, enquanto o processo de apoptose é iniciado quando a TPM ocorre sem a exaustão de ATP (LEMASTERS et al., 1999).

Por outro lado, embora os tipos de morte celular sejam definidos separadamente, estudos têm demonstrado que diversos mecanismos de indução de morte podem ser ativados simultaneamente dentro de uma mesma célula lesada, onde apenas um tipo de morte celular se torna predominante (ORRENIUS, NICOTERA e ZHIVOTOVSKY, 2011). Sob condições de estresse, presença de xenobióticos, por exemplo, as células podem ativar o

processo autofágico que pode ser uma via de morte celular ou um mecanismo de proteção. Contudo, o último mecanismo é o mais aceito na literatura (SHEN et al., 2011; ORRENIUS et al., 2013).

1.7.2 – Autofagia – mecanismo de morte ou sobrevivência celular

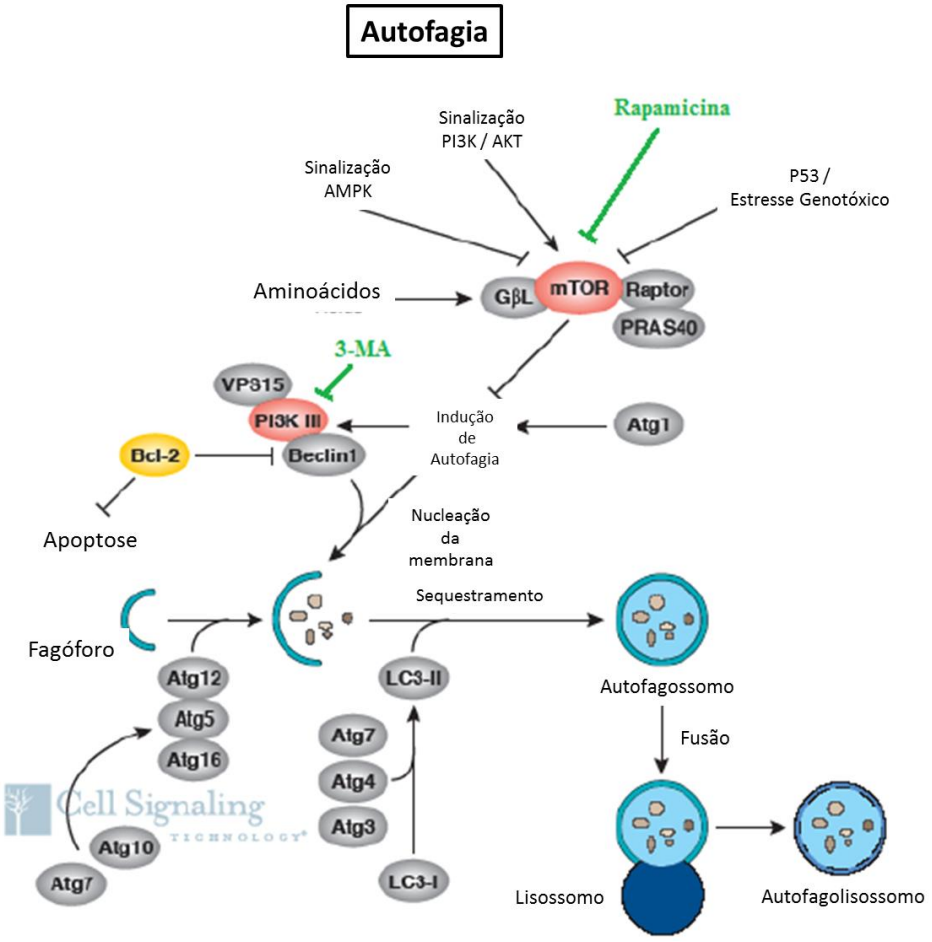
A autofagia é um processo de reciclagem e degradação intracelular, altamente conservado e orquestrado, que envolve degradação de constituintes celulares, bem como remoção de constituintes e organelas danificados por meio dos lisossomos (AMAYA et al., 2015; BOLT, KLIMECKI 2011). O mecanismo é disparado quando um sinal indutor de autofagia (dito pró-autofágico) é percebido pela célula, tanto fisiologicamente quanto em contextos patológicos. Autofagia é classicamente induzida por privação de nutrientes e oxigênio. Porém, outros sinais pró-autofágicos estão bem caracterizados, como: a presença de organelas danificadas; a presença de toxinas extracelulares; estresse do retículo endoplasmático; hipóxia; dano no DNA e compostos citotóxicos. Assim, a autofagia está envolvida em diversos processos fisiológicos ou patológicos, tais como desenvolvimento e manutenção da homeostase do organismo, diferenciação celular, infecção e câncer (KIFFIN et al., 2004; LEVINE; YUAN, 2005; OGATA et al., 2006; ABEDIN et al., 2007; BELLOT et al., 2009; LIM et al., 2010; SHEN et al., 2011).

O termo autofagia foi utilizado pela primeira vez por Christian de Duve em 1963, baseado na descoberta dos lisossomos em 1955, fato que lhe concedeu o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1974. Entretanto, apenas nos últimos anos este processo tem sido descrito com mais detalhes, pois apenas nas últimas duas décadas que, aproximadamente, 40 genes relacionados à autofagia têm sido descritos, os chamados ATG (do inglês: Autophagy-related genes) (de DUVE; WATTIAUX, 1966; FENG et al., 2014; KAUR; DEBNATH, 2015). O processo (representado na figura 9) é caracterizado por uma estrutura inicial de dupla membrana lipídica denominada de fagóforo, que inicia o processo de envolvimento de componentes celulares citoplasmáticos e organelas. A partir da formação do fagóforo há o recrutamento e formação de complexos proteicos que dirigem o englobamento

final dos componentes celulares e a formação de uma vesícula com dupla camada lipídica (autofagossomo) além do recrutamento de lisossomos para a degradação de constituintes celulares e organelas no interior dos autofagossomos (KLIONSKY & EMR, 2000; BEHRENDS et al., 2010). Desta fase de iniciação até o processo de fusão, no qual o autofagossomo se funde com o lisossomo, as principais proteínas envolvidas são a fosfatidilinositol 3-cinase classe III (PI3K III) e os genes relacionados à autofagia, Atgs (WU et al., 2006; BEHRENDS et al., 2010; WESSELBORG, STORK 2015). A maquinaria molecular de controle da autofagia é complexa e coordenada principalmente pelos genes da família Atg. Porém outras proteínas são também importantes, modulando o processo autofágico.

A proteína LC3 merece uma atenção especial. A clivagem de LC3 logo após a tradução produz a forma citosólica de LC3, chamada LC3-I. Quando o processo de autofagia é ativado, LC3-I sofre nova clivagem e uma lipidação com fosfatidiletanolamina por um sistema que envolve as proteínas Atg7 e Atg3, sendo então convertido à LC3-II, a qual se associa à membrana das vesículas autofágicas (WU et al., 2006). É importante ressaltar que a proteína LC3-II não se encontra presente em autofagolisossomos, uma vez que é desestabilizada e degradada pelo ambiente ácido e pelas enzimas lisossomais (BEHRENDS et al., 2010). Outra proteína importante para o processo de autofagia é a p62 (também conhecida como sequestrossoma – SQSTM1), proteína que regula o acondicionamento e transporte de constituintes celulares para o autofagossoma, facilitando assim a depuração de proteínas e organelas danificadas (ORRENIUS et al., 2013).

Figura 9 - Vias de sinalização e controle da autofagia.



Legenda: As principais proteínas envolvidas na modulação e execução do processo autofágico são mostradas, bem como as estruturas formadas. Setas indicam ativação, enquanto que sinais fechados indicam inibição. Em verde encontram-se dois agentes químicos, rapamicina e 3-MA (3-metiladenina).

FONTE: http://www.cellsignal.com

Autofagia e mitofagia (processo de autofagia envolvendo estritamente as mitocôndrias) são importantes processos celulares para preservação de energia e homeostase (ZHANG, 2013). O termo "mitofagia" foi introduzido pela primeira vez em 2005 (LEMASTERS, 2005). Acredita-se que a mitofagia desempenha um papel chave na sobrevivência da célula, sendo o principal mecanismo para a remoção de mitocôndrias defeituosas no interior das células (MICHEL et al., 2012). Concomitante com a produção de energia através da fosforilação oxidativa na mitocôndria, a regulação da homeostase cálcica, biossíntese de grupos heme e esteroides, participação na

sobrevivência ou morte celular, esta organela gera espécies reativas de oxigênio, causando oxidação de proteínas, lipídios e DNA e muitas vezes a indução de morte celular (GREEN; KROEMER, 2004). Desta forma, o controle da qualidade, distribuição e atividade das mitocôndrias é fundamental para manter as funções celulares normais (ZHU; WANG; CHU, 2013).

Dependendo do agente toxicante, o processo de morte celular pode ser iniciado envolvendo diferentes estruturas e sinalização celular (ORRENIUS et al., 2013).

1.8 - Avaliação Toxicogenética

A divisão exata do DNA às células-filhas durante a mitose envolve eventos coordenados, que vão desde a replicação do DNA propriamente dita até a correta segregação cromossômica. A manutenção da normalidade da célula e seu perfeito material genético dependem da exatidão do processo em todos os níveis (SANTELLI, 2014).

Outro importante mecanismo de ação de xenobióticos é a indução de danos ao material genético. Para avaliar corretamente o potencial genotóxico de uma mistura ou de produtos puros é importante o emprego de testes com diferentes *endpoints* (HOUK, 1992). Os testes citogenéticos in vitro, juntamente com os testes de mutação gênica em células de mamíferos, fornecem dados de grande relevância para a avaliação da atividade genotóxica de agentes químicos (SALVADORI et al., 2003). As células apresentam sistemas enzimáticos que reparam o DNA danificado e para isto lançam mão de uma variedade de mecanismos. Alguns sistemas enzimáticos neutralizam compostos potencialmente danosos antes mesmo que eles reajam com o DNA (GRIFFITHS et al., 2001). Outros mecanismos já agem sobre o próprio dano no DNA (BROWN, 199). Uma falha neste sistema pode levar a uma maior taxa de genotoxicidade e mutação (GRIFFITHS et al., 1998).

Uma substância é dita genotóxica quando tem a capacidade de reagir diretamente com a molécula de DNA ou após sua ativação metabólica, produzindo danos em sua estrutura e/ou função (WEISBURGER, 1999).

Quando estes danos são transmitidos à descendência diz-se que ocorreu uma mutação (SANTELLI, 2003).

Mutação é uma alteração no material genético que pode ocorrer em células somáticas ou germinativas e serão transmitidas para as células-filhas ou para a prole, respectivamente, podendo ocorrer de forma espontânea ou induzida por agentes mutagênicos. (LEWIS, 2004; GRIFFITHS etl al., 2006; MACHADO-SANTELLI; SIVIERO, 2008; BENIGNI; BOSSA, 2011).

A mutação pode ocorrer em dois níveis diferentes: Mutação cromossômica, onde segmentos de cromossomos, cromossomos inteiros ou grupos inteiros de cromossomos se alteram (GRIFFITHS et al., 1998); ou mutação gênica também denominada de mutação de ponto, visto que os eventos mutacionais podem ocorrer dentro de genes individuais (GRIFFTHS et al., 2001).

