UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

MURILO PAZIN SILVA

**Avaliação toxicológica e ecotoxicológica dos principais
representantes de éteres de difenilas polibromadas (PBDEs)**

Ribeirão Preto

2018

MURILO PAZIN SILVA

**Avaliação toxicológica e ecotoxicológica dos principais
representantes de éteres de difenilas polibromadas (PBDEs)**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Manuel Marques
Palmeira

Ribeirão Preto

2018

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.

Ficha Catalográfica

Silva, Murilo Pazin

Avaliação toxicológica e ecotoxicológica dos principais representantes de éteres de difenilas polibromadas (PBDEs), 2018.

85 p.

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Dorta, Daniel Junqueira.

Co-orientador: Palmeira, Carlos Manuel Marques

1. PBDEs. 2. Autofagia. 3. HepG2. 4. Zebrafish. 5. Ecotoxicidade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Silva, Murilo Pazin

Título: Avaliação toxicológica e ecotoxicológica dos principais representantes de éteres de difenilas polibromadas (PBDEs)

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

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 avó

Dedico este trabalho à estrela mais brilhante que já pisou em nosso planeta, mas infelizmente ela precisou voltar para casa. Dona Dita foi uma mulher forte, de um coração bondoso, que levou alegria a todos os lugares por onde passou e sempre levando uma palavra de apoio aos que necessitavam. A senhora está fazendo muita falta!

À minha mãe

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

À minha esposa

Dedico por último, mas não menos importante, à minha esposa Heloísa que é um anjo em minha vida, sempre cuidadosa e carinhosa. Com certeza sem ela este trabalho jamais seria completado, pois em todos os momentos difíceis ela estava sempre ao meu lado. A melhor coisa do mundo é poder dizer que sua esposa é sua melhor amiga!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta por confiar e acreditar no meu potencial, além de fornecer oportunidades impares que foram de suma importância para minha formação científica.

Agradeço imensamente a colaboração de meus colegas de laboratório Maria Julia Tasso, Lilian Pereira, Mariana Bernardes, Alana Oliveira, Raissa Ferrari, Flávia Abe, Klaus Accoroni, Gabriela Meireles, Otávio Rocha, Camila Mini, Tamires Brigante, Maíra Prado, Sonia Dreossi por seus ensinamentos fundamentais para execução deste trabalho e pela ótima companhia no dia a dia.

Meu muito obrigado a Raul Miranda, companheiro de pesquisa que pude dividir muitas horas de trabalho e claro com muita risada.

Digo meu muito obrigado ao professor catedrático Carlos M. M. Palmeira pela notável colaboração com o projeto, orientando e cedendo seu laboratório na Universidade de Coimbra, onde foram realizadas muitas as etapas deste trabalho. E também aos companheiros portugueses que tive o imenso prazer de conviver por um ano, Filipe Duarte, Ana Varela, João Rito e João Soeiro, muito obrigado pela hospitalidade porreiríssima, vocês são muito fixes.

Faço aqui um agradecimento especial à professora Dra. Danielle Palma de Oliveira pela imensa contribuição desde o início deste trabalho, aconselhando tanto na parte teórica, quanto cedendo seu laboratório de Toxicologia Ambiental para realização dos ensaios em zebrafish.

Agradeço as Agências de Fomento: CNPq e CAPES, pelo auxílio financeiro concedido a este projeto.

RESUMO

SILVA, M.P. **Avaliação toxicológica e ecotoxicológica dos principais representantes de éteres de difenilas polibromadas (PBDEs)**. 2018. 85f. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Os éteres de difenilas polibromados (PBDEs) são largamente usados como retardantes de chama e têm sido detectados em diversas amostras biológicas, devido às suas características físico-químicas e bioacumuladoras, as quais fazem com que estes compostos tenham uma elevada persistência no meio ambiente. A exposição a estes compostos pode ser nociva ao homem e aos organismos vivos, uma vez que muitos estudos têm relatado que este composto possui atividade citotóxica. Desta forma, no presente estudo, investigamos o mecanismo de ação dos BDE-47, BDE-99, BDE-154 e BDE-209 sobre o processo autofágico de células HepG2, pois além de ser um processo de reciclagem de moléculas intracelular, a autofagia atua ainda na citoproteção celular. Foram realizados ensaios de imunocitoquímica para detecção de alterações no processo autofágico, no qual foi avaliado, sob microscopia de fluorescência, o padrão de distribuição das proteínas LC3-I e LC3-II; paralelamente, foi realizada a técnica de *western blotting* para a quantificação de três proteínas associadas ao processo de autofagia - LC3, Beclin-1 e p62. Em nossas análises de imunocitoquímica pode-se observar que os quatro PBDEs em estudo foram capazes desencadear o processo de autofagia, sendo que a magnitude do efeito tóxico foi dependente do tempo de exposição (24 e 48 horas), da concentração utilizada (0,1; 1; 5; 25 $\mu\text{mol/L}$) e variável de acordo com o congêneres em questão, sendo os BDE-47 e BDE-99 os que apresentaram maior potencial de ativação da autofagia. Além disso, esta indução de autofagia ainda pode ser detectada nos ensaios de *western blotting*, pois os PBDEs alteraram os níveis de LC3-II, Beclin-1 e p62, havendo um padrão de toxicidade semelhante ao visualizado nos ensaios de imunocitoquímica. Adicionalmente, devido ao fato dos PBDEs poderem se acumular no meio ambiente, principalmente em organismos aquáticos, uma análise dos efeitos destes compostos sobre um modelo ecotoxicológico foi realizada. O zebrafish (*D. rerio*) foi utilizado como organismo-teste, a fim de avaliar a toxicidade destes contaminantes ambientais sobre seus estágios embrionários e larvais. Foram analisados endpoints de letalidade, subletalidade e teratogenicidade após a exposição aos PBDEs em estudo. Sendo que os compostos BDE-47, BDE-99 e BDE-209 (na presença de luz) apresentaram alterações em pelo menos um dos indicadores avaliados, sendo que o parâmetro mais afetado foi a inflação das bexigas natatórias, indicando uma possível teratogenicidade causada por estes compostos. Por outro lado, os BDE-154 e BDE-209 (na ausência de luz) não causaram malformações no organismo-teste. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que estes compostos podem causar alterações na homeostase celular desencadeando o processo autofágico, sendo que se absorvidos por organismos, podem afetar o desenvolvimento de espécies como o zebrafish.

Palavras-chave: PBDEs. Autofagia. HepG2. Zebrafish. Ecotoxicidade.

ABSTRACT

SILVA, M.P. **Toxicological and Ecotoxicological evaluation of the main polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)**. 2018. 85f. Thesis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are widely used as flame retardants and they have been detected in several biological samples due to their physicochemical and bioaccumulating characteristics, which make these compounds to have a high persistence in the environment. The exposure to these compounds can be harmful to man and other living organisms, since many studies have reported that this compound has cytotoxic activity. Thus, in the present study, we investigated the mechanism of action of the BDE-47, the BDE-99, the BDE-154 and the BDE-209 on the autophagic process of HepG2 cells, because beyond being an intracellular molecule recycling process, autophagy acts also in the cell cytoprotection. Immunocytochemistry assays were performed to detect changes in the autophagic process, in which the distribution pattern of the LC3-I and LC3-II proteins was evaluated under fluorescence microscopy. In parallel, the western blotting technique was used to quantify three proteins associated with the autophagy process - LC3, Beclin and p62. In our analyzes of immunocytochemistry it can be observed that the four PBDEs in the study were able to trigger the autophagy process, and the magnitude of the toxic effect was dependent on the exposure time (24 and 48 hours), on the used concentration (0.1; 1; 5; 25 $\mu\text{mol/L}$), and it varies according to the congener. The BDE-47 and BDE-99 are the ones with the highest potential for autophagy activation. In addition, this autophagy induction can still be detected in the western blotting assays, because the PBDEs altered the levels of LC3-II, Beclin-1 and p62, with a similar pattern of toxicity as seen in the immunohistochemical assays. In addition, due to the fact that PBDEs may accumulate in the environment, mainly in aquatic organisms, an analysis of the effects of these compounds on an ecotoxicological model was performed. The Zebrafish (*D. rerio*) was used as a test organism in order to evaluate the toxicity of these environmental contaminants on their embryonic and larval stages. In this study, lethality, sublethality and teratogenicity endpoints were analyzed after exposure to the PBDEs. The BDE-47, BDE-99 and BDE-209 compounds (in the presence of light) presented alterations in at least one of the indicators evaluated, and the most affected parameter was the swim bladder inflation, indicating a possible teratogenicity caused by these compounds. On the other hand, the BDE-154 and the BDE-209 (in the absence of light) did not cause malformations in the test organism. Considering the results, it can be concluded that these compounds are able to cause changes in cellular homeostasis triggering the autophagic process, and whether absorbed by organisms, they can affect the development of species such as zebrafish.

Keywords: PBDEs. Autophagy. HepG2. Zebrafish. Ecotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química geral dos PBDEs e as estruturas químicas dos PBDEs analisados no presente trabalho.....	4
Figura 2. Esquema representativo dos processos autofágicos.	10
Figura 3. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-47 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre a porcentagem de células que apresentaram padrão de aglomeração da proteína LC3-II na membrana do autofagossomo após 24 e 48 horas de exposição	24
Figura 4. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-47 sem a adição de wortamanina no tempo de exposição de 24 horas.	25
Figura 5. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-47 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 24 horas.	26
Figura 6. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-47 sem a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas.	27
Figura 7. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-47 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas.	28
Figura 8. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-47 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína LC3 de células HepG2, após 24 e 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de <i>western-blotting</i>	30
Figura 9. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-47 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína Beclin-1 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de <i>western-blotting</i>	31
Figura 10. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-47 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína p62 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de <i>western-blotting</i>	32
Figura 11. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-99 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre a porcentagem de células que apresentaram padrão de aglomeração da proteína LC3-II na membrana do autofagossomo após 24 e 48 horas de exposição	34
Figura 12. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-99 sem a adição de wortamanina no tempo de exposição de 24 horas.	35
Figura 13. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-99 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 24 horas.	36
Figura 14. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-99 sem a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas.	37

Figura 15. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-99 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas. 38

Figura 16. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-99 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína LC3 de células HepG2, após 24 e 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*..... 39

Figura 17. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-99 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína Beclin-1 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting* 40

Figura 18. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-99 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína p62 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*..... 41

Figura 19. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-154 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre a porcentagem de células que apresentaram padrão de aglomeração da proteína LC3-II na membrana do autofagossomo após 24 e 48 horas de exposição 42

Figura 20. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-154 sem a adição de wortamanina no tempo de exposição de 24 horas 43

Figura 21. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-154 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 24 horas 44

Figura 22. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-154 sem a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas 45

Figura 23. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-154 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas 46

Figura 24. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-154 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína LC3 de células HepG2, após 24 e 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*..... 47

Figura 25. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-154 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína Beclin-1 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting* 48

Figura 26. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-154 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína p62 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*..... 49

Figura 27. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-209 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre a porcentagem de células que apresentaram padrão de aglomeração da proteína LC3-II na membrana do autofagossomo após 24 e 48 horas de exposição 51

Figura 28. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-209 sem a adição de wortamanina no tempo de exposição de 24 horas	52
Figura 29. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-209 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 24 horas	53
Figura 30. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-209 sem a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas	54
Figura 31. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-209 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas	55
Figura 32. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-209 (0,1; 1; 5 e 25 μ mol/L) sobre o conteúdo da proteína LC3 de células HepG2, após 24 e 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de <i>western-blotting</i>	56
Figura 33. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-209 (0,1; 1; 5 e 25 μ mol/L) sobre o conteúdo da proteína Beclin-1 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de <i>western-blotting</i>	57
Figura 34. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-209 (0,1; 1; 5 e 25 μ mol/L) sobre o conteúdo da proteína p62 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de <i>western-blotting</i>	58
Figura 35. Taxa de letalidade dos embriões/larvas de zebrafish (média $\pm$ EPM de 20 organismos) após a exposição aos PBDEs em estudo	64
Figura 36. Taxa de letalidade dos embriões/larvas de zebrafish	65
Figura 37. Fotomicrografias (magnificação 30x) ilustrativas das larvas de <i>Danio rerio</i> (zebrafish) com 96 hpf após exposição ao BDE-209 sob fotoperíodo	65
Figura 38. Taxa de subletalidade dos embriões/larvas de zebrafish (média $\pm$ EPM de 20 organismos) após a exposição aos PBDEs em estudo	66
Figura 39. Taxa de subletalidade dos embriões/larvas de zebrafish	67
Figura 40. Fotomicrografias (magnificação 30x) ilustrativas das larvas de <i>Danio rerio</i> (zebrafish) com 96 hpf após exposição ao BDE-47	67
Figura 41. Taxa de teratogenicidade dos embriões/larvas de zebrafish (média $\pm$ EPM de 20 organismos) após a exposição aos PBDEs em estudo	68
Figura 42. Taxa de bexigas natatórias infladas nos embriões/larvas de zebrafish (média $\pm$ EPM de 20 organismos) após a exposição aos PBDEs em estudo	69
Figura 43. Fotomicrografias (magnificação 30x) ilustrativas das larvas de <i>Danio rerio</i> (zebrafish) com 144 hpf após exposição ao BDE-47	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	-	Análise de variância
ATG	-	<i>Autophagy-related genes</i>
BDE	-	Éter de difenila
BSA	-	Albumina sérica bovina
CE ₅₀	-	Concentração Efetiva em 50%
CL ₅₀	-	Concentração Letal em 50%
CEUA	-	Comissão de Ética no Uso de Animais
CN	-	Controle negativo
CONAMA	-	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP	-	Controle positivo
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	-	Erro padrão da média
FET	-	<i>Fish Embryo Acute Toxicity</i>
hpf	-	Horas pós-fertilização
IT	-	Intervalo terapêutico
Kow	-	Coeficiente de partição octanol/água
NOAA	-	<i>National Oceanic and Atmospheric Administration</i>
OECD	-	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PBDE	- Éter de difenila polibromada
PBS	- Tampão fosfato-salino
PCB	- Bifenila policlorada
PE	- Fosfatidiletanolamina
pH	- Potencial hidrogeniônico
PI(3)P	- Fosfatidilinositol-3-fosfato
PI3KIII	- Fosfatidilinositol-3-quinase de classe III
POP	- Poluentes orgânicos persistentes
PVDF	- Fluoreto de polivinilideno
UE	- União Europeia
USEPA	- <i>United States Environmental Protection Agency</i>
USGS	- <i>United States Geological Survey</i>
UV	- Ultra-violeta

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Contaminantes emergentes	1
1.2 PBDEs: Aspectos gerais e toxicidade	4
1.3 Bioensaios em análises toxicológicas	7
1.3.1 Autofagia	8
1.3.2 Zebrafish	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivos Específicos	16
3 METODOLOGIA	17
3.1 Experimentos em células HepG2	17
3.1.1 Imunocitoquímica para análise da proteína LC3 por Microscopia de Fluorescência.....	18
3.1.2 Análises de immunoblotting de proteínas marcadoras do processo autofágico – <i>western blotting</i>	19
3.2 Ensaio de toxicidade utilizando o modelo experimental do zebrafish.....	20
3.2.1 Organismo teste: manutenção e aquisição de ovos.....	20
3.2.2 Ensaio de toxicidade aguda com estágio embrio-larval de zebrafish	21
3.3 Análise Estatística	22
4 RESULTADOS – AUTOFAGIA	23
5 DISCUSSÃO – AUTOFAGIA.....	59
6 RESULTADOS - ZEBRAFISH	63
7 DISCUSSÃO – ZEBRAFISH.....	71
8 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contaminantes emergentes

No mundo todo há um número crescente de compostos sintéticos que têm sido produzidos para uso industrial, doméstico e agrícola. No entanto, além do fato de que muitos chegam ao ambiente como contaminantes e atingem, assim, diversos ecossistemas, muitos destes possuem a capacidade de interferir negativamente com o meio. Um dos grandes problemas relacionados à utilização destes compostos está no descarte dos mesmos no ambiente através de efluentes domésticos e industriais, caso não haja um tratamento adequado destes resíduos; outra forma de atingirem o ambiente é pelo uso na agricultura, onde, além de atingirem o solo, podem sofrer processos de lixiviação e serem transportados até águas superficiais ou subterrâneas (MURRAY; THOMAS; BODOUR, 2010). Estes compostos ainda podem ser transportados pelo ar, causando diversos problemas de saúde nas populações (BESIS et al., 2017).

