

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da toxicidade dos congêneres BDE-47 e BDE-99 de éter de bifenilas polibromadas (PBDEs) utilizando ensaios mitocondriais**

**Murilo Pazin Silva**

**Ribeirão Preto  
2013**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da toxicidade dos congêneres BDE-47 e BDE-99 de éter de bifenilas polibromadas (PBDEs) utilizando ensaios mitocondriais**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

**Orientado:** Murilo Pazin Silva

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

**Ribeirão Preto**  
**2013**

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.

Pazin-Silva, Murilo.

Avaliação da toxicidade dos congêneres BDE-47 e BDE-99 de éter de bifenilas polibromadas (PBDEs) utilizando ensaios mitocondriais. Ribeirão Preto, 2013. 62p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Dorta, Daniel Junqueira

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

Foto da Capa: Foto da Capa de autoria de Murilo Pazin

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Murilo Pazin Silva

Avaliação da toxicidade dos congêneres BDE-47 e BDE-99 de éter de bifenilas polibromadas (PBDEs) utilizando ensaios mitocondriais

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*“Ame a todos. Confie em poucos. Não faça mal a ninguém.”*

William Shakespeare

## DEDICATÓRIA

### À Deus

Por sempre estar presente na minha vida, ajudando e iluminando meu caminho.  
Protegendo de todos os males e guiando nas tomadas de decisões.

### À minha Família

Dedico este trabalho à minha mãe (Silvana) e minha vó (Dona Dita) que sempre me apoiaram incondicionalmente em todas as fases da minha vida. Seus ensinamentos de honra, ética, honestidade e perseverança regem meu viver.

### À minha noiva

Dedico também este trabalho à minha noiva Heloísa. Meus dias sem você seriam imensamente tristes e monótonos. Obrigado por me apoiar em todos os momentos, pelo seu amor, paciência, compreensão, companheirismo e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta por confiar e acreditar no meu potencial, além de fornecer oportunidade ímpares que foram de suma importância para o desenvolvimento do meu conhecimento científico.

Agradeço imensamente a colaboração de meus colegas de laboratório Cezar Pestana, Bruno Teodoro, Flávia Baraldi, Valéria Uyemura, Ingrid Pontes, Mariana Bernardes, Maria Julia Tasso, Alecsandra de Oliveira, Elisa Baldo, Gabriela Meireles, Adolfo Santos, Luiz Rodrigues, Bruno Lemos, Nilson Ferreira Júnior e Bruno Rocha, por seus ensinamentos fundamentais para execução deste trabalho e pela ótima recepção que me deram.

Meu muito obrigado a Lilian Pereira e Tatiane Andreo, companheiras de pesquisa com os PBDEs e pelas horas de convivência agradável.

Tenho um grande agradecimento para fazer aos 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 e auxílios para realização de tal pesquisa. Agradeço também as várias contribuições de Klaus Accoroni técnico do Laboratório de Toxicologia Ambiental. E também, a secretária da Pós-Graduação Rosemary Ioshimine Gerolineto pela atenção e presteza.

Faço aqui um agradecimento especial aos professores Dr. Carlos Curti e Profa. Dra. Luciane Carla Alberice pela notável colaboração com o projeto, cedendo seus laboratórios de Bioquímica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, onde foram realizadas muitas as etapas deste trabalho.

É com enorme satisfação que agradeço a contribuição significativa dos Professores: Augusto Cesar Cropanese Spadaro, Sérgio Akira Uyemura, Carem Gledes Vargas Rechia, Danielle Palma de Oliveira e Yara Maria Lucisano Valim pela colaboração na execução deste trabalho e na minha formação como profissional.

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.2012/04542-0).

Por último e não menos importante, agradeço aos ratos que cederam suas vidas para realização deste trabalho.

## RESUMO

PAZIN-SILVA, M. **Avaliação da toxicidade dos congêneres BDE-47 e BDE-99 de éter de bifenilas polibromadas (PBDEs) utilizando ensaios mitocondriais.** 62f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Os éteres de bifenilas polibromados (PBDEs) são largamente usados como retardadores de chama e têm sido detectados no sangue humano, tecido adiposo e leite materno devido às suas propriedades físico-químicas e bioacumuladoras e à sua elevada persistência no meio ambiente. Muitos estudos têm relatado toxicidade hepática relacionada à exposição aos PBDEs. Como efeitos citotóxicos são frequentemente associados à disfunção mitocondrial, no presente estudo, investigamos a toxicidade do BDE-47 em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Nos seguintes parâmetros: potencial de membrana mitocondrial, consumo de oxigênio, interação com a membrana mitocondrial, liberação de cálcio, inchamento mitocondrial e os níveis de ATP da suspensão mitocondrial com a finalidade de observar a capacidade do composto em interferir com a bioenergética da organela. Avaliou-se ainda a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), dos níveis de GSH/GSSG, níveis mitocondriais de grupos sulfidríla de proteínas e níveis mitocondriais de NAD(P)H com o intuito de analisar o estado redox mitocondrial. Os congêneres BDE-47 e BDE-99 foram avaliados em concentrações que variaram entre 0,1 e 50  $\mu\text{mol/L}$ . Os dois congêneres de PBDEs apresentaram toxicidade mitocondrial afetando todos os parâmetros que avaliam a bioenergética mitocondrial culminando em uma depleção do ATP. Por outro lado, nos ensaios de avaliação do estresse oxidativo os PBDEs estudados não demonstraram qualquer efeito, no entanto, afetaram a cadeia respiratória mitocondrial, o que normalmente reflete em um acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Estes resultados são explicados pelo mecanismo de ação destes compostos como retardante de chama, pois durante a combustão os retardantes de chama bromados realizam a neutralização de radicais livres ( $\text{OH}^\bullet$  e  $\text{H}^\bullet$ ). Conclui-se assim que os PBDEs podem levar à disfunção bioenergética e assim induzir a morte celular pela diminuição do ATP. Observou-se ainda que BDE-47 apresentou maior toxicidade do que o BDE-99 sobre os parâmetros estudados.

Palavras-chave: Éter de bifenilas polibromadas, Bioenergética, Mitocôndrias.

## ABSTRACT

PAZIN-SILVA, M. **Evaluation of the toxicity of BDE-47 and BDE-99 congeners of polybrominated biphenyl ether (PBDE) using mitochondrial assays.** 62f Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Polybrominated biphenyls ethers (PBDE) , widely used as flame retardants, have been detected in human blood, adipose tissue and breast milk due to their physicochemical and high bioaccumulative properties and environmental persistence. Many studies have reported liver toxicity related to exposure to PBDEs. As cytotoxic effects are often associated with mitochondrial dysfunction, in the present study, we investigated the toxicity of the BDE-47 and BDE-99 on isolated rat liver mitochondria. Assessing mitochondrial membrane potential, oxygen consumption, interaction with the mitochondrial membrane, calcium release, mitochondrial swelling and ATP levels of the mitochondrial suspension in order to observe the ability of the compounds to interfere with the bioenergetic organelle, and the formation of reactive oxygen species (ROS), GSH/GSSG levels, mitochondrial sulfhydryl groups and levels of mitochondrial NAD(P)H in order to analyze mitochondrial redox state. The congeners BDE-47 and BDE -99 were evaluated at concentrations ranging between 0.1 and 50  $\mu\text{mol/L}$ . Both PBDEs congeners showed mitochondrial toxicity affecting all parameters that assess mitochondrial bioenergetics and culminating with ATP depletion. On the other hand, no effect was observed in tests assessing oxidative stress, although they were able to inhibit the mitochondrial respiratory chain, which is usually reflected in an accumulation of reactive oxygen species. These results are explained by the mechanism of action of this compounds as flame retardants, because during the combustion brominated flame retardants perform the neutralization of free radicals ( $\text{OH}^{\bullet}$  and  $\text{H}^{\bullet}$ ). It follows that PBDEs can lead to mitochondrial dysfunction and thus induce bioenergetic cell death. It was also observed that The BDE-47 showed higher toxicity than BDE-99 in the studied model.

Keywords: Polybrominated biphenyls ethers, Bioenergetics, Mitochondria.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estrutura química geral dos PBDEs.....	3
<b>Figura 2.</b>	Mecanismo de ação dos retardantes de chama .....	4
<b>Figura 3.</b>	Figura representativa de uma mitocôndria e da cadeia respiratória ..	8
<b>Figura 4.</b>	Esquema da Reação de Fenton e Haber-Weiss.....	10
<b>Figura 5.</b>	Interação dos BDE-47 e BDE-99 com a membrana mitocondrial interna.....	24
<b>Figura 6.</b>	Gráficos obtidos no teste de respiração mitocondrial sob influência das concentrações do BDE-47 .....	26
<b>Figura 7.</b>	Gráficos obtidos no teste de respiração mitocondrial sob influência das concentrações do BDE-99 .....	27
<b>Figura 8.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre a dissipação do potencial de membrana mitocondrial .....	30
<b>Figura 9.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-99 sobre a dissipação do potencial de membrana mitocondrial .....	31
<b>Figura 10.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre o inchamento mitocondrial.....	32
<b>Figura 11.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-99 sobre o inchamento mitocondrial.....	33
<b>Figura 12.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre o efluxo de cálcio ...	34
<b>Figura 13.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-99 sobre o efluxo de cálcio ...	34
<b>Figura 14.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre os níveis de ATP ....	35
<b>Figura 15.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-99 sobre os níveis de ATP ....	36
<b>Figura 16.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre a formação de radicais livres .....	37
<b>Figura 17.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-99 sobre a formação de radicais livres .....	38
<b>Figura 18.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre os níveis de proteínas SH .....	39
<b>Figura 19.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-99 sobre os níveis de proteínas SH .....	39

<b>Figura 20.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre a razão GSH/GSSG.....	40
<b>Figura 21.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-99 sobre a razão GSH/GSSG.....	41
<b>Figura 22.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre os níveis de NAD(P)H.....	42
<b>Figura 23.</b>	Efeito concentração-resposta do BDE-99 sobre os níveis de NAD(P)H.....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	BDE-47 – Efeito sobre a razão de controle respiratório (RCR) .....	28
<b>Tabela 2.</b>	BDE-99 – Efeito sobre a razão de controle respiratório (RCR) .....	28
<b>Tabela 3.</b>	BDE-47 – Efeito sobre a razão ADP/O.....	28
<b>Tabela 4.</b>	BDE-99 – Efeito sobre a razão ADP/O.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosine5' Difosfato
ADP/O	Razão de ADP por molécula de Oxigênio
ANS	1-anilino-8-naftaleno sulfonato sal
ANT	Translocador de nucleotídeo de adenina
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BDE-47	2,2', 4,4'-tetra-bromo difenil éter
BDE-99	2,2', 4,4',5-penta-bromo difenil éter
BDE-100	2,2', 4,4',6- penta-bromo difenil éter
CCCP	Cianeto de Carbonila Cloro Fenilhidrazona
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CsA	Ciclosporina A
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
CypD	Ciclofilina D
Da	Daltons
DNA	Ácido Desoxiribonucleíco
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DTNB	5,5'- ditiobis ácido (2-nitrobenzóico)
EGTA	Ácido Etilenoglicol bis ( $\beta$ -aminoetil éter)-N,N,N',N'- tetraacético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona Oxidada
H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazinil-(1)]-etanossulfônico
mtDNA	Ácido Desoxiribonucleíco Mitocondrial
mV	Milivolts
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato) (forma reduzida)
NEM	N-etilmaleimida

nm	nanômetros
OH <sup>•</sup>	Radical Hidroxil
OPT	o-ftalaldeído
PBBs	Bifenilas polibromadas
PBDDs	Polibromados dibenzo-p-dioxins
PBDEs	Éteres Difenílicos Polibromados
PTP	Poros de transição de permeabilidade
PCA	Ácido Perclórico
PCBs	Bifenilas Policloradas
PM	Peso Molecular
PMM	Permeabilidade da Membrana Mitocondrial
RCR	Razão de Controle Respiratório
RCBs	Retardantes de Chama Bromados
RR	Vermelho de Rutênio (Ruthenium Red)
T-BOOH	terc-butilhidroperóxido
TBBPA	Tetrabromo bisfenol A
TMA-DPH	1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenilhexa-1,3,5 trieno
TPM	Transição de Permeabilidade Mitocondrial
USP	Universidade de São Paulo
VDAC	Canal de ânion dependente de voltagem

## SUMÁRIO

Resumo	I
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas	vi
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Contaminantes Emergentes	1
1.2 Retardantes de Chama	2
1.3 Bifenilas Polibromadas (PBDEs)	3
1.4 Toxicidade dos PBDEs	4
1.5 Importância dos ensaios com Mitocôndria em Análises Toxicológicas	6
1.5.1 Estrutura e função mitocondrial	6
1.5.2 Ação de xenobióticos sobre a mitocôndria	9
1.5.3 Formação de poro de transição de permeabilidade	10
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>14</b>
3.1 Reagentes	14
3.2 Animais Experimentais	15
3.2.1 Decapitação sem anestesia	15
3.3 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato e dosagem de proteína	16
3.4 Interação com a Membrana mitocondrial interna	17
3.5 Respiração mitocondrial	17
3.6 Potencial de membrana mitocondrial	18

3.7	Inchamento mitocondrial .....	19
3.8	Efluxo de $\text{Ca}^{2+}$ .....	19
3.9	Níveis mitocondriais de ATP .....	20
3.10	Produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....	20
3.11	Níveis mitocondriais de grupos sulfidril de proteínas .....	21
3.12	Níveis mitocondriais de GSH/GSSG .....	22
3.13	Níveis mitocondriais de NAD(P)H .....	22
3.14	Análise estatística .....	23
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
4.1	Interação com a Membrana mitocondrial interna .....	24
4.2	Respiração mitocondrial .....	25
4.3	Potencial de membrana mitocondrial .....	29
4.4	Inchamento mitocondrial .....	31
4.5	Efluxo de $\text{Ca}^{2+}$ .....	33
4.6	Níveis mitocondriais de ATP .....	35
4.7	Produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....	36
4.8	Níveis mitocondriais de grupos sulfidril de proteínas .....	38
4.9	Níveis mitocondriais de GSH/GSSG .....	40
4.10	Níveis mitocondriais de NAD(P)H .....	41
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Contaminantes emergentes

No mundo todo existem cerca de onze milhões de substâncias químicas, das quais aproximadamente três mil são produzidas em larga escala e poucas, aproximadamente 50, são regulamentadas pelos parâmetros de potabilidade da água na maioria dos países, incluindo o Brasil (NETO, 2010).

Atualmente, os estudos de Toxicologia Ambiental têm voltado sua atenção para compostos originados em processos antropogênicos. Dentre estes, encontramos alguns que são atualmente classificados como “contaminantes emergentes”, sendo estes compostos de amplo espectro, originados de diferentes tipos de produtos químicos (sintético ou natural). Entre os contaminantes emergentes, destacam-se os retardantes de chama, produtos farmacêuticos, plastificantes, agentes tensoativos, certos praguicidas, entre outros que não eram conhecidos ou não reconhecidos como contaminantes ambientais, sendo seus efeitos ao meio ambiente e ao homem relativamente desconhecidos (MATAMOROS et al., 2012).

Os níveis dessas substâncias têm aumentado em diversos compartimentos ambientais devido a atividades industriais, efluentes residenciais e das estações de tratamento de água e esgoto (FONTENELE et al., 2009). Portanto, uma monitorização destes compostos no ambiente se faz necessária, particularmente na água, devido a grande extensão de ação e deslocamento destes compostos, adicionalmente às preocupações ecotoxicológicas (RODIL et al., 2012). Para tal, as agências de vigilância ambiental dispõem de altos valores e muito esforço para monitorar xenobióticos presentes em águas superficiais, sedimentos, animais aquáticos e ecossistema terrestre (DIAMOND et al., 2011). Entretanto, existe uma carência de dados toxicológicos, principalmente relacionados aos efeitos nocivos aos organismos, aos biomarcadores de exposição e potenciais danos ao ambiente (DIAMOND et al., 2011).

Dentre estes contaminantes, os *retardantes de chama polibromados* (PBDEs – Polybrominated Flame Retardants) merecem uma atenção especial por possuírem uma alta resistência no meio ambiente e assim serem considerados como poluentes orgânicos persistentes (POPs) (SHE et al., 2013). Estes compostos possuem

características físicas, químicas e bioacumulativas semelhantes às amplamente estudadas Bifenilas Policloradas (PCBs) e se assemelham também com relação à capacidade de difusão no ambiente e em tecidos humanos (SIDDIQI et al., 2003; PENA-ABAURREA et al., 2013). Os PCBs foram descobertos há mais de 100 anos e diversos trabalhos também relatam sua capacidade de causar hepatotoxicidade, neurotoxicidade, imunotoxicidade e alterações endócrinas assim como os PBDEs (ZHU et al., 2009; HORTON et al., 2013).

## 1.2 Retardantes de chama

A utilização dos retardantes de chama serve como medida de segurança na prevenção de incêndios. Estes são utilizados em indústrias de eletroeletrônicos, têxtil, automobilística e construção civil, sendo empregados em materiais como madeira, plásticos, papéis, utensílios de cozinha, dentre outros. (CHEVRIER et al., 2010; ANGIONI et al., 2013).

Sem estes retardantes de chama os bens de consumo se queimam com muita facilidade e rapidamente, o que leva a possíveis danos materiais e à saúde. Assim, durante ou após o processo de fabricação destes bens de consumo os retardantes de chama são adicionados 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 (PESTANA et al., 2008).

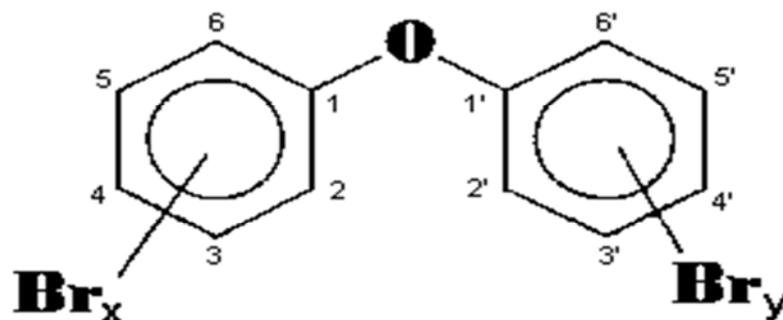
Atualmente existem mais de 175 substâncias químicas classificadas como retardantes de chama, dos quais os maiores grupos são os halogenados (bromados e clorados), seguidos de outros como: derivados de fósforo, de nitrogênio, melaminas e cargas inorgânicas (RAVICHANDRAN et al., 2011).

Nas últimas décadas houve um grande aumento na demanda de retardantes de chama, observando-se um aumento de mais de 600% entre os anos 2000 e 2011, passando de 310.000 toneladas/ano para 2 milhões toneladas/ano (BSEF, 2000; FROL, 2013). Neste último levantamento, os retardantes de chama bromados constituíam cerca de 20% dentre todos utilizados no mundo (FROL, 2013). O consumo dos retardantes de chama bromados (RCBs) varia de acordo com a região na qual são utilizados, esta variação deve-se principalmente à legislação nacional e às preferências dos produtores, sendo a indústria de aparelhos eletro-eletrônicos um

dos campos mais importantes de consumo e demanda destes compostos (WATANABE, 2003).

### 1.3 Retardantes de chama polibromados

Os retardantes de chama polibromados podem ser divididos em grupos, dos quais os mais utilizados são: bifenilas polibromadas (PBBs, do inglês polybrominated biphenyl), os éteres de bifenilas polibromadas (PBDEs, do inglês polybrominated diphenyl ether), dibenzo-p-dioxinas polibromadas (PBDDs, do inglês polybrominated dibenzo-p-dioxins) entre outros. Os PBDEs (Figura 1) são os mais empregados devido a sua alta eficiência contra a propagação da chama e o baixo custo (PESTANA et al., 2008).

