

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOELMA NILZA DOS SANTOS LEÃO BUCHIR

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DE ÉTERES DIFENÍLICOS
POLIBROMADOS (PBDEs) EM EXEMPLARES DE *Oreochromis niloticus*

CURITIBA

2021

JOELMA NILZA DOS SANTOS LEÃO BUCHIR

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TÓXICO DE ÉTERES DIFENÍLICOS
POLIBROMADOS (PBDEs) EM EXEMPLARES DE *Oreochromis niloticus*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maritana Mela Prodocimo

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Buchir, Joelma Nilza dos Santos Leão
Avaliação do potencial tóxico de éteres difenílicos polibromados
(PBDEs) em exemplares de *Oreochromis niloticus*. / Joelma Nilza dos
Santos Leão Buchir. – Curitiba, 2021.
177 p.: il.

Orientador: Maritana Mela Prodocimo

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Polímeros. 2. Poluentes ambientais. 3. Toxicidade. 4. Biomarcadores.
I. Título. II. Mela, Maritana, 1979-. III. Universidade Federal do Paraná.
Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 615.902



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JOELMA NILZA DOS SANTOS LEÃO BUCHIR** intitulada: **AValiação DO POTENCIAL TÓXICO DE ÉTERES DIFENÍLICOS POLIBROMADOS (PBDEs) EM EXEMPLARES DE *Oreochromis niloticus***, sob orientação da Profa. Dra. MARITANA MELA PRODOCIMO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 04 de Fevereiro de 2021.

Assinatura Eletrônica
08/02/2021 17:46:59.0
MARITANA MELA PRODOCIMO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
09/02/2021 19:45:28.0
LUIS FERNANDO FÁVARO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
08/02/2021 19:24:35.0
SAMUEL LIEBEL
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE)

Assinatura Eletrônica
10/02/2021 12:19:46.0
WANEISSA ALGARTE RAMSDORF
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
09/02/2021 08:32:41.0
KATYA NALIWAICO
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico:

Ao meu esposo, Luís Miguel Buchir.

Ao meu filho, Yuki Buchir.

Aos meus irmãos, Paulo Leão, Gildo Leão e Fernanda Leão.

Aos meus pais, Fernando Leão (*in memoriam*) e Maria Emília Estêvão Leão.

Aos meus avós, Malote Estêvão Mate e Amélia Chilaúle (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas bênçãos concedidas.

À minha família, pelos ensinamentos e apoio prestado ao longo da vida.

À Prof^a. Dr^a. Maritana Mela Prodocimo, pela orientação, ensinamentos, dedicação, confiança, preocupação, apoio e amizade.

Aos Professores Samuel Liebel, Luís Fernando Fávaro, Katya Naliwaiko, Wanessa Ramsdorf, Izonete Guiloski e Taynah Vicari, por aceitarem o convite de participar da banca de avaliação, contribuindo para a melhoria do trabalho.

Ao Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane, pelo incentivo na formação de seus quadros e aos colegas de trabalho pelo apoio prestado.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela oportunidade concedida no ingresso ao Programa.

Aos professores, pela partilha de conhecimento.

Aos colegas e amigos do grupo de pesquisa em Toxicologia Celular e Ambiental: Patrícia, Tugstênio, Nilce, Aliciane, Roberta, Dámaso, Yuri, Jéssica, Michele, Tobias, Luiza, Benísio, Mariliza, Melyssa, Erick e Maristela, pelo companheirismo, apoio e colaboração durante o curso.

Aos amigos Eliane e Cleverson, seus filhos Nicolas e Murilo, pela amizade e suporte.

Aos bolsistas de Iniciação científica Júlia e Mateus, pelo auxílio durante a pesquisa.

À Universidade Federal do Paraná pela estrutura disponibilizada e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo auxílio financeiro.

“Nenhum trabalho de qualidade pode ser feito sem concentração e auto-sacrifício, esforço e dúvida.”

Max Beerbohm

RESUMO

O crescimento industrial vem gerando uma maior demanda na produção de novos polímeros sendo que a grande maioria desses compostos possui origem petrogênica e características inflamáveis. Deste grupo de polímeros fazem parte os Éteres Difenílicos polibromados (PBDEs) que são retardantes de chama adicionados a produtos de consumo para reduzir e evitar a propagação do fogo. O aumento desses poluentes no ambiente tem acentuado a preocupação a nível mundial, dado que as principais consequências toxicológicas destes em humanos podem ser, alteração hormonais, déficit neurológicos durante o desenvolvimento fetal e o desenvolvimento de câncer. Com o objetivo de avaliar o potencial tóxico dos PBDEs, foram realizados dois experimentos com dois congêneres diferentes de BDE em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), utilizando diferentes biomarcadores. No primeiro experimento, tilápias juvenis foram expostas via gavagem a cada 10 dias, durante 80 dias e de forma subcrônica à diferentes concentrações de BDE-47 (0 (óleo de canola); 0,253; 2,53; 25,3 ng. g⁻¹). O segundo experimento, usando a mesma espécie, via, tempo de exposição e analisando as mesmas respostas, consistiu na exposição ao BDE-99 (0 (óleo de milho); 0,294; 2,94; 29,4 ng. g⁻¹). Mesmo em baixas concentrações, tanto a exposição ao BDE-47 quanto ao BDE-99 foi capaz de causar alterações significativas nas atividades enzimáticas, efeitos de desregulação endócrina e alterações nos parâmetros histopatológicos em *O. niloticus*, promovendo um melhor entendimento dos mecanismos de exposição aos PBDEs. Os resultados obtidos quanto à ação do BDE-47 e BDE-99 na tilápia não são conclusivos pois, variáveis como a concentração destes congêneres, duração da exposição, espécies de peixes, estágio de desenvolvimento (idade) ou o veículo usado para administração deste poluente podem interferir na saúde geral e crescimento dos peixes.

Palavras-chave: Bioensaios, exposição subcrônica, exposição trófica, BDE-47, BDE-99, biomarcadores, toxicidade.

ABSTRACT

Industrial growth has been generating greater demand in the production of new polymers and the vast majority of these compounds have a petrogenic origin and flammable characteristics. This group of polymers includes polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) which are flame retardants added to consumer products to reduce and prevent the spread of fire. The increase of these pollutants in the environment has accentuated the concern worldwide, given that the main toxicological consequences of these in humans can be, hormonal changes, neurological deficits during fetal development, and the development of cancer. In order to evaluate the toxic potential of PBDEs, two experiments were carried out with two different BDE congeners in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), using different biomarkers. In the first experiment, juvenile tilapia were exposed via gavage every 10 days, for 80 days, and subchronically to different concentrations of BDE-47 (0 (canola oil); 0.253; 2.53; 25.3 ng. g⁻¹). The second experiment, using the same species, route, exposure time, and analyzing the same biomarkers, consisted of exposure to BDE-99 (0 (maize oil); 0.294; 2.94; 29.4 ng. g⁻¹). Even at low concentrations, both exposures to BDE-47 and BDE-99 were able to cause significant changes in enzyme activities, endocrine disrupting effects, and changes in histopathological parameters in *O. niloticus*, promoting a better understanding of the mechanisms of exposure to PBDEs. The results obtained regarding the action of BDE-47 and BDE-99 on tilapia are not conclusive because variables such as the concentration of these congeners, duration of exposure, species of fish, stage of development (age), or the vehicle used to administer this pollutant can interfere with the general health and growth of fish.

Keywords: Bioassays, subchronic exposure, trophic exposure, BDE-47, BDE-99, biomarkers, toxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
AChE	Acetilcolinesterase
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
ALFAC	Álcool-formaldeído-ácido acético
BDE-28	2,4,4' - tribromodiphenyl ether
BDE-47	2,2',4,4' - tetrabromodiphenyl ether
BDE-99	2,2',4,4',5 - pentabromodiphenyl ether
BDE-100	2,2',4,4',6 - pentabromodiphenyl ether
BDE-153	2,2',4,4',5,5' - hexabromodiphenyl ether
BDE-154	2,2',4,4',5',6 - hexabromodiphenyl ether
BDE-183	2,2',3,4,4', 5',6 - heptabromodiphenyl ether
BDE-209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6' - decabromodiphenyl ether
BFRs	Brominated flame retardants
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Bovine serum albumin
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
Cd	Cádmio
Cr (VI)	Cromo hexavalente
CTAF	Centro de de tecnologia avançada de fluorescência
CYP 450	Ciocromo P450
CEUA	Comitê de ética do uso de animais
DE	Desregulação endócrina
Dio	Deiodinases
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNPH	2,4-dinitrofenil-hidrazina
DTNB	Ácido 5,5' ditiobis 2 nitrobenzóico

EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPA	Environmental Protection Agency
EROD	Etoxrresorufina-O-desetilase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
E2	17 β -estradiol
FeSO ₄ .NH ₄	Sulfato ferroso amoniacal
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Grama
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSI	Gonadosomatic index
GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa s- transferase
h	horas
HBCD	Hexabromociclododecano
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
Hg	Mercúrio
HSI	Hepatosomatic index
IBR	Integrated biomarker response
K	Fator de condição
L	Litro
LH	Hormônio luteinizante
LPO	Peroxidação lipídica
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mm ²	Milimetro quadrado
min	Minutos

mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MS222	Ácido etil-ester-3-aminobenzóico
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina NBT
NBT	Azul de nitrotetrazólio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NPT	Non-orotein thiols
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ⁻	Radical superóxido
OH•	Radical hidroxila
OH-PBDEs	Hidroxi-PBDEs
Pb	Chumbo
PBBs	Polybrominated biphenyls
PBDEs	Polybrominated diphenyl ethers
PBS	Phosphate buffered saline
PCO	Carbonilação proteica
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
ppm	Partes por milhão
RoHS	Restriction of certain hazardous substances
SA-HRP	Streptavidin-horseradish peroxidase
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SOD	Superóxido dismutase
T	Testosterona
TBBPA	TetrabromobisfenolA
TBP	Tribromophenol
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-bufer saline tween
TCA	Ácido tricloroacético
THs	Hormônios tireoideanos

TMB	3,3',5,5; -tetramethylbenzidine
TTR	Transthyretin
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
UDPGTs	Uridina difosfato-glucoronosil transferase
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
VTG	Vitelogenina
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
ESTRUTURA DO TRABALHO.....	16
INTRODUÇÃO GERAL, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, OBJETIVOS e	
METODOLOGIA.....	17
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 RETARDANTES DE CHAMA BROMADOS	20
2.2 ÉTERES DIFENÍLICOS POLIBROMADOS – PBDEs.....	21
2.3 MECANISMO TOXICOCINÉTICO DOS PBDEs	28
2.4 <i>Oreochromis niloticus</i> COMO MODELO DE ESTUDO.....	31
2.5 BIOMARCADORES	32
3. JUSTIFICATIVA.....	41
4. HIPÓTESE.....	41
5. OBJETIVOS.....	42
6. MATERIAL E MÉTODOS	42
6.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
REFERÊNCIAS	44
 Manuscript: Effects of trophic 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47)	
exposure in <i>Oreochromis niloticus</i>: a multiple biomarkers analysis	55
Abstract.....	58
1. Introduction	59
2. Material and method	60
3. Results.....	65
4. Discussion	72
References	79

Manuscript: Assessment of the effects of sub chronic exposure of Nile

tilapia to BDE-99	90
1. Introduction	93
2. Materials and methods.....	94
3. Results.....	101
4. Discussion	112
5. Conclusion	115
References	116
 CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES.....	129
LISTA DE REFERÊNCIAS	131
 APÊNDICE A.....	155
DESCRIÇÃO DETALHADADA DA METODOLOGIA.....	155
APÊNDICE A1 - PREPARO DOS XENOBIÓTICOS	156
APÊNDICE A2 - DESENHO EXPERIMENTAL E EXPOSIÇÃO	156
APÊNDICE A3 - COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO	157
APÊNDICE A4 - ÍNDICES SOMÁTICOS	158
APÊNDICE A5 - ANÁLISE GENOTÓXICA.....	159
APÊNDICE A6 - ANÁLISE MOLECULAR.....	162
APÊNDICE A7 - ANÁLISE BIOQUÍMICA	164
APÊNDICE A8 - ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL	169
 APÊNDICE B	172
RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	172
APÊNDICE B - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA (B1-B6) ...	173

ESTRUTURA DO TRABALHO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o potencial tóxico de dois congêneres de Éteres difenílicos polibromados (PBDEs) (BDE-47 e BDE-99) em exemplares de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através da análise de biomarcadores em diferentes tecidos alvo. Para tal, o trabalho foi organizado da seguinte maneira:

Aspectos introdutórios: Introdução geral, revisão bibliográfica, objetivos e metodologia resumida.

Resultados: Apresentados na forma de artigos científicos.

- ✓ Capítulo I - “Effects of individual polybrominated diphenyl ether congeners (PBDE – 47) on *Oreochromis niloticus* by multiple biomarkers”. Submetido à revista Environmental Toxicology and Pharmacology.
- ✓ Capítulo II - “Evaluation of the effects of subchronic exposure of *Oreochromis niloticus* to 2,2',4,4',5-pentabromodifenil ether (BDE-99)”. A ser submetido no primeiro semestre de 2021 à revista Aquatic Toxicology.

Considerações finais e recomendações.

Apêndice: Metodologia detalhada e resultados complementares.

**INTRODUÇÃO GERAL, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, OBJETIVOS
e METODOLOGIA**

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os avanços na ciência têm contribuído para o aumento de produção de novos materiais, levando à geração e utilização de uma variedade de polímeros sintéticos empregados nos mais variados bens de consumo, como na indústria e na construção civil (ANNUNCIAÇÃO; ALMEIDA; SODRÉ, 2017; PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017). Entretanto, com o desenvolvimento crescente, tem-se observado também o aumento de emissões de poluentes, os quais podem se tornar responsáveis diretos pelo comprometimento da saúde dos ecossistemas aquáticos, afetando também diferentes populações que dessa água dependem (BARBEE; GAVIO; SWEARER, 2014).

Em grandes cidades, mesmo em regiões onde a água doce é abundante, o comprometimento da qualidade da água é agravado por despejos de esgoto doméstico e industrial, contribuindo para novas situações de desequilíbrio (KHAN et al., 2016; YAMAMOTO et al., 2016). O desenvolvimento da agricultura também tem contribuído para a poluição das águas através do uso de fertilizantes sintéticos e agrotóxicos muitas vezes usados em quantidades abusivas nas lavouras (BARNI et al., 2016; HADDAOUI et al., 2016). Adicionalmente, muitos desses poluentes, além da sua toxicidade, persistem no ambiente, podendo ser bioacumulados na cadeia alimentar, colocando em risco a saúde humana (BARNI et al., 2016; NUGEGODA e KIBRIA, 2017; XU et al., 2017a; MWAKALAPA et al., 2018).

Dentre os novos polímeros produzidos para uma utilização ampla nos diversos setores da indústria, atingindo os setores de serviço e consumo popular através de diferentes produtos, destacam-se os éteres difenílicos polibromados (PBDEs), retardantes de chamas que, devido a sua bioacumulação nos tecidos dos seres vivos são considerados contaminantes ambientais persistentes. A sua toxicidade tem sido amplamente estudada no sedimento aquático e solos; material particulado atmosférico e aquático; matrizes biológicas como tecidos de animais marinhos, sangue humano, tecidos humanos e leite materno humano (WANG et al., 2011; MA et al., 2012; AL-ZAIDAN et al., 2015; BARNI et al., 2016; BOSSI; VORKAMP; SKOV, 2016; ENGLISH et al., 2016; NAING; LI; LEE, 2016; YUAN et al., 2016; GIULIVO et al., 2017; IQBAL et al., 2017; LUNDEBYE et al., 2017; NUGEGODA; KIBRIA, 2017; RÍOS et al., 2017; TRABALÓN et al., 2017;

VERHAERT et al., 2017; MWAKALAPA et al., 2018). Ademais, estudos toxicológicos sugerem que a exposição de humanos aos PBDEs está acompanhada de alterações imunológicas, hepatotóxicas e neurotóxicas, bem como da ação interferente endócrina (LYCHE et al., 2015; WANG et al., 2015; NUGEGODA e KIBRIA, 2017; KODAVANTI, STOKER e FENTON., 2017).

No Brasil pouco se sabe sobre a utilização dos PBDEs, bem como sobre seus níveis ambientais. Sabe-se, porém, que os principais processos de contaminação em ambientes urbanos estão intimamente associados ao aporte de esgoto bruto e ao descarte de efluentes de estações de tratamento de esgoto (ETE) (ANNUNCIAÇÃO; ALMEIDA; SODRÉ, 2017; PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017). Entretanto, ainda não há uma legislação específica em relação a estes retardantes, apenas um Projeto de Lei do Senado (nº 173) proposto em 2009 e arquivado em 2011, o qual estabelece que computadores, componentes de computadores e equipamentos de informática em geral comercializados no Brasil devem apresentar concentração não superior a 0,1% de PBBs, PBDEs, chumbo, mercúrio e cromo hexavalente (ANNUNCIAÇÃO; ALMEIDA; SODRÉ, 2017). Existe também uma instrução normativa (número 1 de 2010) a respeito dos critérios ambientais na aquisição de bens, que exige que os mesmos não contenham substâncias perigosas como mercúrio (Hg), chumbo (Pb), cromo hexavalente (Cr (VI)), cádmio (Cd), bifenil-polibromados (PBBs) e éteres difenílicos polibromados (PBDEs), em concentrações acima da recomendada na diretiva RoHS (*Restriction of Certain Hazardous Substances*), (PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017).

Fontes difusas de contaminação são uma problemática em grandes rios do Brasil e o país apresenta deficiência em recursos que previnam e tratem os problemas causados pelo despejo de resíduos tóxicos no ambiente. Contudo, a preocupação crescente em encontrar meios que reduzam a poluição ainda em níveis iniciais e evitar seu contato com a população vem crescendo a cada ano (CAZENAVE et al., 2009; FREIRE et al., 2015; SANTANA et al., 2018). Neste contexto, o estudo dos efeitos de poluentes ambientais se faz necessário, uma vez que, anualmente, são lançadas no mercado cerca de mil novas substâncias químicas sintéticas, a maioria sem nenhuma avaliação adequada sob o ponto de vista da sua interação nos ecossistemas. Acrescenta-se que muitas destas substâncias podem atuar no organismo humano de forma muito silenciosa, visto

que seus efeitos são observados somente após longos períodos de exposição (MELA et al., 2012).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RETARDANTES DE CHAMA BROMADOS

Durante as últimas décadas, diversos produtos químicos foram desenvolvidos para melhorar a qualidade de vida do homem, como por exemplo os bromados utilizados como retardantes de chamas (BFRs), substâncias estas utilizadas nos mais variados produtos comerciais. Estes retardantes de chamas agem inibindo o processo de combustão, reduzindo riscos e danos provocados por incêndios (PAPACHLIMITZOU et al., 2012; WANG et al., 2016).

Os bromados podem ser divididos em três subgrupos, dependendo do modo de incorporação em polímeros: monômeros (estirenos bromados e butadieno bromados), reativos (tetrabromobisfenolA-TBBPA) e aditivos (hexabromociclododecano-HBCD e éteres difenílicos polibromados-PBDE) (GIRAUDO et al., 2017; PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017). O TBBPA é utilizado na produção de resinas epóxi e de policarbonato para ser aplicado na fabricação de placas de circuito impresso e seu teor de bromo pode atingir cerca de 10% do peso total do equipamento. Os HBCD, com teor de bromo de 74,7%, são aplicados principalmente em espuma de poliestireno ou usados em vários outros produtos, incluindo mobiliário, têxteis e materiais de construção (ZHANG; BUEKENS; LI, 2016). Os PBDEs são muitas vezes aplicados na produção de resinas termo-endurecíveis, poliésteres, espuma de poliuretano e têxteis, sendo que o teor de bromo em alguns tipos de espuma de poliuretano chega a ter de 10 a 30% do peso total (SILVA et al., 2014).

Infelizmente com o avanço tecnológico e a produção em massa de resíduos eletrônicos, a dispersão de componentes associados ao lixo nos ambientes naturais tem aumentado e a grande preocupação tem foco nos países em desenvolvimento, uma vez que a alternativa na eliminação de produtos compostos por estes retardantes de chamas tem sido a incineração (TUE et al., 2016). Segundo TUE et al. (2016), é observado um alto grau de liberação de componentes bromados e clorados em locais de queima de equipamentos

eletrônicos em Gana. Além disso, os autores demonstraram que o grau de dispersão é baixo, ficando retido ao solo, comprovando que alguns extratos do ambiente são mais propícios a reter estes compostos. Dentre os retardantes de chamas citados na literatura científica, o foco dos estudos de toxicidade tem se voltado para a classe dos PBDEs, considerados poluentes emergentes (SILVA et al., 2014; TUE et al., 2016).

2.2 ÉTERES DIFENÍLICOS POLIBROMADOS – PBDEs

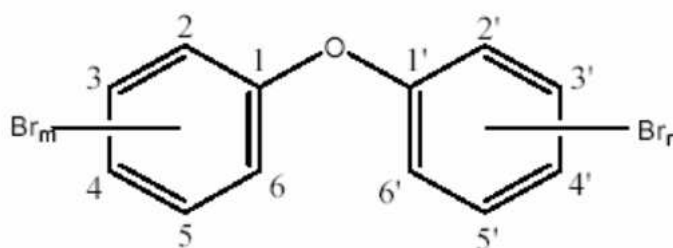
Os ecossistemas aquáticos têm sido tradicionalmente depósitos de muitas substâncias antropogênicas (CARVALHO et al., 2012; GONZÁLEZ-DONCEL et al., 2016; DALZOCHIO et al., 2016; YAMAMOTO et al., 2016) e os éteres difenílicos polibromados (PBDEs) destacam-se por sua ubiquidade em uma variedade de produtos industriais e de consumo (LIU et al., 2011; WANG et al., 2013; ARKOOSH et al., 2015) onde são amplamente utilizados como retardantes de chama (CHEN et al., 2010; LIU et al., 2011; VIGANÒ et al., 2011; GHOSH et al., 2013; YUAN et al., 2016; GANDHI et al., 2017; KANG et al., 2017; HORRI et al., 2018).

Apesar de alguns PBDEs terem sido banidos e a tendência geral de seu uso ser reduzido, relatos de sua ocorrência em uma série de matrizes, incluindo ar, água e espécies vivas que variam de plâncton a humanos, continuam aumentando (ARKOOSH et al., 2015). Dentre as três classes mais comuns de retardantes de chama, o PBDE é o composto mais comercializado atualmente. Estes compostos são amplamente utilizados em produtos eletrônicos, na indústria têxtil, materiais de construção e plásticos e sua existência no meio aquático deve-se principalmente a descargas de esgoto e deposição atmosférica (CHEN et al., 2010; SHA, 2015; DENG et al., 2016; WANG et al., 2016; ZHOU et al., 2016; ANNUNCIAÇÃO; ALMEIDA; SODRÉ, 2017; PIERONI et al., 2017; KANG et al., 2017).

Os PBDEs têm alto ponto de ebulição, baixa pressão de vapor e baixa solubilidade na água (WANG et al., 2015; WANG et al., 2016; ANNUNCIAÇÃO; ALMEIDA; SODRÉ, 2016; PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017). Além disso, sua molécula possui um núcleo éter difenil com 10 átomos de hidrogênio que podem ser substituídos por átomos de bromo (FIGURA 1), característica esta

que possibilita a formação de pelo menos 209 congêneres que são produzidos em escala industrial em três formulações de bromação: misturas de deca, octa e penta-BDE (SHA et al., 2015; YUAN et al., 2016; ANNUNCIAÇÃO; ALMEIDA; SODRÉ, 2017; PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017; LU et al., 2017). De acordo com Hakk e Letcher (2003), desses 209 possíveis congeners de PBDEs, apenas um pequeno subconjunto se destaca como resíduos contaminantes nos tecidos de organismos expostos. Neste subconjunto estão: 2,4,4'-tribromoDE (BDE-28), 2,2',4,4'-tetrabromoDE (BDE-47), 2,2',4,4',5-pentabromoDE (BDE-99), 2,2',4,4',6-pentabromoDE (BDE-100), 2,2',4,4',5,5'-hexabromoDE (BDE-153), 2,2',4,4',5,6-hexabromoDE (BDE-154), 2,2',3,4,4',5,6-heptabromoDE (BDE-183) e 2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'-decabromoDE (BDE-209).

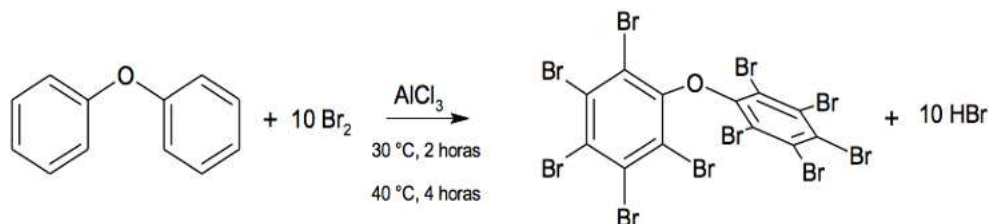
FIGURA 1 - ESTRUTURA BÁSICA DOS ÉTERES DIFENÍLICOS POLIBROMADOS (PBDE), ONDE (M + N = 1 A 10 ÁTOMOS DE BROMO)



FONTE: EPA (2006).

A bromação na síntese de PBDEs é conduzida pela adição subsequente de bromo em posições específicas, formando assim diferentes outros congeners desde os menos bromados até a formação do decabromodifenil éter (FIGURA 2) (ZHANG et al., 2014; ARKOOSH et al., 2015; NELSON et al., 2015; ZHOU et al., 2016; DENG et al., 2016; ANNUNCIAÇÃO; ALMEIDA; SODRÉ, 2017; PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017; GONZÁLEZ-DONCEL et al., 2017).

FIGURA 2- REAÇÃO SIMPLIFICADA DE SÍNTESE DO BDE-209 A PARTIR DA BROMAÇÃO DO DIFENIL ÉTER



FONTE: ANNUNCIAÇÃO et al., (2018)

A mistura de deca-BDE é composta principalmente de BDE-209, o BDE-183 é frequentemente tido como indicativo da mistura de octa-BDE e a mistura de penta-BDE consiste em tetra-BDE (predominantemente BDE-47) e penta-BDE (BDE-99 e BDE-100) (TABELA 1) (WANG et al., 2013; ANNUNCIAÇÃO; ALMEIDA; SODRÉ, 2016; PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017). Devido a condições ambientais como ausência de oxigênio (anaeróbia) e a incidência de luz, os PBDEs podem ser fototransformados pelo processo de debromação durante exposição a luz solar (WANG et al., 2015).

TABELA 1 – QUANTIDADE DOS PRINCIPAIS CONGÊNERES PRESENTE NAS MISTURAS COMERCIAIS DE PBDES

Congêneres	Penta-BDE	Octa-BDE	Deca-BDE
BDE-47	25-37%		
BDE-99	35-50%		
BDE-100	6-10%		
BDE-153	3-5%	5-10%	
BDE-154	2-4%	1-5%	
BDE-183		40%	
BDE-196		8%	
BDE-197		21%	
BDE-203		5-35%	
BDE-206			2,20%
BDE-207		7%	0,24%
BDE-208		10%	0,06%
BDE-209			97%

Os valores representam a percentagem de peso de cada congêner.

FONTE: EPA (2010).

Os éteres difenílicos polibromados apresentam grande interesse ambiental devido à sua persistência na natureza, potencial de bioacumulação e biomagnificação na cadeia trófica, além de possíveis efeitos adversos sobre os animais, incluindo o homem (LIU et al., 2011; ONDARZA et al., 2014; WANG et al., 2016; ZHOU et al., 2016; ANNUNCIAÇÃO; ALMEIDA; SODRÉ, 2017; GIRAUDO et al., 2017; GONZÁLEZ-DONCEL et al., 2017; KANG et al., 2017; LU et al., 2017; PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017; HORRI et al., 2018). Por este motivo, a Convenção de Estocolmo, um tratado para controlar e eliminar gradualmente os principais poluentes orgânicos persistentes (POPs) do planeta, incluiu recentemente, no início dos anos 2000 os PBDEs em sua lista de restrição (ZHANG, 2014; NELSON et al., 2015; WANG et al., 2015; ZHOU et al., 2016; ANNUNCIAÇÃO; ALMEIDA; SODRÉ, 2017; HORRI et al., 2018).

Pelo fato da sua toxicidade já ser conhecida, a produção de penta e octa-BDE foi banida dos países da União Europeia, Estados Unidos e Canadá, porém, continuam sendo usados sob restrições em países emergentes como China e Índia. O deca-BDE por ser menos nocivo permanece em uso na maioria dos países, havendo restrições em apenas alguns deles (CHEN et al., 2010; LIU et al., 2011; SHI et al., 2013; NELSON et al., 2015; DENG et al., 2016; GIRAUDO et al., 2017; PIERONI; LEONEL; FILLMANN, 2017) como nos Estados Unidos da América, onde foi voluntariamente eliminada pelos fabricantes em 2013 (ARKOOSH et al., 2015).

Apesar do progresso na redução global de produção e uso de PBDEs, este não tem um impacto direto na redução dos seus riscos para os ecossistemas, uma vez que o ciclo de vida dos PBDEs vai para além da sua produção devido a sua alta hidrofobicidade, recalcitrância e mobilidade entre o ar, água e partículas do solo. O potencial de exposição a estes contaminantes pode continuar por anos devido ao uso contínuo e reciclagem de produtos contendo estes contaminantes e pela contaminação do sedimento e da biota (ARKOOSH et al., 2015; ANNUNCIAÇÃO; ALMEIDA; SODRÉ, 2017).

No ambiente aquático, peixes e mamíferos marinhos têm sido reportados como tendo os níveis mais elevados de PBDEs devido à sua posição

na cadeia trófica e, porque estes animais também recuperam bio-sólidos e partículas suspensas e precipitadas em sedimentos inferiores aos quais essas substâncias lipofílicas tendem a agregar-se (GONZÁLEZ-DONCEL et al., 2016). Estes polímeros sintéticos alteram as funções fisiológicas críticas em várias espécies tanto como congêneres individuais quanto como misturas de congêneres (ARKOOSH et al., 2015).

Dos estudos já publicados, vários relataram os efeitos dos PBDEs como sendo desreguladores endócrinos, interferindo no sistema tireoidiano devido à sua semelhança estrutural com os hormônios triiodotironina (T3) e tetraiodotironina (T4), alterando o equilíbrio hormonal da tireóide, interrompendo o desenvolvimento do cérebro e também interferindo na reprodução dos peixes. Esta alteração na concentração de hormônios tireoidianos é crítica para uma série de funções fisiológicas, incluindo crescimento, comportamento e osmoregulação (SIDIQI et al., 2003; CHEN et al., 2010; ARKOOSH et al., 2015; GONZÁLEZ-DONCEL et al., 2016; WANG et al., 2016; YUAN et al., 2016; ANNUNCIAÇÃO; ALMEIDA; SODRÉ, 2017; KANG et al., 2017; HORRI et al., 2018).

A exposição a estes poluentes também está associada a alterações hepáticas, função renal, sistema imune e atividade estrogênica em peixes, o que pode interromper a reprodução alterando os níveis de vitelogenina (CHEN et al., 2010; ARKOOSH et al., 2015; GONZÁLEZ-DONCEL et al., 2016; WANG et al., 2016; ANNUNCIAÇÃO; ALMEIDA; SODRÉ, 2017; KANG et al., 2017). O mecanismo neurotóxico pelo qual agem os PBDEs ainda não está bem elucidado, porém, uma vez que desregulam os hormônios tireoidianos, interferem indiretamente no sistema nervoso (SIDIQI et al., 2003; COSTA et al., 2013).

2.2.1 Tetra-BDE (BDE-47) e Penta-BDE (BDE-99)

Os congêneres de PBDE são enumerados com base em um sistema desenvolvido para bifenilos policlorados e o número atribuído ao congênere reflete o grau de bromação dos anéis aromáticos. Entretanto, amostras ambientais apresentam apenas uma pequena porção dos 209 possíveis congêneres de PBDE, em parte devido aos congêneres específicos incluídos nas principais misturas comerciais e sua estabilidade no meio ambiente

(ARKOOSH et al., 2015). Dos diversos congêneres de PBDEs, o 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE-47), detectado em tecido animal incluindo o humano (SHA et al., 2015), já foi encontrado em elevadas concentrações em amostras ambientais e seu potencial de desregulação endócrina em organismos aquáticos é considerado de grande preocupação (CHEN et al., 2010; GONZÁLEZ-DONCEL et al., 2017; KANG et al., 2017). Este poluente pode ser bioacumulado rapidamente nas reservas lipídicas dos organismos e sua taxa de absorção é maior do que a de outros PBDEs (SHA et al., 2015).

O 2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter (BDE-99), outro congênere abundante no meio ambiente devido a sua produção em massa (SHA et al., 2015), tem sido detectado em tecidos humanos e em amostras de alimentos (ALBINA et al., 2010; ZHAO et al., 2014) e estudos reportam sua predominância tanto no fígado quanto no tecido adiposo (ZHAO et al., 2014). Embora o rim não seja órgão alvo para o BDE-99, diversos estudos tem detectado este xenobiótico em rim de humanos e de aves, porém sem informação de alterações funcionais (ALBINA et al., 2010). Este congênere, à semelhança do BDE-47, demonstrou ter ação desreguladora sobre a tireóide em zebrafish expostos via parental (WU et al., 2019). Devido à alta toxicidade e bioatividade, pesquisas em efeitos toxicológicos de PBDEs têm sido centradas principalmente em éteres difenílicos menos bromados que inclui BDE-28, BDE-47 e BDE-99 (SHA et al., 2015).

A fonte de congêneres de PBDE de baixa bromação é atribuída ao uso da mistura comercial de penta-BDE que consiste principalmente em congêneres de BDE-47 e BDE-99 (2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter) (FIGURA 3), bem como na degradação de congêneres com bromação elevada. As misturas comerciais que consistem desses congêneres menos bromados são consideradas mais tóxicas do que as misturas contendo congêneres mais bromados (ARKOOSH et al., 2015; GANDHI et al., 2017; ANNUNCIAÇÃO; ALMEIDA; SODRÉ, 2017).

FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DE: A) BDE-47 E B) BDE-99



FONTE: ANNUNCIAÇÃO; ALMEIDA; SODRÉ., (2017)

Estudos de monitoramento na bacia do rio Columbia, Washington, demonstraram presença de concentrações do somatório de PBDE acima de 13000 ng por grama de lipídios no organismo de salmão chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (SLOAN et al., 2010). Em outras pesquisas usando juvenis da mesma espécie, foram encontrados no conteúdo estomacal e no organismo inteiro, vários congêneres de PBDE sendo os congêneres menos bromados BDE-47 e BDE-99 os mais predominantes (ARKOOSH et al., 2015).

Apesar da sua natureza ubíqua, as concentrações ambientais de BDE-47 e congêneres relatados na literatura diferem significativamente. A baixa solubilidade deste composto em água sugere que as concentrações sejam na ordem de ng/L (GONZÁLEZ-DONCEL et al., 2016). Informações ecotoxicológicas para os primeiros períodos de desenvolvimento do peixe, tanto nos embriões quanto nos estágios pós-incubação, têm sido frequentemente associadas à sua biodisponibilidade na água. Estes estudos incluem frequentemente a análise química inicial da substância em soluções aquosas ou a sua acumulação em tecidos, mas geralmente ignoram a sua estabilidade na água (GONZÁLEZ-DONCEL et al., 2016).

O destino de congêneres individuais de PBDEs em peixes expostos via trófica mostrou que é altamente dependente da espécie e do próprio congênere. Estudos demonstraram que a carpa juvenil (*Cyprinus carpio*) não apresentou acumulação de BDE-99 após exposição trófica, enquanto a truta juvenil (*Salvelinus namaycush*) e o pique (*Esox lucius*) mostraram acúmulo deste congênere. Diferentes espécies de peixes também variaram em sua capacidade

de transformar BDE-99 em BDE-49 ou BDE-47, onde congêneres com 3 e 10 átomos de bromo foram acumulados em trutas juvenis com diferentes taxas de assimilação, amplamente influenciadas pela debromação, tendo o BDE-47 mostrado a maior absorção (MUNSCHY et al., 2011).

González e colaboradores (2016) concluíram que não é viável manter o BDE-47 em solução sob condições tradicionais de exposição semi-estática pois, a rota predominante de exposição e entrada de produtos químicos altamente lipofílicos para predadores no meio aquático é via alimento contaminado. Devido à sua lipofilicidade, estes compostos são principalmente encontrados associados a matéria orgânica e não à água, de modo que a exposição via trófica é considerada a principal via de exposição a PBDEs para vertebrados (CHEN et al., 2010; GONZÁLEZ-DONCEL et al., 2017; HORRI et al., 2018). Uma abordagem sobre esta via de exposição em zebrafish foi realizada pelo encapsulamento de BDE-47 em alimentos granulados tendo se observado que a concentração deste congênere foi de 0,02 ng/g de peso húmido (0,11 ng/g de lipídio) no alimento controle e 74,9 ng/g (416,1 ng/g de lipídio) no alimento encapsulado. A concentração total de BDE-47 no corpo foi de 1,9 ng/g (10,6 ng/g de lipídio) no grupo controle e 68,8 ng/g (369,9 ng/g de lipídio) no grupo que recebeu alimento encapsulado com BDE-47, mostrando a capacidade de bioacumulação deste composto durante os 40 dias de exposição oral. Entretanto esta dieta não causou efeitos significativos na sobrevivência do zebrafish (CHEN et al., 2010).

2.3 MECANISMO TOXICOCINÉTICO DOS PBDEs

Nos organismos expostos, o metabolismo é um fator importante na determinação da bioacumulação, destino, farmacocinética ou toxicocinética e toxicidade de contaminantes (HAKK e LETCHER, 2003). Estudos sobre a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação de PBDEs são restritos em grande parte a roedores (ratos e camundongos) *in vitro* e *in vivo* (NOYES e STAPLETON, 2014). No entanto, estudos tem demonstrado que a toxicocinética varia dependendo do congênere de PBDE envolvido, espécies, sexo, estágio de vida e via de exposição (COSTA et al., 2008; NOYES e STAPLETON, 2014; GENIUS et al., 2017).

Em peixes expostos a diferentes congêneres de PBDE (isolados ou mistura) por meio de diferentes vias (dieta, hidrica, sedimento, maternal) mostraram que existem diferenças específicas da espécie no que se refere a taxas de assimilação deste xenobiótico, possivelmente devido a diferenças nos sistemas de enzimas metabólicas (NOYES e STAPLETON, 2014).

Após absorção, os PBDEs são depositados no tecido lipofílico de uma variedade de animais, incluindo os peixes. Estes poluentes podem atravessar as barreiras placentária e hematoencefálica e se acumulam no Sistema nervoso central. Ademais, o fígado é também um alvo importante de deposição e toxicidade de PBDEs. A absorção de BDE-209 em alguns peixes teleósteos ocorre em uma taxa lenta, o que pode permitir maior metabolismo e eliminação quando comparado com espécies terrestres. Este congêneres em particular distribui-se preferencialmente pelos tecidos altamente perfundidos e ricos em sangue como, fígado, rim, coração e parede intestinal. Este padrão de distribuição pode ser atribuído ao tamanho desta molécula e à sua capacidade de se ligar às proteínas plasmáticas (NOYES e STAPLETON, 2014).

Acredita-se que o metabolismo dos PBDEs nos peixes teleósteos envolve vias de inserção de oxigénio e de debrominação redutiva deste composto químico (HAKK e LETCHER, 2003; SIDIQI et al., 2003), uma importante via metabólica comprovada na carpa comum (*C. carpio*), vairão (*P. promelas*), truta arco-íris, truta do lago (*S. namaycush*), salmão chinook (*O. tshawytscha*) e zebrafish (*D. rerio*) (HAKK e LETCHER, 2003). Todavia, continua incerto o papel dos sistemas enzimáticos específicos envolvidos na catalização do processo de biotransformação. Uma das vias sugeridas é pela atividade das enzimas iodotironina deionidase (Dio), que são enzimas ligadas à membrana, expressas na membrana plasmática e no retículo endoplasmático e que regulam os níveis de hormônios da tireóide nos invertebrados. Nos peixes existem três isoformas desta enzima (Dio 1, 2 e 3) que compartilham homologia funcional com isoformas Dio de mamíferos. A conversão da tiroxina (T4) em hormônio genomicamente ativo triiodotironina (T3), é catalisada pela clivagem do iodo da meta-posição do anel fenil externo da T4. À semelhança da T4, a debrominação redutiva de PBDEs em peixes também é denominada por meta-clivagem de bromo, sugerindo um possível papel das Dio na catalização da debrominação de PBDEs. Estudos em peixes sugerem que PBDEs podem ser substratos que competem

com os hormônios tireoidianos pela atividade da enzima Dio. Apesar destas evidências, são necessários estudos adicionais para entender o potencial papel de outras possíveis redutases ainda não descritas (NOYES e STAPLETON, 2014).

Adicionalmente, os PBDEs podem ter ação indutora ou inibidora sobre enzimas metabolizadoras de xenobióticos de fase I, mediadas pelo citocromo P450 (CYP), CYP 1A1 e CYP 1A2, alterando a atividade do microsomo hepático EROD. Estas enzimas da fase I estão envolvidas no primeiro estágio de detoxificação de xenobióticos e na transformação enzimática de um agente tóxico lipossolúvel em solúvel em água (SIDIQI et al., 2003; COSTA et al., 2008; DALZUCHIO et al., 2016; KROON et al., 2017). Um número bastante reduzido de estudos desenvolvidos em peixes *in vivo* e *in vitro* mostraram fraca indução e inibição da atividade de etoxirresorufina-O-desetilase (EROD), um biomarcador da CYP1A e indutor do receptor aril hidrocarbono (AhR) após exposição a congêneres individuais de PBDE (NOYES e STAPLETON, 2014).

Até o momento, existem poucas pesquisas do papel da uridina difosfato-glucuronosil transferase (UDPGTs) no metabolismo de PBDEs em peixes, embora esta enzima seja importante fator catalisador do metabolismo da fase II em peixes (COSTA et al., 2008; NOYES e STAPLETON, 2014). Entretanto, pensa-se que esta enzima quando induzida metaboliza os PBDEs no fígado. Sabe-se também que os PBDEs podem regular positivamente a UDPGTs transformando substratos endógenos e exógenos em compostos mais polares e solúveis em água, o que aumenta a taxa de conjugação e excreção de T4 (SIDIQI et al., 2003; COSTA et al., 2008). Os seus metabólitos (OH-PBDEs) podem se ligar à proteína transportadora dos hormônios da tireóide (transferrina), reduzindo os níveis de T4 consequentemente interferindo com o transporte normal do hormônio, resultando na diminuição dos níveis totais de tiroxina (SIDIQI et al., 2003). Dois estudos mostraram uma diminuição de mRNA de genes que codificam UDPGT1ab em larvas de zebra fish expostas a BDE-209 e UGT1 em bacalhau juvenil do atlântico (*G. morhua*) exposto a BDE-47. Esse declínio pode ser uma resposta aos níveis reduzidos de hormônios tireoideanos (THs), pois os UDPGTs estão envolvidos no metabolismo dos THs (NOYES e STAPLETON, 2014).

A rota de eliminação do PBDE em peixes não está clara, porém, estudos sugerem que sua excreção ocorra por via biliar e fecal. No entanto, incertezas continuam quanto as semi-vidas de eliminação (NOYES e STAPLETON, 2014).

2.4 *Oreochromis niloticus* COMO MODELO DE ESTUDO

Em estudos ambientais, espécies indicadoras de contaminação são utilizadas como os primeiros indicadores de efeito do estresse causado por contaminantes (ZHOU et al., 2016), permitindo mensurar de forma eficiente o grau de exposição em organismos aquáticos a xenobióticos (DALZUCHIO et al., 2016). No processo de escolha da espécie indicadora é importante que algumas características sejam observadas, como: sobrevivência da espécie em ambientes saudáveis e apresentação de resistência relativa ao contaminante, abundância da espécie no ambiente, facilidade da espécie em adaptar-se aos ensaios laboratoriais e o tamanho do animal, pois deve possibilitar a obtenção de material biológico suficiente para garantir a realização das análises propostas no estudo (ZHOU et al., 2016). O nível trófico da espécie a ser utilizada também deve ser avaliado, uma vez que espécies que ocupam níveis tróficos superiores geralmente são mais representativas, podendo fornecer informações relacionadas aos fenômenos de bioacumulação e biomagnificação (ZHOU et al., 2016).

Peixes têm sido considerados excelentes modelos aquáticos para estudos de biomonitoramento (DALZUCHIO et al., 2016; KUMAR et al., 2017) por apresentarem várias das características acima citadas, além de apresentarem mecanismos semelhantes aos encontrados nos vertebrados superiores, como mamíferos, e por habitarem os mais diversos ambientes dentro dos ecossistemas aquáticos, estando sob constante exposição hídrica ou trófica (OLIVEIRA RIBEIRO et al.; 2006; MELA et al., 2010; GENTÈS et al., 2019).

A tilápia tem se tornado a segunda fonte alimentar em peixe de água doce do mundo, sendo que o gênero *Oreochromis* está entre os mais importantes peixes comercialmente produzidos na aquacultura mundial, com mais de 75 países produtores (FERREIRA et al., 2015). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (FIGURA 4), faz parte da família Cichlidae e é um peixe nativo da África, distribuído amplamente, pode persistir em um habitat altamente poluído e tem o

potencial para desenvolvimento como monitor biológico de poluição ambiental (CARVALHO et al., 2012). Além das características mencionadas, a tilápia possui alta tolerância a variações de salinidade, temperatura e adaptabilidade a sistemas de criação fornecendo um suporte biológico de informações importantes na detecção dos efeitos associados à qualidade da água (SANTANA et al., 2018).

FIGURA 4 - TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)



FONTE: O AUTOR (2018)

2.5 BIOMARCADORES

O nível de um determinado contaminante na água pode ser estimado mediante análise físico-química. Contudo, este método não é suficiente para descrever os efeitos adversos decorrentes da mistura complexa de produtos químicos presentes em quaisquer locais contaminados como também não prediz o potencial efeito na biota (AMEUR et al., 2015; DALZUCHIO et al., 2016; KUMAR et al., 2017). Para complementar este método faz-se uso de biomarcadores para avaliar o nível de contaminação em corpos d'água através de respostas quantitativas e efeitos adversos crônicos causados pela poluição da água (VAN DER OOST et al., 2003; DALZUCHIO et al., 2016).

Biomarcadores são respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas como, alterações bioquímicas, fisiológicas, celulares, histopatológicas ou comportamentais, integrando sistemas biológicos operacionais em diferentes níveis de organização biológica (CARVALHO et al., 2012; DALZUCHIO et al., 2016). Eles podem ser classificados em três tipos: (1) de Exposição, que podem ser usados para confirmar e avaliar a exposição individual ou de grupo, para uma substância em particular, estabelecendo uma

ligação entre a exposição externa e a quantificação da exposição interna, (2) de Efeito, que podem ser usados para documentar as alterações pré-clínicas ou efeitos adversos à saúde decorrente da exposição e absorção da substância química e (3) de Susceptibilidade, que permitem elucidar o grau de resposta da exposição provocada nos indivíduos (AMORIM, 2003; VAN DER OOST et al., 2003; DALZUCHIO et al., 2016; KROON et al., 2017).

Um estudo de toxicologia ambiental ideal faz o uso de uma abordagem de um conjunto de biomarcadores, permitindo uma análise mais adequada na detecção de respostas biológicas desencadeadas por poluentes (YAMAMOTO et al., 2016; KUMAR et al., 2017). Esta ferramenta está sendo cada vez mais reconhecida mundialmente para a avaliação dos impactos da poluição no ambiente aquático e o uso combinado de um conjunto deles (multibiomarcadores), pode indicar exposição a contaminantes e quantificar seu impacto nos organismos vivos, com o fornecimento de uma avaliação mais abrangente e integrada dos efeitos bioquímicos e celulares causados por xenobióticos ambientais (SALEH e MARINE, 2016).

2.5.1 Biomarcadores genotóxicos

Vários xenobióticos liberados na natureza apresentam potencial genotóxico para os organismos vivos, razão pela qual vários estudos objetivaram entender o impacto dos danos no DNA após exposições a estes poluentes (LACAZE et al., 2010). Este parâmetro avalia as alterações no material genético induzidas por um químico genotóxico, alterações estas que podem conduzir a uma cascata de eventos que podem ser observadas desde o nível estrutural do DNA culminando com danos no DNA que resultariam em efeitos mutacionais e hereditários como o câncer (VAN DER OOST et al., 2003; YAMAMOTO et al., 2016; KROON et al., 2017).

