
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANA CAROLINE PIMENTEL DE OLIVEIRA

**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO
CELULAR 3D UTILIZANDO-SE CO-CULTURAS
DE CÉLULAS HEPÁTICAS PARA ANÁLISES
TOXICOLÓGICAS DA ATUAÇÃO DE
FITOSSANITÁRIOS NO METABOLISMO PRÓ-
ESTEATÓTICO**

Rio Claro - SP
2022

ANA CAROLINE PIMENTEL DE OLIVEIRA

**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO CELULAR 3D UTILIZANDO-
SE CO-CULTURAS DE CÉLULAS HEPÁTICAS PARA ANÁLISES
TOXICOLÓGICAS DA ATUAÇÃO DE FITOSSANITÁRIOS NO
METABOLISMO PRÓ-ESTEATÓTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Campus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Bacharela e
Licenciada em Ciências Biológicas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karen Cristiane Martinez de Moraes

Rio Claro - SP
2022

O48e

Oliveira, Ana Caroline Pimentel de

Estabelecimento de um modelo celular 3D utilizando-se co-culturas de células hepáticas para análises toxicológicas da atuação de fitossanitários no metabolismo pró-esteatótico / Ana Caroline Pimentel de Oliveira. -- Rio Claro, 2022

75 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Karen Cristiane Martinez de Moraes

1. Contaminantes ambientais. 2. Cultura celular 3D. 3. Esteatose hepática. 4. Inovações biotecnológicas. 5. Fitossanitários. I. Título.

ANA CAROLINE PIMENTEL DE OLIVEIRA

**ESTABELECIMENTO DE UM MODELO CELULAR 3D UTILIZANDO-
SE CO-CULTURAS DE CÉLULAS HEPÁTICAS PARA ANÁLISES
TOXICOLÓGICAS DA ATUAÇÃO DE FITOSSANITÁRIOS NO
METABOLISMO PRÓ-ESTEATÓTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Bacharela e
Licenciada em Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a Dr^a Karen Cristiane Martinez de Moraes (orientadora)

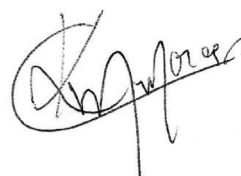
Prof^a. Dr^a. Bibiana Monson de Souza

Prof^a. Dr^a. Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo Morales

Aprovado em: 18 de novembro de 2022.

Ana C. P. de Oliveira

Assinatura da discente



Assinatura da orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus que, mesmo quando tudo pareceu escuro, iluminou o meu caminho e até aqui me guardou e me deu forças para que este projeto pudesse ser concluído.

À professora Dr^a. Karen, que topou traçar essa jornada comigo e que pôde, através da excelentíssima orientação, me ajudar a tornar a pesquisadora que um dia eu sonhei ser. Obrigada pela oportunidade, confiança e paciência. Todo os “surto” valeram a pena!

Agradeço imensamente à minha família que sempre apoiou minhas escolhas, me amaram incondicionalmente e que trilharam a estrada para que eu pudesse atravessar. Obrigada, mãe e pai (Natalina e Cláudio) por, mesmo sem entenderem, fazerem o possível e impossível para que eu pudesse realizar meu sonho, nada disso seria possível sem a ajuda de vocês! Obrigada, Thaly, por todos os puxões de orelha, por ser meu exemplo de caráter e a minha maior e melhor inspiração. Obrigada, Paulo, por proporcionar as melhores condições para que eu estudasse com segurança e conforto, e Théo que, mesmo tão pequeno, alegra os momentos mais difíceis. Eu amo vocês mais do que posso descrever!

Aos meus tios, Leni e José Roque, por me ajudarem nos primeiros anos de graduação, e ao Diego, por ter se tornado meu primão favorito.

Às minhas amigas Beatriz, Daiane e Fernanda que tornaram-se minha segunda família e estiveram comigo em todos os momentos. Esse é só o começo dessa linda história que escreveremos juntas. Obrigada também à Bianca e Rafaela, por proporcionarem as melhores risadas durante esses 5 anos. Vocês são incríveis!

Agradeço aos colegas do Laboratório de Sinalização Celular e Expressão Gênica (LaSCEG), Camila, Fabiano, Indyanara, Letícia Molic e Luana, pelo apoio, pela experiência, pelo aprendizado e pela convivência diária.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo 03/2021) pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a todos meus amigos e familiares (de Campinas e região rs) que, de forma direta ou indireta, me ajudaram na conclusão deste trabalho e da minha construção pessoal e profissional. Eu amo vocês!

RESUMO

Atualmente, as doenças hepáticas são consideradas um problema de saúde pública mundial e, entre elas, a esteatose se destaca. Caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura no fígado a esteatose se origina de diferentes etiologias tais como as causadas por transtornos alimentares, doenças autoimunes, causas virais e contato com substâncias nocivas, como os agrotóxicos e outros contaminantes ambientais. Nos dias atuais os agrotóxicos, nomeados como fitossanitários, são amplamente utilizados em vários países e tem o potencial de causar doenças metabólicas e sequelas hepatotóxicas. Considerando-se as disfunções metabólicas hepáticas, a esteatose hepática não alcoólica (DGHNA), ou simplesmente esteatose, pode progredir a quadros de fibrose e/ou hepatocarcinoma (HCC), cujos aspectos moleculares não se encontram completamente elucidados. Nesse contexto, a regulação do metabolismo lipídico é de suma importância para o controle e/ ou reversão do quadro de esteatose. Assim sendo, neste estudo foi estabelecido um modelo alternativo de baixo custo baseado em co-cultivo celular em ambiente 3D para a avaliação do metabolismo pró-esteatótico e dos efeitos toxicológicos de fitossanitários no estabelecimento da doença. Resultados obtidos com culturas 3D aproximam-se mais dos encontrados em modelos *in vivo*, além disso a utilização de métodos alternativos ao uso de animais nas pesquisas vem ao encontro das necessidades das pesquisas contemporâneas. Para isso, células das linhagens de hepatócitos HepG2 (ATCC® HB-8065™) e de células estreladas hepáticas (CEH), LX-2, foram co-cultivadas e semeadas no modelo padronizado. Para a padronização do modelo de estudo e análises subsequentes, diferentes substratos que potencialmente viabilizam o crescimento celular em 3D foram testados isoladamente e/ou em combinação. A viabilidade das formações dos esferóides foi acompanhada por intervalos regulares de 24h, 48h e 72h, seguido de análises de azul de tripano. Análises de citotoxicidade MTT de diferentes fitossanitários foram avaliadas e as concentrações de estudo foram estabelecidas. Os resultados demonstraram que as co-culturas crescida em 0,5% de alginato + 0,75% de ágar por 48h formaram os melhores esferóides e apresentaram viabilidade superior a 70%. O substrato 3D apresentou viabilidade celular satisfatória quando incubadas com ácidos graxos (AGs) a 400 μ M, por um intervalo de 24h de exposição. Com relação aos fitossanitários analisados, verificou-se que o inseticida fipronil (nas concentrações 2 μ M e 20 μ M) e o herbicida bromacil (nas concentrações de 5 nM e 50 nM) apresentaram melhores resultados de não citotoxicidade e integridade das células nas culturas 2D, portanto foram utilizadas na análise do modelo de estudo. A mensuração de TGs e glicose, após a exposição aos AGs e aos fitossanitários, demonstraram aumento estatisticamente significativo nos tratamentos, certificando a aplicabilidade do modelo 3D na avaliação do quadro pró-esteatótico.

