

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/08/2024.



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

JOYCE SANTANA RIZZI

**Mecanismos de danos induzidos pelo Triclopir em
mitocôndrias hepáticas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lílian Cristina Pereira

**Botucatu
2022**

Joyce Santana Rizzi

Mecanismos de danos induzidos pelo Triclopir
em mitocôndrias hepáticas

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lílian Cristina Pereira

Botucatu
2022

R627m	Rizzi, Joyce Santana Mecanismos de danos induzidos pelo Triclopir em mitocôndrias hepáticas / Joyce Santana Rizzi. -- Botucatu, 2022 43 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina, Botucatu Orientadora: Lillian Cristina Pereira 1. Patologia. 2. Toxicologia. 3. Mitocôndria. 4. Triclopir. 5. Herbicida. 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.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas”.

Carl Sagan
Cientista

★ 1934 † 1996

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, à minha família, aos trabalhadores rurais que se expõem diariamente a químicos para que tenhamos comida à mesa e a população em geral que é exposta de alguma maneira aos contaminantes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido tantas oportunidades e por ter me sustentado em todos os momentos, viver o processo do Seu propósito dá sentido à minha vida.

Aos meus pais, Rinaldo Antonio Rizzi e Cátia Aparecida Santana Rizzi, que sempre acreditaram em mim e estiveram presentes em todos os momentos que passei, dando muito além do que poderiam para que eu tivesse suporte suficiente para alcançar meus objetivos e viver meus sonhos.

Mamãe, obrigada por ser meu tudo. Além de mãe, minha melhor amiga e apoiadora. À senhora que já estudou tanto e plantou em nós essa sementinha. Obrigada por todas as vezes em que me acompanhou e cuidou de mim. Com a senhora sou minha melhor versão, eu te amo para sempre.

Meus irmãos, Rafael Santana Rizzi e Diego Santana Rizzi, por serem inspiração em muitos aspectos e assim como meus pais me apoiarem em tudo vibrando sempre boas energias.

Pela oportunidade que me foi concedida pelo TOXICAM e pela orientação da professora Lílian Cristina Pereira durante esse processo de aprendizagem.

Aos meus colegas de trabalho, pela parceria e amizade, especialmente à Danielle Seloto por ter me acompanhado dia a dia na bancada, por dividir seus conhecimentos sobre mitocôndrias e por todas as vezes que esteve disposta a discutir meus resultados.

Ao Tony Grassi e Elaine Camargo por serem sempre muito prestativos e humildes mesmo com tanta experiência.

À Natália Kohori por sempre estar disposta a ajudar e resolver problemas.

Ao Ítalo Bertoni, Paloma Peixoto e Cristina Viriato pelo acolhimento, por tornarem o biotério do zebrafish um local agradável e de compartilhamento de ideias.

E a todas as pessoas que no decorrer dessa trajetória contribuíram de alguma forma, meu muito obrigada.

Por fim, agradeço o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do

Estado de São Paulo (FAPESP: Processo nº 18/00229-1) pelos estudos relacionados ao Triclopir e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES: Processo nº 88887.481968/2020-00) que me forneceu a bolsa durante esse período.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi

Capítulo 1 - Revisão da Literatura

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Triclopir	2
1.2. Estudos experimentais	4
1.3. Importância da mitocôndria	6
2. JUSTIFICATIVA	8
3. OBJETIVOS	9
3.1. Geral	9
3.2. Específicos	9
4. REFERÊNCIAS	10

Capítulo 2 - Manuscrito

1. INTRODUCTION	14
2. MATERIAL AND METHODS	15
2.1. Experimental animals	15
2.2. Mitochondrial isolation	15
2.3. Mitochondrial respiration with glutamate and malate and with succinate	16
2.4. ATP production	16
2.5. Mitochondrial membrane potential	17
2.6. Effects on Ca^{2+} uptake and release	17
2.7. Mitochondrial swelling	18
2.8. Monitoring the formation of reactive oxygen and nitrogen species (RONS)	18

2.9. Evaluation of the redox state of pyridine nucleotides	18
2.10. Mitochondrial membrane lipoperoxidation	19
2.11 Mitochondrial levels of sulfhydryl groups of membrane proteins	19
2.12. Determination of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) levels	20
2.13. Statistical analysis	20
3. RESULTS AND DISCUSSION	21
4. CONCLUSION	25
5. REFERENCES	26
ANEXO 1	28

RESUMO

O herbicida triclopir (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético) é considerado um problema ambiental devido às concentrações encontradas no ambiente decorrentes do descarte incorreto, lixiviação e dispersão aérea, podendo representar risco para o ambiente e para a saúde humana. Estudos avaliaram o metabolismo, a absorção, a excreção e o transporte ativo do triclopir, mas não há informações claras sobre seu modo de ação (MoA) e sua potencial ação citotóxica permanece desconhecida. Nesse contexto, as mitocôndrias têm sido utilizadas para avaliar a toxicidade de xenobióticos por serem organelas complexas e altamente reguladas, essenciais para a manutenção de diversos processos biológicos como homeostase celular e metabólica. Interações de substâncias tóxicas podem resultar em disfunção mitocondrial e consequentemente citotoxicidade. Com o intuito de identificar o mecanismo tóxico do triclopir foram utilizadas mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar machos, jovens, expostas *in vitro* à concentrações entre 0,5 a 500 µmol/L. A formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), estado redox de nucleotídeos de piridina, dissipação de potencial de membrana, lipoperoxidação de membrana, níveis mitocondriais de grupos sulfidril de membrana, glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG), produção de ATP, movimentação de cálcio, inchamento e a respiração mitocondrial foram avaliadas e comparadas entre os grupos por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett, demonstrando que o triclopir altera a bioenergética mitocondrial sem afetar o estado redox e a estrutura mitocondrial. Os resultados sugerem que o triclopir atua como um desacoplador da fosforilação oxidativa, sendo classificado como mitotóxico induzindo disfunção mitocondrial.