A nível das células sanguíneas em interfase, podem ser avaliados danos cromossômicos através da presença de micronúcleos ou alterações morfológicas nucleares (DALZUCHIO et al., 2016). Estes micronúcleos, são cromossomos inteiros ou parciais que durante a divisão celular (mitose), não foram incorporados dentro do núcleo da célula mãe. Em peixes, de entre outros tecidos, o sangue é utilizado para a realização do teste de micronúcleos, uma

vez que eritrócitos de peixes são nucleados e este teste tem sido amplamente utilizado como biomarcador em análises ambientais (RAMSDORF, 2007).

Para avaliação da integridade do DNA, o ensaio cometa tem sido de eleição pois este é eficiente para detectar dano ao DNA, que, dentre vários agentes causadores, pode ser induzido por xenobióticos. Dos principais testes para monitoramento e avaliação de genotoxicidade em ambientes impactados, para além do ensaio cometa, destacam-se também o teste do micronúcleo píscico e a formação de adutos de DNA (RAMSDORF, 2007).

2.5.2 Biomarcadores de desregulação endócrina

A literatura científica atual tem se concentrado e se preocupado com a liberação de compostos no ambiente aquático devido ao potencial desses compostos na desregulação endócrina (DE) de espécies aquáticas e consequentemente da fisiopatologia humana (MULDOON e HOGAN, 2016). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) e vários autores, DE é um composto exógeno que pode interferir na síntese, secreção, transporte, metabolismo, ligação a receptores ou eliminação de hormônios endógenos, alterando os sistemas endócrino e homeostático (ANKLEY et al., 2009; DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2009; LAURETTA et al., 2019). Atualmente, a definição mais ampla para os desreguladores endócrinos abrange agentes que causam alterações na reprodução ou no desenvolvimento por meio de efeitos diretos nos eixos hipotálamo-hipofisário-tiroidal ou hipotálamo-hipofisário-gonadal de vertebrados (ANKLEY et al., 2009).

A maioria dos desreguladores endócrinos são substâncias constituídas por compostos sintéticos e naturais que possuem a capacidade de interferir nos receptores hormonais de ligação do sistema endócrino, atuando como agonistas totais, parciais ou invertidos ou como antagonistas (CARNEVALI et al., 2018). Uma vez liberados no ambiente os DEs exercem seus efeitos nos organismos expostos alterando os níveis de esteróides endógenos (andrógenos ou estrógenos) e tireóide, através da ativação ou inibição dos receptores hormonais alvo ou das vias esteroidogénicas alterando os níveis de transcrição dos principais genes esteroidogénicos (MULDOON e HOGAN, 2016; XU et al., 2017b; CARNEVALI et al., 2018; AYOBACHAN et al., 2020). Os desreguladores

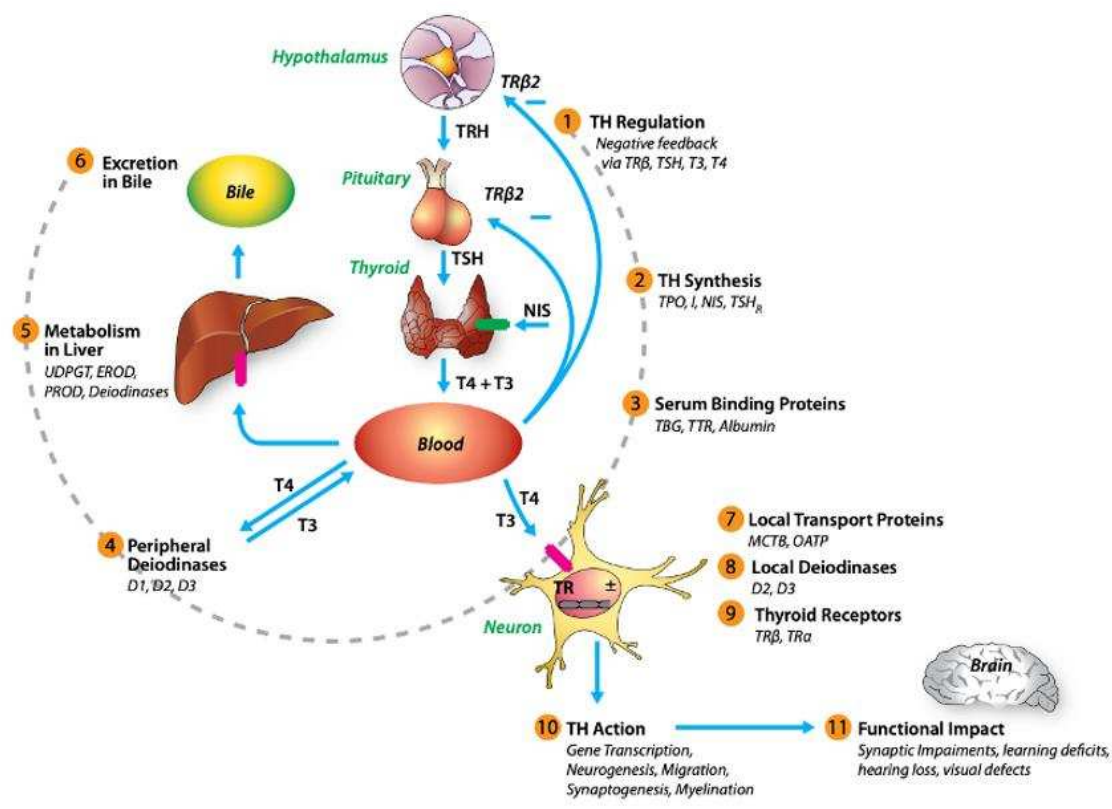
endócrinos podem ainda causar alterações histopatológicas nos tecidos alvo, atraso ou desenvolvimento alterado, falha reprodutiva e comportamento anormal nos peixes e ter implicações em nível populacional como o colapso e a recuperação da população de peixes (MULDOON e HOGAN, 2016; CARNEVALI et al., 2018; AYOBAN et al., 2020).

Entre os desreguladores endócrinos podemos citar os pesticidas, herbicidas, metais pesados, contaminantes plásticos, compostos farmacêuticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e os retardantes de chamas (CARNEVALI et al., 2018; AYOBAN et al., 2020). Estudos têm demonstrado uma grande preocupação com efeitos potencialmente adversos dos PBDEs, principalmente os efeitos de desregulação endócrina no sistema tireoidiano e nos níveis de hormônios esteróides sexuais (SIDDIQI et al., 2003; YU et al., 2015; PINSON et al., 2016).

Nos peixes, a Vitelogenina (VTG), uma fosfoglicoproteína precursora da gema de ovo, é utilizada como um biomarcador de desregulação endócrina que interfere na síntese de estrógeno e é sintetizada no fígado de vertebrados ovíparos, com envolvimento de hormônios como hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), testosterona (T) e 17 β -estradiol (E2) (YU et al., 2015; OLIVARES-RUBIO et al., 2015; MIN et al., 2018). Ademais, os níveis sanguíneos de hormônios esteróides específicos ou proteínas normalmente induzidas pelos referidos hormônios, podem ser indicativos de efeitos reprodutivos decorrentes de desregulações endócrinas (VAN DER OOST et al., 2003). Entretanto, substâncias hepatotóxicas podem perturbar significativamente a síntese desta proteína (AYOBAN et al., 2020) ou ativar o receptor de estrógeno e induzir a síntese da mesma (OLIVARES-RUBIO et al., 2015). A VTG é expressa em fêmeas durante o período reprodutivo (ANKLEY e JOHNSON, 2004) e estudos realizados evidenciaram respostas feminizadas em peixes que incluem, produção de proteínas femininas (VTG) em machos e alterações no desenvolvimento de células germinativas (produção de oócitos) no testículo, em peixes expostos a descargas de efluentes (SOFFKER e TYLER, 2012; WHO, 2012). Yamamoto et al. (2017) demonstraram eficácia da VTG e dos hormônios esteróides como biomarcadores de desregulação endócrina através da observação de seus efeitos estrogênico ou anti-estrogênico em peixes que se encontravam em ambientes impactados.

Além disso, os hormônios tireoidianos (TH) são mediadores importantes de processos fisiológicos, de desenvolvimento e comportamentais que incluem crescimento, transição metamórfica, osmorregulação e reprodução, agindo em conjunto com outros hormônios. Os níveis circulantes de TH são controlados centralmente tanto pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HPT) quanto em nível periférico pelas enzimas Dio, entre outros reguladores (WHO, 2012; NOYES e STAPLETON, 2014). Em peixes, os PBDEs demonstraram desregular o sistema tireoidiano em vários pontos ao longo do eixo HPT central e nos tecidos periféricos (FIGURA 5) (WHO, 2012; NOYES e STAPLETON, 2014), estudos estes centrados no BDE-47 e BDE-209 (NOYES e STAPLETON, 2014). Espécies de peixes expostas às misturas de congêneres de PBDEs ou à BDEs isoladamente por vias trófica, hidrica, intravenosa ou maternal, mostraram diferentes respostas como redução e/ou aumento dos níveis de T4 e T3 circulantes no plasma, transcritos de mRNA elevado e/ou reduzido e aumento da expressão de mRNA de genes que codificam as enzimas dio 1, dio 2 e dio 3 (NOYES e STAPLETON, 2014).

FIGURA 5 - POSSÍVEIS LOCAIS DE AÇÃO DE CONTAMINANTES AMBIENTAIS NO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TIREÓIDE (HPT)



FONTE: WHO (2012)

2.5.3 Biomarcadores bioquímicos

Os biomarcadores bioquímicos têm um potencial considerável para medir os efeitos dos produtos químicos, uma vez que são as primeiras respostas sensíveis observadas (CARVALHO et al., 2012). A avaliação das respostas bioquímicas constitui uma abordagem promissora visto que refletem respostas rápidas como, alterações na atividade das enzimas de biotransformação, antioxidantes e acetilcolinesterase, prejudicando os processos fisiológicos no organismo exposto aos contaminantes (VAN DER OOST et al., 2003).

As enzimas de biotransformação são enzimas que participam na metabolização de moléculas lipossolúveis em metabólitos hidrossolúveis tornando-as mais facilmente excretáveis. Estas enzimas encontram-se principalmente no fígado e os processos de biotransformação ocorrem em duas fases (I e II), as quais são independentes entre si (KROON et al., 2017).

Entretanto, dependendo da lipossolubilidade da molécula a ser biotransformada, poderão ocorrer as duas fases, somente a fase I ou somente a fase II. A metabolização de moléculas pode gerar moléculas mais reativas (mais tóxicas) que o composto parental devido à sua bioativação durante a fase I. Para a maioria dos xenobióticos, as reações de fase I envolvem reações de oxidação, redução e hidrólise catalisadas por enzimas monooxigenases microsomais que incluem as isoenzimas CYPs 1, 2 e 3 do citocromo P450 (VAN DER OOST et al., 2003; KROON et al., 2017). Na fase II da biotransformação (segunda fase de detoxificação) ocorrem reações de conjugação dos metabólitos da fase I ou do xenobiótico na sua forma original à molécula de glutathione reduzida (GSH) ou ao ácido glucurônico (DALZUCHIO et al., 2016; KROON et al., 2017).

O metabolismo normal de moléculas de oxigênio molecular (O_2) nos organismos produz espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais compreendem: o radical aniônico superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH\cdot$) (AMEUR et al., 2015; YAMAMOTO et al., 2016). Estas moléculas podem ser prejudiciais às células, especialmente o radical hidroxil, que é um potente agente oxidante podendo inativar enzimas, causar danos em lipídios e na molécula de DNA culminando com morte celular (VAN DER OOST et al., 2003; XIONG et al., 2018). Contudo, para garantir a homeostase celular, os organismos desenvolveram o sistema antioxidante que reduz as EROs, previnem e reparam danos em lipídeos oxidados e mantem o estado redox de moléculas importantes para a redução de EROs (como a glutathione reduzida) causada pelo estresse oxidativo (VAN DER OOST et al., 2003). Este estresse ocorre quando o sistema antioxidante não consegue compensar os níveis de EROs gerados, ocorrendo desequilíbrios no sistema. Deste modo, enzimas e outras moléculas do sistema de defesa antioxidante têm sido utilizadas como biomarcadores para avaliação de estresse oxidativo (PISOSCHI e POP, 2015; KROON et al., 2017).

Diante desta situação, as enzimas antioxidantes exercem sua atividade de defesa dos organismos contra as espécies reativas de oxigênio, atividade esta extremamente importante na detoxificação de radicais para moléculas não-reativas (VAN DER OOST et al., 2003), e a glutathione s-transferase (GST) destaca-se como sendo uma enzima chave da fase II, protegendo os tecidos dos danos oxidativos (DALZUCHIO et al., 2016). Neste sentido, sistemas de defesa

(enzimas antioxidantes) que tendem a inibir a formação de oxirradicais, são ativados, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR), sendo considerados biomarcadores de estresse oxidativo (VAN DER OOST et al., 2003; DALZUCHIO et al., 2016; KROON et al., 2017).

A SOD degrada o radical aniônico superóxido formando oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este peróxido embora pouco reativo, tem a capacidade de atravessar membranas biológicas, podendo ser convertido em radical hidroxila portanto, mais reativo, através da reação de Fenton (VAN DER OOST et al., 2003; KROON et al., 2017). A enzima CAT é responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio dentro dos peroxissomos, formando oxigênio e água. A atividade reduzida destas duas enzimas favorece o acúmulo de O_2 e H_2O_2 e esses radicais aceleram a conversão de Fe^{3+} para Fe^{2+} , sendo este último, substrato do radical hidroxila para gerar uma reação que leva ao aumento da peroxidação lipídica (AMEUR et al., 2015).

Dentre os danos causados a biomoléculas devido à ocorrência de estresse oxidativo, tem-se, por exemplo, a lipoperoxidação ou peroxidação lipídica (LPO) e a carbonilação de proteínas (PCO). A LPO é um dos principais danos causados pelo estresse oxidativo. Neste caso, as EROs reagem com os fosfolípidios das membranas celulares, sequestrando elétrons e desestruturando as membranas, causando aumento de permeabilidade. De um modo mais intenso, a lipoperoxidação pode ocasionar a ruptura da membrana com consequente morte celular (VAN DER OOST et al., 2003; SOUZA et al., 2019).

A PCO compreende danos sobre cadeias laterais de proteínas. A carbonilação pode ser decorrente de oxidação protéica pela reação de grupamentos cetonas e aldeídos provenientes de reações com EROs. Este processo pode levar à mudanças conformacionais de proteínas, além da perda da função de algumas enzimas (VAN DER OOST et al., 2003).

Para avaliar os efeitos de neurotoxicidade em estudos de biomonitoramento a atividade da acetilcolinesterase (AChE) é mensurada (KROON et al., 2017). A inibição da atividade desta enzima no cérebro e no músculo pode indicar a ocorrência de efeitos neurotóxicos, uma vez que ela atua na hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético nas fendas sinápticas das sinapses colinérgicas e junções musculares, impedindo o fornecimento contínuo

de impulsos nervosos, consequentemente, contribuindo para uma correta transmissão destes impulsos, coordenação motora e memória (YAMAMOTO et al., 2016; XIONG et al., 2018). Estudos demonstram a associação de pesticidas organofosforados e carbamatos à inibição da AChE onde, foi observada diminuição da atividade desta enzima em tecido muscular de peixes de locais poluídos com organofosforados e no tecido cerebral de peixes de rios poluídos (VAN DER OOST et al., 2003). Em relação aos PBDEs, Chen et al., (2017) demonstraram alterações no desenvolvimento e funções neuronais, organização muscular, desempenho visual e comportamento natatório em estudo desenvolvido com larvas de *zebrafish*, após exposição ao BDE-209.

2.5.4 Biomarcadores morfológicos

A análise histopatológica é outra ferramenta importante de avaliação de lesões em órgãos alvo e pode auxiliar na interpretação de outros biomarcadores como, de estresse oxidativo, danos no DNA e neurotoxicidade. Uma vantagem prática em usar histopatologia em peixes para avaliação ambiental deve-se ao fato de ser possível realizar análise de vários órgãos quando comparada com outros biomarcadores (AMEUR et al., 2015). As alterações observadas nesses órgãos podem indicar tanto danos reversíveis como uma hemorragia quanto danos irreversíveis como ocorrência de neoplasias e necrose, indicando o grau de comprometimento dos diferentes tecidos e órgãos (BERNET et al., 1999). Para estas análises, o fígado é o órgão-alvo de eleição pois desempenha papel importante no metabolismo e excreção de xenobióticos. Enquanto que o rim desempenha o papel principal de via de excreção de metabólitos de xenobióticos, e recebe a maior proporção de sangue pós-branquial, sendo um órgão propenso a sofrer alterações histopatológicas sob estresse ambiental (MELA et al., 2007; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2006; YAMAMOTO et al., 2016).

A biologia reprodutiva de peixes frente a exposição de poluentes ambientais pode ser abordada de diferentes aspectos como, mediante o estudo do desenvolvimento gonadal e do desenvolvimento ovocitário (ADEOGUN et al., 2016; CHUKWUKA et al., 2019). Alterações reportadas em gônadas de peixes nas quais estão inclusas degeneração das células germinativas nos ovários ou nos testículos, desorganização de lóbulos seminíferos, degeneração testicular,

são evidências de desregulação endócrina durante a diferenciação sexual. Esses estudos realizados atribuem esta desregulação à sensibilidade dos peixes aos contaminantes ambientais que por sua vez induzem a toxicidade (CHUKWUKA et al., 2019).

3. JUSTIFICATIVA

Os PBDEs são identificados como uma nova classe de poluentes orgânicos, com risco ecológico devido a sua toxicidade, bioacumulação e distribuição global. Assim, se faz necessário que saibamos os reais riscos destes poluentes aos organismos aquáticos.

Apesar de já existirem equipamentos com grande sensibilidade, estes não identificam substâncias emergentes, considerando em suas análises somente aquelas listadas nos bancos de dados ou cujos padrões são considerados. Desta maneira, estudos envolvendo biomarcadores apresentam vantagens em relação ao acompanhamento tradicional (métodos analíticos), pois podem detectar efeitos sub letais nos organismos, fornecem uma análise integrada das respostas dos organismos assim como dos riscos ecológicos em ambientes aquáticos.

4. HIPÓTESE

A exposição de peixes juvenis da espécie *O. niloticus* a concentrações ambientais relevantes de éteres difenílicos polibromados (PBDEs) durante 80 dias altera as respostas endócrina, genotóxica, bioquímica e histopatológica.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial tóxico do BDE-47 e BDE-99 em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizando diferentes biomarcadores, após exposição subcrônica, via trófica.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

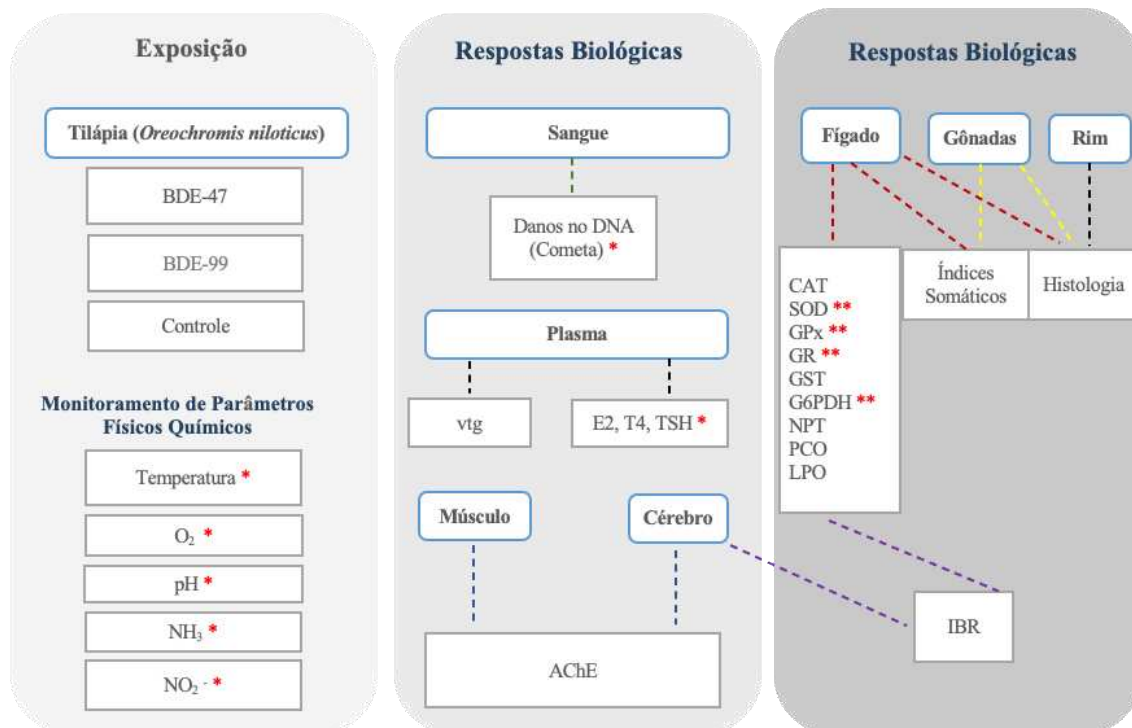
- Avaliar se a condição de saúde da tilápia é influenciada pela exposição trófica ao BDE-47 e 99;
- Avaliar se as respostas genotóxicas no sangue estão associadas a presença de BDE-47 e 99;
- Avaliar se o pontecial de desregulação endócrina destes poluentes está associado a alteração dos níveis de vitelogenina, hormônio esteróide 17- β estradiol e hormônios tiroideanos T4 e TSH no plasma sanguíneo de *O. niloticus*;
- Avaliar se as concentrações dos BDEs utilizadas nas exposições são capazes de alterar a função enzimática e o sistema de defesa antioxidante nos tecidos alvo de *O. niloticus*;
- Analisar o grau de integração das respostas dos biomarcadores bioquímicos nas diferentes exposições aos BDEs 47 e 99;
- Avaliar se a exposição ao BDE-47 e 99 produz alterações morfológicas a nível do fígado, rim e gônadas e ultraestruturais no fígado.

6. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), sob o certificado número 1200, processo 23075.219442/2017-14.

O resumo esquemático da metodologia utilizada nos dois experimentos é apresentado a seguir. * análises realizadas somente no experimento com BDE-

47 e ** análises realizadas para BDE-99. As análises sem marcação foram realizadas para os dois congêneres de BDE. Os processos metodológicos detalhados são descritos nos Anexos.



6.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Antes das análises, todos os dados foram testados para normalidade e homocedasticidade das variâncias usando *Shapiro-Wilk* e *Levene's test*, respectivamente. Os dados paramétricos foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida de Dunnet ou *post-test* de Tukey, respectivamente. Os dados não paramétricos foram analisados por Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas aquelas cujo p foi menor ou igual a 0,05 ($p \leq 0,05$).

REFERÊNCIAS

- ADEOGUN, A. O., ONIBONOJE, K., IBOR, O. R., OMIWOLE, R. A., CHUKWUKA, A. V., UGWUMBA, A. O., UGWUMBA, A. A. A., ARUKWE, A. Endocrine-disruptor molecular responses, occurrence of intersex and gonado-histopathological changes in tilapia species from a tropical freshwater dam (Awba Dam) in Ibadan, Nigeria. **Aquatic Toxicology**, v. 174, p. 10-21, 2016.
- ALBINA, M. L., ALONSO, V., LINARES, V., BELLÉS, M., SIRVENT, J. J., DOMINGO, J. L., SÁNCHEZ, D. J. Effects of exposure to BDE-99 on oxidative status of liver and kidney in adult rats. **Toxicology**, v. 271, p. 51-56, 2010.
- AL-ZAIDAN, A. S., AL-SARAWI, H. A., MASSOUD, M. S., AL-ENEZI, M., SMITH, A. J., BIGNELL, J. P., GREEN, M. J., ASKEM, C., BOLAM, T. P. C., BARBER, J. L., BERSUDER, P., LYONS, B. P. Histopathology and contaminant concentrations in fish from Kuwaits marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 100, p. 637-645, 2015.
- AMEUR, W. B., MEGDICHE, Y. E., DE LAPUENTE, J., BARHOUMI, B., TRABELSI, S., ENNACEUR, S., CAMPS, L., SERRET, J., RAMOS-LÓPEZ, D., GONZALEZ-LINARES, J., TOUIL, S., DRISS, M. R., BORRÁS, M. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. **Chemosphere**, v. 135, p. 67-74, 2015.
- AMORIM, L. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, 2003.
- ANKLEY, G. T., JOHNSON, R. D. Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. **Institute for Laboratory Animal Research Journal**, v. 45, n. 4, p. 469-483, 2004.
- ANKLEY, G. T., BENCIC, D. C., BREEN, M. S., COLLETTE, T. W., CONOLLY, R. B., DENSLOW, N. D., EDWARDS, S. W., EKMAN, D. R., GARCIA-REYERO, N., JENSEN, K. M., LAZORCHAK, J. M., MARTINOVIC, D., MILLER, D. H., PERKINS, E. J., ORLANDO, E. F., VILLENEUVE, D. L., WANG, R-L., WATANABE, K. H. Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. **Aquatic Toxicology**, v. 92, p. 168-178, 2009.
- ANNUNCIAÇÃO, D. L. R., ALMEIDA, F. V., SODRÉ, F. F. Method development and validation for the determination of polybrominated diphenyl ether congeners in Brazilian aquatic sediments. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 43-48, 2017.
- ANNUNCIAÇÃO, D. L. R., ALMEIDA, F. V., HARA, E. L.Y., GRASSI, M. T., SODRÉ, F. F. Éteres difenílicos polibromados (PBDE) como contaminantes persistentes: Ocorrência, comportamento no ambiente e estratégias analíticas. **Química Nova**, v. 41, n. 7, p. 782-795, 2018.

ARKOOSH, M. R., GAEST, A. L. V., STRICKLAND, S. A., HUTCHINSON, G. P., KRUPKIN, A. B., DIETRICH, J. P. Dietary exposure to individual polybrominated diphenyl ether congeners BDE-47 and BDE-99 alters innate immunity and disease susceptibility in juvenile chinook salmon. **Environmental Science & Technology**, v. 49, p. 6974-6981, 2015.

AYOBAHAN, S. U., EILEBRECHT, S., BAUMANN, L., TEIGELER, M., HOLLERT, H., KALKHOF, S., EILEBRECHT, E., SCHAFERS, C. Detection of biomarkers to differentiate endocrine disruption from hepatotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) using proteomics. **Chemosphere**, v. 240, p. 124970, 2020.

BARBEE, N.C., GANIO, K., SWEARER, S.E. Integrating multiple bioassays to detect and assess impacts of sublethal exposure to metal mixtures in an estuarine fish. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p.244–55, 2014.

BARNI, M. F. S., ONDARZA, P. M., GONZALEZ, M., DA CUÑA, R., MEIJIDE, F., GROSMAN, F., SANZANO, P., LO NOSTRO, F. L., MIGLIORANZA, K. S. B. Persistent organic pollutants (POPs) in fish with diferente feeding habits inhabiting a shallow lake ecosystem. **Science of the Total Environment**, v. 550, p. 900-909, 2016.

BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, P. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Disease**, v. 22, p. 25-34, 1999.

BOSSI, R., VORKAMP, K., SKOV, H. Concentration of organochlorine pesticides, polybrominated diphenyl ethers and perfluorinated compounds in the atmosphere of Noeth Greenland. **Environmental Pollution**, v. 17, p. 4-10, 2016.

CARNEVALI, O., SANTANGELI, S., FORNER-PIQUER, I., BASILI, D., MARADONNA, F. Endocrine-disrupting chemicals in aquatic environment: What are the risks for fish gametes? **Fish Physiology Biochemistry**, v.44, n. 6, p. 1561-1576, 2018.

CARVALHO, C. D. S., BERNUSSO, V. A., DE ARAÚJO, H. S. S., ESPÍNDOLA, E. L. G., FERNANDES, M. N. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 89, p. 60– 69, 2012.

CAZENAVE, J., BACCHETTA, C., PARMA, M.J., SCARABOTTI, P.A., WUNDERLIN, D.A. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environmental Pollution**, v. 157, p. 3025–3033, 2009.

CHEN, T-H., CHENG, Y-M., CHENG, J-O., CHOU, C-T., HSIAO, Y-C., KO, F-C. Growth and transcriptionl effect of dietary 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicilogy and Environmental Safety**, v. 73, p. 377-383, 2010.

CHEN, L., WANG, X., ZHANG, X., LAM, P. K. S., GUO, Y., LAM, J. C. W., ZHOU, B. Transgenerational endocrine disruption and neurotoxicity in zebrafish larvae

after parental exposure to binary mixtures of decabromodiphenyl ether (BDE-209) and lead. **Environmental Pollution**, v. 230, p. 96-106, 2017.

CHUKWUKA, A., OGBEIDE, O., UHUNAMURE, G. Gonad pathology and intersex severity in pelagic (*Tilapia zilli*) and benthic (*Neochanna diversus* and *Clarias gariepinus*) species from a pesticide-impacted agrarian catchment, south-south Nigeria. **Chemosphere**, v. 225, p. 535-547, 2019.

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

COSTA, L. G., DE LAAT, R., TAGLIAFERRI, S., PELLACANI, C. A mechanistic view of polybrominated diphenyl ether (PBDE) developmental neurotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 230, n. 2, p. 282-294, 2013.

DALZIOCHIO, T., RODRIGO, G. Z. P., PETRY, I. E., GEHLEN, G., da SILVA, L. B. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. **International Aquatic Research**, v. 8, p. 283-298, 2016.

DENG, D., LIU, J., XU, M., ZHENG, G., GUO, J., SUN, G. Uptake, translocation and metabolism of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in seven aquatic plants. **Chemosphere**, v. 152, p. 360-368, 2016.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E., BOURGUIGNON, J-P., GIUDICE, L. C., HAUSE, R., PRINS, G. S., SOTO, A. M., ZOELLER, R. T., GORE, A. C. Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 4, p. 293-342, 2009.

ENGLISH, K., TOMS, L-M. L., GALLAN, C., MUELLER, J. F. BDE-209 in the Australian Environment: Desktop review. **Journal of Hazardous Material**, v. 320, p. 194-203, 2016.

EPA, Environmental Protection Agency. **Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs)**. Project Plan, 2006.

EPA, Environmental Protection Agency. **Emerging Contaminants – Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDE) and Polybrominated Biphenyls (PBB)**, 2010.

FERREIRA DA CRUZ, N., PIRES, J., MARQUES, R.C. A Measuring the sustainability of urban water services. **Environmental Science & Policy**, v. 54, p. 142–151, 2015.

FREIRE, C. A., SOUZA-BASTOS, L. R., CHIESSE, J., TINCANI, F. H., PIACINI, L. D. S., RANDI, M. A. F., PRODOCIMO, V., CESTARI, M. M., SILVA-DE-ASSIS, H. C., ABILHOA, V., VITULE, J. R. S., BASTOS, L. P., DE OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A. A multibiomarker evaluation of urban, industrial, and agricultural exposure of small characins in a large freshwater basin in southern Brazil. **Environmental**

Science and Pollution Research, v. 22, p. 13263-13277, 2015.

GANDHI, N., GEWURTZ, S. B., DROUILLARD, K. G., KOLIC, T., MACPHERSON, K., REINER, E. J., BHAVSAR, S. P. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Great Lakes fish: Levels, patterns, trends and implications for human exposure. **Science of the Total Environment**, v. 576, p. 907-916, 2017.

GENIUS, S. K., BIRKHOLZ, D., GENIUS, S. J. Human excretion of polybrominated diphenyl ethers flame retardants: Blood, urine, and sweat study. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-14, 2017.

GENTÈS, S., COQUERY, M., VIGOUROUX, R., HANQUIEZ, V., ALLARD, L., MAURY-BRACHET, R. Application of European water framework directive: Identification of reference sites and bioindicator fish species for mercury in tropical freshwater ecosystems (French Guiana). **Ecological Indicators**, v. 106, p. 105468, 2019.

GHOSH, R., LOKMAN, P. M., LAMARE, M. D., METCALF, V. J., BURRITT, D. J., DAVISON, W., HAGEMAN, K. J. Changes in physiological responses of an Antarctic fish, the emerald rock cod (*Trematomus bernacchii*), following exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). **Aquatic Toxicology**, v. 128-129, p. 91-100, 2013.

GIRAUDO, M., DOUVILLE, M., LETCHER, R. J., HOUDE, M. Effects of food-borne exposure of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to emerging brominated flame retardants 1,2-bis (2,4,6-tribromophenoxy) ethane and 2-ethylhexyl-2,3,4,5-tetrabromobenzoate. **Aquatic Toxicology**, v. 186, p. 40-49, 2017.

GIULIVO, M., CAPRI, E., KALOGIANNI, E., MILACIC, R., MAJONE, B., FERRARI, F., ELJARRAT, E., BARCELÓ, D. Occurrence of halogenated and organophosphate flame retardants in sediment and fish samples from three European river basins. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 782-791, 2017.

GLOCK, G. E., MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Journal of Biochemistry**, v. 55, p. 400-408, 1953.

GONZÁLEZ-DONCEL, M., CARBONELL, G., GARCÍA-MAURIÑO, J. E., SASTRE, S., BELTRÁN, E. M., ANAYA, C. G., TORIJA, C. F. effects of dietary 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) exposure in growing medaka fish (*Oryzias latipes*). **Aquatic Toxicology**, v. 178, p. 141-152, 2016.

GONZÁLEZ-DONCEL, M., SASTRE, S., CARBONELL, G., BELTRÁN, E. M., ANAYA, C. G., GARCÍA-MAURIÑO, J. E., TORIJA, C. F. Bioaccumulation, maternal transfer and effects of dietary 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) exposure on medaka fish (*Oryzias latipes*) offspring. **Aquatic Toxicology**, v. 192, p. 241-250, 2017.

HADDAOUI, I., MAHJOUB, O., MAHJOUB, B., BOUJELBEN, A., DI BELLA, G. Occurrence and distribution of PAHs, PCBs, and chlorinated pesticide in Tunisian soil irrigated with treated wastewater. **Chemosphere**, v. 146, p. 195-205, 2016.

HAKK, H., LETCHER, R. J. Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants-a review. **Environment International**, v. 29, p. 801-828, 2003.

HORRI, K. ALFONSO, S., COUSIN, X., MUNSCHY, C., LOIZEAU, V., AROUA, S., BÉGOUT, M-L., ERNANDE, B. Fish life-history traits are affected after chronic dietary exposure to an environmentally realistic marine mixture of PCBs and PBDEs. **Science of the Total Environment**, v. 610-611, p. 531-545, 2018.

IQBAL, M., SYED, J. H., KATSOYIANNIS, A., MALIK, R. N., FAROOQI, A., BUTT, A., LI, J., ZHANG, G., CINCINELLI, A., JONES, K. C. Legacy and emerging flame retardants (FRs) in the freshwater ecosystem: A review. **Environmental Research**, v. 152, p. 26-42, 2017.

KANG, H-M., LEE, Y. W., KIM, B-M., KIM, I-C., JEONG, C-B., LEE, J-S. Adverse effects of BDE-47 on *in vivo* developmental parameters, thyroid hormones, and expression of hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis genes in larvae of the self-fertilizing fish *Kryptolebias marmoratus*. **Chemosphere**, v. 176, p. 39-46, 2017.

KHAN, M.M., ZAMAN, K., IRFAN, D., AWAN, U., ALI, G., KYOPHILAVONG, P., SHAHBAZ, P., NASEEM, I. Triangular relationship among energy consumption, air pollution and water resources in Pakistan. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p.1375-1385, 2016.

KODAVANTI, P. R. S., STOKER, T. E., FENTON, S. E. Brominated flame retardants. **Reproductive and Developmental Toxicology**, v. 38, p. 681-710, 2017.

KONO, Y. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide-dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 186, p. 189-195, 1978.

KROON, F., STRETEN, C., HARRIES, S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. **Plos One**, v. 12, n. 4, 2017.

KUMAR, N., KRISHNANI, K. K., GUPTA, S. K., SINGH, N. P. Cellular stress and histopathological tools used as biomarkers in *Oreochromis mossambicus* for assessing metal contamination. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 49, p. 137-147, 2017.

LACAZE, E., GEFFARD, O., BONY, S., DEVAUX, A. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 700, p. 32-38, 2010

LAURETTA, R., SANSONE, A., SANSONE, M., ROMANELLI, F., APPETECCHIA, M. Endocrine disrupting chemicals: Effects on endocrine glands. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 178, 2019.

LIU, Y-P., LI, J-G., ZHAO, Y-F., WEN, S., HUANG, F-F., WU, Y-N. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and indicator polychlorinated biphenyls (PCBs) in marine fish from four areas of China. **Chemosphere**, v. 83, p. 168-174, 2011.

LU, Q., JÜRGENS, M. D., JOHNSON, A. C., GRAF, C., SWEETMAN, A., CROSSE, J., WHITEHEAD, P. Persistent Organic Pollutants in sediment and fish in the River Thames Catchment (UK). **Science of the Total Environment**, v. 576, p. 78-84, 2017.

LUNDEBYE, A-K., LOCK, E-J., RASINGER, J. D., NØSTBAKKEN, O. J., HANNISDAL, R., KARLSBAKK, E., WENNEVIK, V., MADHUN, A. S., MADSEN, L., GRAFF, I. E., ØRNSRUD, R. Lower levels of Persistent Organic Pollutants, metals and the marine omega 3-fatty acid DHA in farmed compared to wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Environmental Research**, v. 155, p. 49-59, 2017.

LYCHE, J. L., ROSSELAND, C., BERGE, G., POLDER, A. Human health risk associated with brominated flame-retardants (BFRs). **Environment International**, v. 74, p. 170-180, 2015.

MA, S., YU, Z., ZHANG, X., REN, G., PENG, P., SHENG, G., FU, J. Levels and congener profiles of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in breast milk from Shanghai: Implication for exposure route of high brominated BDEs. **Environment International**, v. 42, p. 72-77, 2012.

MELA, M.; RANDI, M. A. F., VENTURA, D. F., CARVALHO, C.E.V., PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 68, p.426-435, 2007.

MELA, M.; CAMBIER, S.; MESMER-DUDONS, N.; LEGEAY, A.; GROTZNER, S.R.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; FIX VENTURA, D.; MASSABUAU, J.C. Methylmercury localization in *Danio rerio* retina after trophic and subchronic exposure: a basis for neurotoxicology. **Neurotoxicology**, v. 31, p. 448–453, 2010.

MELA, M., GRÖTZNER, S.R., LEGEAY, A., MESMER-DUDONS, N., MASSABUAU, J-C., FIX VENTURA, D., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Morphological evidence of neurotoxicity in retina after methylmercury exposure. **Neurotoxicology**, v.33, p. 407-415, 2012.

MIN, B. H., KIM, B-M., KIM, M., KANG, J-H., JUNG, J-H. Plasma biomarkers in juvenile marine fish provide evidence for endocrine modulation potential of organotin compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 210, p. 35-43, 2018.

MULDOON, B. M., HOGAN, N. S. Biomarker responses to estrogen and androgen exposure in the brook stickleback (*Culaea inconstans*): A new bioindicator species for endocrine disrupting compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 180, p. 1-10, 2016.

MUNSCHY, C., HÉAS-MOISAN, K., TIXIER, C., OLIVIER, N., GASTINEAU, O., LE BAYON, N., BUCHET, V. Dietary exposure of juvenile common sole (*Solea solea* L.) to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): Part 1. Bioaccumulation and elimination kinetics of individual congeners and their debrominated metabolites. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 229-237, 2011.

MWAKALAPA, E. B., MMOCHI, A. J., MÜLLER, M. H. B., MDEGELA, R. H., LYCHE, J. L., POLDER, A. Occurrence and levels of persistent organic pollutants (POPs) in farmed and wild marine fish from Tanzania. A pilot study **Chemosphere**, v. 191, p. 438-449, 2018.

NAING, N. N., LI, S. F. Y., LEE, H. K. Micro-solid phase extraction followed by thermal extraction coupled with gas chromatography-mass selective detector for the determination of polybrominated diphenyl ethers in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1458, p. 25-34, 2016.

NELSON, C.; DROUILLARD, K.; CHENG, K.; ELLIOTT, J.; ISMAIL, N. Accumulation of PBDEs in an urban river otter population and an unusual finding of BDE-209. **Chemosphere**, v. 118, p. 322-328, 2015.

NOYES, P. D., STAPLETON, H. M. PBDE flame retardants-Toxicokinetics and thyroid hormone endocrine disruption in fish. **Endocrine Disruptors**, v. 2, 2014.

NUGEGODA, D., KIBRIA, G. Effects of environmental chemicals on fish thyroid function: Implications for fisheries and aquaculture in Australia. **General and Comparative Endocrinology**, v. 144, p. 40-53, 2017.

OLIVARES-RUBIO, H. F., DZUL-CAAMAL, R., GALLEGOS-RANGEL, M. E., MADERA-SANDOVAL, R. L., DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, M. L., GARCÍA-LATORRE, E., VEGA-LÓPEZ, A. Relationship between biomarkers and endocrine-disrupting compounds in wild *Girardnichthys viviparus* from two lakes with different degrees of pollution. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 3, p. 664-85, 2015.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., FILIPAK NETO, F., MELA, M., SILVA, P. H., RANDI, M. A. F., RABITTO, I. S., PELLETIER, E. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. **Environmental Research**, v. 101, p. 74-80, 2006.

ONDARZA, P. M., GONZALEZ, M., FILLMANN, G., MIGLIORANZA, K. S. B. PBDEs, PCBs and organochlorine pesticides distribution in edible fish from Negro River basin, Argentinean Patagonia. **Chemosphere**, v. 94, p. 135-142, 2014.

PAPACHLIMITZOU, A., BARBER, J. L., LOSADA, S., BERSUDE, P., LAW, R. J.

A review of the analysis of novel brominated flame retardants. **Journal of Chromatography A**, v. 1219, p. 15-28, 2012.

PIERONI, M. C., LEONEL, J., FILLMANN, G. Retardantes de chama bromados: Uma revisão. **Química Nova**, v. 40, p. 317-326, 2017.

PINSON, A., BOURGUIGNON, J. P., PARENT, A. S. Exposure to endocrine disrupting chemicals and neurodevelopmental alterations. **Andrology**, p. 1-17, 2016.

PISOSCHI, A.M., POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

RAMSDORF, W. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri - UFPR)**. Tese (Doutorado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, p. 1-109, 2007.

RÍOS, J. M., LANA, N. B., CIOCCO, N. F., COVACI, A., BARRERA-ORO, E., MOREIRA, E., ALTAMIRANO, J. C. Implications of biological factors on accumulation of persistent organic pollutants in Antarctic notothenioid fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 145, p. 630-639, 2017.

SALEH, Y. S., MARINE, M-A. S. Use of *Arius thalassinus* fish in a pollution biomonitoring study, applying combined oxidative stress, hematology, biochemical and histopathological biomarkers: A baseline field study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 106, p. 308-322, 2016.

SANTANA, M. S., YAMAMOTO, F. Y., SANDRINI-NETO, L., NETO, F. F., ORTOLONI-MACHADO, C. F., RIBEIRO, C. A. O., PRODOCIMO, M. M. Diffuse sources of contamination in freshwater fish: Detecting effects through active biomonitoring and multi-biomarker approaches. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, p. 173-181, 2018.

SHA, J.; WANG, Y.; CHEN, H.; WANG, M.; WANG, H.; LI, X. Using population demographic parameters to assess impact of two polybrominated diphenyl ethers (BDE-47, BDE-209) on the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 119, p. 106-115, 2015.

SHI, Z.; JIAO, Y.; HU, Y.; SUN, Z.; ZHOU, X.; FENG, J.; LI, J.; WU, Y. Levels of tetrabromobisphenol A, hexabromocyclododecanes and polybrominated diphenyl ethers in human milk from the general population in Beijing, China. **The Science of the Total Environment**, p. 452-453, 2013.

SIDIQQI, M. A., LAESSING, R. H., REED, K. D. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): New pollutants-old diseases. **Clinical Medicine and Research**, v. 1, n. 4, p. 281-290, 2003.

SIES, H., KOCH, O. R., MARTINO, E., BOVERIS, A. Increased biliary glutathione

disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v. 103, p. 287-290, 1979.

SILVA., M. V.; RODRIGUES, A. M.; CARDOSO, V. V.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M. J.; ALMEIDA, C. M. Retardantes de chama bromados: Éteres difenílicos polibromados (PBDEs). **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p. 67-78, 2014.

SLOAN, C. A., ANULACION, B. F., BOLTON, J. L., BOYD, D., OLSON, O. P., SOL, S. L., YLITALO, G. M., JOHNSON, L. L. Polybrominated diphenyl ethers in out migrant juvenile Chinook salmon from the lower Columbia river and estuary and Puget Sound, Washington. **Archive of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 403-424, 2010.

SOFFKER, M., TYLER, C. R. Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish-a critical review on effects and possible consequences. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 42, n. 8, p. 653-668, 2012.

SOUZA, T. L. **Avaliação funcional do Sistema reprodutor masculino de camundongos swiss após múltiplas formas de exposição ao manganês**. 127 f. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

TRABALÓN, L., VILAVERTE, L., DOMINGO, J. L., POCURULL, E., BORRULL, F., NADAL, M. Human exposure to brominated flame retardants through the consumption of fish and shellfish in Tarragona Country (Catalonia, Spain). **Food and Chemical Toxicology**, v. 104, p. 48-56, 2017.

TUE, N. M.; GOTO, A.; TAKAHASHI, S.; ITAI, T.; ASANTE, K. A.; KUNISUE, T.; TANABE, S. Release of chlorinated, brominated and mixed halogenated dioxin-related compounds to soils from open burning of e-waste in Agbogbloshie (Accra, Ghana). **Journal of hazardous materials**, v. 302, p. 151-7, 2016.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p. 57-149, 2003.

VERHAERT, V., NEWMARK, N., D'HOLLANDER, W., COVACI, A., VLOK, W., WEPENER, V., ADDO-BEDIAKO, A., JOOSTE, A., TEUCHIES, J., BLUST, R., BERVOETS, L. Persistent organic pollutants in the Olifants River Basin, South Africa: Bioaccumulation and trophic transfer through a subtropical aquatic food web. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 792-806, 2017.

VIGANÒ, L.; ROSCIOLI, C.; GUZZELLA, L. Decabromodiphenyl ether (BDE-209) enters the food web of the River Po and is metabolically debrominated in resident cyprinid fishes. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 4966-4972, 2011.

WANG, J., LIN, Z., LIN, K., WANG, C., ZHANG, W., CUI, C., LIN, J., DONG, Q., HUANG, C. Polybrominated diphenyl ethers in water, sediment, soil, and

biological samples from different industrial areas in Zhejiang, China. **Journal of Hazardous Material**, v. 197, p. 211-219, 2011.

WANG, X., XI, B., HUO, S., SUN, W., PAN, H., ZHANG, J., REN, Y., LIU, H. Characterization, treatment and releases of PBDEs and PAHs in a typical municipal sewage treatment plant situated beside an urban river, East China. **Journal of Environmental Science**, v. 25, p. 1281-1290, 2013.

WANG, X-T., CHEN, L., WANG, X-K., ZHANG, Y., ZHOU, J., XU, S-Y., SUN, Y-F., WU, M-H. Occurrence, profiles, and ecological risks of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in river sediments of Shanghai, China. **Chemosphere**, v. 133, p. 22-30, 2015.

WANG, G., PENG, J., XU, X., ZHANG, D., LI, X. Polybrominated diphenyl ethers in sediments from the Southern Yellow Sea: Concentration, composition profile, source identification and mass inventory. **Chemosphere**, v. 144, p. 2097-2105, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **State of the science of endocrine disrupting chemicals**. p. 91-108, 2012.

WU, L., LI, Y., RU, H., XIE, H., YAO, F., NI, Z. Parental exposure to 2,2',4,4'-tetrabrominated diphenyl ethers (BDE-99) causes thyroid disruption and developmental toxicity in zebrafish. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 372, p. 11-18, 2019.

XIONG, Q., SHI, Y., LU, Y., PAN, K., DAKHIL, M. A., ZHANG, L., XIAO, Y. Sublethal or not? Responses of multiple biomarkers in *Daphnia magna* to single and joint effects of BDE-47 and BDE-209. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p. 164-171, 2018.