Palavras-chave: contaminantes ambientais; cultura celular 3D; esteatose hepática; inovações biotecnológicas; fitossanitários.

ABSTRACT

Currently, liver diseases are considered a global public health problem and, among them, steatosis stands out. Characterized by excessive accumulation of fat in the liver, steatosis originates from different etiologies such as those caused by eating disorders, autoimmune diseases, viral causes and contact with harmful substances, such as pesticides and other environmental contaminants. Nowadays, pesticides, named as phytosanitary, are widely used in several countries and have the potential to cause metabolic diseases and hepatotoxic sequelae. Considering hepatic metabolic disorders, non-alcoholic hepatic steatosis (NAFLD), or simply steatosis, can progress to fibrosis and/or hepatocarcinoma (HCC), whose molecular aspects are not completely elucidated. In this context, the regulation of lipid metabolism is of the utmost importance for the control and/or reversal of steatosis. Therefore, in this study, an alternative low-cost model based on cell co-culture in a 3D environment was established for the evaluation of pro-steatotic metabolism and the toxicological effects of phytosanitary in the establishment of the disease. Results obtained with 3D cultures are closer to those found in *in vivo* models, in addition, the use of alternative methods to the use of animals in research meets the needs of contemporary research. For this, cells from the HepG2 (ATCC® HB-8065™) and hepatic stellate cell (HEC) LX-2 cell lines were co-cultured and seeded in the standardized model. For the standardization of the study model and subsequent analyses, different substrates that potentially enable 3D cell growth were tested alone and/or in combination. The viability of spheroid formations was monitored at regular intervals of 24h, 48h and 72h, followed by trypan blue analyses. MTT cytotoxicity analyses of different phytosanitary were evaluated and study concentrations were established. The results showed that co-cultures grown in 0.5% alginate + 0.75% agar for 48h formed the best spheroids and showed viability greater than 70%. The 3D substrate showed satisfactory cell viability when incubated with fatty acids (FAs) at 400 μ M, for an interval of 24h of exposure. Regarding the phytosanitary analyzed, it was found that the insecticide fipronil (at concentrations of 2 μ M and 20 μ M) and the herbicide bromacil (at concentrations of 5 nM and 50 nM) presented better results of non-cytotoxicity and cell integrity in 2D cultures, therefore, they were used in the analysis of the study model. The measurement of TGs and glucose, after exposure to AGs and phytosanitary products, showed a statistically significant increase in the treatments, certifying the applicability of the 3D model in the evaluation of the pro-steatotic condition.

Keywords: environmental contaminants; 3D cell culture; hepatic steatosis; biotechnological innovations; phytosanitary.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema histológico do fígado com seus principais componentes celulares.....	11
Figura 2 - Espectro e evolução da DHGNA.....	13
Figura 3 - Método de exclusão azul de tripano	29
Figura 4 - Esquema representativo das análises de viabilidade/ citotoxicidade do ensaio colorimétrico do MTT.....	31
Figura 5 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B e C) 24h e (D, E e F) 48h da incubação de células HepG2 a substratos contendo (B e E) 2% de gelatina e 0,3% de agarose e (C e F) 4% de gelatina e 0,3% de agarose. (A e D) controles do experimento. Ampliação de 40x.....	34
Figura 6 - Análises de microscopia de campo claro após 48h da incubação de células HepG2 ao substrato contendo (A) 2% de gelatina, 0,6% de agarose e 1% de colágeno; (B) 2% de gelatina e 0,6% de agarose; (C) 2% de gelatina, 0,8% de agarose e 1% de colágeno; e (D) 2% de gelatina e 0,8% de agarose. Ampliação de 100x.....	36
Figura 7 - Análises de microscopia de campo claro após 48h da incubação de células hepáticas (A, B e C) HepG2 e (D, E e F) LX-2 cultivada por 48h em (B e E) 2% de gelatina, 0,6% de agarose e 0,2% de colágeno; e (C e F) 2% de gelatina, 0,6% de agarose e 0,5% de colágeno. (A e D) controles do experimento. Ampliação de 100x.....	36
Figura 8 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B, C e D) 24h, (E, F, G e H) 48h e (I, J, K e L) 144h da incubação de células HepG2 ao substrato contendo (A, E e I) 1% de gelatina e 1% de colágeno; (B, F e J) 1% de colágeno; (C, G e K) 1% de gelatina e 2% de colágeno; e (D, H, L) 2% de colágeno. (A-H) Ampliação de 100x. (I-L) Ampliação de 40x.....	38
Figura 9 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B e C) 24h e (D, E e F) 72h da incubação de células (A e D) HepG2, (B e E) LX-2 e (C e F) co-cultura, ao substrato contendo 1% de gelatina e 2% de colágeno. (A, B e C) Ampliação de 100x. (D, E e F) Ampliação de 40x.....	39
Figura 10 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B e C) 24h e (D, E e F) 48h da incubação de células HepG2 ao substrato contendo (A e D) 0,05% de colágeno; (B e E) 0,1% de colágeno; e (C e F) 0,2% de colágeno. Ampliação de 40x.....	40
Figura 11 - Análises de microscopia de campo claro após (A e B) 24h e (C, D e E) 48h da incubação de células LX-2 ao substrato contendo (A e C) 0,05% de colágeno; (D) 0,1% de colágeno; e (B e E) 0,2% de colágeno. Ampliação de 40x.....	40
Figura 12 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B e C) 24h e (D, E e F) 48h da incubação de células HepG2 ao substrato contendo (A e D) 0,25% de alginato e 0,37% de agarose; (B e E) 0,5% de alginato e 0,75% de agarose; e (C e F) 1% de alginato e 1,5% de agarose. Ampliação de 100x.....	42

