UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Alterações mitocondriais induzidas por representantes das
principais classes de Éteres Difenílicos Polibromados**

Lílian Cristina Pereira

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Alterações mitocondriais induzidas por representantes das
principais classes de Éteres Difenílicos Polibromados

Lílian Cristina Pereira

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

"Versão corrigida da dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Toxicologia.
A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP"

**Alterações mitocondriais induzidas por representantes das
principais classes de Éteres Difenílicos Polibromados**

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientada: Lílian Cristina Pereira

Orientador: Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta

Ribeirão Preto

2012

PEREIRA, L.C.	Alterações mitocondriais induzidas por representantes das principais classes de Éteres Difenílicos Polibromados		MESTRADO FCFRPUSP 2012

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.

* A Imagem da capa, reproduzida nesta dissertação, foi autorizada pelo autor Michael Taylor, desde que indicada a fonte (www.shutterstock.com) e que respeite os termos de Licença da empresa.

Pereira, Lílian Cristina

Alterações mitocondriais induzidas por representantes das principais classes de Éteres Difenílicos Polibromados. Ribeirão Preto, 2012.

90 p. : Il. ; 30 cm

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

Orientador: Dorta, Daniel Junqueira

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lílian Cristina Pereira

Alterações mitocondriais induzidas por representantes das principais classes de Éteres Difenílicos Polibromados

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Daniel Junqueira Dorta

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Não Sei

*"Não sei... se a vida é curta ou longa demais pra nós,
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocamos o coração das pessoas.*

Muitas vezes basta ser:

Colo que acolhe,

Braço que envolve,

Palavra que conforta,

Silêncio que respeita,

Alegria que contagia,

Lágrima que corre,

Olhar que acaricia,

Desejo que sacia,

Amor que promove.

*E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais,
Mas que seja intensa, verdadeira, pura... Enquanto durar"*

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

À Deus

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

À minha Família

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

Ao meu noivo

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

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador professor Dr. Daniel Junqueira Dorta, por confiar e acreditar no meu potencial e pela contribuição importante no desenvolvimento do meu conhecimento científico.

Apreciei imensamente a colaboração de meus colegas de laboratório Cezar Rangel Pestana, Fernando Postalli, Mariana Lopes Grassi e Valéria Tudella Uyemura que fizeram a minha rotina de laboratório alegre e promissora nestes anos de convivência. Sempre me lembrarei dos ensinamentos fundamentais para execução deste trabalho e de quão bem vocês me receberam.

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

Confesso-me em débito com o professor Dr. Carlos Curti pela notável colaboração com o projeto, cedendo o laboratório de Bioquímica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, onde foram realizadas todas as etapas deste trabalho.

É com enorme satisfação que agradeço a contribuição significativa dos Professores (as) Drs (as): Carem Gledes Vargas Rechia, Danielle Palma de Oliveira, Yara Maria Lucisano Valim pela colaboração na execução deste trabalho e na minha formação como profissional.

Meu muito obrigado especial a Alecsandra Souza e Luiz Fellipe Cabral Miranda, companheiros de pesquisa com os PBDEs e pelas horas de convivência agradável. Sou grata também aos colegas de pós-graduação pelos encorajamentos, apoio, conselhos e alegrias durante todo o empreendimento. Devo também agradecer os dedicados esforços de Paulo Henrique Pereira pelo excelente trabalho como revisor de meus textos.

Sou profundamente grata aos amigos Acácio Antonio Pigoso e Tatiane Perbone Ferreira, sempre dispostos a ajudar-me e aconselhar-me. Os momentos de convivência (cada vez mais escassos) são realmente proveitosos na minha formação moral e profissional.

Agradeço a Agencia de Fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido a este projeto (Processos n. 2009/06912-6 e 2010/02661-6).

RESUMO

PEREIRA, L.C. **Alterações mitocondriais induzidas por representantes das principais classes de Éteres Difenílicos Polibromados. 90 f.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Os retardantes de chama bromados são substâncias utilizadas nos mais variados bens de consumo para aumentar sua resistência ao fogo e/ou altas temperaturas em casos de incêndio, aumentando assim, as chances de escape e reduzindo a gravidade das queimaduras. Para este fim os éteres difenílicos polibromados (PBDEs) representam a classe mais utilizada tendo em vista sua eficiência no controle da propagação da chama e seu baixo custo. Estes compostos se incluem entre os recentemente denominados contaminantes ambientais emergentes que apresentam uma carência de dados toxicológicos, principalmente em relação aos efeitos danosos e aos biomarcadores de exposição, além do potencial dano ao ambiente, sendo esta uma preocupação recente da comunidade científica. Pelo fato da mitocôndria ser reconhecida como a principal organela produtora de energia celular, além de exercer um papel fundamental na manutenção de inúmeras funções celulares, ela foi utilizada como modelo experimental para avaliar os efeitos dos congêneres de BDE- 100; -153; -154 e -209 na faixa de concentração de 0,1 $\mu\text{mol/L}$ a 50 $\mu\text{mol/L}$. Nossos resultados mostram que os efeitos em mitocôndrias isoladas podem ocorrer em menores concentrações para os congêneres BDE-153; -154 (Hexa-BDE) e -209 (Deca-BDE) e em maiores concentrações para o BDE-100 (Penta-BDE). Desta forma, foi observado que os compostos possuem capacidade de interagir com membrana mitocondrial, induzir inchamento mitocondrial, desregular a homeostase cálcica e dissipar o potencial de membrana mitocondrial em concentrações diferentes, entretanto não são capazes de induzir estresse oxidativo na mitocôndria. Assim, os resultados indicam que a ação dos PBDEs sobre mitocôndrias pode ser um dos mecanismos de toxicidade desta classe de compostos.

Palavras-chave: Retardantes de chama, Éteres Difenílicos Polibromados, Mitocôndria.

ABSTRACT

PEREIRA, L.C. **Mitochondrial alterations induced by representatives main of the classes of poly-brominated diphenyls ethers (PBDEs).** 90 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The brominated flame retardants are substances used in various consumer goods to increase their fire resistance and / or higher temperatures in case of fire, thus increasing the chances of escape and reducing the severity of burns. To this end polybrominated diphenyls ethers (PBDEs) are the most used class in view of its efficiency in controlling the spread of flame and its low cost. These compounds are among the newly emerging environmental contaminants known to exhibit a lack of toxicological data, especially regarding the harmful effects and biomarkers of exposure and potential harm to the environment, which is a recent concern of the scientific community. Because the mitochondrion is recognized as the main energy-producing cell organelles, as well as play a vital role in the maintenance of many cellular functions, it was used as an experimental model to evaluate the effects of the congeners BDE-100 (Penta-BDE), -153, -154 (Hexa-BDE) and -209 (Deca-BDE), in concentration range ranging from 0.1 $\mu\text{mol/L}$ to 50 $\mu\text{mol/L}$. The results show that the effects on isolated mitochondria may occur at lower concentrations for the BDE-153, -154 and -209 and high concentrations to the BDE-100. Thus, it was observed that the compounds have the ability to interact with mitochondrial membrane, inducing swelling, dysregulation of calcium homeostasis and dissipation of membrane potential at different concentrations, however they cannot change factors related to oxidative stress in mitochondria. Furthermore, the induction of mitochondrial swelling, and added significant depletion of ATP levels may contribute to the toxic effects observed. Thus, we conclude that the action of PBDESS on mitochondria is one of the mechanisms of toxicity of this class of compounds.

Keyword: Flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, Mitochondria.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura química geral dos PBDEs	14
FIGURA 2	Mecanismo de ação dos retardantes de chama	15
FIGURA 3	Estrutura química dos PBDEs estudados	18
FIGURA 4	Reação Eletroquímica no eletrodo de Prata	26
FIGURA 5	Interação de Membrana	35
FIGURA 6	Respiração Mitocondrial	40
FIGURA 7	Potencial de Membrana	45
FIGURA 8	Inchamento Mitocondrial	48
FIGURA 9	Efluxo de Cálcio	50
FIGURA 10	Níveis de ATP Mitocondrial	53
FIGURA 11	Formação de EROS	56
FIGURA 12	Oxidação NAD(P)H	59
FIGURA 13	GSH/GSSG	62
FIGURA 14	Oxidação Grupos Tiólicos	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Razão de Controle Respiratório com Glutamato e Malato	41
TABELA 2	Razão de Controle Respiratório com Succinato	41
TABELA 3	ADP/O com Glutamato e Malato	42
TABELA 4	ADP/O com Succinato	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosine 5' Difosfato
ADP/o	Razão de ADP por Oxigênio
ANSA	1-anilino-8-naftaleno sulfonato sal
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BDE-47	2,2', 4,4'-tetra-bromo difenil éter
BDE-99	2,2', 4,4',5-penta-bromo difenil éter
BDE-100	2,2', 4,4',6- penta-bromo difenil éter
BDE-153	2,2', 4,4',5,5'- hexa-bromo difenil éter
BDE-154	2,2', 4,4',5,6'- hexa-bromo difenil éter
BDE-209	Deca-bromo difenil éter
BSA	Albumina Soro Bovino
CCCP	Cianeto de Carbonila Clorofenilhidrazona
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CsA	Ciclosporina A
Da	Daltons
DNA	Ácido Desoxiribonucleíco
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DTNB	5,5'- ditiobis ácido (2-nitrobenzóico)

EGTA	Ácido Etilenoglicol bis (β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona Oxidada
HBDC	Hexabromociclododecano
H ₂ DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazinil-(1)]-etanossulfônico
mtDNA	Ácido Desoxiribonucleíco Mitocondrial
mV	Milivolts
NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato) (forma reduzida)
NEM	N-etil-maleimina
nm	nanômetros
OH ⁻	Radical Hidroxil
OPT	o-ftalaldeído
PBBs	Bifenilas polibromadas
PBDDs	Polibromados dibenzo-pdioxins
PBDEs	Éteres Difenílicos Polibromados
PCA	Ácido Perclórico
PCBs	Bifenilas Policloradas

PM	Peso Molecular
PMM	Permeabilidade da Membrana Mitocondrial
RCR	Razão de Controle Respiratório
RCBs	Retardantes de Chama Bromados
RR	Rutênio Red
T-BOOH	<i>t</i> -butilhidroperóxido
TBBPA	Tetrabromobisfenol A
TMA-DPH	1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenilhexa-1,3,5 trieno
TPM	Transição de Permeabilidade Mitocondrial
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	10
1.1 Contaminantes Emergentes	10
1.2 Retardantes de Chama	11
1.3 Bifenilas Poli-Bromadas (PBDEs)	13
1.4 Toxicidade dos PBDEs	15
1.5 Importância dos ensaios com Mitocôndria em Análises Toxicológicas	18
1.6 Transição da Permeabilidade Mitocondrial	21
2 – OBJETIVOS	22
2.1 Objetivos gerais	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 – METODOLOGIA	23
3.1 Reagentes	23
3.2 Animais Experimentais	24
3.3 Isolamento da Mitocôndria	24
3.4 Dosagem de Proteínas	25
3.5 Respiração Mitocondrial	25
3.6 Potencial de Membrana	27
3.7 Formação de Espécies Reativas de Oxigênio	27
3.8 Avaliação do Estado Redox dos Nucleotídeos de Piridina	28
3.9 Níveis de Glutathione Reduzida (GSH) e Glutathione Oxidada (GSSG)	28
3.10 Inchamento Mitocondrial	29
3.11 Movimentação e Liberação de Ca^{+2}	30

3.12 Interação com a Membrana Mitocondrial	31
3.13 Níveis mitocondriais de grupos sulfidril de proteínas.....	31
3.14 Níveis mitocondriais de ATP	32
3.15 Análise Estatística.....	32
4 - RESULTADOS	33
5 - DISCUSSÃO	66
6 - CONCLUSÃO	74
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
8 - ANEXOS	85

1 – INTRODUÇÃO

1.1 Contaminantes Emergentes

Até alguns anos atrás, a grande preocupação da Toxicologia Ambiental era com os compostos sabidamente tóxicos presentes no ambiente em quantidades elevadas. Porém, as ações tomadas pelos órgãos de controle fizeram com que os níveis destas substâncias reduzissem muito em várias áreas (BAHE et al., 2006).

Entretanto, problemas ambientais novos ou recorrentes têm surgido e são denominados como “contaminantes ambientais emergentes”. Estes novos contaminantes devem ser estudados com cautela, pois englobam uma infinidade de substâncias diferentes e provenientes de fontes de emissão difusa (BAHE et al., 2006). Além disso, artigos publicados mostram que os níveis dessas substâncias têm aumentado em diversos compartimentos ambientais, efluentes industriais, residenciais e das estações de tratamento de água e esgoto, compondo muitas vezes misturas muito complexas (FONTENELE, et al., 2009). Portanto, estes compostos precisam ser monitorados no ambiente, e particularmente na água, devido à possibilidade real de propagação e por seus caracteres ecotoxicológicos ainda serem desconhecidos (RODIL et al., 2012).