XU, F., TAY, J-H., COVACI, A., PADILLA-SÁNCHEZ, J. A., PAPADOPOULOU, E., HAUG, L. S., NEELS, H., SELLSTRÖM, U., DE WIT, C. A. Assessment of dietary exposure to organohalogen contaminants, legacy and emerging flame retardants in a Norwegian cohort. **Environment International**, v. 102, p. 236-243, 2017a.

XU, Q., WU, D., DANG, Y., YU, L., LIU, C., WANG, J. Reproduction impairment and endocrine disruption in adult zebrafish (*Danio rerio*) after waterborne exposure to TBOEP. **Aquatic Toxicology**, v. 182, p. 163-171, 2017b.

YAMAMOTO, F. Y., PEREIRA, M. V. M., LOTTERMANN, E., SANTOS, G. S., STREMEL, T. R. O., DORIA, H. B., GUSSO-CHOUERI, P., CAMPOS, S. X., ORTOLANI-MACHADO, C. F., CESTARI, M. M., NETO, F. F., AZEVEDO, J. C. R., RIBEIRO, C. A. O. Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguaçu River (Southern Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 18111-18128, 2016.

YAMAMOTO, F. Y., GARCIA, J. R. E., KUPSCO, A., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Vitellogenin levels and others biomarkers show evidences of endocrine

disruption in fish species from Iguaçu river - Southern Brazil. **Chemosphere**, v. 186, p. 88-99, 2017.

YU, L., LIU, C., CHEN, Q., ZHOU, B. Endocrine disruption and reproduction impairment in zebrafish after long-term exposure to DE-71. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 1354-1362, 2014.

YUAN, H., JIN, J., BAI, Y., LI, Q., WANG, Y., HU, J. Concentration and distributions of polybrominated diphenyl ethers and novel brominated flame retardants in tree bark and human hair from Yunnan Province, China. **Chemosphere**, v. 154, p. 319-325, 2016.

ZHANG, W. F. Determination of polybrominated diphenyl ethers in river water by combination of liquid-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Chinese Chemical Letters**, abr. 2014.

ZHANG, M.; BUEKENS, A.; LI, X. Brominated flame retardants and the formation of dioxins and furans in fires and combustion. **Journal of hazardous materials**, v. 304, p. 26-39, 2016.

ZHOU, Y.; CHEN, Q.; DU, X.; YIN, G.; QIU, Y.; YE, L.; ZHU, Z.; ZHAO, J. Occurrence and trophic magnification of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and their methoxylated derivatives in freshwater fish from Dianshan Lake, Shanghai, China. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 932-938, 2016.

CAPÍTULO I

Manuscript: Effects of trophic 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) exposure in *Oreochromis niloticus*: a multiple biomarkers analysis

Effects of trophic 2,2', 4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) exposure in *Oreochromis niloticus*: a multiple biomarkers analysis

Joelma Leão-Buchir ^{a, b}, Nilce Mary Turcatti Folle ^a, Tugstênio Lima de Souza ^a, Patricia Manuitt Brito ^a, Elton Celton Oliveira ^c, Aliciane de Almeida Roque ^a, Wanessa Algarte Ramsdorf ^d, Luís Fernando Fávaro ^a, Juan Ramón Esquivel García^{†e}, Luíse Esquivel ^e, Francisco Filipak Neto ^a, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro ^a, Maritana Mela Prodocimo^{a*}.

^a Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19031, CEP 81531-970, Curitiba-PR, Brazil

^b Departamento de Toxicologia Molecular e Ambiental, Centro de Biotecnologia-Universidade Eduardo Mondlane (CB-UEM), Maputo, Mozambique.

^c Programa de Pós-graduação em Agroecossistemas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, CEP 82660-000, Dois Vizinhos, PR. Brazil

^d Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba, CEP 81280-340Curitiba, PR, Brazil.

^e Estação de Piscicultura Panamá, Est. Geral Bom Retiro. Paulo Lopes - SC, CEP 88490-000, Brazil.

*Corresponding Author: Laboratório de Toxicologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil.

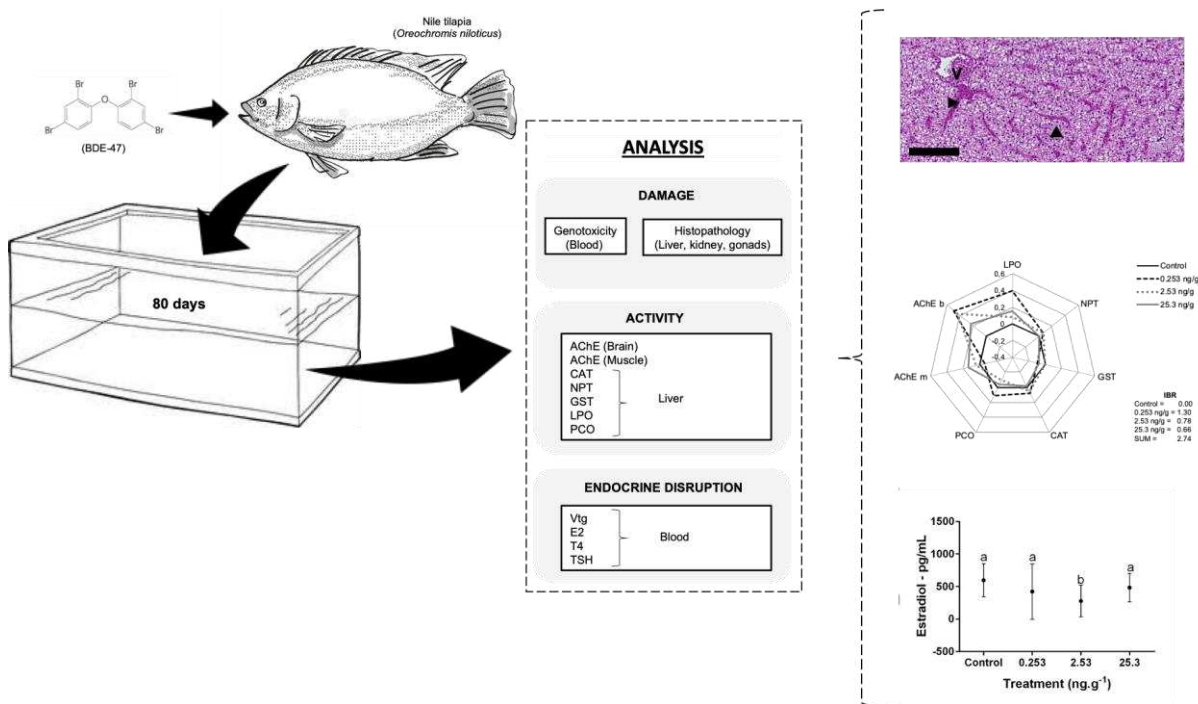
E-mail adress: maritana.mela@gmail.com (Maritana Mela Prodocimo)

Phone: +55 41984086171

[†] in memorian.

*Este manuscrito foi submetido à revista Environmental Toxicology and Pharmacology

GRAPHICAL ABSTRACT



Abstract

Brominated flame retardants are substances used in various consumer products to increase fire resistance. Particularly, polybrominated diphenyl esters (PBDEs) are the most used in flame spread control due to its efficiency and low cost. These compounds are emerging environmental contaminants with few toxicological data concerning harmful effects to environmental health, being a concern for the scientific community. The 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) is one of the most prevalent PBDE congener found in the environment and due to high stability and lipophilicity, it tends to be absorbed and accumulated by aquatic biota. Thus, this study evaluated the effects of BDE-47 on the health of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia) fish. The animals were randomly distributed into four groups and orally exposed to three tested doses of BDE-47 (0, 0.253, 2.53, 25.3 ng. g⁻¹) every 10 days, for 80 days. Multiple biomarkers, including somatic and growth indexes, genotoxic, endocrine disruption, biochemical and histopathological biomarkers were considered. According to the current experimental BDE-47 affected the hepatosomatic (HSI) and gonadosomatic (GSI) index in female when compared to males and the condition factor (K) by intermediate dose in both sexes. The levels of estradiol and T4 are affected by reducing and increasing respectively, but the vitellogenin production was not modulated in male individuals. Equally, changes in AChE, GST, LPO and histopathology were observed while the integrated biomarker response index suggests that the lowest dose of BDE-47 compromised the activity of antioxidant enzymes. The present study highlighted that oral exposure to BDE-47 in environmental concentrations is toxic to *O. niloticus* and show that the use of multiple biomarkers is an important tool in ecotoxicology studies and biomonitoring programs.

Keywords: Flame retardants, Endocrine disruption, Oxidative stress, Genotoxicity, Histopathology.

1. Introduction

Advances in science and industry have contributed to increased production of new materials, leading to the generation and use of a variety of synthetic polymers for a wide range of products ([Annuniação et al., 2017](#); [Pieronia et al., 2017](#); [Sun et al., 2021](#)). These intense human activities lead to pollutant emissions in the aquatic ecosystems increasing potentially the risk of exposure to biota and human populations ([Barbee et al., 2014](#); [Groh et al., 2019](#)).

In the last decade, the use of brominated flame retardants (BFRs) was consolidated as important component of industrial products such as electronics, electrical equipment, textiles, infant products, plastics, or building materials to reduce its flammability ([Díaz-Jaramillo et al., 2016](#); [Lee et al., 2020](#); [Li et al., 2020](#); [Margolis et al., 2020](#); [Montalbano et al., 2020](#); [Pardo et al., 2020](#); [Thornton et al., 2016](#); [Yu et al., 2015](#)). Among the BRFs, the polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are the most utilized as a new synthetic polymer ([Annuniação et al., 2017](#); [Pardo et al., 2020](#)). These brominated compounds are not strongly chemically bounded to the products, and so are released to the environment during production, use or during the products disposal ([Chalifour & Tam, 2016](#); [Li et al., 2020](#); [Wu et al., 2020](#)). Additionally, due to the high stability in the environment and lipophilicity these chemicals are bioaccumulated and biomagnified in the food chain endangering the biota and human health ([Barbee et al., 2014](#); [Díaz-Jaramillo et al., 2016](#); [Liu et al., 2020](#); [Pardo et al., 2020](#)).

PBDEs are ubiquitous and toxic compounds, and according to [Staskal et al. \(2006\)](#), [Shi et al. \(2009\)](#) and [Sun et al. \(2019\)](#), its occurrence in biota and human populations is continuously increasing despite of the tendency to reduce the use. In fish, several studies described the effects of PBDEs on development, behavior, reproduction and gonadal development ([González-Doncel et al., 2016](#); [Han et al., 2015](#); [Huang et al., 2015](#)); while in humans the exposure occurs by inhalation of household dust or ingestion of contaminated food ([Margolis et al., 2020](#); [Montalbano et al., 2020](#); [Pardo et al., 2020](#); [Yang et al., 2017](#)). According to [Li et al. \(2020\)](#) the effects in mammals are related with reproductive, development, neurobehavioral and thyroid aspects.

The 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47), a tetra-BDE congener, is one of the most prevalent PBDE found in the environment (Díaz-Jaramillo et al., 2016; Thornton et al., 2016; Montalbano et al., 2020). Numerous field studies have exploited and demonstrated the toxicity of BDE-47 (Arkoosh et al., 2017); (Po & Chiu, 2018) but few were described about the risk of exposure of BDE-47 in fish. The majority of studies in fish were during the early stage of development such as in larvae of *Pimephales promelas* (Thornton et al., 2016) *Kryptolebias marmoratus* (Kang et al., 2017) and *Danio rerio* (Glazer et al., 2018; Zhao et al., 2016). Despite of the studies reported by Liu et al. (2019) with *Oncorhynchus mykiss*, where an increased activity of enzymes from detoxification and antioxidant systems are described, the studies of BDE-47 in juveniles or adult fish are still scarce.

The Nile tilapia (*O. niloticus*) has wide distribution, high market demand, easy breeding, fast growth and tolerance to varied habitats (Moustafa et al., 2020) and so widely used in biomonitoring of aquatic ecosystems impacted by different sources of contamination. In the present investigation individuals of the Nile tilapia were orally and subchronic exposed to BDE-47, in order to evaluate the effects of environmental doses. This is one of the few studies where juvenile to adults fish are orally exposed to BDE-47 where the toxic effects are evaluated by multiple biomarkers.

2. Material and method

2.1. Fish

Sixty-four juvenile specimens of *O. niloticus* with approximately 35 g was obtained at Panama Pisciculture Farm (Paulo Lopes city, Santa Catarina State, Brazil) (www.pisciculturapanama.com.br) and transported to the laboratory of Federal University of Paraná (UFPR). Prior to the experiment, the animals were randomly distributed into 8 tanks (150 L) with a flow-through system containing submerged pump, controlled water conditions (dissolved O₂, temperature, pH, nitrite and ammonia) and fed. The filter system was composed of quartzite for biological filtration, activated charcoal and zeolite for nitrite and ammonia removal, including a Perlon™ type blanket for mechanical filtration of residues. Fish were acclimated during 14 days before the experiments. All procedures were

approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) of UFPR, protocol number 1200.

2.2. Experimental design

After acclimation, three groups (8 fish/group in duplicate) were exposed to BDE-47 (0.253, 2.53 and 25.3 ng. g⁻¹), including a fourth group as control. The fish were anaesthetized with MS222 (0.12% ethil-ester-3-aminobenzoic acid in water, Sigma/Aldrich®) weighed and orally exposed to BDE-47 or canola oil (control group) (0.2 mL/100 g body weight control group) every 10 days during 80 days (8 doses). The BDE-47 intermediated tested dose (2.53 ng. g⁻¹) was based in concentrations detected in muscle of environmentally exposed fish ([Arkoosh et al., 2017](#); [Zhou et al., 2020](#)). During acclimation and the exposure period, fish were fed twice a day with commercial pellets (Poytara®) enhanced with carnitine, digestive enzymes and probiotics. Water quality parameters as temperature, dissolved oxygen, pH, ammonia and nitrite were monitored daily to ensure good experimental conditions. The tanks were cleaned every 2 days by siphoning and 25% of water were renewed every time. Ten days after the last gavage (80th day), the animals were anesthetized for measure of total weigh and length, and blood sampling from caudal vein with heparinized syringe. Fish were then euthanized by medullar section, the sex was confirmed by visual analysis, the liver, kidney, gonads, brain and muscle were collected. Sample of liver, muscle, brain and plasma were stored at -80 °C for biochemical or molecular analysis, while kidney, liver and gonads samples were chemically preserved for histopathological studies.

2.3. Condition factor index (K)

The Fulton condition factor index (K) was used to assess the physiological state, since it determines how well the fish was dealing with the environmental stress. The index expresses the relationship between length and weight and was calculated as follow: $K = (\text{fish weight}/\text{fish length}^3) \times 100$ ([Ríos et al., 2017](#)).

2.4. Somatic indexes

Hepatosomatic (HS) and Gonadosomatic (GS) indexes were measured to assess quantitatively the energetic reserves available for liver and the degree of gonad development for reproductive activity stage, respectively. Both indexes reflect the relationship between organ weight and body mass. $HSI = (\text{liver wet weight/fish weight}) \times 100$ and $GI = (\text{gonad weight/fish weight}) \times 100$ (Ríos et al., 2017).

2.5. Endocrine disruption analysis

After sampling, the blood was immediately centrifuged (6000 g, 4 °C, 10 min) and the plasma was obtained and stored at - 80 °C for posterior vitellogenin analysis or hormone detection.

2.5.1. Vitellogenin levels

Fish plasma was thawed on ice and protein concentration was determined (Bradford, 1976). Then, 50 µg of total plasma protein were denaturized in sample buffer (1 M Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, glycerol, bromophenol blue, 0.05% β-mercaptoethanol), separated with 8% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. The proteins were transferred to a nitrocellulose membrane in buffer (5 mM Tris-base, 192 mM glycine, 0.037% SDS, 20% methanol) at a constant current of 100V for 60 min at 4 °C. The membrane was blocked in 5% non-fat dry milk diluted in TBST buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature. After washing three times with TBS, the membrane was incubated with non-commercial anti-*Geophagus brasiliensis* vitellogenin antibodies (1:20.000) in blocking solution at 4°C for 16 h. Then, the membrane was washed with TBST buffer and incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase (1:4000, Bio-Rad®) at room temperature for 60 min. The membrane was washed three times in TBST and the reaction was detected through Pierce chemiluminescent kit (Thermo scientific®) on the membrane exposed to a sensitive x-ray film (Kodak™) for 10 min (Yamamoto et al., 2017).

2.5.2. Hormone levels

The plasma concentration of 17 β -estradiol (E2), total thyroxine (T4) and thyroid-stimulating hormone (TSH) was determined with ELISA kits (ALPCO®), according to the manufacturer's instructions.

2.6. Biochemical analysis

The liver was homogenized in ice-cold Tris-buffer (20 mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA, pH 7.6, 1 mM PMSF), and brain and muscle were homogenized in potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5) using a microhomogeneizer. The homogenate was centrifuged for 20 min at 12,000 g at 4°C. The supernatants were recovered and total protein concentration were measured ([Bradford, 1976](#)). Catalase ([Aebi, 1984](#)) (with minor modifications) and glutathione S-transferase ([Keen et al., 1976](#)) (with minor modifications) activities, non-protein thiols ([Sedlak and Lindsay, 1968](#)), lipid peroxidation ([Jiang et al., 1992](#)) and protein carbonylation ([Levine et al., 1994](#)) were measured in the liver. Acetylcholinesterase activity ([Ellman et al., 1961](#)) was measured in the muscle and brain.

2.6.1. Integrated biomarker response (IBR) index

The integrated biomarker response (IBR) index, described by [Beliaeff and Burgeot \(2002\)](#) and modified by [Sanchez et al. \(2013\)](#), was calculated to assess the set of responses of biochemical biomarkers (enzymatic and non-enzymatic) in relation to the different treatments, simplifying data analysis and interpretation. The index considers the differences observed in the results of treated groups in relation to the control group ([Sanchez et al., 2013](#)). Baseline values for each biomarker (T0) were used as reference values. For each individual biomarker, the ratio was obtained between the average value from each treatment and the respective average value of the baseline (T0), which was transformed into log (Yi). Then, the general mean (μ) and standard deviation (s) were calculated, considering the Yi values of a given biomarker. The Yi values were standardized by the equation: $Z_i = (Y_i - \mu) / s$. The difference between Zi and

Z0 (T0) was used to define the deviation index of the biomarker (A). To obtain the IBR index, the value of (A) for each biomarker was calculated, with the IBR being established by adding the absolute values of (A) (Vieira et al., 2016).

2.7. Genotoxic analysis

The DNA strand breaks was analyzed by the comet assay performed with the blood, according to Singh et al. (1988), modified for erythrocytes by (Ferraro et al., 2004).

2.8. Histopathological analysis

Samples of liver, kidney and gonads were fixed in ALFAC solution (70% ethanol, 4% formaldehyde, 5% glacial acetic acid) for 16 h, dehydrated in a graded ethanol series, diaphanized in xylol and included in Paraplast® (Sigma) in a Micron® Tissue Processor (Thermo Fisher Scientific). Sections of 5 µm thick were obtained, stained with hematoxylin/eosin and the images registered by an Olympus BX51 Microscope from the Center for Advanced Fluorescence Technologies (CTAF-UFPR). The Lesion Index based in histopathological findings was calculated according to Bernet et al. (1999) modified by Mela et al. (2013). Briefly, the lesions and alterations in tissue are classified in categories according to biological importance as: 1 - minimal, easily reversible; 2 - moderate, reversible in most cases; and 3 - marked, generally irreversible); and severity establishing scores from 0 to 6. The lesion index for each group of lesions in liver or kidney was calculated using the formula: $I_{org.} = \sum_{rp} \sum_{alt} (a \times w)$, where: *org* represent the organ (constant), *rp* the reaction pattern, *alt* the alteration, *a* the score value and *w* the importance factor of lesion. Still in histological analysis, we performed a count of Melano-macrophage centers (MMCs), where after routine staining with hematoxylin and eosin, 15 fields on liver tissues were randomly chosen. The numbers of MMCs in each field were counted according to Rabitto et al. (2005), in sections using an eyepiece graticule coupled to a light microscope, an average was taken and results were expressed per mm².

2.9. Data analysis

Normality and homoscedasticity of variances were verified through Shapiro-Wilk and Levene's tests, respectively. Parametric data were analyzed by one-way or two-way ANOVA followed by Dunnett or Tukey *post-test*, respectively. Nonparametric data was analyzed by Kruskal-Wallis followed by Dunn test. Differences were considered statistically significant when p values < 0.05 .

3. Results

3.1. Experimental conditions

During the experiment was observed a mortality of 6.4% in all groups. The physic chemical parameters of water (mean $\pm$ standard deviation) were as follows: temperature (25.08 ± 1.95 °C), dissolved oxygen (4.60 ± 1.29 mg/L), pH (6.37 ± 0.18), ammonia (2.49 ± 1.77 ppm) and nitrite (0.98 ± 0.15 ppm).

3.2. Somatic indexes

The exposure to BDE-47 did not affect the hepatosomatic (HSI) (Fig. 1A) or gonadosomatic (GSI) (Fig. 1B) indexes in female and male individuals. However, a significant increase in HSI and GSI was observed in females in all treated groups when compared to males. Nevertheless, there was no interaction between both factors (treatments and sex) for the indexes. The condition factor (K) was significantly higher in individuals exposed to 2.53 ng. g^{-1} . (Fig. 1C).

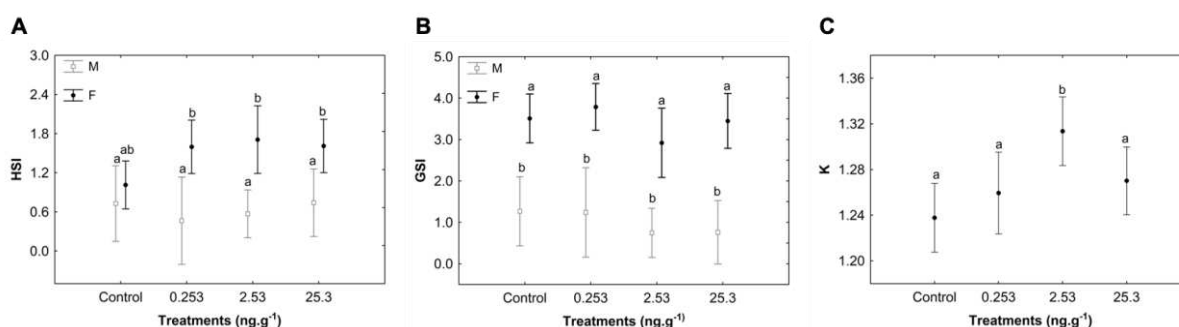


Fig. 1. Somatic indexes of *O. niloticus* exposed to BDE-47: (A) HSI: Hepatosomatic index. (B) GSI: Gonadosomatic index. (C) K: Condition factor. Different letters indicate statistical differences between exposure doses and the control groups ($p < 0.01$).

3.3. Vitellogenin and hormone levels

We found significant difference in the plasma concentration of E2 and total T4 hormones ($p > 0.05$) between the control and groups exposed to BDE-47, where E2 was reduced in the dose of 2.53 ng, g⁻¹ (Fig. 2A) and the total T4 was elevated in all the treated groups when compared to the control group (Fig. 2B). TSH levels were similar between the control and treated groups (Fig. 2C). Western blotting evidenced the expression of two Vtg isoforms (~120 and 140 kDa) for BDE-47 exposed female fish (Fig 2D), but not for males (Fig. 2E).

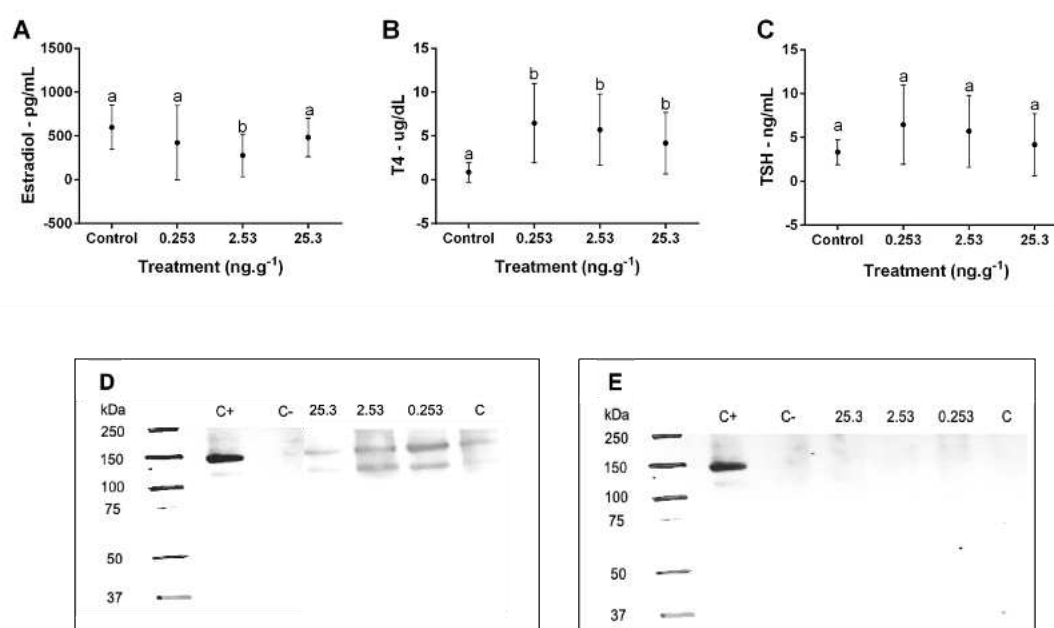


Fig. 2. Immunodetection of vitellogenin (vtg) protein and hormones level in the plasma of *O. niloticus* after sub chronic exposure to BDE-47. (A) Estradiol. (B) total T4. (C) TSH levels. Different letters indicate statistical differences between exposure and the control groups ($p < 0.01$). SDS-PAGE followed by Western blotting in females (Fig.2D) and males, (Fig 2E). Positive control (C⁺, plasma of female not exposed). Negative control (C⁻, plasma from untreated male fish). Control group (C, plasma of female treated with vehicle).

3.4. Biochemical and genotoxic analysis

Acetylcholinesterase (AChE) increased at all BDE-47 concentrations for the brain (Fig. 3A) and at 25.3 ng. g⁻¹ for the muscle (Fig. 3B). Catalase activity (Fig. 3C), levels of non-protein thiols (Fig. 3E), and protein carbonylation (Fig. 3F) were not altered by exposure to BDE-47. Glutathione S-transferase activity

reduced at concentrations of 0.253 and 25.3 ng. g⁻¹ (Fig. 3D) and lipid peroxidation increased at 0.253 ng. g⁻¹ BDE-47 (Fig. 3G). The comet assay showed no significant difference among the DNA damage scores in the blood cells of the groups tested (Fig. 3H).

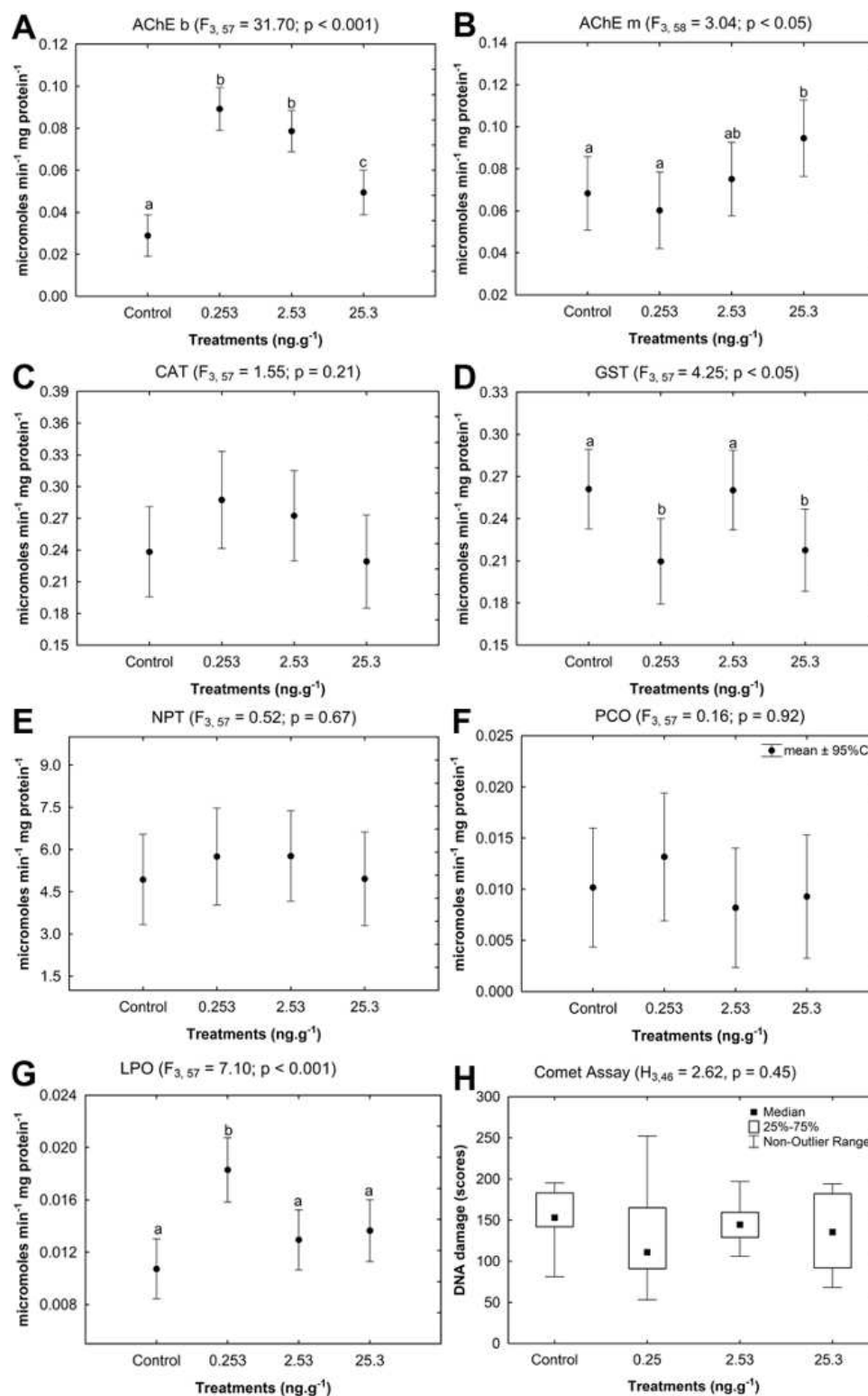


Fig. 3. Biochemical biomarkers and DNA damage from *O. niloticus* after oral exposure to BDE-47. (A) Brain Acetylcholinesterase. (B) Muscle Acetylcholinesterase. (C) Catalase. (D) Glutathione S-transferase. (E) non-protein thiols. (F) protein carbonylation. (G) lipid peroxidation. (H) Cometa assay. Different letters indicate statistically significant differences between control and exposure groups ($p \leq 0.05$).

3.5. Integrated biomarker response index (IBR)

The IBR values demonstrated that the concentrations of BDE-47 modified the dynamics of biomarkers compared to the control group (Fig. 4) in a decrescent dependent way. The response was more pronounced in the concentration of 0.253 ng/g caused the highest alterations in the biomarkers and, consequently, a higher IBR index (1.30). The levels of LPO, NPT, PCO and activities of CAT and AChE (brain) increased, while the activities of GST and AChE (muscle) decreased.

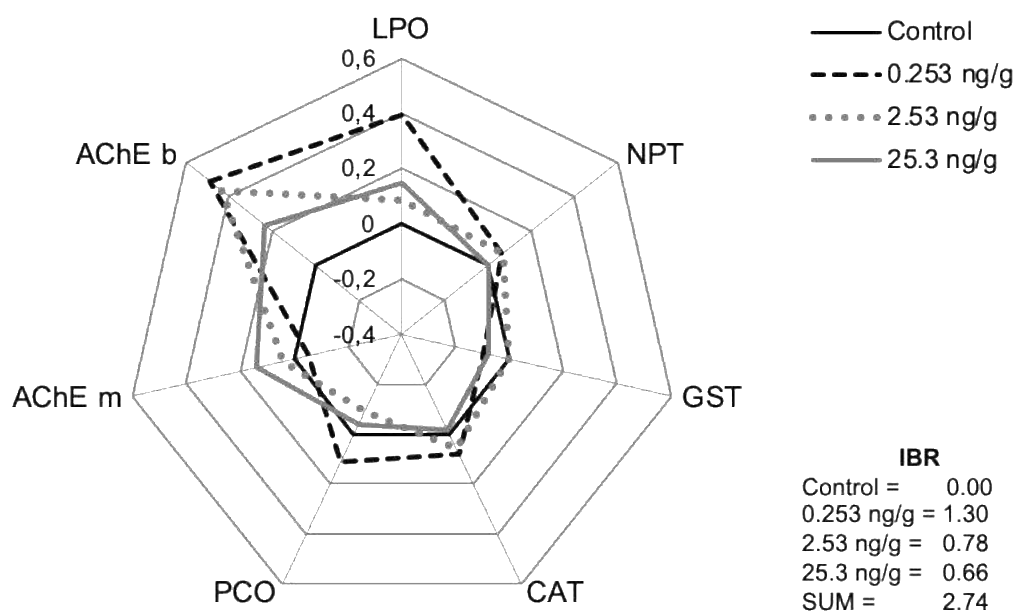


Fig. 4. Index of the integrated biochemical response (IBR) of *O. niloticus* exposed to BDE-47. The graph shows the way the concentrations of BDE-47 modified the dynamics of biomarkers compared to the control group. Values below zero indicates reduction of the biomarker, whereas values above zero indicate induction of the biomarker. LPO: Lipid peroxidation. NPT: Non-protein thiols. GST: Glutathione S-transferase. CAT: Catalase. PCO: Protein carbonylation. AChE m: Acetylcholinesterase (muscle). AChE b: Acetylcholinesterase (brain).

3.6. Histopathological analysis

As found to other teleost, the liver of the control animals (Fig. 5C) presented homogeneous parenchyma, polygonal hepatocytes, spherical nucleus with central nucleolus. The hepatocytes were organized like cords which was accompanied by thin sinusoid vessels. After exposure to BDE-47, some relevant histopathological changes were found in the liver of *O. niloticus*, such as cytoplasmic inclusions, necrosis, steatosis, leukocyte infiltration and vascular congestion (Fig. 5D-H). In addition, the incidence of melanomacrophage centers (MMC) was higher at the dose of 0.253 ng. g⁻¹ (Fig. 5B). This structure appeared as distinct yellow-brown spots on the surface of the liver. The hepatic lesion index was significantly different between the control and treated groups, with a higher index of lesion in all treated groups ($p < 0.0001$ and $p < 0.01$) (Fig. 5A).

Kidney tissue of individuals from control fish showed normal morphology with prominent bowman's capsule, glomerulus, proximal and distal tubules, also similar to another teleost (Fig. 6C). However, after exposure to BDE-47 kidney tissues showed leukocyte infiltration, presence of pyknotic nucleus, glomerulus atrophy, necrosis and incidence of melanomacrophage centers (MMC) (Fig. 6D-F). The lesion index (Fig 6A) in the renal tissue was higher in the groups treated with 2.53 ng. g⁻¹ and 25.3 ng. g⁻¹ ($p < 0.01$) when compared to the control group and the incidence of MMC was higher at the lowest dose (Fig. 6B).

The lesions found in both the liver and kidney are shown in table 1.

Conversely, there was no histopathological alterations for the gonads.

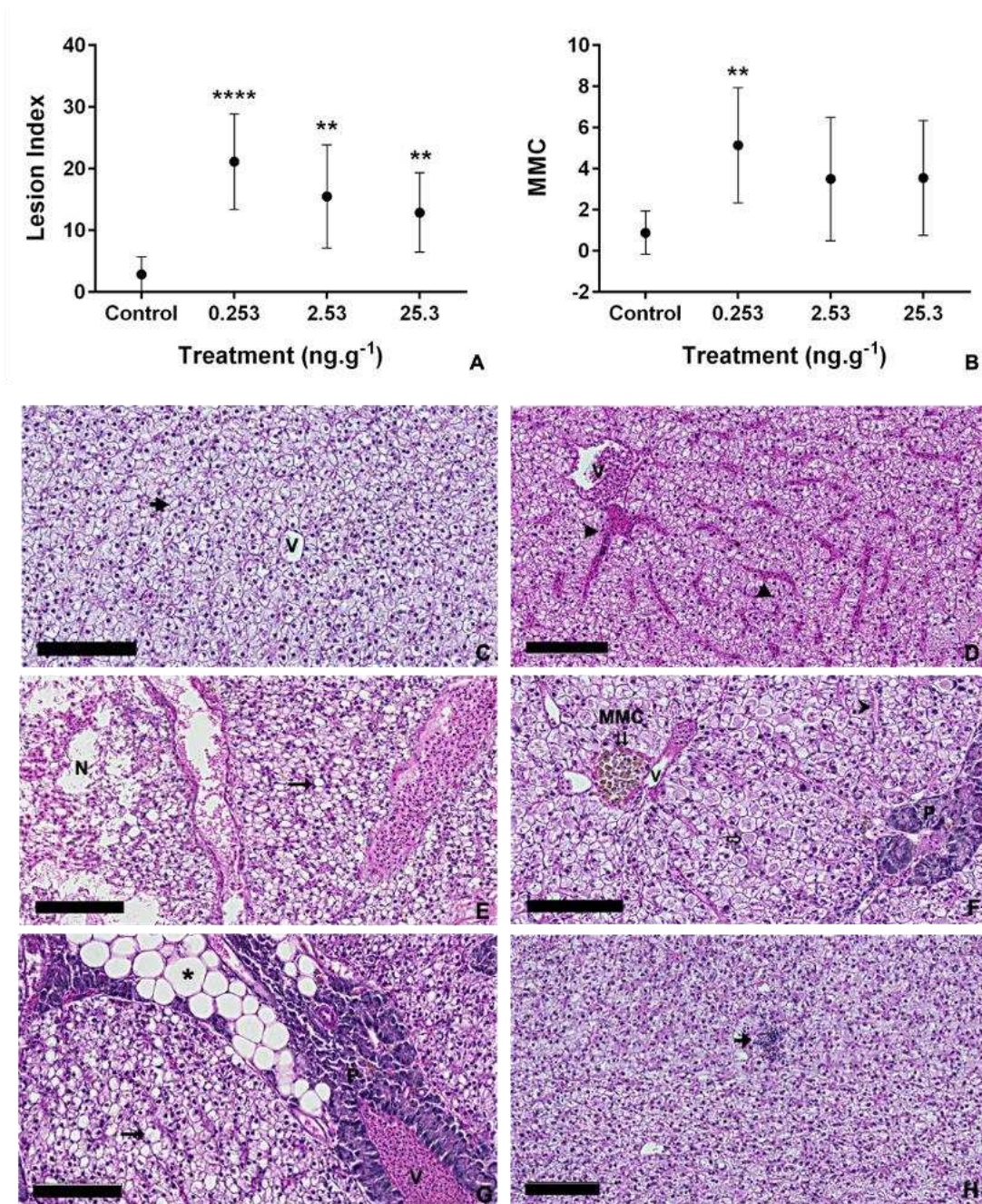


Fig. 5. Structural organization of liver of *O. niloticus* counterstained with hematoxylin/eosin. **(A)** Histopathological index. Statistical differences are represented by asterisks (** = $p < 0.01$, **** = $p < 0.0001$). **(B)** Incidence of Melanomacrophage centers (MMC) in liver of *O. niloticus* after doses of BDE-47. Statistical differences are represented by asterisks (** = $p < 0.01$). **(C)** Liver of control fish. Blood vessel (V) and hepatocytes (➔). **(D)** Liver exposed group (25.3 ng.g⁻¹). Blood vessel (V) and Vascular congestion (➤). **(E)** Liver exposed group (0.253 ng.g⁻¹). Steatosis (➔) and Areas of necrosis (N). **(F)** Liver exposed group (2.53 ng.g⁻¹). Sinusoids (➤), Melanomacrophages centers (⇓ MMC) located in close proximity to a blood vessel, Pancreatic tissue (P) and Cytoplasmic inclusions (➔). **(G)** Liver exposed group (2.53 ng.g⁻¹). Blood vessel (V), Pancreatic tissue (P), Adipose tissue (*) and Steatosis (➔). **(H)** Liver exposed group (0.253 ng.g⁻¹). Leukocyte infiltration (➔). Scale bars = 100 μ m.

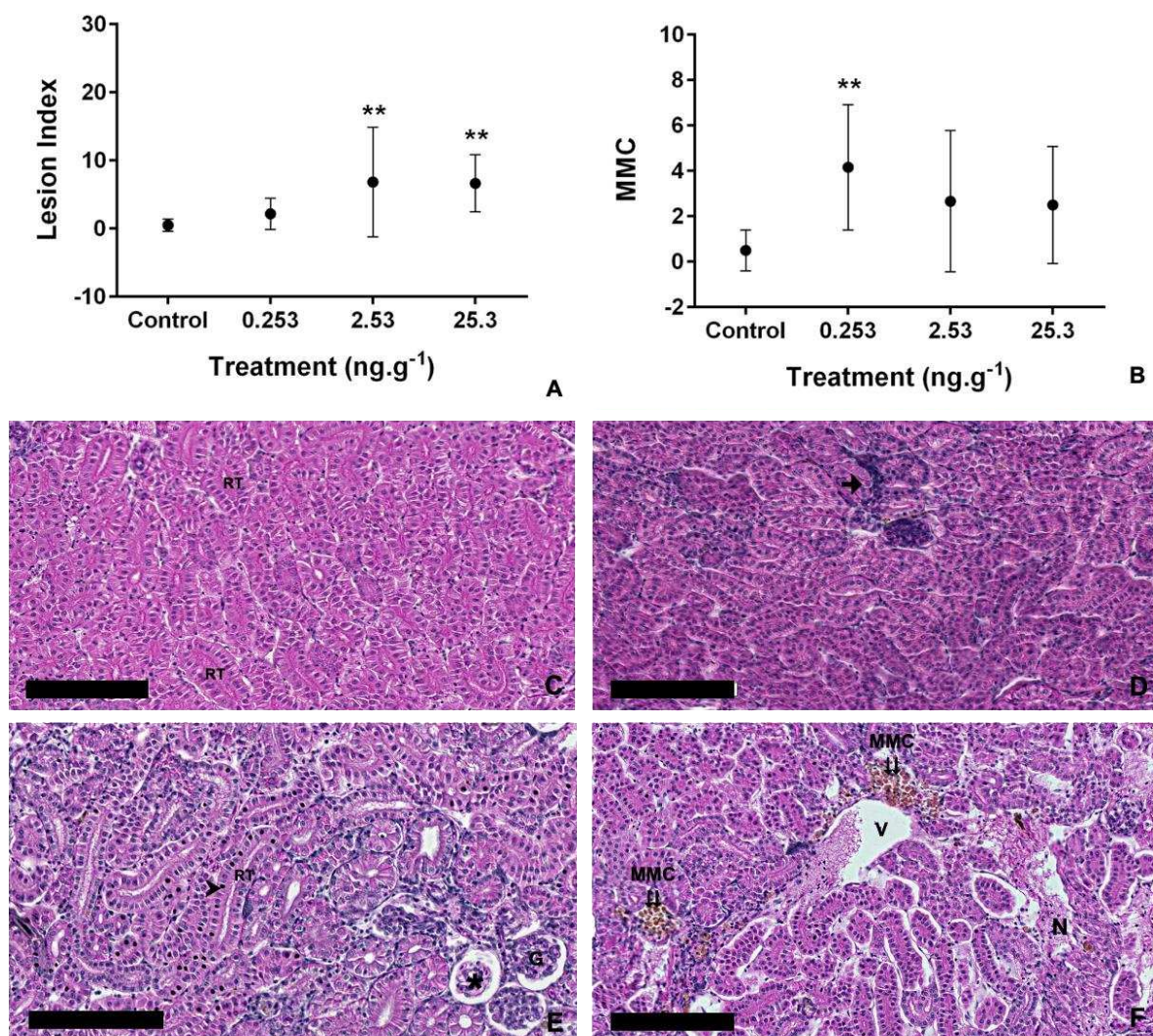


Fig. 6. Structural organization of kidney of *O. niloticus* counterstained with hematoxylin/eosin. **(A)** Histopathological index. Statistical differences are represented by asterisks (** = $p < 0.01$). **(B)** Melanomacrophage centers (MMC) in kidney of *O. niloticus* after doses of BDE-47. Statistical differences are represented by asterisks (** = $p < 0.01$). **(C)** Kidney of control fish. Renal parenchyma filled with renal tubules (RT). **(D)** Kidney exposed group (25.3 ng.g⁻¹). Leukocyte infiltration (→). **(E)** Kidney exposed group (25.3 ng.g⁻¹). Pyknotic nucleus (▶), Glomerulus (G) and Glomerulus atrophy (*). **(F)** Kidney exposed group (2.53 ng.g⁻¹). Blood vessel (V), Melanomacrophages centers (⇓ MMC) and Area of necrosis (N). Scale bars = 100 μ m.

Table 1

Occurrence of histopathological changes in the liver and kidney of *O. niloticus* exposed to BDE-47.

The values are presented as a percentage.

Liver							
Treatment (ng. g ⁻¹)	Vascular congestion	Cytoplasmic inclusions	Necrosis	Adipose tissue	Steatosis	Leucocyte infiltration	MMC
Control	44	0	0	11	22	11	44
0.253	100	71	71	43	57	14	86
2.53	100	75	50	75	25	0	75
25.3	89	22	44	44	44	44	67

Kidney					
Treatment (ng. g ⁻¹)	Leucocyte infiltration	Pyknotic nucleus	Glomerulus atrophy	Necrosis	MMC
Control	17	0	0	8	25
0.253	0	0	8	58	83
2.53	0	0	67	50	58
25.3	67	58	42	0	67

4. Discussion

The current study brings new evidences of BDE-47 toxicity to fish after trophic and sub chronic exposure to environmental relevant doses. The exposure period was chosen to simulate the frequent bioavailability of this compound to aquatic organisms environmentally exposed. Besides that, when assessing the effects of PBDEs on fish health, characteristics such as the lipophilic nature, sustain the use of more realistic exposure routes that include the trophic exposition ([González-Doncel et al., 2016](#); [Ni et al., 2012](#)). To date some studies have relied on waterborne BDE-47 exposures ([Lema et al., 2007](#); [Usenko et al., 2011](#)). However, the efficiency of these waterborne exposures has been concluded to be environmentally unrealistic ([González-Doncel et al., 2014](#)).

Somatic indexes are important biological factors for assessing the individual's health and some physiological disorders. These indexes make it possible to analyze changes in liver function and level of energetic reserves, as well as assessing whether the gonad was affected or not by its degree of development ([Baudou et al., 2019](#); [Ríos et al., 2017](#); [Yamamoto et al., 2016](#)).

Changes in these indexes can compromise the expression of vitellogenin in animals exposed to certain pollutants (Yamamoto et al., 2016). Studies have shown that *Notothenia rossi* and *Trematomus newnesi* exposed to persistent organic pollutants, include PBDEs, had high energy reserves in the liver (HSI > 1) (Baudou et al., 2019; Ríos et al., 2017; Yamamoto et al., 2016). Here, the higher HSI observed in females can be explained by the synthesis of vitellogenin and, therefore, a greater accumulation of fat and occurrence of steatosis and cytoplasmic inclusions found histopathologically in the liver. This data is in accordance with (Chen et al., 2017) in adults females zebrafish exposed to BDE-209 and in *O. niloticus* exposed to tribromophenol (TBP) (Folle et al., 2020).

A higher GSI was found in males of *Astyanax bifasciatus* and *Chrenicicla iguassuensis* from the Iguazu River, due to the increase in vitellogenin expression induced by endocrine disrupting chemicals released by human activities (Yamamoto et al., 2017). Increased GSI resulting from exposure to BDE-209 was observed in zebrafish females (Chen et al., 2017). In the present study, was observed that GSI of females exposed to BDE-47 was higher when compared to males, conversely with the results of Vtg expression in female that decreased in the higher dose but increasing with the lower dose.

The Condition factor (K) is an indicator of the general health status of the fish (Baudou et al., 2019; Ríos et al., 2017) and varies not only according to exposure to xenobiotics but also with the amount of fat, degree of parasitism, disease, nutritional level and susceptibility to environmental changes (Barni et al., 2016; Dalzochio et al., 2016). Although nutritional and environmental conditions to which the fish were subjected in the tested groups in the present study were similar, K was significantly higher in fish exposed to intermediate dose. This result is associated with the abnormal presence of adipocytes and steatosis, histopathologically evidenced in fish exposed to 2.53 ng. g⁻¹ of BDE-47. Contrary to this, Ameer et al. (2015), described in a study carried out with fish from a lagoon impacted by different chemicals, including PBDE, the absence of variation in the condition factor.

