

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta  
tese será disponibilizado  
somente a partir de 30/03/2023.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Thania Rios Rossi Lima**

**Mecanismos de citotoxicidade do diuron em células  
uroteliais – Possível papel de lesão mitocondrial**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lílian Cristina Pereira  
Coorientadores: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo  
Profa. Dra. Carla Adriene da Silva

**Thania Rios Rossi Lima**

**Mecanismos de citotoxicidade de diuron em células uroteliais – Possível papel de lesão mitocondrial**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lílian Cristina Pereira  
Coorientadores: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo  
Profa. Dra. Carla Adriene da Silva

Botucatu

2022

L732m

Lima, Thania Rios Rossi

Mecanismos de citotoxicidade do diuron em células uroteliais

– Possível papel de lesão mitocondrial / Thania Rios Rossi

Lima. -- Botucatu, 2022

120 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientadora: Lílian Cristina Pereira

Coorientador: João Lauro Viana de Camargo

1. Diuron. 2. Herbicida. 3. Toxicidade urotelial. 4. Disfunção  
mitocondrial. 5. Cultura celular. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da  
Faculdade de Medicina, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

*Dedicatória*

**À família**

Dedico este trabalho à minha família, a qual amo muito. Sei que sempre posso contar com vocês!

**Ao esposo**

Dedico este trabalho também ao meu esposo, Leandro. Obrigada pelo incentivo e companheirismo, sobretudo nas horas difíceis.

# *Agradecimientos*

Aos meus pais, Aparecido e Juliana, por terem me dado a vida e me proporcionarem inúmeras oportunidades de aprendizado. Progredir sempre, tal é a lei!

Ao meu irmão Túlio, pelo carinho e por estar sempre presente.

Aos meus avós Clarice e Luiz, e demais familiares, por me apoiarem em todos os momentos de minha vida.

Ao amor da minha vida, Leandro. Obrigada por estar presente na conclusão de mais essa etapa!

Aos queridos amigos do laboratório pelo companheirismo e por tornarem o dia-a-dia de trabalho mais leve e descontraído.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado (Processo nº 167774/2018-2)

À FAPESP, pelo auxílio financeiro (Processo nº 2017/25402-5).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante parte do período de meu doutoramento e pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche (CAPES-PrInt - Processo nº 88887.467311/2019-00).

Ao Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana (TOXICAM), pelo suporte na realização deste trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram para que este trabalho fosse concluído, meu muito obrigada!

*Agradecimentos  
especiais*

À minha orientadora, Dra. Lílian Cristina Pereira, por compartilhar seu conhecimento e por todo o suporte na realização deste trabalho. Você é exemplo de dedicação à ciência!

Ao Dr. João Lauro Viana de Camargo, o meu mais sincero agradecimento por abrir as portas do TOXICAM e me permitir fazer parte desse grupo de pesquisa de excelência.

À Dra. Carla Adriene da Silva pelo companheirismo e pelo auxílio na coorientação deste trabalho.

Vocês, queridos professores, me inspiram a aprender e ter pensamento crítico. Obrigada por acreditarem no meu potencial!

“Não há problema que não possamos resolver juntos e muito poucos os que possamos resolver sozinhos.”

Lyndon B. Johnson

Os efeitos tóxicos de substâncias químicas sobre o sistema urinário têm sido estudados ao longo dos últimos anos, sendo que o herbicida diuron e seus metabólitos mostraram potencial cancerígeno na bexiga urinária de ratos Wistar e citotoxicidade em células uroteliais derivadas de ratos e humanos. Assim, estudos que buscam elucidar os principais eventos envolvidos na toxicidade desses compostos são essenciais para compreender o possível mecanismo de ação sobre o urotélio. Este estudo teve como objetivo investigar os mecanismos de toxicidade urotelial exercida pelo diuron e metabólitos, abordando o possível papel da disfunção mitocondrial. Após exposição aos produtos químicos, as células uroteliais humanas 1T1 apresentaram alterações relacionadas à morte e proliferação, instabilidade do ciclo celular, estresse oxidativo, e dano mitocondrial. Além disso, por meio de investigação metabolômica em mitocôndrias uroteliais isoladas de ratos Wistar foram encontradas alterações em moléculas associadas à membrana e em moléculas envolvidas no metabolismo celular. Avaliados em conjunto, tais resultados indicam potencial ação nociva do diuron e seus metabólitos sobre a função mitocondrial, o que pode ser considerado o evento iniciador de um processo sequencial que desencadeia a citotoxicidade observada neste estudo e as alterações morfológicas observadas em estudos anteriores.

The toxic effects of chemical substances on the urinary system have been studied over the past years, being that the diuron herbicide and its metabolites showed carcinogenic potential in the urinary bladder of Wistar rats and cytotoxicity in rat and human-derived urothelial cells. Thus, studies that seek to elucidate the key-events involved in the toxicity of these compounds are essential to understand the possible mechanism of action on the urothelium. This study aimed to investigate the underlying mechanisms linked to urothelial toxicity resulting from diuron and metabolites exposure, addressing the possible role of mitochondrial dysfunction. After exposure to the chemicals, human urothelial cells 1T1 showed alterations related to death and proliferation, cell cycle instability, oxidative stress, mitochondrial and damage. Additionally, through metabolomic investigation in urothelial mitochondria isolated from Wistar rats, alterations in membrane-associated molecules and in molecules involved in cellular metabolism were found. Altogether, these results indicate potential harmful action of diuron and its metabolites on mitochondrial function, which can be considered the initiator event of a sequential process that triggers the cytotoxicity observed in this study and the morphological changes observed in previous studies.

## CAPÍTULO I

Figura 1. Cultivo de células 1T1 em monocamada. Aumento de 100x .....	- 22 -
Figura 2. Caracterização morfológica dos 3 tipos mais comuns de morte celular: apoptose, necrose e autofagia .....	- 29 -
Figura 3. Etapas da fosforilação oxidativa.....	- 31 -

## CAPÍTULO II

### MANUSCRITO I

Figure 1. Kinetic study of the cell growth.....	- 64 -
Figure 2. MTT reduction rate (%). .....	- 65 -
Figure 3. Cell proliferation (%).....	- 66 -
Figure 4. Micrographs in 100X magnification showing the proliferation of the 1T1 cells .....	- 67 -
Figure 5. Cell cycle; % of cells in each phase .....	- 69 -
Figure 6. Percentage (%) of live and dead cells .....	- 71 -
Figure 7. Percentage (%) of labelled cells for Annexin V/PI .....	- 72 -
Figure 8. Percentage (%) of cells positive for nuclear condensation and fragmentation .....	- 74 -
Figure 9. Micrographs for nuclear condensation and fragmentation.....	- 75 -
Figure 10. Monitoring of the location of lysosomes in the cytosol of 1T1 cells .....	- 77 -
Figure 11. Fluorescence microscopy micrographs at 1000X magnification showing the accumulation of the LysoTracker.....	- 78 -