ABSTRACT

The herbicide triclopyr (3,5,6-trichloro-2-pyridinyloxyacetic acid) is considered an environmental problem due to environmental damage caused by incorrect disposal, leaching and aerial dispersion, which may represent a risk to the environment and health human. Studies have assessed the metabolism, absorption, excretion and active transport of triclopyr, but there is no clear information about its mode of action (MoA) and its potential for cytotoxic action remains unknown. In this context, mitochondria have been used to assess the toxicity of xenobiotics because it is a complex and highly regulated organelle, essential for the maintenance of several biological processes such as cell and metabolic homeostasis. Interactions of potentially toxic substances can result in mitochondrial dysfunction and consequently cytotoxicity. In order to identify the toxic mechanism of triclopyr, liver mitochondria from young Wistar rats were exposed *in vitro* to different concentrations of triclopyr, between 0.5 to 500 μ M. The formation of reactive oxygen and nitrogen species (RONS), redox state of pyridine nucleotides, membrane potential dissipation, membrane lipid peroxidation, mitochondrial levels of membrane sulfhydryl groups, reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG), ATP production, calcium movement, swelling and mitochondrial respiration were evaluated and compared between groups by analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test, demonstrating that triclopyr alters mitochondrial bioenergetics without affecting redox state and mitochondrial structure. The results suggest that triclopyr acts as an uncoupler of oxidative phosphorylation, being classified as a mitotoxicant inducing mitochondrial dysfunction.

LISTA DE ABREVIATURAS

A.F.U: Arbitrary Fluorescence Unit

ADP/O: Razão de ADP por Oxigênio

ADP: Adenosine 5' Difosfato

ANOVA: Análise de Variância

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

BSA: Albumina Soro Bovino

Ca²⁺: Íon de cálcio

CaCl₂: Cloreto de cálcio

CCCP: Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona

CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CL₅₀: Concentração letal (mediana)

CYP: Citocromo

DL₅₀: Dose letal (mediana)

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DNA: Ácido Desoxiribonucleíco

EDTA: 2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diyl)dinitrilo)tetraacetic acid

EGTA: Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

ERONs: Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

GHS: Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulação de Produtos Químicos

GSH: Glutathione Reduzida

GSSG: Glutathione Oxidada

H₂DCFDA: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

HEPES: Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-piperazinil-(1)]-etanossulfônico

K⁺: Íon Potássio

KCl: Cloreto de Potássio

KH₂PO₄: Fosfato de Potássio Dibásico

Koc médio: Coeficiente de partição normalizado pelo carbono orgânico

KOH: Hidróxido de Potássio

Kow: Coeficiente de partição n-octanol-água

MDA: Malondealdeído

MoA: Modo de ação

mtDNA: Ácido Desoxiribonucleíco Mitocondrial

NAD(P)⁺: Nucleotídeos de piridina oxidados

NAD(P)H: Nucleotídeos de piridina reduzidos

NaOH: Hidróxido de Sódio

NC: Negative control

NEM: N-etilmaleimida

nm: Nanômetros

OPT: O-ftalaldeído

pH: Potencial Hidrogeniônico (escala logarítma)

Pi: Fosfato inorgânico

pKa: Operação matemática que permite calcular a acidez de uma solução

PM: Peso Molecular

PTPM: Poro de Transição de Permeabilidade Mitocondrial

RCR: Razão de Controle Respiratório

RNA: Ácido ribonucleico

T4: Tiroxina

TBA: Ácido Tiobarbitúrico

TBARs: Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TBOOH: tert-butyl hidroperóxido

TCA: Ácido Tricloroacético

TCP: 3,5,6-tricloro-2-piridinol / Tricloropiridinol

TMP: 3,5,6-tricloro-2-metoxi-piridina

TOXICAM: Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana

Triclopir BEE: Éster 2-butoxietílico solúvel em óleo

Triclopir IPA: Isopropilamina

Triclopir TEA: Sal trietilamina

Triclopir: Ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético ($C_7H_4Cl_3NO_3$)

TSH: Hormônio tireoestimulante

USEPA: Agência de Proteção Ambiental Norte Americana

Capítulo 1

Revisão da
Literatura

Capítulo 1 - REVISÃO DA LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

Os praguicidas representam um grupo de substâncias químicas, incluindo algumas de origem biológica, heterogêneas, que visam aumentar a produtividade e qualidade dos alimentos (WEISS *et al.*, 2004).