Agências de pesquisas ambientais gastam enormes quantias e esforços para monitorar concentrações de vários compostos orgânicos presentes em águas superficiais, sedimentos, animais aquáticos e ecossistema terrestre (DIAMOND, et al., 2011). Entretanto a carência de dados toxicológicos, principalmente relacionados aos efeitos danosos aos organismos, aos biomarcadores de exposição e potenciais danos ao ambiente, também é uma preocupação relacionada a esses compostos. Muitos deles são pobremente caracterizados com relação a sua presença em ambientes aquáticos e seus potenciais efeitos para a vida aquática e ao homem (YAN et al., 2010; DIAMOND, et al., 2011).

Existem cerca de onze milhões de substâncias químicas conhecidas no mundo, sendo que três mil são produzidas em larga escala e, apenas 40 a 50 substâncias químicas são contempladas pelos parâmetros de potabilidade da água na maioria dos países, incluindo o Brasil. O atual padrão de potabilidade é composto por: (i) padrão microbiológico; (ii) padrão de turbidez para a água pós-filtração ou pré-desinfecção; (iii) padrão para substâncias químicas que representam risco à saúde; (iv) padrão de radioatividade (v) padrão de aceitação para consumo humano (NETO, 2010). Desta forma, os contaminantes emergentes são compostos químicos de origem sintética ou natural, previamente conhecidos ou não, reconhecidos como contaminantes no ambiente ou na saúde devido à escassez de resultados que comprovem seus efeitos e/ou a ausência de legislação que controle sua utilização. Entre os contaminantes emergentes, destacam-se os produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais, hormônios naturais e sintéticos, surfactantes, praguicidas, plastificantes, nanomateriais além dos **retardantes de chama** (YAN et al., 2010).

1.2 Retardantes de Chama

Os retardantes de chama são compostos utilizados como principal medida de segurança na prevenção de incêndios, particularmente nas indústrias de eletroeletrônicos, têxtil, automobilística e construção civil sendo empregados em materiais como madeira, plásticos, papéis, utensílios de cozinha, carpetes, roupas, etc. Em computadores são comumente usados em circuitos impressos, conectores, capas plásticas e cabos, além de serem usados como coberturas de televisão. Esses bens de consumo se queimam com muita facilidade, e uma vez iniciada a ignição, a combustão completa é rápida, reduzindo as chances de escape e aumentando as de danos causadas por queimaduras. Os Retardantes de Chama são adicionados durante ou após o processo de fabricação a fim de tornar os materiais resistentes ao fogo ou à alta temperatura, inibindo ou suprimindo o processo de combustão reduzindo o

risco de lesões em casos de incêndio (BSEF, 2000; YAN, et al., 2010; PESTANA et al., 2008).

Existem hoje mais de 175 substâncias químicas classificadas como retardantes de chama. Os maiores grupos são os halogenados (bromados e clorados) e os não halogenados (derivados de fósforo e de nitrogênio, melaminas e cargas inorgânicas). A demanda por retardantes de chama vem crescendo substancialmente, em 1990, foi de 145.000 toneladas em todo o mundo (PETTIGREW, 1994). Já em 2000 houve um crescimento superior a 100% chegando a 310.000 toneladas (BSEF, 2000).

O tetrabromobisfenol A (TBBPA) é o retardante de chama mais consumido mundialmente, podendo estar presente em chapas eletrônicas, fabricado na forma reativa, ou em materiais poliméricos, por simples mecanismos de adição ao polímero. O hexabromociclododecano HBDC também ocupa posição importante no mercado mundial de retardantes de chamas, sendo também incorporado por simples adição aos polímeros e materiais têxteis, o que ocasiona a fácil liberação ao ambiente durante o manuseio, descarte inadequado e incineração, sendo facilmente encontrados em tecidos adiposos, amostras de leite e sangue humano (ARNOT, et al., 2009; COVACI et al., 2006) e também em alimentos (HIEBL; VETTER 2007; FERNANDES et al., 2008).

Os cinco maiores Retardantes de Chama Bromados (RCBs) comercializados são tetrabromobisfenol A, com o maior volume de produção, seguido por três misturas técnicas de éter de difenilas polibromadas (PBDEs), os quais são conhecidos como éter decabromodifenílico (decaBDE), éter octabromodifenílico (octaBDE) e éter pentabromodifenílico (pentaBDE) e ainda o hexabromociclododecano (HBDC) (WHO, 1997; BIRNBAUM, STASKAL, DILIBERTO, 2004; WHO, 1995).

A demanda de mercado e as aplicações de RCBs são diferentes na América, Ásia e Europa e dependem também da legislação nacional e as preferências dos produtores. Sendo a indústria de aparelhos eletro-eletrônicos um dos campos mais importantes de consumo e demanda destes compostos (WATANABE, 2003).

A resistência à chama está intimamente ligada ao processo de combustão composto por pré-aquecimento, pirólise ou decomposição / volatilização, ignição ou combustão e extinção (TROITZCH, 1990). Os mecanismos de ação dos retardantes de chama se baseiam em princípios físicos (resfriamento ou diluição) ou químicos (formação de radicais, remoção por decomposição do polímero ou proteção devido à carbonização) (BSEF, 2000).

Estes compostos são altamente lipofílicos, portanto são encontrados na ordem de traços em águas, sendo preocupante a capacidade de propagação dos mesmos no ambiente e biota por meio de sedimento e lodo. Análises de 11 amostras de lodo de esgoto nos estados de Virginia, Maryland, Nova York e Califórnia nos Estados Unidos, encontraram altos níveis dos retardantes de chama em lodo (YAN, et al., 2010; HALE et al., 2001). A liberação dos retardantes de chama pode ocorrer durante a fabricação, a incorporação em produtos de resina ou polímeros, durante o tempo de uso do produto e finalmente, com o descarte, reciclagem e eliminação dos mesmos (DANISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1999; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2005).

1.3 Éteres Difenílicos Polibromados (PBDEs)

Os bromados representam 36% do consumo mundial, enquanto no Brasil este grupo abrange 90% do consumo em retardantes de chama (ALAE et al., 2003; SANT'ANNA, 2004). A utilização dos retardantes de chamas bromados, tem propiciado alto nível de segurança domiciliar e empresarial no que diz respeito ao fator inflamabilidade. Alternativas de substâncias retardantes de chamas são alguns compostos fosforados ou metálicos, porém, estas são mais onerosas e interferem muito no processo de fabricação (RAHMAN et al., 2001; DE WIT 2002).

Os retardantes de chama bromados mais usados e seus principais subprodutos são: bifenilas polibromadas (PBB, do inglês polybrominated

biphenyl), os éteres de difenilas polibromadas (PBDEs, do inglês polybrominated diphenyl ether), dibenzo-p-dioxinas polibromadas (PBDD, do inglês polybrominated dibenzo-p-dioxins) entre outros, sendo os PBDEs (Figura 1) os mais empregados por serem eficientes contra a propagação da chama e apresentarem baixo custo (PESTANA et al., 2008). Dentre estes compostos, os congêneres de baixo peso molecular (tri a hexa-BDE) são considerados os mais importantes do ponto de vista toxicológico, pois são quase totalmente absorvidos, lentamente excretados e apresentam alto potencial de bioacumulação (RICHARDSON; TERNES, 2005). De maneira geral os PBDEs são extremamente estáveis no ambiente, podendo acumular-se na cadeia alimentar aquática (YAN, et al., 2010). Três misturas comerciais de PBDEs são amplamente utilizadas pelas empresas (penta BDE, octa-BDE e deca-BDE), perfazendo 14%, 6% e 80% respectivamente da produção de 1999 estimada em 67.000 toneladas (IKONOMOU, RAYNE, ADDISSON, 2002).

BDE-100 2,2',4,4',6 – Penta Bromo Difenil éter

BDE-153 2,2',4,4',5,5' – Hexa Bromo Difenil éter

BDE-154 2,2',4,4',5,6' – Hexa Bromo Difenil éter

BDE-209 – Deca Bromo Difenil éter

FIGURA 1: Estrutura química geral dos PBDEs ($x + y = 1$ a 10) e o nome dos principais representantes dessa classe de contaminantes emergentes utilizados no trabalho (Costa et al., 2008).

O mecanismo de ação dos PBDEs (Figura 2) consiste na neutralização dos radicais livres ($\text{OH}^\cdot$ e $\text{H}^\cdot$) produzidos durante o processo de combustão, formados durante a ignição, e responsáveis pela propagação da chama (BSEF, 2000; PESTANA et al., 2008).

FIGURA 2: Mecanismo de ação dos Retardantes de chama halogenados na combustão (PESTANA et al., 2008).

1.4 Toxicidade dos PBDEs

Vários estudos têm demonstrado o potencial tóxico dos PBDEs. Entre seus principais efeitos estão a hepatotoxicidade, alterações imunológicas, neurotoxicidade, ações endócrinas e desenvolvimento de câncer (ZHOU et al., 2001). No entanto os mecanismos de ação tóxica ainda não foram bem estabelecidos. Mas sabe-se que são resistentes a ácidos, bases, luz, calor, redução e oxidação (COSTA, 2006), portanto em relação ao meio ambiente pode-se afirmar que são extremamente persistentes.

As conseqüências neurotóxicas desses compostos estão associadas com o desenvolvimento de hiperatividade e declínio da aprendizagem devido à exposição pré ou pós natal, além do elevado potencial citotóxico em linhagens derivadas de neuroblastoma humano e células neurais de roedores (COSTA et al., 2008; HE et al., 2008; HU et al., 2010; SHÃO et al., 2008).

DE BOER e colaboradores (1998) demonstraram que indivíduos de 13 anos de idade, expostos por várias horas/dia ao ver televisão ou jogando vídeo game em ambientes fechados desenvolveram erupções cutâneas provocadas pelos PBDEs. Já SJÖDIN e colaboradores (1999) verificaram que trabalhadores suecos que atuavam desmontando manualmente equipamentos eletrônicos em jornada de trabalho de 8 horas/dia apresentaram concentrações 70 vezes maiores do congênere BDE-183 quando comparados ao grupo controle. Ainda, 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 BDE -47, -99, -100, -153, -154 e -183 (TOMS et al., 2007). Estudo similar avaliou o leite de 47 mulheres, verificando níveis elevados de todos os congêneres estudados (SCHECTER et al., 2003).

Devido a sua alta lipofilicidade esses compostos são recalcitrantes no meio ambiente, podendo ser encontrados em diversos compartimentos ambientais e em vários fluidos biológicos humanos, como sangue e leite. A detecção destes compostos tem sido feita mesmo em locais remotos, como camadas polares, onde o lançamento não é esperado, demonstrando grande potencial de transporte (BIRNBAUM et al., 2003; PESTANA et al., 2008). IKONOMOU e colaboradores (2002) constataram que se for mantida a taxa de bioacumulação de PBDEs em animais das regiões árticas, em 2050 os níveis dos retardantes de chama já serão maiores que o de bifenilas policloradas (PCBs). De acordo com este estudo, os níveis de PBDEs aumentaram exponencialmente entre 1981 a 2000 na região ártica do Canadá (IKONOMOU, RAYNE, ADDISSON, 2002).

Em 2004, HITES publicou uma revisão sistemática referente aos estudos existentes até então e também demonstrou um aumento significativo das concentrações de PBDEs encontradas nos compartimentos ambientais e em amostras biológicas de humanos e animais nos últimos anos. O autor relatou concentrações de até 193 ng/g de lipídios em leites de lactantes americanas, além de 7500 e 67000 ng/g em ovos de gaivota da região dos

grandes lagos (EUA) e em ar de ambientes ocupacionais na Suécia, respectivamente (HITES, 2004).

Estudos recentes mostraram que o BDE-99 e o -209 são capazes de induzir morte celular por apoptose, sendo que no último um aumento na concentração de radicais livres foi observado (MADIA *et al.*, 2004). Já o BDE-47 demonstrou em outro estudo, também a capacidade de elevar a produção de radicais livres e ser capaz de induzir dano mitocondrial, indicando a possibilidade de esta organela ser o principal alvo de toxicidade celular, através do aumento na produção destes radicais no interior da célula e indução de morte celular (WEIHONG *et al.*, 2008).

Dentre todos os seus congêneres, os que são encontrados nos tecidos humanos com maior prevalência são: BDE-47 (tetra- BDE), BDE-99, BDE-100 (penta-BDEs), BDE-153, BDE-154 (hexa-BDEs) e em alguns casos o congênere BDE-209 (deca-BDE), abaixo podem ser observadas as estruturas dos congêneres estudados neste trabalho (Figura 3). No entanto, em uma revisão sobre os aspectos toxicológicos dos PBDEs, TALSNESS (2008) reportou que os deca-BDE podem gerar outros congêneres (tetra a nona – BDE) por fotólise, metabolismo biótico e biotransformação (TALSNESS, 2008).