Figure 12. Effect of diuron and metabolites on protein conversion from LC3 to LC3B in 1T1 cells ..... - 80 -

Figure 13. Micrographs showing cell nuclei labeled in blue, the LC3B protein in red, and the MitoTracker probe in green ..... - 81 -

Figure 14. Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ )..... - 83 -

Figure 15. Micrographs in 400X magnification showing the accumulation of the TMRM probe in 1T1 cells ..... - 84 -

Figure 16. Production of RONS (%) ..... - 86 -

**MANUSCRITO II**

Figure 1. Partial Least Square-Discriminant Analysis (PLS-DA) score plot model ..... - 109 -

Figure 2. Heatmap demonstrating the frequency averages of the markers per group. .... -110 -

Figure 3. Detected molecules (red square) using metabolomic analysis and their relationship with mitochondria ..... - 111 -

Figure 4. Graphical abstract ..... - 112 -

Figure S1. Principal Component Analysis (PCA) score plot validation ..... - 114 -

**CAPÍTULO I**

Tabela 1. Estrutura química do diuron e seus metabólitos..... - 24 -

**CAPÍTULO II**

Table 1. Proposed markers elected by PLS-DA VIP scores of urothelial mitochondria isolated from Wistar rats and exposed to diuron or its metabolites. <sup>1</sup>METLIN ID; PC-Phosphatidylcholine; PI-Phosphatidylinositol; PS-Phosphatidylserine .....- 108 -

Table S2. Significance of markers' intensities variation (Fold change - FC) between comparisons of each chemical exposed groups to negative controls (NC) were tested with t-test using FDR adjusted p-value.....- 113 -

## Lista de abreviatuas e siglas

---

ADME	Absorção, distribuição, metabolização e excreção
AiP	Apoptosis-induced proliferation
ATP	Adenosina-trifosfato
CCCP	Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine
DCA	3,4-dicloroanilina
DCPMU	3-(3,4-diclorofenil)-1-metilureia
DCPU	3,4-diclorofenilureia
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ERONs	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
GHS	Globally Harmonized System
IA	Ingrediente ativo
MoA	Mode of action/Modo de ação
mtDNA	DNA mitocondrial
MTT	[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]
PC	Phosphatidylcholine
PI	Phosphatidylinositol
PI	Propidium iodide
PS	Phosphatidylserine
PTPM	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
RONS	Reactive oxygen and nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
TIM	Translocases of the inner mitochondrial membrane
TMRM	Tetramethylrhodamine methyl ester
U.S. EPA	Agência de Proteção Ambiental norte-americana

**CAPÍTULO I**

1. INTRODUÇÃO..... - 20 -

1.1 Bexiga como órgão-alvo de toxicidade..... - 20 -

1.2 Praguicidas no Brasil..... - 22 -

    1.2.1 Diuron ..... - 23 -

    1.2.2 Estudos experimentais ..... - 25 -

1.3 Citotoxicidade..... - 27 -

1.4 Importância da mitocôndria na toxicidade de xenobióticos ..... - 30 -

1.5 Metabolômica na avaliação de disfunção mitocondrial ..... - 32 -

REFERÊNCIAS..... - 34 -

2. OBJETIVOS..... - 40 -

2.1 Geral ..... - 40 -

2.2 Específicos..... - 40 -

**CAPÍTULO II**

**MANUSCRITO I**

Abstract ..... - 43 -

1. Introduction ..... - 44 -

2. Material and Methods ..... - 45 -

    2.1. Chemical exposure..... - 45 -

    2.2. Cytotoxicity analysis..... - 46 -

---

---

2.2.1.	Cellular culture.....	- 46 -
2.2.2.	Kinetic study - Cell growth curve.....	- 46 -
2.2.3.	Cellular metabolic capacity - MTT.....	- 47 -
2.2.4.	Cell proliferation.....	- 47 -
2.2.5.	Cell cycle analysis .....	- 47 -
2.2.6.	Live/Dead assay .....	- 48 -
2.2.7.	Annexin V/PI assay.....	- 48 -
2.2.8.	Nuclear abnormalities .....	- 48 -
2.2.9.	Lysosome accumulation .....	- 49 -
2.2.10.	LC3B accumulation.....	- 49 -
2.2.11.	Mitochondrial membrane potential.....	- 50 -
2.2.12.	Accumulation of Reactive Oxygen and Nitrogen Species (RONS) ...	- 51 -
3.	Statistical analysis.....	- 51 -
4.	Results.....	- 51 -
4.1.	Cytotoxicity assays.....	- 51 -
4.1.1.	Kinetic study - Cell growth curve.....	- 51 -
4.1.2.	MTT reduction rate .....	- 52 -
4.1.3.	Cell proliferation.....	- 52 -
4.1.4.	Cell cycle alterations.....	- 53 -
4.1.5.	Live/Dead.....	- 53 -

4.1.6. Annexin V/PI .....	- 53 -
4.1.7. Nuclear abnormalities .....	- 54 -
4.1.8. Autophagy - Accumulation of lysosomes and LC3B .....	- 54 -
4.1.9. Mitochondrial membrane potential .....	- 55 -
4.1.10. RONS production by 1T1 cells.....	- 55 -
5. Discussion .....	- 55 -
6. Acknowledgments.....	- 60 -
7. Conflict of interest statement .....	- 60 -
8. Funding.....	- 60 -
References.....	- 60 -
Figures .....	- 63 -
Figure captions.....	- 86 -
 <b>MANUSCRITO II</b>	
Abstract .....	- 91 -
Introduction.....	- 92 -
Material and Methods .....	- 93 -
Experimental animals .....	- 93 -
Mitochondrial isolation.....	- 94 -
Chemical exposure assay .....	- 94 -
Mass spectrometry analysis .....	- 95 -
Statistical analysis and markers annotation.....	- 95 -
Results .....	- 96 -
Discussion and Conclusion .....	- 97 -

Acknowledgements .....	- 101 -
Conflict of interest statement .....	- 101 -
Funding .....	- 101 -
References .....	- 102 -
Table .....	- 108 -
Figures .....	- 109 -
Figure captions .....	- 113 -
Supplementary material.....	- 114 -
Conclusão .....	- 117 -
Anexos .....	- 119 -