Figura 13 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B e C) 24h e (D, E e F) 48h da incubação de células LX-2 ao substrato contendo (A e D) 0,25% de alginato e 0,37% de agarose; (B e E) 0,5% de alginato e 0,75% de agarose; e (C e F) 1% de alginato e 1,5% de agarose. Ampliação de 100x.....42

Figura 14 - Análises de microscopia de campo claro após (A) 24h e (B) 48h da incubação de células hepáticas em co-cultura (HepG2 e LX-2) ao substrato contendo 0,25% de alginato e 0,37% de agarose. Ampliação de 100x.....43

Figura 15 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B e C) 24h e (D, E e F) 48h da incubação de células HepG2 ao substrato contendo (A e D) 0,25% de alginato e 0,37% de ágar; (B e E) 0,5% de alginato e 0,75% de ágar; e (C e F) 1% de alginato e 1,5% de ágar. Ampliação de 100x.....44

Figura 16 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B e C) 24h e (D, E e F) 48h da incubação de células LX-2 ao substrato contendo (A e D) 0,25% de alginato e 0,37% de ágar; (B e E) 0,5% de alginato e 0,75% de ágar; e (C e F) 1% de alginato e 1,5% de ágar. Ampliação de 100x.....45

Figura 17 - Análises de microscopia de campo claro após (A) 24h e (B) 48h da incubação de células hepáticas em co-cultura (HepG2 e LX-2) ao substrato contendo 0,5% de alginato e 0,75% de ágar. Ampliação de 100x.....46

Figura 18 - Análises de azul de tripano após 48h da incubação de hepáticas (A, B e C) HepG2 e (D, E e F) LX-2 ao substrato contendo (A e D) 0,25% de alginato e 0,37% de agarose; (B e E) 0,5% de alginato e 0,75% de agarose; e (C e F) 1% de alginato e 1,5% de agarose. Ampliação de 100x.....48

Figura 19 - Análises de azul de tripano após 48h da incubação de células hepáticas (A e B) HepG2 e (C e D) LX-2 ao substrato contendo (A e C) 0,25% de alginato e 0,37% de ágar; e (B e D) 0,5% de alginato e 0,75% e ágar. Ampliação de 100x.....49

Figura 20 - Ensaio de citotoxicidade (MTT) realizado por 48h na presença do agrotóxico piraclostrobina. A) Células LX-2. B) Células HepG2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Tukey, onde $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$; $****p \leq 0,0001$ em comparação com o controle.....52

Figura 21 - Ensaio de citotoxicidade (MTT) realizado por 24h na presença do agrotóxico mancozebe. A) Células HepG2. B) Células LX-2. (C) Células em co-cultura. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Tukey, onde $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$; $****p \leq 0,0001$ em comparação com o controle.....53

Figura 22 - Ensaio de citotoxicidade (MTT) realizado por 24h na presença do agrotóxico fipronil. A) Células HepG2. B) Células LX-2. (C) Células em co-cultura. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Tukey, onde $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$ em comparação com o controle.....54

Figura 23 - Ensaio de citotoxicidade (MTT) realizado por 72h na presença do agrotóxico Bromacil. A) Células HepG2. B) Células LX-2. (C) Células em co-cultura. Os resultados foram

submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Tukey, onde $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$ em comparação com o controle.....55

Figura 24 - Análises de microscopia de campo claro de co-cultura de células hepáticas HepG2 e LX-2 cultivadas por 48h em substrato contendo 0,5% de alginato e 0,75% de ágar + 24h com (A, B e C) 2 μ M de fipronil e (D, E e F) 20 μ M de fipronil. (A e D) Ampliação de 40x. (B e E) Ampliação de 100x. (C e F) Ampliação de 200x.....56

Figura 25 - Análises de microscopia de campo claro de co-cultura de células hepáticas HepG2 e LX-2 cultivadas por 48h em substrato contendo 0,5% de alginato e 0,75% de ágar + 24h com (A, B e C) 5 nM de bromacil e (D, E e F) 50 nM de bromacil. (A e D) Ampliação de 40x. (B e E) Ampliação de 100x. (C e F) Ampliação de 200x.....56

Figura 26 - Ensaio enzimático colorimétrico de triglicerídeos realizado por 24h em células co-cultivadas no modelo 3D padronizado na presença de AGs, fipronil 2 μ M e 20 μ M, e bromacil 5 nM e 50 nM. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Tukey, onde $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$; $****p \leq 0,0001$ em comparação com o controle.....58

Figura 27 - Ensaio enzimático colorimétrico de glicose realizado por 24h em células co-cultivadas no modelo 3D padronizado na presença de AGs, Fipronil 2 μ M e 20 μ M, e Bromacil 5 nM e 50 nM. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Tukey, onde $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$; $****p \leq 0,0001$ em comparação com o controle.....59

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

2,4-D	Diclorofenoxiacético
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ABA	Ácido abscísico
ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACSs	Células-tronco adultas
AG	Ácidos graxos
ATP	Adenosina trifosfato
AZO	Azoxistrobina
CEH	Células estreladas hepáticas
CO₂	Dióxido de carbono
CPT-1	Carnitina palmitoiltransferase I
CPT-2	Carnitina palmitoiltransferase II
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EBCD	Etileno bisditiocarbamato
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EPSP	5-enolpiruvil-quiquimato-3-fosfato sintase
ESCs	Células-tronco embrionárias
ETU	Etilenotiouréia
FAS	Ácidos graxos sintase
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GL	Gotículas de lipídeos
HCC	Carcinoma hepatocelular
IA	Insumos agrícolas
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente
IDA	Ingestão diária aceitável
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8