In fish, steroid hormones play a crucial role in the stimulation of hepatic synthesis and secretion of vtg in females, and in reproduction in males (Guellard et al., 2019; Nelson & Habibi, 2016). Although the deregulation mechanism is not related to the interactions between this brominated compound and the estrogen

receptor, since the affinity is low and without cellular responses in *in vitro* studies (Folle et al., 2020), in this work, we found that BDE-47 showed antiestrogenic action by decreasing the E2 level in the intermediate dose. In line with our results, Deng et al. (2010), reported antiestrogenic properties of TBP, as it decreased the activity of estradiol and aromatase. As for thyroid hormones, Song et al. (2016), Zhao et al. (2016) and Wu et al. (2019) claim that these hormones play important roles in the metabolism, growth, development and reproduction of teleost fish. The exposure of fish to high doses of BDE-47 Song et al. (2016) and to different concentrations of BDE-209 Zhao et al. (2016), showed that the plasma T4 level was reduced. On the other hand, in the present study, T4 levels increased due to exposure to BDE-47 and TSH levels remained unchanged when compared to control. These scenarios show that the final effect of exposure to PBDE on thyroid hormones depends on several variables, such as the species of the fish and its stage of life, the PBDE counterpart, route and duration of exposure (Arkoosh et al., 2017). In addition, PBDE can alter the internal mechanisms that play a role in thyroid hormone homeostasis in fish. In our study, T4 levels were elevated due to the low ability of BDE-47 to bind to transthyretin (TTR), a transport protein bound to THs circulating in the plasma.

The vitellogenin is a protein synthesized by female in response to endogenous estrogens and compose egg yolk in oviparous vertebrates, including fish. The induction of the expression of vtg in male fish by exposure to xenoestrogens has been used as a biomarker of endocrine disruption (Adeogun et al., 2016; Burkina et al., 2018; Costa et al., 2010; Min et al., 2018; Yu et al., 2014). In the present study, vtg expression was not detected in male fish, showing that BDE-47 did not act as an endocrine disruptor for males in this species. These results corroborate with data observed in juvenile *Atlantic salmon* exposed to commercial Penta-BDE and octa-BDE mixtures, that did not find Vtg induction in males (Chen et al., 2010). In females, it was possible to observe a decrease in the expression of Vtg in all concentrations when compared to the control, antiestrogenic effect. This shows a relationship between a decrease of circulating estradiol in the plasma and the decrease of Vtg expression in individuals from groups exposed. In addition, according to Folle et al. (2020), a higher rate of liver damage can impair the synthesis of Vtg.

According to the literature, changes in AChE activity may compromise synaptic transmission ([Abdalla et al., 2013](#); [Jaques et al., 2011](#); [Mela et al., 2013b](#)) and activities such as locomotion ([Drever et al., 2011](#); [Sahu et al., 2013](#)). Studies in goldfish *Carassius auratus* reported that AChE activity was decreased by exposure to BDE-209 ([Zhang et al., 2016](#)). Our study showed increased AChE activity in the brain and muscle in groups exposed to BDE-47. Similar result was also reported by [Chen et al. \(2012\)](#) in zebrafish larvae exposed to BDE-71, resulting in changes in locomotor behavior and cholinergic function. Although the consequences of increasing AChE for the health of organisms are still poorly understood, [Folle et al. \(2020\)](#), state that it may represent an overcompensation for prior AChE inhibition or reduced expression of the enzyme needed to regulate the motor and cognitive functions that affect reproductive behavior.

Environmental pollutants have the potential to induce oxidative stress in aquatic organisms. Catalase (CAT), non-protein thiols (NPT) and glutathione S-transferase (GST) have important antioxidant and detoxification roles. The presence of BDE-47 in the exposed groups was not able to change the activities and amount of CAT and NPT, respectively, which prevents damage to the liver, maintaining the antioxidant defense mechanisms. Unchanged PCO levels maybe related to unchanged CAT activity observed in the present study, keeping the H₂O₂ detoxification process and its ability to eliminate reactive oxygen species stable. The decrease in GST activity in BDE-47 exposed groups shows susceptibility to oxidative damage and injuries to liver tissue, since GST is one of the most important phase II enzymes, conjugating glutathione to electrophilic compounds, usually reducing their toxicity and increasing their solubility in water. Likewise, [Carvalho et al. \(2012\)](#) reported decrease of GST activity in muscle of *O. niloticus* from impacted river.

Uncontrolled lipid peroxidation (LPO) can be directly associated with protein and DNA damage. In the present study, an increase of LPO was observed at the lowest dose of BDE-47, which demonstrates the potential of BDE-47 to induce a redox unbalance state and consequently cellular damages. Studies conducted with PBDEs showed an increase of LPO concentration ([Carvalho et al., 2012](#)) in the emerald rock cod fish and this high level of LPO was associated with liver necrosis, an evidence of oxidative stress ([Ghosh et al., 2013](#)). In the present study, there was evidence of hepatic necrosis in the exposed groups

which was not detected in individuals from the control group, revealing the toxic effects of BDE-47.

The multiple biomarker approach enables integrating various biomarkers into a single value, allowing a better understanding of the responses to a stressor (Baudou et al., 2019; Souza et al., 2019). In the present study, 0.253 ng. g⁻¹ showed the highest IBR (1.30), suggesting that sub chronic exposure to a low concentration of this pollutant was sufficient to cause toxicity. The lowest dose may not have been sufficient to alert the organism of the presence of this pollutant in the organism and, consequently, not produce a defense satisfactory answer, causing the observed damages. On the other hand, the higher dose may have promoted an acute response of defense and so without permanent lesions. An important highlight is the lower dose effects detected by the IBR analysis, showing that under low exposure the defense mechanisms are not stimulated by BDE-47, leading to cumulative effects with drastic consequences to the individual in long term. No DNA damage was observed, indication low or no genotoxic potential of BDE-47.

The morphological alterations, in general, results of indirectly or direct action of xenobiotic on the tissues. Indirect action can be induced by the molecular, biochemical or physiological changes (Myers and Fournie, 2002). After exposure to pollutants the oxidant species production or the impairment of antioxidant defenses can lead to damages in cellular macromolecules. It is well established that molecular damages can explain the source of more complex effects as the histopathological findings, an efficient method to evaluate the chronic toxicity in target organs (Folle et al., 2020).

The liver is one of the most intensively investigated organs among vertebrate toxicological studies, and is considerate the major site of biotransformation reactions (Mela et al., 2007). Liver lesion index showed that exposure of *O. niloticus* to different concentrations of BDE-47 caused toxicity. Changes such as vascular congestion are related to circulatory disorders at the same time as leukocyte infiltration and formation of melanomacrophage centers (MMC) are indicative of inflammatory responses related to necrosis. Circulatory disorders were similar to those found by Barja-Fernández et al. (2013) in *Psetta maxima* exposed to BDE-47 for 15 days. According to Mela et al. (2013), steatosis and a large amount of adipose tissue result from disturbance in lipid

metabolism. Our findings are in agreement with another study conducted with *Pimephales promelas*, where exposure to BDE-209 induced the presence of steatosis in this organ (Noyes et al., 2013). According to Barja-Fernández et al. (2013), prolonged exposure to BDE-47 can lead to nuclear alterations that precede necrosis. In our study, it was possible to confirm the presence of cellular necrosis in the exposed groups, corroborating with the previous finding. In addition, the cytoplasmic inclusions are signs of biliary stagnation and suggests a degenerative process associated to possible obstruction of bile canaliculi (Bonomo et al., 2021). Furthermore, the increased melanomacrophage centers can be related to the important function of these structures in the sequestration of cellular degradation products and potentially toxic materials such as free radicals and catabolic degradation product (Agius and Roberts, 2003; Moustafa et al., 2020; Rabitto et al., 2005). Melanomacrophages are aggregations of macrophages in which the cytoplasm contains pigments such as lipofuscin, melanin, and hemosiderin (Agius and Roberts, 2003) and usually located close to a blood vessel (Graf and Schlüns, 1979; Lu et al., 2017). The specific role of MMCs is not certain, but it is clear that they increase in size and number when fish are stressed or exposed during environmental contamination (Bucke et al., 1992; Moustafa et al., 2020; Myers and Fournie, 2002; Suresh, 2009).

Kidney is susceptible to the toxic effects of xenobiotics due to the high blood flow and its role in metabolism and excretion of toxic compounds (Perussolo et al., 2019). The kidney lesion index showed that exposure of *O. niloticus* to different concentrations of BDE-47 caused toxicity. An inflammatory response was observed, characterized by the presence of leukocyte infiltration and MMC. Similar changes were reported in juvenile *Oncorhynchus mykiss* Zhou et al. (2020), and *Barbus graellsii* exposed to BDE-47 (Berg et al., 2013). The macrophages in teleost take up worn-out or damaged cells, coagulated blood and damaged connective tissue fibrils, i.e., these cells have a regular uptake of various scavenger materials and act to clean up the tissue after infection and mechanical damage (Agius and Roberts, 2003). According to Mela et al. (2013a) and Salgado et al. (2019), necrosis is associated with leukocyte infiltration and formation of MMC. According to Ali et al. (2014), the accumulation of MMCs in kidney suggest that this tissue is susceptible to BDE-47 and are undergoing heightened innate immune responses. The glomerulus is considerably more

sensitive to oxidative injuries than other nephron segments (Lowe et al., 2012). The oxidative stress could be involved in different inflammatory glomerular lesions caused by a series of mediators, including cytokines and chemokines that lead to leukocyte activation, production of reactive oxygen species and increased glomerular damage (Aguila et al., 2005). Glomerular atrophy was observed in *Piaractus mesopotamicus* exposure to cyanobacterium Tavares et al. (2019) and in *Tinca tinca* Atencio et al. (2008) and in *C. carpio* exposed to MC-LR Råbergh et al. (1991), and in *Tilapia zillii* impacted by the discharge of agricultural, industrial and domestic waste Shahid et al. (2020). Pyknosis is considered an irreversible condensation of chromatin and the nucleus (Hou et al., 2016; Wohlan et al., 2014). According to Perussolo et al. (2019), the presence of a pyknotic nucleus is the result of deleterious processes, followed by necrosis or apoptosis. The presence of a pycnotic nucleus in fish exposed to BDE-47 may be related to necrotic areas, also observed in this tissue. Several toxics have been shown cause Pyknotic nuclei (Fernandez et al., 2011; Wolf and Wheeler, 2018), including in the renal tubule (Atencio et al., 2008; Råbergh et al., 1991).

5. Conclusion

The exposition to BDE-47 caused significant changes in *O. niloticus* and these effects indicate the risk of chronic exposure to this pollutant. These effects may provide information for the risk of exposure to biota and human populations. In addition, the current study emphasizes the importance of continuing research on the PBDE effects including the long term and low doses also for other fish species.

Funding

This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, finance code 001).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors thank Satar Gemusse, Dámaso Rubio, Roberta Pozzan, Yuri Gonçalves, Júlia Miranda and Mateus Silva, for assistance with fish maintenance and technical support during the experiments, and the director of Center for Advanced Fluorescence Technologies of UFPR/CTAF Dr. Marco Randi and Ms. Israel Henrique Bini.

References

- Abdalla, F. H., Cardoso, A. M. H., Pereira, L. B., Schmatz, R., Gonçalves, J. F., Stefanello, N., Fiorenza, A. M., Gutierrez, J. M., Da Silva Serres, J. D., Zanini, D., Pimentel, V. C., Vieira, J. M., Schetinger, M. R. C., Morsch, V. M., & Mazzanti, C. M. (2013). Neuroprotective effect of quercetin in ectoenzymes and acetylcholinesterase activities in cerebral cortex synaptosomes of cadmium-exposed rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 381(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1659-x>
- Adeogun, A. O., Onibonoje, K., Ibor, O. R., Omiwole, R. A., Chukwuka, A. V., Ugwumba, A. O., Ugwumba, A. A. A., & Arukwe, A. (2016). Endocrine-disruptor molecular responses, occurrence of intersex and gonadohistopathological changes in tilapia species from a tropical freshwater dam (Awba Dam) in Ibadan, Nigeria. *Aquatic Toxicology*, 174, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.002>
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Agius, C., & Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Letters in Drug Design & Discovery*, 26, 499–509. <https://doi.org/10.2174/157018081503180131102747>
- Aguila, M. B., Pinheiro, A. R., Aquino, J. C. F., Gomes, A. P., & Mandarim-De-Lacerda, C. A. (2005). Different edible oil beneficial effects (canola oil, fish oil, palm oil, olive oil, and soybean oil) on spontaneously hypertensive rat glomerular enlargement and glomeruli number. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 76(1–4), 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2004.12.003>
- Ali, A. O., Hohn, C., Allen, P. J., Ford, L., Dail, M. B., Pruett, S., & Petrie-Hanson, L. (2014). The effects of oil exposure on peripheral blood leukocytes and splenic melano-macrophage centers of Gulf of Mexico fishes. *Marine*

- Pollution Bulletin*, 79(1–2), 87–93.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.036>
- Ameur, W. Ben, El Megdiche, Y., de Lapuente, J., Barhoumi, B., Trabelsi, S., Ennaceur, S., Camps, L., Serret, J., Ramos-López, D., Gonzalez-Linares, J., Touil, S., Driss, M. R., & Borràs, M. (2015). Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. *Chemosphere*, 135, 67–74.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.050>
- Annuniação, D. L. R., Almeida, F. V., & Sodré, F. F. (2017). Method development and validation for the determination of polybrominated diphenyl ether congeners in Brazilian aquatic sediments. *Microchemical Journal*, 133, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.009>
- Arkoosh, M. R., Van Gaest, A. L., Strickland, S. A., Hutchinson, G. P., Krupkin, A. B., & Dietrich, J. P. (2017). Alteration of thyroid hormone concentrations in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to polybrominated diphenyl ethers, BDE-47 and BDE-99. *Chemosphere*, 171, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.035>
- Atencio, L., Moreno, I., Jos, A., Pichardo, S., Moyano, R., Blanco, A., & Cameán, A. M. (2008). Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to Microcystis under laboratory conditions. *Toxicicon*, 52(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicicon.2008.05.009>
- Barbee, N. C., Ganio, K., & Swearer, S. E. (2014). Integrating multiple bioassays to detect and assess impacts of sublethal exposure to metal mixtures in an estuarine fish. *Aquatic Toxicology*, 152, 244–255.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.012>
- Barja-Fernández, S., Míguez, J. M., & Álvarez-Otero, R. (2013). Histopathological effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in the gills, intestine and liver of turbot (*Psetta maxima*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95, 60–68.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.028>
- Barni, M. F. S., Ondarza, P. M., Gonzalez, M., Da Cuña, R., Meijide, F., Grosman, F., Sanzano, P., Lo Nostro, F. L., & Miglioranza, K. S. B. (2016). Persistent organic pollutants (POPs) in fish with different feeding habits inhabiting a shallow lake ecosystem. *Science of the Total Environment*, 550, 900–909.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.176>
- Baudou, F. G., Ossana, N. A., Castañé, P. M., Mastrángelo, M. M., González Núñez, A. A., Palacio, M. J., & Ferrari, L. (2019). Use of integrated biomarker indexes for assessing the impact of receiving waters on a native neotropical teleost fish. *Science of the Total Environment*, 650, 1779–1786.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.342>
- Beliaeff, B., & Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(6), 1316–1322. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>
- Berg, V., Zerihun, M. A., Jørgensen, A., Lie, E., Dale, O. B., Skaare, J. U., & Lyche, J. L. (2013). High prevalence of infections and pathological changes in burbot (*Lota lota*) from a polluted lake (Lake Mjøsa, Norway). *Chemosphere*, 90(5), 1711–1718.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.017>

- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., Kueng, C., Segner, H., Dutra, F. M., Ritzmann, M., Sponchiado, D., Forneck, S. C., Freire, C. A., Ballester, E. L. C., Kipfer, S., Segner, H., Wenger, M., Wahli, T., Bernet, D., Luzio, A., ... Cáceres-Vélez, P. R. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Disease*, 22, 25–34. <https://doi.org/10.3354/dao061137>
- Bonomo, M. M., Sachi, I. T. de C., Paulino, M. G., Fernandes, J. B., Carlos, R. M., & Fernandes, M. N. (2021). Multi-biomarkers approach to access the impact of novel metal-insecticide based on flavonoid hesperidin on fish. *Environmental Pollution*, 268, 115758. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115758>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bucke, D., Vethaak, A., & Lang, T. (1992). Quantitative assessment of melanomacrophage centres (MMCs) in dab *Limanda limanda* along a pollution transect in the German Bight. *Marine Ecology Progress Series*, 91, 193–196. <https://doi.org/10.3354/meps091193>
- Burkina, V., Zamaratskaia, G., Sakalli, S., Giang, P. T., Kodes, V., Grabic, R., Velisek, J., Turek, J., Kolarova, J., Zlabek, V., & Randak, T. (2018). Complex effects of pollution on fish in major rivers in the Czech Republic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164(April), 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.109>
- Carvalho, C. dos S., Bernusso, V. A., Araújo, H. S. S. de, Espíndola, E. L. G., & Fernandes, M. N. (2012). Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*, 89(1), 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.013>
- Chalifour, A., & Tam, N. F. Y. (2016). Tolerance of cyanobacteria to the toxicity of BDE-47 and their removal ability. *Chemosphere*, 164, 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.109>
- Chen, L., Huang, C., Hu, C., Yu, K., Yang, L., & Zhou, B. (2012). Acute exposure to DE-71: Effects on locomotor behavior and developmental neurotoxicity in zebrafish larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(10), 2338–2344. <https://doi.org/10.1002/etc.1958>
- Chen, L., Wang, X., Zhang, X., Lam, P. K. S., Guo, Y., Lam, J. C. W., & Zhou, B. (2017). Transgenerational endocrine disruption and neurotoxicity in zebrafish larvae after parental exposure to binary mixtures of decabromodiphenyl ether (BDE-209) and lead. *Environmental Pollution*, 230, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.053>
- Chen, T. H., Cheng, Y. M., Cheng, J. O., Chou, C. T., Hsiao, Y. C., & Ko, F. C. (2010). Growth and transcriptional effect of dietary 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(3), 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.12.033>
- Costa, D. D. M., Neto, F. F., Costa, M. D. M., Morais, R. N., Garcia, J. R. E., Esquivel, B. M., & Ribeiro, C. A. O. (2010). Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17- β -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 151(2), 248–257.

- <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.11.002>
- Dalzochio, T., Rodrigues, G. Z. P., Petry, I. E., Gehlen, G., & da Silva, L. B. (2016). The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. *International Aquatic Research*, 8(4), 283–298. <https://doi.org/10.1007/s40071-016-0147-9>
- Deng, J., Liu, C., Yu, L., & Zhou, B. (2010). Chronic exposure to environmental levels of tribromophenol impairs zebrafish reproduction. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 243(1), 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.016>
- Díaz-Jaramillo, M., Miglioranza, K. S. B., Gonzalez, M., Barón, E., Monserrat, J. M., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2016). Uptake, metabolism and sub-lethal effects of BDE-47 in two estuarine invertebrates with different trophic positions. *Environmental Pollution*, 213, 608–617. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.009>
- Drever, B. D., Riedel, G., & Platt, B. (2011). The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 505–514. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.037>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Fernandez, W. S., Dias, J. F., Ribeiro, C. A. O., & Azevedo, J. de S. (2011). Liver damages and nuclear abnormalities in erythrocytes of *Atherinella brasiliensis* (Actynopterigii, Atherinopsidae) from two beaches in southeast of Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, 59(2), 163–169. <https://doi.org/10.1590/S1679-87592011000200005>
- Ferraro, M. V. M., Fenocchio, A. S., Mantovani, M. S., de Oliveira Ribeiro, C., & Cestari, M. M. (2004). Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*, 27(1), 103–107. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572004000100017>
- Folle, N. M. T., Azevedo-Linhares, M., Garcia, J. R. E., Esquivel, L., Grotzner, S. R., Oliveira, E. C. de, Filipak Neto, F., & Oliveira Ribeiro, C. A. de. (2020). 2,4,6-Tribromophenol is toxic to *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) after trophic and subchronic exposure. *Chemosphere*, xxxx, 128785. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128785>
- Ghosh, R., Lokman, P. M., Lamare, M. D., Metcalf, V. J., Burritt, D. J., Davison, W., & Hageman, K. J. (2013). Changes in physiological responses of an Antarctic fish, the emerald rock cod (*Trematomus bernacchii*), following exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). *Aquatic Toxicology*, 128–129, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.019>
- Glazer, L., Wells, C. N., Drastal, M., Odamah, K. A., Galat, R. E., Behl, M., & Levin, E. D. (2018). Developmental exposure to low concentrations of two brominated flame retardants, BDE-47 and BDE-99, causes life-long behavioral alterations in zebrafish. *NeuroToxicology*, 66, 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.09.007>
- González-Doncel, M., Carbonell, G., García-Mauriño, J. E., Sastre, S., Beltrán, E. M., & Fernández Torija, C. (2016). Effects of dietary 2,2', 4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) exposure in growing medaka fish

- (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 178, 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.07.017>
- González-Doncel, M., Torija, C. F., Beltrán, E. M., García-Mauriño, J. E., Sastre, S., & Carbonell, G. (2014). Limitations of waterborne exposure of fish early life stages to BDE-47. *Aquatic Toxicology*, 148, 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.015>
- Graf, R., & Schlüns, J. (1979). Ultrastructural and histochemical investigation of the terminal capillaries in the spleen of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cell and Tissue Research*, 196(2), 289–306. <https://doi.org/10.1007/BF00240103>
- Groh, K. J., Backhaus, T., Carney-Almroth, B., Geueke, B., Inostroza, P. A., Lennquist, A., Leslie, H. A., Maffini, M., Slunge, D., Trasande, L., Warhurst, A. M., & Muncke, J. (2019). Overview of known plastic packaging-associated chemicals and their hazards. *Science of the Total Environment*, 651, 3253–3268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.015>
- Guellard, T., Kalamarz-Kubiak, H., & Kulczykowska, E. (2019). Concentrations of melatonin, thyroxine, 17 β -estradiol and 11-ketotestosterone in round goby (*Neogobius melanostomus*) in different phases of the reproductive cycle. *Animal Reproduction Science*, 204(July 2018), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.02.014>
- Han, J., Won, E. J., Lee, M. C., Seo, J. S., Lee, S. J., & Lee, J. S. (2015). Developmental retardation, reduced fecundity, and modulated expression of the defensome in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* exposed to BDE-47 and PFOS. *Aquatic Toxicology*, 165, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.05.022>
- Hou, L., Liu, K., Li, Y., Ma, S., Ji, X., & Liu, L. (2016). Necrotic pyknosis is a morphologically and biochemically distinct event from apoptotic pyknosis. *Journal of Cell Science*, 129(16), 3084–3090. <https://doi.org/10.1242/jcs.184374>
- Huang, Y., Wang, X. L., Zhang, J. W., & Wu, K. S. (2015). Impact of endocrine-disrupting chemicals on reproductive function in Zebrafish (*Danio rerio*). *Reproduction in Domestic Animals*, 50(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/rda.12468>
- Jaques, J. A. dos S., Rezer, J. F. P., Gonçalves, J. F., Spanevello, R. M., Gutierrez, J. M., Pimentel, V. C., Thomé, G. R., Morsch, V. M., Schetinger, M. R. C., & Leal, D. B. R. (2011). The effect of curcumin in the ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of cigarette smoke-exposed rats. *Cell Biochemistry and Function*, 29(8), 703–707. <https://doi.org/10.1002/cbf.1804>
- Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., & Wolff, S. P. (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 202(2), 384–389. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N)
- Kang, H. M., Lee, Y. H., Kim, B. M., Kim, I. C., Jeong, C. B., & Lee, J. S. (2017). Adverse effects of BDE-47 on in vivo developmental parameters, thyroid hormones, and expression of hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis genes in larvae of the self-fertilizing fish *Kryptolebias marmoratus*. *Chemosphere*, 176, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.081>
- Keen, J. H., Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1976). Mechanism for the several

- activities of the glutathione S transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251(20), 6183–6188. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0)
- Lee, H. K., Kang, H., Lee, S., Kim, S., Choi, K., & Moon, H. B. (2020). Human exposure to legacy and emerging flame retardants in indoor dust: A multiple-exposure assessment of PBDEs. *Science of the Total Environment*, 719, 137386. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137386>
- Lema, S. C., Schultz, I. R., Scholz, N. L., Incardona, J. P., & Swanson, P. (2007). Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). *Aquatic Toxicology*, 82(4), 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.03.002>
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233(C), 346–357. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)
- Li, P., Gao, H., Dong, L., Liu, L., Zhou, G., Luo, C., Tian, Z., Xia, T., Wang, A., & Zhang, S. (2020). Perinatal low-dose PBDE-47 exposure hampered thyroglobulin turnover and induced thyroid cell apoptosis by triggering ER stress and lysosomal destabilization contributing to thyroid toxicity in adult female rats. *Journal of Hazardous Materials*, 392(September 2019), 122265. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122265>
- Liu, C., Wang, B., Zhou, B., Jian, X., Zhang, X., & Wang, Y. (2019). The responses of *Oncorhynchus mykiss* coping with BDE-47 stress via PXR-mediated detoxification and Nrf2-mediated antioxidation system. *Aquatic Toxicology*, 207(September 2018), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.11.026>
- Liu, Y., Feng, Y., Li, J., Zhou, D., Guo, R., Ji, R., & Chen, J. (2020). The bioaccumulation, elimination, and trophic transfer of BDE-47 in the aquatic food chain of *Chlorella pyrenoidosa*-*Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 258, 113720. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113720>
- Lowe, J., Souza-Menezes, J., Freire, D. S., Mattos, L. J., Castiglione, R. C., Barbosa, C. M. L., Santiago, L., Ferrão, F. M., Cardoso, L. H. D., da Silva, R. T., Vieira-Beiral, H. J., Vieyra, A., Morales, M. M., Azevedo, S. M. F. O., & Soares, R. M. (2012). Single sublethal dose of microcystin-LR is responsible for different alterations in biochemical, histological and physiological renal parameters. *Toxicon*, 59(6), 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.003>
- Lu, Q., Jürgens, M. D., Johnson, A. C., Graf, C., Sweetman, A., Crosse, J., & Whitehead, P. (2017). Persistent Organic Pollutants in sediment and fish in the River Thames Catchment (UK). *Science of the Total Environment*, 576, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.067>
- Margolis, A. E., Banker, S., Pagliaccio, D., De Water, E., Curtin, P., Bonilla, A., Herbstman, J. B., Whyatt, R., Bansal, R., Sjödin, A., Milham, M. P., Peterson, B. S., Factor-Litvak, P., & Horton, M. K. (2020). Functional connectivity of the reading network is associated with prenatal polybrominated diphenyl ether concentrations in a community sample of 5 year-old children: A preliminary study. *Environment International*, 134(September 2019), 105212. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105212>
- Mela, M., Guiloski, I. C., Doria, H. B., Rabitto, I. S., da Silva, C. A., Maraschi, A. C., Prodocimo, V., Freire, C. A., Randi, M. A. F., Oliveira Ribeiro, C. A., & Silva de Assis, H. C. (2013a). Risks of waterborne copper exposure to a

- cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.002>
- Mela, M., Guiloski, I. C., Doria, H. B., Randi, M. A. F., De Oliveira Ribeiro, C. A., Pereira, L., Maraschi, A. C., Prodocimo, V., Freire, C. A., & Silva de Assis, H. C. (2013b). Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.026>
- Mela, M., Randi, M. A. F., Ventura, D. F., Carvalho, C. E. V., Pelletier, E., & Oliveira Ribeiro, C. A. (2007). Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(3), 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.11.013>
- Min, B. H., Kim, B. M., Kim, M., Kang, J. H., Jung, J. H., & Rhee, J. S. (2018). Plasma biomarkers in juvenile marine fish provide evidence for endocrine modulation potential of organotin compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 210(April), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.05.001>
- Montalbano, A. M., Albano, G. D., Anzalone, G., Moscato, M., Gagliardo, R., Di Sano, C., Bonanno, A., Ruggieri, S., Cibella, F., & Profita, M. (2020). Cytotoxic and genotoxic effects of the flame retardants (PBDE-47, PBDE-99 and PBDE-209) in human bronchial epithelial cells. *Chemosphere*, 245. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125600>
- Moustafa, E. M., Dawood, M. A. O., Assar, D. H., Omar, A. A., Elbially, Z. I., Farrag, F. A., Shukry, M., & Zayed, M. M. (2020). Modulatory effects of fenugreek seeds powder on the histopathology, oxidative status, and immune related gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 515(August 2019), 734589. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734589>
- Myers, M. S., & Fournie, J. W. (2002). Histopathological biomarkers as integrators of anthropogenic and environmental stressors. In *Biological indicators of aquatic ecosystem stress* (pp. 221–287). American Fisheries Society.
- Nelson, E. R., & Habibi, H. R. (2016). Thyroid hormone regulates vitellogenin by inducing estrogen receptor alpha in the goldfish liver. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 436, 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.045>
- Ni, H. G., Ding, C., Lu, S. Y., Yin, X. L., & Samuel, S. O. (2012). Food as a main route of adult exposure to PBDEs in Shenzhen, China. *Science of the Total Environment*, 437, 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.056>
- Noyes, P. D., Lema, S. C., Macaulay, L. J., Douglas, N. K., & Stapleton, H. M. (2013). Low level exposure to the flame retardant BDE-209 reduces thyroid hormone levels and disrupts thyroid signaling in fathead minnows. *Environmental Science and Technology*, 47(17), 10012–10021. <https://doi.org/10.1021/es402650x>
- Pardo, O., Fernández, S. F., Quijano, L., Marín, S., Villalba, P., Corpas-Burgos, F., & Yusà, V. (2020). Polybrominated diphenyl ethers in foods from the Region of Valencia: Dietary exposure and risk assessment. *Chemosphere*, 250. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126247>
- Perussolo, M. C., Guiloski, I. C., Lirola, J. R., Fockink, D. H., Corso, C. R., Bozza, D. C., Prodocimo, V., Mela, M., Ramos, L. P., Cestari, M. M., Acco, A., &

- Silva de Assis, H. C. (2019). Integrated biomarker response index to assess toxic effects of environmentally relevant concentrations of paracetamol in a neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182(January), 109438. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109438>
- Pieronía, M. C., Leonelb, J., & Fillmann, G. (2017). *RETARDANTES DE CHAMA BROMADOS: UMA REVISÃO*. 40(3), 317–326. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160176>
- Po, B. H. K., & Chiu, J. M. Y. (2018). Transgenerational impairments of reproduction and development of the marine invertebrate *Crepidula onyx* resulted from long-term dietary exposure of 2,2",4,4"-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47). *Environmental Pollution*, 235, 730–738. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.087>
- Råbergh, C. M. I., Bylund, G., & Eriksson, J. E. (1991). Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology*, 20(3), 131–145. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(91\)90012-X](https://doi.org/10.1016/0166-445X(91)90012-X)
- Rabitto, I. S., Alves Costa, J. R. M., Silva De Assis, H. C., Pelletier, É., Akaishi, F. M., Anjos, A., Randi, M. A. F., & Oliveira Ribeiro, C. A. (2005). Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: Histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(2), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.03.002>
- Ríos, J. M., Lana, N. B., Ciocco, N. F., Covaci, A., Barrera-Oro, E., Moreira, E., & Altamirano, J. C. (2017a). Implications of biological factors on accumulation of persistent organic pollutants in Antarctic notothenioid fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145(February), 630–639. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.009>
- Sahu, S. S., Madhyastha, S., & Rao, G. M. (2013). Neuroprotective effect of resveratrol against prenatal stress induced cognitive impairment and possible involvement of Na⁺, K⁺-ATPase activity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(3), 520–525. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.09.012>
- Salgado, L. D., Marques, A. E. M. L., Kramer, R. D., Oliveira, F. G. de, Moretto, S. L., Lima, B. A. de, Prodócimo, M. M., Cestari, M. M., Azevedo, J. C. R. de, & Silva de Assis, H. C. (2019). Integrated assessment of sediment contaminant levels and biological responses in sentinel fish species *Atherinella brasiliensis* from a sub-tropical estuary in south Atlantic. *Chemosphere*, 219, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.204>
- Sanchez, W., Burgeot, T., & Porcher, J. M. (2013). A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 2721–2725. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>
- Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25(C), 192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)
- Shahid, S., Sultana, T., Sultana, S., Hussain, B., Irfan, M., Al-Ghanim, K. A.,

- Misned, F. A., & Mahboob, S. (2020). Histopathological alterations in gills, liver, kidney and muscles of *Ictalurus punctatus* collected from pollutes areas of River. *Brazilian Journal of Biology*, 69(4), 1–8. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.234266>
- Shi, T., Chen, S. J., Luo, X. J., Zhang, X. L., Tang, C. M., Luo, Y., Ma, Y. J., Wu, J. P., Peng, X. Z., & Mai, B. X. (2009). Occurrence of brominated flame retardants other than polybrominated diphenyl ethers in environmental and biota samples from southern China. *Chemosphere*, 74(7), 910–916. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.047>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Song, Y., Miao, J., Pan, L., & Wang, X. (2016). Exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) alters thyroid hormone levels and thyroid hormone-regulated gene transcription in manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Chemosphere*, 152, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.049>
- Souza, T. L., Batschauer, A. R., Brito, P. M., Oliveira Ribeiro, C. A., Martino-Andrade, A. J., & Ortolani-Machado, C. F. (2019). Multigenerational analysis of the functional status of male reproductive system in mice after exposure to realistic doses of manganese. *Food and Chemical Toxicology*, 133(May), 110763. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110763>
- Staskal, D. F., Hakk, H., Bauer, D., Diliberto, J. J., & Birnbaum, L. S. (2006). Toxicokinetics of polybrominated diphenyl ether congeners 47, 99, 100, and 153 in Mice. *Toxicological Sciences*, 94(1), 28–37. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl091>
- Sun, B., Hu, Y., Cheng, H., & Tao, S. (2019). Releases of brominated flame retardants (BFRs) from microplastics in aqueous medium: Kinetics and molecular-size dependence of diffusion. *Water Research*, 151, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.017>
- Sun, B., Liu, J., Zhang, Y. Q., Leung, K. M. Y., & Zeng, E. Y. (2021). Leaching of polybrominated diphenyl ethers from microplastics in fish oil: Kinetics and bioaccumulation. *Journal of Hazardous Materials*, 406, 124726. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124726>
- Suresh, N. (2009). Effect of cadmium chloride on liver, spleen and kidney melano macrophage centres in *Tilapia mossambica*. 30 (July), 254–256.
- Tavares, D., Paulino, M. G., Terezan, A. P., Batista Fernandes, J., Giani, A., & Fernandes, M. N. (2019). Osmoregulatory disturbance in Neotropical fish exposed to the crude extracts of the cyanobacterium, *Radiocystis fernandoi*. *Aquatic Toxicology*, 216(May), 105315. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105315>
- Thornton, L. M., Path, E. M., Nystrom, G. S., Venables, B. J., & Sellin Jeffries, M. K. (2016). Early Life Stage Exposure to BDE-47 Causes Adverse Effects on Reproductive Success and Sexual Differentiation in Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Science and Technology*, 50(14), 7834–7841. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02147>
- Usenko, C. Y., Robinson, E. M., Usenko, S., Brooks, B. W., & Bruce, E. D. (2011). PBDE developmental effects on embryonic zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(8), 1865–1872.

- <https://doi.org/10.1002/etc.570>
- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Lunardelli, B., de Oliveira, L. F., da Costa Cabrera, L., Risso, W. E., Primel, E. G., Meletti, P. C., Fillmann, G., & Bueno dos Reis Martinez, C. (2016). Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of the Total Environment*, 542, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.071>
- Wohlan, K., Goy, S., Olling, A., Srivaratharajan, S., Tatge, H., Genth, H., & Gerhard, R. (2014). Pyknotic cell death induced by *Clostridium difficile* TcdB: Chromatin condensation and nuclear blister are induced independently of the glucosyltransferase activity. *Cellular Microbiology*, 16(11), 1678–1692. <https://doi.org/10.1111/cmi.12317>
- Wolf, J. C., & Wheeler, J. R. (2018). A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. *Aquatic Toxicology*, 197(October 2017), 60–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.013>
- Wu, J. P., Wu, S. K., Tao, L., She, Y. Z., Chen, X. Y., Feng, W. L., Zeng, Y. H., Luo, X. J., & Mai, B. X. (2020). Bioaccumulation characteristics of PBDEs and alternative brominated flame retardants in a wild frog-eating snake. *Environmental Pollution*, 258, 113661. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113661>
- Wu, L., Li, Y., Ru, H., Xie, H., Yao, F., Ni, Z., & Zhong, L. (2019). Parental exposure to 2,2',4,4'5 - pentain polybrominated diphenyl ethers (BDE-99) causes thyroid disruption and developmental toxicity in zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 372(November 2018), 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.04.008>
- Yamamoto, F. Y., Garcia, J. R. E., Kupsco, A., & Oliveira Ribeiro, C. A. (2017). Vitellogenin levels and others biomarkers show evidences of endocrine disruption in fish species from Iguaçu River - Southern Brazil. *Chemosphere*, 186, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.111>
- Yamamoto, F. Y., Pereira, M. V. M., Lottermann, E., Santos, G. S., Stremel, T. R. O., Doria, H. B., Gusso-Choueri, P., Campos, S. X., Ortolani-Machado, C. F., Cestari, M. M., Neto, F. F., Azevedo, J. C. R., & Ribeiro, C. A. O. (2016). Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguaçu River (Southern Brazil). *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18111–18128. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6924-6>
- Yang, J., Zhao, H., & Chan, K. M. (2017). Toxic effects of polybrominated diphenyl ethers (BDE 47 and 99) and localization of BDE-99-induced cyp1a mRNA in zebrafish larvae. *Toxicology Reports*, 4(March), 614–624. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.11.003>
- Yu, L., Han, Z., & Liu, C. (2015). A review on the effects of PBDEs on thyroid and reproduction systems in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 219, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.12.010>
- Yu, L., Liu, C., Chen, Q., & Zhou, B. (2014). Endocrine disruption and reproduction impairment in zebrafish after long-term exposure to DE-71. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(6), 1354–1362. <https://doi.org/10.1002/etc.2562>
- Zhang, J., Wang, Y., Sun, K. M., Fang, K., & Tang, X. (2016). A study of oxidative stress induced by two polybrominated diphenyl ethers in the rotifer

- Brachionus plicatilis*. *Marine Pollution Bulletin*, 113(1–2), 408–413.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.032>
- Zhao, X., Ren, X., Ren, B., Luo, Z., & Zhu, R. (2016). Life-cycle exposure to BDE-47 results in thyroid endocrine disruption to adults and offsprings of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 157–167.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.004>
- Zhou, Z., Jian, X., Zhou, B., Lu, K., & Wang, Y. (2020). Changes in the immune function of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) provide insights into strategies against BDE-47 stress. *Journal of Hazardous Materials*, 392(January), 122212. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122212>

CAPÍTULO II

**Manuscript: Assessment of the effects of sub chronic exposure
of Nile tilapia to BDE-99**

Assessment of the effects of sub chronic exposure of Nile tilapia to BDE-99

Joelma Leão-Buchir ^{a, b}, Tugstênio Lima de Souza ^a, Luís Fernando Fávaro ^a, Claudemir Souza ^a, Patricia Manuitt Brito ^a, Juan Ramón Esquivel Garcia ^{d1}, Luíse Esquivel ^d, Francisco Filipak Neto ^a, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro ^a, Maritana Mela Prodocimo^{a*}.

^a Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 19031, CEP 81531-970, Curitiba-PR, Brazil

^b Departamento de Toxicologia Molecular e Ambiental, Centro de Biotecnologia-Universidade Eduardo Mondlane (CB-UEM), Maputo, Mozambique.

^c Programa de Pós-graduação em Ecotoxicologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Curitiba, CEP 81280-340Curitiba, PR, Brazil.

^d Estação de Piscicultura Panamá, Est. Geral Bom Retiro. Paulo Lopes - SC, CEP 88490-000, Brazil.

*Corresponding Author: Laboratório de Toxicologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

E-mail adress: maritana.mela@gmail.com (Maritana Mela Prodocimo)

Phone: +55 41984086171

¹in memorian.

*Este manuscrito será submetido à revista Aquatic Toxicology

Abstract

Brominated flame retardants (BFRs), among which polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) traditionally stand out, are organobromine compounds characterized by an inhibitory effect on combustion. Although PBDEs are known to disturb hormone signaling, the mechanisms underlying the effects of 2,2,4,4'-pentabrominated diphenyl ethers (BDE-99) in fish remain unclear. The aim of the present study was to assess the toxicity of BDE-99 under subchronic exposure in *Oreochromis niloticus* through a multi biomarker approach. For this, fishes were exposed to 0.294, 2.94, 29.4 ng. g⁻¹ of BDE-99 every 10 days for 80 days, via trophic. BDE-99 affected neither K nor HSI and GSI in female and male. Decreased levels of vitellogenin were observed in female fish, and no expression was observed in male plasma. Exposure to BDE-99 induced AChE activity in the muscle. Likewise, in the liver, CAT, PCO and LPO activity increased and GR activity was inhibited. The enzymes SOD, GPx, GST, G6PDH and NPT were not affected by BDE-99. In the brain, there was an increase in CAT activity while the activities of GPx and GR decreased. All concentrations tested did not affect the activities and levels of SOD, GST, G6PDH, NPT, PCO and LPO. By the IBR results, the interaction of oxidative and non-oxidative enzymes shown that the higher those cause the higher damage. Liver histopathology revealed vascular congestion, vacuolization of hepatocytes like steatosis, incidence of melanomacrophages centers and areas of necrosis. The kidney revealed pyknotic nucleus, necrosis, hemorrhage, presence of adipose tissue and incidence of melanomacrophage centers. The alterations observed in the liver and kidney led to an increase in the lesion index at intermediate and high doses in both organs. In the gonads, no morphological changes were observed. These results provided evidence of the deleterious effects of BDE-99 on *O. niloticus* after subchronic exposure.

Keywords: PBDE, *Oreochromis niloticus*, Vitellogenin, oxidative stress, histopathology.

1. Introduction

The increase in economic activity is leading countries to produce large quantities of waste electrical and electronic equipment (e-waste) on a large scale (Zhu et al., 2014; Chen et al., 2014). However, the techniques for disposing these wastes has produced serious environmental problems, especially in developing countries (Zhu et al., 2014; Chen et al., 2017). As a result, there is a growing concern about environmental contamination due to the intensive release of toxic chemicals, such as the persistent organic pollutant (Chen et al., 2017).

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), a class of bromide flame retardants chemicals, are used as additives in consumer appliances to reduce combustion processes. These compounds have a high lipophilicity, are environment persistent, and possess a potential of bioaccumulation (Albina et al., 2010; Alonso et al., 2010; Zhu et al., 2014; Arkoosh et al., 2017b; Chalifour & Tam, 2016; Díaz-Jaramillo et al., 2016b; Krieger et al., 2017; Lee et al., 2020; Li et al., 2020; Margolis et al., 2020; Montalbano et al., 2020; Pardo et al., 2020; Thornton et al., 2016; Wu et al., 2020; Yu et al., 2015). There are three main commercially mixtures available worldwide produced in formulations of penta-BDE, octa-BDE, and deca-BDE (Albina et al., 2010; Zhao et al., 2014; Barón et al., 2016; Song et al., 2016; Thornton et al., 2016; Yuan et al., 2016; Liu et al., 2020; Montalbano et al., 2020). In the European Union, commercial mixtures of penta- and octa-BDE were withdrawn from the market in 2005 due to the adverse effects observed in experimental animals. In north America, these formulations were voluntary withdrawn by the industry in 2004 (Van den berg et al., 2017). BDE-209, the major component of commercial deca-BDE has been discontinued by most manufacturers and its use has been banned in European union and north America (Han et al., 2017) but continues to be produced in India, China and Japan (Mi et al., 2017). Among 209 possible congeners, BDE-99 is one of the most common, persistent and widely detected PBDE in most environmental, food and human samples (Albina et al., 2010; Liu et al., 2020; Montalbano et al., 2020; Song et al., 2016; Thornton et al., 2016; Zhao et al., 2014). Several studies have been reported the toxicity of PBDE in neurodevelopmental, endocrine disruption and hepatic functions (Benedict et al., 2007; Yuan et al., 2016; Farzana et al., 2017; Li et al., 2020).

In order to evaluate toxicity from exposure to chemical pollutants, biomarkers can be used. Their use allows the detection of sublethal effects on organisms, allowing preventive action for the conservation of the ecosystems (Calado et al., 2019). Biomarkers can trigger mechanisms of estrogenic/antiestrogenic activity in response to estrogen signaling by binding to nuclear estrogen receptors present in hepatocytes (endocrine disrupting); can induce cellular redox imbalance due to excessive production of oxidants and impair antioxidant defenses leading to damage of biomolecules (oxidative stress-enzymatic and non-enzymatic activity) (Mela et al., 2013b; Yamamoto et al., 2017; Folle et al., 2020); and can induce morphological damage (histopathology) (Gutteridge and Halliwell, 2018; Wolf and Wheeler, 2018; Folle et al., 2020), resulting in physiological disorders.

Fish are considered good models for biomonitoring aquatic environments. Thus, for environmental toxicity studies it is important to consider species of fish to be used since different species may have different responses (Yamamoto et al., 2017). *Oreochromis niloticus* is a widely distributed freshwater fish that can persist in a highly polluted habitat and have the potential to develop as a biological monitor of environmental pollution (Carvalho et al., 2012; Moustafa et al. (2020). For this reason, the assessment of estrogenic, defense and damage responses in a resistant species becomes relevant in biomonitoring studies. Thus, the main goal of the present study was to investigate the effects of exposure to BDE-99 throughout 80 days, on the biological responses of *O. niloticus*.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

Sixty-four juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) were obtained from Panama Pisciculture Farm (Paulo Lopes city, Santa Catarina State, Brazil) (www.pisciculturapanama.com.br). The animals were randomly distributed in groups of sixteen individuals per treatment into 12 tanks (150 L) with a flow-through system, controlled water conditions and fed twice a day with commercial pellets (Poytara®) enhanced with carnitine, digestive enzymes and probiotics.

After 14 days of acclimation, fishes were exposed every 10 days during 80 days to a solvent control (maize oil), 0.294 ng. g⁻¹, 2.94 ng. g⁻¹ and 29.4 ng. g⁻¹ BDE-99 by gavage. Each treatment was conducted in triplicate. The tested doses were according to the PBDE concentrations (2.5 - 25 ng. g⁻¹) in fish species after environmental exposure ([Arkoosh et al., 2017](#); [Zhou et al., 2020](#)). All procedures were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) of UFPR (number 1200/2017).

2.2. Biological sampling

Ten days after the last gavage (80th day), the animals were anesthetized with MS222 (Sigma/Aldrich®), blood sampled from caudal vein and morphometry were determined. Fish were then euthanized by medullar section, the liver, kidney, gonads, brain and muscle were collected. Sample of liver, muscle, brain and plasma were stored at -80 °C for biochemical or molecular analysis, while kidney, liver and gonads samples were preserved for histopathological studies.

2.3. Somatic biomarkers

The condition index (K) was calculated as a relationship between length and weight as follow: $K = (\text{fish weight} / \text{fish length}^3) * 100$. The Hepatosomatic index (HSI) and gonadosomatic index (GSI) were measured from the proportional relationship between organ weight in relation to body mass, according to the following expressions: $HSI = (\text{liver wet weight} / \text{fish weigh}) * 100$ and $GSI = (\text{gonad wet weight} / \text{fish weigh}) * 100$ ([Ríos et al., 2017](#)).

2.4. Immunoassays

Sandwich indirect assays were carried out in polystyrene microplate (Maxisorb; Nunc, Roskilde, Denmark), coated with 100 µL of capture anti-vtg antibody diluted in coating buffer (50 mM bicarbonate/ carbonate pH 9.6) and incubated for 16 h at 4 °C. Nonspecific binding sites were blocked with 150 µL / well of the 2% (w/v) bovine serum albumin (BSA) (Sigma- Aldrich) in PBS 1x for 90 min at room temperature. For positive control, 286 µg/mL tilapia VTG and

purified induced male and non-induced male as negative control, were added to assay. Then, 100 μL diluted plasma samples (1:10) were incubated for 90 min at 37 °C. For primary detection, anti-VTG (0.74 $\mu\text{g/mL}$) was diluted to 1 $\mu\text{g/mL}$ and 100 μL /well of this solution were incubated for 60 min at 37 °C. The possible sample/antibodies interactions were detected by secondary antibody (100 μL of streptavidin conjugated with HRP peroxidase - 1:10.000) for 1 h at room temperature. After each incubation step, the plates were washed three times with PBS-T. The color reaction was developed by substrate TMB (3,3', 5,5-tetramethylbenzidine) for 20 min followed by addition of 50 μL /well of 2 M H_2SO_4 to reaction stop. The assay absorbance was measured in the Varioskan™ LUX Multimode Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific) at 450 nm.