1.8.1 - Ensaio do Cometa

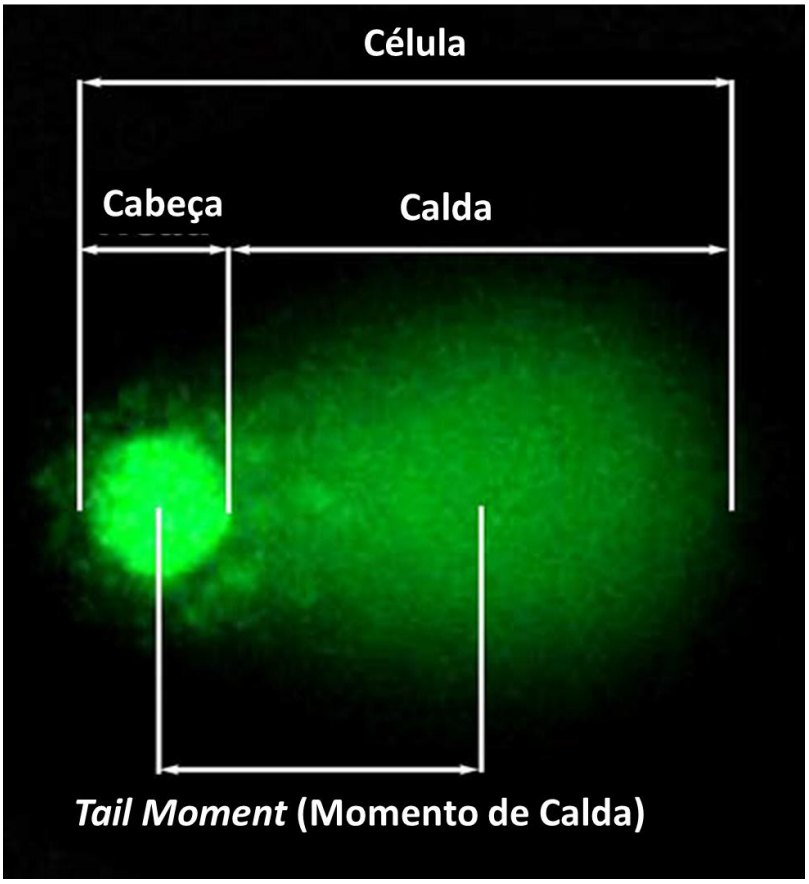
O ensaio do cometa não é utilizado para verificar mutações, mas sim lesões genômicas que se não forem corrigidas, podem ser processadas levando às mutações (TICE, 1995) o que as caracteriza como lesões pré-mutagênicas (KAMMANN et al., 2001). Diferentemente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção (TICE, 1995).

Nas últimas décadas, diversas metodologias para avaliação de danos ao DNA têm sido desenvolvidas e, dentre elas, o ensaio do cometa tem sido considerado como uma das mais eficientes ferramentas para tal finalidade. Este destaque é devido ao teste ser sensível, rápido e econômico, além de requerer poucas células para a sua execução (KOSZ-VNENCHAK, ROKOSZ, 1997; SASAKI et al., 1997; MITCHELMORE, CHIPMAN, 1998). Além do mais, qualquer célula eucariota pode ser utilizada no teste do cometa (TICE et al., 2000).

O teste é realizado com a adesão das células em lâminas embebidas com agarose, lise celular, e eletroforese em pH alcalino (>13) para detectar e quantificar quebras em fitas simples de DNA, sítio álcali-lábeis no DNA, além de quebras de fita duplas (LAI e SINGH, 1995; TICE, 2000). O

parâmetro utilizado para avaliar a extensão do dano ao DNA de células HepG2 foi o *Tail Moment* (TM), ou momento de cauda, representado na Figura 10, que representa a relação entre o comprimento e a intensidade da calda (ou porcentagem de DNA na cauda) (PHILLIPS et al., 1998).

FIGURA 10 – Cometa analisado em software, demostrando o parâmetro Tail Moment (TM)



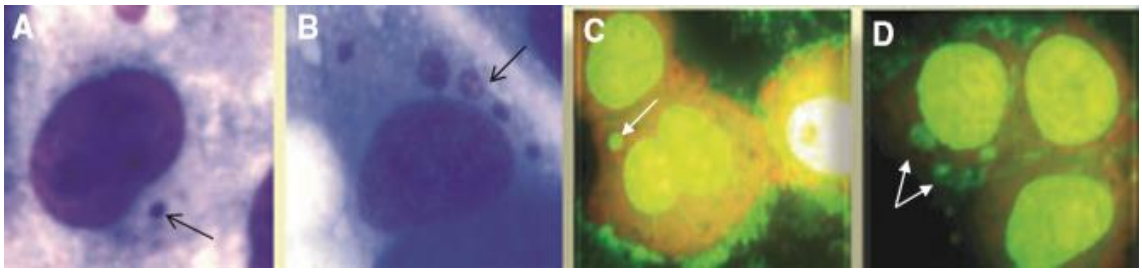
FONTE: Comet Assay IV v. 4.3Manual

1.8.2 - Ensaio do Micronúcleo

Já o ensaio de micronúcleo (MN) é um dos métodos mais usados para avaliar dano cromossômico, relacionado à perda ou quebra cromossômica (CHEQUER et al., 2009), sendo um teste de extrema relevância, tendo em vista que detecta mutações cromossômicas, podendo ser considerados como marcadores precoces para a carcinogênese (BONASSI et al., 2003). Um Micronúcleo (MN) é definido como uma pequena massa nuclear delimitada por uma membrana e separada do núcleo principal (Figura 11). Eles constituem-se de fragmentos cromossômicos acêntricos, que não foram incorporados ao

interior do núcleo das células-filhas (efeito aneugênico) e por isso foram excluídos do núcleo principal das células-filhas (FENECH, 1997; FENECH 2000; FENECH, 2007).

FIGURA 11 - Micrografias de Micronúcleos, único, e múltiplos, vistos sob a luz



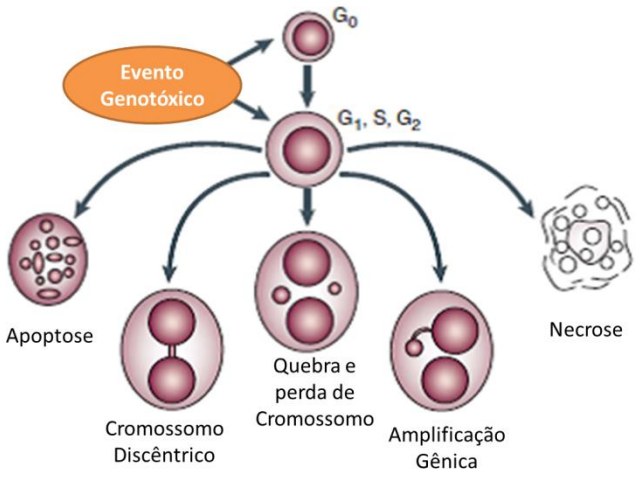
Legenda: (A, B: Giemsa, seta preta) e microscópio de fluorescência (C, D: laranja de acridina, seta branca), respectivamente.
Fonte: BHATIA e KUMAR, 2012.

Para a realização do teste de micronúcleo *in vitro*, é importante a utilização de citocalasina-B, um inibidor da polimerização da proteína actina, requerida pela formação de anel de microfilamentos, que induz à contração do citoplasma e divisão da célula em duas células-filhas (citocinese) (FENECH; CROTT, 2002, SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003) e ainda assim, observar alguns critérios bem definidos na literatura, sendo que os micronúcleos são geralmente redondos ou ovais, 1/16 a 1/3 do tamanho do núcleo principal, não refrativo, com a mesma intensidade de coloração ou ligeiramente mais escuro que o núcleo principal (BHATIA; KUMAR, 2012).

Diferentes tipos de linhagens celulares podem ser empregados nos ensaios de mutagenicidade avaliando a frequência de micronúcleos, dentre eles podemos citar os linfócitos e as células HepG2 (IAMARCOVAI et al., 2008; MURGIA et al., 2008; FENECH 2002).

Atualmente, é proposto o Ensaio Citoma de Micronúcleos com Bloqueio da Citocinese (CBMN) (Figura 12), que além de avaliar a indução de MNs, também avalia a formação de pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares, com o intuito de ampliar a detecção de danos genéticos avaliados (FENECH, 2007).

FIGURA 12 – Possíveis morfologias de células cultivadas com bloqueio de citocinese, após a exposição a agentes genotóxicos/citotóxicos.



Legenda: Usando esses biomarcadores no ensaio CBMN, é possível avaliar a frequência da quebra cromossômica (MN), a perda de cromossomos (MN), rearranjo cromossômico, por exemplo, cromossomos dicêntricos (Pontes), amplificação do gene (Brotos), necrose e apoptose. Além disso, os efeitos citostáticos são facilmente calculados a partir da proporção de células mono, bi e multinucleadas. FONTE: FENECH, 2007

1.8.3 - Ensaio de mutagenicidade com Salmonella ou teste de Ames

O teste de mutagenicidade realizado com diferentes linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium,* é um ensaio de curta duração utilizado para detectar substâncias que podem causar mutações de ponto. É um ensaio que já está bem descrito na literatura e em uso por mais de 20 anos, considerado como de alta sensibilidade e já validado (JARVIS et al., 1996). Além disso, é recomendado pela pela Associação Brasileira de Mutagênese e Genômica Ambiental (MUTAGEN BRASIL, 2004) e reconhecido por comunidades científicas e agências governamentais (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). É usado mundialmente como um ensaio de triagem para determinação de capacidade mutagênica de novos compostos químicos.

As linhagens de Salmonella usadas no teste sofreram mutações nos genes responsáveis pela biossíntese de histidina e por isso não são capazes de produzir este aminoácido (JARVIS et al., 1996). Assim outra mutação é necessária para que a bactéria tenha subsídio para que cresçam e sobrevivam na ausência do referido aminoácido (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

As linhagens de Salmonella utilizadas no ensaio pertencem ao grupo de enterobactérias capazes de produzir azoredutase e nitroredutase, especialmente desenvolvidas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de base no DNA (MARON; AMES, 1983). Assim o ensaio Salmonella/microssoma, apesar de ser um teste bacteriano, é uma ferramenta importante capaz de predizer os possíveis efeitos desses compostos para a saúde humana após a ingestão, pois a Salmonella é uma enterobactéria com características metabólicas similares à microbiota intestinal de mamíferos (UMBUZEIRO, 2005).

As bactérias não apresentam sistema de oxidação por meio do citocromo P450 usados pelos vertebrados na biotransformação de xenobióticos. Assim, sabendo que alguns compostos podem apresentar metabólitos mutagênicos, faz-se necessário mimetizar esse sistema nos ensaios com bactérias através da adição da fração S9. Esta fração é obtida a partir de um homogeneizado de células de fígado de rato pré-tratado com Aroclor 1254 e centrifugados a 9.000 *g* (mistura S9). Assim, substâncias que apresentarem capacidade mutagênica após metabolismo via citocromo P450 serão também detectadas pela fração S9. E os compostos mutagênicos não dependentes de metabolismo podem ser detectados por meio dos ensaios com Salmonella sem adição da mistura S9 (MARON, AMES, 1983; JARVIS et al., 1996).

As linhagens usadas podem reverter espontaneamente a auxotrofia para histidina (His-) e assim podem crescer em um meio sem o aminoácido histidina. Esta reversão espontânea é relativamente fraca, que pode ser aumentada por meio de mutações. Cada linhagem apresenta uma faixa característica de reversão espontânea (MARON, AMES, 1983; MORTELMANS, ZEIGER, 2000). As linhagens TA98 e TA 100, utilizadas no presente trabalho, são comumente utilizadas em estudo de triagem, pois mostram eficiência na detecção de grande número de agentes mutagênicos (CLAXTON et al., 1987; MORTELMANS, ZEIGER, 2000). A tabela 2 mostra as características genéticas das linhagens de Salmonella typhimurium utilizadas neste trabalho e que foram obtidas da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) de São Paulo.

Tabela 2: Características genéticas das linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas no teste *Salmonella*/microssoma

Linhagem	Genótipo	Tipo de mutação	Referências
TA98	*his*D3052[1], rfa[2], bio[3], ΔuvrB[4], pKM101(Ap^r)[5]	Deslocamento do quadro de leitura	MARON, AMES, 1983
TA100	*his*G46[1], rfa[2], bio[3], ΔuvrB[4], pKM101(Ap^r)[5]	Substituição de pares de base	MARON, AMES, 1983

[1] *his* mutação responsável pela síntese de histidina

[2] rfa permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos

[3] dependência à biotina

[4] ΔuvrB deleção do gene uvrB

[5] Ap^r ampicilina resistente

Neste contexto, com o intuito de investigar a capacidade de induzir citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade e desta forma, elucidar o mecanismo de toxicidade e a relação entre estrutura e atividade dos retardantes de chama bromados, mais precisamente os éteres difenílicos polibromados, foram realizados ensaios com cultura de células da linhagem hepática, HepG2; cultivo de células primárias hepáticas, os hepatócitos, da linhagem bacteriana salmonela typhimurium e linfócitos humanos.