INCA	Instituto Nacional de Câncer
KC	Células de Kupffer
LDN	Lipogênese <i>de novo</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEC	Matriz extra celular
NASH	Esteato-hepatite não alcoólica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reações de polimerização em cadeia
PCM-1	Proteína química monocito 1
PL	Projeto de Lei
PNPLA3	Proteína fosfolipase tipo-patatina-3
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
PPARs	Receptores ativados por proliferados de peroxissoma
PSCs	Células-tronco pluripotentes
PYR	Piraclostrobina
Qo1	quinona oxidase
qPCR	Reação de polimerase em cadeia quantitativa
RE	Retículo endoplasmático
RI	Resistência à insulina
RNA	Ácidos ribonucléicos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SCD-1	Estearoil-CoA desaturase 1
SFB	Soro fetal bovino
SREBP-1c	Proteína 1-c ligante de elemento regulador de esterol
TG	Triglicerídeos
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VLDL	Lipoproteína de baixa densidade

SUMÁRIO

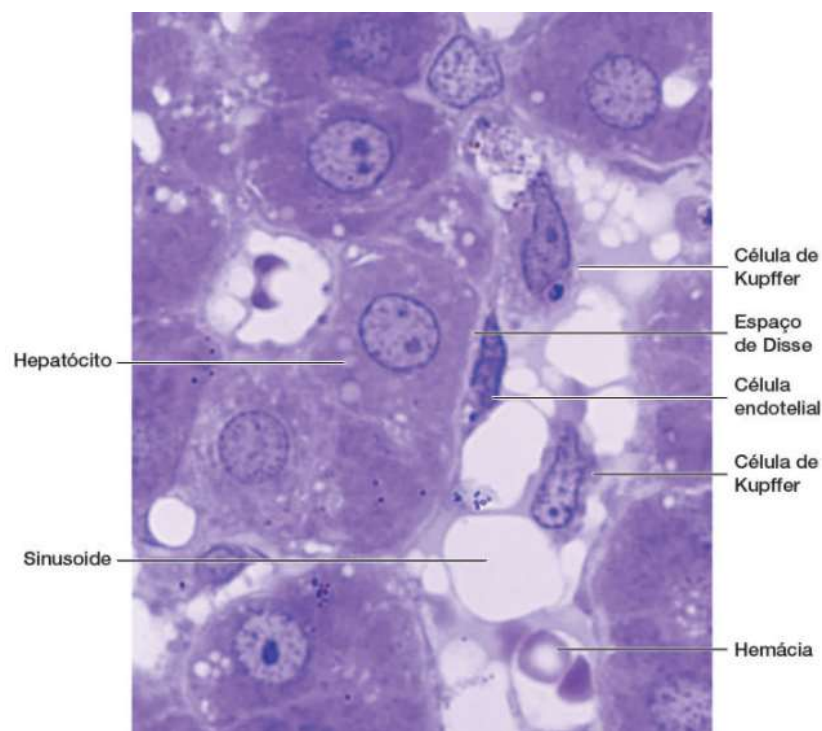
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Doenças hepáticas como um problema de saúde pública mundial	13
1.2 Brasil e os fitossanitários	18
1.2.1 Fitosanitários: inimigos silenciosos e agravantes das patologias hepáticas.....	18
1.2.2 Os fitossanitários mais consumidos no Brasil	20
1.2.3 Fipronil e bromacil: conhecendo os princípios ativos dos fitossanitários	24
1.3 Modelo Alternativo: culturas celulares 3D	26
1.4 Justificativa	29
2. OBJETIVO.....	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Cultura celular e experimentação 3D (padronização do cultivo).....	30
3.2 Preparo e diluições dos fitossanitários	30
3.3 Análises da sobrevivência e integridade celular	31
3.2.1 Análises de microscopia de campo claro.....	31
3.2.2 Azul de Tripano	31
3.2.3 MTT.....	32
3.3 Indução de quadro simulador de condições pró-esteatóticas e mensuração de triglicerídeos e glicose	33
3.4 Análises estatísticas	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Padronização do cultivo celular 3D	35
4.1.1 Ensaios de viabilidade/ citotoxicidade celular – análises de azul de tripano	49
4.2 Validação da funcionalidade do modelo alternativo 3D para análises toxicológicas da atuação de fitossanitários no metabolismo pró-esteatótico.....	53
4.2.1 Ensaio de viabilidade/ citotoxicidade celular – análises de MTT frente a diferentes concentrações de fitossanitários	53
4.2.2 Efeitos dos fitossanitários na viabilidade celular - análises de azul de tripano	57
4.3 Indução de quadro simulador de condições pró-esteatóticas e mensuração de triglicerídeos e glicose	60
5. CONCLUSÃO	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças hepáticas como um problema de saúde pública mundial

O fígado desempenha papel fundamental no corpo humano e é o centro de numerosos processos fisiológicos. Ele é responsável pelo equilíbrio do metabolismo dos indivíduos e realiza mais de 500 reações de síntese e degradação de metabólitos, atuando no metabolismo da glicose, lipídeos, ureia e na síntese de proteínas plasmáticas, além da detoxificação orgânica pelo metabolismo de xenobióticos, entre outros elementos (NORONHA *et al.*, 2020; VIEIRA; RIEGER; DALTOÉ, 2020). Histologicamente, o fígado é constituído por células endoteliais, hepatócitos e as células não parenquimatosas associadas ao fígado, que incluem as células de Kupffer (KC), as células dendríticas e as células estreladas hepáticas (CEH) (SENOO *et al.*, 2010; HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011). Alterações na homeostase e no funcionamento desse órgão apresenta grande impacto na saúde do indivíduo, podendo progredir para uma doença aguda e até uma doença crônica (MOON; SINGAL; TAPPER, 2020). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) doenças relacionadas ao fígado ainda são consideradas um grave problema de saúde pública e uma das principais causas de morte no mundo.

Figura 1 - Esquema histológico do fígado com seus principais componentes celulares



Fonte: GAMA, 2017.

Nos mamíferos, os hepatócitos constituem 80% do volume do fígado e desempenham papéis exócrinos e endócrinos fundamentais na homeostase do órgão (GAMA, 2017; MESSINA *et al.*, 2020). As células endoteliais revestem a parede sinusoidal. As células de *Kupffer* são macrófagos resistentes, que, após a ativação, podem secretar citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS), auxiliando na resposta inflamatória (KMIEC, 2001). As células estreladas hepáticas são especializadas em armazenamento, abrigando inclusões lipídicas ricas em retinóides (vitamina A). Sob condições de homeostase, as CEH apresentam uma forma quiescente, no entanto, sob condições de estresse, tornam-se ativas perdendo seu armazenamento de retinóides e adquirindo uma morfologia semelhante à miofibroblastos (FRIEDMAN, 2008). Além disso, as CEH são células altamente especializadas que contribuem na síntese e secreção de proteoglicanos e proteínas da matriz celular, auxiliando também na formação da parede dos sinusoides do fígado e representando a interface entre o fluxo sanguíneo e células hepáticas (HEYMANN; TACKE, 2016; NI *et al.*, 2017; GAMA, 2017).