2.5. Biochemical biomarkers

Liver was homogenized in Tris-buffer (20 mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA, pH 7.6, 1 mM PMSF); brain and muscle in potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5). The homogenate was centrifuged (20 min at 12,000 $\times g$ at 4 °C), the supernatants (10 μL) recovered and mixed to Bradford reagent (250 μL) in a 96-well microplate and absorbance measured at 595 nm. A standard curve of bovine serum albumin was used to determine the total protein concentration ([Bradford, 1976](#)).

2.5.1. Catalase (CAT)

Supernatant (20 μL , 0.3 mg protein/mL) was mixed with 180 μL of reaction medium (20 mM H_2O_2 , 50 mM Tris-base, 0.25 mM EDTA, pH 8.0) in a 96-well UV-star® microplates (Greiner Bio-One) and the absorbance decreased was immediately measured at 240 nm for 5 min. The molar extinction coefficient for H_2O_2 (40 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) was used to calculate catalase activity ([Aebi, 1984](#), with modifications).

2.5.2. Superoxide dismutase (SOD)

Liver and brain supernatant (30 μ L; 1.0 mg protein/mL) and 70 μ L of 572 μ M nitrotriazolium blue chloride (NBT) in 0.1 mM EDTA were mixed in a 96-well microplate. For the reference curve, the supernatant was replaced by Tris-EDTA buffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4). The reaction was initiated adding 100 μ L of hydroxylamine chloride in 0.5 M sodium carbonate, pH 10.2. The reduction of NBT by O_2^- to blue formazan was measured as a constant increase of absorbance at 560 nm for 30 min ([Kono, 1978](#)).

2.5.3. Glutathione S-transferase (GST)

Liver and brain supernatant (20 μ L; 1.0 mg protein / mL) were added to 96-well microplates, followed by the addition of reaction medium (180 μ L, 1.5 mM GSH (glutathione), 2.0 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 6.5. The absorbance increase was measured at 340 nm for 5 min and the molar extinction coefficient for CDBN ($9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) was used to calculate the GST activity ([Keen et al., 1976](#)).

2.5.4. Glutathione peroxidase (GPx)

Liver and brain supernatant (20 μ L; 1.0 mg / mL protein) was added to a 96-well microplate. Two reaction media were used: the first was prepared in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7) containing sodium azide (2 mM), NADPH (0.2 mM), GSH (2 mM), and 45 μ L of GR. The second medium contained sodium phosphate buffer (0.1M, pH 7.0) and 0.5 mM hydrogen peroxide. First, 140 μ L of the first reaction medium was added, followed by the addition of 40 μ L of the second medium. The absorbance decreased was immediately measured at 340 nm for 5 min, and the GPx activity was calculated using the molar extinction coefficient for NADH ($6.22 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ([Wendel, 1981](#)).

2.5.5. Glutathione disulfide reductase (GR)

Liver and brain supernatant (50 μ L; 1.0 mg/mL protein) was added in a 96-well microplate followed by 150 μ L of the reaction medium (0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.6, 0.5 mM NADPH and 5.0 mM GSSG). The absorbance decrease was immediately measured at 340 nm for 5 min, and the GR activity was calculated using the molar extinction coefficient for NADH ($6.22 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ([Sies et al., 1979](#)) ([Sies, 2015](#)).

2.5.6. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)

Liver and brain supernatant (30 μ L; 1.0 mg / mL protein) in homogenization buffer (20 mM Tris-HCl, 1.0 mM EDTA, pH 7.6, 1 mM PMSF) and white (Tris-EDTA) was pipetted in triplicate in 96-well plates. Then, 170 μ L of the reaction medium was added to each well and the increase in absorbance was immediately measured at 340 nm. The increase in absorbance caused by the reduction of NADP⁺ to NADPH by G6PDH ([Glock and McLean, 1953](#)).

2.5.7. Non-protein thiols (NPT)

Liver and brain supernatant protein precipitated with 10% trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged (1000 g, 4°C, 15 min). A volume of 50 μ L of supernatant were added into 96-well microplates, followed by 230 μ L of 0.4 M Tris-base buffer, pH 8.9 and 20 μ L of 2.5 mM DTNB. The absorbance was measured at 415 nm and NPT concentration was calculated based on a standard GHS curve ([Sedlak and Lindsay, 1968](#)).

2.5.8. Lipid peroxidation (LPO)

Liver and brain supernatant (200 μ L) were mixed with 800 μ L of the reaction medium (0.1 mM xylenol orange, 25 mM H₂SO₄, 4.0 mM butylated hydroxytoluene (BHT)) and 0.25 mM FeSO₄.NH₄ (ammonium ferrous sulfate) in 90% methanol. After 20 minutes at room temperature, centrifuge at 9.000 g for 10 min at room temperature and 200 μ L of supernatant were pipetted into 96-well

microplates, and absorbance was measured at 570 nm. The hydroperoxides concentration was calculated using the apparent molar extinction coefficient for H₂O₂ and cumene hydroperoxide of $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ([Jiang et al., 1992](#)).

2.5.9. Protein Carbonylation (PCO)

Liver and brain supernatant (200 μL ; 2.0 mg/mL protein) were mixed with 500 μL of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2 M HCl (test tube) and 2 M HCl (blank). and kept at 34 °C for 90 minutes. After incubation, 1 mL of 28% trichloroacetic acid (TCA) was added and the microtubes were (9.000 g, 4°C, 10 min). Pellet was resuspended with 1 mL of ethyl acetate/ethanol (1:1), mixed and centrifuge (9.000 g, 4°C, 10 min), procedure repeated three times until supernatant became clear. The pellet was resuspended in 500 μL of 6 M guanidine hydrochloride, centrifuged (9.000 g, 4°C, 10 min). Supernatant (200 μL) were added to a 96-well microplates and absorbance reading at 360 nm. The molar extinction coefficient for hydrazone ($2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ([Levine et al., 1994](#)).

2.5.10. Acetylcholinesterase (AChE)

Muscle and brain supernatant (20 μL ; 1.0 mg protein/mL) were added to a 96-well microplate followed by 130 μL of 0.75 mM DTNB in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5). Then 50 μL of 9 mM acetylcholine iodide (in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.5) was added and the reading of absorbance was performed at 405 nm for 5 min. Molar extinction coefficient of 2-nitrobenzoate-5-mercaptothiocholine ($13.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) was used to calculate the activity of AChE ([Ellman et al., 1961](#)).

2.6. Integrated response of biochemical biomarkers (IBR)

In order to evaluate which dose cause main changes in biochemical dynamics, the methodology described by [Beliaeff and Burgeot \(2002\)](#) and modified by [Sanchez et al. \(2013\)](#) was applied to assess the integrated biomarker response (IBR). The results obtained through the analysis were divided by the

corresponding control group, followed by logarithmized transformations to reduce the variance. From the log-transformed data (Y_i), the mean (μ) and the standard deviation (sd) were calculated. The Y_i values were standardized by the equation $Z_i = (Y_i - \mu) / \text{sd}$ to apply for each treatment and the difference between the treated and the control group ($Z_i - Z_0$) was used to define the deviation index of the biomarker (A). The results were plotted on a radar chart, where values above or below zero (control) indicate the stimulus or inhibition of a given biomarker. For the calculation of the IBR index of each group, the values of (A) were converted to absolute numbers (S) and summed.

2.7. Histopathological biomarker

For morphological analyses, liver, kidney and gonads were fixed in ALFAC (85% ethanol, 10% formaldehyde and 5% glacial acetic acid) for 16 h, dehydrated in a graded series of ethanol, diaphanized in xylol and included in Paraplast® in a Micron® Tissue Processor ([Oliveira Ribeiro et al., 2012](#)) ([Mela, et al., 2013](#)). Sections of 5 μm thick were obtained using a semi-automatic microtome Leica™, stained with hematoxylin/eosin and the images registered by an Olympus BX51 Microscope from the Center for Advanced Fluorescence Technologies (CTAF-UFPR). Lesion indexes were estimated according to [Bernet et al. \(1999\)](#), modified by [Mela, et al. \(2013a\)](#) using the following equation: $LI = \sum_{rp} \sum_{alt} (a \times w)$, where: rp = reaction pattern; alt = alteration; a = score value and w = importance factor.

For ultrastructure analysis, liver samples were fixed in Karnovsky's solution (2,5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, 0.05 M sodium chloride in 0.1 M cacodylate, pH 7.4) for 2 h, washed in cacodylate buffer for 30 min, post-fixed in 2 % osmium tetroxide for 1 h and washed again. Another post-fixation in 2 % uranyl was done. The specimens were then dehydrated in ascending ethanol series (Merck®), and finally embedded in series of propylene oxide, propylene oxide + resin (1:1), propylene oxide + resin (1:2) and resin. Tissue blocks were sectioned on ultramicrotome using glass knives. Semi-thin sections (0.3–0.5 μm) were obtained, stained with 1% toluidine blue and were examined by light microscope to define the desired area for ultrastructural investigation. Ultrathin sections were mounted on copper grids and double stained with aqueous uranyl

acetate for 10 min and lead citrate for 2 min. Grids were examined in a transmission electron microscope (JEOL JEM-1400 Plus).

2.8. Statistical analysis

The data were tested for normality through the Kolmogorov-Smirnov test and homoscedasticity using the Barlett test and analyzed by one-way or two-ways analysis of variance (ANOVA), when applicable, followed by Dunnet or Student Newman Keuls (SNK) *post hoc test*, respectively. All data were presented as mean $\pm$ standard deviation and p values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Somatic biomarkers

All somatic biomarkers did not show significant difference between treatments and the corresponding control group (Table 1).

Table 1

Condition index (K), Hepatosomatic index (HSI) and Gonadosomatic index (GSI) from *O. niloticus* after trophic and subchronically exposure to BDE-99.

Parameter	BDE-99 (ng. g ⁻¹)			
	Control	0.294	2.94	29.4
K	1,745 $\pm$ 0.17	1,719 $\pm$ 0.12	1,796 $\pm$ 0.18	1,738 $\pm$ 0.15
HSI	1,637 $\pm$ 0.47	1,918 $\pm$ 0.53	2,274 $\pm$ 1.12	2,148 $\pm$ 0.91
GSI	2,293 $\pm$ 1.78	1,966 $\pm$ 1.49	1,707 $\pm$ 1.27	2,529 $\pm$ 1.97

Mean $\pm$ Standard deviation. ANOVA two-ways, *post hoc*: Student Newman Keuls.

3.2. Immunodetection of Vitellogenin

The Vtg levels in the plasma of females decreased with increasing dose of BDE-99, showing the presence of antiestrogenic activity by exposure to the

pollutant (Fig. 1A). However, in male fish vtg was not detected in the control and all treated groups, indicating non-estrogenic action of BDE-99 in males (Fig. 1B).

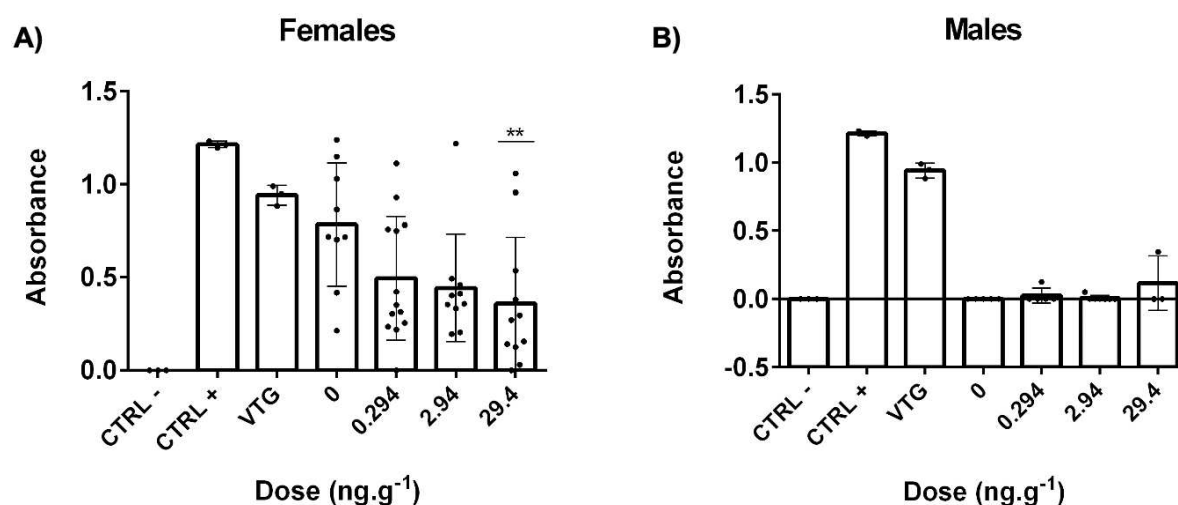


Fig. 1. Vitellogenin detection by ELISA in female (A) and male (B) plasma sample of *O. niloticus* exposed to BDE-99 (0.294, 2.94 and 29.4 ng. g⁻¹). * Values differ significantly from control group. ANOVA two-ways, *post hoc*: Student Newman Keuls.

3.3. Biochemical biomarkers

The results obtained from biochemical biomarkers for neurotoxicity in the brain and muscle are shown in figure 2. In the brain, the enzyme acetylcholinesterase (AChE) did not differ significantly the doses tested (Fig. 2A). However, in muscle, AChE had its activity increased at the highest dose (Fig. 2B).

Some changes were observed for enzymatic and non-enzymatic oxidative stress markers in the liver. Catalase showed a significant increase in activity at doses of 2.94 and 29.4 ng. g⁻¹ (Fig. 3A). The enzyme superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) did not undergo significant changes (Fig. 3B and C). However, glutathione disulfide reductase (GR) had its activity significantly reduced at a dose of 29.4 ng. g⁻¹ (Fig. 3D). None of the treatments was able to cause changes to glutathione S-transferase (GST), glutathione-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and non-protein thiols (NPT) in the different groups (Fig. 3E, F and G). From the non-enzymatic biochemical markers, a significant increase in protein carbonylation (PCO) levels was

observed in the treatment with 2.94 ng. g⁻¹ (Fig. 3H) and lipid peroxidation (LPO) decreased at doses of 2.94 and 29.4 ng. g⁻¹ (Fig. 3I).

In the brain, there was an increase in CAT activity at the highest dose (29.4 ng. g⁻¹ (Fig. 4A). For SOD there were no significant changes in its activity (Fig. 4B). The enzyme GPx had its activity reduced at a dose of 2.94 ng. g⁻¹ (Fig. 4C), the same effect was observed for GR, but at the lowest and highest doses (Fig. 4D). In contrast, the GST did not show significant changes (Fig. 4E). The G6PDH enzyme did not change significantly (Fig. 4F). In all doses tested, no significant differences were observed for non-enzymatic markers (NPT, PCO and LPO) (Fig. 4G, H and I).

The relation of all markers of the oxidative stress cycle in the liver and brain is summarized in figures 3J and 4J, respectively.

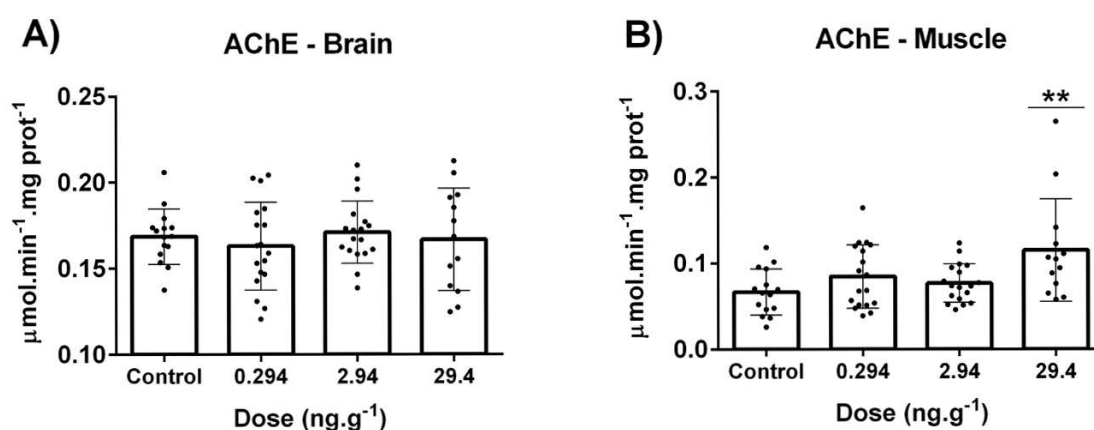


Fig. 2. Acetylcholinesterase activity (AChE): A) Brain; B) Muscle. ** = $p < 0.01$ (ANOVA - *post hoc* test: Student Newman Keuls).

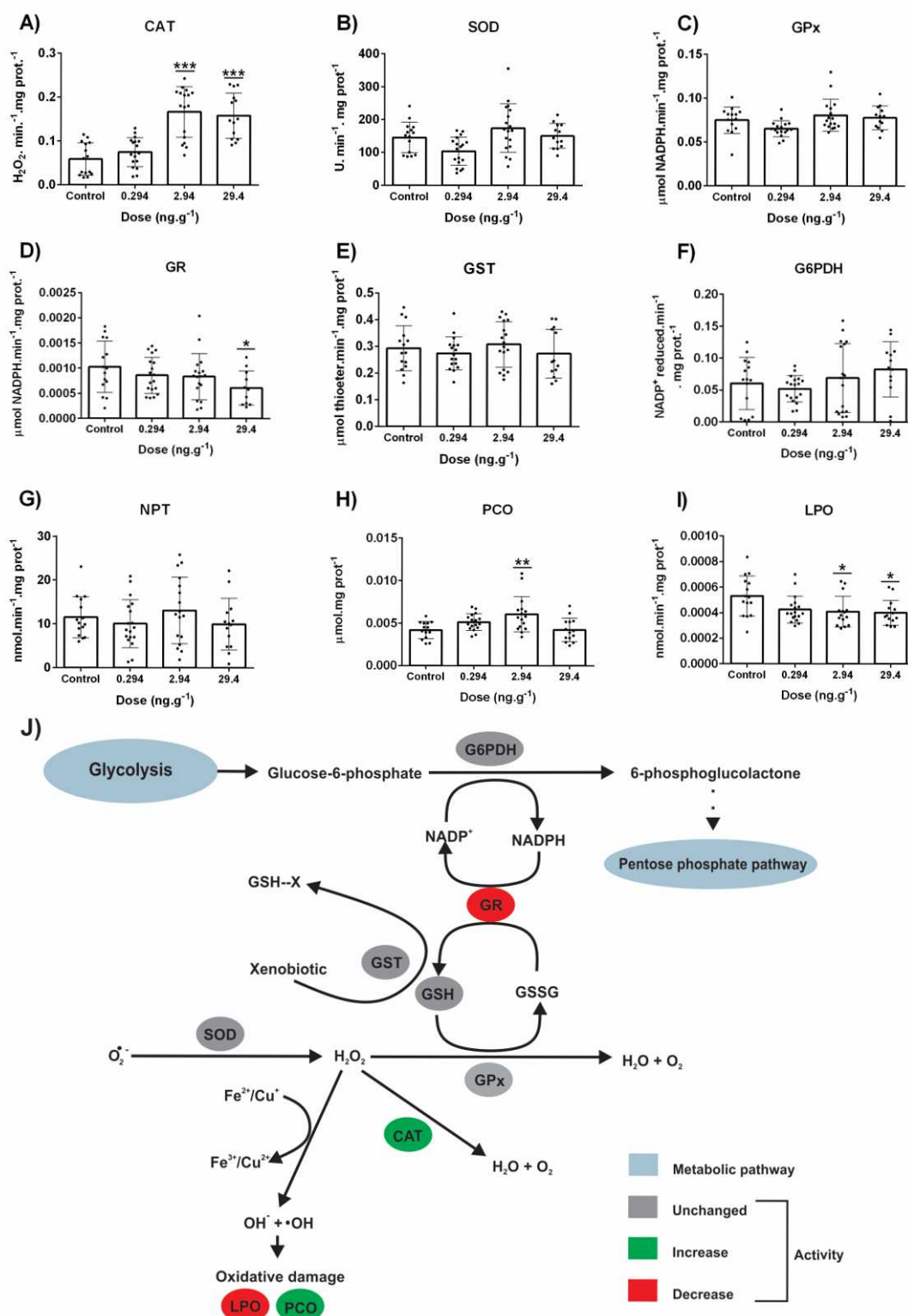


Fig. 3. Biochemical biomarkers in the liver after subchronic exposure of *O. niloticus* to BDE-99. A) Catalase (CAT). B) Superoxide dismutase (SOD). C) Glutathione peroxidase (GPx). D) Glutathione disulfide reductase (GR). E) Glutathione S-transferase (GST). F) Glutathione-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). G) Non-protein thiols (NPT). H) Protein carbonylation (PCO). I) Lipid peroxidation (LPO). J) BDE-99 action on hepatic antioxidant system (Adapted from Souza et al. (2020). * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$ (ANOVA teste *post hoc* Dunnet).

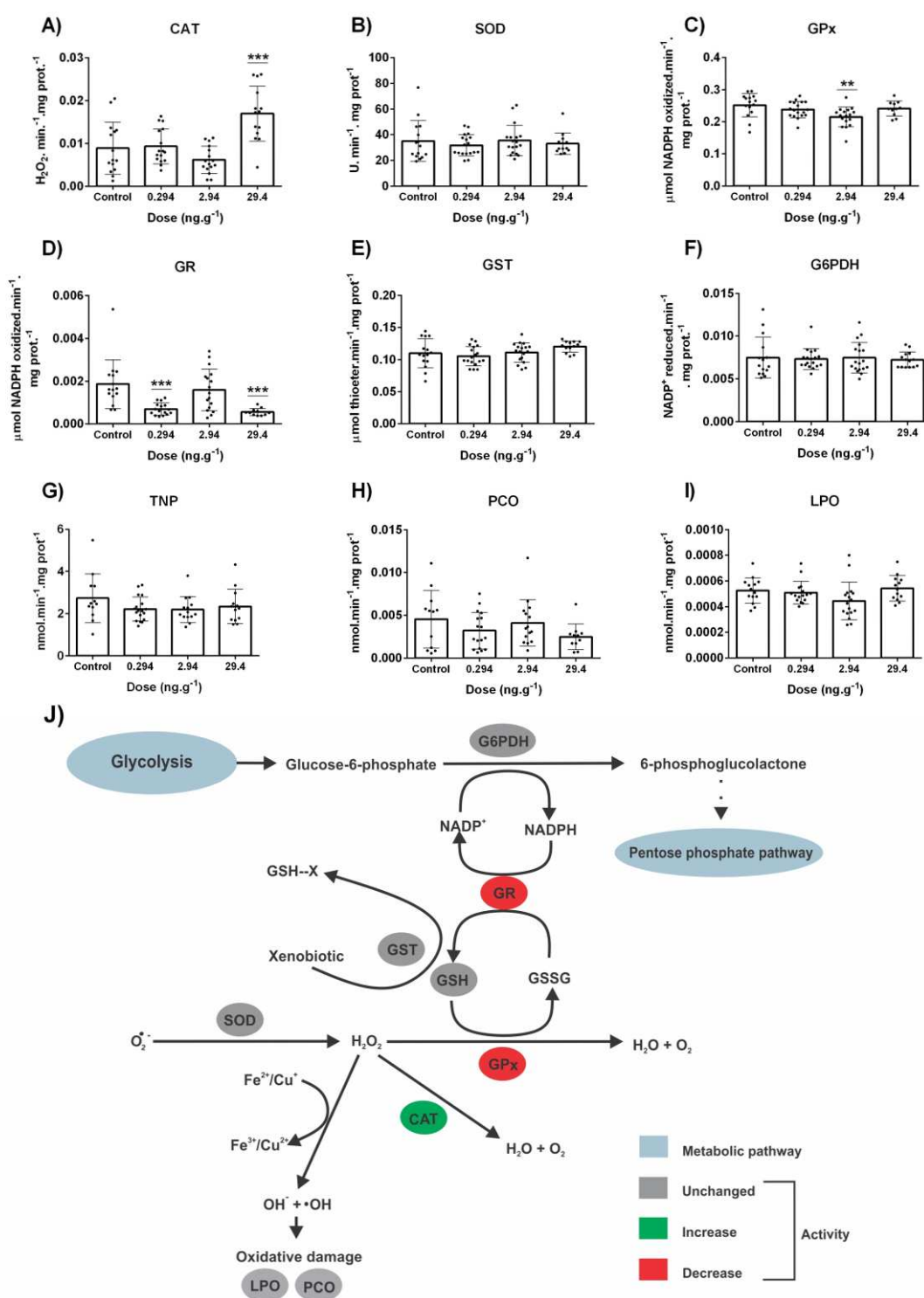


Fig. 4. Biochemical biomarkers and mechanism of oxidative stress induction in the brain after subchronic exposure of *O. niloticus* to BDE-99. A) Catalase (CAT). B) Superoxide dismutase (SOD). C) Glutathione peroxidase (GPx). D) Glutathione disulfide reductase (GR). E) Glutathione S-transferase (GST). F) Glutathione-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). G) Non-protein thiols (NPT). H) Protein carbonylation (PCO). I) Lipid peroxidation (LPO). J) BDE-99 action on

brain antioxidant system. Adapted from Souza et al. (2020). ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$ (ANOVA teste *post hoc* Dunnet).

3.4. Integrated biomarker response (IBR)

The values obtained for the analysis of IBR for each organ and different treatments are shown in figure 5. From these data it was possible to observe that, individually, the different treatments affected the different organs (2.94 ng. g⁻¹ for the liver and 29.4 ng. g⁻¹ for the brain). Furthermore, from the sum of the individual IBR results, it was revealed that the greatest changes in biochemical biomarkers were caused by exposure to the highest dose of BDE-99 (IBR = 23.7).

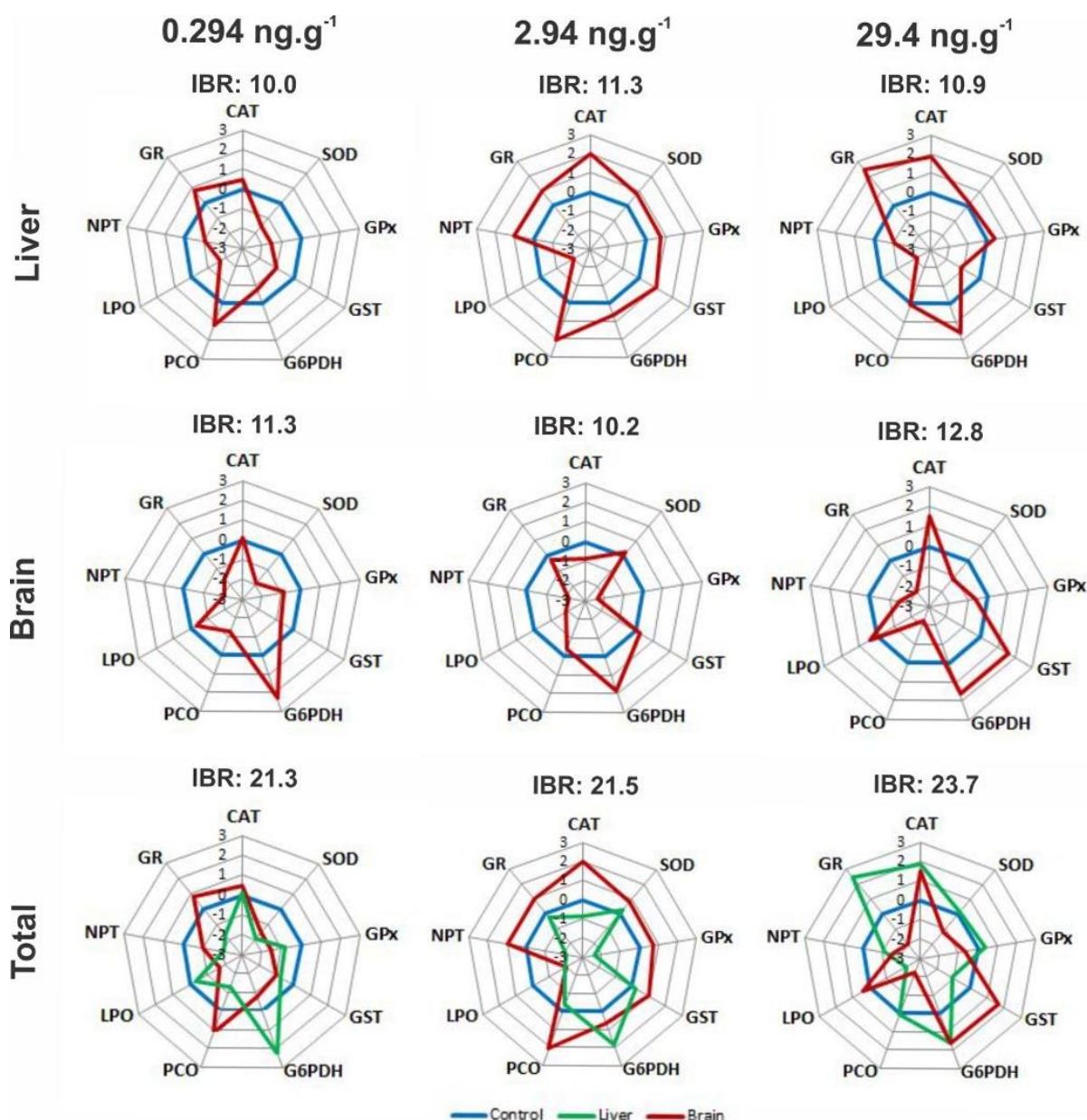


Fig. 5. Integrated biomarker response index analyzed in the liver and brain and the interaction of both. CAT: Catalase; SOD: Superoxide dismutase; GPx: Glutathione peroxidase; GR: Glutathione disulfide reductase; GST: Glutathione S-transferase; G6PDH: Glutathione-6-phosphate dehydrogenase; NPT: Non-protein thiols; PCO: Protein carbonylation; LPO: Lipid peroxidation.

3.5. Histopathological biomarker

According to Bernet lesion index for liver samples, the higher index was observed in fishes exposed to 2.94 and 29.4 ng. g⁻¹ of BDE-99 ($p < 0.0001$ and $p < 0.001$) in relation to control (Fig. 6A). The occurrence of some important histopathological findings, such as, vascular congestion, revealed systemic

disorders, while steatosis is associated with physiological changes. The incidence of melanomacrophages centers are related to inflammatory events and necrosis areas are indicative of irreversible damage (Fig. 6B to E). The ultrastructure of liver confirmed the normal liver arrangement of fish from the control group, showing the entire preserved structure (Fig. 7).

The lesion index in the renal tissue was higher in the groups treated with 2.94 ng. g⁻¹ and 29.4 ng. g⁻¹ ($p < 0.0001$) when compared to the control group (Fig. 8A). Pyknotic nucleus, necrosis, hemorrhage, presence of adipose tissue and incidence of melanomacrophage centers were frequent alterations in the kidney (Fig. 8B to G).

In the gonads, morfological changes were not observed in any of the exposure doses (Fig. 9).

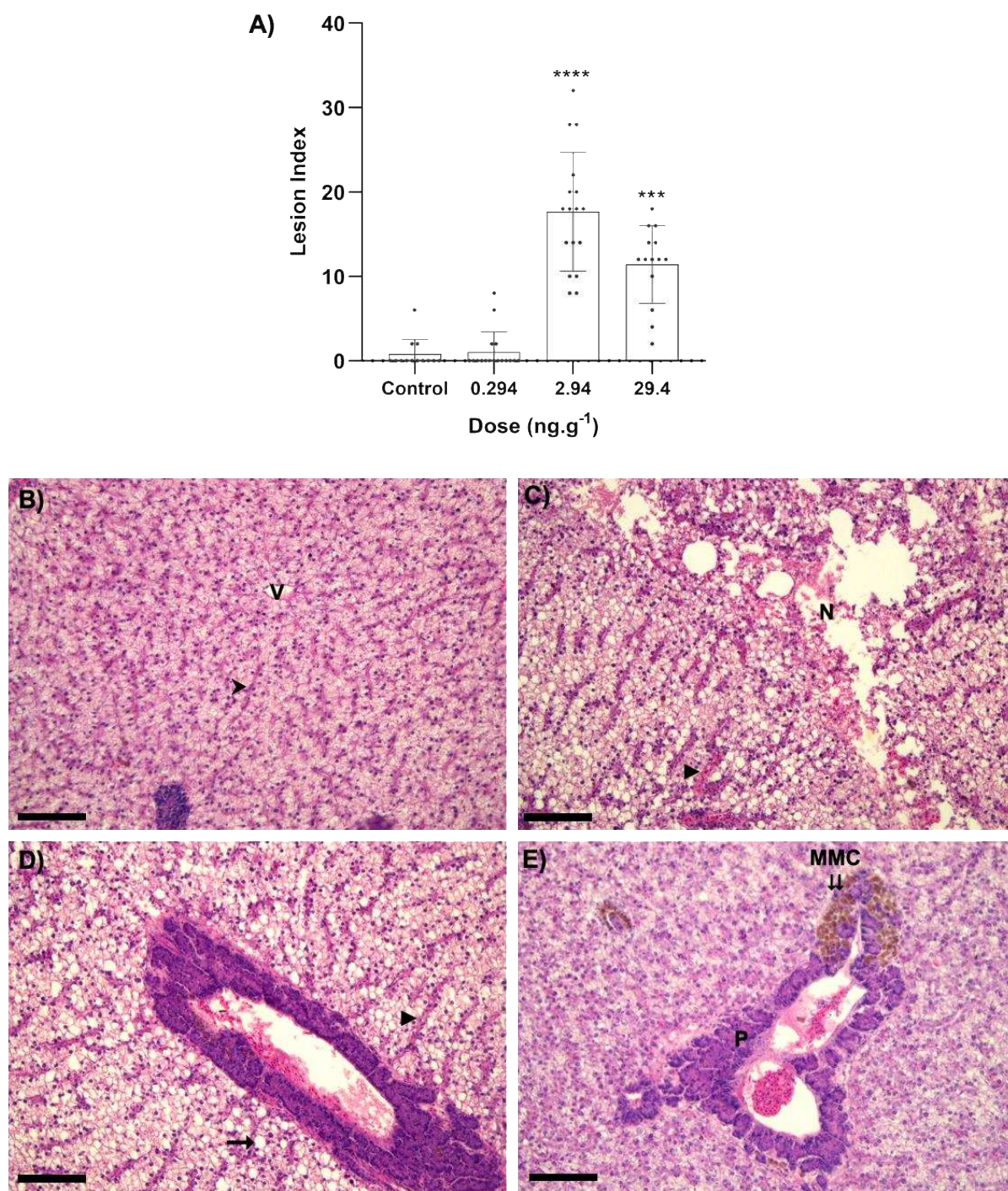


Fig. 6. Histological liver sections of *O. niloticus* exposed to BDE-99 (0.294, 2.94 and 29.4 ng. g⁻¹). **(A)** Lesion index. *** = $p < 0.001$, **** = $p < 0.0001$. **(B)** Liver of control group. Blood vessel (V) and Sinusoids (►). **(C)** Liver exposed group (2.94 ng. g⁻¹). Vascular congestion (►) and Areas of necrosis (N). **(D)** Liver exposed group (0.294 ng. g⁻¹). Steatosis (→) and Vascular congestion (►). **(E)** Liver exposed group (29.4 ng. g⁻¹). Melanomacrophages centers (⇓ MMC) and Pancreatic tissue (P). Scale bars = 100 μ m.

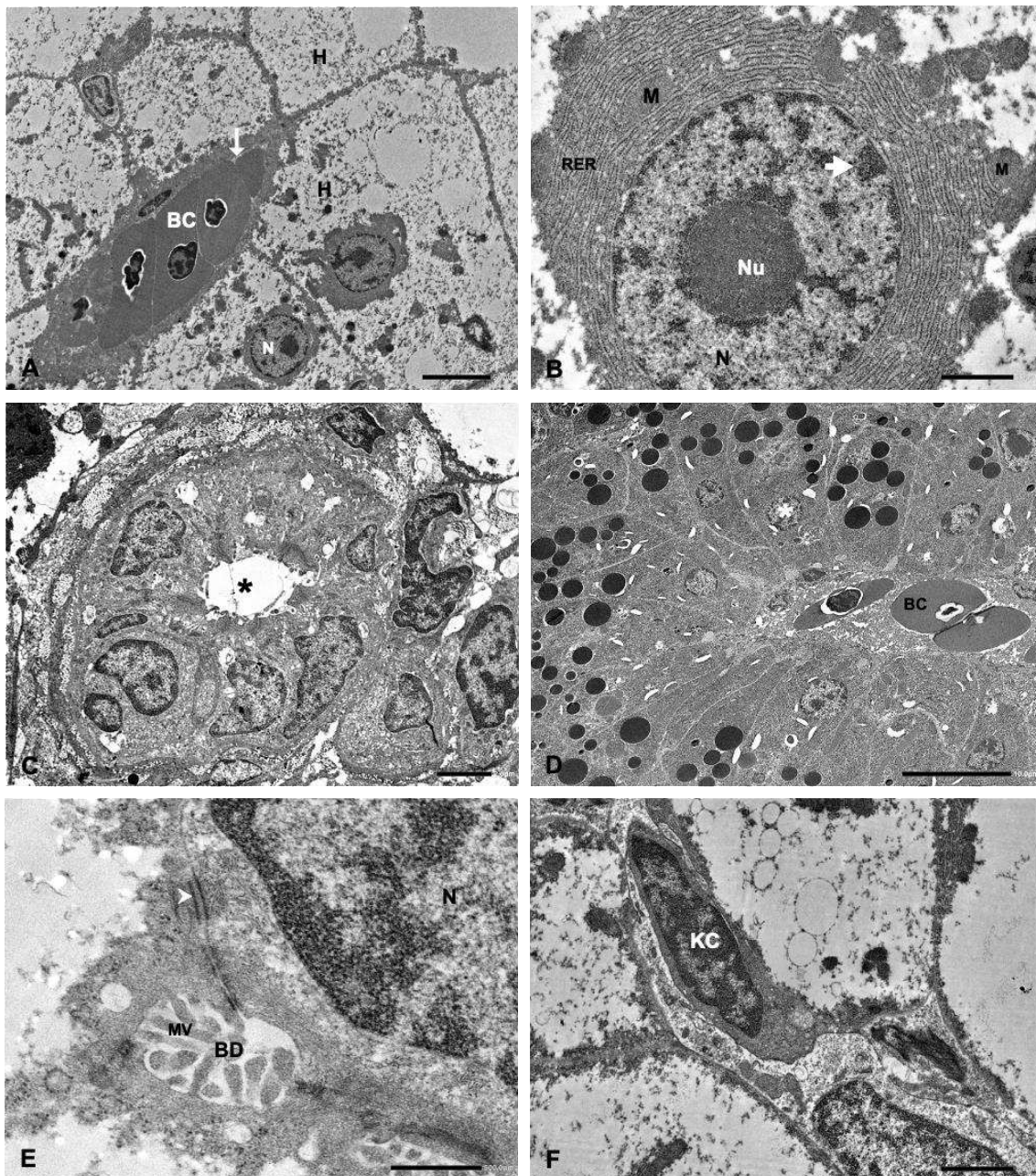


Fig. 7. Ultrastructure of liver in *Oreochromis niloticus* under control conditions. **(A)** Note the normal structure of the hepatic parenchyma. Polygonal hepatocyte of uniform size (H) with nucleus (N) contained one prominent nucleoli (Nu), lobular center vein (↓) with aggregation of blood cells (BC). Scale bar: 5.0 μ m. **(B)** Nucleus of hepatocytes with spherical appearance (N), nucleoli (Nu), heterochromatin (▶), numerous mitochondria scattered in the cytoplasm (M) and a well-developed rough endoplasmic reticulum (RER) arranged in parallel stacks at the lateral border of the hepatocyte nucleus. Scale bar: 1.0 μ m. **(C)** Bile duct (*) with epithelial cells, surrounded by connective tissue. Scale bar: 2.0 μ m. **(D)** Pancreatic acinar cells (*) with rounded nucleus in the basal portion and zymogen granules concentrated apically (▶). The Pancreatic tissue is involving a vessel filled with blood cells (BC). Scale bar: 10.0 μ m. **(E)** Hepatocytes join each other by tight junctions, the desmosomes (▶), nucleus of hepatocyte (N) and high magnification showing bile duct (BD) originating by adjacent hepatocytes. Note the microvilli (MV) filling the biliar canaliculus. Scale bar: 500.0 nm. **(F)** Large macrophages or Kupffer cells (KC) in the sinusoid (S). Scale bar: 2.0 μ m.

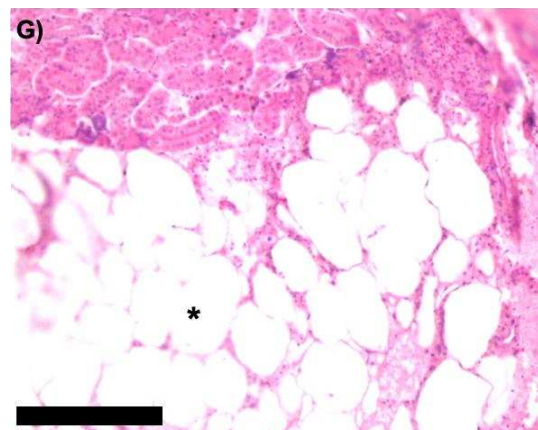
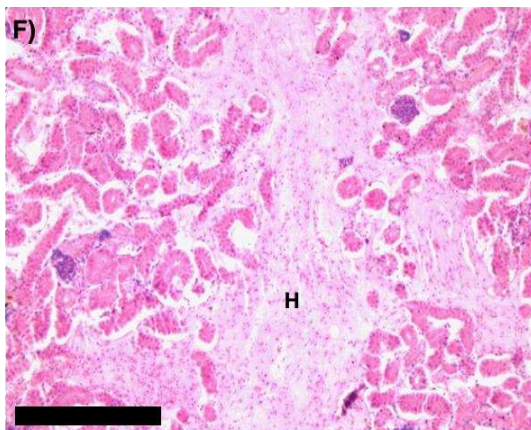
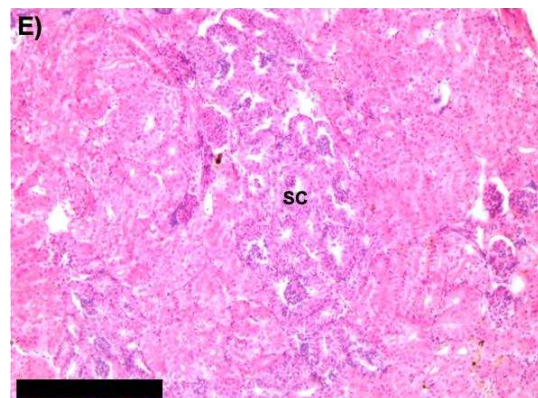
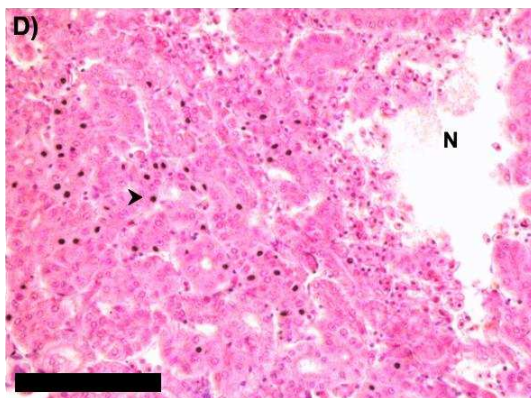
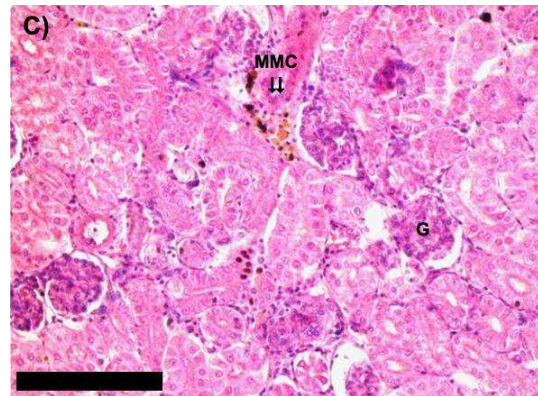
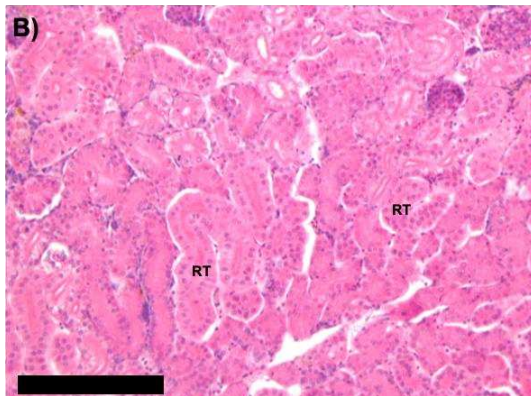
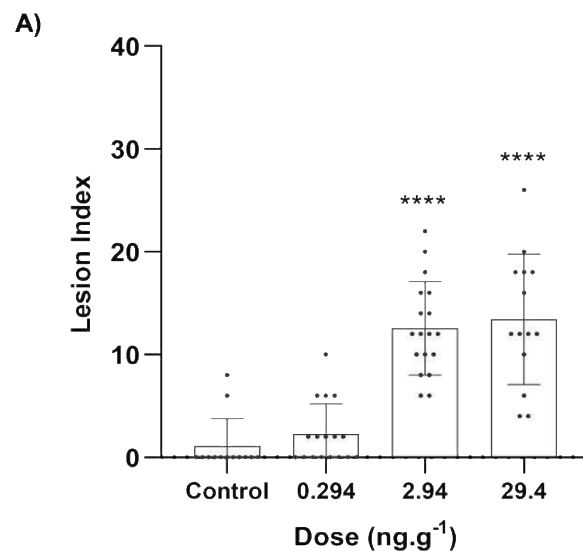


Fig. 8. Kidney sections of *O. niloticus* after BDE-99 exposure. **(A)** Lesion index. **** = $p < 0.0001$. **(B)** Kidney without alterations. Renal parenchyma with renal tubules (RT). **(C)** Glomerulus (G) and Melanomacrophages centers ($\Downarrow$ MMC). **(D)** Pyknotic nucleus ($\blacktriangleright$) and Area of necrosis (N). **(E)** Corpuscle of Stannius. **(F)** Hemorrhage. **(G)** Adipose tissue (*). Scale bars = 100 μ m.

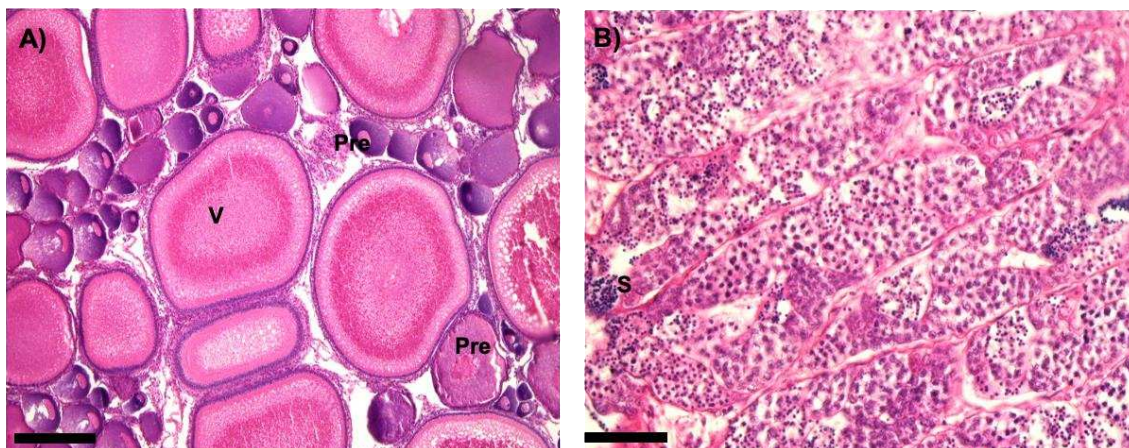


Fig. 9. Histological sections of *O. niloticus* gonads. Gonads of control group: **A)** Normal mature ovary with previtellogenic (Pre) and vitellogenic oocytes (v). **B)** Normal structure of testes with spermatocytes and spermatozoa (S) in the lumen of seminiferous tubules. Scale bars = 100 μ m.