Quando chegam ao ambiente, os contaminantes podem ser afetados por diversos processos bióticos e abióticos, os quais podem alterar seu destino e comportamento. Após esta interação com o meio, alguns destes compostos podem ter sua toxicidade reduzida, porém, alguns apresentam resistência aos processos de degradação e podem permanecer em determinado ecossistema por muito tempo. Mesmo que seja lançado em concentrações muito baixas, esta permanência no ecossistema pode levar à bioacumulação e/ou à biomagnificação em diversas espécies podendo causar um impacto nocivo a todo o ecossistema no qual se encontra (COSTA e OLIVI, 2008).

Muitos destes compostos presentes em resíduos descartados além de não estarem regulamentados de acordo com os níveis de potabilidade da água do Brasil, também não estão contemplados na Resolução CONAMA n. 396 (BRASIL, 2008) que dispõe sobre os níveis permitidos de alguns compostos (metais, solventes, praguicidas, entre outros) em águas subterrâneas. Isto ocorre, pois os perfis toxicológicos destes compostos ainda não estão completamente elucidados, o que gera uma insegurança acerca da presença de contaminantes, potencialmente tóxicos, no ambiente (BRASIL, 2008; UMBUZEIRO, 2012). Diante disso e frente à enorme quantidade de compostos lançados no meio ambiente, estudos de

toxicologia ambiental têm voltado sua atenção para análise do potencial tóxico e determinação dos níveis seguros dos mesmos. Dentre os compostos visados nestas análises, encontramos um grupo que é atualmente classificado como contaminantes emergentes (RICHARDSON e KIMURA, 2016).

Os contaminantes emergentes, que podem ser de origem sintética ou natural, receberam esta denominação devido ao recente interesse na avaliação de seu potencial tóxico para humanos ou para ecossistemas aquáticos e terrestres. Apesar da recente definição e interesse na análise, tais compostos abrangem grupos tanto de substâncias descobertas recentemente, como aqueles cuja utilização é conhecida já há algum tempo (DIAMOND et al., 2011; RODIL et al., 2012).

Graças à crescente produção/utilização mundial de compostos classificados como contaminantes emergentes, uma monitorização destes no ambiente faz-se necessária, particularmente na água, devido à grande extensão de ação e deslocamento destes compostos, além das preocupações ecotoxicológicas (RODIL et al., 2012). Para tal, as agências de vigilância ambiental como a Agência Nacional de Administração Oceânica e Atmosférica dos Estados Unidos (NOAA - *National Oceanic and Atmospheric Administration*), a Agência de Pesquisa Geológica dos Estados Unidos (USGS - *United States Geological Survey*), e a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA – *United States Environmental Protection Agency*) têm dispendido milhões de dólares e muito esforço para monitorar compostos químicos presentes em águas superficiais, sedimentos e organismos vivos (DIAMOND et al., 2011).

O número de grupos classificados como contaminantes emergentes aumenta a cada ano e novos trabalhos acerca da classificação de tais compostos são feitos periodicamente, os quais podem ser encontrados no website do grupo NORMAN (www.norman-network.net/?q=node/19) - uma rede de laboratórios, centros de pesquisa e organizações relacionadas para o monitoramento de substâncias ambientais emergentes (NORMAN Network, 2016) -, ou então nas revisões feitas por Richardson e seus colaboradores (RICHARDSON, 2012; RICHARDSON e KIMURA, 2016; RICHARDSON e TERNES, 2014). Dentre os contaminantes emergentes podemos encontrar: retardantes de chama, produtos farmacêuticos, plastificantes, agentes tensoativos, praguicidas, filtros UV, entre outros (MATAMOROS et al., 2012).

Os retardantes de chama são a classe de interesse do presente trabalho. De acordo com pesquisas recentes, existem mais de 200 tipos diferentes de retardantes de chama (BSEF, 2016). Sendo que o consumo global destes compostos em 2013 e 2014 foi de, aproximadamente, 1,8 e 1,9 toneladas/ano, respectivamente. Ainda se espera que em 2019 o consumo deverá atingir a marca de 2,6 toneladas/ano (BCC Research, 2015).

Esta classe de compostos pode ser dividida em quatro principais grupos, são eles: sais inorgânicos (ex. trióxido de antimônio, hidróxido de alumínio e borato); compostos de fósforo (ex. organofosfatos, halofosfato, óxidos de fosfina e fósforo vermelho); compostos à base de nitrogênio (ex. melamina e seus derivados); e compostos orgânicos halogenados (ex. compostos aromáticos bromados) (FROMME et al., 2016).

Dentro da classe de compostos aromáticos bromados temos um grupo que foi classificado em 2005 como sendo contaminante emergente, os éteres de difenilas polibromadas (PBDEs) (RICHARDSON e TERNES, 2005). Estes compostos merecem uma atenção especial, pois possuem um alto potencial de deslocamento a longas distâncias (acima 1000 km) e elevada persistência no meio ambiente, pois são, em sua maioria, resistentes à degradação; além de serem muito lipofílicos devido ao elevado coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow} > 5$), possibilitando com que ocorra bioacumulação e biomagnificação nos organismos (CHEN et al., 2012b; SHE et al., 2013).

Outro fator que gerou preocupação acerca da toxicidade dos PBDEs está relacionado às suas características físicas, químicas e bioacumulativas semelhantes às amplamente estudadas bifenilas policloradas (PCBs), com as quais se assemelham também com relação à capacidade de difusão no ambiente e presença em tecidos humanos (SACKS e LOHMANN, 2012; SIDDIQI; LAESSIG; REED, 2003).

Assim, a preocupação com a utilização de PBDEs aumentou muito nos últimos anos, pois além dos fatores supracitados, a demanda global por PBDEs vem crescendo rapidamente devido a sua alta eficiência contra a propagação da chama, boa estabilidade térmica e baixo custo (JINHUI; YUAN; WENJING, 2015).

1.2 PBDEs: Aspectos gerais e toxicidade

Os PBDEs constituem uma classe de compostos orgânicos, que podem apresentar teoricamente até 209 congêneres, sendo que os compostos variam de acordo com o número de átomos de bromo e/ou padrão de substituição destes átomos (Figura 1) (FROMME et al., 2016).

Figura 1. Estrutura química geral dos PBDEs e as estruturas químicas dos PBDEs analisados no presente trabalho.

Legenda: A) Estrutura química geral dos PBDEs ($x + y = 1-10$); B) BDE-47 (2,2',4,4'- Éter de Difenila Tetrabromado); C) BDE-99 (2,2',4,4',5- Éter de Difenila Pentabromado); D) BDE-154 (2,2',4,4',5,6'- Éter de Difenila Hexabromado); E) BDE-209 (2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'- Éter de Difenila Decabromado). Fonte: Adaptado de COSTA et al., 2008; SCIFINDER, 2016.

Os PBDEs são compostos orgânicos que fazem parte de um grupo denominado retardantes de chama, os quais são utilizados como medida de

segurança para proteger pessoas e bens contra os riscos potenciais de incêndio. Estes retardantes de chama utilizam de diversos mecanismos para tal fim, como aumentar a temperatura de ignição dos polímeros, reduzir a velocidade de queima, evitar a propagação da chama ou reduzir a produção de fumaça (MOROSE, 2006).

De acordo com o modo que são adicionados durante a produção dos materiais, os retardantes de chama podem ser classificados como reativos ou aditivos. Os reativos são misturados a materiais plásticos antes da polimerização, formando ligações covalentes e tornando parte da matriz polimérica, como ocorre com o tetrabromobisfenol A. Já no grupo dos aditivos temos os PBDEs, os quais são utilizados na fase final de produção, formando uma camada deste composto sobre o material. Este último tipo possui a característica de não estar fortemente ligado à matriz do produto e isso faz com que seja muito mais provável que o mesmo se desprenda dos produtos com mais facilidade do que o primeiro grupo, aumentando a sua liberação no ambiente (SJÖDIN; PATTERSON; BERGMAN, 2003).

Os PBDEs, classificados como retardantes de chama aditivos, interferem com o processo de combustão através da formação de gás de bromo, que desloca o O_2 necessário para realizar as reações de oxidação. Outro mecanismo que ocorre durante o processo de combustão de produtos contendo PBDEs é a formação de radicais de bromo, os quais interferem com as reações em cadeia dos radicais de hidrogênio e hidroxila no fogo. Estes dois mecanismos atuam conjuntamente retardando e restringindo a oxidação térmica (USEPA, 2010).

Os PBDEs têm sido utilizados desde os anos 1970 em indústrias de eletroeletrônicos, mobílias, têxteis, automobilísticas e construção civil; são empregados em materiais como espuma de poliuretano, plásticos, tecidos, utensílios domésticos, dentre outros (JINHUI; YUAN; WENJING, 2015; LI et al., 2016; LV et al., 2015). Devido a essa ampla gama de utilização, o contato do ser humano e do meio ambiente com os PBDEs 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 (USEPA, 2010).

O problema com o descarte incorreto de produtos contendo PBDEs foi observado na cidade de Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil), pois algumas amostras provenientes de uma lagoa pertencente a uma área de recarga do aquífero Guarani, apresentaram concentrações de alguns congêneres de PBDEs, sendo que o mais abundante foi o BDE-47. Esta descoberta gerou uma grande repercussão, pois este

congênere possui elevado potencial tóxico e este reservatório é muito utilizado para captação de água para a população local (FERRARI, 2016).

Estes compostos são produzidos comercialmente em três formas: penta-BDE, octa-BDE e deca-BDE, classificados de acordo com o principal congênere presente na formulação (SUH et al., 2009). Estas formas comerciais já tiveram sua produção e utilização proibidas em alguns lugares do mundo, como por exemplo, na União Europeia (UE) e alguns estados norte-americanos que proibiram o uso do penta- e octa-BDE em 2004, e posteriormente, em 2008, a UE proibiu também o uso do deca-BDE (RICHARDSON e KIMURA, 2016). Os dois primeiros compostos já haviam sido classificados como poluentes orgânicos persistentes (POP) e, recentemente, foi recomendado que o deca-BDE fosse classificado como tal na Convenção de Estocolmo. No entanto, mesmo com proibição da fabricação destes PBDEs em alguns lugares, os mesmos ainda estão presentes em muitos produtos que foram vendidos anteriormente à proibição, ademais, estes compostos podem ainda estar presentes em produtos originados em países onde a proibição ainda não foi implantada (JINHUI; YUAN; WENJING, 2015; RICHARDSON e KIMURA, 2016).

A exposição de organismos vivos aos PBDEs pode ser muito prejudicial, uma vez que há relatos de efeitos nocivos causados por alguns congêneres deste grupo. Os principais efeitos relatados acerca da exposição a estes compostos são a desregulação endócrina (DEODATI et al., 2016), a hepatotoxicidade (COWENS et al., 2015), as alterações imunológicas (LV et al., 2015) e a neurotoxicidade (CHEVRIER et al., 2016). Estes efeitos tóxicos podem ocorrer devido à capacidade de alguns PBDEs causarem um aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio dentro das células, como visualizado por Hu e colaboradores (2009) com o BDE-47 e por Souza e colaboradores (2013) com o BDE-99, e cujos trabalhos correlacionaram este aumento nas espécies reativas de oxigênio com a morte celular observada após o tratamento com estes compostos.

Um estudo realizado entre 2002 e 2003 com 157 mulheres australianas investigou a presença de PBDEs no leite materno. Em todas as amostras estudadas foram encontrados diferentes congêneres, principalmente os BDEs -47, -99, -100, -153, -154 e -183 (TOMS et al., 2007). Um estudo similar avaliou o leite materno humano, no qual foram detectados níveis elevados de todos os congêneres estudados (DANIELS et al., 2010). Esta presença de PBDEs em leite materno é muito preocupante, pois no trabalho de Koenig e colaboradores (2012) com roedores, eles

confirmaram que a exposição perinatal ao BDE-47 através da lactação pode ter consequências neurológicas e representar um risco enorme para o desenvolvimento.

Como já citado, um fator importante a se levar em consideração com relação ao potencial tóxico dos PBDEs é o deslocamento dos mesmos no ambiente, pois podem afetar diversos ecossistemas. O destino dos PBDEs no ambiente é ditado por suas propriedades físicas e químicas e sua propensão à transformação biótica e abiótica (USEPA, 2010). Eles podem ser transportados pelo ar, seja na fase de vapor (mono a tri-BDE) ou adsorvidos a partículas atmosféricas (deca-BDE). Seu transporte também pode ocorrer na água, pois mesmo sendo muito lipofílicos, estes compostos podem ser encontrados em ambientes aquáticos, sendo que a maior parte está acumulada no sedimento, mas uma parte destes compostos também pode estar na coluna d'água, uma vez que podem se acumular ao fitoplâncton ou partículas em suspensão, além de poderem acumular-se em organismos maiores, como peixes (JU et al., 2016; USEPA, 2010).

Assim, torna-se evidente a importância da realização de testes ecotoxicológicos para elucidar a ação destes compostos em ambientes aquáticos. No trabalho realizado por Chen e colaboradores (2012a), ao testarem o BDE-47 em zebrafish, mostraram que os padrões de conectividade neuronal foram alterados e isto pode contribuir para os déficits comportamentais motores nestes organismos (CHEN et al., 2012a).

Outro trabalho que avaliou a absorção do BDE-47 em organismos representativos do ambiente bentônico teve como objetivo analisar a bioacumulação e biomagnificação utilizando como organismos-teste poliquetas e caranguejos. No ensaio avaliando a bioacumulação, os resultados mostraram que os poliquetas absorveram muito mais do PBDE do que os caranguejos. Já no ensaio avaliando a biomagnificação, os caranguejos foram alimentados com poliquetas contendo o composto e foi quantificada uma concentração muito maior do que no primeiro ensaio, mostrando assim o elevado poder de acumulação destes compostos na cadeia trófica (DÍAZ-JARAMILLO et al., 2016).