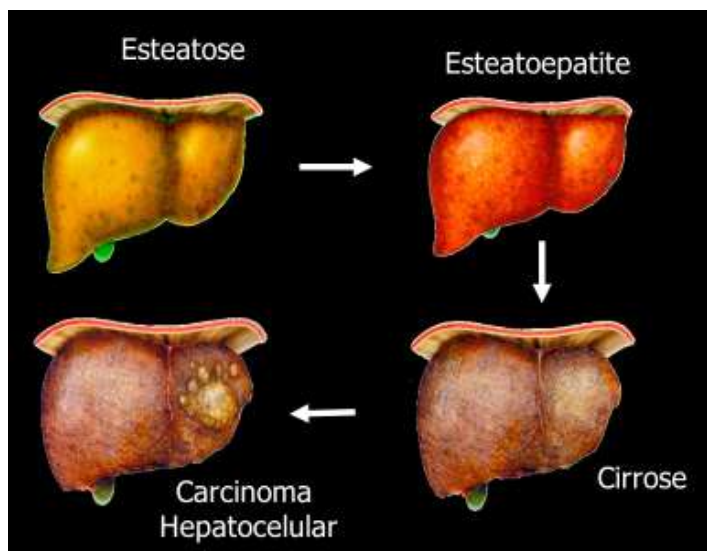
Considerando-se as sociedades atuais com seus costumes e estilo de vida, a incidência das doenças hepáticas, incluindo as hepatites, esteatose, cirrose, carcinoma hepatocelular (HCC) e hemocromatose, têm aumentado consideravelmente em todo o mundo (ANUSHIRAVANI; SEPANLOU, 2019; BUGIANESI; PETTA, 2022), sendo responsáveis por, aproximadamente, 2 milhões de mortes por ano (ASRANI *et al.*, 2019). De acordo com a OMS, em 2020, foram registrados 830 mil óbitos em decorrência do câncer hepático, sendo a terceira principal causa de mortes por câncer, além de uma das 10 causas primárias de morte em diferentes países (WHO, 2020). Além do elevado número de mortes e comorbidades, de acordo com Stepanova *et al.* (2017), as disfunções hepáticas podem gerar, ainda, redução na qualidade de vida dos pacientes, perdas econômicas, como maior taxa de desemprego, menor renda e maiores gastos com cuidados de saúde (SINGH; OSNA; KHARBANDA, 2017).

Com relação à esteatose hepática, de acordo com a Sociedade Brasileira de Hepatologia, essa doença pode ser classificada em dois grandes grupos, sendo o primeiro grupo ocasionado pelo consumo excessivo de bebidas alcoólicas (esteatose hepática alcoólica) e o segundo denominado pela doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (ZHAO *et al.*, 2014; WALLACE; MANN; FRIEDMAN, 2015). Considerando-se as diversas etiologias, que pode variar de má alimentação, consumo excessivo de álcool, toxicidade induzida por drogas, distúrbios metabólicos, infecções virais e o próprio ambiente (ZHAO *et al.*, 2014; MESSINA *et al.*, 2020; BUGIANESI; PETTA, 2022), a esteatose é um problema crônico em diversos

países. Sua prevalência aproxima-se de 25% a 35% em adultos de países desenvolvidos (MENDONÇA *et al.*, 2021; YANG; PARK, 2018; BUGIANESI; PETTA, 2022).

A DHGNA pode se manter silente por anos, e mesmo décadas. Esta, por sua vez, se estabelece devido a disfunções metabólicas que acometem a homeostase do metabolismo hepático e conduzem a um acúmulo de lipídeo nos hepatócitos com valores correspondentes a 5% ou mais do peso do órgão (HARDY *et al.*, 2016; KARANJIA *et al.*, 2016; BENEDICT; ZHANG, 2017). Entretanto, em alguns indivíduos ela pode progredir a quadros de esteatohepatite não alcoólica (NASH) (ABDELMALEK, 2021), ou, ainda, evoluir a estados fisiológicos mais graves e irreversíveis como a cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e posterior morte do tecido (Figura 2) (VIEIRA; RIEGER; DALTOÉ, 2020; HORN *et al.*, 2021).

Figura 2 - Espectro e evolução da DHGNA



Fonte: Sociedade Brasileira de Hepatologia (<https://sbhepatologia.org.br/imprensa/esteatose-hepatica/>).

Apesar de apresentar etiologia bastante variada, a DHGNA depende de uma sinalização integrada modulada por muitos fatores para o seu desenvolvimento e progressão. O acúmulo descontrolado de triglicerídeos (TG) no fígado desencadeia a síntese lipídica e a gliconeogênese (MANNE; HANDA; KOWDLEY, 2018). Além disso, o excesso de ácidos graxos livres (AGs) podem contribuir no estabelecimento de um ambiente inflamatório, lipotoxicidade e aumento de ROS (ZÁMBÓ *et al.*, 2013; ARRESE *et al.*, 2016; PETTA *et al.*, 2016; SILVA, 2021), que, em conjunto, ocasionam a disfunção mitocondrial e a resistência à insulina (RI), alterando assim, a homeostase celular e sistêmica (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; HORN *et al.*, 2021).

No geral, as doenças hepáticas em sua fase inicial são caracterizadas pela presença de uma resposta inflamatória, que pode ser aguda ou crônica (LIU *et al.*, 2017). Na resposta inflamatória crônica ocorre aumento na produção de ROS e reparo reduzido no DNA (LIN *et al.*, 2016). No fígado as células inflamatórias chegam ao local da injúria através de quimiocinas, produtos de células em apoptose ou fragmentos de glicosaminoglicanos e proteínas (BISSELL, 2010; HORN *et al.*, 2021). Um ambiente abundante de quimocinas e citocinas inflamatórias, como a proteína química monócito 1 (PCM-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e IL-8, causam RI e estão relacionados ao desenvolvimento da DHGNA (ARRESE *et al.*, 2016; PETTA *et al.*, 2016).