4. Discussion

The results of the current study show evidences of BDE-99 toxicity at morphological, oxidative and endocrine level. The Condition factor (K) is an indicator of the general health status of the fish (Ríos et al., 2017; Baudou et al., 2019) and varies not only according to exposure to xenobiotics but also with the amount of fat, development of gonads, degree of parasitism, disease, nutritional level and susceptibility to environmental changes (Barni et al., 2016; Dalzochio et al., 2016). Ameur et al. (2015) described in a study carried out with fish from a lagoon impacted by different chemicals, including PBDE, the absence of variation in the condition factor, result that corroborate with our finding in the present study.

The absence of effects in the gonadosomatic index and histology evidenced that gonads mass and structure are not affected, although disturbs in the expression of vitellogenin in female from groups exposed to BDE-99 were evidenced. This finding suggests potential endocrine disruption in female of *O. niloticus*. The result is in line with Folle et al. (2020) in a study where TBP was

not shown alterations in GSI and estrogenic action was observed in female and male tilapia.

AChE is an enzyme responsible for the degradation of acetylcholine in choline and acetic acid (Dey et al., 2016; Mela, et al., 2013b). Regarding its increased activity in the muscle, it may be indicative of the fish's attempt to compensate for the stress caused by BDE-99. However, this increase in activity can influence the cholinergic neurotransmission process and induce lipid peroxidation levels. Similar results were also observed by Dey et al. (2016) in studies carried out with teleost fish exposed to glyphosate herbicide.

In both the liver and the brain, we observed that SOD activity was not altered. This result may be related to the increase in CAT activity that was also observed in the two organs and the decrease in GPx that was only registered in the brain. These enzymes are involved in the process of preventing oxidative damage by eliminating hydrogen peroxide and its potential for conversion to a hydroxyl radical Souza et al. (2019); Lowe et al. (2012), which also explains the non-alteration of LPO levels in the brain as well as reducing its levels in the liver. The reason why GPx in the liver has not changed explains the findings in this tissue of elevated PCO levels. However, with increased CAT activity, the H₂O₂ detoxification process can be supplied, increasing the capacity to eliminate reactive oxygen species (EROD). Similar results have been reported by Ghosh et al. (2013), in studies involving exposure of *Trematomus bernacchii* to the mixture of 8 PBDEs congeners.

GST activity, an important phase II enzyme involved in the metabolism of xenobiotics, was not significantly affected in both the liver and the brain. According to Souza et al. (2020), this enzyme uses reduced glutathione (GSH) as a co-factor, which is the main type of NPT, to make toxic metabolites more soluble and easily excreted. Since the levels of NPT were not affected in the liver and brain, it explains the fact that we did not observe any change in GST activity as well indicating that this mechanism was not activated to avoid injuries in hepatic tissues. This result is in line with reported by Folle et al. (2020) where alterations in this enzymes were not observed in tilapia exposed to TBP.

The reduction in the activity of hepatic and cerebral GR, an enzyme responsible for catalyzing the reduction of GSSG in GSH, used by GPx or GST, is related to the decrease in cellular levels of NADPH, due to the low metabolic

activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase, enzyme responsible for recycling NADP⁺ generated by GR activity, in NADPH. In the liver and brain, G6PDH activity was not significantly affected. This explains the non-alteration of the levels of NPT, with no need to reestablish them and consequently did not interfere in the activity of GST and GPx.

The application of IBR in biochemical biomarkers proved to be relevant in determining the dynamics of the redox action in the presence of BDE-99. The IBR values demonstrated that the action of enzymatic and non-enzymatic markers of oxidative stress on organs studied is affected by the different doses used. However, when sum the indexes of both organs for each treatment, it was possible to verify that these organs suffer variations in the biochemical parameters when fish are exposed to highest dose of BDE-99, corroborating with studies conducted by [Perussolo et al. \(2019\)](#) and [Souza et al. \(2020\)](#).

The hepatic tissue of *O. niloticus* in the control group showed a typical pattern already described for most teleost fish (a homogeneous liver tissue with polyhedral sinusoid and hepatocytes arranged in cords showing peripheral nuclei ([Mela, et al., 2013b](#)). Alterations observed in the liver, such as dilatation of the sinusoids, reflect circulatory disturbance. Necrosis is related to increased levels of lipid peroxidation and reflects irreversible structural and functional damage ([Mela, et al., 2013b](#); [Oliveira et al., 2019](#)). Steatosis suggest loss of liver function with alteration of hepatic metabolism by hepatocytes. Melanomacrophage centers are indicative of an inflammatory response to detoxification of xenobiotics ([Mela, et al., 2013b](#)). The histopathological changes in the liver reported in the present study corroborate the hepatic effects of BDE-47 in *Psetta maxima* described by [Barja-Fernández et al. \(2013\)](#) of BDE-47, 99 e 209 in zebrafish described by [Zezza et al. \(2019\)](#). However, in that study, necrosis was not observed, an alteration that was observed in the presente study. These lesions are related to oxidative stress induced by BDE-99, according to [Zezza et al. \(2019\)](#) this pollutant affects phase II metabolizing enzymes. Hepatic metabolism is na important process when xenobiotics competes with endogenous compounds, a situation which may disrupt the endocrine system ([Yang and Chan, 2015](#)).

In the kidney, in addition to some similar changes observed in the liver, the presence of pycnotic nuclei was also observed, a finding that results from the

sum of oxidative stress and DNA damage, leading to the process of migration of blood leukocytes to the renal tissue. Interstitial hemorrhage has also been observed and this disorder suggests impairment in the vascular process (Perussolo et al., 2019). Like the liver, the Kidney play an important role in metabolism and excretion of toxic compounds (Perussolo et al., 2019). The kidney lesion index confirmed the toxicity of BDE-99 by the presence of leukocyte infiltration and MMC, characterizing inflammatory response process. Associated to this, these alterations can lead to irreversible damage by formation of necrosis (Salgado et al., 2019). This finding is corroborating by Zhou et al (2020) in a study conducting with *Oncorhynchus mykiss* using BDE-47. According to Folle et al. (2020), the occurrence of hemorrhage is an indicative of systemic disorders. The disturbance in lipidic metabolism is associated with the presence of adipose tissue Mela et al. (2013b) and pyknotic nucleus may be related to necrotic areas, alteration that was observed in the present study. (Fernandez et al., 2011; Wolf and Wheeler, 2018; Perussolo et al., 2019).

In addition to analyzing reproductive effects, gonad morphology is used to evaluate fish health. Studies have reported changes such as inter-sex in fishes exposed to xenobiotics, including PBDE and consequently changes in vitellogenin expression (Adeogun et al., 2016). In the present study, no alterations in gonads were observed, but changes in vtg levels were observed in female. According to Yamamoto et al. (2016), changes in vtg levels are not directly related to changes in gonads morphology, a result found in studies in fishes collected from impacted areas, with is in line with our finding.

5. Conclusion

This study demonstrated, through realistic environmental doses, the toxicity of BDE-99 in *O. niloticus* even in low doses. Sub chronic exposure, caused changes in the antioxidant system of the liver and brain. The neurotoxic potential can be related to alterations in muscle enzyme activity. Although histopathological alterations were not observed in the gonads, changes in the liver promoted a decrease in the levels of vitellogenin in female fishes, indicating the xenoestrogenic action of BDE-99. In addition, the multibiomarker approach

represent an efficient strategy to fully assess the environmental effects of pollutants on fish health.

Funding

This work was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, finance code 001).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments and funding

The authors are grateful to Professor Marco Randi, Yuri Gonçalves, Roberta Pozzan, Aliciane Roque, Jessica Luz, Tobias Moraes and Luiza Barreto for assistance with fish maintenance and technical support during the experiments.

References

- Abdalla, F. H., Cardoso, A. M. H., Pereira, L. B., Schmatz, R., Gonçalves, J. F., Stefanello, N., Fiorenza, A. M., Gutierrez, J. M., Da Silva Serres, J. D., Zanini, D., Pimentel, V. C., Vieira, J. M., Schetinger, M. R. C., Morsch, V. M., & Mazzanti, C. M. (2013). Neuroprotective effect of quercetin in ectoenzymes and acetylcholinesterase activities in cerebral cortex synaptosomes of cadmium-exposed rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 381(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1659-x>
- Adeogun, A. O., Onibonoje, K., Ibor, O. R., Omiwole, R. A., Chukwuka, A. V., Ugwumba, A. O., Ugwumba, A. A. A., & Arukwe, A. (2016). Endocrine-disruptor molecular responses, occurrence of intersex and gonadohistopathological changes in tilapia species from a tropical freshwater dam (Awba Dam) in Ibadan, Nigeria. *Aquatic Toxicology*, 174, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.002>
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*, 105(C), 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Agius, C., & Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Letters in Drug Design & Discovery*, 26, 499–509.

- <https://doi.org/10.2174/157018081503180131102747>
- Aguila, M. B., Pinheiro, A. R., Aquino, J. C. F., Gomes, A. P., & Mandarin-De-Lacerda, C. A. (2005). Different edible oil beneficial effects (canola oil, fish oil, palm oil, olive oil, and soybean oil) on spontaneously hypertensive rat glomerular enlargement and glomeruli number. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 76(1–4), 74–85. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2004.12.003>
- Albina, M. L., Alonso, V., Linares, V., Bellés, M., Sirvent, J. J., Domingo, J. L., & Sánchez, D. J. (2010). Effects of exposure to BDE-99 on oxidative status of liver and kidney in adult rats. *Toxicology*, 271(1–2), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.03.006>
- Ali, A. O., Hohn, C., Allen, P. J., Ford, L., Dail, M. B., Pruett, S., & Petrie-Hanson, L. (2014). The effects of oil exposure on peripheral blood leukocytes and splenic melano-macrophage centers of Gulf of Mexico fishes. *Marine Pollution Bulletin*, 79(1–2), 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.036>
- Alonso, V., Linares, V., Bellés, M., Albina, M.L., Pujol, A., Domingo, J.L., Sánchez, D.J. (2010). Effects of BDE-99 on hormone homeostasis and biochemical parameters in adult male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 48, 2206–2211. doi:10.1016/j.fct.2010.05.048
- Ameur, W., Ben, El Megdiche, Y., de Lapuente, J., Barhoumi, B., Trabelsi, S., Ennaceur, S., Camps, L., Serret, J., Ramos-López, D., Gonzalez-Linares, J., Touil, S., Driss, M. R., & Borràs, M. (2015). Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. *Chemosphere*, 135, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.02.050>
- Annuniação, D. L. R., Almeida, F. V., & Sodr , F. F. (2017). Method development and validation for the determination of polybrominated diphenyl ether congeners in Brazilian aquatic sediments. *Microchemical Journal*, 133, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.009>
- Arkoosh, M. R., Van Gaest, A. L., Strickland, S. A., Hutchinson, G. P., Krupkin, A. B., & Dietrich, J. P. (2017a). Alteration of thyroid hormone concentrations in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to polybrominated diphenyl ethers, BDE-47 and BDE-99. *Chemosphere*, 171, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.035>
- Atencio, L., Moreno, I., Jos, A., Pichardo, S., Moyano, R., Blanco, A., & Came n, A. M. (2008). Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to Microcystis under laboratory conditions. *Toxicol*, 52(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2008.05.009>
- Barbee, N. C., Ganio, K., & Swearer, S. E. (2014). Integrating multiple bioassays to detect and assess impacts of sublethal exposure to metal mixtures in an estuarine fish. *Aquatic Toxicology*, 152, 244–255. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.012>
- Barja-Fernández, S., M guez, J. M., & Álvarez-Otero, R. (2013). Histopathological effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in the gills, intestine and liver of turbot (*Psetta maxima*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 95, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.028>

- Barni, M. F. S., Ondarza, P. M., Gonzalez, M., Da Cuña, R., Meijide, F., Grosman, F., Sanzano, P., Lo Nostro, F. L., & Miglioranza, K. S. B. (2016). Persistent organic pollutants (POPs) in fish with different feeding habits inhabiting a shallow lake ecosystem. *Science of the Total Environment*, 550, 900–909. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.176>
- Baroñ, E. Dissanayake, A. Vila-Cano, A. Crowther, C. Readman, J.W. Jha, A.N. Jarrat, E.E. Barcelo, D. (2016). Evaluation of the Genotoxic and Physiological Effects of Decabromodiphenyl Ether (BDE-209) and Dechlorane Plus (DP) Flame Retardants in Marine Mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Environment Science Technology*. 50, 2700–2708. DOI: 10.1021/acs.est.5b05814
- Baudou, F. G., Ossana, N. A., Castañé, P. M., Mastrángelo, M. M., González Núñez, A. A., Palacio, M. J., & Ferrari, L. (2019). Use of integrated biomarker indexes for assessing the impact of receiving waters on a native neotropical teleost fish. *Science of the Total Environment*, 650, 1779–1786. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.342>
- Beliaeff, B., & Burgeot, T. (2002). Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(6), 1316–1322. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>
- Benedict, R. T., Stapleton, H. M., Letcher, R. J., & Mitchelmore, C. L. (2007). Debromination of polybrominated diphenyl ether-99 (BDE-99) in carp (*Cyprinus carpio*) microflora and microsomes. *Chemosphere*, 69(6), 987–993. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.010>
- Berg, V., Zerihun, M. A., Jørgensen, A., Lie, E., Dale, O. B., Skaare, J. U., & Lyche, J. L. (2013). High prevalence of infections and pathological changes in burbot (*Lota lota*) from a polluted lake (Lake Mjøsa, Norway). *Chemosphere*, 90(5), 1711–1718. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.017>
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., Kueng, C., Segner, H., Dutra, F. M., Ritzmann, M., Sponchiado, D., Forneck, S. C., Freire, C. A., Ballester, E. L. C., Kipfer, S., Segner, H., Wenger, M., Wahli, T., Bernet, D., Luzio, A., ... Cáceres-Vélez, P. R. (1999). Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Disease*, 22, 25–34. <https://doi.org/10.3354/dao061137>
- Bonomo, M. M., Sachi, I. T. de C., Paulino, M. G., Fernandes, J. B., Carlos, R. M., & Fernandes, M. N. (2021). Multi-biomarkers approach to access the impact of novel metal-insecticide based on flavonoid hesperidin on fish. *Environmental Pollution*, 268, 115758. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115758>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bucke, D., Vethaak, A., & Lang, T. (1992). Quantitative assessment of melanomacrophage centres (MMCs) in dab *Limanda limanda* along a pollution transect in the German Bight. *Marine Ecology Progress Series*, 91, 193–196. <https://doi.org/10.3354/meps091193>
- Burkina, V., Zamaratskaia, G., Sakalli, S., Giang, P. T., Kodes, V., Grabic, R., Velisek, J., Turek, J., Kolarova, J., Zlabek, V., & Randak, T. (2018). Complex effects of pollution on fish in major rivers in the Czech Republic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164(April), 92–99.

- <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.109>
- Calado, S.L.M. Vicentini, M. Santos, G.S. Pelanda, A. Santos, H. Coral, L.A. Magalhães, V.F. Mela, M. Cestari, M.M. Assis, H.C.S. (2019). Sublethal effects of microcystin-LR in the exposure and depuration time in a neotropical fish: Multibiomarker approach (2019). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 183, 109527. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109527>
- Carvalho, C. dos S., Bernusso, V. A., Araújo, H. S. S. de, Espíndola, E. L. G., & Fernandes, M. N. (2012). Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*, 89(1), 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.013>
- Chalifour, A., & Tam, N. F. Y. (2016). Tolerance of cyanobacteria to the toxicity of BDE-47 and their removal ability. *Chemosphere*, 164, 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.109>
- Chen, L., Huang, C., Hu, C., Yu, K., Yang, L., & Zhou, B. (2012). Acute exposure to DE-71: Effects on locomotor behavior and developmental neurotoxicity in zebrafish larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(10), 2338–2344. <https://doi.org/10.1002/etc.1958>
- Chen, L., Wang, X., Zhang, X., Lam, P. K. S., Guo, Y., Lam, J. C. W., & Zhou, B. (2017). Transgenerational endocrine disruption and neurotoxicity in zebrafish larvae after parental exposure to binary mixtures of decabromodiphenyl ether (BDE-209) and lead. *Environmental Pollution*, 230, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.053>
- Chen, T. H., Cheng, Y. M., Cheng, J. O., Chou, C. T., Hsiao, Y. C., & Ko, F. C. (2010). Growth and transcriptional effect of dietary 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(3), 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.12.033>
- Chen, L. Zhu, B. Guo, Y. Xu, T. Lee, J-S. Qian, P-Y. Zhou, B. (2016). High-throughput transcriptome sequencing reveals the combined effects of key e-waste contaminants, decabromodiphenyl ether (BDE- 209) and lead, in zebrafish larvae. *Environmental Pollution*. 214, 324-333 . <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.040>
- Chen, J. Wang, C. Shen, Z-J. Gao, G-F. Zheng, H-L. (2017). Insight into the long-term effect of mangrove species on removal of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) from BDE-47 contaminated sediments. *Science of the Total Environment*. 575, 390–399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.040>
- Costa, D. D. M., Neto, F. F., Costa, M. D. M., Morais, R. N., Garcia, J. R. E., Esquivel, B. M., & Ribeiro, C. A. O. (2010). Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17- β -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 151(2), 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.11.002>
- Dalzochio, T., Rodrigues, G. Z. P., Petry, I. E., Gehlen, G., & da Silva, L. B. (2016). The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. *International Aquatic Research*, 8(4), 283–298. <https://doi.org/10.1007/s40071-016-0147-9>
- Deng, J., Liu, C., Yu, L., & Zhou, B. (2010). Chronic exposure to environmental levels of tribromophenol impairs zebrafish reproduction. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 243(1), 87–95.

- <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.016>
- Dey, S., Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A. K., Kole, D., & Ghosh, A. R. (2016). Integrative assessment of biomarker responses in teleostean fishes exposed to glyphosate-based herbicide (Excel Mera 71). *Emerging Contaminants*, 2(4), 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.002>
- Díaz-Jaramillo, M., Miglioranza, K. S. B., Gonzalez, M., Barón, E., Monserrat, J. M., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2016a). Uptake, metabolism and sub-lethal effects of BDE-47 in two estuarine invertebrates with different trophic positions. *Environmental Pollution*, 213, 608–617. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.009>
- Drever, B. D., Riedel, G., & Platt, B. (2011). The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 505–514. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.037>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Farzana, S., Chen, J., Pan, Y., Wong, Y. shan, & Tam, N. F. Y. (2017). Antioxidative response of *Kandelia obovata*, a true mangrove species, to polybrominated diphenyl ethers (BDE-99 and BDE-209) during germination and early growth. *Marine Pollution Bulletin*, 124(2), 1063–1070. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.041>
- Fernandez, W. S., Dias, J. F., Ribeiro, C. A. O., & Azevedo, J. de S. (2011). Liver damages and nuclear abnormalities in erythrocytes of *Atherinella brasiliensis* (Actynopterigii, Atherinopsidade) from two beaches in southeast of Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, 59(2), 163–169. <https://doi.org/10.1590/S1679-87592011000200005>
- Ferraro, M. V. M., Fenocchio, A. S., Mantovani, M. S., de Oliveira Ribeiro, C., & Cestari, M. M. (2004). Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*, 27(1), 103–107. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572004000100017>
- Folle, N. M. T., Azevedo-Linhares, M., Garcia, J. R. E., Esquivel, L., Grotzner, S. R., Oliveira, E. C. de, Filipak Neto, F., & Oliveira Ribeiro, C. A. de. (2020). 2,4,6-Tribromophenol is toxic to *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) after trophic and subchronic exposure. *Chemosphere*, xxxx, 128785. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128785>
- Ghosh, R., Lokman, P. M., Lamare, M. D., Metcalf, V. J., Burritt, D. J., Davison, W., & Hageman, K. J. (2013). Changes in physiological responses of an Antarctic fish, the emerald rock cod (*Trematomus bernacchii*), following exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). *Aquatic Toxicology*, 128–129, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.019>
- Glazer, L., Wells, C. N., Drastal, M., Odamah, K. A., Galat, R. E., Behl, M., & Levin, E. D. (2018). Developmental exposure to low concentrations of two brominated flame retardants, BDE-47 and BDE-99, causes life-long behavioral alterations in zebrafish. *NeuroToxicology*, 66, 221–232. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.09.007>

- Glock, G. M. Mclean, P. (1953). Further studies on the properties and assay of glucose 6--phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochemical Journal*, v. 55, p. 400-408.
- González-Doncel, M., Carbonell, G., García-Mauriño, J. E., Sastre, S., Beltrán, E. M., & Fernández Torija, C. (2016). Effects of dietary 2,2', 4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) exposure in growing medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 178, 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.07.017>
- González-Doncel, M., Torija, C. F., Beltrán, E. M., García-Mauriño, J. E., Sastre, S., & Carbonell, G. (2014). Limitations of waterborne exposure of fish early life stages to BDE-47. *Aquatic Toxicology*, 148, 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.015>
- Graf, R., & Schlüns, J. (1979). Ultrastructural and histochemical investigation of the terminal capillaries in the spleen of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Cell and Tissue Research*, 196(2), 289–306. <https://doi.org/10.1007/BF00240103>
- Groh, K. J., Backhaus, T., Carney-Almroth, B., Geueke, B., Inostroza, P. A., Lennquist, A., Leslie, H. A., Maffini, M., Slunge, D., Trasande, L., Warhurst, A. M., & Muncke, J. (2019). Overview of known plastic packaging-associated chemicals and their hazards. *Science of the Total Environment*, 651, 3253–3268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.015>
- Guellard, T., Kalamarz-Kubiak, H., & Kulczykowska, E. (2019). Concentrations of melatonin, thyroxine, 17 β -estradiol and 11-ketotestosterone in round goby (*Neogobius melanostomus*) in different phases of the reproductive cycle. *Animal Reproduction Science*, 204(July 2018), 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.02.014>
- Gutteridge, J.M. Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 899, p. 136– 147.
- Han, J., Won, E. J., Lee, M. C., Seo, J. S., Lee, S. J., & Lee, J. S. (2015). Developmental retardation, reduced fecundity, and modulated expression of the defensome in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* exposed to BDE-47 and PFOS. *Aquatic Toxicology*, 165, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.05.022>
- Han, Z., Li, Y., Zhang, S., Song, N., Xu, H., Dang, Y., Liu, C., Giesy, J.P., Yu, H. (2017). Prenatal transfer of decabromodiphenyl ether (BDE-209) results in disruption of the thyroid system and developmental toxicity in zebrafish offspring. *Aquatic Toxicology*. 190, 46-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.020>
- Hou, L., Liu, K., Li, Y., Ma, S., Ji, X., & Liu, L. (2016). Necrotic pyknosis is a morphologically and biochemically distinct event from apoptotic pyknosis. *Journal of Cell Science*, 129(16), 3084–3090. <https://doi.org/10.1242/jcs.184374>
- Huang, Y., Wang, X. L., Zhang, J. W., & Wu, K. S. (2015). Impact of endocrine-disrupting chemicals on reproductive function in Zebrafish (*Danio rerio*). *Reproduction in Domestic Animals*, 50(1), 1–6. <https://doi.org/10.1111/rda.12468>
- Jaques, J. A. dos S., Rezer, J. F. P., Gonçalves, J. F., Spanevello, R. M., Gutierrez, J. M., Pimentel, V. C., Thomé, G. R., Morsch, V. M., Schetinger, M. R. C., & Leal, D. B. R. (2011). The effect of curcumin in the

- ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of cigarette smoke-exposed rats. *Cell Biochemistry and Function*, 29(8), 703–707. <https://doi.org/10.1002/cbf.1804>
- Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., & Wolff, S. P. (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 202(2), 384–389. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N)
- Kang, H. M., Lee, Y. H., Kim, B. M., Kim, I. C., Jeong, C. B., & Lee, J. S. (2017). Adverse effects of BDE-47 on in vivo developmental parameters, thyroid hormones, and expression of hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis genes in larvae of the self-fertilizing fish *Kryptolebias marmoratus*. *Chemosphere*, 176, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.081>
- Keen, J. H., Habig, W. H., & Jakoby, W. B. (1976). Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 251(20), 6183–6188. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0)
- Kono, Y. (1978). Generation of superoxide radical during autoxidation of Hydroxylamine and an assay for superoxide-dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 186, 189–195. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(78\)90479-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(78)90479-4)
- Krieger, L. K., Szeitz, A., & Bandiera, S. M. (2017). Hepatic microsomal metabolism of BDE-47 and BDE-99 by lesser snow geese and Japanese quail. *Chemosphere*, 182, 559–566. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.027>
- Lee, H. K., Kang, H., Lee, S., Kim, S., Choi, K., & Moon, H. B. (2020). Human exposure to legacy and emerging flame retardants in indoor dust: A multiple-exposure assessment of PBDEs. *Science of the Total Environment*, 719, 137386. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137386>
- Lema, S. C., Schultz, I. R., Scholz, N. L., Incardona, J. P., & Swanson, P. (2007). Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). *Aquatic Toxicology*, 82(4), 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.03.002>
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233(C), 346–357. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)
- Li, J. B., Li, Y. Y., Shen, Y. P., Zhu, M., Li, X. H., & Qin, Z. F. (2020). 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) disrupts gonadal development of the Africa clawed frog (*Xenopus laevis*). *Aquatic Toxicology*, 221(February), 105441. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105441>
- Li, P., Gao, H., Dong, L., Liu, L., Zhou, G., Luo, C., Tian, Z., Xia, T., Wang, A., & Zhang, S. (2020). Perinatal low-dose PBDE-47 exposure hampered thyroglobulin turnover and induced thyroid cell apoptosis by triggering ER stress and lysosomal destabilization contributing to thyroid toxicity in adult female rats. *Journal of Hazardous Materials*, 392(September 2019), 122265. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122265>
- Liu, C., Wang, B., Zhou, B., Jian, X., Zhang, X., & Wang, Y. (2019). The responses of *Oncorhynchus mykiss* coping with BDE-47 stress via PXR-mediated detoxification and Nrf2-mediated antioxidation system. *Aquatic Toxicology*, 207(September 2018), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.11.026>

- Liu, Y., Feng, Y., Li, J., Zhou, D., Guo, R., Ji, R., & Chen, J. (2020). The bioaccumulation, elimination, and trophic transfer of BDE-47 in the aquatic food chain of *Chlorella pyrenoidosa*-*Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 258, 113720. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113720>
- Lowe, J., Souza-Menezes, J., Freire, D. S., Mattos, L. J., Castiglione, R. C., Barbosa, C. M. L., Santiago, L., Ferrão, F. M., Cardoso, L. H. D., da Silva, R. T., Vieira-Beiral, H. J., Vieyra, A., Morales, M. M., Azevedo, S. M. F. O., & Soares, R. M. (2012). Single sublethal dose of microcystin-LR is responsible for different alterations in biochemical, histological and physiological renal parameters. *Toxicon*, 59(6), 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.003>
- Lu, Q., Jürgens, M. D., Johnson, A. C., Graf, C., Sweetman, A., Crosse, J., & Whitehead, P. (2017). Persistent Organic Pollutants in sediment and fish in the River Thames Catchment (UK). *Science of the Total Environment*, 576, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.067>
- Margolis, A. E., Banker, S., Pagliaccio, D., De Water, E., Curtin, P., Bonilla, A., Herbstman, J. B., Whyatt, R., Bansal, R., Sjödin, A., Milham, M. P., Peterson, B. S., Factor-Litvak, P., & Horton, M. K. (2020). Functional connectivity of the reading network is associated with prenatal polybrominated diphenyl ether concentrations in a community sample of 5 year-old children: A preliminary study. *Environment International*, 134(September 2019), 105212. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105212>
- Mela, M., Guiloski, I. C., Doria, H. B., Rabitto, I. S., da Silva, C. A., Maraschi, A. C., Prodocimo, V., Freire, C. A., Randi, M. A. F., Oliveira Ribeiro, C. A., & Silva de Assis, H. C. (2013a). Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88, 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.002>
- Mela, M., Guiloski, I. C., Doria, H. B., Randi, M. A. F., De Oliveira Ribeiro, C. A., Pereira, L., Maraschi, A. C., Prodocimo, V., Freire, C. A., & Silva de Assis, H. C. (2013a). Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.026>
- Mela, M., Randi, M. A. F., Ventura, D. F., Carvalho, C. E. V., Pelletier, E., & Oliveira Ribeiro, C. A. (2007). Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(3), 426–435. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.11.013>
- Mi, X-B. Bao, L-J. Wu, C-C. Wong, C.S. Zeng, E.Y. (2017). Absorption, tissue distribution, metabolism, and elimination of decabrominated diphenyl ether (BDE-209) in rats after multi-dose oral exposure. *Chemosphere*. 186, 749-756. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.049>
- Min, B. H., Kim, B. M., Kim, M., Kang, J. H., Jung, J. H., & Rhee, J. S. (2018). Plasma biomarkers in juvenile marine fish provide evidence for endocrine modulation potential of organotin compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 210(April), 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.05.001>
- Montalbano, A. M., Albano, G. D., Anzalone, G., Moscato, M., Gagliardo, R., Di Sano, C., Bonanno, A., Ruggieri, S., Cibella, F., & Profita, M. (2020). Cytotoxic and genotoxic effects of the flame retardants (PBDE-47, PBDE-99

- and PBDE-209) in human bronchial epithelial cells. *Chemosphere*, 245. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125600>
- Moustafa, E. M., Dawood, M. A. O., Assar, D. H., Omar, A. A., Elbially, Z. I., Farrag, F. A., Shukry, M., & Zayed, M. M. (2020). Modulatory effects of fenugreek seeds powder on the histopathology, oxidative status, and immune related gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 515(August 2019), 734589. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734589>
- Myers, M. S., & Fournie, J. W. (2002). Histopathological biomarkers as integrators of anthropogenic and environmental stressors. In *Biological indicators of aquatic ecosystem stress* (pp. 221–287). American Fisheries Society.
- Nagamatsu, P. C., Vargas, D. Á. R., Prodocimo, M. M., Opuskevitch, I., Ferreira, F. C. A. S., Zanchin, N., de Oliveira Ribeiro, C. A., & de Souza, C. (2020). Synthetic fish metallothionein design as a potential tool for monitoring toxic metals in water. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11427-2>
- Nelson, E. R., & Habibi, H. R. (2016). Thyroid hormone regulates vitellogenin by inducing estrogen receptor alpha in the goldfish liver. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 436, 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.045>
- Ng, L. F., Gruber, J., Cheah, I. K., Goo, C. K., Cheong, W. F., Shui, G., Sit, K. P., Wenk, M. R., & Halliwell, B. (2014). The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ extends lifespan and improves healthspan of a transgenic *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 71, 390–401. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.003>
- Ni, H. G., Ding, C., Lu, S. Y., Yin, X. L., & Samuel, S. O. (2012). Food as a main route of adult exposure to PBDEs in Shenzhen, China. *Science of the Total Environment*, 437, 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.056>
- Noyes, P. D., Lema, S. C., Macaulay, L. J., Douglas, N. K., & Stapleton, H. M. (2013). Low level exposure to the flame retardant BDE-209 reduces thyroid hormone levels and disrupts thyroid signaling in fathead minnows. *Environmental Science and Technology*, 47(17), 10012–10021. <https://doi.org/10.1021/es402650x>
- Oliveira Ribeiro, C.A.O. dos Reis Filho, H.S. Grötzner, S.R. (2012). Técnicas e métodos para utilização prática em microscopia. Livraria Santos Editora Ltda, Curitiba, BR, 2012. pp. 442.
- Pardo, O., Fernández, S. F., Quijano, L., Marín, S., Villalba, P., Corpas-Burgos, F., & Yusà, V. (2020). Polybrominated diphenyl ethers in foods from the Region of Valencia: Dietary exposure and risk assessment. *Chemosphere*, 250. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126247>
- Perussolo, M. C., Guiloski, I. C., Lirola, J. R., Fockink, D. H., Corso, C. R., Bozza, D. C., Prodocimo, V., Mela, M., Ramos, L. P., Cestari, M. M., Acco, A., & Silva de Assis, H. C. (2019). Integrated biomarker response index to assess toxic effects of environmentally relevant concentrations of paracetamol in a neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182(January), 109438. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109438>
- Pieronia, M. C., Leonelb, J., & Fillmann, G. (2017). *Retardantes de chama bromados: Uma revisão*. 40(3), 317–326.

- <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20160176>
- Po, B. H. K., & Chiu, J. M. Y. (2018). Transgenerational impairments of reproduction and development of the marine invertebrate *Crepidula onyx* resulted from long-term dietary exposure of 2,2",4,4"-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47). *Environmental Pollution*, 235, 730–738. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.087>
- Råbergh, C. M. I., Bylund, G., & Eriksson, J. E. (1991). Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology*, 20(3), 131–145. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(91\)90012-X](https://doi.org/10.1016/0166-445X(91)90012-X)
- Rabitto, I. S., Alves Costa, J. R. M., Silva De Assis, H. C., Pelletier, É., Akaishi, F. M., Anjos, A., Randi, M. A. F., & Oliveira Ribeiro, C. A. (2005). Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: Histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(2), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.03.002>
- Ríos, J. M., Lana, N. B., Ciocco, N. F., Covaci, A., Barrera-Oro, E., Moreira, E., & Altamirano, J. C. (2017). Implications of biological factors on accumulation of persistent organic pollutants in Antarctic notothenioid fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145(February), 630–639. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.009>
- Sahu, S. S., Madhyastha, S., & Rao, G. M. (2013). Neuroprotective effect of resveratrol against prenatal stress induced cognitive impairment and possible involvement of Na⁺, K⁺-ATPase activity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(3), 520–525. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.09.012>
- Salgado, L. D., Marques, A. E. M. L., Kramer, R. D., Oliveira, F. G. de, Moretto, S. L., Lima, B. A. de, Prodócimo, M. M., Cestari, M. M., Azevedo, J. C. R. de, & Silva de Assis, H. C. (2019). Integrated assessment of sediment contaminant levels and biological responses in sentinel fish species *Atherinella brasiliensis* from a sub-tropical estuary in south Atlantic. *Chemosphere*, 219, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.204>
- Sanchez, W., Burgeot, T., & Porcher, J. M. (2013). A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(5), 2721–2725. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>
- Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25(C), 192–205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)
- Shahid, S., Sultana, T., Sultana, S., Hussain, B., Irfan, M., Al-Ghanim, K. A., Misned, F. A., & Mahboob, S. (2020). Histopathological alterations in gills, liver, kidney and muscles of *Ictalurus punctatus* collected from pollutes areas of River. *Brazilian Journal of Biology*, 6984, 1–8. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.234266>
- Shi, T., Chen, S. J., Luo, X. J., Zhang, X. L., Tang, C. M., Luo, Y., Ma, Y. J., Wu, J. P., Peng, X. Z., & Mai, B. X. (2009). Occurrence of brominated flame retardants other than polybrominated diphenyl ethers in environmental and

- biota samples from southern China. *Chemosphere*, 74(7), 910–916. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.047>
- Sies, H. Koch, O.R. Martino, E. Boveris, A. (1979). Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEBS Lett.* 103, 287–290. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)81346-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)81346-0).
- Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Song, Y., Miao, J., Pan, L., & Wang, X. (2016). Exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) alters thyroid hormone levels and thyroid hormone-regulated gene transcription in manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Chemosphere*, 152, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.049>
- Souza, T. L., Batschauer, A. R., Brito, P. M., Oliveira Ribeiro, C. A., Martino-Andrade, A. J., & Ortolani-Machado, C. F. (2019). Multigenerational analysis of the functional status of male reproductive system in mice after exposure to realistic doses of manganese. *Food and Chemical Toxicology*, 133(May), 110763. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110763>
- Staskal, D. F., Hakk, H., Bauer, D., Diliberto, J. J., & Birnbaum, L. S. (2006). Toxicokinetics of polybrominated diphenyl ether congeners 47, 99, 100, and 153 in Mice. *Toxicological Sciences*, 94(1), 28–37. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl091>
- Sun, B., Hu, Y., Cheng, H., & Tao, S. (2019). Releases of brominated flame retardants (BFRs) from microplastics in aqueous medium: Kinetics and molecular-size dependence of diffusion. *Water Research*, 151, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.017>
- Sun, B., Liu, J., Zhang, Y. Q., Leung, K. M. Y., & Zeng, E. Y. (2021). Leaching of polybrominated diphenyl ethers from microplastics in fish oil: Kinetics and bioaccumulation. *Journal of Hazardous Materials*, 406, 124726. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124726>
- Suresh, N. (2009). *Effect of cadmium chloride on liver, spleen and kidney melano macrophage centres in Tilapia mossambica*. 30(July), 254–256.
- Tavares, D., Paulino, M. G., Terezan, A. P., Batista Fernandes, J., Giani, A., & Fernandes, M. N. (2019). Osmoregulatory disturbance in Neotropical fish exposed to the crude extracts of the cyanobacterium, *Radiocystis fernandoi*. *Aquatic Toxicology*, 216(May), 105315. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105315>
- Thornton, L. M., Path, E. M., Nystrom, G. S., Venables, B. J., & Sellin Jeffries, M. K. (2016). Early Life Stage Exposure to BDE-47 Causes Adverse Effects on Reproductive Success and Sexual Differentiation in Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Science and Technology*, 50(14), 7834–7841. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02147>
- Usenko, C. Y., Robinson, E. M., Usenko, S., Brooks, B. W., & Bruce, E. D. (2011). PBDE developmental effects on embryonic zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(8), 1865–1872. <https://doi.org/10.1002/etc.570>

- Van den Berga, M. Houbaa, R. Leslieb, H.A. Cantona, R.F. Thomsenc, C. Becher, G. Alvarez-Pedrerold, M. Deud, J.S. Steinere, M. Van Tongerenf, M. Brunekreefa, B. De Boer, J. (2017). Serum levels of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in women from different European countries and possible relationships with lifestyle and diet. *Environment International*. 107, 16–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2017.06.014>
- Vieira, C. E. D., Costa, P. G., Lunardelli, B., de Oliveira, L. F., da Costa Cabrera, L., Risso, W. E., Primel, E. G., Meletti, P. C., Fillmann, G., & Bueno dos Reis Martinez, C. (2016). Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. *Science of the Total Environment*, 542, 44–56. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.071>
- Wendel, A. (1981). Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 325–333.
- Wohlan, K., Goy, S., Olling, A., Srivaratharajan, S., Tatge, H., Genth, H., & Gerhard, R. (2014). Pyknotic cell death induced by *Clostridium difficile* TcdB: Chromatin condensation and nuclear blister are induced independently of the glucosyltransferase activity. *Cellular Microbiology*, 16(11), 1678–1692. <https://doi.org/10.1111/cmi.12317>
- Wolf, J. C., & Wheeler, J. R. (2018). A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. *Aquatic Toxicology*, 197(October 2017), 60–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.013>
- Wu, J. P., Wu, S. K., Tao, L., She, Y. Z., Chen, X. Y., Feng, W. L., Zeng, Y. H., Luo, X. J., & Mai, B. X. (2020). Bioaccumulation characteristics of PBDEs and alternative brominated flame retardants in a wild frog-eating snake. *Environmental Pollution*, 258, 113661. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113661>
- Wu, L., Li, Y., Ru, H., Xie, H., Yao, F., Ni, Z., & Zhong, L. (2019). Parental exposure to 2,2',4,4'5 - pentabrominated diphenyl ethers (BDE-99) causes thyroid disruption and developmental toxicity in zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 372(November 2018), 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.04.008>
- Yamamoto, F. Y., Garcia, J. R. E., Kupsco, A., & Oliveira Ribeiro, C. A. (2017). Vitellogenin levels and others biomarkers show evidences of endocrine disruption in fish species from Iguaçu River - Southern Brazil. *Chemosphere*, 186, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.111>
- Yamamoto, F. Y., Pereira, M. V. M., Lottermann, E., Santos, G. S., Stremel, T. R. O., Doria, H. B., Gusso-Choueri, P., Campos, S. X., Ortolani-Machado, C. F., Cestari, M. M., Neto, F. F., Azevedo, J. C. R., & Ribeiro, C. A. O. (2016). Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguaçu River (Southern Brazil). *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18111–18128. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6924-6>
- Yang, J., & Chan, K. M. (2015). Evaluation of the toxic effects of brominated compounds (BDE-47, 99, 209, TBBPA) and bisphenol a (BPA) using a zebrafish liver cell line, ZFL. *Aquatic Toxicology*, 159, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.12.011>
- Yang, J., Zhao, H., & Chan, K. M. (2017). Toxic effects of polybrominated diphenyl ethers (BDE 47 and 99) and localization of BDE-99-induced cyp1a

- mRNA in zebrafish larvae. *Toxicology Reports*, 4(March), 614–624. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.11.003>
- Yu, L., Han, Z., & Liu, C. (2015). A review on the effects of PBDEs on thyroid and reproduction systems in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 219, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.12.010>
- Yu, L., Liu, C., Chen, Q., & Zhou, B. (2014). Endocrine disruption and reproduction impairment in zebrafish after long-term exposure to DE-71. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(6), 1354–1362. <https://doi.org/10.1002/etc.2562>
- Yuan, H. Jin, J. Bai, Y. Li, Q. Wang, Y. Hu, J. (2016). Concentrations and distributions of polybrominated diphenyl ethers and novel brominated flame retardants in tree bark and human hair from Yunnan Province, China. *Chemosphere* 154, 319 - 325 . <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.132>
- Zeza, D., Tait, S., Della Salda, L., Amorena, M., Merola, C., & Perugini, M. (2019). Toxicological, gene expression and histopathological evaluations of environmentally realistic concentrations of polybrominated diphenyl ethers PBDE- 47, PBDE-99 and PBDE-209 on zebrafish embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 183(April), 109566. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109566>
- Zhang, J., Wang, Y., Sun, K. M., Fang, K., & Tang, X. (2016). A study of oxidative stress induced by two polybrominated diphenyl ethers in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Marine Pollution Bulletin*, 113(1–2), 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.032>
- Zhao, W., Cheng, J., Gu, J., Liu, Y., Fujimura, M., & Wang, W. (2014). Assessment of neurotoxic effects and brain region distribution in rat offspring prenatally co-exposed to low doses of BDE-99 and methylmercury. *Chemosphere*, 112, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.011>
- Zhao, X., Ren, X., Ren, B., Luo, Z., & Zhu, R. (2016). Life-cycle exposure to BDE-47 results in thyroid endocrine disruption to adults and offsprings of zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.004>
- Zhou, Z., Jian, X., Zhou, B., Lu, K., & Wang, Y. (2020). Changes in the immune function of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) provide insights into strategies against BDE-47 stress. *Journal of Hazardous Materials*, 392(January), 122212. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122212>
- Zhu, B. Wang, Q. Wang, X. Zhou, B. (2014). Impact of co-exposure with lead and decabromodiphenyl ether (BDE-209) on thyroid function in zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology*, 157, 186–195. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.011>

CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES

CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição subcrônica a diferentes concentrações dos retardantes de chamas bromados BDE-47 e BDE-99 em peixes juvenis da espécie *Oreochromis niloticus*. Esta espécie é bastante utilizada como modelo biológico em estudos ecotoxicológicos por apresentar biologia amplamente conhecida, resistência à xenobióticos e por apresentar facilidade de adaptação em bioensaios. A tilápia do Nilo é igualmente importante por ser bastante produzida e consumida e sua exposição a poluentes ambientais pode colocar em risco a saúde das diferentes populações.

Os resultados obtidos do experimento com BDE-47 nas concentrações avaliadas demonstraram que a condição de saúde geral dos indivíduos não foi afetada pelas condições de exposição ao poluente. No entanto, apesar de não se ter observado alterações na morfologia das gônadas em fêmeas e machos, alterações histopatológicas proeminentes observadas no fígado conduziram a ação antiestrogênica em fêmeas. Adicionalmente, a integração das respostas bioquímicas evidenciou que baixas concentrações promovem distúrbios oxidativos.

À semelhança do BDE-47, a exposição ao BDE-99 não comprometeu de forma significativa a condição de saúde dos peixes. Igualmente, foi evidenciada ação antiestrogênica deste congênere em fêmeas, sem observação de alteração nas gônadas tanto de fêmeas quanto de machos. Alterações relevantes no fígado também foram observadas e diferente do BDE-47, a aplicação da resposta integrada de biomarcadores bioquímicos demonstrou que a maior dose promoveu maior distúrbio neste índice.

Deste modo pode-se constatar que quando expostos subcronicamente, os éteres difenílicos polibromados não só são capazes de agir e causar efeitos tóxicos às diferentes populações na forma de misturas comerciais ou complexas, como também podem causar danos na forma isolada e, no quadro 1, apresentamos um resumo desses resultados de acordo com os BDEs usados no presente trabalho.

Estes resultados fornecem informação sobre os riscos de exposição a este poluente e enfatizam a importância de mais estudos relacionados com efeitos de exposição crônica a doses baixas de BDE-47 e 99 em outras espécies

bem como a integração de outros biomarcadores para agregar as diferentes respostas biológicas ampliando a exploração dos efeitos do BDEs nos organismos vivos.

LISTA DE REFERÊNCIAS

- ABDALLA, F. H., CARDOSO, A. M. H., PEREIRA, L. B., SCHMATZ, R., GONÇALVES, J. F., STEFANELLO, N., FIORENZA, A. M., GUTIERRES, J. M., DA SILVA SERRES, J. D., ZANINI, D., PIMENTEL, V. C., VIEIRA, J. M., SCHETINGER, M. R. C., MORSCH, V. M., & MAZZANTI, C. M. Neuroprotective effect of quercetin in ectoenzymes and acetylcholinesterase activities in cerebral cortex synaptosomes of cadmium-exposed rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 381(1–2), 1–8, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1659-x>
- ADEOGUN, A. O., ONIBONOJE, K., IBOR, O. R., OMIWOLE, R. A., CHUKWUKA, A. V., UGWUMBA, A. O., UGWUMBA, A. A. A., ARUKWE, A. Endocrine-disruptor molecular responses, occurrence of intersex and gonado-histopathological changes in tilapia species from a tropical freshwater dam (Awba Dam) in Ibadan, Nigeria. **Aquatic Toxicology**, v. 174, p. 10-21, 2016.
- AEBI, H. [13] Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, 105(C), 121–126, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- AGIUS, C., & ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Letters in Drug Design & Discovery**, 26, 499–509, 2013. <https://doi.org/10.2174/157018081503180131102747>
- AGUILA, M. B., PINHEIRO, A. R., AQUINO, J. C. F., GOMES, A. P., & MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Different edible oil beneficial effects (canola oil, fish oil, palm oil, olive oil, and soybean oil) on spontaneously hypertensive rat glomerular enlargement and glomeruli number. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, 76(1–4), 74–85, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2004.12.003>
- ALBINA, M. L., ALONSO, V., LINARES, V., BELLÉS, M., SIRVENT, J. J., DOMINGO, J. L., SÁNCHEZ, D. J. Effects of exposure to BDE-99 on oxidative status of liver and kidney in adult rats. **Toxicology**, v. 271, p. 51-56, 2010.
- ALI, A. O., HOHN, C., ALLEN, P. J., FORD, L., DAIL, M. B., PRUETT, S., & PETRIE-HANSON, L. The effects of oil exposure on peripheral blood leukocytes and splenic melano-macrophage centers of Gulf of Mexico fishes. **Marine Pollution Bulletin**, 79(1–2), 87–93, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.036>
- ALONSO, V. LINARES, V. BELLÉS, M. ALBINA, M.L. PUJOL, A. DOMINGO, J.L. SÁNCHEZ. D.J. Effects of BDE-99 on hormone homeostasis and biochemical parameters in adult male rats. **Food and Chemical Toxicology**. 48, 2206–2211, 2010. doi:10.1016/j.fct.2010.05.048

AL-ZAIDAN, A. S., AL-SARAWI, H. A., MASSOUD, M. S., AL-ENEZI, M., SMITH, A. J., BIGNELL, J. P., GREEN, M. J., ASKEM, C., BOLAM, T. P. C., BARBER, J. L., BERSUDER, P., LYONS, B. P. Histopathology and contaminant concentrations in fish from Kuwaits marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 100, p. 637-645, 2015.