1.3 Bioensaios em análises toxicológicas

Na tentativa de elucidar o efeito tóxico e mecanismo de ação dos PBDEs, foram utilizados neste trabalho dois modelos toxicológicos, a fim de investigar como estes compostos podem afetar sistemas biológicos distintos.

O primeiro modelo utilizado foi uma linhagem de células hepáticas derivadas de um hepatoblastoma (linhagem HepG2), a qual foi submetida à exposição aos PBDEs a fim de investigar se os mesmos são capazes de desencadear o processo autofágico, uma vez que estes compostos são conhecidos por causarem citotoxicidade e poderem desencadear processos de morte celular (SOUZA et al., 2016). Foi utilizado um modelo de cultura in vitro de hepatócitos, pois o mesmo apresenta muitas aplicações, possibilitando o entendimento da ação de compostos sobre a bioquímica, fisiologia e biologia celular. Estas células realizam muitas funções fisiológicas associadas ao fígado, incluindo biotransformação e eliminação de xenobióticos (RODÉS et al., 2007). Outro fator importante é que apresentam muitas mitocôndrias, organelas que são bastante afetadas pela ação dos PBDEs (PAZIN; PEREIRA; DORTA, 2015; LeCLUYSE et al., 2012).

O segundo modelo adotado são os ovos e larvas do peixe zebrafish (*Danio rerio*). Este organismo apresenta alta relevância na avaliação de risco ao homem, além de ser muito utilizado em estudos de ecotoxicidade. Portanto, o mesmo apresenta-se como um representante do ambiente aquático, ecossistema muito afetado e com elevada incidência de PBDEs (MACAULAY et al., 2015). Os ensaios ecotoxicológicos são realizados com organismos que são sensíveis a contaminação ambiental.

1.3.1 Autofagia

A autofagia é considerada um processo de degradação que ocorre em todas as células eucarióticas, nas quais o conteúdo citoplasmático é degradado dentro do lisossomo ou vacúolo. No entanto, a finalidade da autofagia não é simplesmente a eliminação de materiais, mas em vez disso, a autofagia configura um sistema de reciclagem dinâmica de substratos que geram moléculas estruturais e energéticas para a renovação celular e homeostase (FENG et al., 2014; MIZUSHIMA e KOMATSU, 2011)

Durante ausência de nutrientes ou estresse, o processo de autofagia é acionado e destaca-se pela reciclagem de constituintes macromoleculares. O processo visa a manutenção da homeostase celular através da remoção de moléculas e/ou organelas supérfluas ou danificadas. Embora a degradação de proteínas seja uma característica da autofagia, a mesma desempenha um papel

chave na mobilização de reservas celulares de energia e nutrientes, incluindo carboidratos, lipídios e minerais (FENG et al., 2014; KAUR e DEBNATH, 2015).

O termo autofagia foi utilizado pela primeira vez por Christian de Duve em 1963, baseado na descoberta dos lisossomos em 1955, fato que lhe concedeu o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 1974. Entretanto, apenas nos últimos anos este processo tem sido descrito mais detalhadamente, pois apenas nas últimas duas décadas que, aproximadamente, 40 genes relacionados à autofagia foram descritos, os chamados ATG (*Autophagy-related genes*). Os ATG foram descritos primeiramente em leveduras, sendo que muitos genes homólogos já foram identificados em mamíferos, como o ATG8 que em mamíferos é chamado de Cadeia leve 3 da proteína associada à microtúbulos 1A/1B, ou simplesmente LC3 (de DUVE e WATTIAUX, 1966; FENG et al., 2014; KAUR e DEBNATH, 2015). A detecção de alguns genes-chave para o processo de autofagia, conferiu ao biólogo japonês Yoshinori Ohsumi o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2016, reafirmando a grande importância deste processo e seu estudo.

Adicionalmente ao papel clássico da autofagia na reciclagem de moléculas, este processo desempenha uma função muito importante de citoproteção, pois impede que ocorra um acúmulo de proteínas tóxicas, além de agir em vários aspectos da imunidade, incluindo a eliminação de micróbios invasores e participação na apresentação de antígenos (FENG et al., 2014).

A autofagia é classificada em três tipos principais. A microautofagia é um processo de degradação lisossomal, que envolve a imersão direta de substratos citoplasmáticos em uma membrana através de tubos autofágicos. As principais funções da microautofagia são: manutenção do tamanho de organelas, homeostase da membrana e sobrevivência celular sob restrição de nitrogênio. Este processo pode acontecer simultaneamente e de forma coordenada com a macroautofagia e autofagia mediada por chaperonas, que são os outros dois tipos principais (LI; LI; BAO, 2012).

A autofagia mediada por chaperona diferencia-se das demais por realizar autofagia apenas de proteínas e também não utilizar uma vesícula para levar o substrato a ser degradado para os lisossomos. Em vez disso, as proteínas são seletivamente direcionadas para os lisossomos e translocadas para dentro do lúmen através da ação coordenada de chaperonas situadas em ambos os lados da membrana e um complexo de translocação de proteínas específicas. As proteínas alvo da autofagia mediada por chaperona contêm um análogo do pentapeptídeo

KFERQ que é reconhecido pela proteína citosólica Chaperona Cognata de Choque Térmico de 70 kDa (Hsc70). A Hsc70 promove a translocação destes alvos através das membranas lisossomais até o lúmen através do receptor de proteína 2A associado à membrana lisossômica (LAMP2A), para, então, estes substratos serem degradados e reciclados (CUERVO e WONG, 2014; KAUR e DEBNATH, 2015).

Por fim, temos a macroautofagia, processo que é alvo de estudo deste trabalho e, posteriormente, será chamado apenas por autofagia. Neste processo uma membrana dupla de isolamento, chamada de fagóforo, envolve uma pequena porção do citoplasma – moléculas e/ou organelas supérfluas ou danificadas - para formar uma vesícula chamada de autofagossomo. Dessa forma, estes autofagossomos são traficados até os lisossomos e estes se fundirão formando um autofagolisossomo. O substrato sequestrado será degradado no lúmen lisossomal por hidrolases e, posteriormente, serão reciclados (MIZUSHIMA e KOMATSU, 2011). Estes três tipos de autofagia estão representados na Figura 2.

Figura 2. Esquema representativo dos processos autofágicos.

Legenda: O primeiro tipo de autofagia representado é a macroautofagia, na qual temos a fase de iniciação que se caracteriza pelo início da formação do sítio de montagem do fagóforo, segue para a fase de nucleação, depois para a fase de alongamento ou expansão quando há formação do autofagossomo e finalmente ocorre a fusão do autofagossomo com o lisossomo formando o autofagolisossomo. Na microautofagia, os substratos entram diretamente através da membrana lisossomal. Na autofagia mediada por chaperona, os substratos com o pentapeptídeo KFERQ são reconhecidos seletivamente pela proteína citosólica Chaperona Cognata de Choque Térmico de 70 kDa (Hsc70) e translocados para dentro dos lisossomos através do receptor de proteína 2A associado à membrana lisossômica (LAMP2A). Em todos os três processos, os substratos são degradados por hidrolases lisossomais e posteriormente é feita a reciclagem do produto desta degradação. Fonte: adaptado de KAUR e DEBNATH, 2015.

Segue abaixo a descrição detalhada das etapas que constituem o processo de macroautofagia (GENG e KLIONSKY, 2008; FÜLLGRABE; KLIONSKY; JOSEPH, 2014; KAUR e DEBNATH, 2015; KLIONSKY et al., 2016).

1. **Regulação da Indução:** autofagia se inicia com a imersão gradual de material citoplasmático (proteínas anormais e organelas em excesso ou danificadas) pelo fagóforo, que vai amadurecer em uma vesícula de membrana dupla, o autofagossomo. Geralmente, para que ocorra a indução de autofagia, é necessária a repressão da quinase mTOR (inibidor natural do processo autofágico). Após a inibição da mTOR ocorre uma alteração na fosforilação de ULK1 (ATG1) e de algumas proteínas do complexo ATG13, o que estimula a atividade ULK1 e induz autofagia.
2. **Nucleação da vesícula:** esta nucleação ocorre através da ativação do complexo fosfatidilinositol-3-quinase de classe III (PI3KIII), que contém a proteína VPS34, a qual necessita ser ativada para gerar o fosfatidilinositol-3-fosfato (PI(3)P) que é essencial para formação de autofagossomos (principalmente em situações de déficit de nutrientes), sendo a ativação da VPS34 dependente da formação de um complexo que inclui VPS15, beclin-1 (ATG6), AMBRA1, ATG14 e BIF1.
3. **Expansão da vesícula:** dois sistemas de conjugação são responsáveis pela próxima etapa que é o alongamento da vesícula.
A primeira via envolve a conjugação de fosfatidiletanolamina (PE) com proteína LC3 pela ação sequencial da protease ATG4 (processando a forma primária de LC3 – pro-LC3 – para expor o grupamento terminal carboxil do amino ácido Glicina) e das enzimas ATG7 e ATG3, sendo que o resultado desta cascata é a conversão da LC3-I para LC3-II que será ligada à membrana do fagóforo. A função da LC3-II é participar na expansão do fagóforo, atuando como blocos na construção deste, e também no reconhecimento do material a ser envolto pela membrana. Este reconhecimento de materiais a serem degradados é realizado pela proteína p62 (SQSTM1), a qual vai interagir com esses alvos e formar o complexo “Alvo-p62”. Este último será então seletivamente acoplado ao autofagossomo através da interação da p62 com LC3-II.

A outra via envolve a conjugação covalente de ATG12 com ATG5, com o envolvimento sequencial das enzimas ATG7 e ATG10. O conjugado ATG12-ATG5, em seguida, interage de forma não covalente com a ATG16L1. O complexo ATG12-ATG5-ATG16 guia a LC3 na formação da membrana e também pode agir como uma ligase para promover uma reação de conjugação envolvendo LC3-II + PE e também na reação entre p62 com LC3-II.

4. **Recuperação das proteínas associadas ao processo:** quando o autofagossomo é concluído, as proteínas ATG que foram associadas com o fagóforo durante a expansão são liberadas no citoplasma e reutilizadas para a biogênese de novas vesículas, incluindo as moléculas de LC3 que estavam na parte externa na membrana do fagóforo que é removida através da ação da ATG4.
5. **Fusão, rompimento da vesícula e degradação:** Finalmente, os autofagossomos sofrem maturação se fundindo com lisossomos, criando o autofagolisossomo. No autofagolisossomo, a membrana interna e o material alvo da autofagia são degradados por enzimas lisossômicas. Então, os produtos de degradação são liberados de volta para o citosol, a fim de reciclar os constituintes macromoleculares e para gerar energia para manter a viabilidade das células sob condições desfavoráveis, protegendo a célula frente a diversas condições de estresse.

O processo autofágico pode ser desencadeado em decorrência de alguns fatores como formação de espécies reativas de oxigênio, alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, disfunção na bioenergética mitocondrial e alterações na membrana desta organela (FÜLLGRABE; KLIONSKY; JOSEPH, 2014; EISENBERG-LERNER et al., 2009). Visto a importância desta organela na ocorrência do processo autofágico, é importante ressaltar que as mitocôndrias são um dos possíveis alvos de xenobióticos dentro das células, sendo que já foi observado que os PBDEs afetam a homeostase mitocondrial (PAZIN; PEREIRA; DORTA, 2015; PEREIRA et al., 2014; EISENBERG-LERNER et al., 2009). Assim, uma das hipóteses do presente trabalho é que os referidos compostos sejam capazes de desencadear o processo autofágico.

Esta hipótese é suportada por alguns estudos que já reportaram a indução de autofagia em condições de estresse ou exposição a compostos considerados poluentes ambientais (BOLT; BYRD; KLIMECKI, 2010; DONG et al., 2009; DUARTE et al., 2012). Adicionalmente, os PBDEs já foram identificados como citotóxicos e indutores de morte celular (SOUZA et al., 2016).

Além de ser considerado um mecanismo de proteção e manutenção da homeostase celular (protegendo as células de compostos como os PBDEs), quando ocorre de forma excessiva, o processo autofágico também pode causar morte celular. A morte celular autofágica consiste num processo dependente da formação do autofagossomo e degradação lisossomal do citoplasma na medida em que a célula perde viabilidade. Diferentemente do processo de apoptose, na autofagia não há fragmentação do núcleo ou do DNA cromossômico, e também não há perda de integridade da membrana plasmática como na necrose (FÜLLGRABE; KLIONSKY; JOSEPH, 2014).

Trabalhos analisando a indução da autofagia utilizam compostos para controlar este processo, um dos compostos mais utilizados é o inibidor do complexo PI3KIII, wortamanina. Outro composto muito utilizado é o cloreto de amônia (NH_4Cl), pois o mesmo previne que o autofagossomo seja degradado, uma vez que a amônia é um agente muito utilizado para elevar o pH lisossomal impedindo que o mesmo seja responsável pela degradação dos autofagossomos (GUO et al., 2016; KLIONSKY et al., 2016).

1.3.2 Zebrafish

O organismo-teste que foi utilizado neste trabalho é chamado de zebrafish (pop. Paulistinha ou peixe-zebra), um pequeno peixe teleósteo, de 3-4 cm de tamanho, dulcícola de águas tropicais situadas do Sul da Ásia (Índia, Bangladesh, Nepal e Paquistão). Filogeneticamente, este animal pertencente à família dos Cyprinidae, à ordem dos Cypriniformes e à espécie *Danio rerio*. Como o próprio nome sugere, este peixe possui um padrão de coloração listrado (preto e branco) rostro-caudal, tendo como outras características a presença de nadadeiras anal e caudal e as fêmeas são mais claras e arredondadas que os machos (LAWRENCE, 2007; SCHOLZ et al., 2008; SPENCE et al., 2008).

O zebrafish apresenta um desenvolvimento em três estágios: larval, juvenil e adulto. A eclosão do ovo marca o início do estágio larval, o que ocorre em cerca 48-72 horas pós-fertilização (hpf). Este estágio é concluído com 120 (hpf), quando a organogênese dos principais órgãos é concluída; momento quando as larvas inflam suas bexigas natatórias (SCHOLZ et al., 2008).

O zebrafish tem sido muito utilizado em estudos toxicológicos e ecotoxicológicos visando a análise dos possíveis efeitos de compostos químicos sobre o desenvolvimento desse vertebrado, a fim de avaliar a existência de um possível impacto ao ambiente e ao homem (CARLSSON et al., 2013; SCHOLZ et al., 2008; SIPES; PADILLA; KNUDSEN, 2011).

A utilização do zebrafish como organismo-teste tem aumentado devido a diversas vantagens que este modelo apresenta, como: os biotérios variam desde pequenas raques (local para pequenos testes com poucos ovos) até grandes salas com vários aquários (produzindo milhares de ovos por dia), possibilitando a utilização deste modelo para diversos fins e podendo ser instalado com relativo baixo custo (SCHOLZ et al., 2008; SHI et al., 2008; SPENCE et al., 2008).