A diversidade estrutural dos congêneres de PBDE é um dos impasses na elucidação de sua toxicidade. Portanto o estudo do potencial tóxico de cada estrutura é útil no entendimento do mecanismo de ação. Com essa finalidade, propomos a investigação de indução de apoptose de representantes das classes de PBDEs de maior interesse toxicológico (penta e hexa BDE), devido às suas características de bioacumulação, conforme já citado. Além disso, propomos ainda a complementação de nossos resultados já obtidos com mitocôndrias isoladas de fígado de rato com testes que avaliem o potencial mutagênico dos PBDEs, uma vez que tem sido descrito na literatura que os PBDEs apresentam evidências mutagênicas, embora estes dados ainda sejam escassos (PAROLINE, BINELLI, 2012; AN et al., 2011). Para tanto foram escolhidos os congêneres: BDE-100 (penta-BDE) e BDE-153 (hexa-BDE).

6 – CONCLUSÃO

Foi realizada a avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos dos representantes dos congêneres de éteres difenílicos polibromados representantes das classes de penta e hexa-BDE (BDE-100 e BDE-153) sobre células HepG2, hepatócitos primários isolados de fígado de ratos e células HeLa visando compreender os mecanismos de ação tóxica dessa classe de retardante de chamas sobre a saúde humana.

A) Nossos resultados mostram que ocorreu a indução de instabilidade genômica às células HepG2 após a exposição aos PBDEs (BDE-100 e BDE-153), como evidenciado pelo ensaio do cometa. Somado a isso, nossos resultados confirmam o potencial tóxico dos retardantes de chama bromados aqui avaliados pelo BDE-100, -153, sendo estes os principais representantes desta classe de compostos.

B) Nossos resultados mostram a instabilidade genômica observada após a exposição ao BDE-100 e BDE-153, não foi suficiente para induzir mutação cromossômica nas condições avaliadas pela formação de micronúcleos nem em células HepG2, bem como em linfócitos humanos saudáveis. Em adição, podemos relacionar o bom desempenho observado com a linhagem tumoral HepG2 no experimento de mutagenicidade quando comparado com uma célula saúdável, os linfócitos por exemplo. Visto que com ambas as células obtivemos os mesmos resultados.

C) Os PBDEs não foram capazes de reverter a mutação de não produção do aminoácido histidina nas linhagens de Salmonelas TA98 e TA100, não induzindo mutações de bases/frameship nas condições testadas neste modelo de célula procarionte.

D) Os PBDEs avaliados foram capazes de induzir citotoxicidade em 24 e 48 horas de exposição nas células HepG2, em hepatócitos de ratos wistar e em células HeLa, em proporções diferentes entre si. Por isso, nossos achados sugerem que as concentrações avaliadas são capazes de induzir hepatotoxicidade nas condições testadas.

E) Todos os dois congêneres avaliados no presente trabalho se mostraram capazes de causar morte celular por disfunção mitocondrial, observados a partir da capacidade interagir com o potencial de membrana mitocondrial, produção de EROS e liberação de proteínas presentes na matriz mitocondrial.

F) Os PBDEs avaliados foram capazes de induzir a via intrínseca da apoptose monitorada pela liberação de fatores apoptóticos, ativação de caspases, bem como características exclusivas de apoptose, tais como exposição e manutenção da fosfatidilserina na membrana externa das células e fragmentação nuclear.

G) Foi observado também que após a exposição a ambos PBDEs houve o aumento de proteínas do processo autofágico, o que nos dá o indício de que a autofagia é induzida pelos compostos, a príncipio como um mecanismo citoprotetor, visto que quando o processo autofágico é inibido, observamos um aumento em características de morte celular por apoptose.

H) Concluimos também que a toxicidade desses compostos apresentou-se de maneira diferente entre os congêneres testados muito possivelmente devido as suas diferenças estruturais, como a coplanaridade da estrutura tridimensional, número e posição de substituintes de bromo na molécula dos PBDEs.

Desta forma, baseado em nossos resultados e com os relatos de toxicidade dos compostos na literatura, e levando em consideração a quantidade produzida e utilizada destas substâncias nos mais variados itens e utensílios domésticos em adição a falta de legislação para regulamentar o seu uso, concluímos que esta classe de compostos oferece risco a população. Uma vez que a população está em contato direto e indireto com os PBDEs.

Além do mais, nossos dados claramente auxiliam na elucidação do mecanismo de toxicidade dos PBDEs onde mostram que as concentrações aqui avaliadas foram capazes de induzir instabilidade genômica e nas mesmas doses são citotóxicos envolvendo o processo de morte celular por autofagia e apoptose.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDIN, Z.; SEN, S,; FIELD, J. Aldo-keto reductases protect lung adenocarcinoma cells from the acute toxicity of B[a]P-7,8-trans-dihydrodiol, **Chem Res Toxicol**, vol. 13, p. 113-121, 2012.

ABEDIN, M.J.; WANG, D.; MCDONNELL, M.A.; LEHMANN, U.; KELEKAR, A. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. **Cell Death Differ**, v, 14(3), p. 500–510, 2007.

ADEYEMI, J.A.; MARTINS-JUNIOR, A.C.; BARBOSA JR. F. Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (Danio rerio) co-exposed to arsenic and atrazine. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 172, p. 7-12, 2015.

AFFORD, S.; RANDHAWA, S. Apoptosis, **Clin Pathol Mol Pathol**, vol. 53, p. 55-63, 2000.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, Toxicological profile for polybrominated biphenyls and polybrominated diphenyls and polybrominated diphenyls ethers, Atlanta, GA: US Depertament of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for toxic substances and disease registry; 2004, Available from: http://www,atsdr,cdc,gov/ToxProfiles/tp68,pdf [accessed: 19/04/2012].

ALAEE, M.; ARIAS, P.; SJODIN, A.; BERGMAN, A. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. **Environment International**, v. 6, p. 683 – 689, 2003.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. Biologia Molecular da Célula, 3ªed, Porto Alegre: Artes Médicas; 1997, 1549p

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. **Toxicol**, v. 271, p. 51-56, 2010.

AMAYA, C.; FADER, CM.; COLOMBO, M,I. Autophagy and poteins involved in vesicular trafficking, **FEBS Letters**, v,143, p. 45 – 56, 2015.

AN, J.; YIN, L.; SHANG, Y.; ZHONG, Y.; ZHANG, W.; WU, M.; YU, Z.; SHENG, G.; FU, J.; HUANG, Y. The combined effects of BDE-47 and BaP on oxidatively generated DNA damage in LO2 cells and possible molecular mechanism. **Mut Res**, v. 721, p. 192-198, 2011.

AN, J.; LI, S.; ZHONG, Y.; WANG, Y.; WU, M.; YU, Z.; SHENG, G.; FU, J.; HUANG Y. The cytotoxic effects of synthetic 6-Hydroxylated and 6-Methoxylated Polybrominated Diphenyl Ether 47 (BDE47), **Environl Toxicol**, v. 26, p. 591 – 599, 2011.

ASHE, P.C.; BERRY, M.D. Apoptotic signaling cascades. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 27, p, 199-214, 2003.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION – ATCC. Disponível em: http://www.atcc.org/products/all/HB-8065.aspx. Acessado em: 18/05/2016.

BAHE, A.R.; et al., Emerging environmental contaminants and antibiotic resistance: science & policy concerns, 2005, Animal waste management symposium, Disponível em: http://www,cals,ncsu,edu/waste_mgt/05wastesymposium/PDFS/Bahe,pdf. Acesso em 29 de Junho de 2014,

BARSIEN, J.; SYVOKIEN, J.; BJORNSTAD, A. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in mussels exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47. **Aquat Toxicol**, v. 78S, p. 105–108, 2006.

BAUMGART, B.R.; GRAY, K.L.; WOICKE, J.; BUNCH, R.T.; SANDERSON, T.P.; VLEET, T.R.V. MicroRNA and biomarkers of mitochondrial toxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, 2015. doi: 10.1016/j.taap.2015.10.007

BELLOT, G.; GARCIA-MEDINA, R.; GOUNON, P.; CHICHE, J.; ROUX, D.; POUYSSEGUR, J.; MAZURE, N.M. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. **Mol Cell Biol**, v. 29(10), p. 2570–2581, 2009.

BENARD, G.; ROSSIGNOL, R. Ultrastructure of the mitochondrion and its bearingon function and bioenergetics. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, p. 1313-42, 2008.

BEHRENDS, C.; SOWA, M.E.; GYGI, S.P.; HARPER, J.W. Network organization of the human autophagy system. **Nature**, v, 466, p. 68-76, 2010.

BERRY, MN.; FRIEND, D.S.; High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. **J Cell Biol**, v. 43, p. 506–520, 1969.

BERNAS, T.; DOBRUCKI, J. Mitochondrial and Nonmitochondrial Reduction of MTT: Interaction of MTT With TMRE, JC-1, and NAO Mitochondrial Fluorescent Probes. **Cytometry**, v. 47, p. 236 – 242, 2002.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from Salmonella test. **Mut Res,** v. 97, p. 267-281, 1982.

BERRIDGE MV, HERST PM, TAN AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. **Biotechnology annual review**, v. 11, p. 127-152, 2005.

BHATIA, AL.; KUMAR, Y. Cancer cell micronucleus: un update on clinical and diagnostic applications. **Acta Pathologica, microbiológica et immunologica scandinavica**, v. 121, p, 569 – 581, 2012.

BIOULAC-SAGE, P.; LEBAIL, B.; BALABAUD, C. Liver and biliary tract histology, In: Rodés J, Benhamou J-P, Blei AT, Reichen J Rizzetto M (eds,) Textbook of hepatology: from basic science to clinical practice, 3rd edition, Malden: Wiley-Blackwell Publishing, (2007),

BIRNBAUM, L.S.; STASKAL, D.F. Brominated flame retardants: cause for concern? **Environ Health Perspect**, v. 112, p. 9-17, 2004.

BRAGADIN, M. The mitochondria: ATP synthesis and its inhibition by toxic compounds, In: MORENO AJM, OLIVEIRA PJ, PALMEIRA CM, (editores) Mitochondrial Pharmacology and Toxicology, Kerala; Transworld Research Network, 2006, 1-22,

BOLT, A.M.; KLIMECKI, W.T. Autophagy in toxicology: self-consumption in times of stress and plenty. **J Appl Toxicol**, v. 32, p. 465-479, 2012.

BOLT, A.M.; BYRD, R.M.; KLIMECKI, W.T. Autophagy is the predominant process induced by arsenite in human lymphoblastoid cell lines. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 244(3), p. 366–373, 2010.

BOUJRAD, H.; GUBKINA, O.; ROBERT, N.; KRANTIC, S.; SUSIN, S.A. AIF-mediated programmed necrosis a highly regulated way to die. **Cell Cycle**, v. 6, p. 2612-2619, 2007.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S.A. Programmed cell death via mitochondria: different models of dying. **Biochem**, v. 70, p. 231-239, 2005.

BRASIL, Conselho Nacional do Meio Ambiente, Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências, Resolução n, 396, 03 de abril de 2008, Diário Oficial da União, Brasília, p, 66-68, 2008.

BSEF, Bromine Science and Environmental Forum, Brussels, Belgium, 2000, Disponível em: http://www,ebfrip,org/, Acessada em janeiro 2012.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation, In: Gleischer, S,; Packer, L, (Ed,), Methods in Enzimology, New York: Academic Press, 1978, v. 52C, p,302-310.

BURSCH, W.; ELLINGER, A.; KIENZL, H.; TOROK, L.; PANDEY, S.; SIKORSKA, M.; WALKER, R.; HERMANN, R.S. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. **Carcinogenesis**, v. 17(8): p. 1595–1607, 1996.

CHANCE, B.; WILLIANS, GR. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv Enzymol Relat Subj Biochem**, v. 17, p. 65–134, 1956.

CHEQUER, F.M.D.; ANGELI, J.P.F.; FERRAZ, E.R.A.; TSUBOY, M.S.; MARCARINI, J.C.; MANTOVANI, M.S.; OLIVEIRA, D.P. The azo dyes Disperse

Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 676, p. 83-86, 2009.

CHEQUER, F.M.D.; VENÂNCIO, V.P.; PRADO, M.R.S.; CUNHA JR L.R.C.S.; LIZIER, T.M.; ZANONI, M.V.D.; et al., The cosmetic dye quinoline yellow causes DNA damage in vitro. **Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 777, p. 54-61, 2015.