FIGURA 3: Estrutura química dos congêneres de BDE, estudados neste trabalho (Huang et al., 2010 - modificado).

1.5. Importância dos ensaios com Mitocôndria em Análises Toxicológicas

Há muito que a mitocôndria é reconhecida como a principal organela produtora de energia celular, além de exercer um papel fundamental na manutenção de inúmeras funções celulares. As mitocôndrias, classicamente consideradas como a casa de força celular, estão presentes na maioria das células eucarióticas em quantidade que varia em função do tipo celular e da demanda de energia do tecido em que se encontram. Embora as mitocôndrias possam apresentar variabilidade morfológica, é possível definir uma morfologia básica. Elas possuem um sistema duplo de membranas, externa e interna, separadas pelo espaço intermembranar (LESNEFSKY et al., 2001).

O modelo clássico estrutural de uma mitocôndria a descreve como uma organela oval, com aproximadamente 2 μm de comprimento e 0,5 μm de

diâmetro, formada por uma membrana interna rica em proteínas, uma membrana externa semipermeável, um espaço aquoso denominado matriz mitocondrial e inúmeras invaginações denominadas cristas mitocondriais (STRYER, 1996).

A membrana externa é permeável à maior parte dos íons e moléculas pequenas ($PM < 1500$ Da) e contém proteínas associadas que promovem a comunicação entre as mitocôndrias e a rede metabólica celular (LESNEFSKY et al., 2001).

A membrana interna é impermeável a quase todos os íons e moléculas polares e contém a porcentagem mais elevada de proteínas (cerca de 75%) dentre todas as membranas (NICHOLLS e FERGUSON, 1982), entre elas, proteínas que permitem o transporte de metabólitos selecionados. Esta permeabilidade mediada e regulada por proteínas é fundamental para a integridade morfológica e funcional das mitocôndrias. A membrana interna possui o sistema transportador de elétrons, o sistema de fosforilação e os transportadores, delimitando um compartimento denominado matriz. Na matriz encontra-se inúmeras enzimas, entre elas as envolvidas no ciclo dos ácidos tricarboxílicos e na β -oxidação, além de múltiplas cópias do DNA mitocondrial (mtDNA) (FREY e MANELLA, 2000).

A síntese do ATP necessário às funções celulares é realizada nessa organela através do funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial acoplada à função da ATP sintase. Na presença de agentes tóxicos diversos, este processo pode ser inibido e a capacidade energética da célula diminuída. Concomitantemente, a inibição da cadeia respiratória induz um aumento na produção de radicais livres no interior das células que leva à citotoxicidade por meio de danos oxidativos em macromoléculas celulares como proteínas e DNA, além de peroxidação dos lipídios de membrana (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Na presença de inibidores da cadeia respiratória, ou de forma contínua, uma pequena fração do O_2 disponível para a mitocôndria sofre redução incompleta gerando o radical superóxido por meio da reação catalisada pela NADH desidrogenase ou pelo ciclo da Ubiquinona (coenzima Q) (TURRENS,

1997). Quando ocorre um aumento na formação de superóxido ou deficiência nas defesas antioxidantes, H_2O_2 acumula-se e ocorre uma condição conhecida como estresse oxidativo que na presença de Fe^{2+} , produz o radical hidroxil via reação de Fenton-Haber-Weiss. Este radical, o qual não existe nenhum sistema antioxidante enzimático, é capaz de induzir citotoxicidade por meio dos danos oxidativos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Diferente do DNA nuclear que forma longas fitas, constituídas cada uma por dupla hélice e que codificam aproximadamente 100.000 genes, o mtDNA representa de 1 a 2% do DNA celular, em duplo filamento circular, codificando 37 genes. Este codifica aproximadamente 10% das proteínas constitutivas das mitocôndrias e como consequência, para um bom funcionamento destas, é necessária uma boa cooperação entre o DNA nuclear e o DNA mitocondrial. Assim, esta organela pode ser utilizada como auxiliar na elucidação de mecanismo de ação tóxica de xenobióticos.

Um grande número de publicações tem demonstrado que algumas disfunções mitocondriais estão intimamente associadas a algumas doenças degenerativas como a doença de Parkinson, e com a toxicidade de diversos compostos que podem agir como inibidores da fosforilação oxidativa inibindo a cadeia respiratória como a rotenona que bloqueia a transferência de elétrons do NADH para ubiquinona, ou a Antimicina A que bloqueia a passagem do elétron da ubiquinona para o citocromo c (GODEIRO JÚNIOR et al., 2007; LEHNINGER et al., 2002) . As mutações no DNA mitocondrial causam deficiências na funcionalidade da cadeia respiratória. Isto leva a uma diminuição na produção de ATP, à formação de radicais livres e alterações nos mecanismos de regulação do cálcio intracelular. Estes eventos celulares podem induzir a oxidação do DNA, de proteínas e de lipídeos, podem também induzir a abertura do poro de transição de permeabilidade, um acontecimento que está correlacionado com os mecanismos de apoptose e morte celular (LEMASTERS, 1999).

1.6 Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM)

Além das diversas funções celulares as mitocôndrias também orquestram as sinalizações celulares para morte ou vida celular através de sistemas integrados de reações bioquímicas (RASOLA e BERNARDI, 2007). Em caso de dano mitocondrial, várias mudanças podem ocorrer em sua fisiologia e estrutura.

Mitocôndrias isoladas em contato com altas concentrações de Ca^{2+} e /ou condições de estresse oxidativo, comum em diversas condições patofisiológicas, aumento de temperatura ou em contato com uma variedade de compostos químicos podem sofrer o fenômeno descrito como Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM) (LAPIDUS e SOKOLOVE, 1993). Este fenômeno é mediado pela abertura de poros de natureza protéica na membrana mitocondrial, conhecido como Poro de Transição de Permeabilidade (PTP). Este processo é caracterizado pelo inchamento das mitocôndrias, sensível à inibição por Ciclosporina (CsA) (ZORATTI e SZABO, 1995), e definida como um aumento súbito da permeabilidade da membrana interna mitocondrial, sendo que dentre suas maiores implicações estão: difusão de soluto de até 1500 Da, dissipação do potencial de membrana mitocondrial e depleção dos níveis de ATP (RASOLA e BERNARDI, 2007). Vários debates já foram realizados sobre a composição dos poros de permeabilidade mitocondrial. Entretanto sua estrutura e funcionalidade ainda não foram totalmente elucidadas (BELZACQ et al., 2002).

Em mitocôndrias isoladas de ratos, a transição de permeabilidade pode ser induzida por Ca^{2+} , t-butilhidroperóxido e fosfato (Pi) que agem por diferentes mecanismos. O Ca^{2+} entra na mitocôndria por meio de um canal uniporter eletroforético e desencadeia a transição por meio de uma ligação em sítio ainda desconhecido. O t-butilhidroperóxido é metabolizado pelo sistema glutational peroxidase com oxidação do NAD(P)H que está associado à ocorrência de transição e o fosfato pode desencadear o evento de transição diminuindo a concentração de ADP na matrix mitocondrial (LAPIDUS e SOKOLOVE, 1994).

2 – OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Investigar os efeitos dos diferentes congêneres de PBDEs (BDE-100, -153, -154, -209) em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, e tentar elucidar o mecanismo de toxicidade destes compostos sobre esta organela.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a capacidade de interação dos compostos com a membrana interna mitocondrial utilizando diferentes sondas para diferentes regiões da membrana.
- ✓ Avaliar a capacidade dos PBDEs em interferir e alterar o estado redox da mitocôndria.
- ✓ Avaliar a ação dos PBDEs sobre a bioenergética mitocondrial.

3 – METODOLOGIA

3.1 Reagentes

Os reagentes rotenona, cianeto de carbonila clorofenilhidrazona (CCCP), succinato, glutamato, malato, difosfato de adenosina (ADP), safranina- O , o-ftalaldeído (OPT), N-etil-maleimina (NEM), 1-anilino-8-naftaleno sulfonato sal (ANSA), Difenilhexatrieno (DPH), 1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenilhexa-1,3,5 trieno, (TMA-DPH), Ácido Etilenoglicol bis (β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) e Vermelho de Rutênio foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co (St Louis, MO, USA). Enquanto que 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA) e Calcium Green 5N foram adquiridos da Molecular Probe (OR, USA). Os congêneres de BDE utilizados foram adquiridos da Accustandard (New Haven, USA).

Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico, preparados em água purificada pelo sistema Milli-Q.

As soluções estoques dos PBDEs foram preparadas em Dimetil Sulfóxido (DMSO) e armazenadas de acordo com as instruções do fabricante (ao abrigo da luz e calor). As concentrações utilizadas nos testes com mitocôndrias isoladas de células hepáticas de ratos foram: 0,1 $\mu\text{mol/L}$, 1,0 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 25 $\mu\text{mol/L}$ e 50 $\mu\text{mol/L}$. Esta faixa de concentração foi escolhida, pois compreende concentrações encontradas no ambiente e em amostras biológicas de animais e humanos de acordo com a literatura (HITES, 2004). Para todos os testes o mesmo volume de DMSO utilizado nos experimentos testes foi adicionado aos controles e nenhum efeito foi observado.

3.2 Animais Experimentais

Em nossos estudos foram utilizados ratos Wistar jovens, pesando entre 150-200g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto e mantidos sob condições adequadas no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos em gaiolas com maravalha, temperatura em torno de 25°C, ciclo claro/escuro de 12 horas, água e ração servida “*ad libitum*”. Os ratos foram eutanasiados por decapitação, sem o uso de anestésico para não interferir nos parâmetros bioenergéticos das mitocôndrias.

Os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto-USP por estarem de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” (Protocolo nº 10.1.1522.53.3 – ANEXO 01).

3.3 Isolamento Mitocondrial

Após a eutanásia dos animais, o fígado (10-15 g) foi imediatamente removido, picotado com o auxílio de uma tesoura em 50 mL de meio de homogeneização contendo Sacarose 250 mmol/L, EGTA 1 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, a 4°C, lavado com o mesmo meio de homogeneização para retirada do excesso de sangue e homogeneizado em homogenizador Potter-Elvehjen (3 ciclos de 15 segundos com intervalos de 1 minuto).

O homogenato foi centrifugado em centrífuga refrigerada (HITACHI Himac CR21E), a temperatura constante de 4°C, a 770 g por 5 minutos. Verteu-se o sobrenadante para outro tubo, desprezando-se o sedimento por possuir restos de células intactas, membranas e núcleos. O sobrenadante (que possui a mitocôndria) foi novamente centrifugado a 9800 g por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso com meio de lavagem contendo sacarose

250 mmol/L, EGTA 0,3 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2 e novamente centrifugado a 4500 *g* por 15 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento contendo as mitocôndrias foram ressuspensas com 1 mL de meio de ressuspensão contendo sacarose 250 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2 obtendo-se assim a suspensão mitocondrial com concentração de proteínas ainda desconhecida que foi mantida em gelo e utilizada dentro de um período de 3 horas (PEDERSEN *et al.*, 1978).

3.4 Dosagem de Proteínas

A concentração de proteína mitocondrial foi determinada pela reação de Biureto (CAIN; SKILLETER, 1987). Uma alíquota de 10 µl da amostra foi adicionada a 100 µL de uma solução de ácido deoxicólico 5% (m/v) e água q.s.p. 1,5 mL. A essa mistura foi adicionado 1,5 mL de Reagente de Biureto. A Absorvância foi monitorada em espectrofotômetro em λ 540 nm, a partir de uma curva de calibração usando BSA como padrão.

3.5 Respiração Mitocondrial

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias energizadas foi monitorado polarograficamente em um oxígrafo equipado com um eletrôdo tipo Clark (Hansatech instruments, Oxytherm eletrode unit, UK) (CHANCE; WILLIANS, 1956). As mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) foram incubadas em 1 mL do meio padrão. A respiração de estado 3 foi iniciada com 400 nmols de ADP. (CAIN; SKILLETER, 1987).

O meio reacional constituído de Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L, K₂HPO₄ 10 mmol/L e EGTA 0,5 mmol/L, foi suplementado com Glutamato mais Malato 5 mmol/L cada ou Succinato 5 mmol/L (utilizando rotenona para inibição do complexo I) como substratos

oxidáveis de complexo I e II respectivamente. As velocidades de consumo de oxigênio foram expressas em ng/átomo de oxigênio consumidos por miligrama de proteína mitocondrial por minuto, na ausência (Controle) e presença de PBDEs.

O eletrôdo de oxigênio é uma forma especializada na eletroquímica que consiste em dois eletrôdos imersos numa solução de eletrólito. Tipicamente, uma solução a 50% saturada de KCl é usado em sistemas de eletrôdos de oxigênio, sendo preparada por dissolução de 17,5 g de sal anidro em 100 mL de água de-ionizada a 25°C. Com a aplicação de uma tensão de polarização de 700 mV o eletrólito é ionizado e inicia-se o fluxo de corrente através de uma série de reações electroquímicas. No caso do eletrólito de KCl ocorrem as seguintes reações (Figura 4):

FIGURA 4: Reação eletroquímica no eletrôdo de prata. FONTE: www.hansatech-instruments.com.