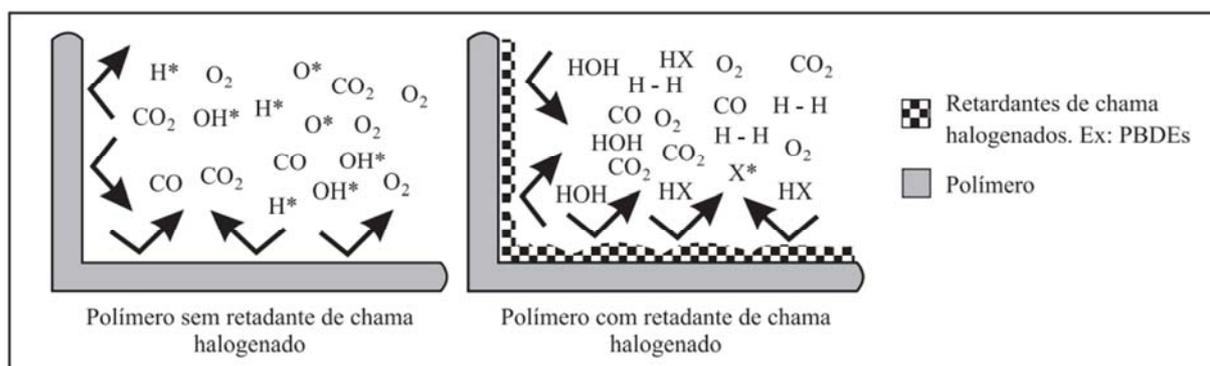


**Figura 1.** Estrutura química geral dos PBDEs ( $x + y = 1$  a 10 átomos de bromo)  
Fonte: INCHEM.

Dentre os PBDEs, os congêneres de baixo peso molecular (tri a hexa-BDE) são considerados os mais importantes do ponto de vista toxicológico, pois são absorvidos quase totalmente, lentamente excretados e apresentam alto potencial de bioacumulação (RICHARDSON; TERNES, 2005). Isto ocorre principalmente devido à baixa pressão de vapor e elevado coeficiente de partição octanol/água ( $\log K_{ow}$ ), (BRAEKEVELT; TITTEMIER; TOMY, 2003).

A resistência à chama está diretamente associada ao processo de combustão composto por pré-aquecimento, pirólise ou decomposição/volatilização, ignição e extinção (SACKS; LOHMANN, 2012). Os mecanismos de ação dos retardantes de chama se baseiam em princípios físicos (resfriamento ou diluição) ou químicos (neutralização de radicais, remoção por decomposição do polímero ou proteção

devido à carbonização). Estes mecanismos consistem essencialmente na neutralização dos radicais livres ( $\text{OH}^\bullet$  e  $\text{H}^\bullet$ ) produzidos durante o processo de combustão, formados durante a ignição e responsáveis pela propagação da chama (Figura 2) (PESTANA et al., 2008).



**Figura 2.** Mecanismo dos retardantes de chama halogenados na combustão  
Fonte: PESTANA et al., 2008.

#### 1.4 Toxicidade dos PBDEs

O contato do ser humano e do meio ambiente com os retardantes de chama pode ocorrer em diversas situações, como: na fabricação destes, na incorporação a produtos, durante o tempo de uso do produto contendo estas substâncias e também com efluentes contaminados pelo descarte inadequado (DANISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1999; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2005).

Diversos autores têm relatado o potencial tóxico dos PBDEs. Entre seus principais efeitos estão a hepatotoxicidade (NASH; SZABO; CAREY, 2013), alterações imunológicas (FAIR et al., 2012), neurotoxicidade (SLOTKIN et al., 2013) e ações endócrinas (YU et al., 2011). Contudo, os mecanismos de ação tóxica ainda não foram bem elucidados, porém sabe-se que os compostos são resistentes a ácidos, bases, luz, calor, redução e oxidação (COSTA, 2006), com exceção do congênere BDE-209 (decabromado) que pode sofrer fotólise e formar compostos com menor número de bromos em sua estrutura (TALNESS et al., 2008). Portanto, em relação ao meio ambiente pode-se afirmar que são extremamente persistentes.

Ainda é importante ressaltar que Talness (2008) relatou que o deca-BDE poderia gerar outros congêneres por metabolismo ativo ou biotransformação, além da fotólise, com menos átomos de bromo em suas estruturas, como tetra-BDE e penta-BDE.

Koenig e colaboradores (2012) confirmaram em seu trabalho que a exposição perinatal ao BDE-47 pode ter consequências no neurodesenvolvimento e que a exposição lactacional representa um risco de exposição significativa durante o desenvolvimento de ratos. No mesmo sentido, Chen e colaboradores (2012) ao testarem o BDE-47 em *zebra-fish*, mostram que os padrões de conectividade neuronal foram alterados e isto pode contribuir para os déficits comportamentais motores.

Sjödin e colaboradores (1999) verificaram que trabalhadores suecos que atuavam desmontando manualmente equipamentos eletrônicos em jornada de trabalho de 8 horas/dia apresentaram concentrações 70 vezes maiores do congêneres BDE-183 quando comparados ao grupo controle. Outro estudo mais recente, quantificou BDE-47 em amostras de sangue de trabalhadores chineses em uma indústria de equipamentos eletrônicos e foi detectada uma presença maior deste composto em homens inférteis, relacionando este composto com esterilização (WANG et al. 2012).

Adicionalmente, um estudo realizado entre 2002 e 2003 com 157 mulheres australianas investigou a presença de PBDEs no leite materno. Em todas as amostras estudadas foram encontrados diferentes congêneres, principalmente BDEs -47, -99, -100, -153, -154 e -183 (TOMS et al., 2007). Um estudo similar avaliou o leite materno humano, verificando níveis elevados de todos os congêneres estudados (DANIELS et al., 2010).

Esses compostos são recalcitrantes no meio ambiente devido a sua alta lipofilicidade, podendo ser encontrados em diversos compartimentos ambientais, além dos vários fluidos biológicos humanos, como sangue e leite, já relatados anteriormente. A detecção destes compostos tem sido feita mesmo em locais remotos, como camadas polares, onde o lançamento não é esperado, demonstrando grande potencial de transporte (PESTANA et al., 2008; BIRNBAUM et al., 2003). Ikonomou e colaboradores (2002) constataram que se for mantida a taxa de bioacumulação de PBDEs em animais das regiões árticas, em 2050 os níveis dos retardantes de chama já será maior que o de PCBs. De acordo com este estudo, os

níveis de PBDEs aumentaram exponencialmente entre 1981 a 2000 na região ártica do Canadá.

Vários compartimentos ambientais sofrem com a ação dos PBDEs, conforme relatado por Hites (2004) em sua revisão sistemática de estudos existentes na época, na qual mostrou elevadas concentrações de PBDEs nos compartimentos ambientais e em amostras biológicas de humanos e animais. Foram relatadas concentrações de até 193 ng/g de lipídios em leites de lactantes americanas, além de 7500 ng/g em ovos de gaivota da região dos grandes lagos (EUA) e 67000 ng/g em ar de ambientes ocupacionais na Suécia.

Estudos mostraram que o PBDE-99 é capaz de induzir morte celular por apoptose, aumentando a concentração de radicais livres intracelular (SOUZA et al., 2013). Já o BDE- 47 demonstrou em outro estudo, também a capacidade de elevar a produção de radicais livres nas células, indicando a possibilidade de que a mitocôndria seja o principal alvo de toxicidade celular, levando a um aumento na produção destes radicais no interior da célula e indução de morte celular (HU et al., 2009).

## **1.5 Bioensaio mitocondrial em análises toxicológicas**

### **1.5.1 Estrutura e função mitocondrial**

A mitocôndria é a principal organela produtora de energia celular e possui papel fundamental na manutenção de diversas funções celulares. A maior parte das células eucarióticas possui mitocôndria e a quantidade destas pode variar de acordo com o tipo celular e necessidade de energia que o tecido nos quais se encontram requerem. Mesmo havendo variabilidade morfológica pode-se atribuir uma morfologia básica às mesmas, caracterizada por possuir um formato ovalado, comprimento de aproximadamente 0,5µm e 1µm de diâmetro, além de um sistema duplo de membranas, externa (MME) e interna (MMI), separadas pelo espaço intermembranar, sendo que a membrana interna delimita uma matriz amorfa rica em proteínas na qual está presente DNA mitocondrial (mtDNA) (OTERA; ISHIHARA; MIHARA, 2013).

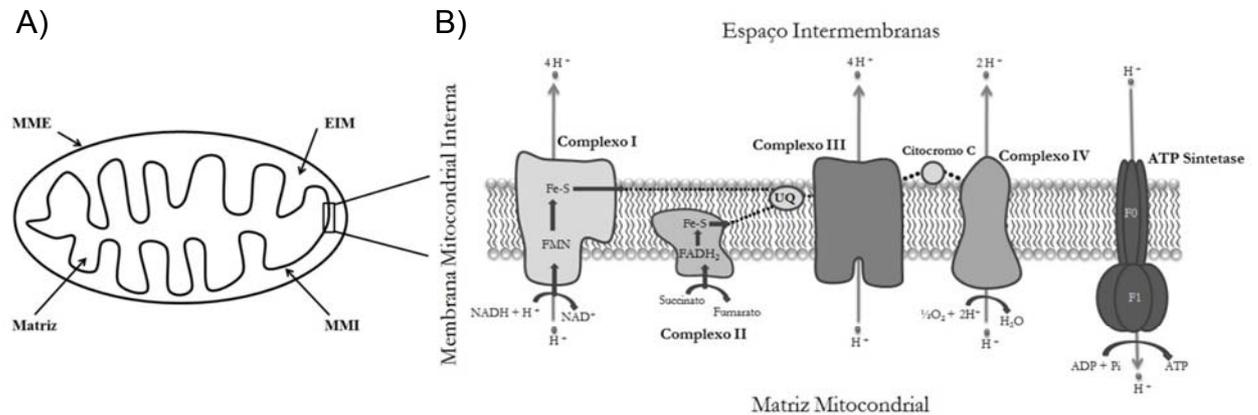
A membrana mitocondrial externa é lisa, possui tamanho de área superficial fixa e contém em altas quantidades uma proteína transportadora chamada porina, a qual forma canais e torna a MME permeável às moléculas com tamanho menores que 5 kDa, cuja principal função é fazer a comunicação entre as mitocôndrias e a rede metabólica celular (STOWE; CAMARA, 2009). Além das porinas, existem outras proteínas presentes na MME, as quais realizam funções essenciais à mitocôndria, como síntese de lipídeos ou conversão de substratos lipídicos para o metabolismo (PORTER et al., 2011).

Diferentemente da membrana externa, a membrana interna apresenta várias invaginações, as quais são características por sua forma de cristas ou túbulos que contribuem para aumentar superfície de contato (DING et al., 2012). As cristas podem variar em quantidade e morfologia de acordo com demanda energética da organela (ZICK; RABL; REICHERT, 2009) e, ainda que as cristas sejam predominantes, existem formações tubulares como ocorre nas mitocôndrias de células que sintetizam esteroides (ALBERTS et al., 1997).

A permeabilidade da MMI também é diferente da presente na MME, pois a primeira é impermeável a quase todos os íons e moléculas polares e possui elevada quantidade de proteínas, sendo que muitas destas proteínas permitem o transporte de metabólitos selecionados (NICHOLLS; FERGUSON, 1982; STOWE; CAMARA, 2009). A permeabilidade diferenciada desta membrana é mediada e regulada por proteínas, as quais são associadas com as três principais funções da membrana interna, são elas: proteínas da cadeia respiratória, que transferem elétrons; proteínas do complexo enzimático denominado ATP-sintase, responsável por produzir ATP; e proteínas transportadoras específicas que regulam a passagem de metabólitos por essa membrana (LIMA; DUARTE; SÁ, 2010).

Como já citado, a mitocôndria é a principal produtora de energia celular, a qual encontra-se na forma de adenosina 5'-trifosfato, mais conhecido como ATP. Este composto é essencial em diversas funções celulares e sua síntese é realizada pela ATP-sintase acoplada à cadeia respiratória mitocondrial (Figura 3) (PEREIRA et al., 2012).

No espaço intermembranas, compreendido entre as duas membranas, há diferentes enzimas que utilizam o ATP gerado para fosforilar nucleotídeos ou sinalizar o desencadeamento de morte celular por apoptose (LIMA; DUARTE; SÁ, 2010).



**Figura 3.** A) Figura representativa de uma mitocôndria com ênfase nos quatro compartimentos principais. MME – Membrana Mitocondrial Externa; EIM – Espaço Intermembranas; MMI – Membrana Mitocondrial Interna; e Matriz mitocondrial. B) Esquema representativo da cadeia respiratória (cadeia transportadora de elétrons – CTE) acoplada a ATP-Sintetase. A CTE está localizada na membrana interna MMI enquanto que o mtDNA está localizado na matriz mitocondrial, mesmo local que ocorre o ciclo do ácido cítrico (Ciclo de Krebs). A CTE é constituída por cinco complexos proteicos. Complexo I (NADH desidrogenase) e complexo II (succinato-desidrogenase), os quais recebem elétrons a partir de metabolismo intermediário, que são então transferidos para a coenzima Q e posteriormente entregues ao complexo III (citocromo c redutase). Estes elétrons são transportados do complexo III para o complexo IV (citocromo c oxidase) mediados pelo citocromo c, sendo esta a última etapa da cadeia transportadora de elétrons, o qual produto final é a formação de água através da redução do oxigênio molecular. O transporte de elétrons é acoplado ao bombeamento de prótons da matriz para o EIM, que é mediado pelos complexos I, III e IV. O gradiente eletroquímico ( $\Delta\psi$ ) gerado pelo bombeamento de prótons durante a fosforilação oxidativa é utilizado como força motriz para o complexo V (ATP-sintase) produzir ATP (DUARTE, 2012; PEREIRA et al., 2012).

Fonte: PEREIRA et al., 2012.

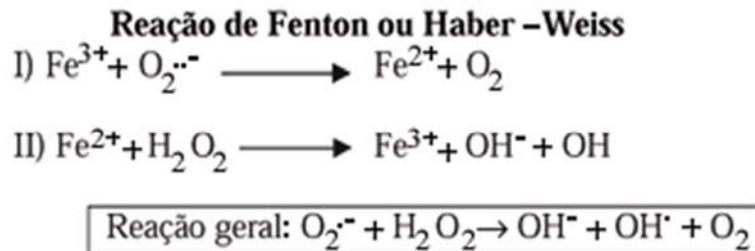
A membrana interna delimita um compartimento denominado matriz, na qual se encontram diversas enzimas, entre elas as envolvidas no ciclo dos ácidos tricarbóxicos e na  $\beta$ -oxidação, além do mtDNA (LIMA; DUARTE; SÁ, 2010). Este material genético exclusivo, o mtDNA é diferente do DNA nuclear, sendo que o primeiro é caracterizado por um duplo filamento circular, compacto e sem íntrons. O mtDNA contém 37 genes que codificam 2 RNAs ribossômicos, 22 RNAs transportadores e 13 RNAs mensageiros (RNAm), que são traduzidos em 13 polipeptídeos envolvidos na fosforilação oxidativa. Enquanto que o DNA nuclear é conhecido por possuir longas fitas, constituídas cada uma por dupla hélice e que contém aproximadamente 100.000 genes (SCHEFFLER, 2001). O mtDNA codifica aproximadamente 10% das proteínas mitocondriais que são componentes essenciais de 4 dos 5 complexos responsáveis pela fosforilação oxidativa

mitocondrial, com exceção do complexo II que é formado, exclusivamente, por subunidades codificadas pelo DNA nuclear (nDNA). Portanto, para um bom funcionamento desta organela, uma boa cooperação entre o DNA nuclear e o DNA mitocondrial se faz necessária (SOUZA; GIUGLIANI, 2001).

### **1.5.2 Ação de xenobióticos sobre a mitocôndria**

Conforme explicado anteriormente, a mitocôndria é a principal organela responsável por transformar a energia retirada dos alimentos em energia em uma forma útil às células, devido a isto, esta organela possui um papel fundamental na manutenção de várias funções celulares. Para ocorrer esta manutenção, a mitocôndria obtém oxigênio e substratos derivados de glicose, aminoácidos e ácidos graxos e como produto final há conversão destes substratos em moléculas de ATP (SRINIVASAN; AVADHANI, 2012). Assim, é de vital importância que se mantenha a integridade morfológica e funcional da organela, sendo esta um dos principais alvos de toxicantes (WALLACE; STARKOV, 2000). Portanto, espera-se encontrar um equilíbrio entre a geração e utilização de energia, avaliados a partir dos níveis de ATP e este equilíbrio assegura aos tecidos energia suficiente para que não ocorra dano celular (PEREIRA et al., 2012).

Quando xenobióticos agem como inibidores da cadeia respiratória, o  $O_2$  disponível para a mitocôndria pode sofrer redução incompleta, isto gera o radical superóxido por meio da reação catalisada pela NADH-desidrogenase ou pelo ciclo da Ubiquinona (coenzima Q) (TURRENS, 1997). O aumento na formação de superóxido ou deficiência no sistema antioxidante levam à formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e este se acumula ocorrendo uma condição conhecida como estresse oxidativo. Nesta condição, juntamente com a presença de  $Fe^{2+}$ , há produção do radical hidroxil via reação de Fenton e Haber-Weiss (Figura 4). Este radical é capaz de induzir citotoxicidade por meio dos danos oxidativos, sendo que para este tipo de radical, não existe nenhum sistema antioxidante enzimático (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).



**Figura 4.** Esquema da Reação de Fenton e Haber-Weiss explicando a formação de radicais livres na presença de ferro livre. Fonte: RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003.

Disfunções mitocondriais têm sido relacionadas a algumas doenças degenerativas, como a doença de Parkinson, e com a toxicidade de diversos compostos (RANA; RERA; WALKER, 2013; PEREIRA; SOUZA; DORTA, 2013; HUANG et al., 2011). Esta associação ocorre, pois como supracitado, alguns xenobióticos podem causar deficiências na funcionalidade da cadeia respiratória o que leva a uma diminuição na produção de ATP, à formação de radicais livres e a alterações nos mecanismos de regulação do cálcio intracelular. Todos estes eventos celulares podem induzir oxidação no DNA, de proteínas e de lipídeos, além de induzir a abertura do poro de transição de permeabilidade, um acontecimento que está correlacionado com os mecanismos de apoptose e morte celular (LEMASTERS, 1999).

### **1.5.3 Formação de poro de transição de permeabilidade**

Caso haja um dano mitocondrial, várias mudanças podem ocorrer em sua fisiologia e estrutura, comprometendo assim diversas das funções mitocondriais já citadas. Adicionalmente pode ocorrer prejuízo no sistema de sinalização celular, pois esta organela também é responsável por vários destes processos, como o de sinalização de morte celular programada (apoptose) através de sistemas integrados de reações bioquímicas (BERNARDI; RASOLA, 2007).

Quando mitocôndrias isoladas entram em contato com elevadas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  e/ou ocorre um desequilíbrio no estado oxidativo, pode haver um aumento de temperatura – devido à liberação de energia originada na CTE que não foi convertida em ATP. Já, quando a mesma entra em contato com alguns

xenobióticos podem sofrer o fenômeno descrito como Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM). A TPM é um fenômeno mediado pela abertura de poros de natureza proteica na membrana interna mitocondrial, sendo que esta abertura de poros que gera uma alteração na permeabilidade mitocondrial é chamada de Poro de Transição de Permeabilidade (PTP) (RAO; CARLSON; YAN, 2013).