CHIKTE, S.; PANCHAL, N.; WARNES, G. Use of LysoTracker Dyes: A flow cytometric study of autophagy. **Cytometry** Part A, v. 85, p. 169 – 178, 2014.

CLAXTON, L.D.; ALLEN, J.; AULETTA, A.; MORTELMANS, K.; NESTMANN, E.; ZEIGER, E. Guide for Salmonella typhimurium/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. **Mutation Research**, v. 189, p. 83-91, 1987.

COBURN, C.G.; CURRAS-COLLAZO, M.C.; KODAVANTI, P.R. In vitro effects of environmentally relevant polybrominated diphenyl ether (PBDE) congeners on calcium buffering mechanisms in rat brain. **Neurochemical Research**, v. 33, p. 355-364, 2008.

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

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**, v. 79, p. 172-183, 2008.

COSTA, L.G.; PELLACANI, C.; DAO, K.; KAVANAGH, T.J.; ROQUE, P.J. The brominated flame retardant BDE-47 causes oxidative stress and apoptotic cell death in vitro and in vivo in mice. **Neurotoxicology**, v. 48, p. 68-76, 2015.

CROMPTON, M. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. **Curr. Opin. Cell Biol** v. 12, p. 414-419, 2000.

DAGDA, R.K.; ZHU, J.; CHU, C.T. Mitochondrial Kinases in Parkinson's disease: Converging insights from neurotoxin and genetic models. **Mitochondrion** v. 9, p. 289-98, 2009.

DALEKE, D.L. Phospholipid Flippases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 821-825, 2007.

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

DANIELS, J.A. Advances in Environmental Research, Nova Science Publishers, New York, vol, 28, 2013, 274p.

DANISH ENVIRONMETAL PROTECTION AGENCY, Brominated flame-retardants-substance flow analysis and assessment of alternatives, Environment Project Rep, n, 494, Danish Environmental Protection Agency, Copenhagen, 1999.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric Assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reability, **Imunol Methods. 22**, v. 89, p. 271 – 277, 1986.

de DUVE, C.; WATTIAUX, R. Functions of lysosomes. **Annu Rev Physiol**, v.28, p.435-492, 1966.

de WIT, C.A. An overview of brominated flame retardants in the environment, **Chemosphere**, v. 46, p, 583-624, 2002.

DIAMOND, J.M. et al., Prioritizing Contaminants of Emerging Concern for Ecological Screening Assesments. **Environmental Toxicology and Chemistr**y, v. 30, p. 2385-2394, 2011.

DING, W.X.; LI, M.; BIAZIK, J.M.; MORGAN, D.G.; GUO, F.; NI, H.M.; GOHEEN, M.; ESKELINEN, E.L.; YIN, X.M. Electron microscopic analysis of a spherical mitochondrial structure. **J Biol Chem**, 2012 In Press.

DINGEMANS, M.M.; HEUSINKVELD, H.J.; BERGMAN, A.; VAN DEN BERG, M.; WESTERINK, R.H. Bromination pattern of hydroxylated metabolites of BDE-

47 affects their potency to release calcium from intracellular stores in PC12 cells. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p. 519-525, 2010.

DU, L.; SUN, W.; ZHANG, H.; CHEN, D. BDE-209 inhibits pluripotent genes expression and induces apoptosis in human embryonic stem cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, p. 659 – 668, 2016.

DYKENS, J.A.; JAMIESON, J.D.; MARROQUIN, L.D.; NADANACIVA, S.; XU J.J.; DUNN M.C.; SMITH, A.R.; WILL, Y. In Vitro Assessment of Mitochondrial Dysfunction and Cytotoxicity of Nefazodone, Trazodone and Buspirone. **Toxicol Sci** v. 103: p. 335-45, 2008.

EGUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. **Cancer Res**, v. 57, p. 1835-1840, 1997.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of Programmed Cell Death. **Toxicology Patology**, v. 35, p. 425 – 516, 2007.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2006a, Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) Project Plan Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, March, 2006, Available at http://www,epa,gov/oppts/pbde/,

EPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Technical Fact Sheet – Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Polybrominated Biphenyls (PBBs), Janeiro, 2014.

ERWALL, B. Screening of toxic compounds in mammaliam cell cultures. **Annals the New York of Science**, v. 407, p. 64-77, 1983.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology, **Toxicology**, v. 181–182, 411–416, 2002.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, p. 1084-1104, 2007.

FENECH, M.; CROTT, J.W. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 504, p. 131-136, 2002.

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147, p. 29–36, 1985.

FENG, Y.; HE, D.; YAO, Z.; et al. The machinery of macroautophagy. **Cell Res**, v.24, n.1, p.24-41, 2014.

FERRAZ, E.R.A.; GRANDO, M.D.; OLIVEIRA, D.P. The azo dye Disperse Orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in Daphnia similis and Vibrio fischeri. **Journal of Hazardous Materials**, v.192, p. 628-633, 2011.

FREEDONIA GROUP, Cleveland, OH, USA, 2011, Disponível em: www,freedoniagroup,com, Acessado em 10/02/2016,

FREY, T,G.; MANNELLA, C.A. The internal structure of mitochondria. **Trends Biochem Sci**, v. 25, p. 319–324, 2000.

FROMENTY, B.; BERSON, A.; PESSAYRE, D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation, **J Hepatol**, v. 26 (supplement1), p. 13-22, 1997.

FROMENTY, B.; PESSAYRE, D, Inhibition of mitochondrial b-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity, **Pharmacol Ther**, v. 67, p. 101-54, 1995.

FÜLLGRABE, J.; KLIONSKY, D.J.; JOSEPH, B. The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.15, n.1, p.65-74, 2014.

GALLOWAY, C.A.; LEE, H.; YOON, Y. Mitochondrial morphology – emerging role in bioenergetics, **Free Radic Biol Med** 2012, In Press.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; TROJEL-HANSEN, C.; KROEMER, G. Mitochondrial Control of Cellular Life. **Stress, and Death, Circ Res**, v, 111, p,1198–1207, 2012.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J.M.; et al,, Molecular definitions on cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differentiation**, v. 19, p. 107-120, 2012.

GEBHARDT, R.; HENGSTLER, J.G.; MÜLLER, D.; GLÖCKNER, R.; BUENNING, P.; LAUBE, B.; SCHMELZER, E.; ULLRICH, M.; UTESCH, D.; HEWITT, N.; RINGEL, M.; HILZ, B.R.; BADER, A.; LANGSCH. A.; KOOSE T.; BURGER, H.J.; MAAS, J.; OESCH, F, New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. **Drug Metab Rev**, v. 35, p. 145–213, 2003.

GELDERBROM, W.C.; GALENDO, D.; ABEL, S.; SWANEVELDER, S.; MARASAS, W.F.; WILD, C.P.. Cancer initiation by fumonisin B(1) in rat liver--role of cell proliferation. **Cancer Lett**, v. 28, p. 127-137, 2001.

GIORGI, C.; ROMAGNOLI, A.; PINTON, P.; RIZZUTO, R. Ca^{2+} Signaling. Mitochondrial and Cell Death. **Curr Mol Med,** v. 8, p. 119-130, 2008.

GÓMEZ-LECHÓN, M.J.; LAHOZ, A.; GOMBAU, L.; CASTELL, J.V.; DONATO M.T. In vitro evaluation of potential hepatotoxicity induced by drugs. **Curr Pharm Des,** v. 16, p. 1963–1977, 2010.

GOZUACIK, D.; KIMCHI, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism, **Oncogene**, v. 23, p. 2891-2906, 2004.

GREEN, D.R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, p. 626-629, 2004.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. Mutação Gênica, In: Introdução à Genética, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, Cap, 7, p, 169-194,

GRIFFTHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. A estrutura de Genes e Genomas, In: Genética Moderna, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, cap, 2, p, 23-28.

GRIFFTHS, A.J.F.; GELBART, W.M.; MILLER, J.H.; LEWONTIN, R.C. Mutações Gênicas, In: Genética Moderna, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, cap, 7, p, 177-204.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose, **Revista Brasileira de Cancerologia** 2007; 53: 335-343.

GROSS, A.; YIN, X.M.; WANG, K.; WEI, M.C.; JOCKEL, J.; MILLIMAN, C.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; KORSMEYER, S.J. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for citochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. **J Biol Chem**, v, 274, p.1156-1163, 1999.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 32, p. 37-43, 2007.

GUGUEN-GUILLOUZO, C. Isolation and culture of animal and human hepatocytes, In: Freshney, R,I, (Ed.), Culture of epithelial cells, New York: Wiley-Liss, 1992, p, 197-223.

GUGUEN-GUILLOUZO, C.; GUILLOUZO, A. General Review on In Vitro Hepatocyte Models and their applications, In: Maurel P. (Ed.), Hepatocytes – Methods and Protocols, New York: Springer, 2010, p, 1-40.

GUILLOUZO, A.; GUGUEN-GUILLOUZO, C. Evolving concepts in liver tissue modeling and implications for in vitro toxicology. **Expert Opin Drug Metab Toxicol** v. 4, p.1279–1294, 2008.

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

GUO, L.; YU, H.; GU, W.; et al. Autophagy Negatively Regulates Transmissible Gastroenteritis Virus Replication. **Sci Rep**, v. 6, p.1-14, 2016.

HAKK, H.; HUWE, J.K.; LARSEN, G.L. Absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) study with 2,2', 4,4', 5,6'-Hexabromodiphenyl ether (BDE-154) in male Sprague –Dawleys rats. **Xenobiotica**, v. 39, n. 1, p. 46-56, 2009.

HAN, S.I.; KIM, Y.; KIM, T. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. **BMB reports**, v. 41, p, 1-10, 2008.

HARDER, H.C.; ROSENBERG, B. Inhibitory effects of anti-tumor platinum compounds on DNA, RNA and protein syntheses in mammalian cells in vitro. **Int. J. Cancer**, v. 6, p. 207 – 216, 1970.

HARRIS, A.J.; DIAL, S.L.; CASCIANO, D.A. Comparison of basal gene expression profiles and effects of hepatocarcinogens on gene expression in cultured primary human hepatocytes and HepG2 cells. **Mutat Res** v. 549:p. 79–99, 2004.

HASSAN, A.M.; ALAM, S.S.; ABDEL-AZIEM, S.H.; AHMED, K.A. Benzo-a-pyrene induced genotoxicity and cytotoxicity in germ cells of mice: Intervention of radish and cress. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 9, p. 65-72, 2011.

HAUPT, S.; BERGER, M.; GOLDBERG, Z.; HAUPT, Y. Apoptosis – the p53 network. **Journal of Cell Science**, v. 116, p. 4077-4085, 2003.

HE, C.; KLIONSKY, D.J. Regulation mechanism and signaling pathways of autophagy. **Annu Rev Genet** v. 43: p. 67-93, 2009.

HENGASTER, M.O. The biochesmitry of apoptosis, **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HE, W.; HE, P.; WANG, A.; XIA, T.; XU B.; CHEN, X. Effects of PBDE-47 on cytotoxicity and genotoxicity in human neuroblastoma cells in vitro. **Mutation Research**, v. 649, p. 62-70, 2008.

HEWITT, N.J.; de KANTER, R.; LECLUYSE, E. Induction of drug metabolizing enzymes: a survey of in vitro methodologies and interpretations used in the pharmaceutical industry–do they comply with FDA recommendations? **Chem Biol Interact** v. 168:p. 51–65, 2007a.

HEWITT, N.J.; LECHÓN, M.J.; HOUSTON, J.B.; HALLIFAX, D.; BROWN, H.S.; MAUREL, P.; KENNA, J.G.; GUSTAVSSON, L.; LOHMANN, C.; SKONBERG, C.; GUILLOUZO, A.; TUSCHL, G.; LI, A.P.; LECLUYSE, E.; GROOTHUIS, G.M.; HENGSTLER, J.G. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. **Drug Metab Rev** v. 39: p.159–234, 2007b.

HISSIN, P.J.; HILF, R.A. fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal, Biochem**, v. 74: p. 214–226, 1976.

HITES, R.A. Polybrominated Diphenyl Ethers in the Environment and in people: A Meta-Analysis of Concentrations. **Environmental Science & Technology**, v. 38, p. 945-956, 2004.