Dentro de uma determinada faixa de polarização o fluxo de elétrons, ou seja, a corrente elétrica gerada é proporcional a concentração de oxigênio (BRACHT, 2003). O eletrôdo de Clark é constituído por um cátodo de platina acoplado a dois ânodos de prata por meio de uma ponte de KCl saturada, e cobertos por uma membrana de teflon. Quando polarizado o oxigênio dissolvido no meio de incubação é reduzido no cátodo de platina a íons OH^- . Este tipo de sensor por eletrôdo foi inicialmente desenvolvido por Clark (1956) para medir oxigênio em amostras de sangue. Como resultado, é muitas vezes referido como o eletrôdo de Clark.

3.6 Potencial de Membrana

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

3.7 Formação de Espécies Reativas de Oxigênio

A geração de Espécies reativas de oxigênio (EROs) foi monitorada espectrofluorimetricamente (F-4500, Hitachi - Japão) utilizando a sonda fluorescente H₂DCFDA nos comprimentos de onda de 503 nm para excitação e 529 nm para emissão. As mitocôndrias (1,0 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio padrão de reação contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2 acrescido de rotenona 2,5 µmol/L e H₂DCFDA 2 µmol/L e energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol/L. Foi realizado controle negativo (basal) e positivo induzido por *t*-butilhidroperóxido 300 µmol/L.

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

3.8 Avaliação do Estado Redox dos Nucleotídeos de Piridina

O estado redox dos nucleotídeos de piridina foi monitorado fluorimetricamente (F-4500, Hitachi - Japão) em λ para excitação 366 nm e 450 nm para emissão. As mitocôndrias (1,0 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio padrão de reação contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L acrescido de rotenona 2,5 μ mol/L e energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol/L. Foi realizado controle negativo (basal) e positivo induzido por *t*-butilhidroperóxido 300 μ mol/L (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Os nucleotídeos de piridina reduzidos (NAD(P)H) são fluorescentes, enquanto que os nucleotídeos de piridina oxidados (NAD(P)⁺) não o são. Assim, alterações na intensidade de fluorescência refletem mudanças no estado redox dos nucleotídeos de piridina.

3.9 Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) e Glutathiona Oxidada (GSSG)

Os níveis de glutathiona reduzida e oxidada foram determinados espectrofluorimetricamente (F-4500, Hitachi - Japão) em λ para excitação 350 nm e 420 nm para emissão, utilizando o o-ftalaldeído (OPT) (HISSIN e HILF, 1976). As mitocôndrias (1,0 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio padrão de reação contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH

10 mmol/L acrescido de rotenona 2,5 μ mol/L e succinato 5 mmol/L e diferentes concentrações dos PBDEs por 30 minutos a 30°C. A reação foi interrompida com Ácido Perclórico (PCA) 1% e levadas a centrifugação a 9000 g por 3 minutos. Alíquotas do sobrenadante (100 μ L) foram adicionadas a 1,8 mL de Tampão NaH₂PO₄ 100 mmol/L, pH 8.0 e EGTA 5 mmol/L adicionando-se 100 μ L de OPT (1mg/mL). A fluorescência para GSH foi determinada após 15 minutos de incubação ao abrigo da luz. Os níveis de GSSG foram determinados pela adição de 250 μ L de N-etil-maleimida (NEM) 0,04M a alíquotas de 250 μ L de sobrenadante. Após 20 minutos de incubação a temperatura ambiente, 500 μ L de NaOH 10 mol/L foi adicionado e 100 μ L desta solução foi adicionado à 2mL de NaOH 1 mol/L e 100 μ L de OPT (1mg/mL). A fluorescência foi determinada após 15 minutos de incubação ao abrigo da luz. Glutathione é distribuída nas células e responsável por muitas funções biológicas, sendo encontrada na forma oxidada (GSSG) e é rapidamente convertida para a forma reduzida (GSH) pela enzima glutathione redutase. Este método consiste na utilização de um agente fluorescente que possui afinidade por GSH ou GSSG dependente do pH utilizando NEM para evitar a oxidação do GSSG (HISSIN e HILF, 1976).

3.10 Inchamento Mitochondrial

O inchamento mitocondrial foi monitorado pela diminuição da absorvância aparente da suspensão de mitocôndrias (0,4 mg proteína/mL), incubadas em 1,5 mL do meio padrão de reação contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L acrescido de rotenona 2,5 μ mol/L, succinato 5 mmol/L e CaCl₂ 10 μ mol/L, em 540 nm, usando-se um espectrofotômetro (DU-70, Beckman - U.S.A.). O inchamento mitocondrial é acompanhado da diminuição na turbidez da suspensão e, portanto, da diminuição proporcional na absorvância (LEMASTERS *et al.*, 1987).

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

3.11 Movimentação e Liberação de Ca^{+2}

A movimentação de Ca^{+2} foi monitorada utilizando o marcador fluorescente Calcium Green 5N, em 506 e 531 nm de excitação e emissão, respectivamente. Utilizou-se 1 mg de proteína mitocondrial em volume final de 2 mL de meio de reação padrão contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L acrescido de rotenona 2 $\mu\text{mol/L}$ + Ca^{2+} 10 $\mu\text{mol/L}$ + Calcium Green 5N 150 nmol/L. As mitocôndrias foram energizadas com succinato de potássio 5 mmol/L e a captação e efluxo de Ca^{+2} foi monitorado por 600 segundos em espectrofluorímetro (F-4500, Hitachi - Japão). O efluxo total de Ca^{+2} foi realizado utilizando CCCP 1 mmol/L. À medida que o Cálcium Green 5N é captado pela mitocôndria observa-se uma diminuição na fluorescência do meio (RAJDEV, 1993).

3.12 Interação com a Membrana Mitocondrial

A interação de substâncias com a membrana causa alteração na fluorescência do marcador. As mitocôndrias (2 mg de proteína/mL) foram incubadas a 30°C com o marcador Difenilhexatrieno (DPH) 0.5 µmol/L, 1-anilino-8-naftaleno sulfonato (ANS) 75 µmol/L e 1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenilhexa-1,3,5 trieno (TMA-DPH) 1,04 µmol/L, em meio de reação contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2 em volume final de 2 mL. A Fluorescência para os marcadores ANS, DPH e TMA-DPH foi determinada espectrofluorimetricamente (F-4500, Hitachi) em 380nm e 485 nm; 360 nm e 430 nm; 362 nm e 432nm de excitação e emissão respectivamente com adição seqüencial dos PBDEs e monitorado por 600 (LEE et al., 1999).

3.13 Níveis mitocondriais de grupos sulfidril de proteínas

A suspensão mitocondrial (1 mg de proteína/mL) foi tratada com ácido perclórico (concentração final de 5%) e centrifugada a 3400 g por 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso com 1 mL do meio contendo 50 mmol/L EDTA e TRIS 100 mmol/L, pH 8,0. A quantidade de grupos sulfidril de proteínas foi calculada a partir de $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, da absorvância determinada em 412 nm, após adição de 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) 0,2 mmol/L. (JOCELYN, 1987). O ácido DTNB reage rapidamente com grupamentos sulfidril, formando dissulfetos mistos e o ânion *p*-nitrotiofenol, que apresenta coloração amarela, com intensidade proporcional à quantidade de grupos sulfidril (HAUGAARD, 2000).

3.14 Níveis mitocondriais de ATP

O ATP mitocondrial foi determinado por quimioluminescência utilizando-se o sistema luciferina-luciferase. A suspensão mitocondrial (1 mg de proteína/mL) foi centrifugada a 9.000 *g* por 5 minutos, a 4°C, e o sedimento contendo as mitocôndrias foi tratado com 1 mL de HClO₄. Após centrifugação a 14000 *g* por 5 minutos, a 4°C, alíquotas (100 µL) do sobrenadante foram neutralizadas com 70 µL de KOH 2 mol/L, acrescidas de Tris-HCl 100 mmol/L, pH 7,8 (volume final 1 mL), e novamente centrifugadas. A luminescência do sobrenadante foi medida, utilizando-se “kit” da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) empregando um luminômetro AutoLumat LB953 Luminescence photometer (Perkin Elmer Life Sciences, Wildbad Germany).

O ATP presente na amostra é consumido durante a oxidação da Luciferina, catalisada pela enzima luciferase com emissão de luz conforme reação:

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

3.15 Análise Estatística

A significância estatística dos dados experimentais, quando pertinente, foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Dunnet para a comparação de vários grupos tratados em relação aos seus controles, utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 3.0 (San Diego, CA, U.S.A.). Os resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 – RESULTADOS

Para avaliar a hipótese de que os PBDEs interagem com a membrana mitocondrial e assim interferem com a homeostase mitocondrial foi utilizado os marcadores fluorescentes DPH, ANS e TMA-DPH que monitoram regiões diferentes da membrana; sendo ANS e TMA-DPH utilizados para monitorar regiões mais próximas a superfície aquosa, enquanto DPH para região hidrofóbica. A interação dos marcadores com a membrana mitocondrial interna causa um aumento na fluorescência do meio. Assim, a figura 5 mostra que os PBDEs interagem com a membrana mitocondrial de forma distinta entre si para os marcadores utilizados, porém, concentração-dependente e apresentam em comum uma maior capacidade de interagir com a porção mais aquosa da membrana. Sendo o BDE-209, o congênere com menor capacidade de interagir com a membrana mitocondrial, além do mais não apresentando interação com a parte lipofílica da membrana monitorada pelo DPH.

A) BDE-100

B) BDE-153

C) BDE-154

D) BDE-209

FIGURA 5: Verificação da interação dos PBDEs com a membrana mitocondrial. As mitocôndrias (2 mg de proteína/mL) isoladas de fígado de rato, incubadas em meio padrão, que consiste de uma solução aquosa contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2 acrescido de DPH, TMA-DPH e ANS. O experimento foi realizado conforme descrito em materiais e métodos. O traçado representa a capacidade de interação com diferentes porções da membrana mitocondrial em relação ao controle (sem adição de PBDE).

A figura 6 demonstra o efeito dos diferentes PBDEs estudados sobre o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas de fígado de rato, usando Glutamato e Malato como substrato oxidável para sítio I e Succinato como substrato oxidável do complexo II e neste caso com adição de rotenona para inibição do complexo I. A respiração mitocondrial foi avaliada após o estímulo com ADP (V_3) e também no estado basal (V_4). Os parâmetros respiratórios RCR (Razão de Controle Respiratório) Tabelas 1 e 2 e ADP/O Tabelas 3 e 4, não foram significativamente alterados pelos congêneres de BDE quando energizados tanto com substratos para sítio I quanto para sítio II. Além disso, os PBDEs não apresentaram efeitos significativos na respiração de estado 4 (resultados não apresentados).

A) BDE-100

Glutamato e malato

Succinato

B) BDE-153

Glutamato e malato

Succinato

c) BDE-154

Glutamato e Malato

Succinato

D) BDE-209

Glutamato e Malato

Figura 6: Efeito dos PBDEs sobre a respiração de estado 3 em mitocôndrias (1mg de proteína/mL) isoladas de fígado de rato, incubadas em meio padrão, que consiste de uma solução aquosa contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, acrescido de EGTA 0,5 mmol/L e K_2HPO_4 10 mmol/L pH 7,2. As mitocôndrias foram energizadas com Glutamato 5 mmol/L e Malato 5 mmol/L para complexo I e Succinato 5 mmol/L acrescido de rotenona 2,5 µmol/L para Complexo II. A respiração de estado 3 foi iniciada com ADP 0,4 µmol. Em seguida foram adicionados os PBDEs (µmol/L). Os resultados representam a média de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. Os valores correspondem à velocidade das respirações no estado 2, 3 e 4, apresentadas aqui como nmol de átomos de O. min⁻¹. mg proteína⁻¹.

TABELA 1: Razão de controle respiratório (RCR) utilizando Glutamato e Malato em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Os valores são expressos como média +/- desvio padrão para três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

Razão de Controle Respiratório com Glutamato e Malato				
	PBDE-100	PBDE-153	PBDE-154	PBDE-209
Controle	5,03 ± 0,55	5,26 ± 0,26	5 ± 0,30	4,80 ± 0,24
0,1 µmol/L	5,03 ± 0,55	3,66 ± 0,26	4,1 ± 0,30	4,9 ± 0,24
1 µmol/L	4,13 ± 0,55	3,86 ± 0,26	4,8 ± 0,30	5,5 ± 0,25
5 µmol/L	5,13 ± 0,55	4,36 ± 0,26	5,1 ± 0,29	5,7 ± 0,25
10 µmol/L	5,13 ± 0,5	4,96 ± 0,26	4,5 ± 0,29	4,9 ± 0,25
25 µmol/L	4,83 ± 0,55	5,06 ± 0,26	4,5 ± 0,29	4,8 ± 0,25
50 µmol/L	5,03 ± 0,55	4,36 ± 0,26	4,6 ± 0,30	5,2 ± 0,25

Controle: Sem adição de PBDEs

Os valores são expressos como média +/- desvio padrão para três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. As condições experimentais estão descritas em Metodologia.