Três principais proteínas compreendem a formação PTP, são elas: o canal de ânion dependente de voltagem (VDAC) presente na membrana exterior; o translocador de nucleotídeo de adenina (ANT) localizado na membrana interna; e Ciclofilina D (CypD) encontrado na matriz (TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2007). Quando agentes externos agem sobre a mitocôndria a CypD pode se ligar ao ANT causando a abertura do poro, seguido de um inchamento das mitocôndrias. Este processo pode ser inibido na presença de Ciclosporina A (CsA), devido ao fato de que a CsA inibe a ligação da CypD com a membrana interna mitocondrial, porém pode ocorrer a formação do PTP mesmo na ausência de CypD (PEREIRA et al., 2012; RAO; CARLSON; YAN, 2013).

Este processo é caracterizado por um aumento súbito da permeabilidade da membrana interna mitocondrial, podendo permitir a entrada de solutos que antes eram bloqueados (<1,5kDa), devido à abertura de um canal de alta condutância, sensível a Ciclosporina A e  $Ca^{+2}$  dependente (BERNARDI; RASOLA, 2007; TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2007). A ocorrência da TPM causa vários distúrbios na mitocôndria, podendo levar a uma dissipação do potencial de membrana mitocondrial o que culmina em uma redução da produção de ATP (BERNARDI; RASOLA, 2007).

Em um ambiente experimental controlado, mitocôndrias isoladas de ratos podem sofrer uma transição de permeabilidade devido a três principais fatores: aumento do cálcio intracelular, t-butilhidroperóxido e fosfato (Pi) que agem por diferentes mecanismos. O cálcio entra na mitocôndria por meio de um canal uniporter eletroforético e desencadeia a transição por meio de uma ligação em sítio ainda desconhecido, podendo gerar produção de radicais livres. O t-butilhidroperóxido pode causar a abertura de poro, pois o mesmo é metabolizado pelo sistema glutatona peroxidase com oxidação do NAD(P)H que está associado à ocorrência de transição, mas também pode ser devido à supressão que o mesmo causa no sistema antioxidante. Por fim, o fosfato pode desencadear o evento de transição diminuindo a concentração de ADP na matriz mitocondrial (LAPIDUS; SOKOLOVE, 1994; RAO; CARLSON; YAN, 2013). Portanto, a formação de PTP leva

a um desequilíbrio homeostático mitocondrial, podendo levar a uma redução nos níveis de ATP e culminar em morte celular.

Outro ponto importante é que desde 1955 já era correlacionado o inchamento mitocondrial com a presença de xenobióticos como o fosfato, arsenato, arsenito e vários outros íons metálicos, assim descritos por Hunter e Ford (1955).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar os mecanismos de ação tóxica dos PBDEs em mitocôndrias, utilizando como modelo os congêneres BDE-47 e BDE-99, os quais são representantes amplamente utilizados da classe das bifenilas polibromadas com alto potencial toxicante e o principal encontrado na natureza.

Para tanto, foram propostos especificamente os seguintes objetivos:

- Investigar os efeitos dos congêneres BDE -47 e BDE-99 na bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de rato;
- Investigar os efeitos dos congêneres BDE -47 e BDE-99 sobre o estado oxidativo de mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

### 3. METODOLOGIA

No presente trabalho foram utilizadas soluções padrões dos congêneres de PBDEs (BDE-47 e BDE-99) (Accustandard, USA). Nos ensaios foram utilizadas concentrações de 0,1  $\mu\text{mol/L}$ , 1,0  $\mu\text{mol/L}$ , 5  $\mu\text{mol/L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$ , 25  $\mu\text{mol/L}$  e 50  $\mu\text{mol/L}$ . Esta faixa de concentração foi escolhida, pois compreende concentrações que têm demonstrado atividade tóxica em diferentes linhagens de células (SOUZA et al., 2013). Os compostos foram analisados em mitocôndrias isoladas de células hepáticas de ratos.

#### 3.1 Reagentes

Os reagentes rotenona, cianeto de carbonila cloro fenilhidrazona (CCCP), succinato, glutamato, malato, difosfato de adenosina (ADP), safranina-o, o-ftalaldeído (OPT), N-etilmaleimida (NEM), 1-anilino-8-naftaleno sulfonato sal (ANSA), Difenilhexatrieno (DPH), 1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenilhexa-1,3,5 trieno, (TMA-DPH), Ácido Etilenoglicol bis ( $\beta$ -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetra acético (EGTA), 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) e Vermelho de Rutênio foram adquiridos da Sigma-Aldrich ChemicalCo (St Louis, MO, USA). Enquanto que 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) e Calcium Green 5N foram adquiridos da Molecular Probe (OR, USA). Os congêneres de BDE utilizados foram adquiridos da Accustandard (New Haven, USA).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico, preparados em água purificada pelo sistema Milli-Q. As soluções estoques dos PBDEs foram preparadas em Dimetil Sulfóxido (DMSO) e armazenadas de acordo com as instruções do fabricante (ao abrigo da luz e calor). Para todos os testes o mesmo volume de DMSO utilizado nos experimentos testes foi adicionado aos controles e nenhum efeito foi observado (dados não apresentados).

### 3.2 Animais experimentais

Em nossos estudos foram utilizados ratos Wistar, pesando aproximadamente 150 g e mantidos sob condições adequadas no Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto (biotério convencional). Com temperatura em torno de 19 à 23°C, ração e água servida “ad libitum”.

Para experimentação os animais tiveram uma ambientação mínima de 48 horas e todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do campus da USP-Ribeirão Preto sob o Protocolo: 12.1.227.53.0.

#### 3.2.1 Decapitação sem anestesia

Para o isolamento das mitocôndrias, os animais foram sacrificados por decapitação e seu fígado posteriormente retirado. Há diversos trabalhos que indicam a não utilização de anestesia química em roedores, antes da sua decapitação para a coleta de tecido a ser utilizado na preparação de mitocôndrias isoladas. A conclusão invariável da maioria destes estudos é que os anestésicos podem alterar o funcionamento e a estrutura das mitocôndrias, se eles são administrados aos animais antes da coleta de tecido ou adicionados à mitocôndria isolada em concentrações fisiológicas (KATER, 1935).

A utilização de anestesia antes de decapitação afeta importantes parâmetros fisiológicos, tais como a liberação de ácidos graxos no tecido e níveis de insulina, que por sua vez pode resultar em alterações das funções mitocondriais e, portanto, devem ser evitados (BHATHENA, 1992). Anestésicos induzem apoptose mediada por mitocôndrias em linfócitos T humanos *in vitro* (LOOP et al., 2005). *In vivo*, como é de conhecimento dos anestesiológicos, a aplicação de anestesia pode causar disfunção nas mitocôndrias (DRIESSEN, 2008). Em procedimentos nos quais se utilizam anestésias gerais em seres humanos ocorre uma inibição da oxidação de vários substratos mitocondriais responsáveis pelo ciclo do ácido tricarboxílico no músculo esquelético (MIRÓ et al., 1999).

Outros trabalhos têm mostrado que a ultraestrutura das mitocôndrias isoladas depende da forma como os animais foram sacrificados, com ou sem o uso de anestésicos (HERTSENS; JACOB; VAN BOGAERT, 1984), e que este último pode

destruir a ultraestrutura normal mitocondrial (ABIDOVA; KHOROSHAEV; LEONOV, 1990), alterar a composição lipídica do interior membrana (DEKUTOVICH; KARGAPOLOV, 1986), sua estrutura física e interações entre lipídios e proteínas (MAZZANTI et al., 1979; LENZ et al., 1978). Ao nível funcional, os anestésicos são utilizados para desacoplar mitocôndrias (DABADIE et al., 1987; ROTTENBERG, 1983) ou para inibir sua respiração (KATER, 1935; TSYGANIĬ; MEDVINSKAIA, 1984) e transporte de metabólitos através de sua membrana interna (RAFAŁOWSKA, 1979) e para interferir na translocação de  $\text{Ca}^{2+}$  (BRANCA, 1988).

Portanto, devido ao fato de que a utilização de anestesia pode interferir sobre as funções mitocondriais que dependem da integridade de sua membrana interna e o funcionamento da sua cadeia respiratória (bioenergética) ou na translocação de  $\text{Ca}^{2+}$ , os ratos foram eutanasiados por decapitação sem a utilização de anestesia. Após a decapitação foi feito um corte sagital para remoção do fígado do animal. Todos os procedimentos foram realizados com materiais cirúrgicos estéreis e o descarte dos animais foi feito em sacos de lixo contaminante (saco branco), sendo armazenados em freezer a  $-18^{\circ}$  e descartados posteriormente sob cuidados do próprio biotério.

### **3.3 Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato e dosagem de proteína**

As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial. Após a eutanásia dos animais, o fígado (10-15 g) foi imediatamente removido, picotado em 50 mL de meio contendo sacarose 250 mmol/L, EGTA 1mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, a  $4^{\circ}\text{C}$  e homogeneizado três vezes por 15 segundos com intervalos de 1 minuto em homogeneizador Potter-Elvehjen. A suspensão foi centrifugada a 770 g por 5 minutos e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 9.800 g por 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso com 10 mL de meio contendo sacarose 250 mmol/L, EGTA 0,3 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2 e centrifugado a 4.500 g por 15 minutos. O sedimento mitocondrial final foi suspenso com 1mL de meio contendo sacarose 250 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2 e utilizado dentro de um período de 3 horas (PEDERSEN et al., 1978). A proteína mitocondrial foi determinada pela reação de Biureto (PEDERSEN et al., 1978; CAIN; SKILLETER, 1987).

### 3.4 Interação com a membrana mitocondrial interna

As mitocôndrias (2 mg de proteína/mL) foram incubados a 30°C com os marcadores: Difenilhexatrieno (DPH) 0,5  $\mu\text{mol/L}$ , 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS) 75  $\mu\text{mol/L}$  e 1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenilhexa-1,3,5 trieno (TMA-DPH) 1,04  $\mu\text{mol/L}$ , em meio de reação contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2 em volume final de 2 mL. A fluorescência para os marcadores ANS, DPH e TMA-DPH foi determinada espectrofluorimetricamente (F-4500, Hitachi) em comprimentos de onda para excitação e emissão, respectivamente, de 380 nm e 485 nm para o ANS, 360 nm e 430 nm para o DPH e 362 nm e 432 nm para o TMA-DPH com adição sequencial dos PBDEs e monitorado por 600 segundos (LEE et al, 1999). A interação dos compostos estudados com a membrana causa redução na fluorescência emitida pelos marcadores supracitados.

### 3.5 Respiração mitocondrial

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias energizadas foi monitorado polarograficamente em um oxígrafo equipado com um eletrodo tipo Clark (Gilson Medical Electronics, USA) (CHANCE; WILLIAMS, 1956). O eletrodo de Clark é constituído por um cátodo de platina acoplado a dois ânodos de prata por meio de uma ponte de KCl saturada (preparada através da dissolução de 17,5 g de sal anidro em 100 mL de água deionizada a 25°C) e cobertos por uma membrana de teflon. Com a aplicação de uma tensão de polarização de 700 mV o eletrólito é ionizado e inicia-se o fluxo de corrente através de uma série de reações eletroquímicas. Dentro de uma determinada faixa de polarização o fluxo de elétrons, ou seja, a corrente elétrica gerada é proporcional à concentração de oxigênio (BRACHT; IWAMOTO 2003).

Este tipo de sensor por eletrodo foi inicialmente desenvolvido por Clark, em 1956, para medir oxigênio em amostras de sangue. Como resultado, por muitas vezes é referido como o eletrodo de Clark.

As mitocôndrias (1,0 mg de proteína) foram incubadas em 1,5 mL do meio reacional padrão juntamente com as concentrações dos PBDEs. A respiração de estado 3 foi iniciada com 400 nmoles de ADP (CAIN; SKILLETER, 1987).

O meio padrão reacional constituído de Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mmol/L e EGTA 0,5 mmol/L foi suplementado com Glutamato + Malato (5 mmol/L cada) ou Succinato 5 mmol/L (utilizando rotenona 2 µmol/L para inibição do complexo I) como substratos oxidáveis de complexo I e II, respectivamente. As velocidades de consumo de oxigênio foram expressas em ng/átomo de oxigênio consumidos por miligrama de proteína mitocondrial por minuto, na ausência (Controle) e presença dos PBDEs.

### 3.6 Potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado espectrofluorimetricamente (F-4500, Hitachi - Japão) monitorando-se as alterações na fluorescência da Safranina-o, um corante catiônico fluorescente, que se distribui eletroforicamente na matriz em resposta a carga negativa da membrana mitocondrial interna (LEMASTERS et al., 1987), usando-se como comprimentos de onda de excitação 495 nm e de emissão 586 nm. As mitocôndrias (1,0 mg de proteína/mL) foram incubadas no meio padrão de reação contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2 acrescido de rotenona 2,5 µmol/L + safranina-o 10 µmol/L, em volume final de 2 mL e energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol/L. Após a formação do potencial de membrana adicionou-se diferentes concentrações dos congêneres de PBDEs no intuito de avaliar cineticamente o seu efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial. No final do período de incubação o potencial de membrana foi totalmente desfeito utilizando 5 µl de CCCP 1 mmol/L. A diminuição do potencial de membrana observada pelo influxo eletrogênico do cátion CCCP correlaciona-se linearmente com o aumento da intensidade de fluorescência do corante na medida em que ele é liberado das mitocôndrias (AKERMAN, 1976; EMAUS et al., 1986).

### 3.7 Inchamento mitocondrial

O inchamento mitocondrial foi monitorado pela diminuição da absorvância aparente da suspensão de mitocôndrias (0,4 mg proteína/mL), incubadas em 1,5 mL do meio padrão de reação contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L acrescido de rotenona 2,5  $\mu\text{mol/L}$ , succinato 5 mmol/L e  $\text{CaCl}_2$  10  $\mu\text{mol/L}$ , em 540 nm, usando-se um espectrofotômetro (DU-70, Beckman - U.S.A.). O inchamento mitocondrial é acompanhado da diminuição na turbidez da suspensão e, portanto, da diminuição proporcional na absorvância (LEMASTERS et al., 1987). Juntamente ao meio e às mitocôndrias foram adicionadas as diversas concentrações dos BDE-47 e BDE-99 para analisar se estes interfeririam no inchamento mitocondrial.

O processo denominado de inchamento mitocondrial é observado na amostra mitocondrial levada a espectrofotômetro, acompanhando-se a diminuição da dispersão de luz em um comprimento de onda específico. Isto ocorre porque a matriz inchada possui um índice de refração menor que a forma condensada, tornando-se perceptível as modificações na organização estrutural. Uma vez que a penetração de água ou solutos acompanhados de água, promove o distanciamento de elementos estruturais, promovido por um rearranjo estrutural de sistemas macromoleculares, este fenômeno pode ser acompanhado na sua velocidade ou na sua extensão, quando mantidas sob condições constantes (ZORATTI, M; SZABO, I, 1995).

### 3.8 Efluxo de $\text{Ca}^{2+}$

A movimentação de  $\text{Ca}^{2+}$  foi monitorada utilizando o marcador fluorescente Calcium Green 5N, em comprimentos de onda de 506 e 531 nm para excitação e emissão, respectivamente. Utilizou-se 1 mg de proteína mitocondrial em volume final de 2 mL de meio de reação padrão contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, HEPES-KOH 10 mmol/L acrescido de rotenona 2  $\mu\text{mol/L}$  +  $\text{Ca}^{2+}$  10  $\mu\text{mol/L}$  + Calcium Green 5N 150 nmol/L. As mitocôndrias foram energizadas com succinato de potássio 5 mmol/L e em seguida adicionou-se diferentes concentrações dos congêneres BDE-47 e BDE-99 no intuito de avaliar cineticamente o efeito destes

compostos sobre o potencial de membrana mitocondrial. O efluxo de  $\text{Ca}^{+2}$  foi monitorado por 600 segundos em espectrofluorímetro (F-4500, Hitachi - Japão). O efluxo total de  $\text{Ca}^{+2}$  foi realizado utilizando CCCP 1mmol/L. À medida que o Calcium Green 5N é captado pela mitocôndria observa-se uma diminuição na fluorescência do meio (RAJDEV; REYNOLDS, 1993).

### 3.9 Níveis mitocondriais de ATP

O ATP mitocondrial foi determinado por quimioluminescência utilizando-se o sistema luciferina-luciferase. Foram incubados sob agitação por 30 minutos a 30°C as concentrações dos PBDEs juntamente com 1 mg de proteína/mL em meio igual ao utilizado para avaliação do potencial de membrana (item 3.6). A suspensão mitocondrial foi centrifugada a 9.000 g por 5 minutos, a 4°C e o sedimento contendo as mitocôndrias foi tratado com 1mL de  $\text{HClO}_4$ . Após centrifugação a 14000 g por 5 minutos, a 4°C, alíquotas (100  $\mu\text{L}$ ) do sobrenadante foram neutralizadas com 70  $\mu\text{L}$  de KOH 2 mol/L, acrescidas de Tris-HCl 100 mmol/L, pH 7,8 (volume final 1 mL) e novamente centrifugadas. A luminescência do sobrenadante foi medida, utilizando-se “kit” da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) empregando um luminômetro AutoLumat LB953 Luminescence photometer (Perkin Elmer Life Sciences, Wildbad Germany). O ATP presente na amostra é consumido durante a oxidação da Luciferina, catalisada pela enzima luciferase com emissão de luz conforme reação:



Quando as concentrações de luciferina, luciferase e oxigênio são mantidos constantes e o ATP é o reagente limitante, a quantidade de luz emitida é proporcional ao ATP presente no meio (THORE, 1979).

### 3.10 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

A geração de Espécies reativas de oxigênio (EROs) foi monitorada espectrofluorimetricamente (F-4500, Hitachi - Japão) utilizando a sonda fluorescente

H<sub>2</sub>DCF-DA nos comprimentos de onda de 503 nm para excitação e 529 nm para emissão. As mitocôndrias (1,0 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio padrão de reação contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2 acrescido de rotenona 2,5 µmol/L e H<sub>2</sub>DCFDA 2 µmol/L e energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol/L. Foi realizado controle negativo (basal), positivo induzido por t-butilhidroperóxido (t-BOOH) 300 µmol/L e tratamentos utilizando as diferentes concentrações de BDE-47 e BDE-99.

O DCFDA é uma molécula que atravessa facilmente as membranas biológicas e é hidrolisado por esterases liberando o composto não fluorescente DCFH. Porém, este em presença de ERONs (Espécies reativas de Oxigênio e Nitrogênio) é rapidamente oxidado e transformado em DCF que apresenta alto rendimento quântico de fluorescência quando excitado em 503 nm. Sendo assim o aumento da fluorescência é diretamente proporcional à produção de EROs pelas mitocôndrias (CATHCART; SCHWIERS; AMES, 1983).

### 3.11 Níveis mitocondriais de grupos sulfidril de proteínas

Os compostos em estudo foram incubados juntamente com 0,4 mg/mL de proteína mitocondrial em meio idêntico ao utilizado para avaliação do potencial de membrana (item 3.6), sob agitação por 30 minutos a 30°C. A suspensão mitocondrial (1 mg de proteína/mL) foi tratada com ácido perclórico (concentração final de 5%) e centrifugada a 3400 g por 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso com 1mL do meio contendo EDTA 50 mmol/L e TRIS 100 mmol/L, pH 8,0. A quantidade de grupos sulfidril de proteínas foi calculada a partir de  $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , da absorvância determinada em 412 nm, após adição de 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzólico (DTNB) 0,2 mmol/L. (JOCELYN, 1987). Foi realizado controle negativo (sem adição dos PBDEs), positivo induzido por t-butilhidroperóxido (t-BOOH) 300 µmol/L e tratamentos utilizando as diferentes concentrações de BDE-47 e BDE-99.

O ácido DTNB reage rapidamente com grupamentos sulfidril, formando dissulfetos mistos e o ânion p-nitrotiofenol, que apresenta coloração amarela, com intensidade proporcional à quantidade de grupos sulfidril (HAUGAARD, 2000).