AMEUR, W. B., MEGDICHE, Y. E., DE LAPUENTE, J., BARHOUMI, B., TRABELSI, S., ENNACEUR, S., CAMPS, L., SERRET, J., RAMOS-LÓPEZ, D., GONZALEZ-LINARES, J., TOUIL, S., DRISS, M. R., BORRÀS, M. Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia. **Chemosphere**, v. 135, p. 67-74, 2015.

AMORIM, L. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6, n. 2, 2003.

ANKLEY, G. T., JOHNSON, R. D. Small fish models for identifying and assessing the effects of endocrine-disrupting chemicals. **Institute for Laboratory Animal Research Journal**, v. 45, n. 4, p. 469-483, 2004.

ANKLEY, G. T., BENCIC, D. C., BREEN, M. S., COLLETTE, T. W., CONOLLY, R. B., DENSLOW, N. D., EDWARDS, S. W., EKMAN, D. R., GARCIA-REYERO, N., JENSEN, K. M., LAZORCHAK, J. M., MARTINOVIC, D., MILLER, D. H., PERKINS, E. J., ORLANDO, E. F., VILLENEUVE, D. L., WANG, R-L., WATANABE, K. H. Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. **Aquatic Toxicology**, v. 92, p. 168-178, 2009.

ANNUNCIAÇÃO, D. L. R., ALMEIDA, F. V., SODRÉ, F. F. Method development and validation for the determination of polybrominated diphenyl ether congeners in Brazilian aquatic sediments. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 43-48, 2017.

ANNUNCIAÇÃO, D. L. R., ALMEIDA, F. V., HARA, E. L.Y., GRASSI, M. T., SODRÉ, F. F. Éteres difenílicos polibromados (PBDE) como contaminantes persistentes: Ocorrência, comportamento no ambiente e estratégias analíticas. **Química Nova**, v. 41, n. 7, p. 782-795, 2018.

ARKOOSH, M. R., GAEST, A. L. V., STRICKLAND, S. A., HUTCHINSON, G. P., KRUPKIN, A. B., DIETRICH, J. P. Dietary exposure to individual polybrominated diphenyl ether congeners BDE-47 and BDE-99 alters innate immunity and disease susceptibility in juvenile chinook salmon. **Environmental Science & Technology**, v. 49, p. 6974-6981, 2015.

ATENCIO, L., MORENO, I., JOS, A., PICHARDO, S., MOYANO, R., BLANCO, A., & CAMEÁN, A. M. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to Microcystis under laboratory conditions. **Toxicon**, 52(1), 1-12, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.05.009>

AYOBAHAN, S. U., EILEBRECHT, S., BAUMANN, L., TEIGELER, M., HOLLERT, H., KALKHOF, S., EILEBRECHT, E., SCHAFERS, C. Detection of biomarkers to differentiate endocrine disruption from hepatotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) using proteomics. **Chemosphere**, v. 240, p. 124970, 2020.

BARBEE, N.C., GANIO, K., SWEARER, S.E. Integrating multiple bioassays to detect and assess impacts of sublethal exposure to metal mixtures in an estuarine fish. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p.244–55, 2014.

BARJA-FERNÁNDEZ, S., MÍGUEZ, J. M., & ÁLVAREZ-OTERO, R. Histopathological effects of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in the gills, intestine and liver of turbot (*Psetta maxima*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 95, 60–68, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.028>

BARNI, M. F. S., ONDARZA, P. M., GONZALEZ, M., DA CUÑA, R., MEIJIDE, F., GROSMAN, F., SANZANO, P., LO NOSTRO, F. L., MIGLIORANZA, K. S. B. Persistent organic pollutants (POPs) in fish with diferente feeding habits inhabiting a shallow lake ecosystem. **Science of the Total Environment**, v. 550, p. 900-909, 2016.

BAUDOU, F. G., OSSANA, N. A., CASTAÑÉ, P. M., MASTRÁNGELO, M. M., GONZÁLEZ NÚÑEZ, A. A., PALACIO, M. J., & FERRARI, L. Use of integrated biomarker indexes for assessing the impact of receiving waters on a native neotropical teleost fish. **Science of the Total Environment**, 650, 1779–1786, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.342>

BELIAEFF, B., & BURGEOT, T. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 21(6), 1316–1322, 2002. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>

BENEDICT, R. T., STAPLETON, H. M., LETCHER, R. J., & MITCHELMORE, C. L. Debromination of polybrominated diphenyl ether-99 (BDE-99) in carp (*Cyprinus carpio*) microflora and microsomes. **Chemosphere**, 69(6), 987–993, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.010>

BERG, V., ZERIHUN, M. A., JØRGENSEN, A., LIE, E., DALE, O. B., SKAARE, J. U., & LYCHE, J. L. High prevalence of infections and pathological changes in burbot (*Lota lota*) from a polluted lake (Lake Mjøsa, Norway). **Chemosphere**, 90(5), 1711–1718, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.017>

BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, P. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Disease**, v. 22, p. 25-34, 1999.

BONOMO, M. M., SACHI, I. T. DE C., PAULINO, M. G., FERNANDES, J. B., CARLOS, R. M., & FERNANDES, M. N. Multi-biomarkers approach to access the impact of novel metal-insecticide based on flavonoid hesperidin on fish.

Environmental Pollution, 268, 115758, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115758>

BOSSI, R., VORKAMP, K., SKOV, H. Concentration of organochlorine pesticides, polybrominated diphenyl ethers and perfluorinated compounds in the atmosphere of Noeth Greenland. **Environmental Pollution**, v. 17, p. 4-10, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72(1-2), 248-254, 1976.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BUCKE, D., VETHAAK, A., & LANG, T. Quantitative assessment of melanomacrophage centres (MMCs) in dab *Limanda limanda* along a pollution transect in the German Bight. **Marine Ecology Progress Series**, 91, 193-196, 1992. <https://doi.org/10.3354/meps091193>

BURKINA, V., ZAMARATSKAIA, G., SAKALLI, S., GIANG, P. T., KODES, V., GRABIC, R., VELISEK, J., TUREK, J., KOLAROVA, J., ZLABEK, V., & RANDAK, T. Complex effects of pollution on fish in major rivers in the Czech Republic. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 164(April), 92-99, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.109>

CALADO, S.L.M. VICENTINI, M. SANTOS, G.S. PELANDA, A. SANTOS, H. CORAL, L.A. MAGALHÃES, V.F. MELA, M. CESTARI, M.M. ASSIS, H.C.S. Sublethal effects of microcystin-LR in the exposure and depuration time in a neotropical fish: Multibiomarker approach (2019). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 183, 2019 109527.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109527>

CARNEVALI, O., SANTANGELI, S., FORNER-PIQUER, I., BASILI, D., MARADONNA, F. Endocrine-disrupting chemicals in aquatic environment: What are the risks for fish gametes? **Fish Physiology Biochemistry**, v.44, n. 6, p. 1561-1576, 2018.

CARVALHO, C. D. S., BERNUSSO, V. A., DE ARAÚJO, H. S. S., ESPÍNDOLA, E. L. G., FERNANDES, M. N. Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 89, p. 60- 69, 2012.

CAZENAVE, J., BACCHETTA, C., PARMA, M.J., SCARABOTTI, P.A., WUNDERLIN, D.A. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). **Environmental Pollution**, v. 157, p. 3025-3033, 2009.

CHALIFOUR, A., & TAM, N. F. Y. Tolerance of cyanobacteria to the toxicity of BDE-47 and their removal ability. **Chemosphere**, 164, 451-461, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.109>

CHEN, L., HUANG, C., HU, C., YU, K., YANG, L., & ZHOU, B. Acute exposure to DE-71: Effects on locomotor behavior and developmental neurotoxicity in

zebrafish larvae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 31(10), 2338–2344, 2012. <https://doi.org/10.1002/etc.1958>

CHEN, T-H., CHENG, Y-M., CHENG, J-O., CHOU, C-T., HSIAO, Y-C., KO, F-C. Growth and transcriptional effect of dietary 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 377-383, 2010.

CHEN, L., WANG, X., ZHANG, X., LAM, P. K. S., GUO, Y., LAM, J. C. W., ZHOU, B. Transgenerational endocrine disruption and neurotoxicity in zebrafish larvae after parental exposure to binary mixtures of decabromodiphenyl ether (BDE-209) and lead. **Environmental Pollution**, v. 230, p. 96-106, 2017.

CHEN, L. ZHU, B. GUO, Y. XU, T. LEE, J-S. QIAN, P-Y. ZHOU, B. High-throughput transcriptome sequencing reveals the combined effects of key e-waste contaminants, decabromodiphenyl ether (BDE- 209) and lead, in zebrafish larvae. **Environmental Pollution**. 214, 324-333, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.040>

CHEN, J. WANG, C. SHEN, Z-J. GAO, G-F. ZHENG, H-L. Insight into the long-term effect of mangrove species on removal of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) from BDE-47 contaminated sediments. **Science of the Total Environment**. 575, 390–399, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.040>

CHUKWUKA, A., OGBEIDE, O., UHUNAMURE, G. Gonad pathology and intersex severity in pelagic (*Tilapia zilli*) and benthic (*Neochanna diversus* and *Clarias gariepinus*) species from a pesticide-impacted agrarian catchment, south-south Nigeria. **Chemosphere**, v. 225, p. 535-547, 2019.

COSTA, D. D. M., NETO, F. F., COSTA, M. D. M., MORAIS, R. N., GARCIA, J. R. E., ESQUIVEL, B. M., & RIBEIRO, C. A. O. Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17- β -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, 151(2), 248–257, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.11.002>

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

COSTA, L. G., DE LAAT, R., TAGLIAFERRI, S., PELLACANI, C. A mechanistic view of polybrominated diphenyl ether (PBDE) developmental neurotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 230, n. 2, p. 282-294, 2013.

DALZOCHIO, T., RODRIGO, G. Z. P., PETRY, I. E., GEHLEN, G., da SILVA, L. B. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. **International Aquatic Research**, v. 8, p. 283-298, 2016.

DENG, D., LIU, J., XU, M., ZHENG, G., GUO, J., SUN, G. Uptake, translocation and metabolism of decabromodiphenyl ether (BDE-209) in seven aquatic plants. **Chemosphere**, v. 152, p. 360-368, 2016.

DENG, J., LIU, C., YU, L., & ZHOU, B. Chronic exposure to environmental levels of tribromophenol impairs zebrafish reproduction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 243(1), 87–95, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.016>

DEY, S., SAMANTA, P., PAL, S., MUKHERJEE, A. K., KOLE, D., & GHOSH, A. R. Integrative assessment of biomarker responses in teleostean fishes exposed to glyphosate-based herbicide (Excel Mera 71). **Emerging Contaminants**, 2(4), 191–203, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.002>

DIAMANTI-KANDARAKIS, E., BOURGUIGNON, J-P., GIUDICE, L. C., HAUSE, R., PRINS, G. S., SOTO, A. M., ZOELLER, R. T., GORE, A. C. Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 4, p. 293-342, 2009.

DÍAZ-JARAMILLO, M., MIGLIORANZA, K. S. B., GONZALEZ, M., BARÓN, E., MONSERRAT, J. M., ELJARRAT, E., & BARCELÓ, D. Uptake, metabolism and sub-lethal effects of BDE-47 in two estuarine invertebrates with different trophic positions. **Environmental Pollution**, 213, 608–617, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.009>

DREVER, B. D., RIEDEL, G., & PLATT, B. The cholinergic system and hippocampal plasticity. **Behavioural Brain Research**, 221(2), 505–514, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.037>

ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES, V., & FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, 7(2), 88–95, 1961. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

ENGLISH, K., TOMS, L-M. L., GALLEN, C., MUELLER, J. F. BDE-209 in the Australian Environment: Desktop review. **Journal of Hazardous Material**, v. 320, p. 194-203, 2016.

EPA, Environmental Protection Agency. **Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs)**. Project Plan, 2006.

EPA, Environmental Protection Agency. **Emerging Contaminants – Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDE) and Polybrominated Biphenyls (PBB)**, 2010.

FARZANA, S., CHEN, J., PAN, Y., WONG, Y. SHAN, & TAM, N. F. Y. Antioxidative response of *Kandelia obovata*, a true mangrove species, to polybrominated diphenyl ethers (BDE-99 and BDE-209) during germination and early growth. **Marine Pollution Bulletin**, 124(2), 1063–1070, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.041>

FERNANDEZ, W. S., DIAS, J. F., RIBEIRO, C. A. O., & AZEVEDO, J. DE S. Liver damages and nuclear abnormalities in erythrocytes of *Atherinella brasiliensis* (Actynopterigii, Atherinopsidade) from two beaches in southeast of Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography**, 59(2), 163–169, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1679-87592011000200005>

FERRARO, M. V. M., FENOCCHIO, A. S., MANTOVANI, M. S., DE OLIVEIRA RIBEIRO, C., & CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, 27(1), 103–107, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572004000100017>

FERREIRA DA CRUZ, N., PIRES, J., MARQUES, R.C. A Measuring the sustainability of urban water services. **Environmental Science & Policy**, v. 54, p. 142–151, 2015.

FOLLE, N. M. T., AZEVEDO-LINHARES, M., GARCIA, J. R. E., ESQUIVEL, L., GROTZNER, S. R., OLIVEIRA, E. C. DE, FILIPAK NETO, F., & OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. DE. 2,4,6-Tribromophenol is toxic to *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) after trophic and subchronic exposure. **Chemosphere**, 2020, 128785. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128785>

FREIRE, C. A., SOUZA-BASTOS, L. R., CHIESSE, J., TINCANI, F. H., PIACINI, L. D. S., RANDI, M. A. F., PRODOCIMO, V., CESTARI, M. M., SILVA-DE-ASSIS, H. C., ABILHOA, V., VITULE, J. R. S., BASTOS, L. P., DE OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A. A multibiomarker evaluation of urban, industrial, and agricultural exposure of small characins in a large freshwater basin in southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 13263-13277, 2015.

GANDHI, N., GEWURTZ, S. B., DROUILLARD, K. G., KOLIC, T., MACPHERSON, K., REINER, E. J., BHAVSAR, S. P. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Great Lakes fish: Levels, patterns, trends and implications for human exposure. **Science of the Total Environment**, v. 576, p. 907-916, 2017.

GENIUS, S. K., BIRKHOLZ, D., GENIUS, S. J. Human excretion of polybrominated diphenyl ethers flame retardants: Blood, urine, and sweat study. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1-14, 2017.

GENTÈS, S., COQUERY, M., VIGOUROUX, R., HANQUIEZ, V., ALLARD, L., MAURY-BRACHET, R. Application of European water framework directive: Identification of reference sites and bioindicator fish species for mercury in tropical freshwater ecosystems (French Guiana). **Ecological Indicators**, v. 106, p. 105468, 2019.

GHOSH, R., LOKMAN, P. M., LAMARE, M. D., METCALF, V. J., BURRITT, D. J., DAVISON, W., HAGEMAN, K. J. Changes in physiological responses of an Antarctic fish, the emerald rock cod (*Trematomus bernacchii*), following exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). **Aquatic Toxicology**, v. 128-129, p. 91-100, 2013.

GIRAUDO, M., DOUVILLE, M., LETCHER, R. J., HOUDE, M. Effects of food-borne exposure of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to emerging brominated flame retardants 1,2-bis (2,4,6-tribromophenoxy) ethane and 2-ethylhexyl-2,3,4,5-tetrabromobenzoate. **Aquatic Toxicology**, v. 186, p. 40-49, 2017.

GIULIVO, M., CAPRI, E., KALOGIANNI, E., MILACIC, R., MAJONE, B., FERRARI, F., ELJARRAT, E., BARCELÓ, D. Occurrence of halogenated and organophosphate flame retardants in sediment and fish samples from three European river basins. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 782-791, 2017.

GLAZER, L., WELLS, C. N., DRASTAL, M., ODAMAH, K. A., GALAT, R. E., BEHL, M., & LEVIN, E. D. Developmental exposure to low concentrations of two brominated flame retardants, BDE-47 and BDE-99, causes life-long behavioral alterations in zebrafish. **NeuroToxicology**, 66, 221–232, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.09.007>

GLOCK, G. E., MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Journal of Biochemistry**, v. 55, p. 400-408, 1953.

GONZÁLEZ-DONCEL, M., TORIJA, C. F., BELTRÁN, E. M., GARCÍA-MAURIÑO, J. E., SASTRE, S., & CARBONELL, G. Limitations of waterborne exposure of fish early life stages to BDE-47. **Aquatic Toxicology**, 148, 184–194, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.015>

GONZÁLEZ-DONCEL, M., CARBONELL, G., GARCÍA-MAURIÑO, J. E., SASTRE, S., BELTRÁN, E. M., ANAYA, C. G., TORIJA, C. F. effects of dietary 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) exposure in growing medaka fish (*Oryzias latipes*). **Aquatic Toxicology**, v. 178, p. 141-152, 2016.

GONZÁLEZ-DONCEL, M., SASTRE, S., CARBONELL, G., BELTRÁN, E. M., ANAYA, C. G., GARCÍA-MAURIÑO, J. E., TORIJA, C. F. Bioaccumulation, maternal transfer and effects of dietary 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) exposure on medaka fish (*Oryzias latipes*) offspring. **Aquatic Toxicology**, v. 192, p. 241-250, 2017.

GRAF, R., & SCHLÜNS, J. Ultrastructural and histochemical investigation of the terminal capillaries in the spleen of the carp (*Cyprinus carpio* L.). **Cell and Tissue Research**, 196(2), 289–306, 1979. <https://doi.org/10.1007/BF00240103>

GROH, K. J., BACKHAUS, T., CARNEY-ALMROTH, B., GEUEKE, B., INOSTROZA, P. A., LENNQUIST, A., LESLIE, H. A., MAFFINI, M., SLUNGE, D., TRASANDE, L., WARHURST, A. M., & MUNCKE, J. Overview of known plastic packaging-associated chemicals and their hazards. **Science of the Total Environment**, 651, 3253–3268, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.015>

GUELLARD, T., KALAMARZ-KUBIAK, H., & KULCZYKOWSKA, E. Concentrations of melatonin, thyroxine, 17 β -estradiol and 11-ketotestosterone in round goby (*Neogobius melanostomus*) in different phases of the reproductive cycle. **Animal Reproduction Science**, 204(July 2018), 10–21, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.02.014>

GUTTERIDGE, J.M. HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, p. 136– 147, 2000.

HADDAOUI, I., MAHJOUB, O., MAHJOUB, B., BOUJELBEN, A., DI BELLA, G. Occurrence and distribution of PAHs, PCBs, and chlorinated pesticide in Tunisian soil irrigated with treated wastewater. **Chemosphere**, v. 146, p. 195-205, 2016.

HAKK, H., LETCHER, R. J. Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants-a review. **Environment International**, v. 29, p. 801-828, 2003.

HAN, J., WON, E. J., LEE, M. C., SEO, J. S., LEE, S. J., & LEE, J. S. Developmental retardation, reduced fecundity, and modulated expression of the defensome in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* exposed to BDE-47 and PFOS. **Aquatic Toxicology**, 165, 136–143, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.05.022>

HAN, Z., LI, Y., ZHANG, S., SONG, N., XU, H., DANG, Y., LIU, C., GIESY, J.P., YU, H. Prenatal transfer of decabromodiphenyl ether (BDE-209) results in disruption of the thyroid system and developmental toxicity in zebrafish offspring. **Aquatic Toxicology**, 190, 46-52, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.020>

HORRI, K. ALFONSO, S., COUSIN, X., MUNSCHY, C., LOIZEAU, V., AROUA, S., BÉGOUT, M-L., ERNANDE, B. Fish life-history traits are affected after chronic dietary exposure to an environmentally realistic marine mixture of PCBs and PBDEs. **Science of the Total Environment**, v. 610-611, p. 531-545, 2018.

HOU, L., LIU, K., LI, Y., MA, S., JI, X., & LIU, L. Necrotic pyknosis is a morphologically and biochemically distinct event from apoptotic pyknosis. **Journal of Cell Science**, 129(16), 3084–3090, 2016. <https://doi.org/10.1242/jcs.184374>

HUANG, Y., WANG, X. L., ZHANG, J. W., & WU, K. S. Impact of endocrine-disrupting chemicals on reproductive function in Zebrafish (*Danio rerio*). **Reproduction in Domestic Animals**, 50(1), 1–6, 2015. <https://doi.org/10.1111/rda.12468>

IQBAL, M., SYED, J. H., KATSOYIANNIS, A., MALIK, R. N., FAROOQI, A., BUTT, A., LI, J., ZHANG, G., CINCINELLI, A., JONES, K. C. Legacy and emerging flame retardants (FRs) in the freshwater ecosystem: A review. **Environmental Research**, v. 152, p. 26-42, 2017.

JAKUES, J. A. DOS S., REZER, J. F. P., GONÇALVES, J. F., SPANEVELLO, R. M., GUTIERRES, J. M., PIMENTEL, V. C., THOMÉ, G. R., MORSCH, V. M., SCHETINGER, M. R. C., & LEAL, D. B. R. The effect of curcumin in the ectonucleotidases and acetylcholinesterase activities in synaptosomes from the cerebral cortex of cigarette smoke-exposed rats. **Cell Biochemistry and Function**, 29(8), 703–707, 2011. <https://doi.org/10.1002/cbf.1804>

JIANG, Z. Y., HUNT, J. V., & WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, 202(2), 384–389, 1992. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N)

KANG, H-M., LEE, Y. W., KIM, B-M., KIM, I-C., JEONG, C-B., LEE, J-S. Adverse effects of BDE-47 on *in vivo* developmental parameters, thyroid hormones, and expression of hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis genes in larvae of the self-fertilizing fish *Kryptolebias marmoratus*. **Chemosphere**, v. 176, p. 39-46, 2017.

KEEN, J. H., HABIG, W. H., & JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, 251(20), 6183–6188, 1976. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0)

KHAN, M.M., ZAMAN, K., IRFAN, D., AWAN, U., ALI, G., KYOPHILAVONG, P., SHAHBAZ, P., NASEEM, I. Triangular relationship among energy consumption, air pollution and water resources in Pakistan. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p.1375-1385, 2016.

KODAVANTI, P. R. S., STOKER, T. E., FENTON, S. E. Brominated flame retardants. **Reproductive and Developmental Toxicology**, v. 38, p. 681-710, 2017.

KONO, Y. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide-dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 186, p. 189-195, 1978.

KRIEGER, L. K., SZEITZ, A., & BANDIERA, S. M. Hepatic microsomal metabolism of BDE-47 and BDE-99 by lesser snow geese and Japanese quail. **Chemosphere**, 182, 559–566, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.027>

KROON, F., STRETEN, C., HARRIES, S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. **Plos One**, v. 12, n. 4, 2017.

KUMAR, N., KRISHNANI, K. K., GUPTA, S. K., SINGH, N. P. Cellular stress and histopathological tools used as biomarkers in *Oreochromis mossambicus* for assessing metal contamination. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 49, p. 137-147, 2017.

LACAZE, E., GEFFARD, O., BONY, S., DEVAUX, A. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay.

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 700, p. 32-38, 2010

LAURETTA, R., SANSONE, A., SANSONE, M., ROMANELLI, F., APPETECCHIA, M. Endocrine disrupting chemicals: Effects on endocrine glands. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 178, 2019.

LIU, Y-P., LI, J-G., ZHAO, Y-F., WEN, S., HUANG, F-F., WU, Y-N. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and indicator polychlorinated biphenyls (PCBs) in marine fish from four areas of China. **Chemosphere**, v. 83, p. 168-174, 2011.

LEE, H. K., KANG, H., LEE, S., KIM, S., CHOI, K., & MOON, H. B. Human exposure to legacy and emerging flame retardants in indoor dust: A multiple-exposure assessment of PBDEs. **Science of the Total Environment**, 719, 2020. 137386. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137386>

LEMA, S. C., SCHULTZ, I. R., SCHOLZ, N. L., INCARDONA, J. P., & SWANSON, P. Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). **Aquatic Toxicology**, 82(4), 296–307, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.03.002>

LEVINE, R. L., WILLIAMS, J. A., STADTMAN, E. P., & SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, 233(C), 346–357, 1994. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)

LI, J. B., LI, Y. Y., SHEN, Y. P., ZHU, M., LI, X. H., & QIN, Z. F. 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) disrupts gonadal development of the Africa clawed frog (*Xenopus laevis*). **Aquatic Toxicology**, 221(February), 2020 105441. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105441>

LI, P., GAO, H., DONG, L., LIU, L., ZHOU, G., LUO, C., TIAN, Z., XIA, T., WANG, A., & ZHANG, S. Perinatal low-dose PBDE-47 exposure hampered thyroglobulin turnover and induced thyroid cell apoptosis by triggering ER stress and lysosomal destabilization contributing to thyroid toxicity in adult female rats. **Journal of Hazardous Materials**, 392(September 2019), 2020. 122265. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122265>

LIU, C., WANG, B., ZHOU, B., JIAN, X., ZHANG, X., & WANG, Y. The responses of *Oncorhynchus mykiss* coping with BDE-47 stress via PXR-mediated detoxification and Nrf2-mediated antioxidation system. **Aquatic Toxicology**, 207(September 2018), 63–71, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.11.026>

LIU, Y., FENG, Y., LI, J., ZHOU, D., GUO, R., JI, R., & CHEN, J. The bioaccumulation, elimination, and trophic transfer of BDE-47 in the aquatic food chain of *Chlorella pyrenoidosa*-*Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, 258, 2020 113720. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113720>

LOWE, J., SOUZA-MENEZES, J., FREIRE, D. S., MATTOS, L. J., CASTIGLIONE, R. C., BARBOSA, C. M. L., SANTIAGO, L., FERRÃO, F. M., CARDOSO, L. H. D., DA SILVA, R. T., VIEIRA-BEIRAL, H. J., VIEYRA, A., MORALES, M. M., AZEVEDO, S. M. F. O., & SOARES, R. M. Single sublethal dose of microcystin-LR is responsible for different alterations in biochemical, histological and physiological renal parameters. **Toxicon**, 59(6), 601–609, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.003>

LU, Q., JÜRGENS, M. D., JOHNSON, A. C., GRAF, C., SWEETMAN, A., CROSSE, J., WHITEHEAD, P. Persistent Organic Pollutants in sediment and fish in the River Thames Catchment (UK). **Science of the Total Environment**, v. 576, p. 78-84, 2017.

LUNDEBYE, A-K., LOCK, E-J., RASINGER, J. D., NØSTBAKKEN, O. J., HANNISDAL, R., KARLSBAKK, E., WENNEVIK, V., MADHUN, A. S., MADSEN, L., GRAFF, I. E., ØRNSRUD, R. Lower levels of Persistent Organic Pollutants, metals and the marine omega 3-fatty acid DHA in farmed compared to wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Environmental Research**, v. 155, p. 49-59, 2017.

LYCHE, J. L., ROSSELAND, C., BERGE, G., POLDER, A. Human health risk associated with brominated flame-retardants (BFRs). **Environment International**, v. 74, p. 170-180, 2015.

MA, S., YU, Z., ZHANG, X., REN, G., PENG, P., SHENG, G., FU, J. Levels and congener profiles of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in breast milk from Shanghai: Implication for exposure route of high brominated BDEs. **Environment International**, v. 42, p. 72-77, 2012.

MARGOLIS, A. E., BANKER, S., PAGLIACCIO, D., DE WATER, E., CURTIN, P., BONILLA, A., HERBSTMAN, J. B., WHYATT, R., BANSAL, R., SJÖDIN, A., MILHAM, M. P., PETERSON, B. S., FACTOR-LITVAK, P., & HORTON, M. K. Functional connectivity of the reading network is associated with prenatal polybrominated diphenyl ether concentrations in a community sample of 5 year-old children: A preliminary study. **Environment International**, 134(September 2019), 2020. 105212. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105212>

MELA, M., GUILOSKI, I. C., DORIA, H. B., RABITTO, I. S., DA SILVA, C. A., MARASCHI, A. C., PRODOCIMO, V., FREIRE, C. A., RANDI, M. A. F., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., & SILVA DE ASSIS, H. C. Risks of waterborne copper exposure to a cultivated freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 88, 108–116, 2013a. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.11.002>

MELA, M., GUILOSKI, I. C., DORIA, H. B., RANDI, M. A. F., DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., PEREIRA, L., MARASCHI, A. C., PRODOCIMO, V., FREIRE, C. A., & SILVA DE ASSIS, H. C. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 93, 13–21, 2013b. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.026>

MELA, M.; RANDI, M. A. F., VENTURA, D. F., CARVALHO, C.E.V., PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 68, p.426-435, 2007.

MELA, M.; CAMBIER, S.; MESMER-DUDONS, N.; LEGEAY, A.; GROTZNER, S.R.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; FIX VENTURA, D.; MASSABUAU, J.C. Methylmercury localization in *Danio rerio* retina after trophic and subchronic exposure: a basis for neurotoxicology. **Neurotoxicology**, v. 31, p. 448–453, 2010.

MELA, M., GRÖTZNER, S.R., LEGEAY, A., MESMER-DUDONS, N., MASSABUAU, J-C., FIX VENTURA, D., OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Morphological evidence of neurotoxicity in retina after methylmercury exposure. **Neurotoxicology**, v.33, p. 407-415, 2012.

MI, X-B. BAO, L-J. WU, C-C. WONG, C.S. ZENG, E.Y. Absorption, tissue distribution, metabolism, and elimination of decabrominated diphenyl ether (BDE-209) in rats after multi-dose oral exposure. **Chemosphere**. 186, 749-756, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.049>

MIN, B. H., KIM, B-M., KIM, M., KANG, J-H., JUNG, J-H. Plasma biomarkers in juvenile marine fish provide evidence for endocrine modulation potential of organotin compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 210, p. 35-43, 2018.

MONTALBANO, A. M., ALBANO, G. D., ANZALONE, G., MOSCATO, M., GAGLIARDO, R., DI SANO, C., BONANNO, A., RUGGIERI, S., CIBELLA, F., & PROFITA, M. Cytotoxic and genotoxic effects of the flame retardants (PBDE-47, PBDE-99 and PBDE-209) in human bronchial epithelial cells. **Chemosphere**, 245, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125600>

MOUSTAFA, E. M., DAWOOD, M. A. O., ASSAR, D. H., OMAR, A. A., ELBIALY, Z. I., FARRAG, F. A., SHUKRY, M., & ZAYED, M. M. Modulatory effects of fenugreek seeds powder on the histopathology, oxidative status, and immune related gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) infected with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, 515(August 2019), 2020. 734589. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734589>

MULDOON, B. M., HOGAN, N. S. Biomarker responses to estrogen and androgen exposure in the brook stickleback (*Culaea inconstans*): A new bioindicator species for endocrine disrupting compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 180, p. 1-10, 2016.

MUNSCHY, C., HÉAS-MOISAN, K., TIXIER, C., OLIVIER, N., GASTINEAU, O., LE BAYON, N., BUCHET, V. Dietary exposure of juvenile common sole (*Solea solea* L.) to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): Part 1. Bioaccumulation and elimination kinetics of individual congeners and their debrominated metabolites. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 229-237, 2011.

MWAKALAPA, E. B., MMOCHI, A. J., MÜLLER, M. H. B., MDEGELA, R. H.,

LYCHE, J. L., POLDER, A. Occurrence and levels of persistent organic pollutants (POPs) in farmed and wild marine fish from Tanzania. A pilot study **Chemosphere**, v. 191, p. 438-449, 2018.

MYERS, M. S., & FOURNIE, J. W. Histopathological biomarkers as integrators of anthropogenic and environmental stressors. In **Biological indicators of aquatic ecosystem stress** (pp. 221–287), 2002. American Fisheries Society.

NAGAMATSU, P. C., VARGAS, D. Á. R., PRODOCIMO, M. M., OPUSKEVITCH, I., FERREIRA, F. C. A. S., ZANCHIN, N., DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., & DE SOUZA, C. Synthetic fish metallothionein design as a potential tool for monitoring toxic metals in water. **Environmental Science and Pollution Research**. 2020 <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11427-2>

NAING, N. N., LI, S. F. Y., LEE, H. K. Micro-solid phase extraction followed by thermal extraction coupled with gas chromatography-mass selective detector for the determination of polybrominated diphenyl ethers in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1458, p. 25-34, 2016.

NELSON, C.; DROUILLARD, K.; CHENG, K.; ELLIOTT, J.; ISMAIL, N. Accumulation of PBDEs in an urban river otter population and an unusual finding of BDE-209. **Chemosphere**, v. 118, p. 322-328, 2015.

NELSON, E. R., & HABIBI, H. R. Thyroid hormone regulates vitellogenin by inducing estrogen receptor alpha in the goldfish liver. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 436, 259–267, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.08.045>

NG, L. F., GRUBER, J., CHEAH, I. K., GOO, C. K., CHEONG, W. F., SHUI, G., SIT, K. P., WENK, M. R., & HALLIWELL, B. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ extends lifespan and improves healthspan of a transgenic *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer disease. **Free Radical Biology and Medicine**, 71, 390–401, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.003>

NI, H. G., DING, C., LU, S. Y., YIN, X. L., & SAMUEL, S. O. Food as a main route of adult exposure to PBDEs in Shenzhen, China. **Science of the Total Environment**, 437, 10–14, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.056>

NOYES, P. D., STAPLETON, H. M. PBDE flame retardants-Toxicokinetics and thyroid hormone endocrine disruption in fish. **Endocrine Disruptors**, v. 2, 2014.

NUGEGODA, D., KIBRIA, G. Effects of environmental chemicals on fish thyroid function: Implications for fisheries and aquaculture in Australia. **General and Comparative Endocrinology**, v. 144, p. 40-53, 2017.

OLIVARES-RUBIO, H. F., DZUL-CAAMAL, R., GALLEGOS-RANGEL, M. E., MADERA-SANDOVAL, R. L., DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, M. L., GARCÍA-LATORRE, E., VEGA-LÓPEZ, A. Relationship between biomarkers and endocrine-disrupting compounds in wild *Girardnichthys viviparus* from two lakes with different degrees of pollution. **Ecotoxicology**, v. 24, n. 3, p. 664-85, 2015.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., FILIPAK NETO, F., MELA, M., SILVA, P. H., RANDI, M. A. F., RABITTO, I. S., PELLETIER, E. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. **Environmental Research**, v. 101, p. 74–80, 2006.

ONDARZA, P. M., GONZALEZ, M., FILLMANN, G., MIGLIORANZA, K. S. B. PBDEs, PCBs and organochlorine pesticides distribution in edible fish from Negro River basin, Argentinean Patagonia. **Chemosphere**, v. 94, p. 135-142, 2014.

PAPACHLIMITZOU, A., BARBER, J. L., LOSADA, S., BERSUDE, P., LAW, R. J. A review of the analysis of novel brominated flame retardants. **Journal of Chromatography A**, v. 1219, p. 15-28, 2012.

PARDO, O., FERNÁNDEZ, S. F., QUIJANO, L., MARÍN, S., VILLALBA, P., CORPAS-BURGOS, F., & YUSÀ, V. Polybrominated diphenyl ethers in foods from the Region of Valencia: Dietary exposure and risk assessment. **Chemosphere**, 250, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126247>

PERUSSOLO, M. C., GUILOSKI, I. C., LIROLA, J. R., FOCKINK, D. H., CORSO, C. R., BOZZA, D. C., PRODOCIMO, V., MELA, M., RAMOS, L. P., CESTARI, M. M., ACCO, A., & SILVA DE ASSIS, H. C. Integrated biomarker response index to assess toxic effects of environmentally relevant concentrations of paracetamol in a neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 182(January), 2019 109438. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109438>

PIERONI, M. C., LEONEL, J., FILLMANN, G. Retardantes de chama bromados: Uma revisão. **Química Nova**, v. 40, p. 317-326, 2017.

PINSON, A., BOURGUIGNON, J. P., PARENT, A. S. Exposure to endocrine disrupting chemicals and neurodevelopmental alterations. **Andrology**, p. 1-17, 2016.

PISOSCHI, A.M., POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

PO, B. H. K., & CHIU, J. M. Y. Transgenerational impairments of reproduction and development of the marine invertebrate *Crepidula onyx* resulted from long-term dietary exposure of 2,2",4,4"-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47). **Environmental Pollution**, 235, 730–738, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.087>

RÅBERGH, C. M. I., BYLUND, G., & ERIKSSON, J. E. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic Toxicology**, 20(3), 131–145, 1991. <https://doi.org/10.1016/0166->

445X(91)90012-X

RABITTO, I. S., ALVES COSTA, J. R. M., SILVA DE ASSIS, H. C., PELLETIER, É., AKAISHI, F. M., ANJOS, A., RANDI, M. A. F., & OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: Histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 60(2), 147–156, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.03.002>

RAMSDORF, W. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Cangüiri - UFPR)**. Tese (Doutorado em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, p. 1-109, 2007.

RÍOS, J. M., LANA, N. B., CIOCCO, N. F., COVACI, A., BARRERA-ORO, E., MOREIRA, E., ALTAMIRANO, J. C. Implications of biological factors on accumulation of persistent organic pollutants in Antarctic notothenioid fish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 145, p. 630-639, 2017.

SAHU, S. S., MADHYASTHA, S., & RAO, G. M. Neuroprotective effect of resveratrol against prenatal stress induced cognitive impairment and possible involvement of Na⁺, K⁺-ATPase activity. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 103(3), 520–525, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.09.012>

SALEH, Y. S., MARINE, M-A. S. Use of *Arius thalassinus* fish in a pollution biomonitoring study, applying combined oxidative stress, hematology, biochemical and histopathological biomarkers: A baseline field study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 106, p. 308-322, 2016.

SALGADO, L. D., MARQUES, A. E. M. L., KRAMER, R. D., OLIVEIRA, F. G. DE, MORETTO, S. L., LIMA, B. A. DE, PRODOCIMO, M. M., CESTARI, M. M., AZEVEDO, J. C. R. DE, & SILVA DE ASSIS, H. C. Integrated assessment of sediment contaminant levels and biological responses in sentinel fish species *Atherinella brasiliensis* from a sub-tropical estuary in south Atlantic. **Chemosphere**, 219, 15–27, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.204>

SANCHEZ, W., BURGEOT, T., & PORCHER, J. M. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science and Pollution Research**, 20(5), 2721–2725, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>

SANTANA, M. S., YAMAMOTO, F. Y., SANDRINI-NETO, L., NETO, F. F., ORTOLONI-MACHADO, C. F., RIBEIRO, C. A. O., PRODOCIMO, M. M. Diffuse sources of contamination in freshwater fish: Detecting effects through active biomonitoring and multi-biomarker approaches. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, p. 173-181, 2018.

SEDLAK, J., & LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, 25(C), 192–205, 1968. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)

SHA, J.; WANG, Y.; CHEN, H.; WANG, M.; WANG, H.; LI, X. Using population demographic parameters to assess impact of two polybrominated diphenyl ethers (BDE-47, BDE-209) on the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 119, p. 106-115, 2015.

SHAHID, S., SULTANA, T., SULTANA, S., HUSSAIN, B., IRFAN, M., AL-GHANIM, K. A., MISNED, F. A., & MAHBOOB, S. Histopathological alterations in gills, liver, kidney and muscles of *Ictalurus punctatus* collected from pollutes areas of River. **Brazilian Journal of Biology**, 6984, 1–8, 2020. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.234266>

SHI, T., CHEN, S. J., LUO, X. J., ZHANG, X. L., TANG, C. M., LUO, Y., MA, Y. J., WU, J. P., PENG, X. Z., & MAI, B. X. Occurrence of brominated flame retardants other than polybrominated diphenyl ethers in environmental and biota samples from southern China. **Chemosphere**, 74(7), 910–916, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.10.047>

SHI, Z.; JIAO, Y.; HU, Y.; SUN, Z.; ZHOU, X.; FENG, J.; LI, J.; WU, Y. Levels of tetrabromobisphenol A, hexabromocyclododecanes and polybrominated diphenyl ethers in human milk from the general population in Beijing, China. **The Science of the Total Environment**, p. 452-453, 2013.

SIDIQQI, M. A., LAESSING, R. H., REED, K. D. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): New pollutants-old diseases. **Clinical Medicine and Research**, v. 1, n. 4, p. 281-290, 2003.

SIES, H., KOCH, O. R., MARTINO, E., BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v. 103, p. 287-290, 1979.

SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, 4, 180–183, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>

SILVA, M. V.; RODRIGUES, A. M.; CARDOSO, V. V.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M. J.; ALMEIDA, C. M. Retardantes de chama bromados: Éteres difenílicos polibromados (PBDEs). **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 3, n. 1, p. 67-78, 2014.

SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R., & SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, 175(1), 184–191, 1988. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)

SLOAN, C. A., ANULACION, B. F., BOLTON, J. L., BOYD, D., OLSON, O. P., SOL, S. L., YLITALO, G. M., JOHNSON, L. L. Polybrominated diphenyl ethers in out migrant juvenile Chinook salmon from the lower Columbia river and estuary and Puget Sound, Washington. **Archive of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, p. 403-424, 2010.

SOFFKER, M., TYLER, C. R. Endocrine disrupting chemicals and sexual behaviors in fish-a critical review on effects and possible consequences. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 42, n. 8, p. 653-668, 2012.

SONG, Y., MIAO, J., PAN, L., & WANG, X. Exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) alters thyroid hormone levels and thyroid hormone-regulated gene transcription in manila clam *Ruditapes philippinarum*. **Chemosphere**, 152, 10–16, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.049>

SOUZA, T. L. **Avaliação funcional do Sistema reprodutor masculino de camundongos swiss após múltiplas formas de exposição ao manganês**. 127 f. Dissertação (Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

SOUZA, T. L., BATSCHAUER, A. R., BRITO, P. M., OLIVEIRA RIBEIRE, C. A., MARTINO-ANDRADE, A. J., & ORTOLANI-MACHADO, C. F. Multigenerational analysis of the functional status of male reproductive system in mice after exposure to realistic doses of manganese. **Food and Chemical Toxicology**, 133(May), 2019. 110763. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110763>

STASKAL, D. F., HAKK, H., BAUER, D., DILIBERTO, J. J., & BIRNBAUM, L. S. Toxicokinetics of polybrominated diphenyl ether congeners 47, 99, 100, and 153 in Mice. **Toxicological Sciences**, 94(1), 28–37, 2006. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl091>

SUN, B., HU, Y., CHENG, H., & TAO, S. Releases of brominated flame retardants (BFRs) from microplastics in aqueous medium: Kinetics and molecular-size dependence of diffusion. **Water Research**, 151, 215–225, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.12.017>

SUN, B., LIU, J., ZHANG, Y. Q., LEUNGB, K. M. Y., & ZENG, E. Y. Leaching of polybrominated diphenyl ethers from microplastics in fish oil: Kinetics and bioaccumulation. **Journal of Hazardous Materials**, 406, 2021 124726. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124726>

SURESH, N. Effect of cadmium chloride on liver, spleen and kidney melano macrophage centres in *Tilapia mossambica*. 30 (July), 254–256, 2009.

TAVARES, D., PAULINO, M. G., TEREZAN, A. P., BATISTA FERNANDES, J., GIANI, A., & FERNANDES, M. N. Osmoregulatory disturbance in Neotropical fish exposed to the crude extracts of the cyanobacterium, *Radiocystis fernandoi*. **Aquatic Toxicology**, 216(May), 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105315>

THORNTON, L. M., PATH, E. M., NYSTROM, G. S., VENABLES, B. J., & SELLIN JEFFRIES, M. K. Early Life Stage Exposure to BDE-47 Causes Adverse Effects on Reproductive Success and Sexual Differentiation in Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). **Environmental Science and Technology**, 50(14), 7834–7841, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02147>

TRABALÓN, L., VILAVERT, L., DOMINGO, J. L., POCURULL, E., BORRULL, F., NADAL, M. Human exposure to brominated flame retardants through the consumption of fish and shellfish in Tarragona Country (Catalonia, Spain). **Food and Chemical Toxicology**, v. 104, p. 48-56, 2017.

TUE, N. M.; GOTO, A.; TAKAHASHI, S.; ITAI, T.; ASANTE, K. A.; KUNISUE, T.; TANABE, S. Release of chlorinated, brominated and mixed halogenated dioxin-related compounds to soils from open burning of e-waste in Agbogbloshie (Accra, Ghana). **Journal of hazardous materials**, v. 302, p. 151–7, 2016.

USENKO, C. Y., ROBINSON, E. M., USENKO, S., BROOKS, B. W., & BRUCE, E. D. PBDE developmental effects on embryonic zebrafish. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 30(8), 1865–1872, 2011. <https://doi.org/10.1002/etc.570>

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p. 57-149, 2003.

VERHAERT, V., NEWMARK, N., D'HOLLANDER, W., COVACI, A., VLOK, W., WEPENER, V., ADDO-BEDIAKO, A., JOOSTE, A., TEUCHIES, J., BLUST, R., BERVOETS, L. Persistent organic pollutants in the Olifants River Basin, South Africa: Bioaccumulation and trophic transfer through a subtropical aquatic food web. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 792-806, 2017.

VIGANÒ, L.; ROSCIOLI, C.; GUZZELLA, L. Decabromodiphenyl ether (BDE-209) enters the food web of the River Po and is metabolically debrominated in resident cyprinid fishes. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 4966-4972, 2011.

VIEIRA, C. E. D., COSTA, P. G., LUNARDELLI, B., DE OLIVEIRA, L. F., DA COSTA CABRERA, L., RISSO, W. E., PRIMEL, E. G., MELETTI, P. C., FILLMANN, G., & BUENO DOS REIS MARTINEZ, C. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. **Science of the Total Environment**, 542, 44–56, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.071>

WANG, J., LIN, Z., LIN, K., WANG, C., ZHANG, W., CUI, C., LIN, J., DONG, Q., HUANG, C. Polybrominated diphenyl ethers in water, sediment, soil, and biological samples from different industrial areas in Zhejiang, China. **Journal of Hazardous Material**, v. 197, p. 211-219, 2011.

WANG, X., XI, B., HUO, S., SUN, W., PAN, H., ZHANG, J., REN, Y., LIU, H. Characterization, treatment and releases of PBDEs and PAHs in a typical municipal sewage treatment plant situated beside an urban river, East China. **Journal of Environmental Science**, v. 25, p. 1281-1290, 2013.

WANG, X-T., CHEN, L., WANG, X-K., ZHANG, Y., ZHOU, J., XU, S-Y., SUN, Y-F., WU, M-H. Occurrence, profiles, and ecological risks of polybrominated

diphenyl ethers (PBDEs) in river sediments of Shanghai, China. **Chemosphere**, v. 133, p. 22-30, 2015.

WANG, G., PENG, J., XU, X., ZHANG, D., LI, X. Polybrominated diphenyl ethers in sediments from the Southern Yellow Sea: Concentration, composition profile, source identification and mass inventory. **Chemosphere**, v. 144, p. 2097-2105, 2016.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp. 325–333, 1981.

WOHLAN, K., GOY, S., OLLING, A., SRIVARATHARAJAN, S., TATGE, H., GENTH, H., & GERHARD, R. Pyknotic cell death induced by *Clostridium difficile* TcdB: Chromatin condensation and nuclear blister are induced independently of the glucosyltransferase activity. **Cellular Microbiology**, 16(11), 1678–1692, 2014. <https://doi.org/10.1111/cmi.12317>

WOLF, J. C., & WHEELER, J. R. A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. **Aquatic Toxicology**, 197(October 2017), 60–78, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.013>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **State of the science of endocrine disrupting chemicals**. p. 91-108, 2012.

WU, J. P., WU, S. K., TAO, L., SHE, Y. Z., CHEN, X. Y., FENG, W. L., ZENG, Y. H., LUO, X. J., & MAI, B. X. Bioaccumulation characteristics of PBDEs and alternative brominated flame retardants in a wild frog-eating snake. **Environmental Pollution**, 258, 2020. 113661. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113661>

WU, L., LI, Y., RU, H., XIE, H., YAO, F., NI, Z. Parental exposure to 2,2',4,4'-tetrabrominated diphenyl ethers (BDE-99) causes thyroid disruption and developmental toxicity in zebrafish. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 372, p. 11-18, 2019.

XIONG, Q., SHI, Y., LU, Y., PAN, K., DAKHIL, M. A., ZHANG, L., XIAO, Y. Sublethal or not? Responses of multiple biomarkers in *Daphnia magna* to single and joint effects of BDE-47 and BDE-209. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p. 164-171, 2018.

XU, F., TAY, J-H., COVACI, A., PADILLA-SÁNCHEZ, J. A., PAPADOPOULOU, E., HAUG, L. S., NEELS, H., SELLSTRÖM, U., DE WIT, C. A. Assessment of dietary exposure to organohalogen contaminants, legacy and emerging flame retardants in a Norwegian cohort. **Environment International**, v. 102, p. 236-243, 2017a.