TABELA 2: Razão de controle respiratório (RCR) utilizando Succinato em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Os valores são expressos como média +/- desvio padrão para três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

Razão de Controle Respiratório com Succinato				
	PBDE-100	PBDE-153	PBDE-154	PBDE-209
Controle	5,2 ± 0,25	4 ± 0,21	5,7 ± 0,30	6,3 ± 0,31
0,1 µmol/L	4,5 ± 0,25	5,1 ± 0,21	4,9 ± 0,30	7,0 ± 0,31
1 µmol/L	4 ± 0,25	5,6 ± 0,21	5,6 ± 0,30	5,5 ± 0,31
5 µmol/L	4,2 ± 0,25	4,5 ± 0,21	5,7 ± 0,30	6,0 ± 0,31
10 µmol/L	4,3 ± 0,25	5,6 ± 0,21	5,3 ± 0,30	6,1 ± 0,31
25 µmol/L	4,5 ± 0,25	5,6 ± 0,21	4,6 ± 0,30	6,8 ± 0,31
50 µmol/L	4,7 ± 0,25	4,6 ± 0,46	4,4 ± 0,30	7,5 ± 0,25

Controle: Sem adição de PBDEs

Os valores são expressos como média +/- desvio padrão para três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. As condições experimentais estão descritas em Metodologia.

TABELA 3: Razão ADP/O em mitocôndrias de fígado de rato utilizando Glutamato e Malato como substratos oxidáveis.

ADP/O com Glutamato e Malato				
	<u>PBDE-100</u>	<u>PBDE-153</u>	<u>PBDE-154</u>	<u>PBDE-209</u>
Controle	2,66 ± 0,31	2,83 ± 0,29	2,66 ± 0,17	1,97 ± 0,33
0,1 µmol/L	2,56 ± 0,31	2,83 ± 0,28	1,73 ± 0,17	2,16 ± 0,33
1 µmol/L	2,66 ± 0,31	3,32 ± 0,28	3,26 ± 0,17	1,96 ± 0,31
5 µmol/L	2,96 ± 0,31	2,83 ± 0,28	3,16 ± 0,17	2,16 ± 0,32
10 µmol/L	2,86 ± 0,31	2,73 ± 0,28	3,16 ± 0,17	2,06 ± 0,33
25 µmol/L	3,06 ± 0,31	2,83 ± 0,28	3,45 ± 0,17	2,86 ± 0,31
50 µmol/L	2,86 ± 0,31	3,03 ± 0,28	3,66 ± 0,17	2,06 ± 0,31

Controle: Sem adição de PBDEs

Os valores são expressos como média +/- desvio padrão para três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. As condições experimentais estão descritas em Metodologia.

TABELA 4: Razão ADP/O em mitocôndrias de fígado de rato utilizando Succinato como substrato oxidável. Os valores são expressos como média +/- desvio padrão para três experimentos com diferentes preparações mitocondriais.

ADP/O com Succinato				
	<u>PBDE-100</u>	<u>PBDE-153</u>	<u>PBDE-154</u>	<u>PBDE-209</u>
Controle	1,8 ± 0,37	1,6 ± 0,65	2 ± 0,37	1,26 ± 0,30
0,1 µmol/L	1,96 ± 0,41	1,9 ± 0,73	2,1 ± 0,37	1,6 ± 0,31
1 µmol/L	1,76 ± 0,42	1,90 ± 0,73	2,1 ± 0,37	1,66 ± 0,31
5 µmol/L	2,06 ± 0,42	1,9 ± 0,74	2,3 ± 0,37	1,76 ± 0,31
10 µmol/L	1,96 ± 0,41	1,5 ± 0,50	2,3 ± 0,37	1,76 ± 0,31
25 µmol/L	1,96 ± 0,41	1,9 ± 0,73	2,2 ± 0,37	1,76 ± 0,31
50 µmol/L	2,06 ± 0,41	1,36 ± 0,44	2,1 ± 0,37	1,76 ± 0,31

Controle: Sem adição de PBDEs

Os valores são expressos como média +/- desvio padrão para três experimentos com diferentes preparações mitocondriais. As condições experimentais estão descritas em Metodologia.

Avaliou-se também a habilidade dos PBDEs estudados em dissipar o potencial de membrana, uma vez que interação com membrana mitocondrial está correlacionada à despolarização de membrana (RODRIGUES, *et al.*, 2002). A Figura 7 demonstra os efeitos dos congêneres BDE -100, -153, -154 e -209 sobre o potencial de membrana. Observou-se que em concentrações mais altas (25 e 50 $\mu\text{mol/L}$) o BDE-100 foi capaz de dissipar o potencial de membrana mitocondrial, enquanto que o BDE-153, BDE-154 e BDE-209 pouco ou nada influenciaram sobre este parâmetro.

A) BDE- 100

B) BDE-153

C) BDE-154

D) BDE-209

Figura 7: Análise do potencial de membrana em mitocôndrias (1mg de proteína/mL) isoladas de fígado de rato, incubadas em meio padrão (Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2). As mitocôndrias foram tratadas como descrito em materiais e métodos e em seguida, energizadas com Succinato 5 mmol/L para a formação do potencial de membrana mitocondrial. Posteriormente foram adicionados os PBDEs (μmol/L). Os resultados representam a média de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. As inserções representam o traçado que melhor representa o experimento. U.F.A (Unidade de Fluorescência Arbitrária).

* $p < 0,05$ - estatisticamente significativo em relação ao controle (Sem adição de PBDE).

Na seqüência, avaliou-se a capacidade destes congêneres em alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial através do ensaio de inchamento mitocondrial. A figura 8 mostra os traçados concentração-resposta para os efeitos dos PBDEs com e sem a presença de inibidores. Os resultados demonstram que o congênere BDE-100 foi capaz de causar o intumescimento da mitocôndria em todas as concentrações testadas (0,1 $\mu\text{mol/L}$, 1,0 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 25 $\mu\text{mol/L}$ e 50 $\mu\text{mol/L}$), sendo mais pronunciado na maior concentração avaliada (50 $\mu\text{mol/L}$) sendo este um indicativo de que em altas concentrações, este congênere estimule o efluxo de cálcio pela abertura do poro de transição de permeabilidade. Pode-se observar também que este intumescimento causado pelo congênere BDE-100 não foi prevenido pelo inibidor clássico Ciclosporina A (CsA). Já o BDE-153 não foi capaz de causar intumescimento na mitocôndria em nenhuma das concentrações. Por outro lado o BDE-154 causou um sutil intumescimento em todas as concentrações testadas, sendo mais pronunciado nas concentrações de 10 $\mu\text{mol/L}$, 25 $\mu\text{mol/L}$ e 50 $\mu\text{mol/L}$ e também se mostrou sensível aos inibidores. Já o BDE-209 foi capaz de causar o inchamento da mitocôndria em todas as concentrações testadas tendo um efeito mais pronunciado nas concentrações (5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$, 25 $\mu\text{mol/L}$ e 50 $\mu\text{mol/L}$), entretanto não foi prevenido pelos inibidores.

Para confirmar se a abertura do poro de transição de permeabilidade esta correlacionada com o efluxo de cálcio do interior das mitocôndrias para o meio, o teste de análise de captação e efluxo de cálcio foi realizado na seqüência (Figura 9).

Observou-se que o BDE -100 foi capaz de interferir na liberação de cálcio nas maiores concentrações testadas, sendo significativo para a concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$. Porém não foi observado efluxo de cálcio para os demais congêneres de BDE.

A) BDE-100 **B) BDE-153**

C) BDE-154

D) BDE-209

FIGURA 8: Verificação do inchamento mitocondrial em mitocôndrias (0,4 mg de proteína/mL) isoladas de fígado de rato, incubadas em meio reacional padrão (Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2) acrescido de Rotenona 2,5 mmol/L, Succinato 5 mmol/L e CaCl_2 10 μ mol/L. Os congêneres de BDE foram adicionados por volta de 100 segundos para verificação de seus efeitos. O controle positivo foi induzido com Fosfato Inorgânico (Pi) 1 mmol/L. Os traçados são representativos de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. Foram analisados também os inibidores: Ciclosporina A (CSA) 1 μ mol/L; N-etil-maleineimida (NEM) 25 μ mol/L; Vermelho de Rutênio (VR) 0,5 μ mol/L para avaliar a inibição do swelling causado pelos PBDEs (50 μ mol/L).

A) BDE-100

B) BDE-153

C) BDE-154

D) BDE-209

FIGURA 9: Verificação da movimentação de Ca^{+2} em mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) isoladas de fígado de rato, incubadas em meio padrão contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2 acrescido de Rotenona 2,5 mmol/L, Cálcio Green 5N 150 nmol/L. As mitocôndrias foram tratadas como descrito em materiais e métodos, em seguida foram energizadas com Succinato 5 mmol/L. Os PBDEs foram adicionados por volta de 100 segundos para verificação de seus efeitos. O controle positivo foi induzido com CCCP 1 mmol/L. As inserções representam o traçado que melhor representa o efeito dos PBDEs no efluxo de cálcio. U.F.A. (Unidade de Fluorescência Arbitrária).

* $p < 0,05$ - estatisticamente significativo em relação ao controle.

Os níveis mitocondriais de ATP foram avaliados após 15 minutos de incubação das mitocôndrias com os PBDEs (Figura 10). Os resultados demonstram uma significativa diminuição nos níveis mitocondriais de ATP pelos PBDEs avaliados no presente trabalho.

A) BDE-100

B) BDE-153 **C) BDE-154**

D) BDE-209

FIGURA 10: Efeitos dos PBDEs sobre o nível de ATP em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. As mitocôndrias (1mg de proteína/mL) foram incubadas por 15 minutos em meio reacional composto por Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, acrescido de Rotenona 2,5 µmol/L e Succinato 5 mmol/L + PBDEs em volume final de 1 mL. A queda nos níveis de ATP foram induzidos por CCCP 1mmol/L. Os resultados representam a média de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais.

* $p < 0,05$ - estatisticamente significativo em relação ao controle (sem adição de PBDE).

Em seguida avaliou-se o estado redox mitocondrial sob efeito dos congêneres de PBDEs, pois a formação de EROs e o conseqüente ataque dos mesmos aos componentes da membrana mitocondrial, conhecido por lipoperoxidação, pode promover a formação de poros e a transição da permeabilidade mitocondrial o que pode levar a morte. Entretanto os congêneres de PBDEs não possuem capacidade de gerar espécies reativas conforme demonstrado na figura 11.

A) BDE-100

B) BDE-153

C) BDE-154

D) BDE-209

FIGURA 11: Verificação da formação de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) isoladas de fígado de rato, incubadas em meio padrão (Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2) acrescido de Rotenona 2,5 mmol/L e succinato 5 mmol/L, logo em seguida foi adicionado a sonda H_2DCFDA 2 µmol/L e os PBDEs para verificação de seus efeitos. O controle positivo foi induzido com *t*-butil hidroperóxido 300 µmol/L. Os traçados são representativos de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais.

Para confirmação dos resultados observados para a formação de espécies reativas de oxigênio, o comportamento dos congêneres sob a oxidação dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H) foram avaliados e estão representados na figura 12. Nossos resultados mostraram que os congêneres testados não foram capazes de induzir a oxidação de NAD(P)H. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos para os congêneres BDE-100, BDE-153, BDE-154 e BDE-209 quanto aos níveis de glutathiona oxidada e reduzida expressa na figura 13 em forma de razão GSH/GSSG, onde não foi observada alteração significativa com relação ao controle, com exceção do BDE-209 (0,1 $\mu\text{mol/L}$).

A) BDE-100

B) BDE-153 **C) BDE-154**

D) BDE-209

FIGURA 12: Níveis de NAD(P)H em mitocôndrias (1mg de proteína/mL) isoladas de fígados de ratos, incubadas em meio padrão (Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2) e posterior adição dos PBDEs. O controle positivo foi induzido com *t*-butil hidroperóxido 300 $\mu\text{mol/L}$. Os traçados são representativos de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais.

A) BDE-100 **B) BDE-153**

C) BDE-154

D) BDE-209

FIGURA 13: Razão entre GSH e GSSG em mitocôndrias (1mg de proteína/mL) isoladas de fígado de rato sob efeitos dos congêneres de BDE, incubadas em meio padrão (Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2) em condições experimentais como descrito em materiais e métodos. Os resultados representam a média de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais.

* $p < 0,05$ - estatisticamente significativo em relação ao controle (sem adição de PBDE).