HOLY, J.M. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation in MCF-7 breast cancer cells. **Mutation Research**, v. 518, p. 71 – 84, 2002.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents, **Mutation Research**, v. 277, p. 91 – 138, 1992.

HOUCK, K.A.; DIX, D.J.; JUDSON, R.S.; KAVLOCK, R.J.; YANG, J.; BERG, E.L. Profiling bioactivity of the ToxCast chemical library using BioMAP primary human cell systems. **J Biomol Screen** v. 14: p. 1054–1066, 2009.

HSU, H.C.; TSENG, H.J.; LAI, P.L.; LEE, P.H.; PENG, S.Y. Expression of p53 gene in 184 unifocal hepatocellular carcinomas: association with tumor growth and invasiveness. **Cancer Res** v. 53: p. 4691–4694, 1993.

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**, v. 171, p. 19–28, 2007.

HUANG, S.C.; GIORDANO, G.; COSTA, L.C. Comparative Cytotoxicity and Intracellular Accumulation of Five Polybrominated Diphenyl Ether Congeners in Mouse Cerebellar Granule Neurons, **Toxicological Sciences** v. 114, p.124-132, 2010.

HUBER, L.A.; XU, Q.B.; JURGENS, G.; BOCK, G.; BUHLER, E.; GREY, K.F.; et al., Correlation of lymphocyte lipid composition membrane microviscosity and mitogen response in the aged, **Eur J Immunol**, v. 21, p. 2761-5, 1991.

IMBERTI, R.; NIEMINEM, A.L.; HERMAN, B. et al., Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporine A and trifluoperazine. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 265, p. 392 – 400, 1993.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER – IARC, Polybrominated Diphenyl Ether. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Hum., v. 107:1–500. Disponível em https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol107/mono107-002.pdf. Acessado em 18/05/2016.

IKONOMOU, M.; RAYNE, S.; ADDISSON, R. Exponential Increases of the Brominated Flame Retardants, Polybrominated Diphenyl Ethers, in the Canadian Arctic from 1981 to 2000, **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 1886-1892, 2002.

JAESCHKE, H.; GORES, G.J.; CEDERBAUM, AI.; HINSON, J.A.; PESSAYRE D.; LEMASTERS, J.J. Mechanisms of hepatotoxicity, **Toxicology Science**, v. 65, p. 166–176, 2002.

JARVIS, A.S.; HOKEYCETT, M.E.; McFARLAND, V.A.; BULICH, A.A.; BOUNDS, H.C. A comparison of the Ames assay and Mutatox in assessing the mutagenic potential of contaminated dredged sediment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 33, p. 193-200, 1996.

JI, K.; CHOI, K. GIESY, J.P.; MUSSARRAT, J.; TAKEDA, S. Genotoxicity of Several Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Hydroxylated PBDEs, and Their Mechanisms of Toxicity. **Environmental Science & Tecnhology**, v. 45, p. 5003 – 5008, 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**, v. 24, p. 1190-1196, 2010.

JONES, A.L.; SCHMUCKER, D.L. Current concepts of liver structure as related to function, **Gastroenterology**, v. 73: p. 833-851, 1977.

JONES, A.L.; SPRING-MILLS, E. The liver and gallbladder, In: Weiss L (Ed): Modern Concepts of Gastrointestinal Histology, New York, Elsevier, 1984, p, 706 – 748.

JUDSON, R.S.; HOUCK, K.A.; KAVLOCK, R.J. KNUDSEN, T.B.; MARTIN, M.T.; MORTENSEN, H.M.; REIF, D.M.; ROTROFF, D.M.; SHAH, I.; RICHARD, A.M.; DIX, D.J. In vitro screening of environmental chemicals for targeted testing prioritization: the ToxCast project. **Environ Health Perspect** v. 118: p. 485–492, 2010.

KAHL, V.F.S.; FENECH, M.; SIMON, D.; DA SILVA, J. Telomere length: what it could tell us? **Applied research in Toxicology**, v. 1, p. 46 – 47, 2015.

KANSMULLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.;

LANGER, T.; DARROUD, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens, **Mutation Research**, v. 402, p. 185-202, 1998.

KANZAWA, T.; ZHANG, L.; XIAO, L.; GERMANO, I.M.; KONDO, Y.; KONDO, S. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. **Oncogene**, v. 24, p. 980–991, 2005.

KAUR, J.; DEBNATH, J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 16, n.8, p.461-472, 2015.

KAWAGUCHI, S.; NAKAMURA, T.; YAMAMOTO, A.; HONDA, G.; SASAKI, Y.F. Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity? **Journal of Nucleic acids**,p. 1 – 8, 2010.

KHAN, Z.; CRAWFORD, J.M.; STOLZ, D. Ultrastructure of the hepatocyte, In: RODES J, BENHAMOU J, BLEI A, REICHEN J, RIZZETTO, M, (eds,) Textbook of Hepatology: From Basic Science to CLinical Practice, Malden, MA: Wiley-Blackwell Publishing, 2007.

KIFFIN, R.; CHRISTIAN, C.; KNECHT, E.; CUERVO, A.M. Activation of chaperonemediated autophagy during oxidative stress. **Mol, Biol, Cell** v. 15(11): p. 4829–48140, 2004.

KIM, J.S.; HE, L.; LEMASTERS, J.J. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, p. 463-470, 2003.

KLIONSKY, D.J.; EMR, S.D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation, **Science** v. 290, p. 1717–1721, 2000.

KLIONSKY, D.J.; ABDELMOHSEN, K.; ABE A. et al., Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy, v.12, p. 1-122, 2015.

KLIONSKY, D.J.; ABDELMOHSEN, K.; ABE, A. et al., Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy. v.12, n.1, p.1-222. 2016.

KARNKOWSKA, A.; VACEK, V.; ZUBACOVA, Z. et al., A Eukaryote without a Mitochondrial Organelle, **Current Biology**, v. 26, p. 1 – 11, 2016.

KODAVANTI, P.R.S.; KODAVANTI, U.P.; MEHENDALE, H.M. Carbon tetrachloride—induced alterations of hepatic calmodulin and free calcium levels in rats pretreated with chlordecone, **Hepatology**, v. 13, p. 230-238, 1991.

KODAVANTI, P.R.; WARD, T.R.; LUDEWING, G.; ROBERTSON, L.W.; BIRNBAUM, L.S. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) effects in rat neuronal cultures: 14C-PBDE accumulation, biological effects and structure-activity relationships. **Toxicological Sciences**, v. 88, p. 181-192, 2005.

KODAVANTI, P.R.S.; ROYLAND, J.E.; OSORIO, C.; WINNIK, W.M.; ORTIZ, P.; LEI L.; et al., Developmental Exposure to a Commercial PBDE Mixture: Effects on Protein Networks in the Cerebellum and Hippocampus of Rats. **Environmental Health Perpectives**, v. 123, p. 428-436, 2015.

KOSZ-VNENCHAK, M.; ROKOSZ, K. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. **Folia Biologica**, v. 45, p. 153-156, 1997.

KOWALTOWSKI, A.J.; SOUZA-PINTO, N.C.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondria and reactive oxygen species, **Free Radic Biol Med**, v. 47, p. 333-343, 2009.

KROEMER, G.; DALLAPORTA, B.; RESCHE-RIGON, M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annu, Rev, Physio** v. 60, p. 619-642, 1998.

KROEMER, G. Mitochondrial Control of apoptosis: an introduction. **Biochem, Biophys, Res, Commun**, v. 304, n, 3, p. 433-435, 2003.

KROEMER, G.; PETIT, P.; ZAMZAMI, N.; VAYSSIÈRE, J.L.; MIGNOTTE, B. The biochemistry of programmed cell death. **FASEB J.** v. 9, n.13, p.1277-1287,1995.

KUNZ, A.; Peralta-Zamora.; Moraes, S.G.; Durán, N. New tendencies on textile effluent treatment, **Química Nova**, vol, 25, pp, 78-82, 2002.

KYUNGHEE, J.; CHOI, K.; GIESY, JP.; MUSARRAT, J.; TAKEDA, S. Genotoxicity of Several Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and Hydroxylated PBDEs and Their Mechanisms of Toxicity. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 5003-5008, 2011.

IAMARCOVAI, G.; BONASSI, S.; BOTTA, A.; BAAN, R.A.; ORSIÈRE, T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature, **Mutation Res**, v. 658, p. 215–233, 2008.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (eds),Histologia Básica, 9ª ed, Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1999, 332 p,

LAANE, E.; TAMM, KP.; BUENTKE, E.; ITO, K.; KHARAZIHA, P.; OSCARSSON, J.; CORCORAN, M.; BJORKLUND, A.C.; HULTENBY, K.; LUNDIN, J.; HEYMAN, M.; SODERHALL, S.; MAZUR, J.; PORWIT, A.; PANDOLFI, P.P.; ZHIVOTOVSKY, B.; PANARETAKIS, T.; GRANDER, D. Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. **Cell Death Differentiation**, v. 16, p. 1018–1029, 2009.

LAI, H.; SINGH, N.P. Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells, **Bioelectromagnetics**, v. 16, p. 207 – 210, 1995.

LANTTO, T.A.; DORMAN, H.J.D.; SHIKOV, A.N.; POZHARITSKAYA, O.N.; MAKAROV, V.G.; TIKHONOV, V.P.; HILTUNEN, R.; RAASMAJA, A. Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (Pinus sibirica Du Tour) extract. **Food Chemistry**, v. 112, p. 936–943, 2009.

LASH, L.H.; JONES, D.P. Methods in Toxicology: Mitochondrial Dysfunction, **Academic Press**, v.21, 1993.

LEBEL, C.P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2',7'- dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol**, n. 5, p. 227-231, 1992.

LeCLUYSE, EL.; WITEK, R.P.; ANDERSEN, M.E.; POWERS, M.J. Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 42, p. 501 – 548, 2012.

LEE, W.S.; SOKOL, R.J. Liver disease in mitochondrial disorders. **Seminars in Liver Disease**, v. 27, p. 259–273, 2007.

LEE, Y.J.; KIM, N.Y.; SUH, Y.A.; LEE, C. Involvement of ROS in Curcumin induced Autophagic Cell Death. **The Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 15, p. 1–7, 2011.

LEEDE, B-JV.; DOHERTY, A.; GUÉRARD, M.; HOWE, J.; O'DONOVAN, M.; PLAPPERT-HELBIG, U.; THYBAUD, V. Performance and data interpretation of the in vivo comet assay inpharmaceutical industry: EFPIA survey results, **Mutation Research**, v. 775-776, p. 81-88, 2014.

LEMASTERS, J.J.; NIEMINEN, AL.; QIAN, T. et al., The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy, **Biochim Biophys Acta** v. 1366: p. 177-96, 1998.

LEME, D.M.; de OLIVEIRA, G.A.R.; MEIRELES, G.; BRITO, L.B.; RODRIGUES, L.B.; de OLIVEIRA, D.P. Eco- and Genotoxicological Assessments of Two Reactive Textile Dyes. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 78, p. 287-300, 2015.

LESNEFSKY, E.J.; MOGHADDAS, S.; TANDLER, B.; KERNER, J.; HOPPEL, C.L. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemiareperfusion, aging, and heart failure, **J Mol Cell Cardiol**, v. 33: p. 1065-1089, 2001.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation, In: Principle of Biochemistry, 3th edition, New York: Worth Publishers, cap, 19, p, 515—539, 2002.

LEMASTERS, J.J.; QIAN, T.; BRADHAM, C.A.; BRENNER, D.A.; CASCIO, W.E.; TROST, L.C.; NISHIMURA, Y.; NIEMINEN, A-L.; HERMAN, B. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic Cell Death, **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 31, p. 305-319, 1999.

LEMASTERS, J.J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging, **Rejuvenation Res**, v.8, p. 3-5, 2005.

LETCHER, R.J.; BUSTNES, J.O.; DIETZ, R.; JENSSEN, B.M.; JORGENSEN, E.H.; SONNE, C.; VERREAULT, C.; VIJAYAN, M.M. GABRIELSEN, G.W. Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish, **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 2995-3043, 2010.

LEVINE, B.; YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? **J Clin Invest**, v. 115, p. 2679-2688, 2005.