São classificados a partir da praga que irão combater (fungicidas, herbicidas, entre outros) ou também, de acordo com a estrutura química das substâncias ativas (organoclorados, organofosforados, piretróides, etc.), e a partir dos efeitos à saúde humana e ao ambiente (poluentes orgânicos persistentes ou contaminantes ambientais emergentes) (KINOSHITA *et al.*, 2007; SANCHES *et al.*, 2003; ZACHARIA, 2011).

A utilização de praguicidas no Brasil cresceu a partir dos anos 1990, juntamente aos demais países do Mercado Comum do Sul (Mercosul) contribuindo para o processo de modernização agrícola, inserindo o país no que se convencionou chamar de Revolução Verde. A utilização de praguicidas em maior escala proporcionou ganhos relacionados à produtividade, juntamente com o uso de fertilizantes, maquinários e práticas modernas de gestão agrícola (DELGADO, 2005; SILVA e COSTA, 2012; VIEIRA e GAQUES, 2016).

Os praguicidas podem causar efeitos adversos em humanos ou em outras espécies não-alvo. Por este motivo, o risco decorrente à exposição precisa ser devidamente caracterizado. Vale lembrar que não são apenas os trabalhadores rurais que estão expostos aos praguicidas, mas sim a população em geral através de resíduos, ingestão de água e/ou alimentos contaminados, descarte incorreto ou até mesmo durante a manufatura dos produtos (WEISS *et al.*, 2004; FERRER e CABRAL, 1991; IARC, 1991).

Muitos praguicidas, podem ser classificados como contaminantes de preocupação emergentes, estando relacionados a contaminantes não legislados, não havendo monitoramento de rotina sobre as reais concentrações ambientais e que podem causar efeitos para o ambiente e saúde humana (DEBLONDE *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2015). São encontrados em solo, fontes de abastecimento de

água, águas subterrâneas, água potável, entre outros (GIL *et al.*, 2012; KOERICH *et al.*, 2021). Esses aspectos devem ser melhor caracterizados e estudados para maior segurança no consumo dessas substâncias (SILVA e ALVES, 2007).

1.1. Triclopir

O herbicida triclopir (ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético, $C_7H_4Cl_3NO_3$) é um ácido monocarboxílico substituído por grupos de cloro nas posições 3, 5 e 6 da molécula, é um éter aromático, uma cloropiridina e um ácido monocarboxílico (PUBCHEM, 2022). É um ácido acético substituído com peso molecular (PM) de 256,5 g/mol com faixa de ponto de fusão de 148 °C a 150 °C, estável em condições normais de armazenamento (AHRENS, 1994). Possui um valor pKa de 2,98, sendo considerado um ácido forte (WOLT, 1998), Kow de 2,64 em pH 5 e 0,36 em pH 7, sendo facilmente diluído em água e Koc médio (RODRIGUES e ALMEIDA, 2005), semelhante aos de outros ácidos ariloxiacéticos (CESSNA e GROVER, 1978). É geralmente formulado como solução aquosa de sal trietilamina (triclopir TEA) ou isopropilamina (triclopir IPA), ou éster 2-butoxietílico solúvel em óleo (triclopir BEE) (CESSNA *et al.*, 2002).

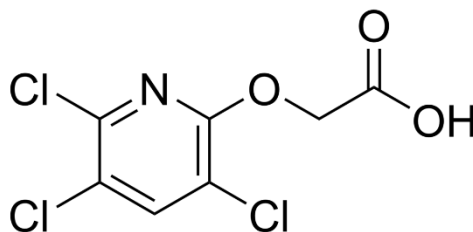


Figura 1: Estrutura química do ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético (Triclopir).

Sua função como herbicida sistêmico do grupo de piridinas é controlar plantas daninhas em pastagens e culturas com absorção foliar e radicular. O triclopir é classificado dentro do grupo de mimetizadores do hormônio auxina (HOLMES *et al.*, 1994) e seu mecanismo de ação no combate às erva-daninhas envolve o metabolismo de ácidos nucleicos e a plasticidade da parede celular. Há relatos que o composto também possa causar acidificação da parede celular por meio do

estímulo da atividade da bomba de prótons ATPase, ligada à membrana celular. Por outro lado, em concentrações altas, este herbicida inibe a divisão e o crescimento celular (AHRENS, 1994). Em adição, por ser um herbicida ácido, dependendo das características do solo, apresenta grande índice de lixiviação após a precipitação da aplicação (D'ANTONINO *et al.*, 2009).

A degradação do triclopir no solo é considerada de rápida a moderada, com meia vida em torno de 20 a 45 dias, porém, pode demorar até 300 dias para degradar, dependendo do tipo de solo e das condições climáticas. Em solos com pH mais baixo o seu grau de adsorção é mais elevado e a mobilidade é menor. Sua degradação ocorre mais rapidamente em condições de umidade e temperatura elevadas, neste caso, o metabolismo microbiano pode ser o principal meio de degradação (NEWTON *et al.*, 1990; RODRIGUES e ALMEIDA, 1998).

A partir da degradação do triclopir pode haver a formação de dois metabólitos, o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), que é seu principal produto de degradação no solo sob condições aeróbicas e, presente em pequenas quantidades, o 3,5,6-tricloro-2-metoxi-piridina (TMP) (CESSNA *et al.*, 2002), que pode provavelmente ser formado a partir da metilação de TCP por fungos, ou degradação por descarboxilação da porção acetato (BIDLACK *et al.*, 1977). Nos seres humanos a formação hepática dos metabólitos TCP e TMP é mínima, e a excreção ocorre mais de 90% na forma de molécula parental (TIMCHALK *et al.*, 1988).