# *Capítulo I*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Bexiga urinária como órgão-alvo de toxicidade

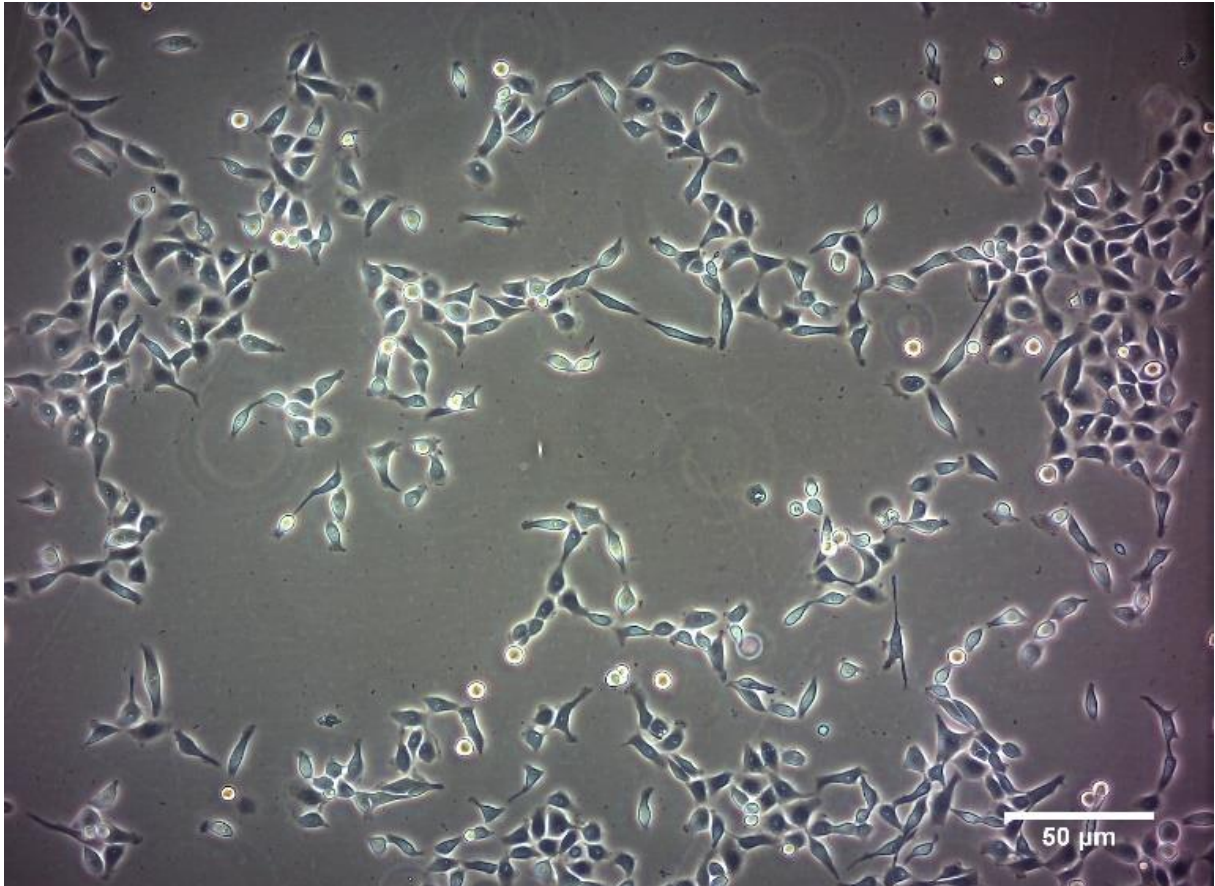
Quando em contato com uma substância química, inicia-se no organismo o processo de toxicocinética, pelo qual a substância é absorvida, distribuída, metabolizada e excretada (ADME) (1, 2). A absorção ocorre principalmente pelas vias dérmica, inalatória e digestiva, sendo que a resposta adversa pode iniciar logo no sítio de contato. A substância pode ser distribuída através do organismo e causar efeitos em múltiplos órgãos ou atuar em órgãos-alvo, e pode ainda sofrer biotransformação, o que favorece a excreção. No entanto, a biotransformação pode gerar metabólitos menos ou mais tóxicos, levando também a desfechos adversos. Na fase de eliminação, fezes e urina são vias primárias de grande importância (1, 2).

A urina é formada pelos néfrons nos rins e é transportada para a bexiga urinária através dos ureteres. A bexiga é uma víscera de armazenamento e sua composição microscópica é organizada em diferentes camadas: epitélio do revestimento, lâmina própria, muscularis propria e serosa. Em particular, o epitélio de revestimento da bexiga urinária, ou urotélio, é a camada mais superficial e possui em sua estrutura as células superficiais em forma de guarda-chuva (*umbrella cells*), tornando-o uma barreira protetora contra lesões nas camadas subjacentes. O urotélio também reveste a pelve renal, ureter e uretra. A bexiga possui capacidade de armazenamento de aproximadamente 500-700 mL, podendo permanecer por tempo razoável - em média 24 horas - em contato com as substâncias a serem expelidas (3, 4). Quanto mais tempo as substâncias permanecerem na bexiga, maior é a probabilidade de ação tóxica local (2).

Os efeitos da ação tóxica de substâncias químicas no sistema urinário têm sido motivo de preocupação há vários anos (5). Por exemplo, em estudo desenvolvido por Hueper, Wiley (6), foi observado que a formação de metabólitos reativos desempenha um papel fundamental no modo de ação carcinogênico das aminas aromáticas na bexiga urinária. Dentre as aminas aromáticas está o 2-acetilaminofluoreno (2-AAF), substância formulada na década de 1940 com propósito praguicida, mas que teve sua comercialização impedida após a descoberta de seu alto potencial carcinogênico para a bexiga em diferentes espécies animais (7). Dessa forma, pesquisas envolvendo o estudo da toxicidade química em diferentes níveis do sistema urinário mostram-se essenciais para a compreensão do modo e mecanismos de ação subjacentes, e podem auxiliar na tomada de decisão regulatória. Nesse contexto, o cultivo de células ou tecidos em ambiente *in vitro* constitui ferramenta muito útil para a compreensão dos eventos-chave envolvidos na toxicidade de compostos químicos (8). Assim como na experimentação *in vivo*, o uso de células derivadas de seres humanos possibilita a obtenção de resultados toxicológicos representativos e que, portanto, aumentam a previsibilidade para toxicidade humana (9). Além do mais, as culturas de linhagens celulares humanas apresentam-se como uma excelente ferramenta para otimização de métodos alternativos à utilização de animais em pesquisas (10-13).

Diferentes linhagens celulares podem ser empregadas nos ensaios *in vitro* para avaliar dano causado ao urotélio, dentre elas, as células 1T1 (Figura 1). A população de células 1T1 é derivada do epitélio de ureter humano saudável e imortalizada por transfecção dos genes E6 e E7 de HPV-16 (14). O cultivo da linhagem celular 1T1 é um modelo bem caracterizado na pesquisa da biologia do

tumor de bexiga e tem sido utilizado na avaliação de citotoxicidade, além de genotoxicidade e mutagenicidade em diferentes protocolos experimentais (15-17).



**Figura 1.** Cultivo de células 1T1 em monocamada. Aumento de 100x. Foto do próprio autor.

No cotidiano, o contato com substâncias potencialmente tóxicas ao organismo, incluindo o sistema urinário, muitas vezes ocorre em baixas doses, mas de forma frequente (18). Dentre essas substâncias estão os ftalatos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bem como alguns praguicidas (5, 18).