### 3.12 Níveis mitocondriais de GSG/GSSG

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram determinados espectrofluorimetricamente (F-4500, Hitachi - Japão) em 350 nm para excitação e 420 nm para emissão, utilizando o-ftalaldeído (OPT) como sonda (HISSIN; HILF, 1976). As mitocôndrias (1,0 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio padrão de reação contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L acrescido de rotenona 2,5  $\mu$ mol/L e succinato 5 mmol/L e diferentes concentrações dos congêneres em estudo por 30 minutos a 30°C. A reação foi interrompida com adição de Ácido Perclórico (PCA) 1% e levadas a centrifugação a 9000g por 3 minutos. Alíquotas do sobrenadante (100 $\mu$ L) foram adicionadas a 1,8 mL de Tampão NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mmol/L, pH 8.0 e EGTA 5 mmol/L adicionando-se 100  $\mu$ L de OPT (1mg/mL). A fluorescência para GSH foi determinada após 15 minutos de incubação ao abrigo da luz. Os níveis de GSSG foram determinados pela adição de 250  $\mu$ L de N-etilmaleimida (NEM) 0,04M a alíquotas de 250  $\mu$ L de sobrenadante. Após 20 minutos de incubação a temperatura ambiente, 500  $\mu$ L de NaOH 10 mol/L foi adicionado e 100  $\mu$ L desta solução foi adicionado à 2 mL de NaOH 1 mol/L e 100  $\mu$ L de OPT (1mg/mL). A fluorescência foi determinada após 15 minutos de incubação ao abrigo da luz.

Glutathiona é distribuída nas células é responsável por muitas funções biológicas, sendo encontrada na forma oxidada (GSSG) e é rapidamente convertida para a forma reduzida (GSH) pela enzima glutathiona redutase. Este método consiste na utilização de um agente fluorescente que possui afinidade por GSH ou GSSG dependente do pH e o NEM é utilizado para evitar a redução do GSSG (HISSIN; HILF, 1976).

### 3.13 Níveis mitocondriais de NAD(P)H

O estado redox dos nucleotídeos de piridina foi monitorado espectrofluorimetricamente (F-4500, Hitachi - Japão) pela autofluorescência do NAD(P)H em comprimentos de onda de 366 nm e 450 nm para excitação e emissão, respectivamente. As mitocôndrias (1,0 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio padrão de reação contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10

mmol/L acrescido de rotenona 2,5  $\mu\text{mol/L}$  e energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol/L. Diferentes concentrações dos PBDEs foram adicionadas e o estado redox dos nucleotídeos de piridina monitorados por 10 minutos. t-butilhidroperóxido 300  $\mu\text{mol/L}$  foi utilizado como controle positivo (OLIVEIRA et al., 2005). Os nucleotídeos de piridina reduzidos (NAD(P)H) são fluorescentes, enquanto que os nucleotídeos de piridina oxidados (NAD(P)<sup>+</sup>) não o são. Assim, alterações na intensidade de fluorescência refletem mudanças no estado redox dos nucleotídeos de piridina.

### **3.14 Análise estatística**

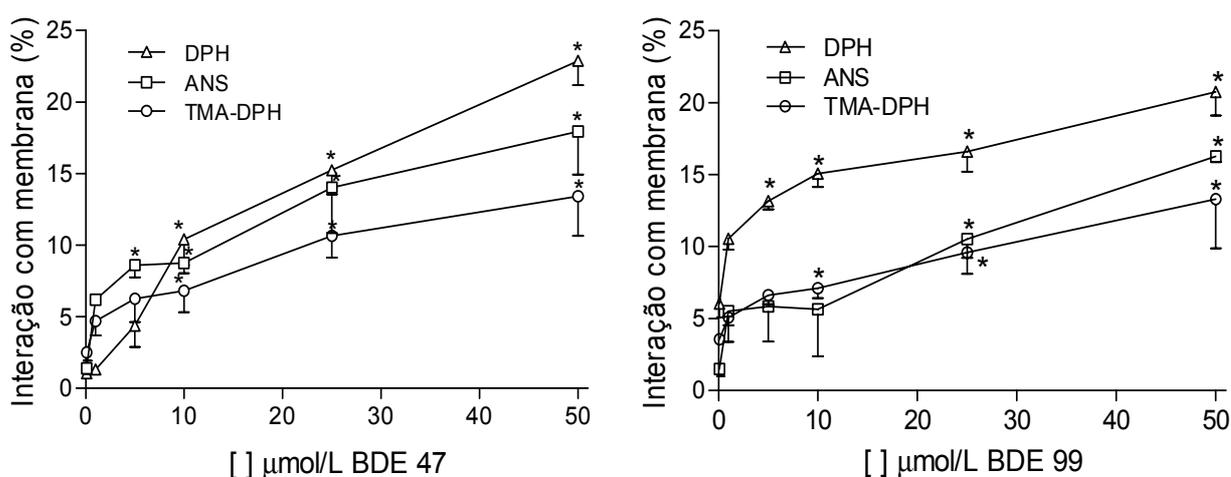
A significância estatística dos dados experimentais, quando pertinente, foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnet para a comparação de vários grupos tratados em relação aos seus controles, utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 5.01 (San Diego, CA, U.S.A.). Os resultados com valor de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Interação com a membrana mitocondrial interna

Devido à hipótese de que os retardantes de chama possam interagir com a membrana mitocondrial interna e com isso perturbar a homeostase da mesma, testes foram realizados utilizando marcadores fluorescentes para detectar e quantificar essa possível interação. Os marcadores utilizados foram: ANS e TMA-DPH que se fixam a região hidrofílica da membrana e DPH, o qual se liga na região hidrofóbica.

Observou-se que os dois congêneres testados interferem de forma significativa com a fluorescência das três sondas utilizadas (Figura 5), sugerindo que ambos os congêneres possam interagir tanto com a região hidrofóbica como com a região hidrofílica da membrana mitocondrial interna. No entanto a sonda hidrofóbica DPH foi a mais afetada para os dois compostos em estudo, chegando a aproximadamente 23% de interferência sobre a fluorescência da sonda quando adicionado 50  $\mu\text{mol/L}$  do BDE-47 e de aproximadamente 20% para o BDE-99, na mesma concentração do BDE-47.

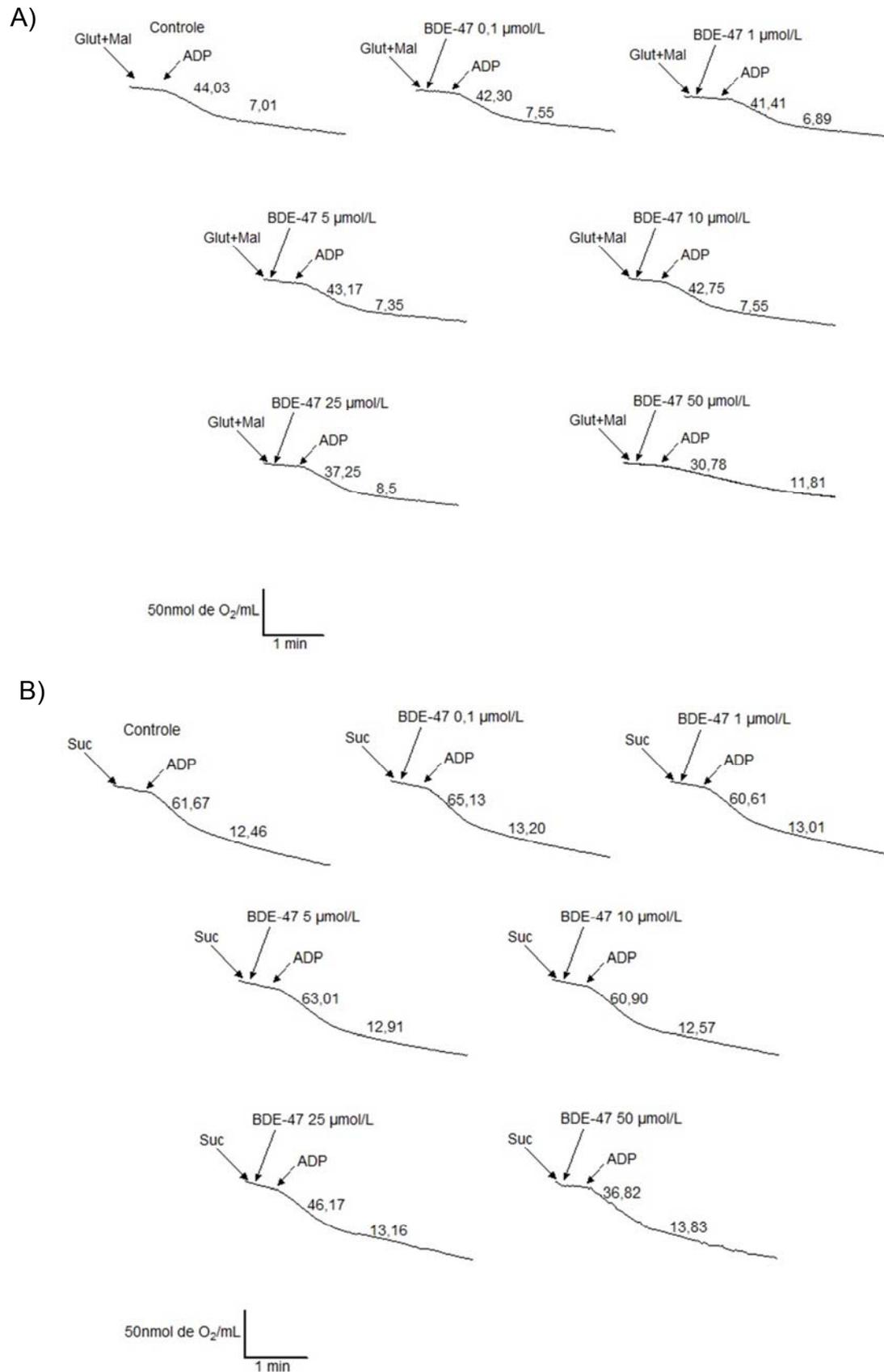


**Figura 5.** Interação dos BDE-47 e BDE-99 com a membrana mitocondrial interna avaliada pelas sondas ANS, TMA-DPH e DPH, conforme descrito em materiais e métodos. O gráfico representa os efeitos dos PBDEs comparado ao grupo controle (sem adição do composto e considerado como 0% de efeito).

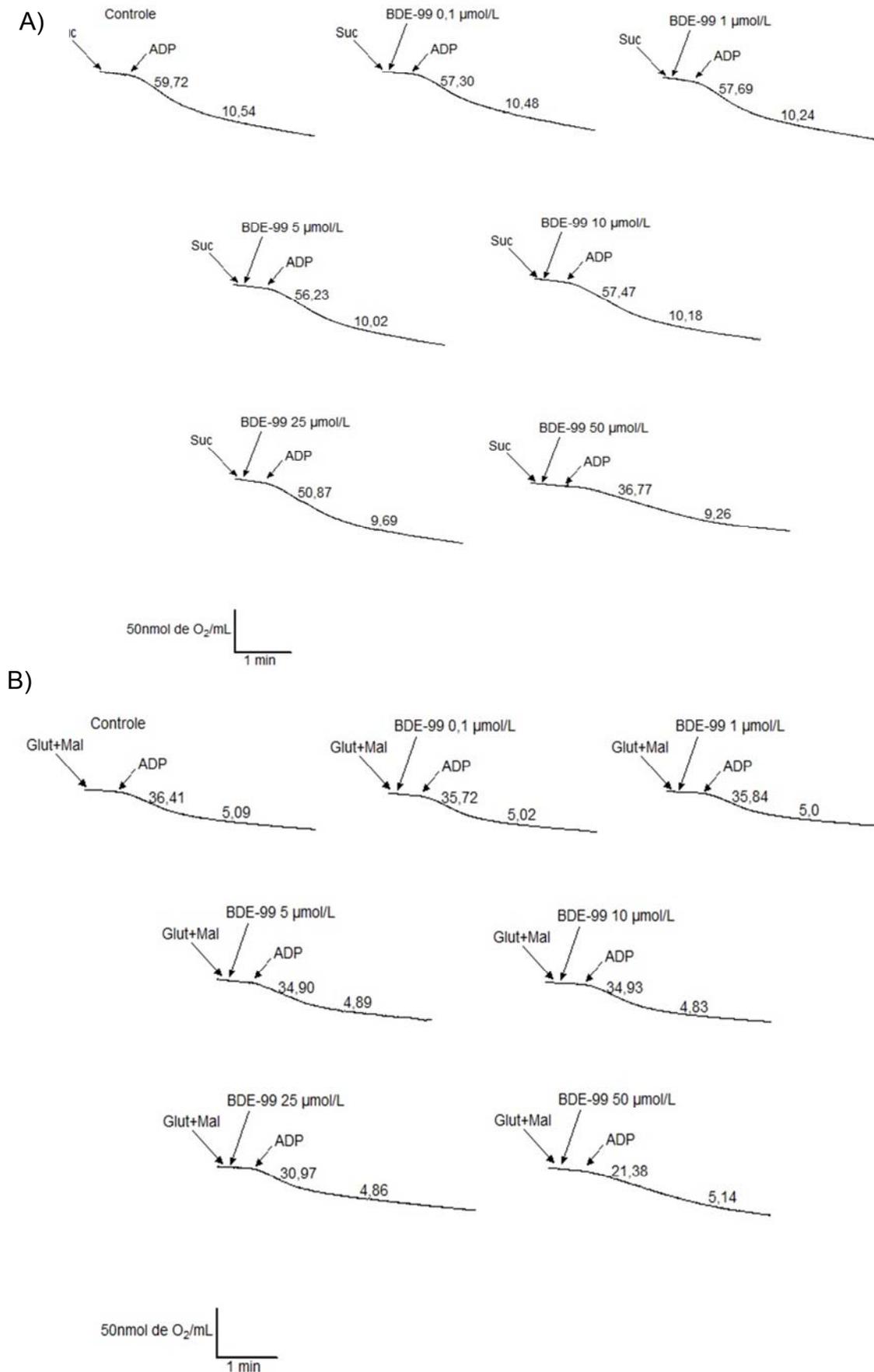
## 4.2 Respiração Mitocondrial

A avaliação da respiração mitocondrial consta em um experimento para avaliar se os congêneres de PBDE em questão são capazes de causar alterações na cadeia transportadora de elétrons, presente na membrana mitocondrial interna. Foram realizados testes a cerca da influência destes sobre o complexo I e II da cadeia. As figuras 6 e 7 demonstram respectivamente o efeito do BDE-47 e BDE-99 sobre o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas de fígado de rato, utilizando glutamato e malato como substratos oxidáveis para o sítio I (figura 6A e 7A) e succinato como substrato oxidável do complexo II (figura 6B e 7B), sendo que neste último caso foi adicionada rotenona para inibir o complexo I e impedir que ocorra o fluxo reverso de elétrons.

Os parâmetros avaliados foram RCR (razão de controle respiratório) e ADP/O, sendo que o primeiro é considerado como padrão de referência do bom funcionamento da mitocôndria isolada (PARDO-ANDREU et al., 2011). Nas tabelas 1 e 2 podem-se observar os valores obtidos de RCR, para os congêneres BDE-47 e BDE-99, sendo que para este parâmetro observou-se uma diminuição significativa do RCR quando a suspensão mitocondrial foi exposta ao BDE-47 nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  para ambos os complexos analisados. Já para BDE-99 observou-se que a mesma interferência sobre a cadeia respiratória mitocondrial ocorre, porém apenas quando exposta a maior concentração do composto (50  $\mu\text{mol/L}$ ). Este mesmo padrão de resposta é observado se analisarmos os valores de (ADP/O), após a exposição das mitocôndrias aos dois compostos em estudo, como pode ser observado nas tabelas 3 e 4.



**Figura 6.** Gráficos obtidos no teste de respiração mitocondrial sob influência das concentrações do BDE-47. A) Curva de respiração iniciada a partir com complexo I, na qual foi adicionado glutamato e malato. B) Curva de respiração iniciada a partir com complexo II, na qual foi adicionado succinato.



**Figura 7.** Gráficos obtidos no teste de respiração mitocondrial sob influência das concentrações do BDE-99. A) Curva de respiração iniciada a partir com complexo I, na qual foi adicionado glutamato e malato. B) Curva de respiração iniciada a partir com complexo II, na qual foi adicionado succinato.

**TABELA 1.** Efeito do BDE-47 sobre a razão de controle respiratório (RCR) utilizando Glutamato e Malato, para complexo I, e Succinato, para Complexo II, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Os valores são expressos como média +/- desvio padrão para três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

[ ] BDE-47 ( $\mu\text{mol/L}$ )	Glutamato + Malato	Succinato
<b>Controle (0)</b>	6,32 $\pm$ 0,72	4,94 $\pm$ 0,26
<b>0,1</b>	5,63 $\pm$ 0,60	4,97 $\pm$ 0,54
<b>1</b>	6,01 $\pm$ 0,15	4,65 $\pm$ 0,10
<b>5</b>	5,87 $\pm$ 0,16	4,88 $\pm$ 0,18
<b>10</b>	5,67 $\pm$ 0,36	4,93 $\pm$ 0,81
<b>25</b>	4,37 $\pm$ 0,45*	3,49 $\pm$ 0,24*
<b>50</b>	2,68 $\pm$ 0,49*	2,67 $\pm$ 0,39*

\*Médias diferentes do controle (sem adição do BDE-47) de acordo com teste de Dunett ( $p < 0,05$ ).

**TABELA 2.** Efeito do BDE-99 sobre a razão de controle respiratório (RCR) utilizando Glutamato e Malato, para complexo I, e Succinato, para Complexo II, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Os valores são expressos como média +/- desvio padrão para três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

[ ] BDE-99 ( $\mu\text{mol/L}$ )	Glutamato + Malato	Succinato
<b>Controle (0)</b>	7,15 $\pm$ 0,11	5,67 $\pm$ 0,13
<b>0,1</b>	7,12 $\pm$ 0,11	5,47 $\pm$ 0,36
<b>1</b>	7,17 $\pm$ 0,16	5,64 $\pm$ 0,25
<b>5</b>	7,15 $\pm$ 0,22	5,63 $\pm$ 0,37
<b>10</b>	7,24 $\pm$ 0,28	5,64 $\pm$ 0,16
<b>25</b>	6,41 $\pm$ 1,14	5,27 $\pm$ 0,48
<b>50</b>	4,21 $\pm$ 0,93*	4,06 $\pm$ 0,43*

\*Médias diferentes do controle (sem adição do BDE-99) de acordo com teste de Dunett ( $p < 0,05$ ).

**TABELA 3.** Efeito do BDE-47 sobre a razão ADP/O utilizando Glutamato e Malato, para complexo I, e Succinato, para Complexo II, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Os valores são expressos como média +/- desvio padrão para três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

[ ] BDE-47 ( $\mu\text{mol/L}$ )	Glutamato + Malato	Succinato
<b>Controle (0)</b>	2,727 $\pm$ 0,02	1,703 $\pm$ 0,19
<b>0,1</b>	2,780 $\pm$ 0,04	1,587 $\pm$ 0,03
<b>1</b>	2,737 $\pm$ 0,03	1,647 $\pm$ 0,04
<b>5</b>	2,750 $\pm$ 0,04	1,597 $\pm$ 0,06
<b>10</b>	2,790 $\pm$ 0,10	1,483 $\pm$ 0,16
<b>25</b>	2,510 $\pm$ 0,17*	1,400 $\pm$ 0,06*
<b>50</b>	1,267 $\pm$ 0,08*	1,136 $\pm$ 0,09*

\*Médias diferentes do controle (sem adição do BDE-47) de acordo com teste de Dunett ( $p < 0,05$ ).