Outra vantagem é com relação ao tamanho pequeno deste peixe, o que gera uma facilidade no manuseio e análise. Ele possui um curto ciclo de reprodução e atinge a maturidade sexual por volta de 3 meses de idade. Além disso, ele produz um grande número de embriões, os quais se desenvolvem fora do útero materno, sendo que os ovos e larvas são transparentes, o que facilita no acompanhamento do desenvolvimento do peixe e observação de malformações (KIMMEL et al., 1995; SCHOLZ et al., 2008; SPENCE et al., 2008).

Ademais, há uma elevada similaridade genética aos humanos (70%), pois o seu genoma já foi totalmente caracterizado, o que confere a esse organismo-teste uma elevada utilização para avaliação genética e toxicológica (HASSAN; MOUSSA; ABBOTT, 2012; SPENCE et al., 2008; LAWRENCE, 2007). Além da similaridade genética, quando comparado com seres humanos, o zebrafish apresenta também grandes semelhanças no sistema gastrointestinal, tais como nas funções de absorção e secreção do fígado, vesícula biliar, pâncreas e trato intestinal (HANYANG et al., 2017).

Frente a isso, o ensaio de embriotoxicidade – *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test* - foi proposto por Nagel (2002), no qual se utilizam os organismos em estágios embrio-larval de zebrafish e tem sido sugerido para avaliar alterações

morfológicas. Sendo visto como mais promissor e viável do que o teste de toxicidade aguda empregando a forma adulta deste peixe (BRAUNBECK et al., 2005; EMBRY et al., 2010; ZHU; TIAN; CAI, 2012). O ensaio de toxicidade aguda utilizando os estágios embrio-larval de zebrafish é indicado para a investigação da toxicidade e teratogenicidade de compostos químicos que podem afetar significativamente o meio ambiente e a saúde humana, pois os estes compostos podem afetar o desenvolvimento embrionário, prejudicando a continuidade da população afetada (ZHU; TIAN; CAI, 2012).

O ensaio em questão consiste em expor os embriões/larvas de zebrafish recém-fertilizados ao composto em análise e observar possíveis alterações nos indicadores de toxicidade (letalidade, subletalidade e teratogenicidade). Sendo os indicadores de subletalidade de grande importância em testes de ecotoxicidade, pois tais efeitos podem gerar impactos significantes em populações ou ecossistemas. Estes impactos ocorrem quando os organismos têm afetadas suas funções biológicas (reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento, maturação e comportamento em geral), o que pode causar uma redução na diversidade genética dentro de uma população, comprometendo a continuidade da mesma (BREITHOLTZ et al., 2006; CARLSSON et al., 2013; RAND e PETROCELLI, 1985).

A avaliação dos efeitos tóxicos de xenobióticos sobre o desenvolvimento embrionário e larval do zebrafish pode se correlacionar com a identificação do risco desses compostos ao ecossistema aquático e à saúde humana. Neste trabalho foram realizados testes investigando se os PBDEs de interesse são capazes de induzir toxicidade aguda, analisando parâmetros que indicam se tais compostos desencadeiam uma resposta rápida e severa no zebrafish (OECD, 2013).

Em suma, espera-se que os PBDEs afetem o desenvolvimento do zebrafish, uma vez que estes compostos são conhecidos por sua capacidade de causar desregulação endócrina. E ainda, podendo desencadear o processo de autofagia nas células HepG2, pois estes compostos também são capazes de causar citotoxicidade.

2 OBJETIVOS

Investigar o mecanismo de ação tóxico dos congêneres BDE-47, BDE-99, BDE-154 e BDE-209, com o intuito de detectar o se estes compostos afetam o desenvolvimento embrionário do zebrafish e se desencadeiam o processo autofágico em células HepG2.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar alterações no processo de autofagia em cultura de células HepG2 expostas aos PBDEs, através de análise imunocitoquímica sob microscopia de fluorescência e análise do conteúdo das proteínas LC3, Beclin-1 e p62 por *western blotting*.
- Avaliar alterações no desenvolvimento embrionário e larval do zebrafish exposto aos PBDEs, analisando indicadores de letalidade, subletalidade e teratogenicidade.
- Comparar os efeitos observados entre os diferentes congêneres testados, relacionando o efeito observado com o número e posição dos átomos de bromo em suas estruturas.

3 METODOLOGIA

No presente trabalho, foram utilizadas soluções padrão dos congêneres de PBDEs: BDE-47, BDE-99, BDE-154 e BDE-209 (99%, AccuStandard, New Haven, USA). Os ensaios foram realizados utilizando quatro doses (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$). A faixa de concentração escolhida foi baseada em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa e por outros grupos, cujos ensaios foram realizados a fim de investigar o potencial de ação tóxica de diferentes congêneres de PBDE (PAZIN; PEREIRA; DORTA, 2015; PEREIRA; SOUZA; DORTA, 2013; SOUZA et al., 2013).

3.1 Experimentos em células HepG2

Os ensaios de imunocitoquímica utilizando as células HepG2, realizados a fim de se analisar o processo autofágico decorrente da exposição destas células aos PBDEs em estudo, foram realizados na Universidade de Coimbra (Coimbra, Portugal) sob co-orientação do Prof. Catedrático Carlos Manuel Marques Palmeira.

Os compostos foram analisados em cultura de células HepG2 através da pré-incubação dos congêneres junto ao modelo experimental. As células HepG2 (American Type Culture Collection, N° HB 8065) foram cultivadas em meio “Minimum Essential Medium” suplementado com 10% de soro fetal, penicilina G 100 UI/mL e estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$, em frascos de cultura, a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO_2 .

Anteriormente ao plaqueamento das células, foi realizada a avaliação da viabilidade das células pelo teste de exclusão com Azul de Tripán a 0,25%. Este método de exclusão de Azul de Tripán (corante) baseia-se na incorporação do corante pelas células inviáveis, por não apresentarem membrana celular íntegra, ao passo que as células viáveis, cujas membranas estão intactas, bloqueiam a penetração do corante. Desta forma, as células inviáveis coram-se em azul e as viáveis ficam transparentes. Sendo assim, os experimentos foram realizados com cultivo de células que apresentaram uma viabilidade $\geq 90\%$ no momento do plaqueamento.

3.1.1 Imunocitoquímica para análise da proteína LC3 por Microscopia de Fluorescência

Para o ensaio de imunocitoquímica para análise da proteína LC3, inicialmente as células HepG2 foram distribuídas em placas de 24 poços (1×10^4 células/mL). Após 24 horas, as células foram expostas aos PBDEs somente ou adicionados à wortamanina (inibidor do processo autofágico) nos tempos de 24 e 48 horas. A wortamanina foi utilizada como controle nos experimentos, pois a mesma age como inibidor do processo autofágico (GUO et al., 2016). Em todos os tratamentos foi adicionado o cloreto de amônia (NH_4Cl – 5 mmol/L) para impedir que o autofagossomo fosse degradado. Como controle positivo as células foram cultivadas com déficit de nutrientes (Starvation Medium - Hank's Balanced Salt Solution suplementada com HEPES 10 mmol/L, pH 7,4) por 5 horas antes da fixação das células. Para o controle negativo, adicionou-se às células 1% de DMSO + NH_4Cl 5 mmol/L (KLIONSKY et al., 2016).

Após os tempos de exposição, as células foram fixadas com formaldeído 4% por 1 hora a 37 °C. Para a permeabilização da membrana celular foi utilizada a solução: PBS, BSA 2%, Triton 0,1% por 10 minutos. A seguir foi feito o bloqueio com BSA + PBS 3% por 1 hora e em seguida a lavagem com PBS. Após esse procedimento, as células foram incubadas com anticorpo primário anti-LC3 (1:1000, *rabbit* - Thermo Fisher Scientific, ref. #L10382) overnight a 4 °C, protegido da luz e sob agitação constante. No dia seguinte, as células foram lavadas e incubadas com a sonda fluorescente Alexa Fluor 594 conjugada com anticorpo secundário (anti-*rabbit*) (1:2000 - Thermo Fisher Scientific, ref. # A21207), durante 2 horas e, ao fim deste tempo o reagente de Hoechst (1 mg/mL - Sigma-Aldrich, ref. #H6024) foi adicionado durante 10 minutos de modo a marcar os núcleos.

As células foram analisadas e quantificadas utilizando um microscópio de fluorescência Nikon Eclipse TS100 com o programa NIS-Elements Imaging (Nikon Instruments Inc.).

O ensaio de imunocitoquímica foi realizado de acordo com Kuma e colaboradores (2007) e Klionsky e colaboradores (2016).

3.1.2 Análises de immunoblotting de proteínas marcadoras do processo autofágico – *western blotting*

As células foram distribuídas (2×10^6) em placas de cultura celular estéreis (100x20 mm, BD) e expostas aos congêneres de PBDE em estudo nas concentrações de 0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$ por 24 e 48 horas de exposição. Após este tempo, as células foram coletadas por método mecânico através da raspagem das placas com PBS. As amostras coletadas foram homogeneizadas em tampão de lise “RIPA” (50 mmol/L de Tris/HCl, pH: 7,4; 150 mmol/L de NaCl; 1 mmol/L de EDTA; 1% triton; 1% deocoxilato; 0,1% dodecilsulfato de sódio (SDS); e uma pastilha de inibidor de protease (SigmaFast Protease Inhibitor Tablets, Sigma-Aldrich ref. #S8820). Após a extração, a quantificação de proteínas foi realizada utilizando o método de Bradford (Bio-Rad, CA, USA) e posteriormente as amostras foram preparadas com partes iguais de proteína extraída em RIPA mais tampão Laemmli 2x (Bio-Rad Laboratories, ref. #1610737) suplementado com β -mercaptoetanol 5%, a fim de carregar os poços das placas de eletroforese com 50 μg de proteína de cada amostra.

As amostras de proteínas (50 μg) foram fracionadas em gel de poliacrilamida (15%) e posteriormente transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), a qual foi ativada previamente em metanol 100%. Após a transferência, para evitar a ocorrência de ligações inespecíficas dos anticorpos, as membranas foram incubadas com leite desnatado (5% - Bio-Rad Laboratories, ref. #1706404) por 2 h, sob temperatura ambiente, sendo que o leite foi dissolvido em tampão de lavagem TBS-T (20 mmol/L Tris pH 7,5, 150 mmol/L NaCl, 0,1% Tween 20). Em seguida, as membranas foram incubadas overnight à 4 °C com o anticorpo primário (1:1000 - rabbit anti-LC3, Cell Signalling, ref. #2775S; 1:1000 rabbit anti-beclin-1, Cell Signalling, ref. #3495S; 1:1000 mouse anti-p62, Cell Signalling, ref. #88588S; 1:1000 mouse anti- β -actina, Cell Signalling, ref. #4967S), o qual se ligará à proteína de interesse.

No dia seguinte as membranas foram lavadas com tampão de lavagem 3 vezes por 5 minutos, incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário (1:1000 anti-mouse IGG, Cell Signalling, ref. #7076S; 1:1000 anti-rabbit IGG, Cell Signalling, ref. #7074S) e, posteriormente, incubadas por 1 minuto com o kit ECL (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, GE, ref. # RPN2232). Este kit

contém uma solução de luminol e outra de peróxido, as quais são misturadas e colocadas em contato com a membrana para que ocorra a oxidação e posterior quantificação das bandas.

O conteúdo da proteína β -actina foi utilizado como controle de corrida. Por fim, as análises foram realizadas pela detecção da fluorescência emitida pela sonda acoplada ao complexo anticorpo secundário + anticorpo primário + proteína de interesse. O conteúdo de proteínas é caracterizado por uma distribuição em bandas na membrana, as quais foram detectadas utilizando o sistema de imagem Gel Doc EZ Imager System (Bio-Rad Laboratories, ref. #1708270). O resultado da quantificação das proteínas LC3, p62 e Beclin-1 foram normalizados utilizando os valores da β -actina. O ensaio de *immunoblotting* foi realizado de acordo com Gomes et al. (2012), Klionsky et al. (2016) e Mizushima e Yoshimori (2007).

3.2 Ensaio de toxicidade utilizando o modelo experimental do zebrafish

Estes ensaios foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira, professora de toxicologia ambiental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, a qual já possui em seu laboratório estrutura para a realização destes experimentos. Para realização da experimentação utilizando os peixes, todos os protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do campus da USP-Ribeirão Preto sob o Protocolo: 14.1.586.53.1.

3.2.1 Organismo teste: manutenção e aquisição de ovos

Os peixes adultos de *Danio rerio* foram adquiridos junto ao Aquário Matheus Comercial LTDA., São Carlos-SP. Os organismos adultos foram mantidos em aquários utilizando o equipamento ZEBTEC (Tecniplast), à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 14:10 horas claro:escuro e alimentados com ração TetraMin® Tropical Granules (47% de proteína bruta). Este equipamento (ZEBTEC) é acoplado a um sistema completo com unidade dedicada ao tratamento da água por osmose reversa (OS 10 LX, Gehaka); possui um sistema para monitoramento constante da água que mantém as condições ideais para manutenção destes organismos. Foi

utilizado também um sistema de reprodução de zebrafish (iSpawn), no qual há um isolamento de machos e fêmeas, além de um coletor de ovos.

Para a aquisição dos ovos que foram utilizados nos experimentos, no dia anterior à desova, peixes machos e fêmeas, na proporção de 2:1 (10 peixes machos e 5 fêmeas), foram colocados no sistema de reprodução, sendo que o acasalamento é iniciado logo após a iluminação súbita do aquário na manhã seguinte. Cerca de 60 minutos após a desova, os ovos foram coletados e transferidos para uma placa Petri para serem lavados com água reconstituída (padrão ISO-7346), diluída em 1:5 com água deionizada. Todos os ovos foram analisados em estereomicroscópio (SMZ-168 Series, Motic) e os ovos não-fertilizados foram descartados. Para os experimentos, foram selecionados ovos que atingiram o estágio de blástula.

Quando necessária, foi realizada a eutanásia dos peixes zebrafish de acordo com o Guia para uso do Zebrafish (NIH, 2013). Para zebrafish com 8 ou mais dias pós-fertilização, a eutanásia foi realizada pela overdose de anestésico tricaina metano sulfonato (MS222, 300 mg/L) por imersão prolongada. Os organismos foram deixados na solução por pelo menos 10 minutos até a paralisação total do movimento opercular. Para zebrafish entre 4 a 7 dias pós-fertilização, foi realizada a eutanásia por submersão em gelo flocado com água resfriada entre os flocos (5 partes de gelo/1 parte de água a 0-4 °C) por 20 minutos, assegurando a morte por hipóxia.