Sabe-se que o acúmulo de espécies reativas na mitocôndria pode levar a oxidação de grupos tiólicos de proteínas mitocondriais. Assim, a Fig. 14 demonstra que na presença do congênere BDE-100, assim como do BDE-154 e BDE-209 não houve indução significativa da oxidação dos grupos tiólicos. Contudo, na presença do BDE-153 pode-se observar que nas concentrações (0,1 $\mu\text{mol/L}$, 1 $\mu\text{mol/L}$ e 50 $\mu\text{mol/L}$) a indução da oxidação de grupos tióis de membrana foi significativa.

A) BDE-100

B) BDE-153 **C) BDE-154**

D) BDE-209

FIGURA 14: Efeitos dos PBDEs sobre a oxidação dos grupos tiólicos de proteínas mitocondriais. As mitocôndrias (1 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio de reação contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L e Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, acrescido de Rotenona 2,5 μmol/L e Succinato 5 mmol/L. Os resultados representam a média de 3 determinações com diferentes preparações mitocondriais. A indução da oxidação de grupamentos sulfidríla foi realizada com t-butil hidroperóxido 300 μmol/L.

* $p < 0,05$ - estatisticamente significativo em relação ao controle (sem adição de PBDE).

5 – DISCUSSÃO

Os PBDEs estão disponíveis comercialmente em misturas de seus congêneres constituídos principalmente por Penta, Octa e Deca-BDE (SIDDIQI, et al., 2003; DARNERUD, 2003). Sendo o Deca-BDE responsável por 80% da produção total de PBDEs, enquanto Penta e Octa-BDE constituem cerca de 12% e 6% respectivamente (DE WIT, 2002). Um grupo particular de congêneres de PBDEs são persistentes no ambiente e, portanto encontrados com facilidade na biota, por exemplo BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153 e BDE-154 (DE WIT, 2002) além do BDE-209 (totalmente bromado) encontrado em tecidos biológicos (THURESSON et al., 2006; JENSSEN et al., 2007). Devido a sua resistência como poluente orgânico, suas características físicas, químicas e bioacumulativas, além de sua capacidade de difusão no ambiente e em tecidos humanos serem semelhantes às Bifenilas Poli-cloradas (PCBs) (SIDDIQI, et al., 2003) os PBDEs são chamados de “Os PCBs do futuro”. Os PCBs foram descobertos há 100 anos e inúmeros trabalhos também relatam sua capacidade de causar hepatotoxicidade, neurotoxicidade, imunotoxicidade e alterações endócrinas assim como os PBDEs (ZHU, et al., 2009).

Os PBDEs são adicionados a vários componentes de circuitos eletrônicos, carros e materiais de construção e têxteis a fim de garantir resistência à combustão. Entretanto muitos estudos têm relatado que os PBDEs podem causar toxicidade hepática e disfunção da tireóide (HU et al., 2007; RICHARDSON et al., 2008). Há ainda estudos que correlacionam à indução de apoptose em células Jurkat pelo BDE-47 à disfunção mitocondrial e um aumento na produção de EROS pelo BDE-209 (YAN et al., 2010; HU, et al., 2007).

Segundo JAESCHKE et al., (2002), o fígado é o principal local de absorção e metabolismo de substâncias e, portanto, um importante alvo para os efeitos nocivos. Além disso, disfunção mitocondrial é um mecanismo

importante e relevante na patogênese de muitos toxicantes em mamíferos, principalmente toxicidade hepática (AMACHER, 2005). Sendo assim, estes estudos preliminares foram realizados visando elucidar o potencial toxicológico no que se referem as suas interações com as mitocôndrias, uma vez que mitocôndrias hepáticas isoladas constituem um clássico modelo experimental para estudos envolvendo alterações bioenergéticas mitocondriais por agentes tóxicos em geral. Até o presente momento, foram avaliados os efeitos de 4 congêneres de BDE sobre o estado energético e oxidativo de mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Contudo, nossos resultados mostram que os efeitos na bioenergética mitocondrial diferem entre os congêneres de PBDEs testados. Tal fato já foi também observado sob outros parâmetros como diferenças de absorção, metabolismo e disposição de classes diferentes de PBDEs (STAPLETON et al., 2009).

Segundo HAKK (2009) é possível encontrar diferenças na capacidade de bioacumulação para os congêneres BDE-153 e BDE-154, sendo o BDE-154 menos bioacumulativo do que o BDE-153. Nossos resultados para interação de membrana mitocondrial denotam algo parecido, uma vez que mesmo os congêneres BDE-153 e BDE-154 (ambos com 5 bromos em sua estrutura) apresentaram diferenças com relação a capacidade de interagir com a membrana mitocondrial. O DPH é um marcador que se incorpora dentro da região lipofílica da bi-camada lipídica, orientando-se em paralelo com os lipídios adquirindo fluorescência (HELENA, et al., 2006). Embora o TMA-DPH incorpore-se com facilidade a regiões hidrofóbicas, este possui também o substituinte catiônico trimetilamônio agindo como âncora de superfície (LEE; HERLIHY, 1999). Desta forma, nossos resultados mostram a capacidade dos PBDEs testados em interagir com a região monitorada pelo TMA-DPH. Entretanto nossos resultados demonstram uma capacidade maior de interagir com a região aquosa monitorada pelo ANS, uma vez que este marcador assume ligações com a porção polar dos fosfolipídeos e proteínas da superfície de membrana (DORTA, et al., 2005). Quanto a esses efeitos, provavelmente estes compostos se distribuem pela porção hidrofóbica e com isso podem promover uma diminuição na fluidez da membrana mitocondrial ocasionando

prejuízo nos processos energéticos da mitocôndria, uma vez que os mesmos são sensíveis à organização da membrana interna mitocondrial.

A oxidação de substratos presentes na matriz mitocondrial e também fora da mitocôndria ocorre através da atividade da cadeia transportadora de elétrons, que pode também ser definida como um sistema de transporte de elétrons trans-membrana. Este sistema trans-membrana, por outro lado, promove a transferência de elétrons de dentro para fora da mitocôndria com a geração de um potencial de membrana. Do ponto de vista energético, este potencial de membrana eletroquímico é necessário para a síntese de ATP (LA PIANA, et al., 1998). Agentes citotóxicos em geral, incluindo contaminantes emergentes (foco principal deste trabalho) e seus metabólitos, podem influenciar o equilíbrio energético das células pelo aumento de consumo de ATP e/ou redução da síntese do mesmo conforme pôde ser observado com nossos resultados para mensurar os níveis mitocondriais de ATP. Sendo a depleção do ATP um dos eventos iniciais da toxicidade induzida por compostos, como consequência da inibição do transporte de elétrons/fosforilação oxidativa, dissipação do potencial de membrana mitocondrial, desregulação da homeostase cálcica, bem como geração de espécies reativas de oxigênio (WALLACE; STARKOV, 2000; MINGATTO, et al., 2002; KOWALTOWSKI, CASTILHO; VERCESI, 2001). Entretanto apenas o BDE-100 foi capaz de desfazer o potencial de membrana nas três últimas concentrações (10 $\mu\text{mol/L}$, 25 $\mu\text{mol/L}$ e 50 $\mu\text{mol/L}$), enquanto o BDE-153, BDE-154 e BDE-209 não alteraram este parâmetro.

As alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial (PMM) são conhecidas de longa data. A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) é desencadeada por inúmeros processos fisiológicos e patogênicos, tanto em células intactas, quanto em mitocôndrias isoladas. De fato, inúmeras respostas estressoras (desregulação cálcica, espécies reativas de oxigênio, espingolípídeos, estresse genotóxico, proteases) podem desencadear a TPM, sugerindo que a mitocôndria age como um sensor universal de estresse (HAJNOCZKY; MADESH, 2003; ROBERTS; GOPING; BLEACKLEY, 2003). Já

é muito bem estabelecida a participação da mitocôndria no mecanismo de morte celular por necrose ou apoptose. A TPM pode causar morte celular por necrose devido à depleção do ATP e desregulação da homeostase cálcica sem a liberação de citocromo C. Por outro lado, durante o processo de apoptose, o citocromo c e outras proteínas podem ser liberados para o citosol através do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) promovendo a ativação de caspases (SUSIN; ZAMZAMI; KROEMER, 1998; BERNARDI et al., 2001; KROEMER, 2003). Isto é consistente com o propósito de que os níveis celulares de ATP estão diretamente envolvidos na morte celular. Tem sido sugerido que quando o nível de ATP cai até um determinado valor, a célula percebe que não é capaz de sobreviver eficientemente e se encaminha para apoptose, entretanto quando ocorre à depleção abrupta dos níveis de ATP ocorre necrose (LA PIANA, et al., 1998). Sendo assim, nossos resultados para níveis mitocondriais de ATP sob efeitos dos diferentes congêneres de BDEs, sugerem que os danos mitocondriais causados por estes compostos podem levar sim a morte celular, pois foi observado diminuição significativa do nível de ATP para todos os quatro PBDEs estudados (BDE-100, -153, -154 e -209) em praticamente todas as concentrações testadas. Somado a isso, nossos resultados até o presente momento mostram que os congêneres testados (BDE-100, BDE-153, BDE-154 e BDE-209) possuem habilidade de causar inchamento mitocondrial em diversas concentrações de toda a faixa de concentração testada (0,1 $\mu\text{mol/L}$ a 50 $\mu\text{mol/L}$), porém os congêneres se comportaram de maneira diferente. Pois o BDE-153 apresentou sutil efeito, sendo mais pronunciado em concentrações mais baixas; e os demais (BDE-100, BDE-154 e BDE-209) necessitaram de altas concentrações para causar inchamento mitocondrial. Este fenômeno conhecido como swelling mitocondrial compreende genericamente uma série de fenômenos de diferentes naturezas, que podem ser medidos como uma alteração da absorção de luz com o uso de espectrofotômetros analisando a turbidez do meio. Segundo BERNARDI et al., (1999) o inchamento mitocondrial é sempre um processo osmótico que pode ocorrer de acordo com dois mecanismos básicos: A) Eletroforético (energia-dependente) que ocorre sem perda de energia e pode ser regenerado pela

respiração mitocondrial, B) Difusão Passiva seguido de uma diminuição da permeabilidade da membrana mitocondrial causado pela abertura de poro seguida de repolarização.

A Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM) pode ser definida como um aumento súbito da permeabilidade da membrana mitocondrial interna a solutos com massas moleculares de até 1500 Da, devido à abertura de um canal de alta condutância, sensível a Ciclosporina A e Ca^{+2} dependente (BERNARDI; RASOLA, 2007; TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2007), os pesquisadores HUNTER; FORD, (1955) demonstraram que o swelling mitocondrial pode ser induzido por fosfato, arsenato, arsenito e vários outros íons metálicos. Além disso, em mitocôndrias energizadas, o consumo de cálcio para a matriz é alcançado por um uniporter para o íon cálcio, sensível ao Vermelho de Rutênio (BERNARDI e RASOLA, 2007). A presença de reagentes de grupos tióis tal como N-etilmaleimida (NEM) eleva o potencial de membrana mitocondrial aparente a valores mais negativos de voltagem, diminuindo a probabilidade de abertura de poros (PETRONILLI et al., 1994), reduzindo assim a chance de TPM, uma vez que este evento é dependente do potencial de membrana mitocondrial (PESTANA, 2010).

O imunossupressor Ciclosporina A (CsA) é conhecido por impedir a indução de TPM (BROEKEMEIER, DEMPSEY, PFEIFFER, 1989), este efeito pode ser observado nos nossos resultados de indução de inchamento mitocondrial com 50 $\mu\text{mol/L}$ de BDE-154 e -209, onde o uso do inibidor clássico CsA inibiu parcialmente o processo. Entretanto, a TPM insensível a CsA tem sido também descrita na literatura (TSUJIMOTO e SHIMIZU 2006), este efeito foi observado pela exposição das mitocôndrias ao BDE-100, onde o uso de CsA não impediu inchamento da organela quando exposta a 50 $\mu\text{mol/L}$ deste congênere. Por outro lado, o congênere BDE-100 e os demais se mostraram sensíveis ao Vermelho de Rutênio, o que nos dá uma indicativa de que o íon Ca^{+2} também seja um agente importante da TPM induzida por estes compostos. Ainda pôde-se observar que o NEM foi capaz de reduzir

parcialmente o inchamento mitocondrial induzido por 50 $\mu\text{mol/L}$ dos PBDEs avaliados, sugerindo uma proteção da formação de poros.

Resultados semelhantes podem ser observados na avaliação da liberação do cálcio através do Cálcio Green 5N, no qual os congêneres de BDE comportaram-se de maneira diferente. O BDE-100 foi capaz de liberar 51% do cálcio na concentração mais alta testada e 20% na concentração de 25 $\mu\text{mol/L}$; O BDE-153 pouco influenciou neste parâmetro, liberando sutilmente cálcio na concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$, similar ao BDE-154 que liberou cálcio muito sutilmente na concentração de 50 $\mu\text{mol/L}$, enquanto o BDE-209 não causou alteração alguma. Segundo KODAVANTI, (2005) congêneres de BDE (BDE-71 e BDE 79) influenciam de forma e intensidade diferentes a homeostase cálcica em microsomas e mitocôndrias isoladas em três regiões distintas do cérebro de ratos.