Nas disfunções hepáticas, ocorrem alterações no metabolismo lipídico e um desbalanço entre a etapa de síntese e a de degradação dessas moléculas. Na fase de síntese, a absorção de AGs ocorre em excesso pelo fígado e essas moléculas são geralmente oriundas da lipólise das moléculas de gordura dos adipócitos e/ ou pela lipogênese *de novo* (LDN) (SUN *et al.*, 2017; MANNE; HANDA; KOWDLEY, 2018; NOOIJER *et al.*, 2019). Já na degradação, ocorre através da disfunção na utilização das moléculas pelo próprio organismo e, principalmente, através da β -oxidação no interior das mitocôndrias e dos peroxissomos (HOWELL *et al.*, 2018). No geral, o acúmulo de TG hepáticos e a RI são agentes facilitadores da LDN e da inibição da lipólise do tecido adiposo, aumentando o efluxo dos AG para o fígado (NOOIJER *et al.*, 2019; SHAUNAK *et al.*, 2020) e, conseqüentemente, o seu acúmulo (RESS; KASER, 2016).

Na via de biossíntese de lipídeos os AGs são metabolizados e resultam em moléculas de acetil-COA. Posteriormente, os ácidos graxos podem ser esterificados com cadeias de glicerol ou esterol originando os triacilgliceróis, para serem armazenados na forma de gotículas de lipídeos (GL) (SANTELLO, 2020) ou exportados através um componente de partículas de lipoproteína de baixa densidade (VLDL). A lipofagia ajuda a degradar os TGs das gotículas lipídicas ao fornecer AGs para essas rotas de exportação. No entanto, a produção de VLDL e a lipofagia são prejudicadas na DHGNA, e a desregulação na β -oxidação mitocondrial conduz ao aumento do estresse oxidativo devido ao vazamento exacerbado de elétrons da cadeia de transporte de elétrons. O estresse oxidativo é agravado pela indução concomitante mediada por AGs do CYP2E1, um citocromo que realiza ciclos com liberação de elétrons no citosol (ZÁMBÓ *et al.*, 2013; RODRIGUEZ; KERSTEN, 2017).

Por sua vez, a LDN tem papel fundamental no aparecimento da DHGNA e esse processo metabólico se inicia, principalmente, a partir da ingestão de carboidratos no qual o principal produto é o palmitato (SILVA, 2021). De maneira descontrolada, a lipogênese *de novo* acarreta em lipotoxicidade, favorecendo o estabelecimento da DHGNA (YANG; PARK, 2018). Na

LDN de mamíferos atuam várias enzimas-chave como acetil-CoA carboxilase (ACC), ácidos graxos sintase (FAS) e estearoil-CoA desaturase 1 (SCD-1) (YANG; PARK, 2018) e desregulações nas atividades dessas enzimas são responsáveis por alterações fisiológicas. Como etapas limitantes da lipogênese *de novo*, as atividades de ACC e FAS são reguladas por vários receptores nucleares e fatores transcricionais, incluindo os fatores de transcrição denominados proteína 1-c ligante de elemento regulador de esterol (SREBP-1c), mediadores pró-inflamatórios como o fator de ativação de plaquetas (PAF) e os fatores de transcrição denominados receptores ativados por proliferados de peroxissoma (PPARs). Esses fatores transcricionais atuam no controle da expressão de genes essenciais para o metabolismo de lipídeos, promovendo a absorção de AG, diferenciação de adipócitos, armazenamento lipídico em adipócitos maduros e regulador da β -oxidação e gasto energético (SANTELLO, 2020). Conjuntamente, várias moléculas colaboram para a biossíntese lipídica.

Em relação ao processo oxidativo e seu equilíbrio na manutenção da homeostase ou na patologia do acúmulo lipídico, várias reações concatenadas ocorrem para que moléculas de AGs sejam reduzidas a acetil-CoA, gerando energia na forma de adenosina trifosfato (ATP). Entretanto, para esse processo os AGs precisam ser ativados por enzimas da família acil-coA. Essas enzimas adicionam grupamentos acetil-CoA às moléculas de AG que podem ser, então, utilizadas nos processos de β -oxidação nas mitocôndrias, peroxissomo e/ou retículo endoplasmático (RE). Entretanto, apenas os AGs de cadeia curta e média, com até 12 carbonos, podem atravessar livremente as membranas das mitocôndrias. Os AGs de cadeia longa requerem a assistência da carnitina palmitoiltransferase I (CPT-1) e CPT-2 para atravessar as membranas mitocondriais, sendo essas enzimas consideradas limitantes na taxa de mitocôndrias da β -oxidação em hepatócitos (YANG; PARK, 2018). A regulação fina e dinâmica dessas rotas metabólicas asseguram o equilíbrio celular e sistêmico (NELSON; COX, 2019).

Além dos elementos apontados, vários outros foram descritos por seu envolvimento na progressão e no desenvolvimento da DHGNA regulando uma ampla gama de mecanismos fisiopatológicos tais como a inflamação, o acúmulo de lipídios e o estresse oxidativo (PACIFICO *et al.*, 2010; CHEN; YEH, 2021). Um importante elemento na disfunção hepática é a proteína fosfolipase tipo-patatina-3 (PNPLA3), que possui variantes polimórficas entre os indivíduos e grupos populacionais, afetando, portanto, sua atividade funcional no metabolismo lipídico. Comumente observa-se a substituição de bases nesse gene que resulta na alteração proteica de uma isoleucina por uma metionina na posição 148 (HUANG; COHEN; HOBBS, 2011; CHEN; YEH, 2021), gerando a variante I148M, que está associada à diminuição na atividade lipolítica da enzima e, conseqüentemente, ocasiona aumento dos níveis de gordura

hepática e inflamação (HUANG; COHEN; HOBBS, 2011; SHAUNAK *et al.*, 2020; SILVA, 2021). Além disso, essa variante colabora com o processo fibrosante hepático, ao passo que também afeta as CEH (CHOUDHARY; DUSEJA, 2021).

Como foi citado acima, essas vias fisiopatológicas fazem parte de um delicado equilíbrio metabólico, o qual pode sofrer alterações, comprometendo a homeostase sistêmica. Além disso, estima-se que, entre os agentes etiológicos, a poluição ambiental pode, de maneira indireta, acarretar problemas hepáticos. As células do fígado estão constantemente expostas a concentrações significativas de produtos químicos, incluindo poluentes orgânicos persistentes (POPs) e agrotóxicos (ARMSTRONG; GUO, 2019). De acordo com estudos realizados por Al-Eryani *et al.* (2015), os fitossanitários compõem grande parte dos produtos químicos ambientais associados a alguma forma de doença hepática gordurosa, não deixando dúvidas de que o fígado gorduroso pode ser a resposta hepática patológica mais comum à exposição química. Nesse contexto, é necessária uma melhor avaliação dos efeitos dos fitossanitários na indução da esteatose hepática.