A classificação do triclopir (Tabela 1), segundo o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS), demonstra que este causa toxicidade variada a partir do tipo de exposição (ECHA, 2021).

Tabela 1: Classificação do triclopir no Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS) (ECHA, 2021).

Tipo de exposição	Categoria GHS	Classificação
Oral	categoria 4	Toxicidade aguda.
Dérmica	categoria 1, 1A e 1B	Sensibilização da pele, alergia.
Ocular	categoria 2A	Lesões oculares graves.

Repetida/prolongada	categoria 2	Toxicidade crônica.
Seres Aquáticos	categoria 1	Muito tóxico, perigo agudo.

Com o uso rotineiro e crescente, o triclopir é considerado um problema ambiental devido as concentrações encontradas em águas superficiais (0,0004 pmol/L – 20 μ mol/L), estuários (8 μ mol/L), lençóis freáticos (0,023 – 2,3 nmol/L) e sedimentos (0,015 – 540 nmol/L) decorrente do seu descarte incorreto, lixiviação e dispersão aérea (CESSNA *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2019).

No Brasil, o uso do triclopir é regulado pela ANVISA e é restrito às culturas de arroz, milho, soja, trigo e eucalipto. No entanto, sua utilização ganha destaque pela ampla utilização em pastagens, cuja aplicação também é permitida (ANVISA, 2020), sendo uns dos mais utilizados no país juntamente com os herbicidas 2,4-D, Glifosato, entre outros (EMBRAPA, 2020). Este tipo de contaminação pode representar grave risco à saúde humana e para o ambiente, principalmente na Europa e América do Sul, assim como no Brasil, onde o triclopir é muito utilizado (GUILHERME *et al.*, 2015; RICHARDSON *et al.*, 2016).

1.2. Estudos experimentais com triclopir

Após o contato com o triclopir a substância é distribuída no organismo em maior quantidade nos rins, seguida pelo fígado e tecido adiposo, evidenciado em estudos com ratos, cães e macacos (NORTOX, 2020).

Embora o rim seja o principal órgão-alvo de toxicidade para o triclopir em todas as espécies de mamíferos (EFSA, 2005; USEPA, 2019), o ácido triclopir e suas outras formulações comerciais como Togar, Arremate, Triclon, Picloram e Triclopir Butílico possuem capacidade de alterar o funcionamento hepático. Para o ácido, degeneração de hepatócitos e inchaço centrolobular são evidenciados em ratos machos e fêmeas a partir de 120 mg/kg/dia e degeneração dos túbulos proximais dos rins a partir de 20 mg/kg/dia para ambos os sexos (UPL, 2015; ADAMA, 2021).

A absorção do triclopir e seus metabólitos foi determinada *in vivo* em ratos, cachorros e humanos voluntários por meio da análise na urina e, em alguns estudos

em amostras fecais e de tecido, após administrações orais, intravenosas ou dérmicas (FINCO e COOPER, 1995; GRIFFIN, 1979). Outro estudo também avaliou a absorção oral do triclopir em voluntários humanos e uma média de 83% a 84% de uma dose administrada de 0,1 ou 0,5 mg/kg/p.c foi recuperada como triclopir parental em até 96 horas após a dosagem, sem dependência da dose nas taxas de eliminação (CARMICHAEL *et al.*, 1988a, 1988b).

Também foi estudado em ensaios *in vitro* utilizando células do túbulo proximal renal para avaliar o transporte ativo do triclopir confirmando que o triclopir é bem absorvido em todas as espécies de mamíferos, havendo reabsorção mais evidente nos cães, possivelmente causada através de transportadores de ânions orgânicos (BARTELS *et al.*, 2020).

A formação hepática de metabólitos de triclopir foi avaliada em microsomas de fígado de ratos Fischer (vesículas do retículo endoplasmático liso) e de doadores humanos. Os resultados demonstraram viabilidade da atividade microssomal baseada em enzimas do citocromo (CYP) e nenhum metabólito mensurável do triclopir foi encontrado nas incubações com microsomas de ratos e de doadores humanos, coincidente com estudos prévios realizados *in vivo* que resultaram em pouco ou nenhum metabolismo do triclopir em mamíferos (BARTELS *et al.*, 2020).

Estudos sobre o metabolismo e excreção do triclopir também foram realizados em humanos e animais demonstrando baixa taxa de absorção e rápida eliminação em mamíferos (TIMCHALK *et al.*, 1997; CARMICHAEL *et al.*, 1989). A via urinária é a principal responsável pela eliminação do produto em até 95,7% e a maior parte do triclopir foi eliminada de forma rápida do plasma, com meia vida de 3 horas. A menor parte avaliada, excretou em velocidade menor, demorando até 151 horas devido a reabsorção. Além disso, mais de 90% foi excretado como ácido triclopir original e pouco como seu metabólito tricloropiridinol (TCP) (TIMCHALK *et al.*, 1988).