3.2.2 Ensaio de toxicidade aguda com estágio embrio-larval de zebrafish

Os ensaios foram realizados segundo as recomendações do *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*, OECD n°236 (OECD, 2013). O ensaio de toxicidade aguda utilizando embriões e larvas de zebrafish teve início com a coleta de 160 ovos fertilizados (em estágio de blástula), que foram distribuídos em 8 placas para cultura com 24 poços, uma para cada tratamento com PBDE. Os ovos foram dispostos individualmente em poços de placas para cultura contendo 2,0 mL de cada concentração do PBDE em estudo ou controles. Os tratamentos foram compostos por controle negativo (DMSO 1% em água padrão da OECD), 5 concentrações das amostras dos BDE-47, BDE-99 e BDE-154 (0,1; 1; 5; 10; 25), 5 concentrações da amostra de BDE-209 (1; 5; 10; 25 e 50 µmol/L) e controle positivo (3,4 dicloroanilina, 100 mg/L), sendo que cada tratamento foi constituído por 20 embriões. Não foi

utilizada a concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$ para os outros 3 PBDEs devido a limitações metodológicas. Para efeitos de comparação devido a elevada degradação do composto, os ensaios para o BDE-209 foram realizados na presença e na ausência de luz.

As placas foram incubadas a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo claro:escuro 14:10 horas. Devido ao fato do BDE-209 pode sofrer fotólise, os ensaios com esse composto foram realizados na presença e ausência de luz, para evitar a degradação do BDE-209 e avaliar sob as duas condições. A ausência de luz não causa efeito no desenvolvimento do zebrafish (KAZIMI e CAHILL, 1999). O desenvolvimento dos embriões e larvas de zebrafish foram avaliados em 4, 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas pós fertilização (hpf), utilizando um estereomicroscópio (SMZ-168 Series, Motic).

Os indicadores utilizados foram avaliados segundo OECD nº236 (OECD, 2013) e Nagel (2002). Foram utilizados indicadores de letalidade (coagulação, desprendimento de cauda, presença dos somitos, batimento cardíaco e eclosão), subletalidade (formação de somitos, gástrula completa, desenvolvimento dos olhos, movimento espontâneo, circulação sanguínea, pigmentação, edemas de pericárdio e saco vitelínico) e teratogenicidade (estrutura modificada da corda, escoliose, raquitismo, deformidades do saco vitelínico, crescimento retardado, comprimento da cauda reduzida, bexiga natatória inflada e malformações de cabeça, otólitos, cauda e coração), analisados nos grupos controles e tratados. A distinção entre desenvolvimento embrionário normal e anormal foi estabelecida de acordo com a descrição da embriogênese do zebrafish publicada por Kimmel et al. (1995). Imagens dos embriões e larvas de zebrafish em diferentes tempos pós-fertilização foram capturados por uma câmera digital acoplada ao um estereomicroscópio (SMZ-168 Series, Motic).

3.3 Análise Estatística

A análise estatística dos dados experimentais foi realizada pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo *post-hoc* de Dunnet para a comparação dos vários grupos tratados em relação aos seus controles, utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0® (version 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS – AUTOFAGIA

Foram concluídos os ensaios de imunocitoquímica e *western blotting* avaliando as alterações no processo de autofagia induzidas pela exposição das células HepG2 aos congêneres BDE-47, BDE-99, BDE-154 e BDE-209. Estas duas técnicas utilizam do mesmo princípio, pois ambas utilizam de anticorpos específicos contra a proteína de interesse que se pretende identificar numa dada célula, sendo que a proteína em questão funciona como um antígeno. No caso da imunocitoquímica, esta técnica é realizada com o intuito de localizar proteínas presentes em cada célula utilizando microscopia de fluorescência. Já o *western blotting* visa à quantificação destas proteínas através de separação por eletroforese e posteriormente utilizando uma sonda que vai se ligar no conjugado (proteína-anticorpo).

Os resultados obtidos para o **BDE-47** podem ser observados na Figura 3, a qual demonstra que este congêneres causou aumento na quantidade de LC3-II (padrão de aglomeração) nas duas maiores concentrações testadas (5 $\mu\text{mol/L}$ e 25 $\mu\text{mol/L}$) e nos tempos de 24 e 48 horas. No ensaio com o inibidor de autofagia, este composto apresentou aumento na quantidade de LC3-II apenas na maior concentração (25 $\mu\text{mol/L}$), em 24 e 48 horas, indicando que, na presença de wortamanina, houve uma redução no padrão de aglomeração da proteína LC3-II. Esta redução de LC3-II na presença de wortamanina, representa que o efeito observado provavelmente foi devido a uma indução do processo autofágico, pois uma de suas vias estava inibida (KLIONSKY et al., 2016). Podemos observar nas Figuras 4, 5, 6 e 7 que, conforme as concentrações aumentam, há um surgimento maior de células em processo de autofagia, caracterizada pela distribuição mais aglomerada da marcação fluorescente, representando a LC3-II e não o padrão difuso que é apresentado pela LC3-I.

Figura 3. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-47 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre a porcentagem de células que apresentaram padrão de aglomeração da proteína LC3-II na membrana do autofagossomo após 24 e 48 horas de exposição

Legenda: A) Células incubadas sem adição do inibidor de autofagia, wortamanina (100 nmol/L); B) Células incubadas com adição do inibidor de autofagia, wortamanina (100 nmol/L). * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-47). Fonte: Do autor.

Figura 4. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-47 sem a adição de wortamanina no tempo de exposição de 24 horas

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-47 0,1 $\mu\text{mol/L}$; C) BDE-47 1 $\mu\text{mol/L}$; D) BDE-47 5 $\mu\text{mol/L}$; E) BDE-47 25 $\mu\text{mol/L}$; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Figura 5. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-47 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 24 horas

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-47 0,1 µmol/L; C) BDE-47 1 µmol/L; D) BDE-47 5 µmol/L; E) BDE-47 25 µmol/L; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Figura 6. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-47 sem a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas.

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-47 0,1 µmol/L; C) BDE-47 1 µmol/L; D) BDE-47 5 µmol/L; E) BDE-47 25 µmol/L; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Figura 7. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-47 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas.

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-47 0,1 µmol/L; C) BDE-47 1 µmol/L; D) BDE-47 5 µmol/L; E) BDE-47 25 µmol/L; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Ainda visando analisar a indução do processo autofágico, os resultados obtidos utilizando a técnica de *western blotting* apresentaram efeito semelhante ao encontrado na técnica de imunoistoquímica, quando as células HepG2 foram expostas ao BDE-47. Pode-se comprovar isso através das Figuras 8, 9 e 10, nas quais estão representados os resultados obtidos nas análises de quantificação das proteínas LC3, Beclin-1 e p62 respectivamente. Sendo que em todos podemos observar que os marcadores deram positivo para autofagia.

Figura 8. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-47 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína LC3 de células HepG2, após 24 e 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*

Legenda: A) Resultados expressos como a razão do conteúdo da proteína LC3-II pela proteína LC3-I. B) Fotos representativas das bandas correspondentes às proteínas LC3-I, LC3-II e β -actina. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-47). Fonte: Do autor.

Figura 9. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-47 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína Beclin-1 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*

Legenda: A) Resultados expressos como a razão do conteúdo da proteína Beclin-1 pela proteína β -actina. B) Fotos representativas das bandas correspondentes às proteínas Beclin-1 e β -actina. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-47). Fonte: Do autor.

Figura 10. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-47 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína p62 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*

Legenda: A) Resultados expressos como a razão do conteúdo da proteína p62 pela proteína β -actina. B) Fotos representativas das bandas correspondentes às proteínas p62 e β -actina. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-47). Fonte: Do autor.

Para o **BDE-99** pode-se observar (Figura 11) que o mesmo causou aumento na quantidade de LC3-II nas duas maiores concentrações (5 $\mu\text{mol/L}$ e 25 $\mu\text{mol/L}$) apenas no tempo de 48 horas. Na análise com 24h de exposição, apenas a maior concentração teve a capacidade de induzir o processo autofágico na ausência de wortamanina. Quando utilizado o inibidor de autofagia, este composto apresentou aumento na quantidade de LC3-II apenas na maior concentração (25 $\mu\text{mol/L}$), em 24 e 48 horas, podendo ser visualizado uma redução no padrão de aglomeração da proteína LC3-II.

Podemos observar nas Figuras 12, 13, 14 e 15 que, de forma semelhante ao que ocorre com o BDE-47, conforme as concentrações aumentam, há um surgimento maior de células em processo de autofagia, caracterizada pelo padrão de aglomeração da marcação fluorescente no citoplasma da célula, representando a LC3-II e não o padrão difuso que é apresentado pela LC3-I.

Figura 11. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-99 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre a porcentagem de células que apresentaram padrão de aglomeração da proteína LC3-II na membrana do autofagossomo após 24 e 48 horas de exposição

Legenda: A) Células incubadas sem adição do inibidor de autofagia, wortamanina (100 nmol/L); B) Células incubadas com adição do inibidor de autofagia, wortamanina (100 nmol/L). * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-99). Fonte: Do autor.

Figura 12. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-99 sem a adição de wortamanina no tempo de exposição de 24 horas

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-99 0,1 µmol/L; C) BDE-99 1 µmol/L; D) BDE-99 5 µmol/L; E) BDE-99 25 µmol/L; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Figura 13. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-99 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 24 horas

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-99 0,1 µmol/L; C) BDE-99 1 µmol/L; D) BDE-99 5 µmol/L; E) BDE-99 25 µmol/L; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Figura 14. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-99 sem a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-99 0,1 µmol/L; C) BDE-99 1 µmol/L; D) BDE-99 5 µmol/L; E) BDE-99 25 µmol/L; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Figura 15. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-99 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-99 0,1 µmol/L; C) BDE-99 1 µmol/L; D) BDE-99 5 µmol/L; E) BDE-99 25 µmol/L; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Nos ensaios utilizando a técnica de *western blotting* foi observada diferença entre os tratamentos após a exposição das células HepG2 com o BDE-99, sendo que foi observado este efeito na concentração de 25 $\mu\text{mol/L}$ em todas as proteínas atuantes no processo autofágico, LC3, Beclin-1 e p62 (Figuras 16, 17 e 18, respectivamente).

Figura 16. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-99 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína LC3 de células HepG2, após 24 e 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*

Legenda: A) Resultados expressos como a razão do conteúdo da proteína LC3-II pela proteína LC3-I. B) Fotos representativas das bandas correspondentes às proteínas LC3-I, LC3-II e β -actina. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-99). Fonte: Do autor.

Figura 17. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-99 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína Beclin-1 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*

Legenda: A) Resultados expressos como a razão do conteúdo da proteína Beclin-1 pela proteína β -actina. B) Fotos representativas das bandas correspondentes às proteínas Beclin-1 e β -actina. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-99). Fonte: Do autor.

Figura 18. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-99 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína p62 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*

Legenda: A) Resultados expressos como a razão do conteúdo da proteína p62 pela proteína β -actina. B) Fotos representativas das bandas correspondentes às proteínas p62 e β -actina. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-99). Fonte: Do autor.

Para o **BDE-154**, podemos observar na Figura 19 que o mesmo causou aumento na quantidade de LC3-II apenas na maior concentração (25 $\mu\text{mol/L}$) tanto no tempo de 24h quanto no de 48h. Na presença da wortamanina, este composto não apresentou aumento no padrão de aglomeração da proteína LC3-II. É possível observar nas Figuras 20, 21, 22 e 23 que apenas na maior concentração temos um padrão de aglomeração de LC3-II mais acentuado.

Figura 19. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-154 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre a porcentagem de células que apresentaram padrão de aglomeração da proteína LC3-II na membrana do autofagossomo após 24 e 48 horas de exposição

Legenda: A) Células incubadas sem adição do inibidor de autofagia, wortamanina (100 nmol/L); B) Células incubadas com adição do inibidor de autofagia, wortamanina (100 nmol/L). * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-154). Fonte: Do autor.

Figura 20. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-154 sem a adição de wortamanina no tempo de exposição de 24 horas

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-154 0,1 µmol/L; C) BDE-154 1 µmol/L; D) BDE-154 5 µmol/L; E) BDE-154 25 µmol/L; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Figura 21. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-154 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 24 horas

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-154 0,1 µmol/L; C) BDE-154 1 µmol/L; D) BDE-154 5 µmol/L; E) BDE-154 25 µmol/L; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Figura 22. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-154 sem a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-154 0,1 µmol/L; C) BDE-154 1 µmol/L; D) BDE-154 5 µmol/L; E) BDE-154 25 µmol/L; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Figura 23. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-154 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-154 0,1 μmol/L; C) BDE-154 1 μmol/L; D) BDE-154 5 μmol/L; E) BDE-154 25 μmol/L; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Nos ensaios de *western blotting*, após a análise da razão LC3-II por LC3-I, sob influência do BDE-154, também pode-se observar que houve diferença estatística entre os tratamentos, mas para este composto observa-se o efeito significativo apenas na maior concentração (25 $\mu\text{mol/L}$) em ambos os tempos de exposição (Figura 24), entretanto não conseguimos detectar este efeito nas outras proteínas analisadas, Beclin-1 e p62 (Figuras 25 e 26, respectivamente).

Figura 24. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-154 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína LC3 de células HepG2, após 24 e 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*

A)

B)

Legenda: A) Resultados expressos como a razão do conteúdo da proteína LC3-II pela proteína LC3-I. B) Fotos representativas das bandas correspondentes às proteínas LC3-I, LC3-II e β -actina. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-154). Fonte: Do autor.

Figura 25. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-154 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína Beclin-1 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*

Legenda: A) Resultados expressos como a razão do conteúdo da proteína Beclin-1 pela proteína β -actina. B) Fotos representativas das bandas correspondentes às proteínas Beclin-1 e β -actina. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-154). Fonte: Do autor.

Figura 26. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-154 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína p62 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*

Legenda: A) Resultados expressos como a razão do conteúdo da proteína p62 pela proteína β -actina. B) Fotos representativas das bandas correspondentes às proteínas p62 e β -actina. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-154). Fonte: Do autor.

Na análise com 24h de exposição, **BDE-209** causou aumento na quantidade de LC3-II apenas na maior concentração (25 $\mu\text{mol/L}$). E assim como visualizado para o BDE-99, no tempo de 48 horas este congênera teve a capacidade de induzir o processo autofágico na ausência de wortamanina nas duas maiores concentrações (5 $\mu\text{mol/L}$ e 25 $\mu\text{mol/L}$) (Figura 27). Quando testado associado ao tratamento com wortamanina, este composto apresentou aumento na quantidade de LC3-II apenas na maior concentração (25 $\mu\text{mol/L}$), em 24 e 48 horas, sendo que nesta análise pode-se observar uma redução no padrão de aglomeração da proteína LC3-II. Podemos observar nas Figuras 28, 29, 30 e 31 que, conforme as concentrações aumentam, há um surgimento maior de células em processo de autofagia, de forma semelhante do que ocorre com os demais compostos testados.

Figura 27. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-209 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre a porcentagem de células que apresentaram padrão de aglomeração da proteína LC3-II na membrana do autofagossomo após 24 e 48 horas de exposição

Legenda: A) Células incubadas sem adição do inibidor de autofagia, wortamanina (100 nmol/L); B) Células incubadas com adição do inibidor de autofagia, wortamanina (100 nmol/L). * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-209). Fonte: Do autor.