1.2 Brasil e os fitossanitários

1.2.1 Fitossanitários: inimigos silenciosos e agravantes das patologias hepáticas

A chamada “revolução verde” brasileira iniciada na década de 1960 foi o marco do consumo em larga escala de agrotóxicos, bem como da modernização no trabalho agrícola (MOREIRA *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2017). Essa inovação favoreceu a propulsão do setor agrícola em vários países, incluindo o Brasil; entretanto, o consumo generalizado, e muitas vezes irresponsável de agrotóxicos, tornou o país um dos maiores consumidores desses compostos do mundo (SOUZA *et al.*, 2017) tornando mais crescente a preocupação sobre os efeitos tóxicos potenciais desse produto para organismos não-alvo, incluindo humanos e para o meio ambiente – ar, solo ou água (LEE; CHOI, 2020; RICHARDSON *et al.*, 2019).

Os agrotóxicos, também denominados de fitossanitários, pesticidas ou praguicidas são caracterizados, de acordo com a OMS, como compostos químicos utilizados para reduzir ou eliminar pragas agrícolas, incluindo insetos, roedores, fungos e plantas indesejáveis (GAMA, 2018). Esses contaminantes ambientais são categorizados em várias classes de acordo com a natureza do organismo a ser combatido, mecanismos de ação em espécies-alvo e efeitos tóxicos em organismos não-alvo. As principais classes, de acordo com a natureza do organismo, são as de herbicidas (ervas daninhas), fungicidas (fungos), inseticidas (insetos), rodenticidas (roedores), entre tantos outros (COSTA *et al.*, 2008). Os herbicidas são os mais utilizados,

representando 48% do total de agrotóxicos, seguidos pelos inseticidas (25%) e pelos fungicidas (22%) (BELCHIOR *et al.*, 2014). Referindo-se aos efeitos tóxicos em organismos não-alvo, de acordo com o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA), tais produtos químicos podem ser classificados quanto à toxicidade aos seres vivos e à periculosidade à biodiversidade. A determinação da toxicidade dos agrotóxicos pode ser evidenciada de acordo com o tipo de intoxicação causada por eles, que variam de intoxicação aguda, intoxicação subaguda e intoxicação crônica (SILVA, 2018). Complementando, a classificação ecotoxicológica, que define o grau de periculosidade ambiental dos agrotóxicos, é categorizada de acordo com a Portaria nº 84/1996. Essa portaria classifica os produtos químicos com base nos parâmetros de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico (SILVA, 2018).

Mesmo frente à conscientização dos potenciais efeitos deletérios do uso de fitossanitários, nos últimos anos houve uma liberação de vultoso número desses compostos, o que vem favorecendo o aumento de sua utilização (RAMOS *et al.*, 2020). Particularmente, o país concedeu registro a 493 agrotóxicos no ano de 2020, sendo considerada a maior quantidade de agroquímicos registrada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em um único ano (MAPA, 2021). Com a liberação, estima-se que a pulverização de agrotóxicos no Brasil seja de aproximadamente 900 milhões de litros por ano, sendo as culturas de soja, milho e cana responsáveis por 76% deste total. De acordo com a literatura, esses compostos são grandes responsáveis por mortes e envenenamentos, e, embora uma parcela considerável dos mesmos seja proibida na União Europeia, estes continuam sendo utilizados no Brasil, mesmo frente às evidências científicas sobre os diversos prejuízos causados à saúde e meio ambiente (LARA *et al.*, 2019). O aumento periódico no consumo dos agrotóxicos, bem como o crescimento da indústria nacional neste segmento e a busca incessante pelo relaxamento na legislação, mostra o incentivo para o uso de tais produtos nas plantações brasileiras (FRIEDRICH *et al.*, 2018). O Projeto de Lei (PL) nº 6.299/2002, ou “Pacote de Veneno”, assim nomeado por organizações da sociedade civil, busca flexibilizar o sistema normativo regulatório para a utilização de agrotóxicos no Brasil, favorecendo o seu uso (GODOI; DOMINGOS, 2020).

De acordo com dados da OMS, são notificados mais de 25 milhões de casos de intoxicação por agrotóxicos no mundo, e mais de 20 mil mortes por ano (GAMEIRO, 2018). Diante desta problematização, a população brasileira se encontra rotineiramente exposta a uma grande quantidade de agrotóxicos potencialmente perigosos à saúde (SILVA, 2018). A contaminação por esses compostos pode acontecer, basicamente, por três formas: através da