Durante o metabolismo mitocondrial, espécies reativas de oxigênio são formadas, especialmente o anion superóxido, H_2O_2 , e radical $\text{OH}^\cdot$ pelos complexos I e III da cadeia respiratória (DIAS, 2005). Em condições de estresse oxidativo causados por xenobióticos e toxicantes, a geração de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e conseqüentemente o acúmulo de H_2O_2 podem estar aumentados em mitocôndrias formando, por meio da reação de Fenton-Haber-Weiss, radicais $\text{OH}^\cdot$ que atacam lipídios de membrana dando início ao processo de lipoperoxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Os experimentos realizados para análise de formação de espécies reativas de oxigênio demonstram que os PBDEs não foram capazes de estimular a produção destas espécies, além da basal. Fato que pôde ser evidenciado pela manutenção do estado redox mitocondrial, avaliados pelo estado redox dos níveis de nucleotídeos de piridina, e pelos níveis de GSH e GSSG. A oxidação do NAD(P)H pode iniciar ou amplificar eventos patológicos e fisiológicos (DI LISA; ZIEGLER, 2001), contudo a ausência de oxidação do NAD(P)H e a não formação de espécies reativas associado à manutenção dos níveis de glutathiona indica que os congêneres de BDE não alteram os fatores associados ao estresse oxidativo. Sabe-se que depleção de glutathiona, lipoperoxidação de

membranas, aumento da concentração citosólica de Ca^{+2} e oxidação de proteínas de grupos tióis são fatores importantes no dano celular ocasionado pelo estresse oxidativo (TAKEYAMA, 1993). Entretanto, já era esperado que os congêneres de BDEs estudados não alterassem estes parâmetros, uma vez que o mecanismo de ação dos mesmos durante a combustão consiste na neutralização dos radicais livres (OH^- e H^+). Contudo há relatos na literatura que o BDE-47 e BDE-209 causam estresse oxidativo em células RTG-2 concentração-dependente em 12 e 18 horas de tratamento levando as células a apoptose (JIN, et al., 2010). Entretanto, esses achados podem estar relacionados com os metabólitos desses compostos, sendo que as linhagens de células de peixe RTG-2 possuem citocromo P-450, CYP1A1, entre outras isoenzimas metabolizantes (RANDELLI, 2011).

Em conjunto, nossos resultados demonstram que os danos decorrentes dos congêneres avaliados no presente trabalho, variaram para um mesmo modelo experimental. Este fato corrobora com dados de estudos toxicocinéticos em ratos adultos, os quais demonstram que a absorção, metabolismo e excreção também variaram entre os congêneres. Por exemplo, os congêneres menos bromados são metabolizados para mono ou di-hidroxilados (6-OHBDE-47) enquanto que os congêneres mais bromados como o Deca-BDE pode ser metabolizado em congêneres menos bromados (COSTA et al., 2008). Além do mais, vários estudos demonstram a capacidade dos PBDEs em induzir monooxigenases em ratos: indução do CYP1A1 pelo BDE-71; disfunção do CYP2B pelos BDE-47, -99 e -153; aumento da expressão dos CYP3A11 e CYP2B10 pelos BDE-47, -99 e -209 (ZHOU et al., 2001; SANDERS et al., 2005; PACYNIK et al., 2007). Entretanto não está totalmente claro como é o metabolismo dos PBDEs em tecidos e organelas e quais os tipos de metabólitos podem ser formados e se os mesmos apresentam maior toxicidade (STAPLETON, 2009).

Sabe-se que a exposição aos PBDEs dá origem a efeitos adversos em vários modelos experimentais in vivo com animais, dependendo do congênere e em diferentes níveis de concentrações. Geralmente os produtos Penta-BDE

causam esses efeitos em pequenas doses enquanto que os Deca-BDE requerem doses mais elevadas para o surgimento desses efeitos (DARNERUD, 2003). Entretanto nossos resultados in vitro mostram que os efeitos em mitocôndrias isoladas podem ocorrer em menores concentrações para o BDE-153 (Hexa-BDE) e em altas concentrações para o BDE-100 (Penta-BDE), -154 (Hexa-BDE) e -209 (Deca-BDE). Em adição, muitos estudos demonstram que metabólitos dos PBDEs, hidroxilados (OH-) e metoxilados (MeO-) também poder ser detectados em tecidos humanos e animais apresentando efeitos tóxicos (AN, et al., 2010; STAPLETON, et al., 2009).

Os dados alarmantes de altas concentrações de PBDEs em pessoas no mundo todo têm levantado discussões a respeito da exposição humana a esses poluentes. Nossos resultados mostram que os congêneres testados são capazes de interagir com a membrana mitocondrial, este efeito pode estar relacionado com a formação de poros que leva a uma perda da permeabilidade mitocondrial sem afetar o seu estado oxidativo.

A União Européia e a grande maioria dos estados americanos já proibiram a comercialização do penta, octa e decaBDE. Contudo, no Brasil não há restrições legais para o uso dos PBDEs. Considerando a toxicidade dos retardantes de chama em diferentes modelos experimentais in vitro e in vivo estudos adicionais, em particular no que se refere à hepatotoxicidade com mitocôndrias isoladas de fígado de ratos e hepatócitos, poderão ser úteis no sentido elucidar melhor o mecanismo de toxicidade dessas substâncias.

6 – CONCLUSÃO

- A) Nossos resultados mostram que as mitocôndrias são alvos importantes na hepatotoxicidade dos PBDEs. Somado a isso, nossos resultados confirmam o potencial tóxico dos retardantes de chama bromados aqui avaliados pelo BDE-100, -153, -154 e -209, sendo estes os principais representantes desta classe de compostos.
- B) Os PBDEs não foram capazes de interferir nos parâmetros respiratórios (RCR e ADP/O) de maneira significativa.
- C) Os efeitos na fosforilação oxidativa não foram capazes de induzir alterações significativas na dissipação do potencial de membrana mitocondrial, com exceção do congênere BDE-100, que se mostrou capaz de dissipar esse potencial eletroquímico a partir da concentração de 10 $\mu\text{mol/L}$.
- D) Todos os quatro congêneres avaliados no presente trabalho se mostraram capazes de interagir com a membrana mitocondrial. Sendo mais evidente a capacidade de interagir com a porção hidrofílica da membrana monitorada pelo ANS, seguido da capacidade de interagir com a região hidrofóbica (em menor intensidade) monitorada pelos marcadores DPH e TMA-DPH.
- E) Os PBDEs avaliados foram capazes de induzir inchamento mitocondrial em proporções diferentes entre si. Onde o BDE-153 não causou swelling e os demais BDE (-100, -154 e -209) em altas concentrações. Por isso, nossos achados sugerem que a TPM desempenha um papel chave na etiologia da hepatotoxicidade induzida pelos BDE.

- F) Foi observado também que o uso de Ciclosporina A preveniu o swelling mitocondrial causado por 50 $\mu\text{mol/L}$ dos BDE-154 e -209, com exceção do BDE-100 que se mostrou insensível a Ciclosporina A. Entretanto o swelling induzido por 50 $\mu\text{mol/L}$ pelos quatro congêneres de BDE foi prevenido pelo uso de Vermelho de Rutênio, o que nos dá o indício de que o Ca^{+2} possa ser um indutor do inchamento mitocondrial.
- G) Podemos concluir também que o estado redox mitocondrial, permaneceu inalterado. Ou seja, as substâncias avaliadas não induzem estresse oxidativo, o que nos indica que a formação de espécies reativas não é o mecanismo de toxicidade dos congêneres de BDE em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALAEI, M.; et al., An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. **Environment International**, Amsterdam, v. 29,n.6, nov., p. 683–689, 2003.

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

AMES, B.N. et al., Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 134, p.111-116, 1983.

AN, J., et al., The cytotoxic effects of synthetic 6-Hydroxylated and 6-Methoxylated Polybrominated Diphenyl Ether 47 (BDE47). **Environmental Toxicology**. 2010. DOI 10.1002:tox.20582

ARNOT, J.; et al., An evaluation of hexabromocyclododecane (HBCD) for persistent organic pollutant (POP) properties and the potential for adverse effects in the environment. Submitted to: European Brominated FlameRetardant Industry Panel (EBFRIP), 2009.

BAHE, A.R.; et al., Emerging environmental contaminants and antibiotic resistance: science & policy concerns. 2005. Animal waste management symposium. Disponível em: <http://www.cals.ncsu.edu/waste_mgt/05wastesymposium/PDFS/Bahe.pdf>. Acesso em 11 de agosto de 2006.

BELZACQ A.S.; VIEIRA H.L.; KROEMER G.; BRENNER C. The adenine nucleotide translocator in apoptosis. **Biochimie**, Paris, v. 84, p.167–176, 2002.

BERNARDI, P., et al., Mitochondria and cell death: Mechanistic aspects and methodological issues. **European Journal Biochemistry**, Baltimore, v. 264, 687-701, 1999.

BERNARDI, P.; PETRONILLI, V.; DI LISA, F. & FORTE, M. A mitochondrial perspective on cell death. Trends **Biochememical Sciences**, Amsterdam, v. 26, p.112-117, 2001.

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

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

- BIRNBAUM, L.S.; STASKAL, D.F. Brominated flame retardants: cause for concern? **Environmental Health Perspective**, [S.I.] v. 112, p.9-17, 2004. doi:10.1289/ehp.6559
- BRACHT, A.; IWAMOTO, E.L.I. O estudo do metabolismo energético em mitocôndrias isoladas de tecido animal. In: Métodos de laboratório em bioquímica. 1ª Ed, Manole, São Paulo, 2003, cap. 9, p. 227-246, 2003.
- BROEKEMEIER, K.M.; DEMPSEY, M.E.; PFEIFFER, D.R. Ciclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, p. 7826-7830, 1989.
- BSEF. Bromine Science and Environmental Forum, Brussels, Belgium, 2000. Disponível em: <http://www.ebfrip.org/>. Acessada em janeiro 2012.
- CAIN, K.; SKILLETER., D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (Eds.). **Biochemical Toxicology**. Oxford: IRL Press, p.217-254, 1987.
- CHANCE, B.; WILLIAMS; G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Advances Enzymology**, New York, v.17, p.65-134, 1956.
- COSTA, L.G., et al., Polybrominated diphenyl ether (PBDEs) flame retardants: environmental contamination, human body burden and potential adverse health effects. **Acta Biomedica**, Berlin, v. 79: 172-183, 2008.
- COSTA, V. Q. Ocorrência de éteres difenilicos polibromados em sedimentos, peixes e mexilhões da Baía de Guanabara. Rio de Janeiro, 2006. Relatório Anual de Iniciação Científica – Pontifícia Universidade Católica (PUC-RJ).
- COVACI, S. et al., Evaluation of total lipids using enzymatic methods for the normalization of persistent organic pollutant levels in serum. **Science of the Total Environment**. San Diego, v. 366, p. 361-366, 2006.
- DANISH ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Brominated flame-retardants-substance flow analysis and assessment of alternatives. Environment Project Rep. n. 494, **Danish Environmental Protection Agency**, Copenhagen, 1999.
- DARNERUD, P.O. Toxic effects of brominated flame retardants in man in wildlife. **Environment International**, New York, v. 29, p.841-853, 2003.
- DE BOER, J., et al., Polybrominated diphenyl ethers in human adipose tissue and relation with watching television – a case study. **Organohalogen compounds**, v. 35, p. 407-410, 1998.
- DE WIT, C.A. An overview of brominated flame retardants in the environment. **Chemosphere**, Oxford, v. 46, 583-624, 2002.
- DIAMOND, J.M., et al., Prioritizing Contaminants of Emerging Concern for Ecological Screening Assessments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 30, n. 11, p. 2385-2394, 2011.
- DIAS, N., BAILLY, C., Drugs Targeting mitochondrial functions to control tumor cell growth. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 70, p. 1-12, 2005.