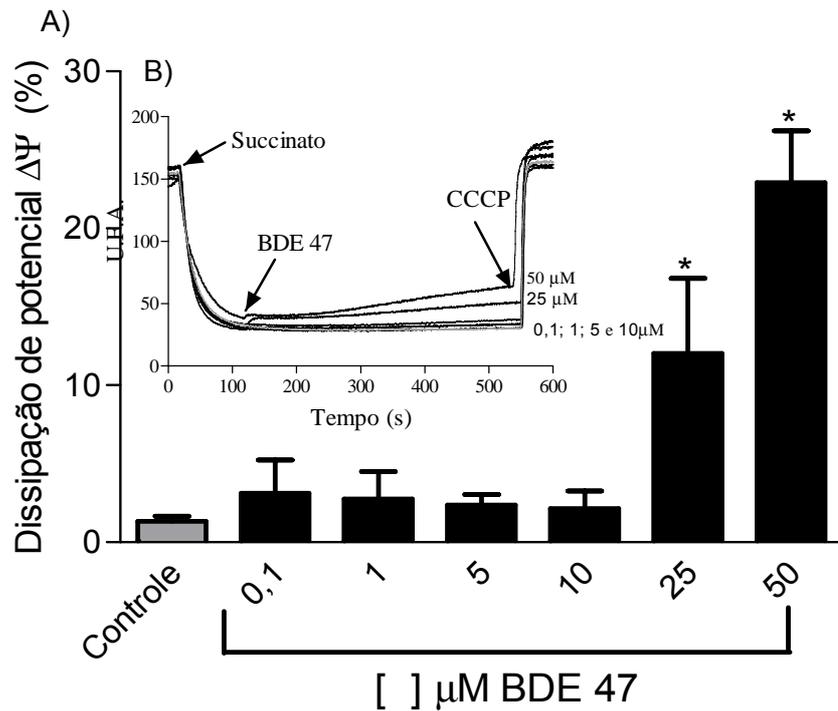
**TABELA 4.** Efeito do BDE-99 sobre a razão ADP/O utilizando Glutamato e Malato, para complexo I, e Succinato, para Complexo II, em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Os valores são expressos como média +/- desvio padrão para três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

[ ] BDE-99 ( $\mu\text{mol/L}$ )	Glutamato + Malato	Succinato
<b>Controle (0)</b>	2,61 $\pm$ 0,09	1,77 $\pm$ 0,04
<b>0,1</b>	2,66 $\pm$ 0,13	1,77 $\pm$ 0,09
<b>1</b>	2,68 $\pm$ 0,03	1,72 $\pm$ 0,02
<b>5</b>	2,77 $\pm$ 0,06	1,71 $\pm$ 0,04
<b>10</b>	2,68 $\pm$ 0,16	1,76 $\pm$ 0,06
<b>25</b>	2,60 $\pm$ 0,15	1,81 $\pm$ 0,03
<b>50</b>	2,29 $\pm$ 0,23*	1,63 $\pm$ 0,08*

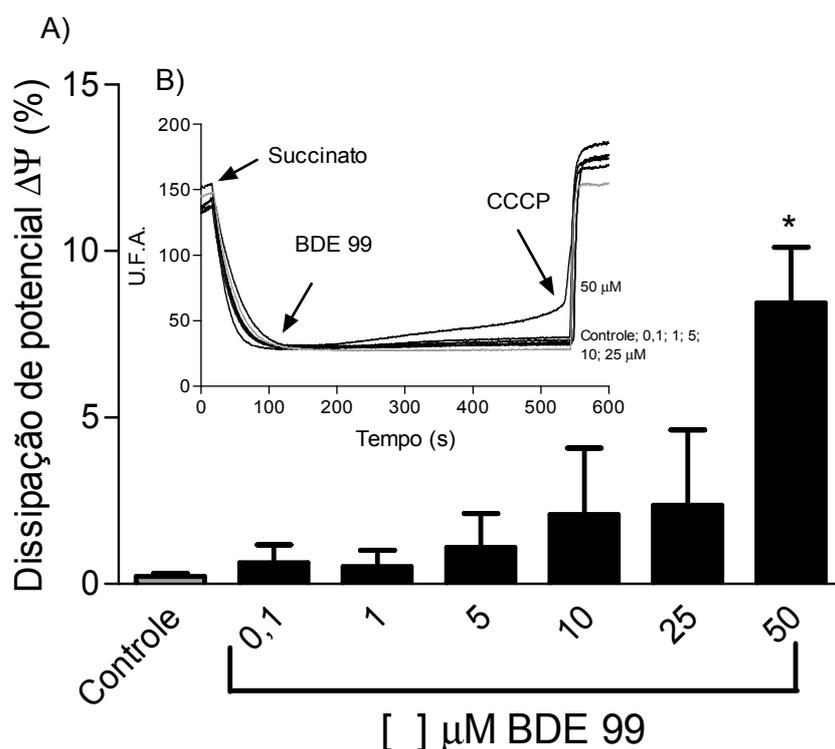
\*Médias diferentes do controle (sem adição do BDE-99) de acordo com teste de Dunett ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 Potencial de Membrana mitocondrial

O estado da membrana mitocondrial interna está diretamente relacionado com o potencial de membrana mitocondrial. Portanto, efeitos nocivos à membrana refletem em alterações no potencial eletroquímico desta organela, assim, corroborando com os dados expostos anteriormente, as Fig. 8 e 9 mostram que os dois congêneres afetaram de forma significativa este parâmetro mitocondrial estudado. Sendo que a dissipação do potencial foi observada nas maiores concentrações do BDE-47 (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ) e na maior concentração do BDE-99 (50  $\mu\text{mol/L}$ ).



**Figura 8.** A) Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre a dissipação do potencial de membrana mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \*Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. B) Traçado representativo do efeito do BDE-47 sobre o potencial de membrana mitocondrial. A dissipação total do potencial de membrana foi induzida por CCCP 1mmol/L.



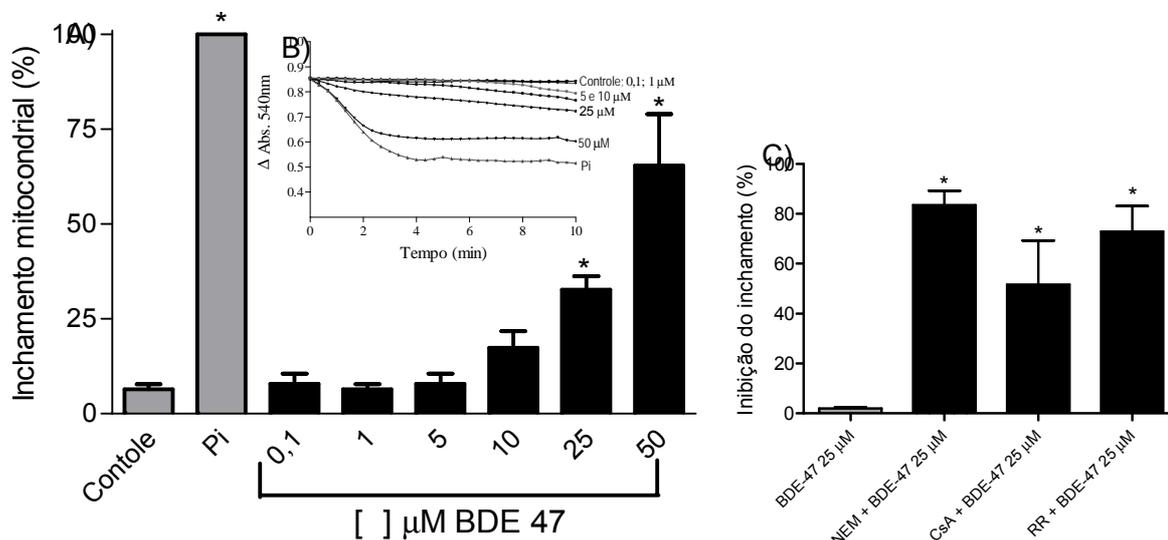
**Figura 9.** A) Efeito concentração-resposta do BDE-99 sobre a dissipação do potencial de membrana mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \*Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. B) Traçado representativo do efeito do BDE-99 sobre o potencial de membrana mitocondrial. A dissipação total do potencial de membrana foi induzida por CCCP 1mmol/L.

#### 4.4 Inchamento mitocondrial

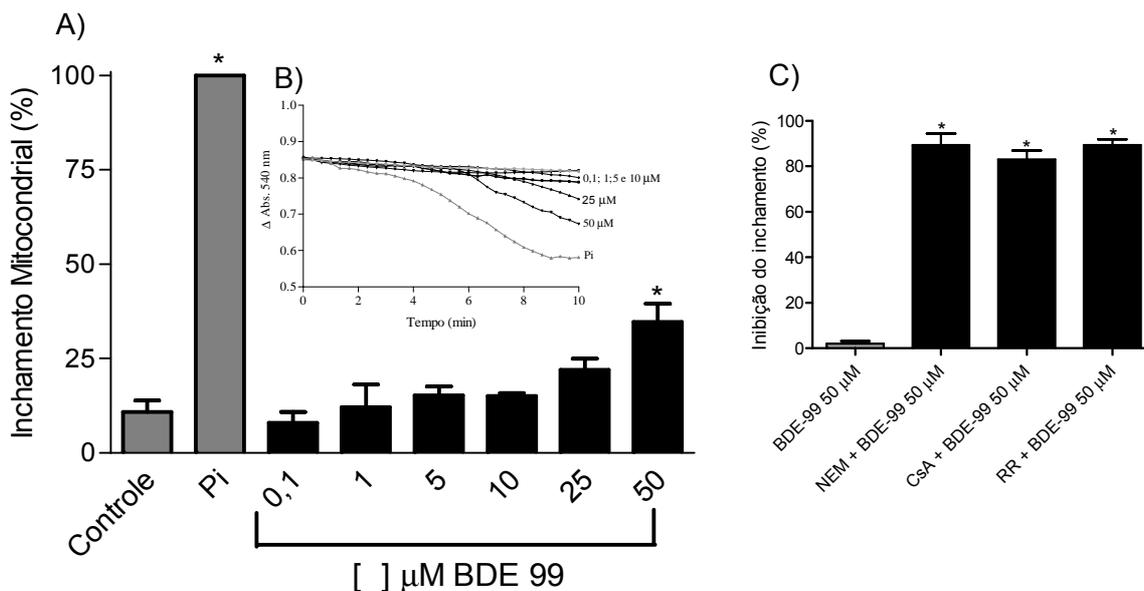
Outro parâmetro avaliado foi o inchamento mitocondrial, também chamado de *Swelling mitochondrial*. Neste foi avaliado a capacidade dos BDE-47 e BDE-99 em alterar a permeabilidade da membrana da mitocôndria. Foi observado que os congêneres testados são capazes de induzir o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna (Figura 10 e 11). O congênere BDE-47 foi capaz de induzir o inchamento mitocondrial de forma significativa estatisticamente nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ , enquanto que o BDE-99 foi capaz de induzir tal efeito apenas na maior concentração (50  $\mu\text{mol/L}$ ). Nota-se ainda que nas concentrações de 50  $\mu\text{mol/L}$  o efeito do BDE-47 sobre o inchamento mitocondrial

acontece mais abruptamente que o efeito observado para o BDE-99, cujo inchamento inicia-se apenas depois de seis minutos de exposição ao composto.

Ainda, com o intuito de verificar o mecanismo de ação pelo qual estes compostos afetaram o inchamento mitocondrial utilizou-se os seguintes moduladores do processo: Ciclosporina A (CsA) – para avaliar se o inchamento estava ocorrendo devido a uma abertura de poro mediada pela CypD, pois a CsA liga-se a este peptídeo inibindo sua ligação com o ANT (RAO; CARLSON; YAN, 2013); Vermelho de Rutênio (RR) – para verificar se o inchamento que estava ocorrendo era dependente de cálcio, pois o RR possui a capacidade de inibir o canal uniporter eletroforético de transporte de cálcio (BAZILet al., 2013); e o NEM, eleva o potencial de membrana mitocondrial aparente a valores mais negativos de voltagem, diminuindo a probabilidade de abertura de poros (PETRONILLI et al., 1994), conferindo maior estabilidade da membrana. O teste com os inibidores foi realizado com a concentração de 25  $\mu\text{mol/L}$  do BDE-47 e 50  $\mu\text{mol/L}$  do BDE-99, ambas foram escolhidas por serem as menores concentrações com efeito significativo para este parâmetro. Observou-se que os três moduladores inibem parcialmente o processo.



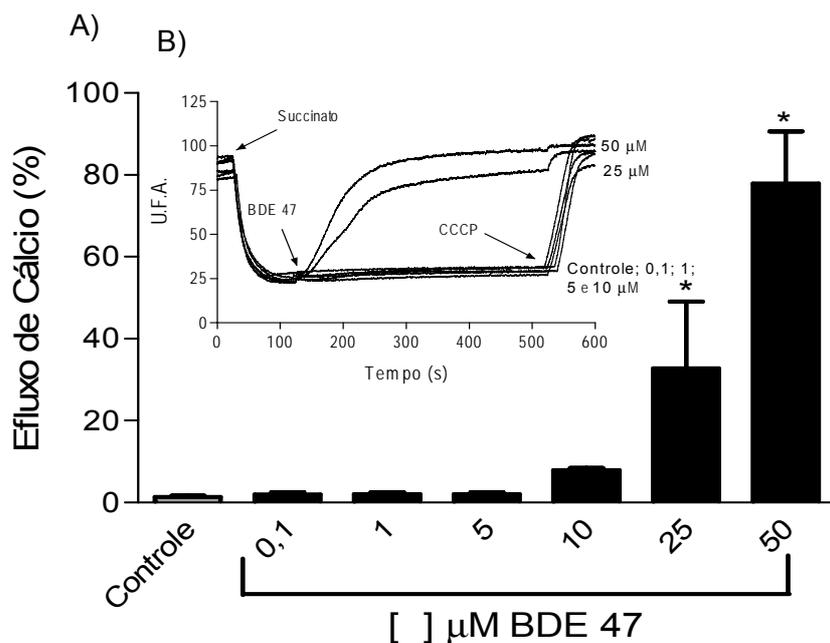
**Figura 10.** A) Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre o inchamento mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (0,4 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \*Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. B) Traçados representativos do efeito do BDE-47 sobre o inchamento mitocondrial. O máximo de inchamento observado foi induzida por fosfato inorgânico (Pi) 1mmol/L. C) Efeito da concentração de 25  $\mu\text{mol/L}$  do BDE-47 sobre interação com inibidores do swelling mitocondrial, sendo os inibidores testados a Ciclosporina A (CsA) 1  $\mu\text{mol/L}$ ; N-etilmaleimida (NEM) 25  $\mu\text{mol/L}$ ; e Vermelho de Rutênio (RR) 0,5  $\mu\text{mol/L}$ .



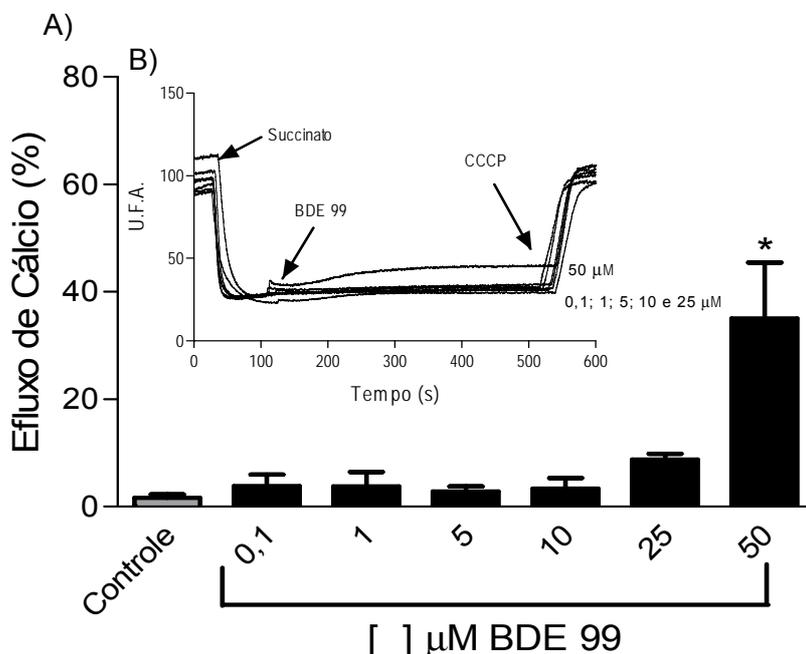
**Figura 11.** A) Efeito concentração-resposta do BDE-99 sobre o inchamento mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (0,4 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \*Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. B) Traçados representativos do efeito BDE-99 sobre o inchamento mitocondrial. O máximo de inchamento observado foi induzida por fosfato inorgânico (Pi) 1mmol/L. C) Efeito da concentração de 50  $\mu$ mol/L do BDE-99 sobre interação com inibidores do swelling mitocondrial, sendo os inibidores testados a Ciclosporina A (CsA) 1  $\mu$ mol/L; N-etilmaleimida (NEM) 25  $\mu$ mol/L; e Vermelho de Rutênio (RR) 0,5  $\mu$ mol/L.

#### 4.5 Efluxo de $Ca^{2+}$

Como o inchamento mitocondrial observado no experimento anterior indicava que os compostos testados induziam a abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP) na membrana mitocondrial avaliamos na sequencia o efeito dos congêneres de PBDEs estudado sobre a homeostasia cálcica no interior da organela. Observou-se que os dois congêneres foram capazes de induzir o efluxo de cálcio do interior da organela para o meio de reação. Este efeito foi observado para exposição ao BDE-47 nas concentrações de 25 e 50  $\mu$ mol/L e para o BDE-99 somente na concentração mais alta testada (50  $\mu$ mol/L) (Figuras 12 e 13).



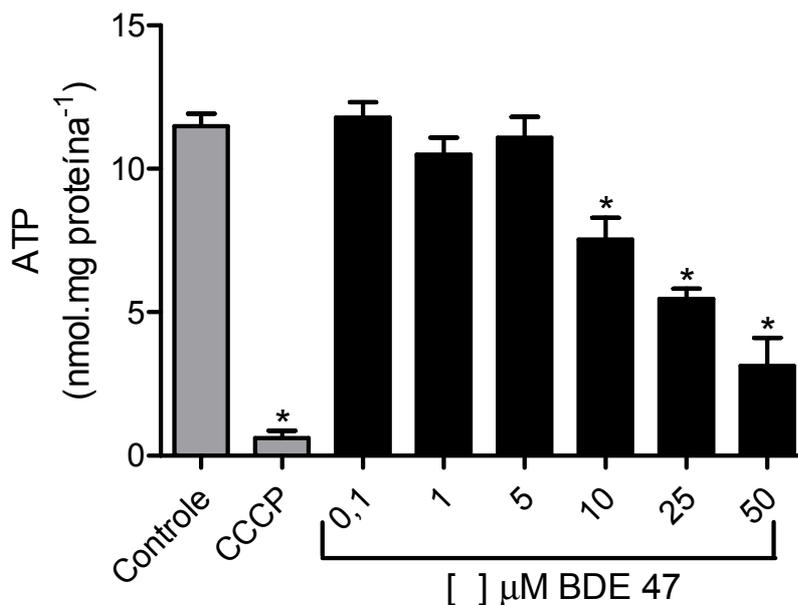
**Figura 12.** A) Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre o efluxo de cálcio em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \* Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. B) Traçados representativos do efeito do BDE-47 sobre o efluxo de cálcio mitocondrial. A liberação total de cálcio foi induzida por CCCP 1mmol/L.