## 1.2 Praguicidas no Brasil

O uso de praguicidas, definidos como substâncias ou misturas de substâncias químicas responsáveis por eliminar, repelir ou controlar pragas, está

entre os principais instrumentos do atual modelo de agricultura no Brasil (19). A necessidade de aplicação dessas substâncias nas lavouras deve-se principalmente ao clima tropical, que favorece o aparecimento de pragas. Embora o Brasil seja um grande consumidor de praguicidas, também possui um extenso território de área plantada que chega a 75.866.854 hectares, ou seja, cerca de 9% do território total (20). Em 2020, as vendas internas de ingredientes ativos (IA) (Produtos Formulados) no país corresponderam a 685,745.68 mil toneladas, o que representa um aumento de 10,51% com relação ao ano anterior. Dentre as classes de praguicidas que apresentaram maior volume de vendas nesse mesmo ano, destacam-se os herbicidas, com um total de 413,833.41 toneladas de IA, sendo que somente no estado de São Paulo esse valor chegou a 47,825.02 toneladas. Do total de praguicidas comercializados em São Paulo, 47,25% pertencem a classe III de periculosidade de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação (GHS, sigla em inglês) adotado pela ANVISA, na qual está inserida o herbicida diuron, que atingiu 3,723.33 toneladas em vendas no estado e 7,901.84 toneladas no Brasil (21).

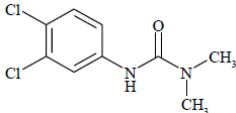
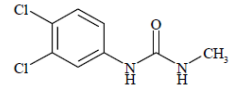
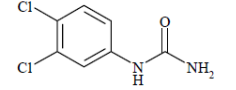
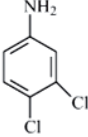
### 1.2.1 Diuron

O diuron 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia é um herbicida derivado da ureia comumente aplicado na pré- e pós-emergência de plantas infestantes em culturas de soja, abacaxi, alfafa, algodão, banana, cana-de-açúcar, cacau, café, citros, seringueira e uva (22, 23). Sua ação herbicida se dá pela inibição da reação de fotólise da água e consequente produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ERONs) que levam à destruição peroxidativa de pigmentos como clorofila e de ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, inibindo a fotossíntese (24, 25). As

plantas infestantes possuem vantagem ecológica com relação à proliferação vegetativa; as sementes ou estruturas de reprodução apresentam capacidade de germinação em fases iniciais de desenvolvimento. Por outro lado, o seu ciclo de vida curto associado à área de absorção e dose aplicada as tornam mais suscetíveis à toxicidade dos herbicidas (26).

A ampla utilização do diuron na agricultura combinada à lenta degradação no solo possibilita sua dispersão para o lençol freático e contaminação aquática (27, 28). Fatores climáticos, características físicas, químicas e microbiológicas do solo e propriedades físico-químicas do herbicida influenciam a degradação no ambiente e resultam em metabólitos potencialmente tóxicos: 3-(3,4-diclorofenil)-1-metilureia (DCPMU), 3,4-diclorofenilureia (DCPU) e 3,4-dicloroanilina (DCA) (Tabela 1) (28, 29).

**Tabela 1.** Estrutura química do diuron e seus metabólitos.

Substância	Estrutura química	Nomenclatura IUPAC*	Referência
Diuron		3-(3,4-diclorofenil)- 1,1-dimetilureia	(22)
DCPMU		3-(3,4-diclorofenil)-1-metilureia	
DCPU		3,4-diclorofenilureia	
DCA		3,4-dicloroanilina	

\*International Union of Pure and Applied Chemistry.

Os mesmos metabólitos são gerados durante a metabolização do herbicida em mamíferos, incluindo o homem. Neles, o diuron é absorvido pelo trato gastrointestinal e respiratório (28). A biotransformação ocorre por desmetilação, hidroxilação do anel aromático, N-oxidação, dechlorinação e conjugação com ácido glicurônico, sendo excretado pela urina ou, em menor quantidade, pelas fezes (23, 28). Há poucos estudos sobre o metabolismo do diuron em humanos. No entanto, em um relato isolado de intoxicação aguda, o principal metabólito encontrado na urina foi o DCPMU, seguido por pequenas quantidades de DCPU e traços de DCA (30). Em ratos, o diuron é quase que completamente absorvido e metabolizado, sendo o DCPU o principal metabólito urinário (31). Uma vez que a sua eliminação ocorre principalmente pela urina, o tecido urotelial é um alvo importante da toxicidade desse herbicida e/ou seus metabólitos.

### 1.2.2 Estudos experimentais

O diuron foi classificado pela Agência de Proteção Ambiental norte-americana (U.S. EPA) como “provável cancerígeno para a espécie humana” após estudo de carcinogenicidade de dois anos apresentar aumento das incidências de papilomas e carcinomas uroteliais na pelve renal e na bexiga de ratos Wistar de ambos os sexos expostos continuamente a 2.500 ppm via ração (25, 32). Estudos desenvolvidos em nosso laboratório - Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana (TOXICAM) - permitiram propor o modo de ação (MoA) pelo qual o herbicida é cancerígeno para o urotélio de ratos, onde o produto parental e/ou seus metabólitos induzem sucessivamente citotoxicidade inicial, degeneração celular, esfoliação e necrose seguida de hiperplasia regenerativa contínua e potencial aparecimento de tumores. Nesses estudos *in vivo*, em que o diuron foi administrado

por via oral pela ração em concentrações de até 2.500 ppm, não foi detectado genotoxicidade em células uroteliais ou de sangue periférico pelo ensaio do cometa, nem alterações na composição urinária, como mudanças do pH ou a presença de sólidos urinários (cristais e cálculos) (31, 33-37).

Foram observadas alterações uroteliais à microscopia eletrônica de varredura (MEV) já no primeiro dia de tratamento de ratos alimentados com ração contendo 2.500 ppm de diuron, o menor período de exposição avaliado. Essas alterações consistiram em células uroteliais edemaciadas, salientes para o lúmen da bexiga, sendo denominadas “*swollen cells*”. A incidência e quantidade dessas células aumentaram no 3º dia de estudo e persistiram até o 7º dia. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) no 7º dia mostrou que essa alteração correspondia à degeneração hidrópica citoplasmática e nuclear, que resultavam no alargamento e protrusão das células uroteliais superficiais para o lúmen vesical, com ruptura da membrana celular, necrose e esfoliação (36). Uma das causas que podem levar a este quadro morfológico é a disfunção mitocondrial, fator que nos levou a aprofundar na avaliação deste parâmetro no presente trabalho.

Os estudos também mostraram aumento das incidências de necrose urotelial, hiperplasia e índice de proliferação celular em ratos Wistar machos tratados durante 15-20 semanas com 125, 500, 1.250 e 2.500 ppm de diuron na ração, sendo que resultados significativos foram observados em 2.500 ppm a partir de 7 dias de exposição (33-35, 38, 39). Esse perfil dose-resposta também foi observado quanto à expressão de genes relevantes para a carcinogênese em células uroteliais isoladas da bexiga de ratos expostos a diferentes concentrações do diuron por períodos variados. Foi possível observar, pela análise PCA (*Principal Component Analysis*) - ferramenta de resolução de dados que agrupa amostras de expressão gênica

similares em um espaço tridimensional - evidente separação entre os grupos expostos a altas concentrações (1.250 e 2.500 pm) e a baixas concentrações (60, 125 e 500 ppm) após 07 dias ou 20 semanas de exposição pela ração (39, 40).