Figura 28. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-209 sem a adição de wortmanina no tempo de exposição de 24 horas

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-209 0,1 µmol/L; C) BDE-209 1 µmol/L; D) BDE-209 5 µmol/L; E) BDE-209 25 µmol/L; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Figura 29. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-209 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 24 horas

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-209 0,1 µmol/L; C) BDE-209 1 µmol/L; D) BDE-209 5 µmol/L; E) BDE-209 25 µmol/L; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Figura 30. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-209 sem a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-209 0,1 µmol/L; C) BDE-209 1 µmol/L; D) BDE-209 5 µmol/L; E) BDE-209 25 µmol/L; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Figura 31. Fotomicrografias (magnificação 400x) representativas do tratamento com o BDE-209 com a adição de wortamanina no tempo de exposição de 48 horas

Legenda: A) Controle negativo; B) BDE-209 0,1 µmol/L; C) BDE-209 1 µmol/L; D) BDE-209 5 µmol/L; E) BDE-209 25 µmol/L; F) Controle positivo (CP) – déficit de nutrientes. Seta amarela aponta o núcleo da célula marcado com Hoechst; seta branca aponta células com LC3-II visualizado através de um padrão de aglomeração da proteína na membrana do autofagossomo. Fonte: Do autor.

Nos ensaios de *western blotting* a razão LC3-II por LC3-I, sob influência do BDE-209 também foi evidenciado que há diferença estatística entre os tratamentos, sendo que o efeito ocorreu na concentração de 25 $\mu\text{mol/L}$ no tempo de exposição de 24h e com 48h foi observado o aumento na razão LC3-II por LC3-I nas duas maiores concentrações (Figura 32). E também foram observados efeitos semelhantes para as proteínas Beclin-1 e p62 (Figuras 33 e 34, respectivamente).

Figura 32. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-209 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína LC3 de células HepG2, após 24 e 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*

Legenda: A) Resultados expressos como a razão do conteúdo da proteína LC3-II pela proteína LC3-I. B) Fotos representativas das bandas correspondentes às proteínas LC3-I, LC3-II e β -actina. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-209). Fonte: Do autor.

Figura 33. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-209 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína Beclin-1 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*

A)

B)

Legenda: A) Resultados expressos como a razão do conteúdo da proteína Beclin-1 pela proteína β -actina. B) Fotos representativas das bandas correspondentes às proteínas Beclin-1 e β -actina. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-209). Fonte: Do autor.

Figura 34. Efeito (média $\pm$ EPM de três replicatas) do tratamento com BDE-209 (0,1; 1; 5 e 25 $\mu\text{mol/L}$) sobre o conteúdo da proteína p62 de células HepG2, após 48 horas de exposição, avaliado pela técnica de *western-blotting*

Legenda: A) Resultados expressos como a razão do conteúdo da proteína p62 pela proteína β -actina. B) Fotos representativas das bandas correspondentes às proteínas p62 e β -actina. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de BDE-209). Fonte: Do autor.

5 DISCUSSÃO – AUTOFAGIA

Os contaminantes ambientais, inclusive os PBDEs, têm sido muitas vezes relacionados a diversos distúrbios fisiológicos, como hepatotoxicidade, agindo direta ou indiretamente, causando disfunção celular e até mesmo morte celular (MILDAZIENE, 2002; PHAM et al, 2006; LEE e SOKOL, 2007; STAPLETON et al, 2009; SOUZA et al, 2013; LIU et al., 2015). Está exposição a contaminantes gera um estresse celular, fator este que, em muitos casos, está relacionado com indução do processo autofágico (ORRENIUS et al., 2013).

Como pode-se observar, os resultados encontrados foram ao encontro da hipótese apresentada, uma vez que os PBDEs em estudo causaram indução de autofagia. As células HepG2 desencadearam o processo autofágico após serem expostas aos BDE-47, -99, 154 e -209, sendo que isso provavelmente aconteceu como um mecanismo de defesa frente a toxicidade destes compostos. Este processo foi detectado devido a uma elevada conversão de LC3-I em LC3-II e alteração nos níveis das proteínas autofágicas p62 e Beclin-1.

Os resultados obtidos sobre a indução do processo de autofagia pelos compostos em estudos vão ao encontro de outros trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, os quais apontam que outros congêneres dos PBDEs (BDE-100 e BDE-153) também são capazes de causar a indução do processo autofágico, fenômeno observado através da utilização das técnicas de imunocitoquímica e *western blotting* (PEREIRA et al., 2016). Outro trabalho também a ação dos PBDEs com a indução da autofagia, como o BDE 209 que aumentou a autofagia, diminuiu a viabilidade dos neurônios causando neurotoxicidade e comprometendo capacidade de aprendizagem e memória em ratos (SUN et al., 2017).

A Autofagia normalmente ocorre como um mecanismo de proteção das células (BOLT; KLIMECKI, 2012), mas quando ocorre de forma exacerbada, pode atuar como o indutor de morte celular (VINOD et al., 2014). Como já visto, o processo de autofagia ocorre seguindo uma cascata de reações, as quais podem ser perturbadas por contaminantes ambientais (arsênio), medicamentos (dexametasona), inibidores da enzima histona-desacetilase (tamoxifeno e estaurosporina) (SHAO et al., 2004; SHIMIZU et al., 2004; BURSCH et al., 1996, KANZAWA et al., 2005; LAANE et al., 2009; BOLT et al., 2010; ZHAO et al., 2010; LEE et al., 2011).

O processo de autofagia é classicamente induzido sob condições de privação de nutrientes e é caracterizado por extensa vacuolização, depleção de organelas, aumento de vesículas ácidas e acumulação de gotículas de gordura (MARTINET et al., 2006). Dessa forma, as células desencadeiam a autofagia para reciclar as suas proteínas a fim de equilibrar a síntese e degradação das mesmas (BOLT; KLIMECKI, 2011). Em função disto, foi utilizado um controle positivo (starvation medium) capaz de induzir esta condição de estresse, déficit de nutrientes, e verificou-se que os valores encontrados, com relação à quantidade de células que apresentam um padrão de aglomeração da proteína LC3-II neste controle, foi semelhante ao observado na maior concentração (25 µmol/L) dos BDE-47 e BDE-99, toda via, os BDE-154 e 209 também apresentaram este efeito tóxico, porém em menor intensidade. Nestes ensaios, foi possível observar que quando ocorreu o desencadeamento do processo autofágico, houve uma menor marcação da proteína LC3 de forma difusa pelo citosol e uma maior ocorrência da forma denominada pontuado ou agregado, o que caracteriza uma conversão da proteína LC3-I em LC3-II (forma da proteína que integra as membranas dos autofagossomos).

Embora o processo autofágico seja geralmente considerado um mecanismo de reciclagem de componentes celulares, o mesmo também atua na resposta de proteção celular contra xenobióticos que podem causar efeitos nocivos à célula. Portanto, a investigação do desencadeamento deste processo após a exposição aos PBDEs foi necessária, uma vez que estes compostos já apresentaram efeitos citotóxicos, como aumento de espécies reativas de oxigênio (FÜLLGRABE; KLIONSKY; JOSEPH, 2014; HU; HU; XU, 2009; SOUZA et al., 2013). Sendo que já foi mostrado que o BDE-47 é capaz de induzir autofagia, fazendo com que ocorra um acúmulo de autofagossomos, o que causou um estresse oxidativo em culturas de células neuronais levando-as a morte (ZHANG et al., 2017).

Alguns estudos relataram que estes compostos são capazes de causar danos à molécula de DNA, causar efeito citostático e atuar como agentes oxidantes - fatores que se apresentam como possíveis indutores do processo de autofagia (BARSIENTE; SYVOKIENE; BJORNSTAD, 2006; JI et al., 2011; ORRENIUS; KAMINSKY; ZHIVOTOVSKY, 2013; SOUZA et al., 2013). Como supracitado, este desencadeamento da autofagia atua como um mecanismo de proteção das células sob condições de estresse na tentativa de garantir a sobrevivência das mesmas, e

este pode ter sido o fator desencadeador do aumento da proteína LC3-II observado no ensaio de imunocitoquímica após o tratamento com os PBDEs.

Outro efeito que os PBDEs apresentaram foi sobre proteína p62 (sequestrossoma – SQSTM1), a qual é fundamental para o processo autofágico. Esta proteína é multifuncional para autofagia, pois regula a formação do autofagossomo e o transporte do mesmo aos lisossomos, afim de eliminar proteínas/substratos deformados ou danificados (ORRENIUS et al., 2013). Assim, foi realizado, o bloqueio de atividade lisossomal utilizando um inibidor do processo autofágico, o cloreto de amônio, o qual inibe o processo de autofagia durante a degradação dos autofagossomos (YAMAMOTO et al., 1998). Isso foi realizado para auxiliar na monitorização do teor de proteínas envolvidas neste processo bioquímico antes que o mesmo seja finalizado e degradado (KLIONSKY et al., 2016). Então, nossos resultados de *western blotting* demonstram que houve indução de autofagia após a exposição aos dois PBDEs avaliados, pois foram encontrados níveis elevados da p62 após 48 horas de exposição.

A proteína Beclin-1 também foi afetada pelos PBDEs em estudo, pois como pode-se observar os níveis desta proteína estavam maiores na presença destes compostos. A Beclin-1 participa da etapa de formação dos autofagossomos, sendo assim, a ação dos PBDEs nesta etapa da autofagia, pode levar a um processo exacerbado caso ocorra alterações no funcionamento dos moduladores desta cascata de reações (MURROW e DEBNATH, 2013; YAN e BACKER; 2007). Este resultado condiz com a literatura, pois Wang e colaboradores (2016), observaram que o BDE-47 aumentou os níveis das proteínas Beclin-1, p62 e LC3 em tecidos extraídos de ovários de ratas tratadas, mostrando que estes compostos causam efeitos semelhantes *in vitro* e *in vivo*.

Adicionalmente, estes compostos também podem causar disfunção na bioenergética mitocondrial e alterações na membrana desta organela (PAZIN, PEREIRA, DORTA, 2015; PEREIRA et al., 2014), fatores que podem também desencadear o processo de autofagia (FÜLLGRABE, KLIONSKY, JOSEPH, 2014). Sendo que quando ocorre estritamente nas mitocôndrias, este processo leva o nome de mitofagia e é de suma importância para manutenção da homeostase celular, principalmente devido ao fato de que a mitocôndria possui grande importância nas vias de morte celular (ZHANG, 2013; PEREIRA et al., 2012; MIZUSHIMA, 2007).

Nossos resultados corroboram com outros estudos realizados, nos quais os PBDEs utilizados, que apresentam efeitos adversos mais pronunciados, foram os mesmos que, aparentemente, apresentaram maior potencial de indução de autofagia nos nossos ensaios de imunocitoquímica (PAZIN, PEREIRA, DORTA, 2015; SOUZA et al., 2016; USENKO et al., 2011). Portanto, classificando os compostos de acordo com os que causaram maior aumento de proteína LC3-II, temos o BDE-47 em primeiro lugar como o mais potente, seguido do BDE-99 e BDE-209, por fim o BDE-154.

Este padrão de toxicidade pode estar relacionado com a quantidade de átomos de bromo, pois modelos que estudam a relação estrutura-atividade de PBDEs têm sido desenvolvidos e mostram que PBDEs 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). Como pode-se observar no trabalho de Usenko e colaboradores (2011), no qual eles comparam os BDE-28, BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153 e BDE-183; analisando os efeitos destes sobre o zebrafish e concluindo que os compostos com menos átomos de bromo são realmente mais tóxicos.

O fato de o BDE-209 apresentar um potencial de indução de autofagia nos ensaios de imunocitoquímica maior do que o BDE-154 pode ser explicado pelo fato de que, diferentemente dos outros PBDEs em estudo - que são considerados resistentes a diversos fatores físicos e químicos -, o BDE-209 pode sofrer fotólise e biotransformação. Estes fenômenos geram compostos com menor número de bromos em sua estrutura, podendo ultrapassar com mais facilidade as membranas biológicas, fato que não ocorre facilmente com compostos de maior bromação (USEPA, 2010). Os ensaios com células HepG2 foram realizados apenas na presença de luz, pois no meio ambiente, esta degradação ocorre naturalmente, assim o efeito encontrado para o BDE-209 em nossos testes se assemelha do real.

Em suma, os BDE-47, -99, -154 e -209 apresentaram elevado potencial de indução de autofagia, sendo que os BDE-47 e -99 se assemelharam do controle positivo (starvation) nos ensaios de imunocitoquímica. Adicionalmente, os mesmos compostos alteraram os níveis das proteínas LC3, p62 e Beclin-1 nos ensaios de western blotting.

6 RESULTADOS - ZEBRAFISH

Nos ensaios que avaliaram o desenvolvimento normal do estágio embrionário-larval dos peixes *Danio rerio* (zebrafish), foram realizados testes analisando *endpoints* de letalidade, subletalidade e teratogenicidade, a fim de verificar se os PBDEs em estudo (BDE-47, BDE-99, BDE-154 e BDE-209) são capazes de promover efeito nocivo ao organismo-teste (NAGEL, 2002).

Para determinar se o solvente utilizado tem a capacidade induzir malformações no zebrafish, foi realizado um teste preliminar, que também auxiliou na determinação da concentração segura para utilização, no qual foi verificado que 1% de DMSO seria a concentração segura, por não induzir o aparecimento de malformações.

Neste estudo pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa com relação ao efeito letal aos embriões/larvas de zebrafish quando expostos a maiores concentrações do BDE-47, 25 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 35A) e do BDE-209, 50 $\mu\text{mol/L}$ (Figura 35D), sendo que este último composto apenas apresentou toxicidade quando testado na presença de luz (fotoperíodo claro:escuro 14:10 horas). Todavia, não foi observado efeito de letalidade aos zebrafish quando expostos aos BDE-99, BDE154 e BDE-209 (sob ausência de luz).

Figura 35. Taxa de letalidade dos embriões/larvas de zebrafish (média $\pm$ EPM de 20 organismos) após a exposição aos PBDEs em estudo

Legenda: A) BDE-47; B) BDE-99; C) BDE-154; D) BDE-209 na presença de luz; E) BDE-209 na ausência de luz. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de PBDE).
Fonte: Do autor.

Figura 36. Taxa de letalidade dos embriões/larvas de zebrafish

Legenda: Taxa de letalidade (média $\pm$ EPM de 20 organismos) - representada pela ausência de batimentos cardíacos - após a exposição ao BDE-47 (A) e ao BDE-209 sob fotoperíodo claro:escuro (B). * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de PBDE). Fonte: Do autor.

Figura 37. Fotomicrografias (magnificação 30x) ilustrativas das larvas de *Danio rerio* (zebrafish) com 96 hpf após exposição ao BDE-209 sob fotoperíodo

Legenda: A) Organismo saudável; B) Organismo com ausência de batimentos cardíacos, além de outras malformações como edema de saco vitelínico e pericárdio. Fonte: Do autor.