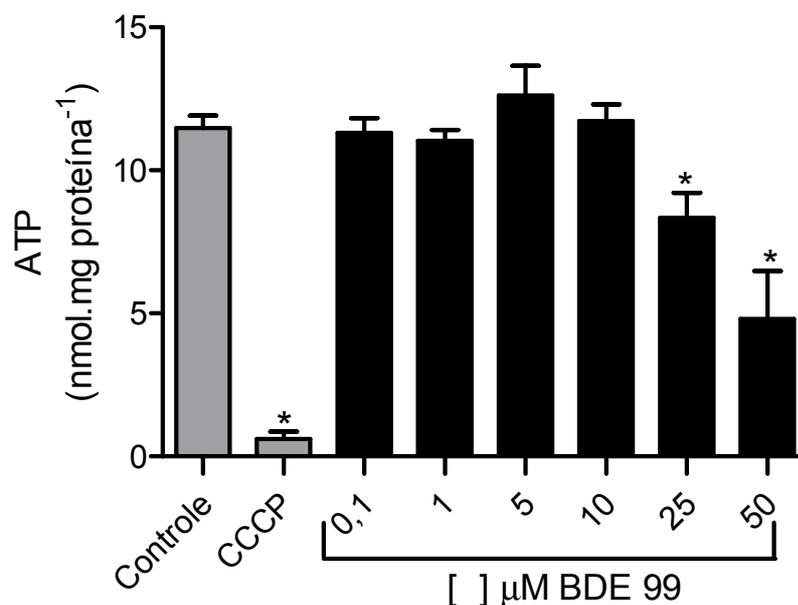
**Figura 13.** A) Efeito concentração-resposta do BDE-99 sobre o efluxo de cálcio em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \* Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. B) Traçados representativos do efeito do BDE-99 sobre o efluxo de cálcio mitocondrial. A liberação total de cálcio foi induzida por CCCP 1mmol/L.

#### 4.6 Níveis mitocondriais de ATP

Por fim, avaliamos se os efeitos observados nos experimentos anteriores sobre a função mitocondrial afetou a capacidade energética da organela. Assim, os níveis mitocondriais de ATP foram avaliados após 15 minutos de incubação da suspensão mitocondrial com os congêneres BDE-47 e BDE-99 (Figuras 14 e 15). Os resultados demonstram uma diminuição significativa nos níveis mitocondriais de ATP causada pela incubação da suspensão mitocondrial com as três maiores concentrações do BDE-47 (10, 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ) e nas duas maiores concentrações do BDE-99 (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ).



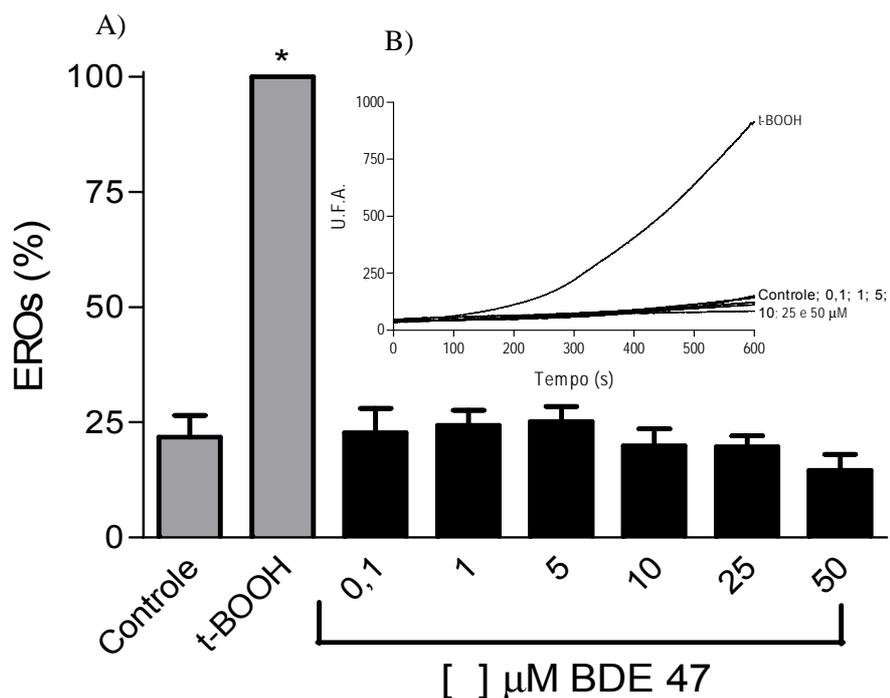
**Figura 14.** Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre os níveis de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \*Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. A queda nos níveis de ATP foi induzida por CCCP 1mmol/L.



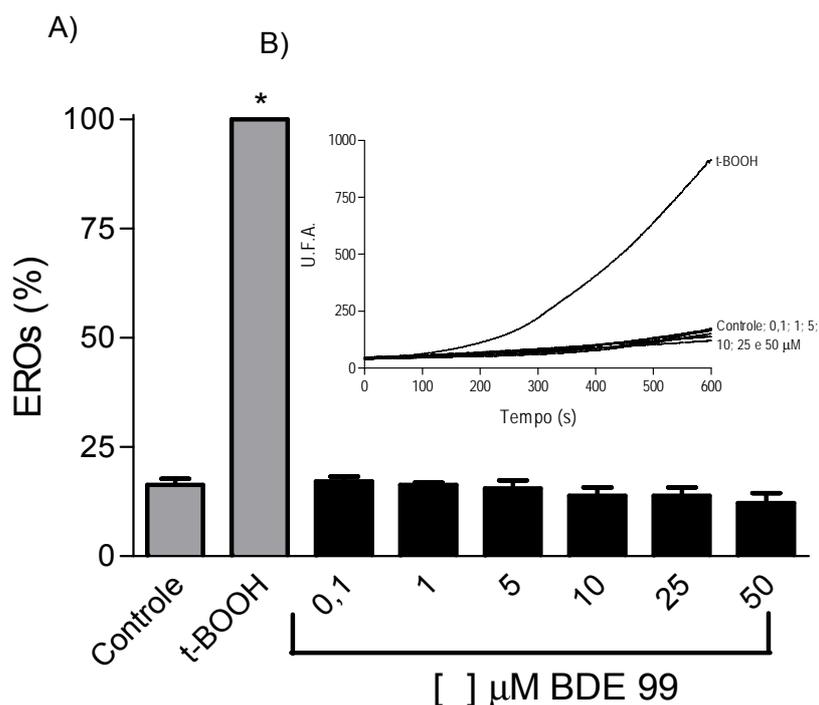
**Figura 15.** Efeito concentração-resposta do BDE-99 sobre os níveis de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \*Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. A queda nos níveis de ATP foi induzida por CCCP 1mmol/L.

#### 4.7 Produção de espécies reativas de oxigênio

Após observação da interferência destes compostos sobre a bioenergética mitocondrial, avaliou-se o estado redox das mitocôndrias. Para isso analisou-se inicialmente a formação e acúmulo de espécies reativas de oxigênio. As figuras 16 e 17 demonstram que nenhum dos congêneres foram capazes de induzir um aumento na geração de EROs.



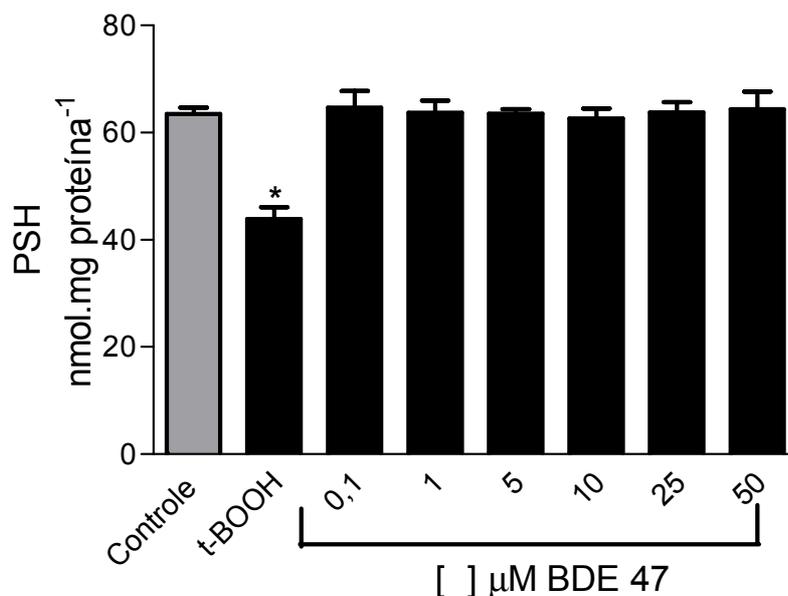
**Figura 16.** A) Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre a formação de radicais livres em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \*Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. B) Traçados representativos do efeito do BDE-47 sobre o efluxo de cálcio mitocondrial. O aumento na formação de radicais livres foi induzido por t-BOOH 300  $\mu\text{mol/L}$ .



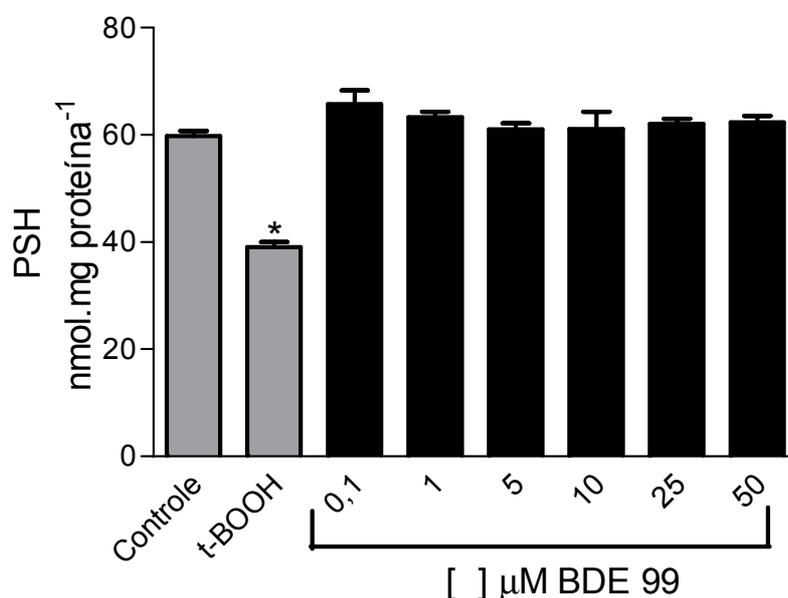
**Figura 17.** A) Efeito concentração-resposta do BDE-99 sobre a formação de radicais livres em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \*Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. B) Traçados representativos do efeito do BDE-99 sobre o efluxo de cálcio mitocondrial. O aumento na formação de radicais livres foi induzido por t-BOOH 300  $\mu\text{mol/L}$ .

#### 4.8 Níveis mitocondriais de grupos sulfidril de proteínas

Sabe-se que o acúmulo de espécies reativas na mitocôndria pode levar a oxidação de grupos tiólicos de proteínas mitocondriais. Assim, para confirmar os achados do experimento anterior os níveis de proteínas sulfidrilas foram quantificados. As figuras 18 e 19 demonstram que na presença de ambos os congêneres de PBDEs (BDE-47 e BDE-99) não houve indução significativa da oxidação dos grupos tiólicos.



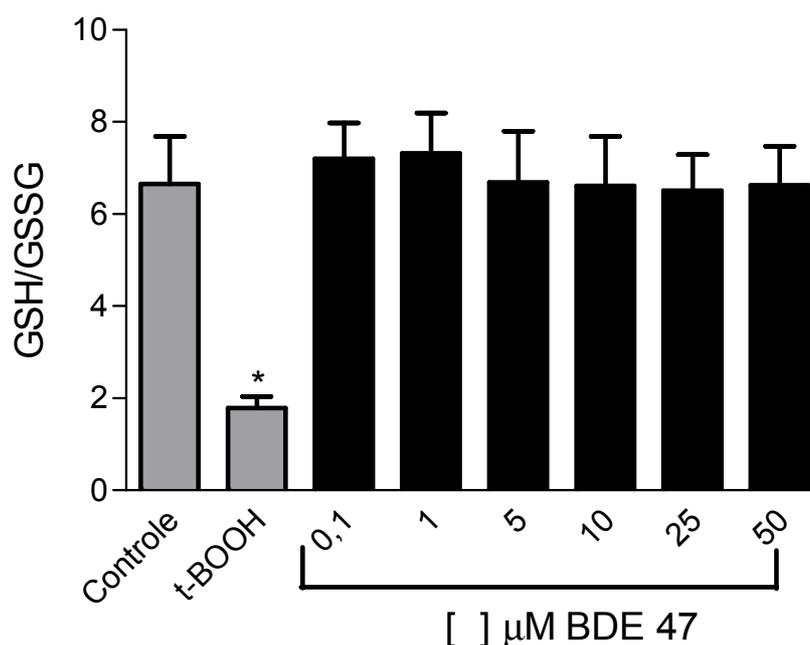
**Figura 18.** Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre os níveis de proteínas SH em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (0,4 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \*Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. A queda nos níveis de proteína SH foi induzida por t-BOOH 300  $\mu$ mol/L.



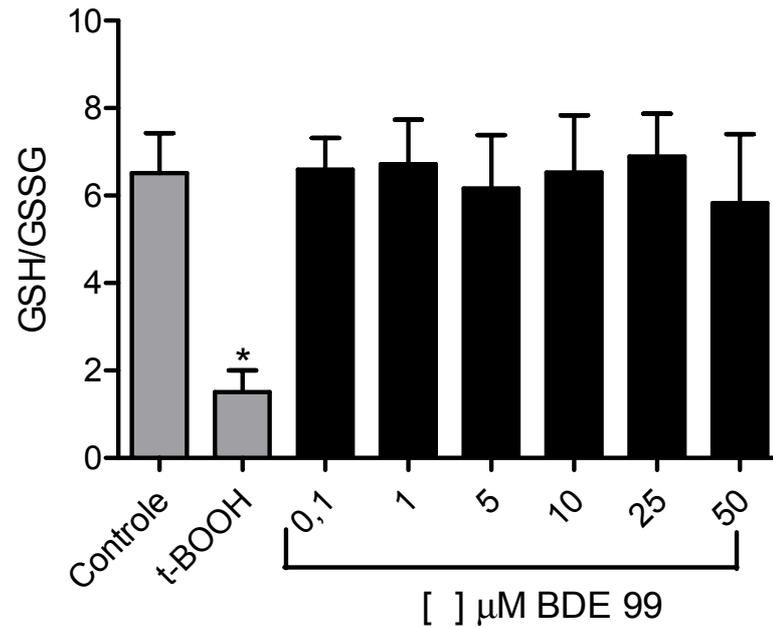
**Figura 19.** Efeito concentração-resposta do BDE-99 sobre os níveis de proteínas SH em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (0,4 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \*Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. A queda nos níveis de proteína SH foi induzida por t-BOOH 300  $\mu$ mol/L.

#### 4.9 Níveis mitocondriais de GSH/GSSG

Outro indicador muito importante de estresse oxidativo é a razão de glutathiona reduzida (GSH) por glutathiona oxidada (GSSG), sendo que para este parâmetro também não houve alteração após a adição de nenhuma das concentrações testadas dos PBDEs em estudo, como pode ser observado nas figuras 20 e 21.



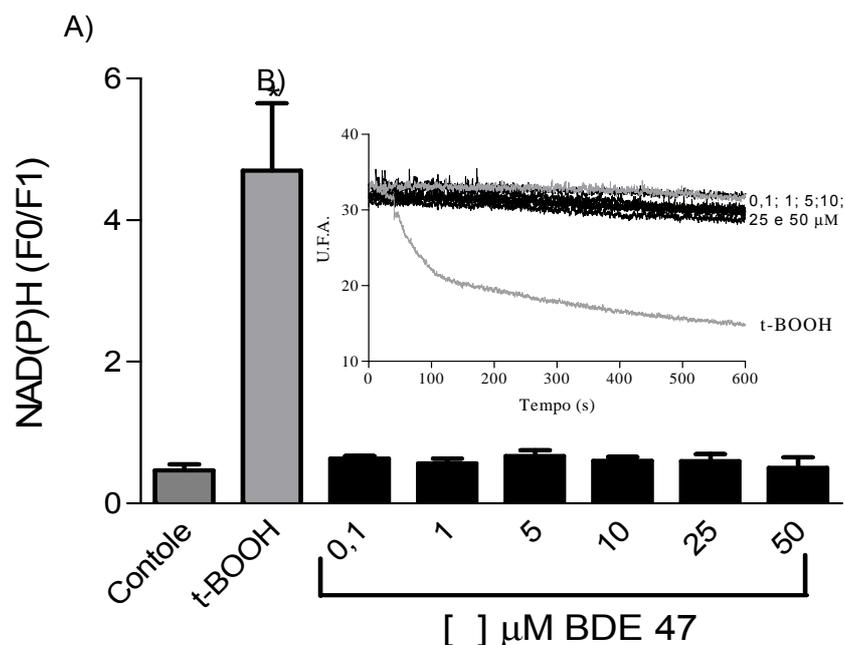
**Figura 20.** Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre a razão GSH/GSSG em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \*Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. A queda na razão GSH/GSSG foi induzida por t-BOOH 300  $\mu$ mol/L.



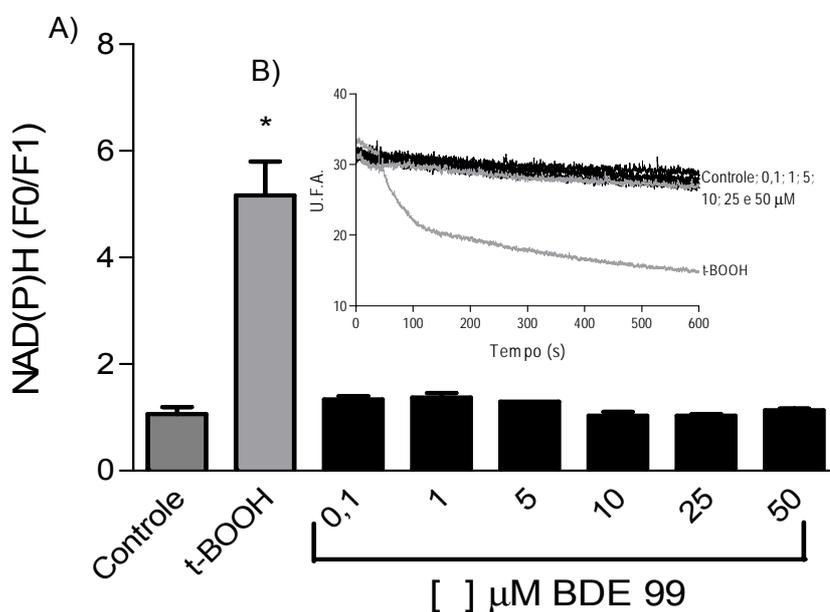
**Figura 21.** Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre a razão GSH/GSSG em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \*Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. A queda na razão GSH/GSSG foi induzida por t-BOOH 300  $\mu\text{mol/L}$ .

#### 4.10 Níveis mitocondriais de NAD(P)H

Outro ponto essencial para averiguação de ocorrência de distúrbio no estado oxidativo mitocondrial é a análise do estado de oxidação dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H), sendo que para este parâmetro os PBDEs estudados também não apresentaram nenhum efeito, como se pode observar pelas figuras 22 e 23, para o BDE-47 e BDE-99, respectivamente.



**Figura 22.** A) Efeito concentração-resposta do BDE-47 sobre os níveis de NAD(P)H em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \*Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. B) Traçados representativos do efeito do BDE-47 sobre a oxidação dos nucleotídeos de piridina. A queda nos níveis de NAD(P)H foi induzida por t-BOOH 300  $\mu\text{mol/L}$ .



**Figura 23.** A) Efeito concentração-resposta do BDE-99 sobre os níveis de NAD(P)H em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (1,0 mg de proteína/mL) incubadas como descrito nos materiais e métodos. Os pontos representam a média  $\pm$  EPM de três determinações com diferentes preparações mitocondriais, relativo ao controle na ausência do composto. \*Resultados estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. Traçados representativos do efeito do BDE-99 sobre a oxidação dos nucleotídeos de piridina. A queda nos níveis de NAD(P)H foi induzida por t-BOOH 300  $\mu\text{mol/L}$ .