- DI LISA, F.; ZIEGLER, M. Pathophysiological relevance of mitochondria in NAD⁺ metabolism. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.492, p.4-8, 2001.
- DORTA, D.J., et al., The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 152, p. 67-78, 2005.
- EMAUS, R.K.; GRUNWALD, R.; LEMASTERS, J.J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat liver mitochondria: spectral and metabolic properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.850, p.436-448, 1986.
- FERNANDES, et al., Brominated and chlorinated dioxins, PCBs and brominated flame retardants in Scottish shellfish: Methodology, occurrence and human dietary exposure. DOI: 10.1002/mnfr.200700135
- FONTENELE, E.G.P.; MARTINS, M.R.A.; QUIDUTE, A.R.P.; JÚNIOR, R.M.M. Contaminantes Ambientais e os Interferentes Endócrinos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**. São Paulo, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2009.
- FREY, T.G., MANNELLA, C.A. The internal structure of mitochondria. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v. 25, n. 7, p. 319-324, 2000.
- GODEIRO JÚNIOR, C.O.;AGUIAR, P.M.C.;FELÍCIO, A.C.; FERRAZ, H.B. Mitocôndria e doença de Parkinson: Contribuições da genética no conhecimento do processo patogênico. **Einstein**, São Paulo, v. 5, n.2, p. 177-181, 2007.
- HAJNOCZKY, G.; MADESH, M. Calcium signaling and apoptosis, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 304, p. 545-554, 2003.
- HAKK, K; HUWE, J.K.; LARSEN G.L.; Absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) study with 2,2',4,4',5,6'-hexabromodiphenyl ether (BDE-154) in male Sprague-Dawley rats. **Xenobiotica**, London, v.39, n.1, p.46-56, 2009.
- HALE, R.C., et al., Persistent pollutants in land-applied sludges. **Nature**, London, v. 412, p. 140-141, 2001.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, third ed. Oxford University Press, New York., 1999.
- HAUGAARD, N. Reflections on the Role of the Thiol Group in Biology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 899, p.148-158, 2000.
- HE, et al., Effects of 20 PBDE metabolites on steroidogenesis in the H295R cell line. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 176, n. 3, p. 230-238, 2008
- HELENA, A.F.C., et al., Effects of isocoumarins isolated from *Paepalanthus bromelioides* on mitochondria: Uncoupling, and induction/inhibition of mitochondrial permeability transition. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 161, p. 155-164, 2006.
- HIEBL, J.; VETTER, W. Detection of Hexabromocyclododecane and Its Metabolite Pentabromocyclododecene in Chicken Egg and Fish from the Official Food Control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S.I.] v.55, n.9, p. 3319-3324, 2007.

- HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analalytical Biochemistry**, San Diego, v.74, p.214-226, 1976.
- HITES, R. A. Polybrominated Diphenyl Ethers in the Environment and in people: A Meta-Analysis of Concentrations. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 38, p. 945-956, 2004.
- HU, X.Z., et al., Apoptosis induction on human hepatomas cells Hep G2 of decabrominated diphenyl ether (PBDE 209). **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 171, p. 19-28, 2007.
- HU, G.C. et al., Bioaccumulation behavior of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the freshwater food chain of Baiyangdian Lake, North China. **Environmental International**. New York. v. 38, n. 4, p. 309-315, 2010.
- HUANG, S.C.; GIORDANO, G.; COSTA, L.G. Comparative Citotoxicity and Intracellular Accumulation of Five Polybrominated Diphenyl Ether Congeners in Mouse Cerebellar Granule Neurons. **Toxicological Scinces**, Orlando, v. 114, p.124-132, 2010.
- HUNTER Jr, F.E.; FORD, L. Inactivation of oxidative and phosphorylative system in mitochondria by preincubation with phosphate and others ions. **The Journal of biological chemistry**. Baltimore, v. 216, p. 357-369, 1955.
- KODAVANTI, P.R.S.; WARD, T.R. Differential Effects of Commercial Polybrominated Diphenyl Ether and Polychlorinated Biphenyl Mixtures om Intracellular Signaling In Rat Brain in vitro. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 85, p. 952-962, 2005.
- KOWALTOWSKI, A.J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress, **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 495, p. 12-15, 2001.
- KROEMER, G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 304, p. 433-435, 2003.
- IKONOMOU, M.; RAYNE, S.; ADDISSON, R. Exponential Increases of the Brominated Flame Retardants, Polybrominated Diphenyl Ethers, in the Canadian Arctic from 1981 to 2000. **Environmental Science Technology**, Washington, v. 36, p. 1886-1892, 2002.
- JAESCHKE, H., et al., Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicology Science**, Orlando, v. 65, p. 166–176, 2002.
- JESSEN, B.M., et al., Brominated flame retardants in north-cast Atlantic marine ecosystems. **Environmental Health Perspectives**. [S.I.], v. 115, p. 35-41, 2007.
- JIN, S., et al., Cytotoxicity and apoptosis induction on RTG-2 cells of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) and decabrominated diphenyl ether (209). **Toxicology in vitro**, New York, v. 24, n. 4, p. 1190-1196, 2010.

- JOCELYN, P.C. Spectrophotometric assay of thiols. **Methods in Enzymology**, New York, v. 143, p. 44-67, 1987.
- LA PIANA, G.; FRANSVEA, E.; MARZULLI, D.; LOFRUMENTO, N.E. Mitochondrial membrane potential supported by exogenous Cytochrome c oxidation Mimics the Early stages of apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 246, p.556-561, 1998.
- LAPIDUS, R.G.; SOKOLOVE, P.M. Spermine Inhibition of the Permeability Transition of Isolated Rat Liver Mitochondria: An Investigation of Mechanism. v. 306, p. 246 – 253, 1993.
- LAPIDUS, R.G.; SOKOLOVE, P.M. The mitochondrial permeability transition: Interactions of Spermine, ADP, and Inorganic Phosphate. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 29, p. 18931 – 18936, 1994.
- LEE, J; YU,B.P.; HERLIHY, J.T. Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, p. 260-265, 1999.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In: Principle of Biochemistry. 3th edition, New York: Worth Publishers, cap. 19, p. 515—539, 2002.
- LEMASTERS, J.J. Mechanisms of hepatic toxicity V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. **The American Journal of Physiology**, Washington, v. 276, n. 1, p. G1-G6, 1999.
- LESNEFSKY, E.J., et al., Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, v. 33, p. 1065-1089, 2001.
- MADIAA, F., et al., Differential in vitro neurotoxicity of the flame retardant PBDESS-99 and of the PCB Aroclor 1254 in human astrocytoma cells. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.154, p. 11–21, 2004.
- MINGATTO, F.E., et al., The critical role of mitochondrial energetic impairment in the toxicity of nimesulide to hepatocytes. **The Journal of Phamacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v. 303, n.2, p. 601-607, 2002.
- NETO, M.L.F. Norma Brasileira de Potabilidade de Água: Análise dos parâmetros agrotóxicos numa abordagem de avaliação de risco. Rio de Janeiro, 2010. Tese de Doutorado, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.
- NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S.J. Bioenergetics 2. Academic Press Inc.: London, 1982.
- OLIVEIRA, H.C., et al., Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 19, p.278-280, 2005.

PACYNIAK, E.K., et al., The flame retardants, polybrominated diphenyl ethers (PBDESS), are pregnane X receptor (PXR) activators. **Toxicology Science**, Orlando, v. 97, p. 94-102, 2007.

PEDERSEN, P.L., et al., Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Methods in Cell Biology**, New York, v. 20, p. 411- 481, 1978.

PESTANA, C.R. Aspectos bioquímicos-estruturais do transportador de nucleotídeos de adenina, cardiolipinas e ciclofilina D na transição de permeabilidade mitocondrial induzida por Ca^{+2} . Ribeirão Preto, 2010. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.

PESTANA, C. R.; BORGES, K. B.; FONSECA, P.; OLIVEIRA, D. P. Retardantes de chama bromados – uma revisão sobre éteres de difenilas polibromadas. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 41- 48, 2008.

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

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

RAHMAN, F.; LANGFORD, K. H.; SCRIMSHAW, M. D.; LESTER, J. N. Polibrominated diphenyl ether (PBDEs) flame retardants (Review). **Science Total Environment**, Amsterdam, v. 275, p. 117, 2001.

RANDELLI, E., et al., Effects of the polycyclic ketone tonalide (AHTN) on some cell viability parameters and transcription of P450 and immunoregulatory genes in rainbow trout RTG-2 cells. **Toxicology in vitro**. New York, v. 25, n.8, p.1596-1602, 2011.

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

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

RICHARDSON, V.M., et al., Possible mechanisms of thyroid hormone disruption in mice by BDE 47, a major polybrominated diphenyl ether congener. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 226, p. 244-250, 2008.

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

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

RODRIGUES, T., et al., Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidante activity toward apoptosis – potencially

implicated mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, London v.136, p. 136-142, 2002.

SANDERS, J.M., et al., Differential expression of CYP1A, 2B, and 3A genes in the F344 rat following exposure to a polybrominated diphenyl ether mixture or individual components. **Toxicology Science**, Orlando, v. 88, p. 127-33, 2005.

SANT'ANNA, J.P. Retardantes à chama. *Plástico Moderno*, 2004. Edição nº 351, 2004. Disponível em: <http://www.plastico.com.br/revista/pm351/retardantes1.htm>. Acesso em: maio 2007.

SHÃO, J.; ECHERT M.L.; LEE, L.E.; GALLAGHER, E.P. Comparative oxygen radical formation and toxicity of BDE 47 in rainbow trout cell lines. **Marine Environmental Research**, London, v. 66, p. 7–8, 2008.

SCHECTER, A., et al., Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in U.S. mothers' milk. **Environmental Health Perspectives**, [S.l.] v. 111, p. 1723–1729, 2003.

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

SJÖDIN, A., et al., Flame retardant exposure: polybrominated diphenyl ethers in blood from Swedish workers. **Environmental Health Perspectives**, [S.l.], v. 107, p. 643– 648, 1999.

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

STRYER, L. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 4 ed., 1996.

SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N. & KROEMER, G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1366, p. 151-165, 1998.

TAKEYAMA, N.; MATSUO, N. e TANAKA, T. Oxidative damage to mitochondria is mediated by the Ca^{+2} dependent inner-membrane permeability transition. **Biochemistry Journal**. London, v. 294, p. 719-725, 1993.

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

TOMS, L. M. L., et al., Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in human milk from Australia. **Chemosphere**, Oxford, v. 68, p. 797–803, 2007.

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

THURESSON, K., et al., Apparent half-lives of hepta- to decabrominated diphenyl ethers in human serum as determined in occupationally exposed workers. **Environmental Health Perspectives**. [S.l.], v. 114, p. 176-181, 2006.

- TROITZCH, J. H. International plastics flammability handbook: principles, regulations, testing and approval. 2nd ed., Hanser Publishers: Munich, Germany, 1990.
- TSUJIMOTO, Y.; NAKAGAWA, T.; SHIMIZU, S. Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1757, p. 1297-1300, 2006.
- TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. **Apoptosis**, Boston, v. 12, p. 835-840, 2007.
- TURRENS, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Bioscience Reports**, London, v. 17, p. 3-8, 1997.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. USEPA. Furniture flame retardancy partnership: Environmental profiles of chemical flame-retardant alternatives for low-density polyurethane foam. Rep. n.742-R-05-002A, USEPA, Washington, D.C., 2005.
- ZHOU T., ROSS, D.G., DEVITO, M.J., CROFTON, K.M. Effects of short-term in vivo exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats. **Toxicology Science**, Orlando, v. 61, p. 76-82, 2001.
- ZHU, Y., et al., N.A. Polychlorinated-biphenyl-induced oxidative stress and cytotoxicity can be mitigated by antioxidants after exposure. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 47, p. 1762-1771, 2009.
- ZORATTI, M; SZABO, I, The mitochondrial permeability transition. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1241, p. 139-176, 1995.
- WALLACE, K.B.; STARKOV, A.A. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 40, p.353-388, 2000.
- WATANABE, I.; SAKAI, S.I. Environmental release and behavior of brominated flame retardants. **Environment International**, New York, v. 23, p. 665-682, 2003.
- WEIHONG, H., et al., Effects of PBDESS-47 on cytotoxicity and genotoxicity in human neuroblastoma cells in vitro. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 649, p. 62–70, 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tetrabromobisphenol A and Derivatives; Environmental Health Criteria 172; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1995.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Flame retardants: A general Introduction; Environmental Health Criteria 192; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1997.
- YAN, C., HUANG, D., ZHANG, Y. The involvement of ROS overproduction and mitochondrial dysfunction in PBDE-47 induced apoptosis on Jurkat cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, doi: 10.1016/j.etp.2010.02.018.

YAN, S., et al., Emerging Contaminants of Environmental Concern: Source, Transport, Fate and Treatment. Practice Periodical of Hazardous, toxic and radioactive waste management, doi: 10.1061/_ASCE_HZ.1944-8376.0000015.

8 - ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.1522.53.3) intitulado "Avaliação das Alterações Mitocondriais Induzidas por Representantes das Principais Classes de Bifenilas Poli-Bromadas (PBDEs)", de autoria de **Lilian Cristina Pereira** e de **Daniel Junqueira Dorta**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 02.02.2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.90.53.3), entitled: "Avaliação das Alterações Mitocondriais Induzidas por Representantes das Principais Classes de Bifenilas Poli-Bromadas (PBDEs)", by **Lilian Cristina Pereira** and **Daniel Junqueira Dorta**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, February 02, 2011

Ribeirão Preto, 9 de fevereiro de 2011

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 4469 – Fax: (16) 3633 7964