LEWIS, R. Estrutura e replicação do DNA, In: Genética Humana – Conceitos e Aplicações, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, cap, 9, p, 167-184.

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

LI, Y.; COUCH, L.; HIGUCHI, M.; FANG, J-L.; GUO, L. Mitochondrial Dysfunction Induced By Sertraline, an Antidepressant Agent, **Toxicol Sci** v. 127: p. 589-91, 2012.

LIGUORI, M.J.; BLOMME, E.A.; WARING, J.F. Trovafloxacin-induced gene expression changes in liver-derived in vitro systems: comparison of primary human hepatocytes to HepG2 cells, **Drug Metab Dispos** v. 36: p. 223–233, 2008.

LIM, S.C.; HAHM, K.S.; LEE, S.H.; OH, SH. Autophagy involvement in cadmium resistance through induction of multidrug resistanceassociated protein and

counterbalance of endoplasmic reticulum stress WI38 lung epithelial fibroblast cells, **Toxicology** v. 276(1): p. 18–26, 2010.

LIMA, T.F.O.; DUARTE, D.A.; SÁ A.L.B. Mitocôndria Revisada, **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 1: p. 94-107, 2010.

LIU, L.Y.; SALAMOVA, A.; HITES, R.A. Halogenated flame retardants in baby food from the United States and from China and the estimated dietary intakes by infants. **Environmental Science & Technology**, v. 48, p. 9812-8, 2014.

LIU, X.; WANG, J.; LU, C.; ZHU, C.; QIAN, B.; LI, Z.; LIU, C.; SHAO, J.; YAN J. The role of lysosomes in BDE 47-mediated activation of mitochondrial apoptotic pathway in HepG2 cells. **Chemosphere**, v. 124, p. 10-21, 2015.

LIU, L.; ZHANG, Z.; XING, D. Cell death via mitochondrial apoptotic pathway due to activation of Bax by lysosomal photodamage. **Free Radic Biol Med**. V. 51: p. 53–68, 2011.

LORBER, M. Exposure of Americans to polybrominated diohenyl ethers, **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 18, p. 2-19, 2008.

LINDSTRÖM, G.; WINGFORS, H.; DAM, M.; VAN BAVEL, B. Identification of 19 polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in long-finned pilot whale (Globicephala mwlas) from the Atlantic, **Archives of Environment Contaminant Toxicology**, v. 36, p. 355-363, 1999.

LIU, L.; ZHANG, Z.; XING, D. Cell death via mitochondrial apoptotic pathway due to activation of Bax by lysosomal photodamage. **Free Radic Biol Med**. v. 51: p. 53–68, 2011.

LIU, X.; WANG, J.; LU, C.; ZHU, C.; QIAN, B.; LI, Z.; LIU, C.; SHAO, J.; YAN, J. The role of lysosomes in BDE 47-mediated activation of mitochondrial apoptotic pathway in HepG2 cells. **Chemosphere**, v. 124, p. 10 – 21, 2015.

LOGAN, D.C. The mitochondrial compartment, **J Exp Bot**, v. 57: p. 1225-1243, 2006.

LOGAR, R.M.; VODOVNIK, M. Techniques: The applications of microbes in environmental monitoring, In: A, Méndez-Vilas (Ed,), Microbiology: Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, vol. 2, pp. 577-585, 2007.

LUFT, R. The development of mitochondrial medicine, Proc Natl Acad Sci,v. 91, p. 8731-8738, 1994.

LUO, X.; BUDIHARFJO, I.; ZHOU, H.; SLAUGHTER, C.; WANG, X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytocromo c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptor. **Cell Press**. v. 94: p. 481-490, 1998.

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**, v. 47, p. 72-77, 2012.

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**, v. 154, p. 11-21, 2004.

MALHI, H.; GORES, G.J.; LEMASTERS, J.J. Apoptosis and Necrosis in the Liver: A Tale of two Deaths? **Hepatology**, v. 43, S31-S44, 2006.

MANNELLA, C.A. The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. **Biochim Biophys Acta** v. 1762: p. 140 – 147, 2006.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, **Mutation Research**, v. 113, p. 173-214, 1983.

MARTINET, W.; DE MEYER, G.R.; ANDRIES, L.; HERMAN, A.G.; KOCKX, M.M. In situ detection of starvation-induced autophagy. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 54, p. 85–96, 2006.

MARTINOU, J.C.; YOULE, R.J. Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. **Devel Cell.** v. 21: p. 92–101, 2011.

MARTINS, M.; COSTA, P.M. The comet assay in Environmental Risk Assessment of marine pollutants: aplications, assets and handicaps of surveying genotoxicity in non-model organisms. **Mutagenesis**, v. 30, p. 89-106, 2015.

MARZANO, C.; BETTIO, F.; BACCICHETTI, F.; TREVISAN, A.; GIOVAGNINI L.; FREGONA, D. Antitumor activity of a new platinum(II) complex with low nephrotoxicity and genotoxicity, **Chemical Biological Interaction**, v. 148, p. 37–48, 2004.

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

MEEUSEN, S.; DEVAY, R.; BLOCK, J.; CASSIDY-STONE, A.; WAYSON, S.; MCCAFFERY, NUNNARI, J. Mitochondrial Inner-Membrane Fusion and Crista Maintenance Requires the Dynamin-Related GTPase Mgm1. **Cell** v. 127, p. 383, 2006.

MEIRONYTÉ, D.; NORÉN, K.; BERGMAN, Å. Analysis of polybrominated diphenyl ethers in Swedish human milk, A time-related trend study, 1972–1997, **Journal Toxicology Environmental Health**, v. 58 (Part A), p. 329–341, 1999.

MICHEL, S.; WANET, A.; de PAUW A.; ROMMELAERE, G.; ARNOULD, T.; RENARD, P. Crosstalk between mitochondrial (dys)function and mitochondrial abundance, **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, p. 2297-2310, 2012.

MILDAZIENE, V.; NAUCIENE, Z.; BANIENE, R.; DEMIN, O.; KRAB, K.; Analysis of effects of 2,2’,5,5’-tetrachlorobiphenyl on the flux control in oxidative phosphorylation system in rat liver mitochondria. **Molecular Biology Reports**, v. 29, p. 35–40, 2002.

MILLER, K.P.; RAMOS, K.S. Impact of cellular metabolism on the Biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. **Drug Metabolism Reviews**, v. 33, p. 1 – 35, 2001.

MINORICS, R.; SZEKERES, T.; KRUPITZA, G.; SAIKO, P.; GIESSRIQL, B.; WOLFLING, J.; FRANK, E.; ZUPKÓ L. Antiproliferative effects of some novel synthetic solanidine analogs on HL-60 human leukemia cells in vitro, **Steroids**, v. 76, p. 156-162, 2011.

MITCHELMORE, C.L.; CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring, **Mutation Research**, v. 399, p. 135-147, 1998.

MIZUSHIMA, N. Autophagy: process and function. **Genes & Development**, v. 21, p. 2861 – 2873, 2007.

MIYAI, K. Ultrastructural basis for toxic liver injury, In: Faber E,, Fisher MM (Eds): Toxic Injury of the Liver, pt A, New York, Marcel Dekker, 1979, p, 59-154.

MIYAI, K. Structural Organization of the Liver, In: Meeks RG,, Harrison SD,, Bull RJ, (Eds): Hepatotoxicology, New York, CRC Press, 1991, p, 1 – 63.

MONTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microssome mutagenicity assay, **Mutation Research**, v. 455, p. 29-60, 2000.

MOREADITH, R.W.; FISCKUM, G. Isolation of mitochondria from ascites tumor cells permeabilized with digitonin, **Anal, Biochem**, v. 137, p. 360-367, 1984.

MORICE, L.; BENAITREAU, D.; DIEUDONNÉ, M.N.; MORVAN, C.; SERAZIN, V.; MAZANCOURT, P.; PECQUERY, R.; SANTOS, E. Antiproliferative and proapoptotic effects of bisphenol A on human trophoblastic JEG-3 cells, **Reprod Toxicol** v. 32, p. 69-76, 2011.

MURGIA, E.; BALLARDIN, M.; BONASSI, S.; ROSSI, A.M.; BARALE, R. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study, **Mutation Res**, v. 639, p. 27–34, 2008.

NADANACIVA, S.; WILL, Y. New insights in Drug-Induced Mitochondrial Toxicity, **Curr Pharm Des**, v. 17, p. 2100-12, 2011.

NAGY, K.; RACZ, G.; MATSUMOTO, T.; ADANY, R.; ADAM, B. Evaluation to genotoxicity of the pyrethroid insecticide phenothrin. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 770, p. 1-5, 2014.

NAKAGAWA, Y.; MOLDÉUS, P.; MOORE, G.A. Relationship between dysfunction and toxicity of propyl gallate in isolated rat hepatocytes, **Toxicology** v. 114, p. 135–145, 1996.

NELSON, D.L.; COX, M.M.; LEHNINGER. Principles of Biochemistry, 3rd, ed, New York: Worth Publishers, 1255 p, 2000.

NETO, M.L.F. Norma Brasileira de Potabilidade de Água: Análise dos parâmetros agrotóxicos numa abordagem de avaliação de risco, Rio de Janeiro, 2010, Tese de Doutorado, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

NORSTROM, R.J.; SIMON, M.; MOISEY, J.; WAKEFORD, B.; WESELOH, D.V.C. Geographical distribution (2000) and temporal trends (1981–2000) of brominated diphenyl ethers in Great Lakes herring gull eggs. **Environmental Science & Technology** v. 36, p. 4783–4789, 2002.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P. et al. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution, **Mutation Research**, v. 504, p. 17–36, 2002.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) (1997) Test No. 473: In Vitro Mammalian Cell Chromosome Aberration Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) (2010), Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), Test n. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, 2014.

OGATA, M.; HINO, S.; SAITO, A.; MORIKAWA, K.; KONDO, S.; KANEMOTO, S.; MURAKAMI, T.; TANIGUCHI, M.; TANII, I.; YOSHINAGA, K.; SHIOSAKA, S.; HAMMARBACK, J.A.; URANO, F.; IMAIZUMI, K. Autophagy is activated for

cell survival after endoplasmic reticulum stress, **Mol Cell Biol** v. 26(24): p. 9220–9231, 2006.

OJHA, A.; SRIVASTAVA, N. In vitro studies on organophosphate pesticides induced oxidative DNA damage in rat lymphocytes. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 761, p. 10-17, 2014.

OLIVEIRA, G.A.R.; LAPUENTE, J.; LEME, D.M.; FERRAZ, E.R.A.; MEIRELES, G.; OLIVEIRA, D.P. (2013) New Paradigms for the environmental assessment: an ecotoxicological and genetic approach. In: advances in Environmental Research, v. 28, Nova Science Publishers, New York, 274p.

OLSAVSKY, K.M.; PAGE, J.L.; JOHNSON, M.C.; ZARBL, H.; STROM, S.C.; OMIECINSKI, C.J. Gene expression profiling and differentiation assessmentin primary human hepatocyte cultures, established hepatoma cell lines, and human liver tissues. **Toxicol Appl Pharmacol** v. 222: p. 42–56, 2007.

ORRENIUS, S.; NICOTERA, P,; ZHIVOTOVSKY, B. Cell Death mechanism and their implications in toxicology, **Toxicological Sciences**, v. 19, p. 3-19, 2011.

ORRENIUS, S.; KAMINSKYY, VO.; ZHIVOTOVSKY, B. Autophagy in Toxicology: Cause or Consequence? **Annu Rev Pharmacol**, **Toxicol,** v. 53, p. 275 – 297, 2013.

OTT, M.; ROBERTSON, J.D.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 99: p. 1259–1263, 2002.

PILÁTOVÁ, M.; SARISSKÝ, M.; KUTSCHY, P.; MIROSSAY A.; MEZENCEV, R.; CURILLOVÁ, Z.; SUCHÝ, M.; MONDE, K.; MIROSSAY, L.; MOJZIS, J. Cruciferous phytoalexins: antiproliferative effects in T-Jurkat leukemic cells, **Leuk Res,** v. 29, p. 415-21, 2005.