Diferenças na resposta citotóxica aos metabólitos urinários foram demonstradas em estudos *in vitro* com células uroteliais de ratos (MYP3) e humanas (1T1). Para a linhagem MYP3, DCPMU foi o metabólito mais citotóxico, seguido por DCPU, enquanto DCA foi o metabólito mais citotóxico para as células 1T1, seguido por DCPU e DCPMU (37).

Embora o MoA citotóxico do diuron tenha sido proposto com base nesses estudos experimentais, seu mecanismo de toxicidade ainda não foi completamente estabelecido. Deste modo, ensaios utilizando métodos alternativos *in vitro* podem auxiliar no esclarecimento mecanístico dos processos bioquímicos e celulares envolvidos no dano ocasionado pela exposição ao herbicida. Esses métodos *in vitro* não só permitem a análise detalhada de efeitos subcelulares como atendem ao movimento de cuidados éticos com animais de experimentação, pela sua substituição, refinamento e redução de uso (3R's) (10).

### 1.3 Citotoxicidade

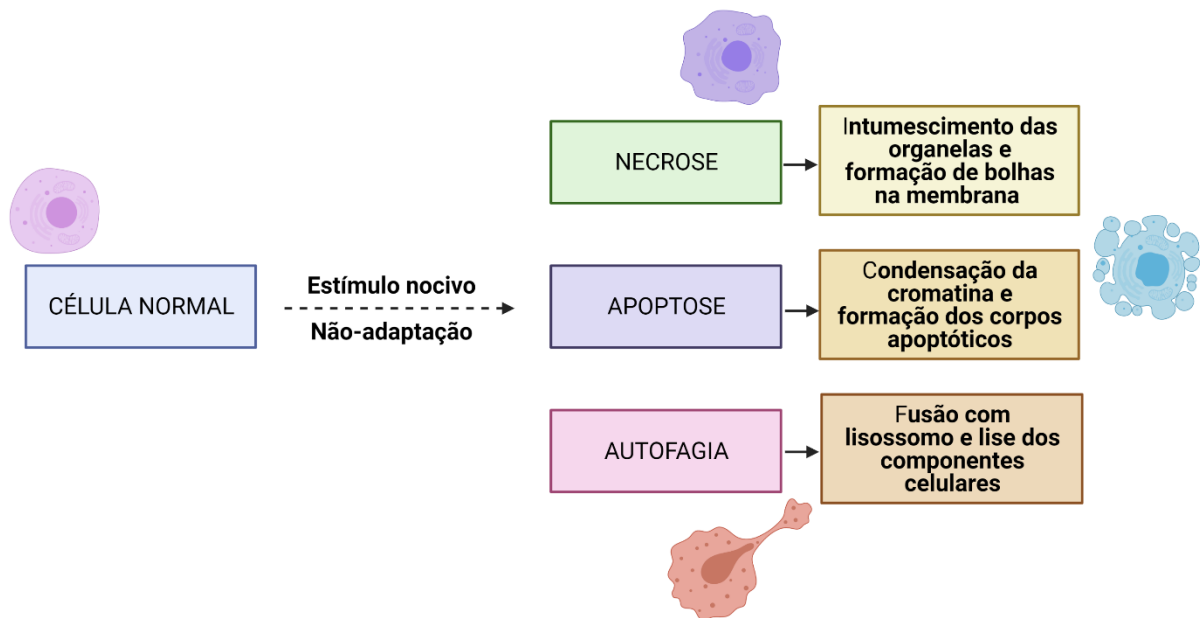
A proliferação celular é dependente do equilíbrio entre diferenciação e morte das células e, por isso, é uma das primeiras funções a ser afetada após exposição química (41, 42). Um agente químico tóxico pode também atuar diretamente na integridade das membranas, levando a degradação ou liberação de componentes celulares. Tais alterações da homeostasia podem desencadear diferentes tipos de morte celular (apoptose, necrose ou autofagia), o que dependerá do tipo de célula, da estrutura e função comprometidas e doses de exposição química (43).

Alterações morfológicas e bioquímicas permitem caracterizar o tipo de morte celular (Figura 2) (44). A apoptose inicia-se com indução de processos ativos, i.e, com consumo energético, dentro da própria célula, que podem envolver ativação de receptores de morte localizados na membrana celular, danos ao DNA ou eventos que levem a perda de permeabilidade da membrana mitocondrial (45, 46). Caracteristicamente, há condensação excêntrica da cromatina. Logo após, as células mortas constituem os corpos apoptóticos que são rapidamente reconhecidos e captados por células vizinhas ou macrófagos. A resposta inflamatória praticamente inexistente. A perda de assimetria de fosfolípidos de membrana e a externalização e permanência da fosfatidil serina (PS) na porção externa da membrana celular facilita o reconhecimento das células apoptóticas por macrófagos (43, 47).

Ao contrário da apoptose, a morte celular por necrose é um processo independente de energia caracterizado por alterações metabólicas que causam imediata depleção do ATP, desequilíbrio iônico e alterações morfológicas devido ao intumescimento mitocondrial e celular. O núcleo torna-se picnótico e há formação de pequenas bolhas na membrana citoplasmática. A ativação de enzimas de degradação resulta em rompimento da membrana, rápido vazamento do conteúdo celular e ativação da resposta inflamatória na região da célula morta (48, 49).

A autofagia (ou mitofagia quando relacionada com as mitocôndrias) é um processo auto-degradativo altamente dinâmico e importante para reciclagem de componentes celulares, bem como para eliminação de patógenos intracelulares. Assim como outras vias celulares, o processo autofágico pode ser modulado em várias etapas, tanto positiva quanto negativamente. De modo geral, a autofagia é considerada um mecanismo de sobrevivência, embora sua desregulação tenha sido associada à morte celular não-apoptótica (50). É caracterizada morfológicamente

por intensa vacuolização do citoplasma sem, entretanto, condensação da cromatina (43, 50, 51). Após a ativação de autofagia, a síntese de algumas proteínas como a LC3B aumenta e, por esse motivo, é utilizada como marcador desse mecanismo. Esta se associa à membrana dos autofagossomos e auxilia na sua maturação (52, 53). Os autofagossomos fagocitam os constituintes e organelas danificados, que são degradados por lisossomos (54, 55).



**Figura 2.** Caracterização morfológica dos 3 tipos mais comuns de morte celular: apoptose, necrose e autofagia. Ao entrar em apoptose a célula passa por condensação da cromatina, degradação celular e posterior fagocitose dos corpos apoptóticos. Na necrose há o inchaço das organelas, formação de bolhas na membrana com posterior ruptura celular. Já na autofagia, os componentes celulares passam por processo de autodegradação seguido da formação do autolisossomo para degradação dos resíduos celulares. *Figura criada com BioRender.com.* Fonte do próprio autor.