Pouco se sabe sobre o mecanismo de toxicidade do triclopir em humanos (GUILHERME *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016), porém, este herbicida apresenta toxicidade em organismos aquáticos com CL50 de 117 mg/kg e 148 mg/kg em truta

arco-íris e peixe-lua, respectivamente (WSSA, 1983), desencadeando desregulação hormonal perturbando os níveis de hormônios tiroxina (T4) e hormônio estimulante da tireoide (TSH). Em ratos a toxicidade é considerada moderada (HOTCHKISS *et al.*, 1992; ZHANG *et al.*, 2016) com DL50 oral de 630 – 729 mg/kg (GUILHERME *et al.*, 2015).

Entre os danos induzidos pela sua exposição podemos citar neurotoxicidade pela diminuição significativa do conteúdo de RNA total e diminuição de viabilidade celular em células primárias neuronais C57BL/6 (neuroblastoma) de camundongos em concentração de 3 mMol/L de triclopir (REDDY *et al.*, 2011). Além disso, foi evidenciada genotoxicidade em peixes *Anguilla anguilla*, provocada por dano oxidativo no DNA, tanto pela formulação comercial Garlon® quanto pelo princípio ativo triclopir (67,6 – 270,5 µg/L e 30 - 120 µg/L, respectivamente) (GUILHERME *et al.*, 2015).

Foi notado também provável enfraquecimento muscular de embriões de zebrafish após exposição ao herbicida triclopir (39-50 µmol/L), implicando no retardo da eclosão dos ovos (WARKENTIN, 2007; SAMAE *et al.*, 2015; ANDRADE, 2021).

1.3. Importância da mitocôndria

As mitocôndrias são organelas presentes em quase todas células eucarióticas, sendo formadas por estruturas complexas, com duas membranas altamente especializadas, uma externa e outra interna, além do espaço intermembranas, que reveste o espaço interno denominado matriz mitocondrial onde estão presentes o DNA mitocondrial (mtDNA), os ribossomos mitocondriais, os RNAs, várias enzimas como piruvato desidrogenase, enzimas constituintes do ciclo do ácido cítrico, carbamioil-fosfato-sintetase, ornitinatranscarbamioilase, catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase, glutatona redutase, entre outras, além de proteínas e lipídios (ALBERTS *et al.*, 2004).

Essa organela têm funções essenciais nas células, produzindo energia através da formação da adenosina trifosfato (ATP), obtida pelo ciclo do ácido cítrico e

fosforilação oxidativa que ocorrem na matriz mitocondrial e na membrana mitocondrial interna, respectivamente (FRIEDMAN e NUNNARI, 2014; NI *et al.*, 2015; ROUBICEK e SOUZA-PINTO, 2017), desempenhando importantes atividades no organismo, contribuindo com a genética a partir do mtDNA, atuando na homeostase celular e regulando processos de morte. A atividade das mitocôndrias é fundamental para manter as funções celulares normais (ZHU, WANG e CHU, 2013).

A integridade mitocondrial é essencial para o perfeito funcionamento na bioenergética celular. O transporte de íons e moléculas nas membranas é seletivo, os poros naturalmente fechados por complexos proteicos regulam a permeabilidade e a interrupção da integridade da membrana é, como consequência, um ponto sem retorno na morte celular (BOELSTERLI, 2002; YOULE e STRASSER, 2008; KUNZELMANN, 2016; BROZ *et al.*, 2020).

Alguns xenobióticos apresentam capacidade de induzir sua abertura e aumentar a permeabilidade (NICHOLLS e FERGUSON, 1982; BOELSTERLI, 2002) colapsando o potencial eletroquímico da membrana, afetando a fosforilação oxidativa e a diferença de osmolaridade entre a matriz mitocondrial e o citosol possibilitando o influxo de água e consequente inchamento da organela (BOELSTERLI, 2002; PEREIRA *et al.*, 2012).

Os xenobióticos que induzem citotoxicidade possuem mecanismos distintos que podem interferir na integridade das membranas, no metabolismo mitocondrial e/ou celular, na degradação ou liberação de componentes celulares, na divisão celular, entre outros, causando muitas vezes dissipação do potencial de membrana, formação e acúmulo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONS), alterações na produção de ATP, inchamento e outros distúrbios mitocondriais (SEIBERT, 1996).

Por este motivo, essa organela, complexa e altamente regulada, atua como biossensor para avaliação toxicológica pois a avaliação dos mecanismos de danos mitocondriais pode descrever os processos que explicam como os xenobióticos induzem seus efeitos tóxicos nos sistemas biológicos (BOELSTERLI, 2002; LI *et*

al., 2012; PEREIRA *et al.*, 2012) pelo fato de que a interação de substâncias potencialmente tóxicas em diversos pontos do sistema mitocondrial pode resultar em disfunção mitocondrial e consequente citotoxicidade (PEREIRA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013).

Elucidando os mecanismos de toxicidade de um xenobiótico é possível avaliar os riscos à saúde humana, permitindo que a toxicidade dessa substância seja prevista e prevenida (BOELSTERLI, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

Embora o triclopir tenha a meia vida considerada moderada, devido à sua alta utilização este herbicida é encontrado no ambiente, podendo ser potencialmente tóxico para o solo, água e animais (CESSNA *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2019), porém, a legislação brasileira não prevê o monitoramento desse herbicida nos compartimentos ambientais do país. No entanto, seu uso considerável na agricultura associado aos seus efeitos nocivos mostram a necessidade do desenvolvimento de pesquisas que melhor elucidem os mecanismos de sua toxicidade.