Ao avaliarmos os efeitos subletais, pode-se observar que apenas os BDE-47 e BDE-209 (na presença de luz), em suas maiores concentrações (25 $\mu\text{mol/L}$ e 50 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente), foram capazes de causar alterações nocivas estatisticamente significativas ao organismo teste (Figura 38A e 38D). Sendo que ambos compostos levaram a um aumento na taxa de organismos que apresentaram edemas de pericárdio e de saco vitelínico (Figura 39). Ainda podemos observar na Figura 40, as fotos representativas dos organismos-teste que apresentaram esta malformação após a exposição a estes compostos.

Figura 38. Taxa de subletalidade dos embriões/larvas de zebrafish (média $\pm$ EPM de 20 organismos) após a exposição aos PBDEs em estudo

Legenda: A) BDE-47; B) BDE-99; C) BDE-154; D) BDE-209 na presença de luz; E) BDE-209 na ausência de luz. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de PBDE).
Fonte: Do autor.

Figura 39. Taxa de subletalidade dos embriões/larvas de zebrafish

Legenda: Taxa de subletalidade (média $\pm$ EPM de 20 organismos) - representada pela presença de edemas de pericárdio e/ou saco vitelínico - após a exposição ao BDE-47 (A) e ao BDE-209 sob fotoperíodo claro:escuro (B). *p<0,05 em relação ao controle negativo (ausência de PBDE). Fonte: Do autor.

Figura 40. Fotomicrografias (magnificação 30x) ilustrativas das larvas de *Danio rerio* (zebrafish) com 96 hpf após exposição ao BDE-47

Legenda: A) Organismo saudável; B) Organismo com edema de saco vitelínico e de pericárdio. Fonte: Do autor.

Também foi observado que os BDE-47 (10 e 25 $\mu\text{mol/L}$), BDE-99 (25 $\mu\text{mol/L}$) e BDE-209 (50 $\mu\text{mol/L}$ - na presença de luz), foram capazes de causar alterações prejudiciais estatisticamente significativas ao organismo teste quando avaliados os indicadores de teratogenicidade (Figura 41A, 41B e 41D). Sendo que o indicador mais alterado foi a inflação da bexiga natatória (Figura 42). A Figura 43 mostra as fotos representativas dos organismos-teste que apresentaram deficiência na inflação das bexigas natatórias após a exposição do zebrafish a estes compostos.

Figura 41. Taxa de teratogenicidade dos embriões/larvas de zebrafish (média $\pm$ EPM de 20 organismos) após a exposição aos PBDEs em estudo

Legenda: A) BDE-47; B) BDE-99; C) BDE-154; D) BDE-209 na presença de luz; E) BDE-209 na ausência de luz. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de PBDE).
Fonte: Do autor.

Figura 42. Taxa de bexigas natatórias infladas nos embriões/larvas de zebrafish (média $\pm$ EPM de 20 organismos) após a exposição aos PBDEs em estudo

Legenda: A) BDE-47; B) BDE-99; C) BDE-154; D) BDE-209 na presença de luz; E) BDE-209 na ausência de luz. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (ausência de PBDE).
Fonte: Do autor.

Figura 43. Fotomicrografias (magnificação 30x) ilustrativas das larvas de *Danio rerio* (zebrafish) com 144 hpf após exposição ao BDE-47

Legenda: A) Organismo saudável; B) Organismo com bexiga natatória inflada. Fonte: Do autor.

7 DISCUSSÃO – ZEBRAFISH

Já foi relatado na literatura que alguns congêneres de PBDEs causaram efeito tóxico com relação ao desenvolvimento do *D. rerio*, como redução da locomoção causada pelo BDE-47 (CHOU et al., 2010), presença de malformações decorrentes da exposição à mistura comercial de DE-71 (penta-BDE) (HAN; YUEN; WU, 2013), ou ainda mortalidade como foi observado no trabalho de Usenko et al. (2011), o qual analisou a ocorrência de letalidade de seis congêneres de PBDEs (BDE-28, BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153 e BDE-183) sobre o zebrafish.

Assim como no trabalho de Usenko et al. (2011), neste estudo podemos observar que os BDE-47 e 209 (na presença de luz) causaram mortalidade dos organismos-teste, sendo esse efeito visualizado através da análise de batimentos cardíacos. Adicionalmente, estes mesmos compostos causaram alterações nos indicadores de subletalidade, edemas de saco vitelínico e de pericárdio, o que indica que a causa da morte pode ter sido decorrente de ação destes compostos sobre o sistema cardiovascular, uma vez que para ambos indicadores, o pericárdio foi uma das regiões mais afetadas. Este efeito cardiotoxico no desenvolvimento embrio/larval de zebrafish já foi relatado por Du et al. (2015) quando testaram outros retardantes de chama (retardantes de chama arilo organofosforados) e concluíram que assim como os PBDEs, estes compostos causam maior toxicidade quando possuem baixa hidrofobicidade, pois possui maior capacidade de se acumular e causar danos aos organismos.

Ao avaliar os indicadores de teratogenicidade, nota-se que os BDE-47, BDE-99 e BDE-209 (na presença de luz) causaram uma interferência sobre inflação das bexigas natatórias. Este efeito já foi registrado como sendo causado por diversos compostos, como: ácido perfluorooctano sulfônico (CHEN et al., 2014; HAGENAARS et al., 2014), sulfonamidas (LIN, CHEN, CHEN, 2013), tetraciclina (ZHANG, CHENG, XIN et al., 2015). Este efeito também ocorreu pela exposição ao BDE-47 hidroxilado, 6-OH-BDE-47, o que gera grandes preocupações ambientais, pois mesmo após sofrer diversas reações no ambiente, estes compostos apresentam elevada toxicidade, podendo ser maior do que a apresentada pelo composto original (MACAULAY et al., 2016). O efeito dos PBDEs em estudo sobre inflação das bexigas natatórias do zebrafish pode ser decorrente perturbações em inúmeras vias

moleculares, conduzindo coletivamente aos problemas observados na bexiga natatória.

Como visto anteriormente nos ensaios de letalidade e subletalidade, os PBDEs podem gerar problemas no sistema cardiovascular, o qual possui influência direta no desenvolvimento da bexiga natatória, pois a circulação sanguínea é um fator essencial no desenvolvimento normal deste órgão (YUE, PETERSON, HEIDEMAN, 2015).

Outro fator que pode causar este efeito teratogênico é devido a uma disfunção endócrina, pois de acordo com Stinckens et al. (2016), o desenvolvimento da bexiga natatória está diretamente relacionado com o funcionamento da tireoide, uma vez que foi testado o efeito de um inibidor de peroxidase tireoidiana e o mesmo reduziu a inflação das bexigas. Devido a isto, é possível que este efeito possa ter ocorrido por alterações na função tireoidiana, uma vez que os PBDEs são famosos por causar disfunções endócrinas (LIU et al., 2017). Sendo que o efeito, citado anteriormente, do BDE-47 hidroxilado sobre as bexigas natatórias também foi relacionado com alterações ocorridas na tireoide segundo Macaulay et al., (2016).

Da mesma forma como ocorrido nos ensaios avaliando o efeito dos PBDEs sobre a autofagia, o padrão de maior toxicidade dos compostos menores ocorreu e provavelmente está relacionado diretamente com a quantidade de átomos de bromo. Pois como supracitado, há modelos que estudam a relação estrutura-atividade de PBDEs e mostram que quando o PBDE possui menor bromação, com átomos de bromo na posição orto e sem átomos de bromo na posição meta, estes compostos se apresentam como tendo um maior potencial tóxico (HARJU et al., 2007). Esta diferença também foi visualizada por Usenko et al. (2011), avaliando diversos congêneres de PBDEs, pois observaram que os compostos com menos átomos de bromo apresentaram toxicidade ao zebrafish (BDE-28, BDE-47, BDE-99 e BDE-100), enquanto que os compostos com mais átomos de bromo não causaram problemas no desenvolvimento deste organismo (BDE-153 e BDE-183). Esta correlação de número de átomos de bromo com potencial tóxico já foi observada em outros estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (PAZIN; PEREIRA; DORTA, 2015; PEREIRA; SOUZA; DORTA, 2013; SOUZA et al., 2016; SOUZA et al., 2013).

A divergência nos resultados obtidos nos dois ensaios realizados com o BDE-209, na presença e ausência de luz, avaliando a influência desse composto sobre os indicadores de toxicidade é corroborada pelo fato de que este composto pode sofrer

fotólise. Esta degradação por fotólise pode gerar outros PBDEs com menor número de bromos em sua estrutura, podendo ultrapassar com menos dificuldade as membranas biológicas e causar efeitos nocivos aos organismos expostos à estes compostos (TALNESS et al., 2008; USEPA, 2010).

Em suma, os BDE-47, BDE-99 e BDE-209 (na presença de luz) causaram efeitos nocivos aos embriões/larvas de *Danio rerio*, principalmente afetando o sistema cardiovascular e a inflação das bexigas natatórias, podendo ter ocorrido isto em decorrência de uma possível disfunção endócrina causada por estes compostos.

8 CONCLUSÕES

Os resultados avaliando os efeitos dos PBDEs sobre o processo autofágico indicam que estes congêneres desempenham uma ação importante sobre tal mecanismo de proteção celular, o que pode levar a um desequilíbrio homeostático celular causando morte celular, sendo que nas análises de imunocitoquímica e western blotting, o BDE-47 foi o congênere que apresentou um indício maior de desencadear autofagia.

Quando avaliados os efeitos dos PBDEs sobre o desenvolvimento embrionário-larval do zebrafish, foi observado que estes compostos podem causar problemas cardiovasculares e de inflação das bexigas natatórias, o que compromete o desenvolvimento destes organismos, podendo causar até morte dos mesmos. Sendo que os congêneres com maior potencial tóxico foram BDE-47, BDE-99 e BDE-209 (na presença de luz).

Diante destes fatos, visto a elevada periculosidade dos PBDEs, se faz necessária a regulamentação/proibição de alguns congêneres desta classe no Brasil, assim como ocorre em outros países, pois além de comprometer a saúde humana, os PBDEs causam grande impacto em diversos ecossistemas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BESIS, A.; LAMMEL, G.; KUKUČKA, P.; et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in background air around the Aegean: implications for phase partitioning and size distribution. **Environ Sci Pollut Res Int**. v.24, n.36, p.28102-28120. 2017.

BCC Research. Flame Retardant Chemicals: Technologies and Global Markets. 2015. Disponível em: <http://www.bccresearch.com/market-research/chemicals/flame-retardant-chemicals-report-chm014m.html>. Acessado em: 18/01/2018 às 23:10.

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

BOLT, A.M.; KLIMECKI, W.T. Autophagy in toxicology: self-consumption in times of stress and plenty. **J Appl Toxicol**, v.32, n.7, p.465-479, 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA n°. 396 de 3 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 07 abr. 2008.

BRAUNBECK, T.; BÖTTCHER, M.; HOLLERT, H.; et al. Towards an alternative for the acute fish LC50 test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species - an update. **Altex**, v.22, n.2, p.87-102, 2005.

BREITHOLTZ, M.; RUDÉN, C.; HANSSON, S.O.; et al. Ten challenges for improved ecotoxicological testing in environmental risk assessment. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.63, n.2, p.324-335, 2006.

BSEF - Bromine Science and Environmental Forum. 2016. Disponível em: <http://bsef.com/bromine-applications/fire-safety/>. Acessado 15/04/2016 às 5:40.

BURSCH, W.; ELLINGER, A.; KIENZL, H.; et al. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. **Carcinogenesis**, v.17, n.8, p.1595-1607, 1996.

CARLSSON, G.; PATRING, J.; KREUGER, J.; et al. Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aquat Toxicol**, v.126, p.30-41, 2013.

CHEN, J.; TANGUAY, R.L.; TAL, T.L.; et al. Early life perfluorooctanesulphonic acid (PFOS) exposure impairs zebrafish organogenesis. **Aquat Toxicol**, v.150, p.124-132, 2014.

CHEN, X.; HUANG, C.; WANG, X.; et al. BDE-47 disrupts axonal growth and motor behavior in developing zebrafish. **Aquat Toxicol**, v.120-121, p.35-44, 2012a.

CHEN, Y.; LI, J.; LIU, L.; et al. Polybrominated diphenyl ethers fate in China: a review with an emphasis on environmental contamination levels, human exposure and regulation. **J Environ Manage**, v.113, p.22-30, 2012b.

CHEVRIER, C.; WAREMBOURG, C.; MANER-IDRISSI, G.; et al. Childhood exposure to polybrominated diphenyl ethers and neurodevelopment at six years of age. **Neurotoxicology**, v.54, p.81-88, 2016.

CHOU, C.T.; HSIAO, Y.C.; KO, F.C.; et al. Chronic exposure of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) alters locomotion behavior in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). **Aquat Toxicol**, v.98, n.4, p.388-395, 2010.

COSTA, C.R.; OLIVI, P. A toxicidade em Ambientes Aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quim Nova**, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008.

COSTA, L.G.; GIORDANO, G.; TAGLIAFERRI, S.; et al. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants: environmental contamination, human body burden and potential adverse health effects. **Acta Biomed**, v.79, n.3, p.172-183, 2008.

COWENS, K.R.; SIMPSON, S.; THOMAS, W.K.; et al. Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE)-Induced Suppression of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (PEPCK) Decreases Hepatic Glyceroneogenesis and Disrupts Hepatic Lipid Homeostasis. **J Toxicol Environ Health A**, v.78, n.23-24, p.1437-1449, 2015.

CUERVO, A.M.; WONG, E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. **Cell Res**, v.24, n.1, p.92-104, 2014.

DANIELS, J.L.; PAN, I.J.; JONES, R.; et al. Individual characteristics associated with PBDE levels in U.S. human milk samples. **Environ Health Perspect**, v.118, n.1, p.155-160, 2010.

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

DEODATI, A.; SALLEMI, A.; MARANGHI, F.; et al. Serum Levels of Polybrominated Diphenyl Ethers in Girls with Premature Thelarche. **Horm Res Paediatr**, v.86, n.4, p.233-239, 2016.

DIAMOND, J.M.; LATIMER, H.A.; MUNKITTRICK, K.R.; et al. Prioritizing contaminants of emerging concern for ecological screening assessments. **Environ Toxicol Chem**, v.30, n.11, p.2385-2394, 2011.

DÍAZ-JARAMILLO, M.; MIGLIORANZA, K.S.; GONZALEZ, M.; et al. Uptake, metabolism and sub-lethal effects of BDE-47 in two estuarine invertebrates with different trophic positions. **Environ Pollut**, v.213, p.608-617, 2016.

DONG, Z.; WANG, L.; XU, J.; et al. Promotion of autophagy and inhibition of apoptosis by low concentrations of cadmium in vascular endothelial cells. **Toxicol In Vitro**, v.23, n.1, p.105-110, 2009.

DU, L.; SUN, W.; ZHANG, H.; et al. BDE-209 inhibits pluripotent genes expression and induces apoptosis in human embryonic stem cells. **J Appl Toxicol**, v.36, p.659-668, 2016.