## 5. DISCUSSÃO

O fígado é o principal local de metabolismo de substâncias e, portanto, um importante alvo para os efeitos nocivos (JAESCHKE et al., 2002). Além disso, a disfunção mitocondrial é um mecanismo importante e relevante na patogênese de muitos toxicantes em mamíferos, principalmente a toxicidade hepática (AMACHER, 2005).

Com o intuito de investigar possíveis alterações hepáticas induzidas por dois dos principais representantes dos retardantes de chama bromados encontrados no ambiente, BDE-47 e BDE-99, foram realizados ensaios para avaliar as suas interações com as mitocôndrias, uma vez que mitocôndrias hepáticas isoladas constituem um clássico modelo experimental para estudos envolvendo alterações bioenergéticas por agentes tóxicos em geral. Foram realizados estudos avaliando o estado energético e oxidativo de mitocôndrias isoladas de fígado de rato sob influência dos PBDEs em questão.

Os resultados obtidos indicam que os dois PBDEs em estudo apresentam um potencial tóxico sobre os parâmetros bioenergéticos, como observado por Pereira e colaboradores (2013) para o BDE-100, sendo que o BDE-47 apresentou em suas maiores concentrações testadas (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ) a capacidade de interferir com os parâmetros bioenergéticos avaliados e os mesmo efeitos foram observados para o BDE-99, porém apenas na maior concentração (50  $\mu\text{mol/L}$ ) avaliada. Por outro lado, não foi verificada nenhuma influência destes compostos sobre os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo.

Com relação à interação entre o BDE-47 e BDE-99 com a membrana mitocondrial, foi observado que estes apresentaram capacidade de interagir com a membrana mitocondrial interna. De acordo com a análise, houve interação tanto com a parte hidrofílica, caracterizado pelo teste com ANS e TMA-DPH, quanto com a parte lipofílica, cujo teste foi realizado utilizando o marcador DPH.

Estes resultados indicam que o BDE-47 e BDE-99, tetra- e penta bromado respectivamente, podem assumir comportamento anfipático por interagirem com estas duas regiões da membrana. Uma vez que, o DPH é um marcador que se incorpora dentro da região lipofílica da bicamada lipídica, orientando-se em paralelo com os lipídios e assim adquirindo fluorescência (CÁLGARO-HELENA et al., 2006) e também com a porção hidrofílica observada pelo monitoramento com o ANS, uma

vez que este marcador assume ligações com a porção polar dos fosfolipídios e proteínas da superfície de membrana (DORTA et al., 2005).

Estes resultados obtidos podem ser explicados frente à capacidade que os BDE-47 e BDE-99 possuem de se acumularem em células, conforme proposto por Huang e colaboradores (2010), cujo trabalho indica que estes compostos possuem capacidade de se acumularem em células nervosas, sendo que o tetra-BDE se acumulou mais que o penta-BDE. Sendo assim, pode-se esperar que estes compostos possuam a capacidade de se distribuir pela membrana mitocondrial interna e com isso possam promover uma diminuição na fluidez da membrana mitocondrial ocasionando prejuízo nos processos energéticos desta organela, uma vez que os mesmos são sensíveis à organização da membrana.

Este ponto pode ser observado também nos ensaios relacionados com a respiração mitocondrial, pois os dois PBDEs reduziram os parâmetros avaliados para ambos os complexos da cadeia transportadora de elétrons, sendo que a distribuição destes na cadeia é diferente, uma vez que o complexo I é caracterizado por ser transmembrana e o complexo II por situar-se na região lipofílica na membrana mitocondrial interna (NAKAGAWA et al., 2007).

Testes complementares a cerca da respiração mitocondrial foram realizados para determinar qual mecanismo de ação estava ocorrendo a partir da interação dos PBDEs com a cadeia transportadora de elétrons. Os resultados sugerem que o efeito se dá por uma possível inibição da cadeia, já que pôde ser observada uma redução do estado III da respiração, momento em que a mitocôndria está transformando ADP em ATP. Mesmo efeito foi observado por Nakagawa e colaboradores (2007) avaliando a toxicidade do Tetabromo Bisfenol A, sendo que em seu estudo ele também observou uma depleção de ATP e redução no potencial de membrana, os quais foram relacionados com alterações na membrana interna mitocondrial.

Com relação à avaliação de um possível efeito desacoplador dos PBDEs em questão, não foi observado efeito significativo (dados não apresentados). Portanto, a toxicidade do BDE-47 e do BDE-99 está relacionada com sua capacidade de interagir com a membrana mitocondrial interna e assim causar uma interferência na cadeia transportadora de elétrons.

Estas alterações na respiração mitocondrial estão também relacionadas com a perda de potencial de membrana observada em nossos resultados, os quais

mostraram que o BDE-47 em suas maiores concentrações (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ) e o BDE-99 apenas na maior concentração (50  $\mu\text{mol/L}$ ) afetaram significativamente o potencial da membrana. Esta relação respiração/potencial de membrana pode ser visualizada uma vez que a oxidação de substratos presentes na matriz mitocondrial e também fora da mitocôndria ocorre através da atividade da cadeia transportadora de elétrons, que pode também ser definida como um sistema de transporte de elétrons transmembrana. Este sistema transmembrana, por outro lado, promove a transferência de prótons de dentro para fora da mitocôndria com a geração de um potencial de membrana. Do ponto de vista energético, este potencial de membrana eletroquímico é necessário para a síntese de ATP (LA PIANA et al., 1998).

Agentes citotóxicos em geral, incluindo contaminantes emergentes (foco principal deste trabalho) e seus metabólitos, podem influenciar o equilíbrio energético das células pelo aumento de consumo de ATP e/ou redução da síntese do mesmo. Devido a isto, ensaios relacionados à depleção de ATP foram realizados para avaliar se os compostos em estudo afetam este importante mecanismo mitocondrial.

Corroborando com os resultados anteriores, as maiores concentrações testadas do BDE-47 (10, 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ) e BDE-99 (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ) reduziram significativamente a quantidade de ATP como também foi observado por Pereira e colaboradores (2013) em seu trabalho com o BDE-100, no qual foi relatada depleção nos níveis de ATP, bem como interação com a membrana mitocondrial e alteração dos parâmetros respiratórios. Os efeitos neste caso apareceram em concentrações menores àquelas apresentadas nos demais ensaios, indicando que este processo é muito sensível a alterações na homeostasia mitocondrial.

Os congêneres testados também afetaram a homeostase cálcica das mitocôndrias como pode ser observado no ensaio de liberação do cálcio do interior da mitocôndria, avaliado pela marcação com a sonda Calcium Green 5N, na qual o BDE-47 em suas maiores concentrações (25 e 50  $\mu\text{mol/L}$ ) e o BDE-99 na maior concentração (50  $\mu\text{mol/L}$ ) interferiram com este parâmetro, levando a uma liberação excessiva de cálcio durante o monitoramento do teste. Resultado semelhante foi observado no trabalho de Coburn e colaboradores (2008), no qual o BDE-47 também afetou a homeostase cálcica em mitocôndrias isoladas de células nervosas, o que prejudicou o sistema de sinalização celular, indicando que esta classe de compostos pode afetar a homeostase cálcica não apenas no tecido hepático, mas

também em células do sistema nervoso central.

Este efeito sobre a homeostase cálcica deve-se provavelmente ao inchamento mitocondrial induzido por BDE-47 nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{mol/L}$  e do BDE-99 na concentração de 50  $\mu\text{mol/L}$ . Este fenômeno conhecido como swelling mitocondrial, segundo Bernardi e colaboradores (1999) é sempre um processo osmótico que pode ocorrer de acordo com dois mecanismos básicos: A) Eletroforético (energia-dependente) que ocorre sem perda de energia e pode ser regenerado pela respiração mitocondrial ou B) Difusão Passiva causado por um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial decorrente de uma abertura de poro.

Estas alterações no efluxo de cálcio e inchamento mitocondrial estão diretamente relacionadas com perda da permeabilidade da membrana mitocondrial (PMM), pois como indicado no teste com moduladores do swelling, ambos os PBDEs tiveram seu efeito quase que totalmente inibidos na presença destes moduladores. O ensaio com estes moduladores podem indicar possíveis mecanismos de ação dos BDE-47 e BDE-99, como a ação destes compostos na presença de CsA não induziu inchamento, pode-se inferir que na ausência de CsA estes retardantes de chama podem levar ao inchamento via abertura de PTP, uma vez que a CsA impede que a CypD se ligue ao ANT na membrana interna causando a abertura do PTP, levando ao inchamento mitocondrial (RAO; CARLSON; YAN, 2013).

Outro resultado importante com relação ao ensaio de inchamento utilizando a presença de modulares, foi que no teste utilizando RR como inibidor, os BDE-47 e BDE-99 também não causaram inchamento. O que corrobora com o resultado obtido na presença de CsA, pois a abertura de PTP normalmente é dependente de cálcio e conforme observado por Wang e colaboradores (2005), mesmo na presença de 0,1  $\mu\text{mol/L}$  de RR, este composto já é capaz de inibir o canal uniporter de transporte de cálcio. Assim, com este canal bloqueado, não seria possível que ocorra a entrada de cálcio na mitocôndria e conseqüentemente a abertura de PTP.

Com relação ao resultado obtido utilizando o NEM como modulador do inchamento mitocondrial, na presença do mesmo, os compostos em estudo também não causaram inchamento. Isto pode ter ocorrido, pois de acordo com Petronilli e colaboradores (1994) em mitocôndrias isoladas de fígado o NEM atua como um agente de substituição dos grupos sulfidríla, sendo que estes últimos possuem um importante papel como inibidores de alterações na permeabilidade mitocondrial.

Assim, nas condições deste experimento o NEM se comporta como um inibidor de abertura de PTP.

De acordo com a literatura, esta transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) encontrada em nossos ensaios pode ser desencadeada por inúmeros processos fisiológicos e patogênicos tanto em células intactas, quanto em mitocôndrias isoladas (HAJNOCZKY; MADESH, 2003). Sendo que inúmeras respostas estressoras (desregulação cálcica, espécies reativas de oxigênio, estresse genotóxico, ativação de proteases) podem desencadear a TPM, sugerindo que a mitocôndria age como um sensor universal de estresse (ROBERTS; GOPING; BLEACKLEY, 2003).

Portanto, podem-se relacionar os resultados obtidos com os testes de interação com a membrana, respiração, potencial de membrana e movimentação de cálcio com o inchamento mitocondrial observado, pois a abertura do PTP causa alterações nestes parâmetros devido a um desequilíbrio eletroquímico, em consequência deste distúrbio ocorre uma redução nos níveis de ATP mitocondrial (BERNARDI; RASOLA, 2007). Uma vez que a depleção do ATP é um dos eventos iniciais da toxicidade induzida por compostos, como uma consequência da inibição do transporte de elétrons/fosforilação oxidativa, dissipação do potencial de membrana mitocondrial e desregulação da homeostase cálcica (WALLACE; STARKOV, 2000; MINGATTO et al., 2002; KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001).

Parâmetros relacionados com estresse oxidativo também foram analisados. Como já apresentado, os ensaios de formação de espécies reativas de oxigênio, níveis mitocôndrias de grupos sulfidril de proteínas, razão entre os níveis de glutathiona reduzida e oxidada, além do estado redox dos nucleotídeos de piridina não foram afetados pelos congêneres de PBDEs em estudo em nenhuma de suas concentrações.

Portanto, mesmo que classicamente os compostos que causam distúrbios na cadeia transportadora de elétrons possam induzir um aumento na formação de EROs, na presença dos BDE-47 e BDE-99 este efeito não foi observado. Este fato pode ser esperado se consideramos que o mecanismo de ação dos mesmos como retardantes de chama consiste na neutralização dos radicais livres ( $\text{OH}^\bullet$  e  $\text{H}^\bullet$ ) durante a combustão (FROL, 2013), fato que indica que provavelmente os radicais formados durante a inibição da cadeia respiratória sejam prontamente neutralizados pelas moléculas livres dos PBDEs.

Contudo há relatos na literatura que o BDE-47 e o BDE-99 causam estresse oxidativo em células HepG2 levando as células a apoptose (SOUZA et al., 2013; HU et al., 2009). Entretanto, tal discrepância nos achados indica que pode estar ocorrendo uma metabolização desses compostos, pois linhagens de células HepG2 possuem citocromo P-450 (VRBA et al., 2012). Estes compostos são mais tóxicos do que o composto sem metabolização como confirmado por Zhang e colaboradores (2013), cujo trabalho indicou que o principal metabolito ativo do BDE-47, o 3-OH-BDE47 apresenta maior poder de acúmulo de radicais livres do que o BDE-47, após o composto original ser metabolizado pela enzima CYP3A1. Fato que também pode estar ocorrendo com o BDE-99, pois Stapleton e colaboradores (2009) identificaram que este congêneres sofre metabolização mediada pelo CYP3A4, podendo gerar a formação de 2,4,5-tribromofenol e outros compostos ainda não totalmente elucidados como dois metabolitos de estruturas monohidroxiladas contendo bifenilas pentabromadas e ainda um composto tetrabromado também indefinido. Devido a isto pode-se estimar que estes metabolitos possam estar causando distúrbio no estado oxidativo celular.

Em suma, nossos resultados demonstram que os danos decorrentes da exposição mitocondrial aos congêneres de PBDE (BDE-47 e BDE-99) avaliados no presente trabalho, se dão apenas nos parâmetros bioenergéticos, não alterando o estado oxidativo mitocondrial. Outro fator importante é que o BDE-47 apresentou uma maior potência tóxica nos efeitos quando comparado com o BDE-99, pois em todos os parâmetros bioenergéticos testados o BDE-47 apresentou efeito nocivo em concentrações menores que o BDE-99. Esta diferença de toxicidade pode estar relacionada com a quantidade de átomos de bromo, pois modelos estudando a relação de estrutura-atividade de PBDEs têm sido desenvolvidos e mostraram que PBDE com menor bromação, com átomos de bromo na posição orto e sem átomos de bromo na posição meta são geralmente mais tóxicos (HARJU et al., 2007)

Assim, os dados alarmantes de altas concentrações de PBDEs em amostras biológicas no mundo todo têm levantado discussões a respeito da exposição humana a esses poluentes. Nossos resultados mostram que o congêneres testado é capaz de interagir com a membrana mitocondrial, este efeito pode estar relacionado com a formação de poros que leva a uma perda da permeabilidade mitocondrial sem afetar o seu estado oxidativo, porém reduzindo significativamente a quantidade de energia produzida na forma de ATP, o que poderia induzir a morte das células.

A União Europeia, Canadá e muitos estados norte americanos (EUA), como Califórnia, Nova Iorque e Washington já proibiram o uso, produção, importação, comercialização e descarte de algumas classes de PBDEs e produtos contendo os mesmos. Segundo as agências de regulamentação, as classes mais proibidas são tetra- penta-, octa- e principalmente o deca-BDE, além de misturas, polímeros e resinas contendo estas substâncias (Cal/EPA, 2006; CEPA, 2008; BSEF, 2013). Entretanto, no Brasil ainda não há restrições legais para o uso dos PBDEs. Esta grande preocupação ocorre devido aos efeitos tóxicos já citados, sendo a desregulação endócrina e hepatotoxicidade os mais relatados. Finalmente, considerando a toxicidade dos retardantes de chama em diferentes modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, estudos adicionais, em particular no que se refere à hepatotoxicidade com mitocôndrias isoladas de fígado de ratos e hepatócitos, poderão ser úteis no sentido elucidar melhor o mecanismo de toxicidade dessas substâncias.

## 6. CONCLUSÃO

Conclui-se no presente trabalho que o BDE-47 e o BDE-99 interferem sobre a bioenergética mitocondrial, afetando parâmetros como o consumo de oxigênio, o potencial de membrana mitocondrial, a homeostase cálcica e a produção de energia, contudo não interferem com o estado redox desta organela. O BDE-47, tetra-BDE, apresentou maior toxicidade frente aos parâmetros bioenergéticos quando comparado com o BDE-99, penta-BDE, sendo que este maior efeito tóxico está relacionado com a menor quantidade de átomos de bromos presente na estrutura do tetra-BDE. Além disso, deve-se levar em consideração a posição destes átomos de bromo, pois esta também interfere nos mecanismos de ação tóxica destes compostos, tornando importante também o estudo de estrutura-atividade destas substâncias.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIDOVA, S.S.; KHOROSHAEV, V.A.; LEONOV, F.V. Morphofunctional characteristics of the heart mitochondria during adrenergic stimulation and blockade under ketamine anesthesia. **Anesteziol. Reanimatol.**, v. 6, p. 12-15, 1990.

AKERMAN, K.E.O.; WIKSTROM, M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. **Febs Lett.**, v. 68, p. 191-197, 1976.

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

AMACHER, D.E. Drug-associated mitochondrial toxicity and its detection. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 16, p. 1829-1839, 2005.

ANGIONI, S.A.; SCORTICHINI, G.; DILETTI, G.; PERLETTA, F.; CECI, R.; FERRI, N. Study of the toxic effects of flame retardant PBDE-47 on the clam *Chamelea gallina* (Linnaeus, 1758). **Veterinaria Italiana**, v. 49, n. 1, p. 69-77, 2013.

BAZIL, J.N.; BLOMEYER, C.A.; PRADHAN, R.K.; CAMARA, A.K.; DASH, R.K. Modeling the Calcium sequestration system in isolated guinea pig cardiac mitochondria. **J Bioenerg Biomembr**, v. 45, n. 3, p. 177-188, 2013.

BERNARDI, P.; RASOLA, A. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. **Apoptosis**, v. 12, p. 815-833, 2007.

BERNARDI, P.; SCORRANO, L.; COLONNA, R.; PETRONILLI, V.; DI LISA, F. Mitochondria and cell death: Mechanistic aspects and methodological issues. **European Journal Biochemistry**, v. 264, p. 687-701, 1999.

BHATHENA, S.J. Comparison of effects of decapitation and anesthesia on metabolic and hormonal parameters in Sprague-Dawley rats. **Life Sciences**. v. 50, n. 21, p. 1649, 1992.

BIRNBAUM, L.S.; STASKAL, D.F.; DILIBERTO, J.J. Health effects of polybrominated dibenzo-p-dioxins (PBDDs) and dibenzofurans (PBDFs). **Environment International**, v. 29, p. 855-860, 2003.

BRACHT, A.; IWAMOTO, E.L.I. O estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal. In: Métodos de laboratório em bioquímica. 1ª Ed, São Paulo, cap. 9, p. 227-246, 2003.

BRAEKEVELT, E.; TITTEMIER, S.A.; TOMY. Direct measurement of octanol–water partition coefficients of some environmentally relevant brominated diphenyl ether congeners. **Chemosphere** v. 51, n. 7, p. 563-567, 2003.

BRANCA, D.; VAROTTO, M.L.; VINCENTI, E.; SCUTARI, G. The inhibition of calcium efflux from rat liver mitochondria by halogenated anesthetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 155, n. 2, p. 978-83, 1988.

BSEF - Brominated Science and Environmental Forum. European regulation and brominated flame retardants. Disponível em: <http://www.bsef.com/regulation/europe/an-overview-of-european-legislation>. Acessado em: 30/11/2013, 10:35. 2013.

BSEF. Bromine Science and Environmental Forum, Brussels, Belgium, 2000. Disponível em: <http://www.ebfrip.org/>. Acessada em novembro de 2013.

CAIN, K.; SKILLETER, D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (Eds.). **Biochemical Toxicology**. Oxford: IRL Press, p. 217-254, 1987.

Cal/EPA - California Environmental Protection Agency Sacramento, California. Polybrominated diphenyl ethers: recommendations to reduce exposure in California. A Report of the Cal/EPA PBDE Workgroup. 2006.