Este projeto buscou avaliar os efeitos do triclopir sobre mitocôndrias isoladas do fígado de ratos Wistar, uma vez que a distribuição neste órgão é descrita na literatura, na tentativa de identificar processos bioquímicos envolvidos no mecanismo de citotoxicidade desse composto acompanhando a tendência mundial pela busca de métodos alternativos para a caracterização do perigo de compostos químicos, em sintonia com os conceitos dos 3R's. Desta forma, preconizando a redução no número de animais utilizados e o refino, diminuindo o sofrimento durante a vida do animal.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Este projeto visou estudar os mecanismos de danos mitocondriais induzidos pelo triclopir em mitocôndrias hepáticas isoladas de ratos Wistar com exposição *in vitro*.

3.2 Específicos

- Avaliar os efeitos da exposição do triclopir sobre a bioenergética mitocondrial isoladas de células hepáticas de ratos Wistar.
- Avaliar os efeitos da exposição do triclopir sobre a estrutura mitocondrial de células hepáticas de ratos Wistar.
- Avaliar os efeitos da exposição do triclopir sobre o estado redox mitocondrial de células hepáticas de ratos Wistar.

AGRADECIMENTOS: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - nº 88887.481968/2020-00 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Brasil (FAPESP) - nº 18/00229-1.

4. REFERÊNCIAS

- ADAMA. Arremate. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Disponível em: https://www.adama.com/brazil/sites/adama_brazil/files/product-documents/2022-01/BULA_ARREIMATE_04112021_v00.pdf. Acesso em: 28 ago. 2022.
- AHRENS, W. H. (Ed.) **Herbicide Handbook**. Champaign, IL: Weed Science Society of America, 7th edition, p. 352, 1994.
- ANDRADE, I. B. L. **Toxicidade dos contaminantes de preocupação emergente decametilciclopentasiloxano e triclopir no desenvolvimento de embriões e larvas de zebrafish**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2021.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice Monográfico: Triclopir. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/T28%2B%2BTriclopir.pdf/b24b997a-66fb-45c0-b43a-5060db498aa4>. Acesso em: 28 ago. 2022.
- BARTELS, M.; BROWN, C.; CHUNG, G.; CHAN, M.; TERRY, C.; GEHEN, S.; CORVARO, M. Review of the pharmacokinetics and metabolism of triclopyr herbicide in mammals: Impact on safety assessments, **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 116 p. 104714, 2020.
- BIDLACK, H. D. Aerobic degradation of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in 15 agricultural soils. GH-C 991. **DowElanco**, Indianapolis, v. 174, p. 19-48, 1977.
- BOELSTERLI, U. A. Mechanistic toxicology: The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. **Taylor and Francis**. London, v. 23, p. 312, 2002.
- BROZ, P.; PELEGRIN, P.; SHAO, F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nat Rev Immunol* 20: 143–157, 2020.
- CARMICHAEL, N. G.; NOLAN, R. J.; PERKINS, J. M.; DAVIES, R.; WARRINGTON, S. J. Oral and dermal pharmacokinetics of triclopyr in human volunteers. **Hum. Toxicol.** v. 8, p. 431–437, 1989.
- CARMICHAEL, N. G.; PERKINS, J.; FLETCHER, A. P.; MACLENNAN, A. I.; DAVIES, R.; BROWN, P. M., WARRINGTON, S. J. Pilot Human Oral Absorption Study of Triclopyr (A Herbicide). A Report of **Dow Chemical Company**, Limited No. DET 1042, 1988a.
- CARMICHAEL, N. G.; PERKINS, J.; NOLAN, R. J.; FLETCHER, A. P.; DAVIES, R.; BROWN, P. M.; WARRINGTON, S. J. A Study of the Oral Absorption and Excretion of Triclopyr in Human Volunteer. A Report of **Dow Chemical Company**, Limited No. DET 1050, 1988b.
- CESSNA, A. J.; GROVER, R. Spectrophotometric determination of dissociation constants of selected acidic herbicides. **J Agric Food Chem** v. 26, p. 289-292, 1978.
- CESSNA, A. J.; GROVER, R.; WAITE, D. T. Environmental Fate of Triclopyr. **Rev. Environ Contam Toxicol.** v. 174, p. 19-48, 2002. doi: [10.1007/978-1-4757-4260-2_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4260-2_2)
- D'ANTONINO, L.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R.; CECON, P. R.; FRANÇA, A. C. E.; SILVA, G. R. Lixiviação do picloram em argissolo vermelho-amarelo e latossolo vermelho-amarelo com diferentes valores de pH. **Planta Daninha**. v. 27, p. 589-600, 2009.
- DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN, P. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 8, p.27-37,2011.
- DELGADO, G. C. A questão agrária no Brasil, 1950-2003. In: JACCOUD, L. (Org.). Questão social e políticas sociais no Brasil contemporâneo. **Brasília**: Ipea, p. 51-90, 2005.
- ECHA. European Chemicals Agency. Notified classification and labelling: [(3,5,6-trichloropyridin-2-yl)oxy]acetic acid. ECHA's C&L Inventory, 2021. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/41428#section=GHS-Classification>
- EFSA. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance triclopyr. **EFSA Scientific Report**. v. 56, p. 1-103, 2005.
- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Herbicidas mais utilizados em pastagens no Brasil. Disponível em: <http://old.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc117/07herbicidas.html>. Acesso em: 28 ago. 2022.
- FERRER, A.; CABRAL, R. Toxic epidemics caused by alimentary exposure to pesticides: a review. **Foo Additives Contam.** v. 8, p. 755-775, 1991.
- FINCO, D. R.; COOPER, T. Effects of Triclopyr on Phenolsulfphonphthalein (PSP) Excretion and Creatinine Clearance in Dogs (Report of The **Dow Chemical Company** No. HET K-042085-059), 1995.
- FRIEDMAN, J. R.; NUNNARI, J. Mitochondrial form and function. **Nature**. v. 505, p. 335–343, 2014.
- GIL, M. J.; SOTO, A. M.; USMA, J. I.; GUTIÉRRE, O. D. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. **Revista Facultad de Ciencias Básicas**, v. 7, p. 52-73, 2012.
- GRIFFIN, T. B. Renal Function Studies with Dowco 233 (Report of The **Dow Chemical Company** No. GHRC 147), 1979.
- GUILHERME, S.; SANTOS, M. A.; GAIVÃO, I.; PACHECO, M. Genotoxicity Evaluation of the Herbicide Garlon® and Its Active Ingredient (Triclopyr) in Fish (*Anguilla anguilla* L.) Using the Comet Assay. **Environmental Toxicology**. v. 30, p. 1073-1081, 2015.
- HAYES, W. J. J. Pesticides studied in man. **Williams and Wilkins**, Baltimore, MD, v. 13, p. 672, 1982.
- HOLMES, S. B.; THOMPSON, D. G.; WAINIO-KEIZER, K. L.; CAPELL, S. S.; STAZNIK, B. Effects of lethal and sublethal concentrations of the herbicide, triclopyr butoxyethyl ester, in the diet of zebra finches. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, p. 319-327, 1994.
- HOTCHKISS, S. A.; HEWITT, P.; CALDWELL, J.; CHEN, W. L.; ROWE, R. R. Percutaneous absorption of nicotinic acid, phenol, benzoic acid and triclopyr butoxyethyl ester through rat and human skin *in vitro*: Further validation of an *in vitro* model by comparison with *in vivo* data. **Food Chem. Toxicol.** v. 30, p. 891-899, 1992.
- IARC (International Agency For Research On Cancer). IARC **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Iarc, Lion, v. 98, 1991.
- KINOSHITA, H.; TANAKA, N.; JAMAL, M.; KUMIHASHI, M.; OKUZONO, R., KLAASSEN C. D. Casarett and Doll's