DUARTE, F.V.; TEODORO, J.S.; ROLO, A.P.; et al. Exposure to dibenzofuran triggers autophagy in lung cells. **Toxicol Lett**, v.209, n.1, p.35-42, 2012.

EISENBERG-LERNER, A.; BIALIK, S.; SIMON, H.U.; et al. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. **Cell Death Differ**, v.16, n.7, p.966-975, 2009.

EMBRY, M.R.; BELANGER, S.E.; BRAUNBECK, T.A.; et al. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. **Aquat Toxicol**, v.97, n.2, p.79-87, 2010.

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

FERRARI, R.S. Quantificação de PBDEs em amostras de sedimentos de Ribeirão Preto e avaliação da toxicidade do BDE-209 em células HepG2 sob influência de indução autofágica. **Dissertação de mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. p.77.

FROMME, H.; BECHER, G.; HILGER, B.; et al. Brominated flame retardants - Exposure and risk assessment for the general population. **Int J Hyg Environ Health**, v.219, n.1, p.1-23, 2016.

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

GENG, J.; KLIONSKY, D.J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. **EMBO Rep**, v.9, n.9, p.859-864, 2008.

GOMES, A.P.; DUARTE, F.V.; NUNES, P.; et al. Berberine protects against high fat diet-induced dysfunction in muscle mitochondria by inducing SIRT1-dependent mitochondrial biogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v.1822, n.2, p.185-195, 2012.

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

HAGENAARS, A.; STINCKENS, E.; VERGAUWEN, L.; et al. PFOS affects posterior swim bladder chamber inflation and swimming performance of zebrafish larvae. **Aquat Toxicol**, v.157, p.225-235, 2014.

HAN, X.B.; YUEN, K.W.; WU, R.S. Polybrominated diphenyl ethers affect the reproduction and development, and alter the sex ratio of zebrafish (*Danio rerio*). **Environ Pollut**, v.182, p.120-126, 2013.

HANYANG, L.; XUANZHE, L.; XUYANG, C.; et al. Application of Zebrafish Models in Inflammatory Bowel Disease. **Front Immunol**, v.3, n.8, p.501. 2017.

HARJU, M.; HAMERS, T.; KAMSTRA, J.H.; et al. 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.816-826, 2007.

HASSAN, S.A.; MOUSSA, E.A.; ABBOTT, L.C. The effect of methylmercury exposure on early central nervous system development in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. **J Appl Toxicol**, v.32, n.9, p.707-713, 2012.

HU, X.; HU, D.; XU, Y. Effects of tetrabrominated diphenyl ether and hexabromocyclododecanes in single and complex exposure to hepatoma HepG2 cells. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.27, n.3, p.327-337, 2009.

JI, K.; CHOI, K.; GIESY, J.P.; et al. Genotoxicity of several polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and hydroxylated PBDEs, and their mechanisms of toxicity. **Environ Sci Technol**, v.45, n.11, p.5003-5008, 2011.

JINHUI, L.; YUAN, C.; WENJING, X. Polybrominated diphenyl ethers in articles: a review of its applications and legislation. **Environ Sci Pollut Res Int**, v.24, n.5, p.4312-4321, 2015.

JU, T.; GE, W.; JIANG, T.; et al. Polybrominated diphenyl ethers in dissolved and suspended phases of seawater and in surface sediment from Jiaozhou Bay, North China. **Sci Total Environ**, v.557-558, p.571-578, 2016.

KANZAWA, T.; ZHANG, L.; XIAO, L.; et al. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. **Oncogene**, v.24, p.980-991, 2005.

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

KAZIMI, N.; CAHILL, G.M. Development of a circadian melatonin rhythm in embryonic zebrafish. **Brain Res Dev Brain Res**, v.117, n.1, p.47-52, 1999.

KIMMEL, C.B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R.; et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Dev Dyn**, v.203, n.3, p.253-310, 1995.

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

KOENIG, C.M.; LANGO, J.; PESSAH, I.N.; et al. Maternal transfer of BDE-47 to offspring and neurobehavioral development in C57BL/6J mice. **Neurotoxicol Teratol**, v.34, n.6, p.571-580, 2012.

KUMA, A.; MATSUI, M.; MIZUSHIMA, N. LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. **Autophagy**, v.3, n.4, p.323-328, 2007.

LAANE, E.; TAMM, KP.; BUENTKE, E.; et al. Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. **Cell Death Differ**, v.16, p.1018-1029, 2009.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v.269, n.1-4, p.1-20, 2007.

LEE, W.S.; SOKOL, R.J. Liver disease in mitochondrial disorders. **Semin Liver Dis**, v.27, p.259-273, 2007.

LI, H.; LIU, H.; MO, L.; et al. Airborne polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polybrominated dibenzo-p-dioxins/furans (PBDD/Fs), and dechlorane plus (DP) in concentrated vehicle parking areas. **Environ Sci Pollut Res Int**, v.23, n.11, p.10702-70713, 2016.

LI, W.W.; LI, J.; BAO, J.K. Microautophagy: lesser-known self-eating. **Cell Mol Life Sci**, v. 69, n.7, p.1125-1136, 2012.

LIN, T.; CHEN, Y.; CHEN, W. Impact of toxicological properties of sulfonamides on the growth of zebrafish embryos in the water. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.36, n.3, p.1068-1076. 2013

LIU, X.; WANG, J.; LU, C.; et al. The role of lysosomes in BDE 47-mediated activation of mitochondrial apoptotic pathway in HepG2 cells. **Chemosphere**, v.124, p.10-21, 2015.

LIU, S.; ZHAO, G.; LI, J.; et al. Association of polybrominated diphenylethers (PBDEs) and hydroxylated metabolites (OH-PBDEs) serum levels with thyroid function in thyroid cancer patients. **Environ Res**, v.159, p.1-8. 2017.

LV, Q.Y.; WAN, B.; GUO, L.H.; et al. In vitro immune toxicity of polybrominated diphenyl ethers on murine peritoneal macrophages: apoptosis and immune cell dysfunction. **Chemosphere**, v.120, p.621-630, 2015.

MACAULAY, L.J.; BAILEY, J.M.; LEVIN, E.D.; et al. Persisting effects of a PBDE metabolite, 6-OH-BDE-47, on larval and juvenile zebrafish swimming behavior. **Neurotoxicol Teratol**, v.52, n.B, p.119-126, 2015.

MACAULAY, L.J.; CHERNICK, M.; CHEN, A.; et al. Exposure to a PBDE/OH-BDE mixture alters juvenile zebrafish (*Danio rerio*) development. **Environ Toxicol Chem**, v.36, n.1, p.36-48, 2016.

MARTINET, W.; de MEYER, G.R.; ANDRIES, L.; et al. In situ detection of starvation-induced autophagy. **J Histochem Cytochem**, v.54, n.1, p.85-96, 2006.

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

MILDAZIENE, V.; NAUCIENE, Z.; BANIENE, R.; et al. Analysis of effects of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl on the flux control in oxidative phosphorylation system in rat liver mitochondria. **Molec Biol Rep**, v.29, p.35-40, 2002.

MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. **Cell**, v.147, n.4, p.728-741, 2011.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T. How to interpret LC3 immunoblotting. **Autophagy**, v.3, n.6, p.542-545, 2007.

MOROSE, G. An Overview of Alternatives to Tetrabromobisphenol A (TBBPA) and Hexabromocyclododecane (HBCD). University of Massachusetts Lowell, **Lowell Center for Sustainable Production**, 32 p., 2006.

MURRAY, K.E.; THOMAS, S.M.; BODOUR, A.A. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. **Environ Pollut**, v.158, n.12, p.3462-3467, 2010.

MURROW, L.; DEBNATH, J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. **Annual review of pathology**, v.8, p.105–137, 2013.

NAGEL, R. The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*-a general model in ecotoxicology and toxicology. **Altex**, v.19, p.38-48, 2002.

NIH - National Institutes of Health. Guidelines for Use of Zebrafish in the NIH Intramural Research Program. Bethesda. 2009. Revisado em: 05/08/2013. Acessado em: 08/04/2016.

NORMAN Network. 2016. Disponível em: Acessado: <http://www.norman-network.net/?q=node/19>. Acessado em: 20/04/2016 às 3:21.

OECD. Guidelines for the testing of chemicals - Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. (Guideline 236), 22p., 2013.

ORRENIUS, S.; KAMINSKY, V.O.; ZHIVOTOVSKY, B. Autophagy in Toxicology: Cause or Consequence? **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.53, p.275-297, 2013.

PAZIN, M.; PEREIRA, L.C.; DORTA, D.J. Toxicity of brominated flame retardants, BDE-47 and BDE-99 stems from impaired mitochondrial bioenergetics. **Toxicol Mech Methods**, v.25, n.1, p.34-41, 2015.

PEREIRA, L.C.; DUARTE, F.V.; VARELA, A.T.I.; et al. An autophagic process is activated in HepG2 cells to mediate BDE-100-induced toxicity. **Toxicology**, v.376, p.59-65, 2017.

PEREIRA, L.C.; MIRANDA, L.F.C.; SOUZA, A.O.; et al. BDE-154 Induces Mitochondrial Permeability Transition and Impairs Mitochondrial Bioenergetics. **J Toxicol Environ Health A**, v.77, n.1-3, p.24-36, 2014.

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

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

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. Fundamentals of aquatic toxicology. (G. M RAND and S. R. PETROCELLI Eds.). Taylor and Francis, New York, 665p., 1985.

RICHARDSON, S.D. Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. **Anal Chem**, v.84, n.2, p.747-778, 2012.

RICHARDSON, S.D.; KIMURA, S.Y. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. **Anal Chem**, v.88, n.1, p.546-582, 2016.

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

RICHARDSON, S.D.; TERNES, T.A. Water analysis: emerging contaminants and current issues. **Anal Chem**, v.86, n.6, p.2813-48, 2014

RODIL, R.; QUINTANA JB.; CONCHA-GRANÃ E.; et al. Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). **Chemosphere**, v.86, n.10, p.1040-1049, 2012.

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

SCHOLZ, S.; FISCHER, S.; GÜNDEL, U.; et al. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing. **Environ Sci Pollut Res Int**, v.15, n.5, p.394-404, 2008.

SCIFINDER. American Chemical Society. 2016. Disponível em: <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>. Acessado em: 05/04/2016 às 2:40.

SHAO, Y.; GAO, Z.; MARKS, P.A.; JIANG, X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. **Protl Nat Acad Sci USA**, v.101, p.18030-18035, 2004.

SHE, Y.Z.; WU, J.P.; ZHANG, Y.; et al. Bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers and several alternative halogenated flame retardants in a small herbivorous food chain. **Environ Pollut**, v.174, p.164-170, 2013.

SHI, X.; DU, Y.; LAM, P.K.; et al. Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.230, n.1, p.23-32, 2008.

SHIMIZU, S.; KANASEKI, T.; MIZUSHIMA, N.; et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. **Nat Cell Biol**, v.6, p.1221-1228, 2004.

SIDDIQI, M.A.; LAESSIG, R.H.; REED, K.D. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs): New Pollutants--Old Diseases. **Clin Med Res**, v.1, n.4, p.281-290, 2003.

SIPES, N.S.; PADILLA, S.; KNUDSEN, T.B. Zebrafish: as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v.93, n.3, p.256-267, 2011.

SJÖDIN, A.; PATTERSON, D.G.; BERGMAN, A. A review on human exposure to brominated flame retardants--particularly polybrominated diphenyl ethers. **Environ Int**, v.29, n.6, p.829-839, 2003.

SOUZA, A.O.; TASSO, M.J.; OLIVEIRA, A.M.; et al. Evaluation of Polybrominated Diphenyl Ether Toxicity on HepG2 Cells - Hexa-brominated Congener (BDE-154) is Less Toxic than Tetra-Brominated Congener (BDE-47). **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v.119, n.5, p.485-497, 2016.

SOUZA, A.O.; PEREIRA, L.C.; OLIVEIRA, D.P.; et al. 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.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biol Rev Camb Philos Soc**, v.83, n.1, p.13-34, 2008.

STAPLETON, H.; Kelly, S.M.; Pei, R.; et al. Metabolism of Polibrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) by Human Hepatocytes in Vitro, **Environ Health Perspect**, v.117, n.2, p.197-202, 2009.

STINCKENS, E.; VERGAUWEN, L.; SCHROEDER, A.L.; et al. Impaired anterior swim bladder inflation following exposure to the thyroid peroxidase inhibitor 2-mercaptobenzothiazole part II: Zebrafish. **Aquat Toxicol**, v.173, p.204-217, 2016.

SUH, Y.W.; BUETTNER, G.R.; VENKATARAMAN, S.; et al. UVA/B-induced formation of free radicals from decabromodiphenyl ether. **Environ Sci Technol**, v.43, n.7, p.2581-2588, 2009.

SUN, W.; DU, L.; TANG, W.; et al. PBDE-209 exposure damages learning and memory ability in rats potentially through increased autophagy and apoptosis in the hippocampus neuron. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.50, p.151-158. 2017.

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.

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

UMBUZEIRO, G.A. Guia de potabilidade para substâncias químicas. São Paulo: Limiar, 148 p., 2012.

USENKO, C.Y.; ROBINSON, E.M.; USENKO, S.; et al. PBDE developmental effects on embryonic zebrafish. **Environ Toxicol Chem**, v.30, n.8, p.1865-1872, 2011.

USEPA - U.S. Environmental Protection Agency (EPA). An exposure assessment of polybrominated diphenyl ethers. National Center for Environmental Assessment, Washington, DC; EPA/600/R-08/086F. Disponível em: National Technical Information Service, Springfield, VA, e online em: <http://www.epa.gov/ncea>, 2010.

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

WANG, C.; ZHANG, S.; MA, R.; et al. Roles of endoplasmic reticulum stress, apoptosis and autophagy in 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether-induced rat ovarian injury. **Reprod Toxicol**, v.65, p.187-193. 2016

YAMAMOTO, A.; TAGAWA, Y.; YOSHIMORI, T.; et al. Bafilomycin a1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, h-4-ii-ecells. **Cell Struct Funct**, v.23, p.33-42, 1998.

YAN, Y.; BACKER, J.M. Regulation of class III (Vps34) PI3Ks. **Biochem Soc Transac**, v.35, p.239–241, 2007.

YUE, M.S.; PETERSON, R.E.; HEIDEMAN, W. Dioxin inhibition of swim bladder development in zebrafish: is it secondary to heart failure? **Aquat Toxicol**, v.162, p.10-17, 2015.

ZHANG, C.; LI, P.; ZHANG, S.; et al. Oxidative stress-elicited autophagosome accumulation contributes to human neuroblastoma SH-SY5Y cell death induced by PBDE-47. **Environ Toxicol Pharmacol**, v.56, p.322-328. 2017.

ZHANG, Q.; CHENG, J.; XIN, Q. Effects of tetracycline on developmental toxicity and molecular responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Ecotoxicology**, v.24, n.4, p.707-719, 2015.

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

ZHU, X.; TIAN, S.; CAI, Z. Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. **PLoS One**, v.7, n.9, p.1-6, 2012.