CÁLGARO-HELENA, A.F.; DEVIENNE, K.F.; RODRIGUES, T.; DORTA, D.J.; RADDI, M.S.; VILEGAS, W.; UYEMURA, S.A.; SANTOS, A.C.; CURTI, C. Effects of isocoumarins isolated from *Paepalanthus bromelioides* on mitochondria: Uncoupling, and induction/inhibition of mitochondrial permeability transition. **Chemico-Biological Interactions**, v. 161, p. 155-164, 2006.

CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; AMES, B.N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 134, p. 111-116, 1983

CEPA - Canadian environmental protection act. Polybrominated Diphenyl Ethers Regulations Canada Gazette Part II, v.142, n.14. p.1665-1682. 2008.

CHANCE, B.; WILLIAMS; G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv. Enzymol.**, v. 17, p. 65-134, 1956.

CHEN, X.; HUANG, C.; WANG, X.; CHEN, J.; BAI, C.; CHEN, Y.; CHEN, X.; DONG, Q.; YANG, D. BDE-47 disrupts axonal growth and motor behavior in developing zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 15, p. 35-44. 2012.

CHEVRIER, J.; HARLEY, K.G.; BRADMAN, A.; GHARBI, M.; SJÖDIN, A.; ESKENAZI, B. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants and thyroid hormone during pregnancy. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 10, 2010.

COBURN, C.G.; CURRÁS-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, n. 2, p. 355-364, 2008.

COSTA, V.Q. Ocorrência de éteres difenilicos polibromados em sedimentos, peixes e mexilhões da Baía de Guanabara. Rio de Janeiro, 2006. **Relatório Anual de Iniciação Científica** – Pontifícia Universidade Católica (PUC-RJ).

DABADIE, P.; BENDRISS, P.; ERNY, P.; MAZAT, J.P. Uncoupling effects of local anesthetics on rat liver mitochondria. **FEBS Letters**. v. 226, n. 1, p. 77-82, 1987.

DANIELS, J.L.; PAN, I.; JONES, R.; ANDERSON, S.; PATTERSON Jr., D.G.; NEEDHAM, L.L.; SJÖDIN, A. Individual characteristics associated with PBDE levels in U.S. human milk samples. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 1, 2010.

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

DEKUTOVICH, G.V.; KARGAPOLOV, A.V. Characteristic effect of local anesthetics on the phospholipid composition of mitochondria. **Vopr. Med. Khim.**, v. 32, n. 6, p. 38-41, 1986.

DIAMOND, J.M.; LATIMER, H.A.2ND.; MUNKITTRICK, K.R.; THORNTON, K.W.; BARTELL, S.M.; KIDD, K.A. Prioritizing Contaminants of Emerging Concern for Ecological Screening Assessments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 30, n. 11, 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**, v. 287, n. 50, p. 42373-42378, 2012.

DORTA, D.J.; PIGOSO, A.A.; MINGATTO, F.E.; RODRIGUES, T.; PRADO, I.M.; HELENA, A.F.; UYEMURA, S.A.; SANTOS, A.C.; CURTI, C. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 152, p. 67-78, 2005.

DRIESSEN, J. J. Neuromuscular and mitochondrial disorders: what is relevant to the anaesthesiologist? **Current Opinion in Anaesthesiology**. v. 21, n. 3, p. 350, 2008.

DUARTE, F.V. Dibenzofuran exposure: cellular and mitochondrial damage. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. 178p. 2012.

EMAUS, R.K.; GRUNWALD, R.; LEMASTERS, J.J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat liver mitochondria: spectral and metabolic properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 850, p. 436-448, 1986.

FAIR, P.A.; STAVROS, H.C.; MOLLENHAUER, M.A.; DEWITT, J.C.; HENRY, N.; KANNAN, K.; YUN, S.H.; BOSSART, G.D.; KEIL, D.E.; PEDEN-ADAMS, M.M. Immune function in female B(6)C(3)F(1) mice is modulated by DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether mixture. **Journal of Immunotoxicology**. v. 9, n. 1, p. 96-107, 2012.

FONTENELE, E.G.P.; MARTINS, M.R.A.; QUIDUTE, A.R.P.; JÚNIOR, R.M.M. Contaminantes Ambientais e os Interferentes Endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2009.

FROL. Flame Retardants Online. Disponível em: <http://www.flameretardants-online.com/web/en/106/7ae3d32234954e28e661e506e284da7f.htm>. Acessado em: 16/11/2013 as 19:18.

HAJNOCZKY, G.; MADESH, M. Calcium signaling and apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, p. 545-554, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, 3ª ed. **Oxford University Press**, New York., 1999.

HARJU, M.; HAMERS, T.; KAMSTRA, J.H.; SONNEVELD, E.; BOON, J.P.; TYSKLIND, M.; ANDERSSON, P.L. Quantitative structure-activity relationship modeling on in vitro endocrine effects and metabolic stability involving 26 selected brominated flame retardants. **Environ Toxicol Chem**. v. 26, n. 4, p. 816-26, 2007.

HAUGAARD, N. Reflections on the role of the thiol group in biology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 148-158, 2000.

HERTSENS, R.; JACOB, W.; VAN BOGAERT, A. Effect of hypnorm, chloralose and pentobarbital on the ultrastructure of the inner membrane of rat heart mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 769, n. 2, p. 411-418, 1984.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, 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 e Technology**, v. 38, p. 945-956, 2004.

HORTON, M.K.; BOUSLEIMAN, S.; JONES, R.; SJODIN, A.; LIU, X.; WHYATT, R.; WAPNER, R.; FACTOR-LITVAK, P. Predictors of serum concentrations of polybrominated flame retardants among healthy pregnant women in an urban environment: a cross-sectional study. **Environmental Health**, v. 12, n. 1, p. 23, 2013.

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

HUANG, P.; LI, J.; ZHANG, S.; CHEN, C.; HAN, Y.; LIU, N.; XIAO, Y.; WANG, H.; ZHANG, M.; YU, Q.; LIU, Y.; WANG, W. Effects of lanthanum, cerium, and neodymium on the nuclei and mitochondria of hepatocytes: accumulation and oxidative damage. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 31, n. 1, p. 25-32, 2011.

HUANG, S.C.; GIORDANO, G.; COSTA, L.G. Comparative cytotoxicity and intracellular accumulation of five polybrominated diphenyl ether congeners in mouse cerebellar granule neurons. **Toxicol Sci**, v. 114, n. 1, p. 124-132, 2010.

HUNTER Jr., F.E.; FORD, L. Inactivation of oxidative and phosphorylative system in mitochondria by preincubation with phosphate and others ions. **The Journal of biological chemistry**. v. 216, p. 357-369, 1955.

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 e Technology**, v. 36, p. 1886-1892, 2002.

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

JOCELYN, P.C. Spectrophotometric assay of thiols. **Methods in Enzymology**, v. 143, p. 44-67, 1987.

KATER, J.M. Sodium amytal for anesthesia in studies on mitochondria. **Science**, v. 82, n. 2124, p. 256, 1935.

KOENIG, C.M.; LANGO, J.; PESSAH, I.N.; BERMAN, R.F. Maternal transfer of BDE-47 to offspring and neurobehavioral development in C57BL/6J mice. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 34, n. 6, p. 571-580. 2012.

KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, v. 495, p. 12-15, 2001.

LA PIANA, G.; FRANSVEA, E.; MARZULLI, D.; LOFRUMENTO, N.E. Mitochondrial membrane potential supported by exogenous Cytochrome c oxidation Mimics the Early stages of apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, p. 556-561, 1998.

LAPIDUS, R.G.; SOKOLOVE, P.M. The mitochondrial permeability transition: Interactions of Spermine, ADP, and Inorganic Phosphate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 29, p. 18931-18936, 1994.

LEE, R.V.; SILBERBERG, H.; HARDY, M.; STEDEFORD, T. Fecundability and serum PBDE concentrations in women. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 8, 2010.

LEMASTERS, J.J. Mechanisms of hepatic toxicity V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. **American Journal of Physiology**, v. 276, n. 1, p. 1-6, 1999.

LEMASTERS, J.J.; DIGIUSEPPI, J.; NIEMINEM, A.L.; HERMAN, B. Blebbing. free calcium and mitochondrial membrane potential preceding cell death hepatocytes. **Nature**, v. 325, p. 78-81, 1987.

LENAZ, G.; CURATOLA, G.; MAZZANTI, L.; PARENTI-CASTELLI, G.; BERTOLI, E. Effects of general anesthetics on lipid protein interactions and ATPase activity in mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 27, n. 24, p. 2835-2844, 1978.

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

LOOP, T.; DOVI-AKUE, D.; FRICK, M.; ROESSLEIN, M.; EGGER, L.; HUMAR, M.; HOETZEL, A.; SCHMIDT, R.; BORNER, C.; PAHL, H.L.; GEIGER, K.K.; PANNEN, B.H. Volatile anesthetics induce caspase-dependent, mitochondria-mediated apoptosis in human T lymphocytes in vitro. **Anesthesiology**, v. 102, n. 6, p. 1147, 2005.

MATAMOROS, V.; SALA, L.; SALVADÓ, V. Evaluation of a biologically-based filtration water reclamation plant for removing emerging contaminants: a pilot plant study. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 243-249, 2012.

MAZZANTI, L.; CURATOLA, G.; ZOLESE, G.; BERTOLI, E.; LENZA, G. Lipid protein interactions in mitochondria. VIII. Effect of general anesthetics on the mobility of spin labels in lipid vesicles and mitochondrial membranes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 11, n. 1-2, p. 17-32, 1979.

MINGATTO, F.E.; RODRIGUES, T.; PIGOSO, A.A.; UYEMURA, S.A.; CURTI, C.; SANTOS, A.C. The critical role of mitochondrial energetic impairment in the toxicity of nimesulide to hepatocytes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 601-607, 2002.

MIRÓ, O.; BARRIENTOS, A.; ALONSO, J.R.; CASADEMONT, J.; JARRETA, D.; URBANO-MÁRQUEZ, A.; CARDELLACH, F. Effects of general anaesthetic procedures on mitochondrial function of human skeletal muscle. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 55, n. 1, p. 35-41, 1999.

NAKAGAWA, Y.; SUZUKI, T.; ISHII, H.; OGATA, A. Biotransformation and cytotoxicity of a brominated flame retardant, tetrabromobisphenol A, and its analogues in rat hepatocytes. **Xenobiotica**, v. 37, n. 7, p. 693-708, 2007.

NASH, J.T.; SZABO, D.T.; CAREY, G.B. Polybrominated diphenyl ethers alter hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase enzyme kinetics in male Wistar rats: implications for lipid and glucose metabolism. **Journal of Toxicological Environmental Health**, v. 76, n. 2, p. 142-156, 2013.

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.

NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. Bioenergetics 2. **Academic Press Inc.**: London, 1982.

OLIVEIRA, H.C.; COSSO, R.G.; ALBERICI, L.C.; MACIEL, E.N.; SALERNO, A.G.; DORIGHELLO, G.G.; VELHO, J.A.; DE FARIA, E.C.; VERCESI, A.E. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. **The FASEB Journal**, v. 19, p. 278-280, 2005.

OTERA, H.; ISHIHARA, N.; MIHARA, K. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, n. 5, p. 1256-1268, 2013.

PARDO-ANDREU, G.L.; NUÑEZ-FIGUEREDO, Y.; TUDELLA, V.G.; CUESTA-RUBIO, O.; RODRIGUES, F.P.; PESTANA, C.R.; UYEMURA, S.A.; LEOPOLDINO, AM.; ALBERICI, L.C.; CURTI C. The anti-cancer agent nemorosone is a new potent protonophoric mitochondrial uncoupler. **Mitochondrion**, v. 11, n. 2, p. 255-263. 2011.

PEDERSEN, P.L.; GREENAWALT, J.W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G.L.; SOPER, J.W.; BUSTAMENTE, E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Methods in Cell Biology**, v. 20, p. 411-481, 1978.

PENA-ABAURREA, M.; RAMOS, J.J.; GONZALEZ, M.J.; RAMOS, L. Miniaturized selective pressurized liquid extraction of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers from feedstuffs. **Journal of Chromatography A**, v. 1273, p. 18-25, 2013.

PEREIRA, L.C.; SOUZA, A.O.; DORTA, D.J. Polybrominated Diphenyl Ether Congener (BDE-100) Induces Mitochondrial Impairment. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 112, n. 6, p. 418-424, 2013.

PEREIRA, L.C.; SOUZA, A.O.; PAZIN, M. DORTA, D.J. Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 25, n. 1, p. 1-14, 2012.

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

PETRONILLI, V.; COSTANTINI, P.; SCORRANO, L.; COLONNA, R.; PASSAMONTI, S.; BERNARDI, P. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. **J Biol Chem**, v. 269, n. 24, p. 16638-41662, 1994.

PORTER Jr., G.A.; HOM, J.; HOFFMAN, D.; QUINTANILLA, R.; BENTLEY, K.M.; SHEU, S.S. Bioenergetics, mitochondria, and cardiac myocyte differentiation. **Progress in Pediatric Cardiology**, v. 31, n. 2, p. 75-81, 2011.

RAFAŁOWSKA, U. Transport of malate and citrate into rat brain mitochondria under hypoxia and anesthesia. **Neurochemical Research**, v. 4, n. 3, p. 355-364, 1979.

RAJDEV, S.; REYNOLDS, I.J. Calcium green-5N, a novel fluorescent probe for monitoring high intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentrations associated with glutamate excitotoxicity in cultured rat brain neurons. **Neuroscience Letters**, v. 162, p. 149-152, 1993.

RANA, A.; RERA, M.; WALKER, D.W. Parkin overexpression during aging reduces proteotoxicity, alters mitochondrial dynamics, and extends lifespan. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 110, n. 21, p. 8638-8643, 2013.

RAO, V.K.; CARLSON, E.A.; YAN, S.S. Mitochondrial permeability transition pore is a potential drug target for neurodegeneration. **Biochim. Biophys. Acta. In Press** <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.09.003>, 2013.

RAVICHANDRAN, S.; BOULDIN, R.M.; KUMAR, J.; NAGARAJAN, R. A renewable waste material for the synthesis of a novel non-halogenated flame retardant polymer. **Journal of Cleaner Production**, v. 19, p. 454-458, 2011.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Reactive oxygen species on plant defense responses to pathogens. **Fitopatol. Bras.** v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

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

ROBERTS, D.L.; GOPING, I.S.; BLEACKLEY, R.C. Mitochondrial at the heart of the cytotoxic attack. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, p. 513-518, 2003.

RODIL, R.; QUINTANA JB.; CONCHA GRANÃ E.; LÓPEZ-MAHÍA P.; MUNIATEGUI-LORENZO S.; PRADA-RODRIGUEZ D. Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). **Chemosphere**, v. 86, p. 1040-1049, 2012.

ROTTENBERG, H. Uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria by general anesthetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.** v. 80, n. 11, p. 3313-3317, 1983.

SACKS, V. P.; LOHMAN, R. Freely dissolved PBDEs in water and porewater of an urban estuary. **Environmental Pollution**, v. 162, p. 287-293, 2012.

SCHEFFLER, I.E. Mitochondria: make a come back. **Adv Drug Deliv Ver**, v. 49, p. 3-26, 2001.

SHE, Y.Z.; WU, J.P.; ZHANG, Y.; PENG, Y.; MO, L.; LUO, X.J.; MAI, B.X. Bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers and several alternative halogenated flame retardants in a small herbivorous food chain. **Environmental Pollution**, v. 174, p. 164-170, 2013.

SIDDIQI, M.A.; LAESSIG, R.H.; REED, K.D. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs): New Pollutants–Old Diseases. **Clinical Medicine and Research Marshfield**, v. 1, n. 4, p. 281-290, 2003.

SJÖDIN, A.; HAGMAR, L.; WEHLER, E. K.; DIAB, K. K.; JAKOBSSON, E.; BERGMAN, A. Flame retardant exposure: polybrominated diphenyl ethers in blood from Swedish workers. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, p. 643-648, 1999.

SLOTKIN, T.A., CARD, J.; INFANTE, A.; SEIDLER, F.J. BDE99 (2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether) suppresses differentiation into neurotransmitter phenotypes in PC12 cells. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 37, p. 13-17, 2013.

SOUZA, A.F.M.; GIUGLIANI, R. Doenças Mitocondriais. In: Carakushanski E. Doenças Genéticas em Pediatria. **Ed. Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, p. 189-195, 2001.

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, n. 2, p. 580-587, 2013.

SRINIVASAN, S.; AVADHANI, N.G. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 53, p. 1252-1263, 2012.

STAPLETON, H.M.; KELLY, S.M.; PEI, R.; LETCHER, R.J.; GUNSCH, C. Metabolism of Polibrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) by Human Hepatocytes in Vitro. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 2, p. 197-202, 2009.

STOWE, D.F.; CAMARA, A.K. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 6, p. 1373-1414, 2009.

TALNESS, C.E. Overview of toxicological aspects of polybrominated diphenyl ethers: A flame-retardant additive in several consumer products. **Environmental Research**, v. 108, p. 158-167, 2008.

THORE, A. Technical aspects of bioluminescent firefly luciferase assay of ATP. **Science Tools**, v. 26, n. 2, p. 30-34, 1979.

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

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. **Apoptosis**, v. 12, p. 835-840, 2007.

TSYGANIĬ, A.A.; MEDVINSKAIA, N.A. Characteristics of the change in oxidative phosphorylation in the mitochondria of various organs under nitrous oxide anesthesia. **Farmakologija i toksikologija**, v. 47, n. 4, p. 30-33, 1984.

TURRENS, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Bioscience Reports**, v. 17, p. 3-8, 1997.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 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.

VRBA, J.; KREN, V.; VACEK, J.; PAPOUSKOVA, B.; ULRICHOVA, J. Quercetin, quercetin glycosides and taxifolin differ in their ability to induce AhR activation and CYP1A1 expression in HepG2 cells. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 11, p. 1746-1752, 2012.

WALLACE, K.B.; STARKOV, A.A. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 40, p. 353-388, 2000.

WANG, C.; LIN, Z.; DONG, Q.; LIN, Z.; LIN, K.; WANG, J.; HUANG, J.; HUANG, X.; HE, Y.; HUANG, C.; YANG, D.; HUANG, C. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in human serum from Southeast China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 206-211, 2012.

WANG, Y.; PERCHELLET, E.M.; WARD, M.M.; LOU, K.; HUA, D.H.; PERCHELLET, J.P. Rapid collapse of mitochondrial transmembrane potential in HL-60 cells and isolated mitochondria treated with anti-tumor 1,4-anthracenediones. **Anticancer Drugs**, v. 16, n. 9, p. 953-967, 2005.

WATANABE, I.; SAKAI, S.I. Environmental release and behavior of brominated flame retardants. **Environment International**, v. 23, p. 665-682, 2003.

YU, L.; LAM, J.C.W.; GUO, Y.; WU, R.S.S.; LAM, P.K.S.; ZHOU, B. Parental transfer of polybrominated diphenyl ethers (pbdes) and thyroid endocrine disruption in zebrafish. **Environmental Science e Technology**, v. 45, p. 10652-10659, 2011.

ZHANG, Z.; ZHANG, X.; SUN, Z.; DONG, H.; QIU, L.; GU, J.; ZHOU, J.; WANG, X.; WANG, S.L. Cytochrome P450 3A1 mediates 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether-induced reduction of spermatogenesis in adult rats. **PLoS One**. v. 8, n. 6, p. e66301, 2013.

ZHU, Y.; KALEN, A.L.; LI, L.; LEHMLER, H.J.; ROBERTSON, L.W.; GOSWAMI, P.C.; SPITZ, D.R.; AYKIN-BURNS, N. Polychlorinated-biphenyl-induced oxidative stress and cytotoxicity can be mitigated by antioxidants after exposure. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, p. 1762-1771, 2009.

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

ZORATTI, M.; SZABO, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1241, p. 139-176, 1995.