Toxicology: the basic science of poisons. 7th ed. New York: Mc Graw Hill; p. 881-931, 2007.

KOERICH, P.; GILSON, I. K.; VIEIRA, M. G.; BARBOSA, S. C.; SILVA, M. R. V.; PRIMEL, E. G.; RADUNZ, A. L.; CABRERA, L. C. Determinação De Contaminantes Emergentes No Rio Lontra (Salto Do Lontra – Paraná). **Biodiversidade**. v. 20, n. 1, 2021.

KUNZELMANN, K. Ion channels in regulated cell death. *Cell Mol Life Sci* 73: 2387–2403, 2016.

NASCIMENTO, L. X.; ARAÚJO, R. T.; ALVAREZ, L. D. G. Contaminantes orgânicos emergentes: Impactos y soluciones para la salud humana y el medio ambiente. *RECYT*, v. 17, p.28-34,2015.

NEWTON, M.; ROBERTS, F.; ALLEN, A.; KELPSAS, B.; WHITE, D.; BOYD, P. Deposition and dissipation of three herbicides in foliage, litter, and soil of brushfields of southwest Oregon. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 38, p. 574-583, 1990.

NI, H. M.; WILLIAMS, J. A.; DING, W. X. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. **Redox Biol. Elsevier**. v. 4, p. 6–13, 2015.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics** 2. Academic Press Inc.: London, 3rd ed., p. 288, 1982.

NORTOX. Triclopír F Nortox. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Disponível em: https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2021-01/triclopírfnortox.pdf. Acesso em: 28 ago. 2022.

PEREIRA, L. C.; DE SOUZA, A. O.; DORTA, D. J. Polybrominated Diphenyl Ether Congener (BDE-100) induces mitochondrial impairment. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. v. 112, p. 418-424, 2013.

PEREIRA, L. C.; DE SOUZA, A. O.; FRANCO-BERNARDES, M. F.; PAZIN, M.; TASSO, M. J.; PEREIRA, P. H.; DORTA, D. J. A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. **Environmental Science and Pollution**, v. 22, p. 13800-23, 2015.

PEREIRA, L. C.; DE SOUZA, A. O.; PAZIN, M.; DORTA, D. J. Mitocôndria como Alvo para Avaliação de Toxicidade de Xenobiótico. **Revista Brasileira de Toxicologia**. v. 25, p. 1-14, 2012.