PALM, A.; COUSINS, I.T.; MACKAY, D.; TYSKLIND, M.; METCALFE, C.; ALAEE, M. Assessing the environmental fate of chemicals of emerging concern:

a case study of the polybrominated diphenyl ethers, **Environmental Pollution**, v. 117: p. 195-213, 2002.

PAROLINI, M.; PEDRIALI, A.; BINELLI, A. Variation of Antioxidant Activity in Dreissena polymorpha Specimes Exposed to 2,2',4,4',5,6'-Hexa BDE (BDE-154), **Water, Air Soil Pollutant**, 2012, doi 10,1007/s11270-012-1089-5

PAROLINI, M.; BINELLI, A. Cyto-genotoxic effects induced by three brominated diphenyl ethers congeners on the feshwater Mussel dreissena polymorpha, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, doi:10,1016/j,ecoenv,2012,01,008, 2012.

PAZIN, M.; PEREIRA, L.C.; DORTA, D,J. Toxicity of Brominated Flame Retardants, BDE-47 and BDE-99 stems from impaired mitochondrial bioenergetics. **Toxicology Mechanism and Methods**, v. 25, p. 34 – 41, 2015.

PEREIRA, L.C.; MIRANDA, L.F.C.; de SOUZA, A.O.; DORTA, D.J. BDE-154 Induces Mitochondrial Permeability Transition and Impairs Mitochondrial Bioenergetics. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A,** v. 77, p. 24-36, 2014.

PEREIRA, L.C.; de SOUZA, A.O.; DORTA, D.J. Polybrominated Diphenyl Ether Congener (BDE-100) Induces Mitochondrial Impairment, **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology** (Print), v. 112, p. 418-424, 2013.

PEREIRA, L.C.; de SOUZA, A.O.; PAZIN, M.; DORTA, D.J. Mitocôndria como Alvo para Avaliação de Toxicidade de Xenobiótico, **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 25, p. 1-14, 2012.

PEREIRA, L.C.; DUARTE, F.V.; VARELA, A.T.I.F.; ROLO, A.P.; PALMEIRA, C.M.; DORTA, D.J. An autophagic process is activated in HepG2 cells to mediate BDE-100-induced toxicity, **Toxicology**, 2016. NO PRELO.

PERIER, C.; BOVE, J.; VILA, M. Mitochondria and Programmed Cell Death in Parkinson's Disease: Apoptosis and Beyond. **Antioxid Redox Signal**. V. 16: p. 883–895, 2012.

PESSAYRE, D. Role of reactive metabolites in drug-induced hepatitis, **J Hepatol,** v. 23: p. S16-24, 1995.

PESTANA, C.R.; BORGES, K.B.; FONSECA, P.; OLIVEIRA, D.P. Risco ambiental da aplicação de éteres de difenilas polibromadas como retardantes de chama, **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 21 (2), p. 41-48, 2008.

PETTIGREW, A. Halogenated flame retardants, 4th ed, Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology, vol, 10, Wiley, New York, 1994.

PFAU, W.; MARTIN, F.L.; COLE, K.J.; VENITT, S.; PHILLIPS, D.H.; GROVER, P.L. et al. Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. **Carcinogenesis**, v. 20, p. 545–551, 1999.

PHAM, T.N.; MARION, M.; DENIZEAU, F.; JUMARIE, C. Cadmium-induced apoptosis in rat hepatocytes does not necessarily involve caspase-dependent pathways. **Toxicology in vitro,** v. 20, p. 1331-1342, 2006.

PHILLIPS, J.L.; IVASCHUK, O.; ISHIDA-JONES, T.; JONES, R.A.; CAMPBELL-BEACHER, M.; HAGGREN, W. DNA damage in Molt-4 T-lymphoblastoid cells exposed to cellular telephone radiofrequency fields in vitro, **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, p. 103 – 110, 1998.

POLLACK, A.; CIANCIO, G. Cell cycle phase-specific analysis of cell viability using Hoechst 33342 and propidium iodide after ethanol preservation. **Methods Cell Biology**, v. 33, p. 19-24, 1990.

QIN, G.; WU, M.; SANG, N. Sulfur dioxide and benzo(a)pyrene trigger apoptotic and anti-apoptotic signals at different post-exposure times in mouse liver. **Chemosphere,** v. 139, p. 318 – 325, 2015.

REISTAD, T.; MARIUSSEN, E. A commercial mixture of the brominated flame retardant pentabrominated diphenyl ether (DE-71) induces respiratory burst in human neutrophil granulocytes in vitro. **Toxicology science**, v. 87, p. 57-65, 2005.

REISTAD, T.; MARIUSSEN, E.; FONNUM, F. The effect of a brominated flame retardant, tetrabromobisphenol-A, on free radical formation in human neutrophil granulocytes: the involvement of the MAP kinase pathway and protein kinase C. **Toxicology science**, v. 83, p. 89-100, 2005.

REISTAD, T.; MARIUSSEN, E.; RING, A.; FONNUM, F. In vitro toxicity of tetrabromobisphenol A on cerebellar granule cells: cell death, free radical formation, calcium influx and extracellular glutamate. **Toxicology Science**, v. 96, p. 268-78, 2007.

RICHARDSON, S.D.; TERNES, T.A. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues, **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 3807–3838, 2005.

RICHARDSON, S.D.; TERNES, T.A. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues, **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 2813 – 2848, 2014.

RICHARDSON, V.M.; STASKAL, D.F.; ROSS, D.G.; DILIBERTO, J.J.; DEVITO, M.J.; BIMBAUM, L.S. Possible mechanisms of thyroid hormone disruption in mice by BDE 47: A major polybrominated diphenyl ether congener. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 226, p. 244–250, 2008.

RIVA, C.; BINELLI, A.; COGNI, D.; PROVINI, A. Evaluation of DNA damage induced by decabromodiphenyl ether (BDE-209) in hemocytes of Dreissena polymorpha using the comet and micronucleus assays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 9, p. 735-43, 2007.

RODÉS, J.; BENHAMOU, J-P.; BLEI, A.; REICHEN, J.; RIZZETTO, M. Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice, Malden, MA: Wiley-Blackwell Publishing, 2007.

RODIL, R. et al,, Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain), **Chemosphere**, v. 86, p. 1040-1049, 2012.

RODRIGUEZENRIQUEZ, S.; KIM, I.; CURRIN, R.T.; LEMASTERS, J.L. Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes, **Autophagy**; v. 2: p. 39–47, 2006.

ROSNER, D.; MARKOWITZ, G. Persistent pollutants: a brief history of the discovery of the widespread toxicity of chlorinated hydrocarbons, **Environ Res** v. 120: p. 126–133, 2013.

ROSKO, M.; SZYMCZYK, K.; RZEPKOWSKA, M.; JEDRZEJCZAK, R. Seasonal variability of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polychlorinated diphenyl ethers (PBDEs) congener profiles in butter in Poland: **Dietary risk evaluation**, v. 49, p. 182 – 199, 2014.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas, In: RIBEIRO, L,R,, SALVADORI, D,M,F,, MARQUES, E,K, In: Mutagênese Ambiental, Canoas: Ulbra, 2003, p, 201-223.

SANGAR, V.; EDDY, J.A.; SIMEONIDIS, E.; PRICE, N.D. Mechanistic modeling of aberrant energy metabolism in human disease. **Front Physiol.**; v. 3: p. 1–10, 2012.

SANTELLI, G.M.M. Mutagênese e Carcinogênese, In Seizi Oga, Fundamentos de Toxicologia, 2ed, São Paulo: Atheneu Editora, 2003, v,1, p, 76-88.

SANTELLI, G.M.M. Mutagênese e Carcinogênese, In Seizi Oga, Fundamentos de Toxicologia, 3ed, São Paulo: Atheneu Editora, 2014, v,1, p, 71-84.

SASAKI, Y.F.; TSUDA, S.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E. Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay, **Mutation Research**,v. 388, p. 33–44, 1997.

SCANLON, K.J.; SAFIRSTEIN, R.L.; THIES, H.; GROSS, R.B.; WAXMAN, S.; GUTTENPLAN, J.B. Inhibition of amino acid transport by *cis*-diamminedichloroplatinum (II) derivatives in L1210 murine Leukemia cells. **Cancer Res.** v. 43, p. 4211 – 4215, 1983.

SCHEFFLER, I.E. Mitochondria, Ed, Wiley-Liss, 1999, New York 351p.

SCOTTH, H.L. Modeling the lipid component of membranes, v. 12, p. 495-502, 2002.

SEIBERT, H.; BALLS, M.; FENTEM, J.H.; BIANCHI, V.; CLOTHIER, H.; DIERICKX, P.J.; EKWALL, B.; GARLE, M.J.; LECHÓN, M.J.G.; GRIBALDO, L.; GULDEN, M.; LIEBSCH, M.; RASMUSSEN, E.; ROGUET, R.; SHRIVASTAVA, R.; WALUM, E. Acute Toxicity testing in vitro and the classification and labelling of chemicals, **ATLA**, v, 24, p, 499-510, 1996.

SELLSTRÖM, U.; JANSSON, B.; KIERKEGAARD, A.; de WIT, C.; ODSJÖ, T.; OLSSON, M. Polybrominated diphenyl ethers (PBDE) in biological samples from the Swedish environment, **Chemosphere** v. 26, p. 1703–1718, 1993.

SENTURK, E.; MANFREDI, J.J. (2013) p53 and cell cycle effects after DNA damage. In. p53 protocols. Ed.: Deb, S., Deb, S.P. 2nd Edition, Human Press, New York, 238p.

SHAO, Y.; GAO, Z.; MARKS, P.A.; JIANG, X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 18030–18035, 2004.

SHEN, H.; DING, G.; HAN, G.; WANG, X.; XU, X.; HAN, J.; LOU, X.; XU, C.; CAI, D. Distribution of PCDD\Fs, PCBs, PBDEs and organochorine residues in children's blood from Zheijiang, **Chemosphere**, v. 80, p. 170-175, 2010.

SHEN, S.; KEPP, O.; MICHAUD, M.; MARTINS, I.; MINOUX, H.; METIVIER, D.; MAIURI, M.C.; KROEMER, R.T.; KROEMER, G. Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study, **Oncogene** v. 30(45): p. 4544–4556, 2011.

SHIMIZU, S.; KANASEKI, T.; MIZUSHIMA, N.; MIZUTA, T.; ARAKAWA-KOBAYASHI, S.; THOMPSON, C.B.; TSUJIMOTO, Y. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. **Nature Cell Biology**, v. 6, p. 1221–1228, 2004.

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.

SKULACHEV, V.P. Mitochondria in programmed death phenomena: a principle of biology: “it is better to die than to be wrong”, **IUBMB Life**, v. 49, p. 365-373, 2000.

SIDDIQI, M.A.; et al,, Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs):New Pollutants–Old Diseases, **Clinical Medicine and Research**, v. 1,n. 4, p. 281-290, 2003.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, **Experimental Cell Research**, v. 175(1), n. 184-194, 1998.

SJÖDIN, A.; JONES, R.S.; FOCANT, J-F.; LAPEZA, C.R.; WANG, R.Y.; MCGAHEE, E.E.; et al,, Retrospective time-trend study of polybrominated diphenyl ether and polybrominated and polychlorinated biphenyl levels in human serum from the United States, **Environmental Health Perspectives**, v. 112, p. 655–658, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MUTAGÊNESE, CARCINOGÊNESE E TERATOGÊNESE AMBIENTAL (SBMCTA), São Paulo, 2004, UMBUZEIRO, GA,, VERGAS, V,M,F,, FELZENSZWALB, I,, HENRIQUES, J,A,P,, VARANDA, E, Orientações básicas de execução de teste de mutagenicidade para proteção da saúde humana e do meio ambiente, Teste de mutação reversa com Salmonella typhimurium (Teste de Ames, Ensaio Salmonella/microssoma), (Série de documentos, 1), Disponivel em: http://www,sbmcta,org,br, Acesso em 28/02/2016,

SOUZA, A.O.; PEREIRA, L.C.; OLIVEIRA, D.P.; DORTA, D.J. BDE-99 congener induces cell death by apoptosis of human hepatoblastoma cell line – HepG2. **Toxicology in vitro**, v. 27, p. 580-587, 2013.