XU, Q., WU, D., DANG, Y., YU, L., LIU, C., WANG, J. Reproduction impairment and endocrine disruption in adult zebrafish (*Danio rerio*) after waterborne exposure to TBOEP. **Aquatic Toxicology**, v. 182, p. 163-171, 2017b.

YAMAMOTO, F. Y., PEREIRA, M. V. M., LOTTERMANN, E., SANTOS, G. S., STREMEI, T. R. O., DORIA, H. B., GUSSO-CHOUERI, P., CAMPOS, S. X., ORTOLANI-MACHADO, C. F., CESTARI, M. M., NETO, F. F., AZEVEDO, J. C. R., RIBEIRO, C. A. O. Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguaçu River (Southern Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 18111-18128, 2016.

YAMAMOTO, F. Y., GARCIA, J. R. E., KUPSCO, A., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Vitellogenin levels and others biomarkers show evidences of endocrine disruption in fish species from Iguaçu river - Southern Brazil. **Chemosphere**, v. 186, p. 88-99, 2017.

YANG, J., & CHAN, K. M. Evaluation of the toxic effects of brominated compounds (BDE-47, 99, 209, TBBPA) and bisphenol a (BPA) using a zebrafish liver cell line, ZFL. **Aquatic Toxicology**, 159, 138–147, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.12.011>

YANG, J., ZHAO, H., & CHAN, K. M. Toxic effects of polybrominated diphenyl ethers (BDE 47 and 99) and localization of BDE-99-induced cyp1a mRNA in zebrafish larvae. **Toxicology Reports**, 4(March), 614–624, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.11.003>

YU, L., HAN, Z., & LIU, C. A review on the effects of PBDEs on thyroid and reproduction systems in fish. **General and Comparative Endocrinology**, 219, 64–73, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.12.010>

YU, L., LIU, C., CHEN, Q., ZHOU, B. Endocrine disruption and reproduction impairment in zebrafish after long-term exposure to DE-71. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 1354-1362, 2014.

YUAN, H., JIN, J., BAI, Y., LI, Q., WANG, Y., HU, J. Concentration and distributions of polybrominated diphenyl ethers and novel brominated flame retardants in tree bark and human hair from Yunnan Province, China. **Chemosphere**, v. 154, p. 319-325, 2016.

ZEZZA, D., TAIT, S., DELLA SALDA, L., AMORENA, M., MEROLA, C., & PERUGINI, M. Toxicological, gene expression and histopathological evaluations of environmentally realistic concentrations of polybrominated diphenyl ethers PBDE- 47, PBDE-99 and PBDE-209 on zebrafish embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 183(April), 2019. 109566. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109566>

ZHANG, J., WANG, Y., SUN, K. M., FANG, K., & TANG, X. A study of oxidative stress induced by two polybrominated diphenyl ethers in the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Marine Pollution Bulletin**, 113(1–2), 408–413, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.032>

ZHANG, W. F. Determination of polybrominated diphenyl ethers in river water by combination of liquid–liquid extraction and gas chromatography–mass

spectrometry. **Chinese Chemical Letters**, abr. 2014.

ZHANG, M.; BUEKENS, A.; LI, X. Brominated flame retardants and the formation of dioxins and furans in fires and combustion. **Journal of hazardous materials**, v. 304, p. 26–39, 2016.

ZHAO, W., CHENG, J., GU, J., LIU, Y., FUJIMURA, M., & WANG, W. Assessment of neurotoxic effects and brain region distribution in rat offspring prenatally co-exposed to low doses of BDE-99 and methylmercury. **Chemosphere**, 112, 170–176, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.04.011>

ZHAO, X., REN, X., REN, B., LUO, Z., & ZHU, R. Life-cycle exposure to BDE-47 results in thyroid endocrine disruption to adults and offsprings of zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 48, 157–167, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.004>

ZHOU, Y.; CHEN, Q.; DU, X.; YIN, G.; QIU, Y.; YE, L.; ZHU, Z.; ZJAO, J. Occurrence and trophic magnification of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and their methoxylated derivatives in freshwater fish from Dianshan Lake, Shanghai, China. **Environmental Pollution**, v. 219, p. 932-938, 2016.

ZHOU, Z., JIAN, X., ZHOU, B., LU, K., & WANG, Y. Changes in the immune function of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) provide insights into strategies against BDE-47 stress. **Journal of Hazardous Materials**, 392(January), 2020. 122212. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122212>

ZHU, B. WANG, Q. WANG, X. ZHOU, B. Impact of co-exposure with lead and decabromodiphenyl ether (BDE-209) on thyroid function in zebrafish larvae. **Aquatic Toxicology**, 157, 186-195, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.011>

QUADRO 1 – RESULTADOS OBTIDOS DA EXPOSIÇÃO TRÓFICA À
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE BDE-47 E BDE-99

Parâmetro	BDE-47				BDE-99			
	Tratamento (ng.g-1)				Tratamento (ng.g-1)			
	0	0.253	2.53	25.3	0	0.294	2.94	29.4
Índices somáticos								
Fator de condição								
Índice hepatossomático								
Índice gonadossomático								
Desregulação endócrina								
Vitelogenina-fêmeas								
17 β -estradiol								
Tiroxina								
Hormônio tireóide estimulante								
Biomarcadores enzimáticos e não enzimáticos								
Fígado								
Catalase								
Superóxido dismutase								
Glutathione s-transferase								
Glutathione peroxidase								
Glutathione dissulfeto redutase								
Glicose-6-fosfato desidrogenase								
Tióis não protéicos								
Peroxidação lipídica								
Carbonilação de proteínas								
Biomarcadores enzimáticos e não enzimáticos								
Cérebro								
Catalase								
Superóxido dismutase								
Glutathione s-transferase								
Glutathione peroxidase								
Glutathione dissulfeto redutase								
Glicose-6-fosfato desidrogenase								
Tióis não protéicos								
Peroxidação lipídica								
Carbonilação de proteínas								
Acetilcolinesterase cérebro								
Acetilcolinesterase músculo								
Genotoxicidade								
Danos no DNA								
Histopatologia								
Alterações morfológicas								
Fígado								
Rim								
Gônadas								
Ultraestrutura								
Fígado								

Preto: parâmetros não avaliados; Cinza escuro: alteração não estatisticamente significativa; Azul: redução estatisticamente significativa; Vermelho: aumento estatisticamente significativo. FONTE: adaptado de SOUZA (2019).

APÊNDICE A

DESCRIÇÃO DETALHADADA DA METODOLOGIA

APÊNDICE A1 - PREPARO DOS XENOBIÓTICOS

BDE-47 (98,9% de pureza) e BDE-99 (98,5% de pureza) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich® e as concentrações foram estabelecidas com base em concentrações realísticas encontradas em músculo de peixes contaminados com PBDEs com derivações em 10 vezes acima e 10 vezes abaixo. Desta concentração, foram calculadas as concentrações para BDE-99 e BDE-47 tendo se obtido 2,94 ng. g⁻¹ e 2,54 ng. g⁻¹, respetivamente.

A solução estoque de BDE-47 e 99 foram diluídas em DMSO na concentração 20 mg/ml e a cada 10 dias, diluições foram feitas para obtenção das concentrações para o cálculo da dose. A dose administrada foi calculada a partir da massa (em g) dos animais, onde 200 µL de volume da solução foi administrado a cada 100 gramas de peso, chegando às concentrações estipuladas.

APÊNDICE A2 - DESENHO EXPERIMENTAL E EXPOSIÇÃO

2.1 Ensaio sub-crônico

Espécies de *Oreochromis niloticus* juvenis (64 animais de ~ 35 g) foram adquiridas da piscicultura Panamá, localizada em Paulo Lopes – Santa Catarina e trazidas para o Laboratório de Toxicologia Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba. Os animais foram transferidos aleatoriamente para 8 tanques com capacidade para 150 litros, sendo 8 indivíduos por tanque. Foram estabelecidos dois tanques por grupo experimental expostos à diferentes concentrações de BDE-47, sendo: óleo de canola (controle), 0,253 ng. g⁻¹ (Tratamento 1), 2,53 ng. g⁻¹ (Tratamento 2) e 25,3 ng. g⁻¹ (Tratamento 3). Para o BDE-99 foram estabelecidos três tanques por grupo: óleo de milho (controle), 0,294 ng. g⁻¹ (Tratamento 1), 2,94 ng. g⁻¹ (Tratamento 2), 29,4 ng. g⁻¹ (Tratamento 3).

Os peixes foram mantidos por 15 dias em aclimação nos tanques abastecidos com água proveniente da rede de abastecimento comum. Neste período morreram 22 peixes (34%) e na sequência era feita a reposição dos mesmos. Para a manutenção dos animais, a temperatura dos aquecedores com

termostato foi mantida entre 24-28 °C e com medições diárias (duas vezes por dia). Os tanques também receberam aeração constante e um sistema de filtração composto por um conjunto de elementos filtrantes como zeolita, para remoção de amônia e nitrito; quartzite, para filtração biológica e manta tipo Perlon™, para filtração mecânica de resíduos alimentares e fezes. Os animais foram alimentados diariamente (duas vezes por dia) com ração comercial e a remoção de detritos e fezes realizada por sifonagem do fundo dos tanques a cada três dias, momento esse em que eram aferidos os valores de oxigênio dissolvido, pH, amônia, nitrito e a reposição de aproximadamente 25% da água.

Após o período de aclimação, os animais foram expostos por via trófica aos xenobióticos e 24 horas antes de cada exposição os peixes não foram alimentados. Após anestesia com 120 mg mL⁻¹ de triclaínmetanosulfonato (MS222) – Sigma®, os animais foram pesados para determinar o volume à administrar (100 µL / 200 g). Por via trófica e nas doses anteriormente citadas, o BDE-47 foi administrado após ter sido dissolvido em óleo de canola (veículo) e BDE-99 administrado após dissolução em óleo de milho (veículo), procedimento este realizado a cada dez dias. Cada ensaio teve duração de oitenta dias, totalizando oito exposições. As doses foram estabelecidas com base em estudos realizados utilizando a mesma via de exposição e em espécies diferentes em que, para determinar os efeitos de BDE-47 e 99 foram utilizadas 2,5 - 25 ng/g de uma mistura de 13 congêneres de BDE (BDE-28, 47, 66, 77, 85, 99, 100, 138, 154, 183, 190, 209) em trutas (ARKOOSH et al., 2017).

APÊNDICE A3 - COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Dez dias após a última exposição os animais foram levados ao óbito onde, primeiramente foram anestesiados com solução alcoólica de benzocaína a 1,5%. Após anestesia, com auxílio de seringas e agulhas heparinizadas em solução de *phenylmethanesulfonyl fluoride* 0,1 M, foi coletado sangue por punção da veia caudal para as análises genética, molecular e hematológica. Em seguida foi realizada a biometria (medidas de comprimento zoológico e massa) com posterior sacrifício dos animais através de anestesia profunda com MS222 (120 mg. mL⁻¹) e coleta dos seguintes órgãos: fígado, rim, gônadas, músculo e cérebro.

As amostras de fígado, rim e gônadas foram fixadas em solução de ALFAC por 16 h para microscopia de luz. Para o fígado em especial, um outro fragmento foi fixado em solução de Karnovsky (Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 4%, CaCl_2 0.05 M diluídos em tampão Cacodilato 0.1 M e pH 7,2-7,4) por duas horas em temperatura ambiente para estudos ultraestruturais. Além disso, uma terceira porção do fígado foi acondicionada em tubos de microcentrifuga a -80°C para análises bioquímicas. Amostras de músculo e cérebro também foram preservadas por congelamento a -80°C para estudos de neurotoxicidade.

APÊNDICE A4 - ÍNDICES SOMÁTICOS

4.1 Fator de condição (K)

Para avaliar o estado fisiológico da espécie *O. niloticus* após exposição ao xenobiótico, foi estimado o fator de condição, permitindo comparar o efeito dos 3 tratamentos nos animais. Para tal, foi estimado mediante a expressão descrita por Ríos et al., (2017).

$$K (\%) = (\text{massa corporal/comprimento (cm)}^3) \times 100$$

4.2 Índices hepatossomático (IHS) e gonadossomático (IGS)

Ríos et al (2017) afirmam que, para analisar quantitativamente a atividade reprodutiva, as reservas alimentares disponíveis para o metabolismo hepático e o grau de desenvolvimento das gônadas podem ser aferidos a partir da relação proporcional entre o peso do órgão (fígado e gônadas) em relação à massa corporal, mediante as seguintes expressões:

$$\text{IHS} (\%) = (\text{massa fígado/massa corporal}) \times 100$$

$$\text{IGS} (\%) = (\text{massa da gônada/massa corporal}) \times 100$$

APÊNDICE A5 - ANÁLISE GENOTÓXICA

As análises de genotoxicidade foram realizadas em parceria com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

5.1 Ensaio cometa

O teste de genotoxicidade para avaliação de quebras no material genético, descrito por SINGH et al., 1988 e modificado por FERRARO, 2003, foi analisado por meio do ensaio cometa de sangue e consistiu das etapas descritas a seguir.

5.1.1 Preparação das lâminas com cobertura de agarose normal

- Foram dissolvidos 1,5 g de agarose normal em 100 mL de PBS em erlenmeyer, com agitação por duas horas. Essa mistura foi fervida em micro-ondas até sua fervura e completa dissolução.
- Após fervura, a agarose foi mantida a temperatura ambiente até solidificar, picada e levada novamente a fervura no micro-ondas, etapa esta que foi repetida mais uma vez. No final deste processo, a agarose foi mantida em banho-maria a 70 °C.
- As lâminas previamente limpas foram mergulhadas na agarose quente e retiradas cuidadosamente desta solução, tendo um dos lados da lâmina sido limpo com um lenço de papel.
- As lâminas foram mantidas *overnight* em superfície plana e à temperatura ambiente para que a camada de agarose solidificasse e posteriormente conservadas em geladeira.

5.1.2 Preparação de agarose de baixo ponto de fusão (LMP)

- Foram dissolvidos 100 mg de agarose de baixo ponto de fusão (LMP) em 20 mL de PBS, com somente uma etapa de fervura em forno de micro-ondas.

- A agarose foi mantida em geladeira até o momento do uso, quando foi aquecida em banho-maria e mantida a 37 °C.

5.1.3 Coleta de sangue e montagem das lâminas

- O sangue total de cada animal (± 1 mL) foi coletado e colocado em microtubo de centrifuga do tipo *ependorf*. Este tubo permaneceu sob refrigeração e ao abrigo da luz até a montagem das lâminas.
- Coletou-se 10 μ L de sangue de cada tubo e misturou-se com 1 mL de soro bovino fetal. Desta solução coletou-se 10 μ L e misturou-se gentilmente com 120 μ L de agarose LMP previamente preparada e levemente aquecida (37 °C). Esta suspensão foi depositada sob uma lâmina previamente coberta com agarose normal.
- Após a deposição da mistura agarose LMP (120 μ L) + sangue (10 μ L) sobre a lâmina, esta foi coberta com uma lamínula e acondicionada em geladeira por 10 minutos, evitando-se exposição direta à luz durante todo o processo, pois pode causar danos adicionais ao DNA.
- Após 10 minutos de refrigeração, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas acondicionadas em cubetas porta-lâminas onde foi adicionada a solução de lise previamente refrigerada (4 °C) e mantidas ao abrigo da luz. As lâminas foram mantidas nesta solução na geladeira durante 24 horas.
- Após o tempo de lise as lâminas foram cuidadosamente transferidas para uma cubeta de eletroforese horizontal, preenchendo o máximo possível todos os espaços vazios e quando necessário, os espaços vazios foram preenchidos com lâminas limpas.
- A cuba foi colocada sob refrigeração e no escuro, procedimento este que permite manter todo o processo de desespiralização do DNA e a própria corrida em uma temperatura de ± 4 °C.
- Na cuba de eletroforese, foi adicionada suavemente a solução de eletroforese (pH >13) de modo a cobrir todas as lâminas e estas permaneceram nesta solução por 25 minutos para permitir a desespiralização do DNA.

- Em seguida, iniciou-se a corrida eletroforética a 25 V e 300 mA por 25 minutos.
- Após o término da corrida eletroforética, as lâminas foram retiradas da cuba cuidadosamente e neutralizadas com 5 ml de solução de neutralização (pH 7,5) por 5 minutos. Após este tempo, foi retirada a solução inclinando-se as lâminas, procedimento este que foi repetido por mais duas vezes. A neutralização foi realizada aplicando diretamente o tampão sobre as lâminas com auxílio de uma pipeta sobre uma superfície plana.
- As lâminas foram colocadas na posição inclinada para secar em temperatura ambiente e após a secagem, foram fixadas em etanol 96% por 5 minutos e conservadas para posterior coloração e visualização.
- Para a coloração, foram adicionados 20 μ L de brometo de etídeo em cada lâmina, cobertas com lamínulas e mantidas por 5 minutos ao abrigo da luz.

5.1.4 Análises de dano ao DNA

Para a visualização dos danos do DNA, as lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência com aumento de 400x. Em teste cego, foram analisados 100 núcleos em cada lâmina e os danos classificados em cinco classes, de acordo com o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética. Os núcleos foram classificados em: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano máximo) e 4 (núcleo destruído ou em apoptose). A quantificação dos tipos de danos em cada lâmina e a atribuição de escores em cada classe foi realizada e os escores foram obtidos através da multiplicação do número de cometas encontrados em cada classe pelo valor da classe.

APÊNDICE A6 - ANÁLISE MOLECULAR

6.1 Expressão da Vitelogenina

6.1.1 Western Blotting

A concentração de proteínas plasmáticas dos peixes foi determinada através do método descrito por Bradford (1976). Em seguida, 50 µg de proteínas totais foram desnaturadas em tampão de amostra (1 M Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, glicerol, azul de bromofenol e 0,05% β-mercaptoetanol), separadas com SDS-PAGE 8% e coradas com coomassie blue R-250. Após a separação protéica, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão (Tris base 5 mM, glicina 192 mM, SDS 0,037%, metanol 20%) a 100 V, durante 60 minutos a 4 °C. A membrana foi bloqueada em 5% de leite em pó desnatado (Molico®) diluído em tampão TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) durante 1 h a temperatura ambiente. Após 3 lavagens com TBS de 5 minutos entre cada etapa, a membrana foi incubada com anticorpos não comerciais de vitelogenina anti- *Geophagus brasiliensis* diluído 1:20.000 em solução de bloqueio durante 16 h a 4 °C. Em seguida, a membrana foi lavada com tampão TBST e incubada com IgG de cabra anti-coelho conjugado com peroxidase (1:4000, Bio-Rad®) a temperatura ambiente durante 60 minutos. Foram feitas 3 lavagens em TBST e a reação foi detectada através de um kit quimioluminescente (Pierce®, Thermo Scientific) na membrana exposta a um filme de raio-x sensível por 10 minutos.

6.1.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Para a sensibilização, foram adicionadas às microplacas (NUNC Immuno TM plates, Maxisorb) 100 µL de anticorpo de captura anti-VTG (1,4 mg/mL) diluído para 0,2 µg/mL em tampão de sensibilização carbonato/bicarbonato (50 mM; pH 9,6), cobertas com selo adesivo e acondicionadas à 4 °C por 16 horas. A curva padrão para cada ensaio foi preparada a partir da diluição seriada de VTG purificada e tampão de diluição (PBS 1x acrescido de 0,5% de BSA). Para o controle negativo, foi usada amostra de macho não induzido e como controles

positivos foram usadas duas amostras (macho induzido purificado por duas etapas de cromatografia e VTG de tilápia - 286 µg/mL). Após incubação, foi descartada a solução por inversão e os poços da microplaca foram lavados 3 vezes com 150 µL de tampão de lavagem (PBS 1x acrescido de 0,1% de Twee-20 (PBS-T) por 2 minutos.

O bloqueio foi realizado adicionando 150 µL de tampão de bloqueio (2% de albumina do soro bovino (BSA) em PBS 1x) por poço. De seguida as placas foram cobertas com selo adesivo e incubadas a 25 °C por 90 minutos. Após o período de incubação, a solução foi descartada por inversão e os poços lavados 3 vezes com 150 µL de tampão de lavagem por 2 minutos.

A etapa de captura iniciou com a diluição das amostras de plasma para 1:10 no tampão de diluição, homogeneizadas 5 vezes por inversão e refrigeradas até o momento do uso. A seguir, 100 µL de cada amostra foram adicionados nos respectivos poços, as placas foram cobertas com selo adesivo e incubadas a 37 °C por 90 minutos. A solução foi descartada por inversão e os poços lavados 3 vezes com 150 µL de tampão de lavagem por 2 minutos.

Para a detecção primária, o anticorpo de detecção (biotinilado) (anti-VTGR-B (0,74 mg/mL) foi diluído para a concentração de 1 µg/mL no tampão de diluição e adicionado 100 µL da solução de anticorpo por poço. As placas foram cobertas com selo adesivo e incubadas a 37 °C por 60 minutos. Após incubação, a solução foi descartada por inversão e os poços lavados 3 vezes com 150 µL de tampão de lavagem por 2 minutos.

Na detecção secundária, o conjugado (enzima peroxidase com estreptavidina - SA-HRP) (1 mg/mL) foi diluído para 1:10.000 no tampão de diluição e adicionado 100 µL da solução por poço. As placas foram cobertas com selo adesivo e incubadas a 25 °C por 60 minutos. A solução foi descartada por inversão e os poços lavados 3 vezes com 150 µL de tampão de lavagem por 2 minutos.

Após colocar o substrato TMB (substrato para a enzima peroxidase) em temperatura ambiente, foram adicionados rapidamente nos poços 100 µL. As placas foram incubadas em ausência de luz por 20 minutos a temperatura ambiente. Após o período de incubação, a reação foi interrompida com 50 µL da solução de interrupção (ácido sulfúrico 2 M) por poço, as placas incubadas por 10 minutos em ausência de luz e a leitura da absorbância feita a 405 nm, no

leitor de microplaca Varioskan Lux™ Multimode Microplate Reader (Thermo Scientific) por até 30 minutos após finalização da reação. Para os cálculos foram utilizadas planilhas do programa Excel e do programa estatístico Prism GraphPad 8.3.1.

6.2 Quantificação de hormônios esteroides e tireoidianos

A dosagem de hormônios esteróides 17- β Estradiol e tireoidianos (T3, T4 e TSH) no plasma foi feita por meio do método de imunoensaio enzimático (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) de acordo com kit ALPCO.

APÊNDICE A7 - ANÁLISE BIOQUÍMICA

Para avaliar se a exposição ao BDE causou algum efeito nos parâmetros relacionados com o estresse oxidativo e neurotoxicidade, as amostras foram analisadas para os diferentes testes descritos a seguir. Para tanto, amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM, PMSF 1 mM, pH 7,6. As amostras de cérebro e músculo foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,5. Em seguida foram centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 20 minutos. Volumes conhecidos do sobrenadante para cada análise foram separados em diferentes tubos de microcentrífuga (1,5 mL) para posterior determinação da concentração de proteínas em cada amostra.

7.1 Quantificação protéica

A concentração de proteínas totais das amostras foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), comparando com uma curva-padrão de albumina de soro bovino (BSA). Em microplacas, foram adicionados 10 μ L do sobrenadante de cada amostra seguidos de 250 μ L do reativo de *Bradford* (*Coomassie brilliant blue BG-250*). Para o branco foi utilizado PBS e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorvância com os valores provenientes da curva-padrão de BSA nas concentrações de 0, 125, 250, 500, 750 e 1000 μ g de BSA por mililitro de volume

final de solução, seguido de normalização para o uso nos diferentes ensaios bioquímicos.

7.2 Catalase (CAT)

A cinética da enzima CAT foi mensurada baseada no método estabelecido por AEBI (1984) onde, um meio de reação com os reagentes na seguinte ordem foi preparado: 2,5 mL de tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0, 47,32 mL de água destilada e 180 μ L de H_2O_2 à 30%. Em seguida 20 μ L das amostras normalizadas para 0,3 mg/proteína/mL e em triplicata foram pipetadas em microplacas de 96 poços, seguido de adição de 180 μ L do meio de reação. A leitura foi realizada imediatamente em leitor de microplacas a 240 nm, cinética de 5 minutos em intervalos de 10 segundos. Neste ensaio, ocorre o decréscimo da absorbância devido à degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.

7.3 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade enzimática foi analisada de acordo com o método proposto por Kono (1978), baseado na capacidade da SOD em inibir a redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) para azul de formazan. Foram utilizados 30 μ L de amostra normalizada para 1mg/proteína/mL, pipetados em triplicata em placas de 96 poços. Em seguida foram adicionados 70 μ L de NBT e 100 μ L de hidroxilamina, obtendo as concentrações finais de 100 μ M e 36,85 mM, respectivamente. Em seguida, foi realizada a leitura em leitor de microplacas no tempo de 0, 2, 4, e 6 horas de incubação.

7.4 Glutathione-S-transferase (GST)

Para análise da atividade da enzima GST foi mensurada a formação de um tioéster a partir da reação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com o GSH, catalisada pela GST (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976). O meio de reação foi preparado utilizando 0,0093 g de GSH e 0,0081 g de CDBN diluídos em 19 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5. Após, 20 μ L das

amostras normalizadas para 1 mg/proteína/mL foram adicionadas em triplicata em microplacas de 96 poços, seguido da adição de 180 μ L do meio de reação. A absorbância foi medida imediatamente em um leitor de microplacas a um comprimento de onda de 340 nm.

7.5 Glutathione peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi avaliada de acordo com o protocolo descrito por Wendel (1981). O método é baseado no decréscimo da absorbância a 340 nm durante a redução da GSSG promovida pela GR na presença de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH). A oxidação do NADPH é equivalente a produção de GSSG a partir da GSH, na presença de peróxido de hidrogênio, reação esta catalisada pela GPx. Em triplicata foi adicionado 20 μ L da amostra, normalizadas para 1 mg/mL de proteína, em microplaca de 96 poços. Foram utilizados dois meios de reação: o primeiro foi preparado em 14,45 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7) contendo azida sódica (2mM), NADPH (0,2 mM), GSH (2mM) e 45 μ L de GR. Já o segundo meio continha tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7) e peróxido de hidrogênio 0,5mM. Primeiro, foi adicionado 140 μ L do primeiro meio de reação, seguido da adição de 40 μ L do segundo meio. A leitura foi realizada em leitor de microplacas, imediatamente, a 340 nm.

7.6 Glutathione disulfide reductase (GR)

A atividade da GR foi analisada de acordo com o método proposto por SIES et al. (1979), método baseado na capacidade de catálise da GR na redução de GSSG em GSH através da oxidação de NADPH e com o decréscimo de absorbância medido em espectrofotômetro a 340 nm. Em placas de 96 poços foram pipetados em triplicata, 50 μ L de amostras normalizadas. Em seguida foi adicionada 150 μ L do meio de reação contendo 16 mL de tampão fosfato de potássio (0,1M pH 7,6), NADPH 0,5mM e GSSG 5,0 mM. Após adição do meio de reação, foi rapidamente realizada a leitura das placas para obtenção da cinética enzimática.

7.7 Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A atividade da G6PDH foi descrita por GLOCK e MCLEAN, 1953 com modificações. O método baseia-se no aumento da absorbância causada pela redução do NADP^+ a NADPH pela G6PDH a 340 nm. 30 μL de amostras normalizadas para 1,0 mg/mL em tampão de homogeneização (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,6, PMSF 1 mM) e de branco (tris-EDTA) foram pipetadas em triplicata em placas de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 170 μL de meio de reação em cada poço e o acréscimo na absorbância foi imediatamente medido a 340 nm.

7.8 Tióis não-protéicos (TNP)

A concentração de tióis não protéicos (glutathiona) foi determinada a partir da precipitação de proteínas com posterior reação de TNPs com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Um meio de reação contendo 10 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% foi preparado e este foi adicionado à 200 μL de amostras congeladas e não normalizadas. A mistura foi centrifugada a 5000 g, 4 °C, 10 minutos e do sobrenadante obtido, 50 μL foram pipetados em triplicata em microplacas de 96 poços. Para comparação com os resultados obtidos, uma curva padrão de GSH foi preparada nas concentrações de 160, 80, 40, 20, 10, 5 e 0 μM . Posteriormente, foi adicionado aos poços 230 μL de tampão Tris-base 0,4 M, pH 8,9, seguido de adição de 20 μL de DTNB a 2,5 mM. A quantificação de TNP foi obtida através da leitura a 415 nm.

7.9 Peroxidação lipídica (LPO)

Os danos aos lipídios celulares de membrana foram avaliados de acordo com o método *Ferrous Oxidation* - FOX que tem como princípio, a rápida oxidação do Fe^{2+} mediada por peróxidos com formação do complexo Fe^{3+} - laranja de xilenol (JIANG; HUNT; WOLFF, 1991, 1992). Em um microtubo de 2 mL com 200 μL de sobrenadante das amostras ainda congeladas e não normalizadas, foram adicionadas 800 μL do meio de reação composto por 0,0038 g de laranja de xilenol, 0,0049 g de sulfato ferroso ammoniacal

($\text{FeSO}_4 \cdot \text{NH}_4$) e 0,0441 g de hidroxitolueno butilado (BHT), diluídos em 47,37 mL de methanol PA acrescido de 125 μL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 98%. Após 20 minutos de reação à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 9.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Do sobrenadante obtido, 200 μL foram pipetados em triplicata em microplacas de 96 poços e a absorbância foi medida a 550- 570 nm.

7.10 Carbonilação protéica (PCO)

A concentração de proteínas carboniladas foi quantificada segundo LEVINE et al. (1994), onde a reação das proteínas carboniladas com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) formou dinitrofenil hidrazonas. Às amostras normalizadas para 2 mg/ml (200 μL) foram adicionados 500 μL do reagente DNPH a 10 mM, HCl 2 M e mantidas à 34 °C por 90 minutos. Após incubação, colocou-se os tubos em gelo e adicionou-se 700 μL TCA a 28% e os microtubos foram agitados, centrifugados a 9.000 g, 4°C por 10 minutos e descartar o sobrenadante. O precipitado foi lavado 3 vezes por ressuspensão em etanol/acetato de etila gelado com posterior centrifugação e ressuspensão em hidrocloreto de guanidine a 6 M. De seguida foi feita a centrifugação para eliminação de resíduos não solúveis, as amostras pipetadas (200 μL) em duplicata em microplacas de 96 poços e leitura a 360 nm.

7.11 Acetilcolinesterase (AChE)

Os efeitos neurotóxicos foram avaliados pela medida da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) através do método de ELLMAN et al. (1961) modificado para microplaca por SILVA DE ASSIS (1998) cujo princípio é a hidrólise do substrato acetilcolina em tiocolina e acetato pela enzima AChE. A tiocolina resultante reage com o DTNB resultando na formação de 5-tio-2-nitrobenzoato, responsável pelo aparecimento da coloração amarela. Em microplacas de 96 poços, foram adicionados em triplicata 20 μL das amostras normalizadas para 1 mg/ml e acrescidos 130 μL de DTNB 0,75 mM. Em seguida foi adicionado 50 μL de iodeto de acetilcolina e realizada a leitura a 405 nm durante 4 minutos em intervalos de 30 segundos.

7.12 Resposta integrada de biomarcadores (IBR)

O índice de resposta integrada de biomarcadores (IBR), segundo BELIAEFF & BURGEOT (2002) e modificado por SANCHEZ et al. (2013) foi utilizado para avaliar o conjunto das respostas dos biomarcadores bioquímicos, enzimáticos e não enzimáticos, frente aos diferentes tratamentos. O índice pondera a diferença observada nos resultados de grupos tratados em relação ao grupo controle (SANCHEZ et al., 2013). Os valores basais de cada biomarcador (T0) foram usados como valor de referência. Para cada biomarcador individual obteve-se a razão entre o valor médio obtido em cada tratamento e o respectivo valor médio da linha de base (T0), a qual foi transformada em log (Yi). Em seguida, calculou-se a média geral (μ) e o desvio-padrão (s), considerando os valores de Yi de um determinado biomarcador. Os valores de Yi foram padronizados pela fórmula: $Z_i = (Y_i - \mu) / s$. A diferença entre Zi e Z0 (T0) foi utilizada para definir o índice de desvio do biomarcador (A). Para se obter a resposta integrada de múltiplos biomarcadores, o valor de A para cada biomarcador foi calculado, sendo o IBR estabelecido pela soma dos valores absolutos de A (VIEIRA et al., 2016).

APÊNDICE A8 - ANÁLISE MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL

8.1 Microscopia de luz

Após 16 h em fixador ALFAC (85% de álcool 80%, 10% de formol e 5% de ácido acético glacial) os tecidos coletados foram lavados e conservados em etanol 70%. Posteriormente, o fígado, o rim e a gônada masculina foram desidratados em série crescente de etanol (80, 90 e 95%, 100 I, 100 II, 100 III) diafanizados em xilol (álcool 100 + xilol (1:1), xilol I, Xilol II) incluídos (Paraplast I e II) e emblocados em paraplast Sigma® no Processador de Tecidos Micron® e Dispensador de Parafina Micron®. A gônada feminina seguiu outro protocolo onde primeiro, foram feitos cortes nas extremidades das mesmas, depois desidratadas em série crescente de etanol (80, 90 e 100%) diafanizados em xilol (álcool 100% + xilol, xilol puro) incluídos (Paraplast na estufa) e emblocados em paraplast.

Essa alteração de protocolo para o tecido gonadal foi estabelecida uma vez que este tecido apresenta características peculiares dos demais. Utilizando o micrótomo (Leica®), cortes de 5 µm foram obtidos e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina para análise em microscopia de luz. Para quantificação dos danos foi utilizado o método descrito por BERNET et. al., (1999). Os danos foram considerados de acordo com seu fator de importância, onde: (1) importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível; (2) importância patológica moderada, a lesão é reversível na maioria dos casos e (3) importância patológica marcante, a lesão geralmente é irreversível, levando a diminuição das funções do órgão. De acordo com o grau de ocorrência, foram atribuídos valores que variam de 0 (inalterado) a 6 (ocorrência severa). O Índice de lesão (IL) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IL = \sum_{pr} \sum_{alt} (a \times w)$$

Onde: pr = padrão de reação, alt = alteração, a = valor atribuído à alteração e w = fator de importância.

8.2 Microscopia eletrônica de transmissão

As porções de fígado coletadas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 mm² e fixados em Karnovsky modificado por 2 horas em temperatura ambiente (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4%, CaCl₂ 0,05 M em cacodilato 0,1 M, pH 7,2 - 7,4) com posterior acondicionamento a 4 °C. Após o período de fixação os fragmentos foram lavados em tampão cacodilato 0,1 M (3 lavagens de 10 minutos cada). A pós-fixação foi em tetróxido de ósmio 2 % em tampão cacodilato 0,2 M (1:1) por 1 hora até os fragmentos ficarem pretos. Em seguida foi feita a lavagem pós-fixação dos fragmentos em cacodilato por 10 minutos e lavagens em água destilada (3 vezes de 10 minutos cada). Uma pós-fixação em uranila 2 % foi feita por 1 hora, seguida de lavagens (3 vezes de 10 minutos cada). A seguir o material foi desidratado em série alcoólica crescente (Merck®) (30, 50, 60, 70, 80, 95, 100, 100, 100 %) de 10 minutos cada, com posterior inclusão em série em: óxido de propileno (3 vezes de 10 minutos cada), óxido de propileno + resina (1:1) por 1 hora, óxido de propileno + resina (1:2)

overnight com os tubos abertos. No dia seguinte o processo de inclusão teve continuidade com a transferência do material para outros microtubos, adição de resina pura PolyEMBED812 (ElectronMicroscopyScience®) por 30 minutos. Em seguida, foi feita a montagem do material nas formas, orientando para a extremidade da forma, colocou-se resina pura e deixou-se no vácuo *overnight* para retirada de possíveis bolhas. No dia seguinte, retirou-se as formas do vácuo, preencheu-se com resina pura, quando necessário, posicionou-se o material se estes tivessem se deslocado e colocou-se na estufa a 60 °C para polimerizar. Após polimerização, os blocos foram trimados e realizados os cortes ultrafinos com navalha de diamante com espessura de 70 nm. Após o procedimento de corte, o material passou pelo processo de contrastação em solução de Reynolds (citrato de chumbo) e uranila. A observação e captura de imagens foram realizadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM-1400 Plus, do Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ).

APÊNDICE B

RESULTADOS COMPLEMENTARES

APÊNDICE B - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA (B1-B6)

TABELA B1 - Variação de temperatura (° C) em tanques de bioensaio.

Tanque 1	Tanque 2	Tanque 3	Tanque 4	Tanque 5	Tanque 6	Tanque 7	Tanque 8
25,3	25,2	25,8	24,2	26	24,8	25	25,8
28,2	25,3	26,5	25,5	27,3	25,9	26	26,9
27,3	25,4	25,7	24	26,1	26,2	25	23,8
24,6	25,5	26,4	24,5	27,6	25,2	26,1	26,1
23,2	25,6	25,4	23,5	26,3	23,4	24,8	24,9
23,9	25,7	26,3	24,6	26,8	23,1	25,2	25,4
22,8	25,8	25	23,8	26,6	23,2	25	25
25,8	25,9	26	25,2	27	23,5	25,2	25,5
24,2	25,1	25,4	24	26	22,1	24,5	24,3
26	25,11	25,2	24	26,1	21,6	24,9	25,6
24	25,12	25,3	24,5	26,3	20,9	25,2	25,8
24,2	25,13	23,3	23,7	26,3	28,9	25,4	23,6
27	25,14	25,1	23,1	25,3	27,3	25,2	24,9
25,4	25,15	25	24,7	25,2	25,2	24,6	24,2
25,6	25,16	25,6	23,5	26,1	25,3	25,1	25
26,1	25,17	25,6	24,2	26	24,4	25,4	26,4
26	25,18	25,2	24	25,1	23,2	25,2	25,7
27,3	25,19	25,4	24,3	25,4	23	25,2	24,9
25,5	25,2	25,2	23,6	25,4	25,2	24,5	24,7
26,5	25,21	25,3	23,8	25,3	23,6	25,3	25,1
26,4	25,22	25,2	23,5	25,3	23,5	25,2	25,2
25,7	25,23	24,6	23,9	25	24,5	25,1	23,5
20	25,24	23,4	19	21,6	21	23,6	19,3
23,4	25,25	27,6	23,2	26,2	23,9	27	23,2
22	25,26	27,8	21,6	25,3	22,5	26,5	21,3
25	25,27	24,9	24,6	26,7	25	24,1	24
24,8	25,28	24,8	24,6	26,6	24,5	24,8	23,2
26,2	25,29	25,2	26,5	27,4	25,7	25	25,4
26,1	25,3	28,1	26,7	25,5	25,3	25,2	27,3
25,8	25,31	23,4	26,5	26,3	26,2	25	23,8
25,2	25,32	23,3	25,3	26	26,2	25,2	24,6
25,8	25,33	23,1	25,1	25,9	26	25,1	24,7
26,2	25,34	23,4	26,2	26,2	26,3	25,1	25,1
25,9	25,35	23,3	26,1	26,4	26,2	25,3	24,8
27,8	25,36	23,4	28,3	27,8	28,2	25,5	26,9
23,1	25,37	26	26	26	26,4	24,3	24,4
24	25,38	22,8	23,9	25,3	24,5	24,3	22,8
24,2	25,39	23	25	25,4	24,7	24,7	23,2
24,2	25,4	23,4	25,6	26,1	25,5	25,4	24,1
24,6	25,41	23,2	25,9	25,7	25,8	25,3	24,8
20,2	25,42	21,9	21,8	23,3	25,9	25,1	25

25,7	25,43	22,2	22,1	24,1	23,7	23,7	21,3
27,1	25,44	27,2	27,2	27,5	27,4	25,8	26,6
28	25,45	24,7	27,2	26,8	28,5	25,7	28,1
28,3	25,46	25,1	25,2	26,6	29,1	25,6	26,4
24	25,47	24,2	25	25,2	22,9	24,8	26,8
20,4	25,48	21,9	22,1	21,9	22,5	23,4	22,3
21,2	25,49	25,5	19,9	21,1	19,5	22,2	18,5
13,3	25,5	13,3	14,1	19,2	16,9	22,1	16,8
23,1	25,51	29,2	23	26,5	24	29,5	22,5
25,8	25,52	26,7	25,9	27,9	26	26,9	25
25,9	25,53	26	26	27,5	26	27,5	25
27	25,54	27	26	26,8	27	27	26
25	25,55	26	25	25,5	25	26	24
28	25,56	27	27	26,9	28	26,5	26,5
27,5	25,57	27	26,9	26,5	27,5	26,5	27
27	25,58	26,9	26,9	26	28	26	26
28,4	25,59	27	26,5	27	27,8	25,5	25,5
26	25,6	26	26	26	27	25,5	26
28,5	25,61	27	25,5	27	27,2	26,9	27
26,5	25,62	26,5	26	26	27	26	26
26,5	25,63	26	26	26	25,9	25,9	26
29	25,64	27,9	25,2	27	26,9	26	28,9
28	25,65	27	25	26,9	28,2	26	26,9
24,9	25,66	25	24,5	24,8	24,9	25	23
27	25,67	26,9	25,9	26,5	27	26,5	26,5
26	25,68	25,5	25	25,5	26,5	25,9	26
26	25,69	25	24,9	25,3	26	25	24,9
27,5	25,7	26,6	26	26,5	27,3	26	25,8
23,5	25,71	21	21	22	21	23	20,9
20	25,72	24	21	23	21	24	20
23	25,73	25	23	25	23	24	21
22	25,74	25	21,5	24	23	24	21

TABELA B2 - Variação de oxigênio dissolvido (mg/L) em tanques de bioensaio.

Tanque 1	Tanque 2	Tanque 3	Tanque 4	Tanque 5	Tanque 6	Tanque 7	Tanque 8
5,2	5,3	5,5	4,8	4,5	5,5	5,5	4,7
4,9	4,8	4,9	4,2	3,7	4,7	3,9	4
4,5	3,9	4	6,3	3,7	5	4,5	5,3
4,4	4,1	3,1	3,4	3,7	4,3	4,4	6,6
5,2	3,7	4,2	3,2	5,8	5,2	4,7	3,7
4,8	2,8	3,8	3,4	3,7	3,8	5,2	4,1
4,6	4,9	5,6	8,1	6,2	6,5	6,2	7
5	5,3	6	8,3	6,3	6,1	6	6,8
5,2	4,8	4,7	8,6	2,7	5,1	6,1	6,7

5,2	4,8	6,2	9,2	5	4,6	5,5	3,6
3,2	4,5	4,2	8,3	4,2	2	3,8	2,9
6,5	5	6,1	3,8	5,3	6,1	6,2	6
4,7	4,7	5,7	5	5,8	5,5	5,3	4,8
5,3	4,5	4,5	3,7	4,2	4,8	4,7	4,2
5,1	5,1	4,6	4,4	3,8	4,8	3,6	4
4,9	4,7	4,3	4,9	4	5,3	6	5,6
4,5	4,3	5	4,4	4,4	5,3	5,3	6,6
4,2	3	3,6	3,8	3,6	4,3	4,5	4,5
4,7	3,6	5,3	3,6	3,6	4,2	6	4,2
3,3	3,4	3,7	5,7	7	4,7	4,2	3,7
4,7	6,6	6,5	5,1	4,3	4,8	6,5	6,3
4,4	4,8	4,6	4,6	4,3	4,8	4,3	3,7
5,5	6,8	6,2	5,3	5,1	7,6	6,2	6,3
4,2	4,9	3,1	5,1	3,5	4,6	3,8	4,7
4,4	5,1	4,4	5,1	3,7	4,8	4,7	4,5
4,3	5,3	5,2	4,9	4,1	4,7	2,9	3,3
5	5,3	5,3	6	4,8	5,2	4	4,3
4,4	4,8	4,7	4,6	4,4	4,6	4,9	4,4
8,7	4,2	4,3	7,1	4	5,4	4,7	3,3
3,8	2,9	3,9	5,2	3,3	5,3	4,5	5,5
2,1	2,3	2,5	2,3	2,1	2,1	2,2	2,5
6,5	7	7,3	6,2	6,4	6,4	6,5	5,4
5,7	5,3	5,7	6,3	6,3	6,4	7,7	7,7
8	7,5	7,2	5,8	6,6	7,2	7,8	7,2
4,2	3,8	5	3,3	3,6	3,2	2,6	2,6
5,7	5,2	5,7	5,7	5,7	5,3	5,5	3,9
3,7	4,6	3,5	3,6	6	6,2	6	5,8
5,3	5,6	5,1	4,8	4,8	5,2	5,2	3,6
2,9	3,9	4,4	4	3,8	4,6	4,1	4,6
2,7	3,2	3,2	3	4	3,9	4,1	4
4,5	1,9	4,8	5,2	5,4	2,8	3,1	2,7
3,3	3,2	3,3	3,6	3,4	5,3	4,1	4,9
4,3	1,5	3,6	4,2	4,1	4,1	4,1	3,7
3,5	4,3	3,7	3	3,7	3,4	3,3	2,4
3,2	3,8	3,3	3,3	2,8	3,2	3,9	2,4
3,6	3,5	4	4,5	4,2	4,4	3,7	3,7
3	3,3	3,2	3,2	3,1	4,3	3,7	3,3
3,7	4	2,5	3	2,9	3,2	2,7	3,2
3,3	4	2,3	2,5	2	4,2	2,3	3,4

TABELA B3 - Variação do potencial hidrogênico (pH) em tanques de bioensaio.

Tanque 1	Tanque 2	Tanque 3	Tanque 4	Tanque 5	Tanque 6	Tanque 7	Tanque 8
6,6	6,8	6,6	6,8	6,6	6,6	6,6	6,6
6,4	6,4	6,4	6,6	6,4	6,4	6,4	6,4
6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6
6,2	6,6	6,4	6,2	6,2	6,4	6,2	6,2
6,2	6,2	6,2	6,4	6,2	6,2	6,2	6,2
6,4	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,4	6,4
6,2	6,2	6,2	6,2	6,4	6,4	6,2	6,2
6,2	6,2	6,6	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2

TABELA B4 - Variação de amônia (ppm) em tanques de bioensaio.

Tanque 1	Tanque 2	Tanque 3	Tanque 4	Tanque 5	Tanque 6	Tanque 7	Tanque 8
0,008	0,016	0,008	0,013	0,008	0,006	0,008	0,008
3,5	3,5	3,5	0,006	3,5	3,5	3,5	3,5
0,011	0,008	0,008	0,002	0,008	0,006	0,008	0,005
3,5	0,008	3,5	3,5	3,5	2	3,5	3,5
3,5	2	2	3,5	3,5	2	2	2
6,5	6,5	3,5	3,5	3,5	3,5	6,5	3,5
3,5	3,5	3,5	2	3,5	3,5	3,5	3,5
3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5

TABELA B5 - Variação de nitrito (ppm) em tanques de bioensaio.

Tanque 1	Tanque 2	Tanque 3	Tanque 4	Tanque 5	Tanque 6	Tanque 7	Tanque 8
2,8	2,8	1.0	2.8	1.75	1.0	1.0	1.0
0,5	2,8	0.25	2.8	1.0	0.5	0.25	0.25
1	1	1.0	0.25	1.0	0.5	0.25	0.5
1	1	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25
0	0,25	0.25	0.25	0.25	0.0	0.25	0.0
0,5	0,5	0.5	0.25	0.25	0.5	1.75	1.0
0,5	0,25	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
0,25	0,5	1.0	0.25	1.0	1.0	0.25	0.5

TABELA B6 - Médias e desvio padrão dos parâmetros físico-químicos previamente mensurados nos tanques de bioensaio.

	Média	Desvio Padrão
Temperatura (°C)	25,08	1,95
O₂ (mg/L)	4,60	1,29
pH	6,37	0,18
NH₃ (ppm)	2,49	1,77
NO₂ (ppm)	0,98	0,15

TABELA B7 - Ocorrência de alterações histopatológicas no fígado e rim de *O. niloticus* expostos ao BDE-99. Os valores são apresentados em percentagem.

Liver					
Treatment (ng. g ⁻¹)	Vascular congestion	Necrosis	Steatosis	MMC	
Control	15	0	8	23	
0.294	18	29	18	12	
2.94	88	76	94	88	
29.4	79	79	86	71	
Kidney					
Treatment (ng. g ⁻¹)	Hemorrhage	Pyknotic nucleus	Adipose tissue	Necrosis	MMC
Control	0	0	0	14	7
0.294	12	6	0	24	18
2.94	61	83	61	44	39
29.4	36	79	14	79	36