As vias de sinalização de morte celular podem ser ativadas em resposta a um dano no DNA. No entanto, é importante salientar que, não necessariamente ou exclusivamente, a morte das células está associada ao dano genético. Ainda, essas

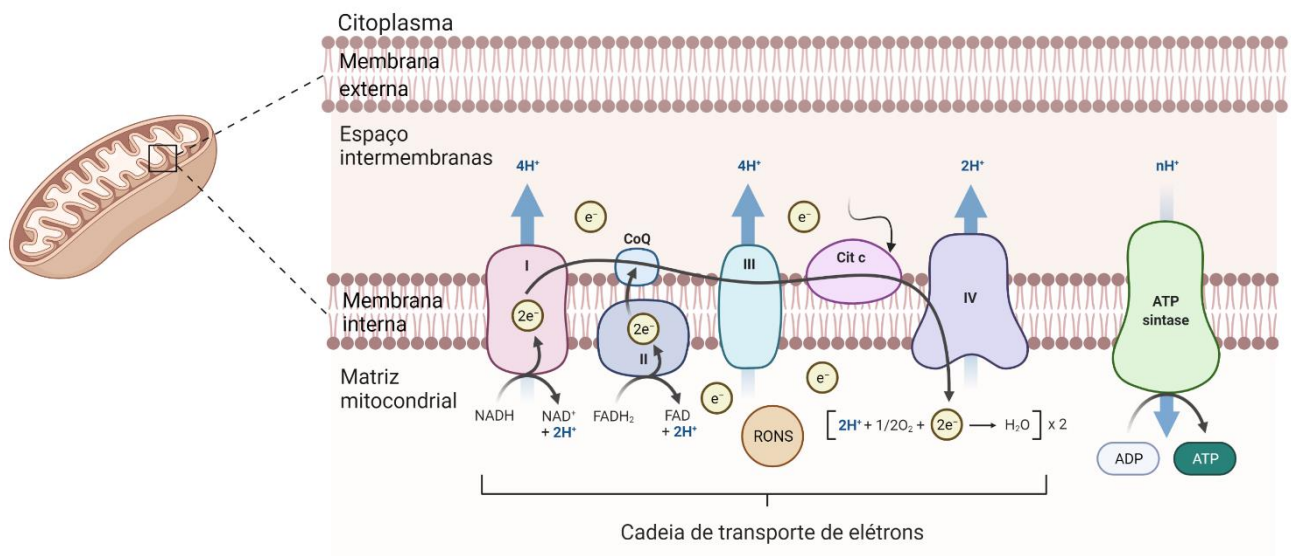
sinalizações podem ser desencadeadas de forma independente ou dependente de mitocôndrias (56).

### **1.4 Importância da mitocôndria na toxicidade de xenobióticos**

As mitocôndrias são organelas intracelulares presentes em organismos eucariontes aeróbicos e, experimentalmente, têm sido utilizadas como ferramenta para esclarecer o mecanismo de toxicidade de diferentes xenobióticos (57, 58). Sua estrutura básica é formada por uma membrana externa que é separada da membrana interna por um espaço intermembranas, e uma matriz onde estão localizados os componentes necessários à função da mitocôndria, como o DNA mitocondrial (mtDNA), proteínas e lipídios, ribossomos, RNAs, além de outras enzimas (59).

A mitocôndria é considerada a “casa de força” das células, sendo a energia produzida pela organela, a partir do ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, que ocorrem na matriz mitocondrial e na membrana mitocondrial interna, respectivamente, armazenada na forma de adenosina-trifosfato (ATP) (60-62). A fosforilação oxidativa compreende a última etapa do processo de respiração celular e desempenha papel crucial no metabolismo energético. Essa etapa é caracterizada pelo transporte de elétrons através de quatro grandes complexos proteicos (NADH desidrogenase; I, Succinato desidrogenase; II, Ubiquinol-citocromo c redutase; III, e Citocromo c oxidase; IV) por reações de oxido-redução, até um acceptor final, o oxigênio molecular ( $O_2$ ) (Figura 3). Agentes capazes de interferir em qualquer dessas vias metabólicas, podem induzir a produção de ERONs, principalmente os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), que se acumulam e podem levar ao estresse oxidativo intracelular sistêmico. O estresse

oxidativo é uma condição decorrente do desequilíbrio entre a produção de ERONs e defesas antioxidantes, a favor dos oxidantes, o que pode resultar no comprometimento de componentes celulares como lipídeos, proteínas, carboidratos e DNA. Alterações na produção de ERONs podem ser causa ou consequência da disfunção mitocondrial (1, 63).



**Figura 3.** Etapas da fosforilação oxidativa. O transporte de elétrons através dos quatro (I, II, III, IV) complexos mitocondriais leva ao bombeamento de prótons ( $H^+$ ) para o espaço intermembranar. A energia gerada pelo fluxo inverso de prótons através da ATP-sintase é utilizada para síntese de ATP. *Figura criada com BioRender.com. Fonte do próprio autor.*

Algumas características da membrana interna são de importância toxicológica como, por exemplo, o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) (1). O PTPM é fechado e composto por uma série de complexos proteicos que tornam a membrana impermeável à maioria dos íons e moléculas polares; entretanto, certos xenobióticos apresentam capacidade de induzir sua abertura e aumentar a permeabilidade (1, 64). Como consequência, o potencial eletroquímico da membrana entra em colapso e a fosforilação oxidativa é afetada. Ainda, a

diferença de osmolaridade entre a matriz mitocondrial e o citosol possibilita o influxo de água e causa o inchamento da organela. Vários eventos subcelulares e possivelmente reversíveis, como o edema celular, estão associados diretamente com a injúria no sistema de fosforilação oxidativa e, desta forma, caso a exposição seja de duração e intensidade (dose) suficientes para levar a célula ao ponto de não retorno, haverá a lesão irreversível e morte celular (1).

De acordo com o exposto, a função da mitocôndria é complexa, altamente regulada e essencial para a manutenção de diversos processos biológicos como sobrevivência e homeostase metabólica das células. Portanto, a interação de agentes exógenos de natureza diversa em diversos pontos deste sistema pode resultar em danos irreversíveis na estrutura e função mitocondrial (47, 65).

### **1.5 Metabolômica na avaliação de disfunção mitocondrial**

Diferentes métodos têm sido aplicados para avaliar a ação de xenobióticos sobre a mitocôndria, que incluem técnicas citoquímicas, moleculares e bioquímicas (66). A metabolômica é uma das adições mais recentes à família "-omics", caracterizada como um método analítico de alto rendimento para medir e comparar um grande número de metabólitos (metaboloma) de baixa massa molecular (até 1.500 Daltons) presentes em amostras biológicas (67, 68).