SOUZA, A.O.; TASSO, M.L.; OLIVEIRA, A.M.; PEREIRA, L.C.; DUARTE, F.C.; OLIVEIRA, D.P.; PALMEIRA, C.M.; DORTA, D.J. Evaluation of Polybrominated Diphenyl Ether Toxicity on HepG2 Cells - Hexa-brominated Congener (BDE-154) is Less Toxic than Tetra-Brominated Congener (BDE-47), **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, doi: 10.1111/bcpt.12598.

STACHOWICZ, A.; SUSKI, M.; OLSZANECKI, R.; MADEJ, J.; OKON, K.; KORBUT, R. Proteomic analysis of liver mitochondria of apolipoprotein E Knockout mice treated with metformin, **J Proteomic** 2012; In Press.

STAPLETON, H.; et al., Metabolism of Polibrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) by Human Hepatocytes in Vitro, **Environmental Health Perspectives**, [S,I,], v. 117,n. 2, p. 197-202, 2009.

STETLER, R.A.; LEAK, R.K.; GAO Y.; CHEN, J. The dynamics of the mitochondrial organelle as a potential therapeutic target, **J Cereb Blood Flow Metab**; p. 1-11, 2012.

STOWE, D.F.E.; CAMARA, A.K. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function, **Antioxid Redox Signal** v. 11: p.1373-1414, 2009.

STRANDMAN, T.; KOISTINEN, J.; VARTIAINEN, T. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in placenta and human milk, **Organohalogen Compounds** v. 47: p. 61–64, 2000.

SØFTLAND, L.; PETERSEN, K.; STAVRUM, A-K.; WU, T.; OLSVIK, P.A. Hepatic in vitro toxicity assessment of PBDE congeners BDE47, BDE153 and BDE154 in Atlantic Salmon (Salmo salar L,) **Aquatic Toxicology**, v. 105, p. 246-263, 2011.

TAGLIAFERRI, S.; CAGLIERI, A.; GOLDONI, M.; PINELLI, S.; ALINOVI, R.; POLI, D. et al. Low concentrations of the brominated flame retardants BDE-47 and BDE-99 induce synergistic oxidative stress-mediated neurotoxicity in human neuroblastoma cells. **Toxicology in vitro,** v. 24, p. 116- 122, 2010.

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

TICE, R. et al., Single Cell/comet assay:guidelines for in vitro e in vivo genetic toxicology testing, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TRAYER, W.S.; RUBIN, E. Effects of Chronic Ethanol Intoxication on Oxidative Phosphorylation in Rat Liver Submitochondrial Particles, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 7717-7723, 1979.

TRILECOVÁ, L.; KRCKOVÁ, S.; MARVANOVÁ, S.; PENCIKOVÁ, K.; KRCMAR, P.; NECA, J.; HULINKOVÁ, P.; PÁLKOVÁ, L.; CIGANEK, M.; MILKOVÁ, A.; TOPINKA, J.; VONDRÁCEK, J.; MACHALA, M. Toxic Effects of Methylated Benzo[a]pyrenes in Rat Liver Stem-Like Cells, **Chemical Research in Toxicology,** v. 24, p. 866-876, 2011.

TROITZCH, J.H. International plastics flammability handbook: principles, regulations, testing and approval, 2nd ed,, Hanser Publishers: Munich, Germany, 1990.

UMBUZEIRO, G.A.; FREEMAN, H.; WARREN, S.H.; KUMMROW, F.; CLAXTON, L.D. Mutagenicity evaluation of the commercial product C,I, Disperse Blue 291 using different protocols of Salmonella assay, **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 49-56, 2005.

UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS, V.M.F. Teste de mutagenicidade com Salmonella typhimurium (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos, In: Mutagênese Ambiental, Eds, Lucia Regina Ribeiro, Daysi Maria Fávero Salvadori & Edmundo Kanan Marques, Editora da ULBRA, capítulo 4, p, 81 – 112, 2003.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, USEPA, Furniture flame retardancy partnership: Environmental profiles of chemical flame-retardant alternatives for low-density polyurethane foam, Rep, n,742-R-05-002A, USEPA, Washington, D.C., 2005.

VAN DEN HOF, W.F.P.M.; COONEN, M.L.J.; HERWIJNEN, M.V.; BRAUERS K.; WODZIG, W.K.W.H.; Van DELFT, J.H.M.; KLEINJANS, J.C.S. Classification of Hepatotoxicants Using HepG2 Cells: A Proof of Principle Study, **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, p. 433-442, 2014.

VALVERDE, M.; ROJAS, E. The Comet Assay in Human Biomonitoring, In: The Comet Assay in Toxicology, RSC Publishing, Cambridge, UK, 461 p, 2009.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELLINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotics cells using fluorescein labelled annexin V, **Journal of Immunological Methods**, v. 184, p. 39-51, 1995.

VINOD, V.; PADMAKRISHNAN, C.J.; VIJAYAN, B.; GOPADA, S. “How can I halt thee?” The puzzles involved in autophagic inhibition. **Pharmacological Research**, v. 82, p. 1-8, 2014.

WALLACE, D.C.; BROWN, M.D.; LOTT, M.T. Mitochondrial Genetics. In: Rimoin DL, Cormor JM, Pybriz RE. Emery and Rimoin’s Practice of Medical Genetics. Vol I. 3a ed. Churchill Livingstone. New York, 1997 pp: 277-299.

WALMSLEY, R.M.; BILLINTON, N. How accurate is in vitro prediction of carcinogenicity? **British Journal of Pharmacology**, v. 162: p. 1250–1258, 2011.

WANG, X.; The expanding role of mitochondria in apoptosis, Genes Dev, New York, v. 15, p, 2922-2933, 2001.

WANG, J.Y.J. Nucleo-cytoplasmatic communication in apoptotic response to genotoxic and inflammatory stress. **Cell Research**, v. 15, p. 43-48, 2005.

WANG, L.; ZOU, W.; ZHONG, Y.; AN, J.; ZHANG, X.; WU, M. et al., The hormesis effect of BDE-47 in HepG2 cells and the potential molecular mechanism. **Toxicology Letters**, v. 209, p. 193-201, 2012.

WALLACE, K.B.; STARKOV, A.A. Mitochondrial targets of drug toxicity, **Annu Rev Pharmacol Toxicol,** v. 40, p. 353–388, 2000.

WALLACE, D.C.; BROWN, M.D.; LOTT, M.T. Mitochondrial Genetics. In: Rimoin DL, Cormor JM, Pybriz RE. Emery and Rimoin’s Practice of Medical Genetics. Vol I. 3a ed. Churchill Livingstone. New York, 1997 pp: 277-299.

WESSELBORG S, STORK B, Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks, Cell. Mol. Life, Sci. v. 72, p. 4721-4757, 2015.

WIENCH, B.; EICHHORN, T.; PAULSEN, M.; EFFERTH, T. Shikonin directly targets mitochondria and causes mitochondria dysfunction in cancer cell. **Evid Base Complement Alternat Med**. 2012. Doi: 10.1155/2012/7260025.

WEISBURGER, J.H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now, **Mutation Research**, v. 437, p. 105-112, 1999.

WILKENING, S.; STAHL, F.; BADER, A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties, **Drug Metab Dispos** v. 31: p. 1035–1042, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Tetrabromobisphenol A and Derivatives; Environmental Health Criteria 172; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Flame retardants: A general Introduction; Environmental Health Criteria 192; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1997.

WOLTER, K.G.; HSU, Y.T.; SMITH, C.L.; NECHUSHTAN, A.; XI, X.G.; YOULE, R.J. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis, **J Cell Biol** v. 139, p. 1281-1292, 1997.

WU, J.; et al, Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B – two novel markers of autophagosome, **Biochem Biophys Res Commun**, v. 339 (1), p. 437-442, 2006.

YAMAMOTO, A.; TAGAWA, Y.; YOSHIMORI, T.; MORIYAMA, Y.; MASAKI R.; TASHIRO Y. Bafilomycin a1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusionbetween autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, h-4-ii-ecells. **Cell Structure and Function**, v. 23, p. 33–42, 1998.

YANG, H.; CHEN, C.; CHANG, W.; LU, F.; LAI, Y.; CHEN, C.; HSEU, T.; KUO, C.; HSEU, Y. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by Antrodia camphorate. **Cancer Lett.,** v. 231, p. 215-227, 2006.

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

YAN, S.; et al,, Emerging Contaminants of Environmental Concern: Source, Transport, Fate and Treatment, Practice Periodical of Hazardous, toxic and radioactive waste management, doi: 10,1061/_ASCE_HZ,1944-8376,0000015.

YOULE, RJ.; Van Der BLIEK AM. Mitochondrial Fission, Fusion and Stress. **Science**, v. 337, p. 1062 – 1066, 2012.

ZHANG, F.; HU, W.; YU, H.; SUN, H.; SHEN, O.; WANG, X.; LIU, H.; LAM, M.H.; GIESY, J.P.; ZHANG, X. Endocrine disruption effects of 2,2',4,4',6-pentabromodiphenylether (BDE100) in reporter gene assays, **Journal Environmental Monitoring**, v. 13, p. 850-854, 2011.

ZHANG, S.; KUANG, G.; ZHAO, G.; WU, X.; ZHANG, C.; LEI R.; et al. Involvement of the mitochondrial p53 pathway in PBDE-47-induced SH-SY5Y cells apoptosis and its underlying activation mechanism, **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 699-706, 2013.

ZHANG, J. Autophagy and mitophagy in cellular damage control, **Redox Biology**, v. 1, p. 19-23, 2013.

ZHANG, M.; HE, W.M.; HE, P.; XIA, T.; CHEN, X.M.; WANG, A.G. Effects of PBDE-47 on oxidative stress and apoptosis in SH-SY5Y cells. (2007).

ZHANG, C.; DUNJIN, C.; XIANBAO, L.; LILI, D. Role of brominated diphenyl ether-209 in the proliferation and apoptosis of rat cultured neural stem cells in vitro. **Molecular and Cellular Toxicology**, v. 12, p. 45 – 52, 2016.

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

ZHAO, Y.; XUE, T.; YANG, X.; ZHU, H.; DING, X.; LOU, L.; LU, W.; YANG, B.; HE, Q. Autophagy plays an important role in sunitinib-mediated cell death in H9c2 cardiac muscle cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 248, p. 20–27, 2010.

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

ZHOU, T.; ROSS, D.G.; DEVITO, M.J.; CROFTON, K.M. Effects of short-term in vivo exposure to polybrominated a ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats, **Toxicology Science**, v. 61, p. 76-82, 2001.

ZHU, J.; WANG, KZQ.; CHU, C.T. After the banquet: Mitochondrial biogenesis, mitophagy and cell survival, **Autophagy**, v. 9, p. 1663-1676, 2013.

ZICK, M.; RABL, R.; REICHERT, A.S. Cristae formationlinking ultrastructure and function of mitochondria, **Biochim, Biophys, Acta** v. 1793: p. 5 – 19, 2009.

ZOU, H.; LI, Y.; LIU, X.; WANG, X. An Apaf-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9, **J, Biol Chem** v. 274, p. 11549-11556, 1999.

8 - ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação dos congêneres BDE-100 e BDE-153 de éteres difenílicos polibromados sobre a linhagem celular HepG2 e linfócitos humanos: efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos

Pesquisador: Lilian Cristina Pereira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38843414.0.0000.5403

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 974.763

Data da Relatoria: 20/03/2015

Apresentação do Projeto:

Ok

Objetivo da Pesquisa:

Ok

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ok

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ok

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ok

Recomendações:

Ok

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram atendidas.

Endereço: Avenida do café s/n°
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-903
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fcfrp.usp.br

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado "ad referendum" do CEP/FCFRP em 05/03/2015. Em atendimento às Resoluções vigentes, deverá ser encaminhado ao CEP, através da Plataforma Brasil, o relatório final da pesquisa conforme modelo de Relatório aprovado pelo Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção da mesma. Informamos que, de acordo com a Resolução 466/12, item IV.5, letra d, o TCLE deve "ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha". Sugerimos que o TCLE seja apresentado ao sujeito da pesquisa em documento impresso frente e verso.

RIBEIRAO PRETO, 05 de Março de 2015

Assinado por:
Cleni Mara Marzocchi Machado
(Coordenador)

Endereço: Avenida do café s/n°
Bairro: Monte Alegre **CEP:** 14.040-903
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fcfrp.usp.br