PUBCHEM. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 41428, Triclopyr, 2022. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/41428>

REDDY, T. P.; MANCZAK, M.; CALKINS, M. J.; MAO, P.; ARUBALA, P. R.; SHIRENDEB, U.; PARK, B.; REDDY, H. Toxicity of Neurons Treated with Herbicides and Neuroprotection by Mitochondria-Targeted Antioxidant SS31. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 203–221, 2011.

RICHARDSON, S. D.; KIMURA, S. Y. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* 2016;88(1):546–582.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. Londrina: Edição dos Autores, 7^a ed., p. 675, 1998.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. Londrina: IAPAR, 3^a ed., p. 591, 2005.

RODRIGUES, E. T.; ALPENDURADA, M. F.; GUIMARÃES, A.; AVÓ, F.; FERREIRA, B.; PARDAL, M. A. The environmental condition of na estuarine ecosystem disturbed by pesticides. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 26, p. 24075-24087, 2019.

ROUBICEK, D. A.; SOUZA-PINTO, N. C. D. Mitochondria and mitochondrial DNA as relevant targets for environmental contaminants. **Toxicology. Elsevier**. v. 17, p. 30179-8, 2017.

SAMAEI, S. M.; RABBANI, S.; JOVANOVIĆ, B.; MOHAJERITEHRANI, M. R.; HAGHPANAH, V. Efficacy of the hatching event in assessing the embryo toxicity of the nano-sized TiO₂ particles in zebrafish: a comparison between two different classes of hatching-derived variables, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 116:121–128, 2015.

SANCHES, S. M.; SILVA, C. H. T. P.; CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M.; Pesticida e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 53-58, 2003.

SEIBERT, H.; BALLS, M.; FENTEM, J. H.; BIANCHI, V.; CLOTHIER, H.; DIERICKX, P. J.; EKWALL, B.; GARLE, M. J.; LECHÓN, M. J. G.; GRIBALDO, L.; GULDEN, M.; LIEBSCH, M.; RASMUSSEN, E.; ROGUET, R.; SHRIVASTAVA, R.; WALUM, E. Acute Toxicity testing *in vitro* and the classification and labelling of chemicals. **ATLA**. v. 24, p. 499-510, 1996.

SILVA, A. M.; ALVES, S. M. F. Análise dos registros de intoxicação por agrotóxicos em Goiás, no período de 2001 a 2004. **Rev Eletr Farmácia**. v. 4, p. 194-201, 2007.

SILVA, M. F. O.; COSTA, L. M. A indústria de defensivos agrícolas. **BNDES Setorial**, v. 35, p. 233-276, 2012.

TIMCHALK, C.; DRYZGA, M. D.; KASTL, P. E. Triclopyr: Tissue Distribution and Metabolism of ¹⁴C Labeled Triclopyr in Fischer 344 Rats (Report of The **Dow Chemical Company** No. HET K-42085-40), 1988.

TIMCHALK, C.; FINCO, D. R.; QUAIST, J. F. Evaluation of renal function in rhesus monkeys and comparison to beagle dogs following oral administration of the organic acid triclopyr (3,5,6- trichloro-2-pyridinyloxyacetic acid). **Fundam. Appl. Toxicol. Off. J. Soc. Toxicol.** v. 36, p. 47–53, 1997.

UPL, Open Ag. Triclon. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Disponível em: https://br.uplon-line.com/download_links/I/Corahatf8huQSfPWo81wP58AofS2Re13kc12Ho.pdf. Acesso em: 28 ago. 2022.

USEPA. Triclopyr, Triclopyr Butoxyethyl Ester, and Triclopyr Salts. Human Health Draft Risk Assessment to Support Registration Review. DP Code D451808. US EPA. **Washington**, DC, 2019.

VIEIRA, R. J. E. F.; GASQUES, J. G. Agricultura, transformação produtiva e sustentabilidade. Brasília: **Ipea**. p. 143-163, 2016.

WARKENTIN, K. M. Oxygen, gills, and embryo behavior: mechanisms of adaptive plasticity in hatching. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* 148:720– 731, 2007.

WEISS, B.; AMLER, S.; AMLER, R.W. Pesticides. **Pediatrics**, v. 113, p. 1030-1036, 2004.

WOLT, J. D. Ground and surface water exposure assessment for triclopyr. GH-C 4350. **DowElanco**, Indianapolis, IN, v. 174, 1998.

WSSA (Weed Science Society of America). Weed Science Society of America, 5th ed., **Weed Society of America**, Champaign, IL, 1983.

YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 47–59, 2008.

ZACHARIA, J. T.; Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides, Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis. Dr. Margarita Stoytcheva. ISBN: 978-953-307-437-5, InTech (Ed.), 2011.

ZHANG, J.; BEQUM, A.; BRANNSTROM, K.; GRUNDSTROM, C.; LAKOVLEVA, I.; OLOFSSON, A.; SAUER-ERIKSSON, A. E.; ANDERSSON, P. L. Structure-Based Virtual Screening Protocol for in Silico Identification of Potential Thyroid Disrupting Chemicals Targeting Transthyretin. **Environ Sci Technol.** v. 50, p. 11984-11993, 2016.

ZHU, J.; WANG, K. Z. Q.; CHU, C. T. After the banquet: Mitochondrial biogenesis, mitophagy and cell survival. **Autophagy**, v. 9, p. 1663-1676, 2013.

Capítulo 2

Manuscrito