A análise metabolômica pode ser direcionada a um grupo de pequenos metabólitos que serão quantificados e identificados, ou ser semi-direcionada à uma classe específica de metabólito (aminoácidos, ácidos orgânicos ou acirionitinas), ou ainda basear-se em uma abordagem não-alvo, na qual todos os metabólitos presentes em uma amostra serão submetidos a detecção e quantificação. A escolha

da abordagem adequada dependerá do objetivo acerca do material biológico disponível (67, 68).

Uma vez que toda atividade celular dá origem a metabólitos, a implementação desse método em um estudo tem o potencial de auxiliar no esclarecimento das alterações envolvidas nos efeitos tóxicos causados por exposição a agentes exógenos, incluindo aqueles relacionados à mitocôndria (67). Há uma série de estudos que utilizaram a análise metabolômica para avaliar danos causados por resposta a estresses ambientais ou na identificação de potenciais biomarcadores para compreensão dos mecanismos associados ao desenvolvimento de doenças. Investigação metabolômica realizada em tecido cerebral de camundongo modelo para doença de Alzheimer Familiar mostrou alterações em biomarcadores associados ao metabolismo de nucleotídeos, carboidratos, aminoácidos e de neurotransmissores, além de metabólitos associados ao ciclo de Krebs e transferência de energia, confirmando o importante papel da disfunção mitocondrial na patofisiologia da doença (69). Considerando que os metabólitos celulares são conservados em várias espécies animais, os achados de pesquisa em animais de experimentação podem ser extrapolados para humanos (67).

Outro estudo que objetivou investigar potenciais vias metabólicas envolvidas na progressão do carcinoma urotelial também mostrou desregulação de marcadores relacionados ao metabolismo de glicose, ciclo de Krebs, lipídios de membrana, aminoácido e nucleotídeos em amostras biológicas de indivíduos e linhagens celulares neoplásicas (70).

Para determinar o potencial nocivo e mecanismos de substâncias, é crucial a realização de testes utilizando sistemas diferentes do ponto de vista de complexidade biológica e de desfechos. Deste modo, os dados obtidos neste estudo

irão contribuir com os achados de testes *in vivo* já aplicados por nosso grupo de pesquisa, além de trazer novos dados associados à citotoxicidade e dano mitocondrial induzido pelo herbicida diuron e seus metabólitos, permitindo a melhor compreensão dos processos bioquímicos e celulares chaves envolvidos no seu mecanismo de ação tóxica.

### REFERÊNCIAS

1. Boelsterli UA. Mechanistic toxicology: The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. London,2002. 312- p.
2. Lehman-McKeeman LD. Absorption, Distribution, and Excretion of Toxicants. In: Klaassen CD, III JBW, editors. Casarett and Doull's Essentials of toxicology. 2nd ed: McGraw-Hill Publishing Company; 2010.
3. Bolla SR, Odeluga N, Jetti R. Histology, Bladder. StatPearls [Internet] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
4. Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier; 2006.
5. Lei T, Sun H, Kang Y, Zhu F, Liu H, Zhou W, et al. ADMET Evaluation in drug discovery. 18. Reliable prediction of chemical-induced urinary tract toxicity by boosting machine learning approaches. Mol Pharmaceutics. 2017;14:3935-53.
6. Hueper WC, Wiley FH, Wolfe HD. Experimental production of bladder tumors in dogs by administration of beta-naphthylamine. J Ind Hyg Toxicol. 1938;20:46-84.
7. Cohen SM. Screening for human urinary bladder carcinogens: two-year bioassay is unnecessary. Toxicology Research. 2018;7(4):565-75.
8. Kim JY, Fluri DA, Marchan R, Boonen K, Mohanty S, Singh P. 3D spherical microtissues and microfluidic technology for multi-tissue experiments and analysis. Journal of Biotechnology. 2015;205:24-35.
9. Anadón A, Martínez MA, Castellano V, Martínez-Larrañaga MR. The role of in vitro methods as alternatives to animals in toxicity testing. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2014;10(1):67-79.
10. Fenwick N, Griffin G, Gauthier C. The welfare of animals used in science: how the "Three Rs" ethic guides improvements. Canadian Veterinary Journal. 2009;50:523-30.

11. Lilienblum W, Dekan W, Foth H, Gebel T, Hengstler JG, Kahl R. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). *Archives of Toxicology*. 2008;82:211-36.
12. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews in Molecular Cell Biology*. 2007;8:839-45.
13. Pampaloni F, Stelzer EHK. Three-dimensional cell cultures in toxicology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2009;26:129-50.
14. Tamatani T, Hattori K, Nakashiro K, Hayashi Y, Wu S, Klumpp D, et al. Neoplastic conversion of human urothelial cells in vitro by overexpression of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating peroxisomal fatty acyl CoA oxidase. *International Journal of Oncology*. 1999;15(4):743-52.
15. DeGraff DJ, Robinson VL, Shah JB, Brandt WD, Sonpavde G, Kang Y. Current preclinical models for the advancement of translational bladder cancer research. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(2):121-30.
16. Dodmane PR, Arnold LL, Kakiuchi-Kiyota S, Qiu F, Liu X, Rennard SI. Cytotoxicity and gene expression changes induced by inorganic and organic trivalent arsenicals in human cells. *Toxicology*. 2013;312(1):18-29.
17. Yokohira M, Arnold LL, Lautraite S, Sheets L, Wason S, Stahl B. The effects of oral treatment with transfluthrin on the urothelium of rats and its metabolite, tetrafluorobenzoic acid on urothelial cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49(6):1215-23.
18. Sarwar M. Indoor risks of pesticide uses are significantly linked to hazards of the family members. *Cogent Medicine*. 2016;3(1):1155373.
19. MMA. Perfil nacional da gestão de substâncias químicas. Ministério do Meio Ambiente; 2003.
20. IBGE. Produção Agrícola Municipal - Tabela 1612 - Área plantada, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras temporárias 2020 [Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612>].
21. IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos 2020 [Disponível em: <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>].
22. USEPA. Registration eligibility decision for diuron. List A. Case 0046. Office of prevention, pesticides and toxic substances. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency; 2003.
23. APVMA. Review of the mammalian toxicology and metabolism/toxicokinetics of diuron. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority; 2011.

24. Geoffroy L, et al. Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmusobliquus*. *Pestic Biochem Physiol*. 2002;72(3):178-85.
25. Iyer P. Evidence on the development and reproductive toxicity of diuron: draft reproductive and cancer hazard assessment. 2002.
26. Fontes JRA, Shiratsuchi LS, Neves JL, Júlio Ld, Filho JS. Manejo integrado de plantas daninhas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados; 2003.
27. Field JA, et al. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. *J Environ Qual*. 2003;32(1):171-9.
28. Giacomazzi S, Cochet N. Environmental impact of diuron transformation : a review. 2004;56:1021-32.
29. Gatidou G, Thomaidis NS. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides , their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. 2007;85:184-91.
30. Boven MV, Laruelle L, Daenens P. HPLC analysis of diuron and metabolites in blood and urine. *J Anal Toxicol*. 1990;14(4):231-4.
31. da Rocha MS, Arnold LL, Luiza M, Sartor C, Catalano SMI, Paula A, et al. Diuron-induced rat urinary bladder carcinogenesis: Mode of action and human relevance evaluations using the International Programme on Chemical Safety framework. *Critical Reviews in Toxicology*. 2014:1-14.
32. USEPA. Carcinogenicity peer review of diuron. Office of prevention, pesticides and toxic substances. Cincinnati: United States Environmental Protection Agency; 1997.
33. da Rocha MS, Nascimento MG, Cardoso APF, Lima LAD, Zelandi EA. Cytotoxicity and regenerative proliferation as the mode of action for Diuron-induced urothelial carcinogenesis in the rat. *Toxicological sciences*. 2010;113(1):37-44.
34. Fava RM, Ferragut APF, Sanches M, de Oliveira MLSC. Evaluation of early changes induced by diuron in the rat urinary bladder using different processing methods for scanning electron microscopy. *Toxicology*. 2015;333:100-6.
35. Nascimento MG, Luiza M, Sartor C, Lima AS, Camargo VD. Effects of Diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the urinary bladder of male Wistar rats. *Toxicology*. 2006;224:66-73.
36. Rocha MSD, Arnold LL, Pennington KL, Muirhead D, Dodmane PR, Anwar M, et al. Diuron-induced rat bladder epithelial cytotoxicity. *Toxicological sciences*. 2012;130(2):281-8.

37. Rocha MSD, Arnold LL, Dodmane PR, Pennington KL, Qiu F, Lauro J, et al. Diuron metabolites and urothelial cytotoxicity: In vivo, in vitro and molecular approaches. *Toxicology*. 2013;314:238-46.
38. Cardoso APF, Catalano SMI, Sanches M, Garcia M, Camargo JLVD, de Oliveira MLSC. Dose–response of diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] in the urothelial mucosa of Wistar rats. *Toxicology*. 2013;312:1-5.
39. Ihlaseh SM, Bailey KA, Hester SD, Jones C, Ren H, Cardoso APF, et al. Transcriptional profile of Diuron-induced toxicity on the urinary bladder of male Wistar rats to inform mode of action. *Toxicological sciences*. 2011;122(2):330-8.
40. Ihlaseh-catalano SM, Bailey KA, Paula A, Cardoso F, Ren H, Fry RC, et al. Dose and temporal effects on gene expression profiles of urothelial cells from rats exposed to diuron. *Toxicology*. 2014;325:21-30.
41. Oliveira GAR, Lapuente J, Leme DM, Ferraz ERA, Meireles G, Oliveira DP. New Paradigms for the environmental assessment: an ecotoxicological and genetic approach. New York: Nova Science Publishers; 2013.
42. Seibert H, Balls M, Fentem JH, Bianchi V, Clothier H, Dierickx PJ. Acute toxicity testing in vitro and the classification and labelling of chemicals. *ATLA*. 1996;24:499-510.
43. Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. 2011;119(1):3-19.
44. Grivicich I, Regner A, da Rocha AB. Morte celular por apoptose. *53(3):335-43*.
45. Afford S, Randhawa S. Demystified...Apoptosis. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 2000;53:55-63.
46. Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis – the p53 network. *Journal of Cell Science*. 2003;116:4077-85.
47. Pereira LC, Souza AO, de Pazin M, Dorta DJ. Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. *Revista Brasileira de Toxicologia*. 2012;25(1-2):1-14.
48. Boujrad H, Gubkina O, Robert N, Krantic S, Santos A. AIF-mediated programmed necrosis: a highly orchestrated way to die. 2007;6(21):2612-9.
49. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35:425-516.
50. Orrenius S, Kaminsky VO, Zhivotovsky B. Autophagy in toxicology: cause or consequence ? 2013(October 2012):1-23.

51. Shen S, Kepp O, Michaud M, Martins I, Minoux H, Metivier D. Association and dissociation of autophagy, apoptosis and necrosis by systematic chemical study. *Oncogene*. 2011;30(45):4544-56.
52. Lee Y-k, Lee J-a. Role of the mammalian ATG8 / LC3 family in autophagy : differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy. 2016;49(8):424-30.
53. Wu J, Dang Y, Su W, Liu C, Shan Y, Pei Y, et al. Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B —Two novel markers of autophagosome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006;339:437-42.
54. Amaya C, Fader CM, Colombo MI. Autophagy and proteins involved in vesicular trafficking. 2015;589:3343-53.
55. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*. 2008;445:77-88.
56. Surova O, Zhivotovsky B. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*. 2013;32:3789-97.
57. Li Y, Couch L, Higuchi M, Fang JL, L G. Mitochondrial dysfunction induced by Sertraline, an antidepressant agent. *Toxicological sciences*. 2012;127:589-91.
58. Stachowicz A, Suski M, Olszanecki R, Madej J, Okon K, Korbut R. Proteomic analysis of liver mitochondria of apolipoprotein E in knockout mice treated with metformin. *J Proteomic*. 2012;IN PRESS.
59. Fawcett DW. *Mitochondria*. 1981. p. 410-86.
60. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature*. 2014;505(7483):335-43.
61. Ni H-m, Williams JA, Ding W-x. Redox biology mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biology*. 2015;4:6-13.
62. Roubicek DA, Souza-pinto NCD. Mitochondria and mitochondrial DNA as relevant targets for environmental contaminants. *Toxicology*. 2017;391:100-8.
63. Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.
64. Nicholls DG, Ferguson SJ. *Bioenergetics 2*. London: Academic Press Inc; 1982.
65. Pereira LC, de Souza AO, Dorta DJ. Polybrominated Diphenyl Ether Congener (BDE-100) induces mitochondrial impairment. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2013;112:18-424.

66. Connolly NMC, Theurey P, Adam-Vizi V, Bazan NG, Bernardi P, Bolaños JP, et al. Guidelines on experimental methods to assess mitochondrial dysfunction in cellular models of neurodegenerative diseases. *Cell Death & Differentiation*. 2017;25:542–72.
67. Esterhuizen K, Van der Westhuizen FH, Louw R. Metabolomics of mitochondrial disease. *Mitochondrion*. 2017;16:30145-3.
68. Braga CP, Adamec J. Metabolome Analysis. In: Shoba Ranganathan MG, Kenta Nakai, Christian Schönbach, editor. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*: Academic Press; 2019. p. 463-75.
69. Trushina E, Nemetlu E, Zhang S, Christensen T, Camp J, Mesa J, et al. Defects in mitochondrial dynamics and metabolomic signatures of evolving energetic stress in mouse models of familial Alzheimer’s Disease. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e32737.
70. Sahu D, Lotan Y, Wittmann B, Neri B, Hansel DE. Metabolomics analysis reveals distinct profiles of nonmuscle-invasive and muscle-invasive bladder cancer. *Cancer medicine*. 2017;6(9):2106–20.