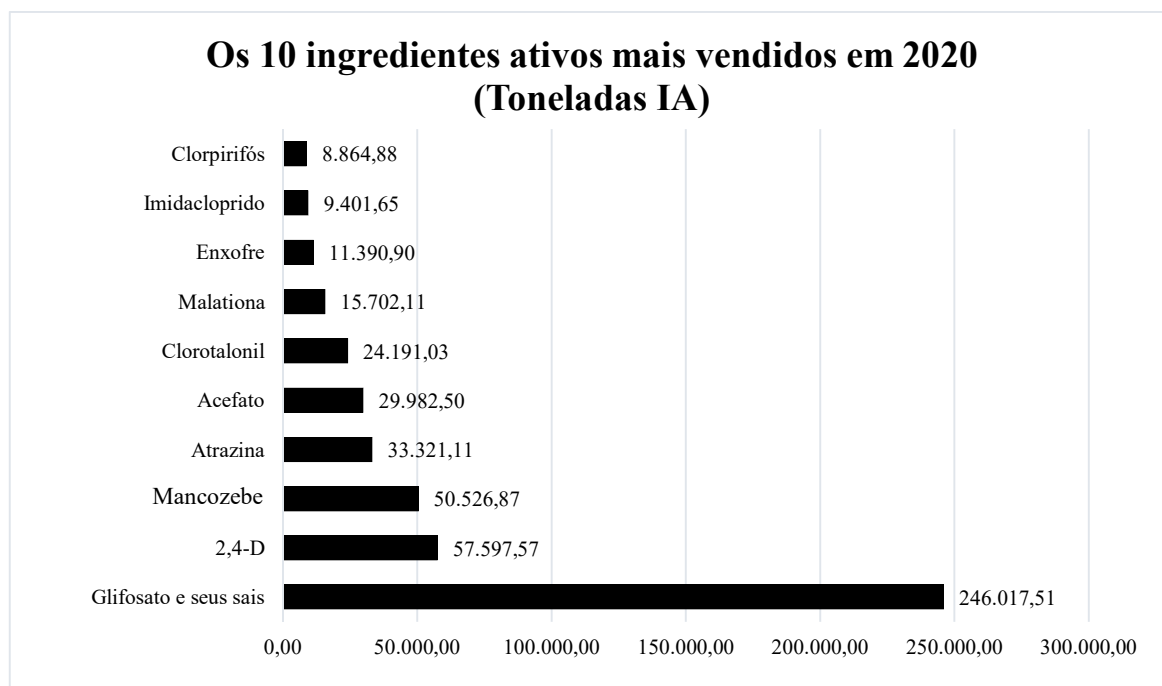
contaminação ocupacional (trabalhadores rurais e agricultores), da contaminação alimentar (ingestão de alimentos contaminados) e da contaminação ambiental (“acidentes” na produção ou aplicação de agrotóxicos) (DUTRA; SOUZA, 2017). Muitos estudos confirmam o desenvolvimento de doenças associadas a exposição a pesticidas, que, por alterarem o metabolismo, conduzem também ao aparecimento das doenças hepáticas correlatas ao fígado gordo (RIGOTTO; AGUIAR, 2017). De acordo com o INCA (Instituto Nacional de Câncer), os efeitos gerados pela exposição aos agrotóxicos podem ser agudos (de aparecimento rápido) ou crônicos (que aparecem após exposições repetidas a pequenas quantidades de agrotóxicos por um período prolongado). Os efeitos agudos se dão através da pele: irritação, ardência, desidratação, alergias; através da respiração: ardência do nariz e boca, tosse, coriza, dor no peito, dificuldade de respirar; e através da boca: irritação da boca e garganta, dor de estômago, náuseas, vômitos, diarreia. Os efeitos crônicos são de grande preocupação e variam de dificuldade para dormir, esquecimento, aborto, impotência, depressão, problemas respiratórios graves, anormalidade da produção de hormônios da tireoide, dos ovários e da próstata, incapacidade de gerar filhos, malformação e problemas no desenvolvimento intelectual e físico das crianças, alteração do funcionamento do fígado e dos rins, até o câncer (INCA, 2019; KIM *et al.*, 2017; LEE; CHOI, 2020; SILVA, 2018).

Em conjunto, esses estudos evidenciam a problemática da utilização irracional de pesticidas, sugerindo que uma campanha para o uso comedido dos mesmos seja feita.

1.2.2 Os fitossanitários mais consumidos no Brasil

Entre os principais fitossanitários vendidos no Brasil, o glifosato [N-(fosfonometil) glicina] se destaca como sendo o agente químico mais consumido no país no ano de 2020 (IBAMA, 2021). Esse fitossanitário representou mais de 50% do total de agroquímicos utilizados nas plantações brasileiras (486.996,11 toneladas), seguido pela utilização do defensivo agrícola ácido diclorofenoxiacético, também conhecido como 2,4-D (57 mil toneladas), e do maconzebe (50 mil toneladas) (Gráfico 1). Assim, considerando-se a toxicidade dos mesmos ao meio ambiente e aos animais, incluindo o homem, a seguir serão apresentadas as características gerais desses insumos agrícolas e outros comumente utilizados.

Gráfico 1 - Representação quantitativa dos insumos agrícolas (IA) ativos mais vendidos no Brasil no ano de 2020.



Fonte: Adaptado de IBAMA.

Herbicidas:

- **Glifosato**

Sintetizado pela empresa norte-americana Monsanto em 1974, o glifosato é um herbicida sistêmico não seletivo pertencente à família dos organofosforados. O aumento nas vendas desse ingrediente ativo foi observado a partir dos anos 90, principalmente devido ao seu baixo custo e amplo espectro de ação, possibilitando que este fosse considerado o pesticida mais utilizado em todo o mundo, inclusive no Brasil (BARBOSA *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2020; KLINGELHÖFER *et al.*, 2021).

A ação do glifosato baseia-se em sua capacidade de entrar em contato com tecidos e células vegetais impedindo a biossíntese de aminoácidos aromáticos essenciais por meio do bloqueio da 5-enolpiruvil-quiquimato-3-fosfato sintase (EPSP) presente na via metabólica do ácido chiquímico, encontrado nos cloroplastos (VICINI *et al.*, 2019; BARBOSA *et al.*, 2020; GONÇALVES *et al.*, 2020; KLINGELHÖFER *et al.*, 2021). Além disso, o glifosato também afeta a fotossíntese, os metabólitos secundários, o estado nutricional e o fluxo de carbono da planta e outros microrganismos que também possuem a EPSP (BARBOSA *et al.*, 2020; GONÇALVES *et al.*, 2020). Ainda, por não degradar facilmente na natureza, esse fitossanitário e seus metabólitos podem ser encontrados na água, no solo e até mesmo em alimentos, causando enormes prejuízos e desequilíbrio ambiental (GONÇALVES *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2020).

Em relação a saúde humana e animal, estudos apontam o potencial deletério do glifosato, uma vez que pode induzir danos genéticos e inibir a enzima do citocromo P450, atuando como um agente carcinogênico, além de reduzir a fertilidade de animais e quelar substâncias como ferro, cobre e cobalto, causando deficiências aos organismos alvo e não-alvo (NASCIMENTO *et al.*, 2019; KLINGELHÖFER *et al.*, 2021). Por tanto, o herbicida é utilizado com restrição e/ou é proibido na União Europeia, assim como outros 149 defensivos agrícolas livremente comercializados no Brasil (MOLICA; BARRETO; MORAES, 2021).

Considerando-se o fígado como uma glândula essencial do organismo por sua capacidade metabolizadora, desde os anos 80 estudos demonstram os efeitos adversos ocasionados pelo glifosato sobre o órgão (MESNAGE *et al.*, 2017; SOUDANI *et al.*, 2019; PORTIER, 2020). Entre os danos hepáticos, o estresse oxidativo, a inibição e/ou alteração do metabolismo energético mitocondrial (PORTIER, 2020), mecanismos exacerbados de necrose (MESNAGE *et al.*, 2017), bem como disfunção do metabolismo de lipídios (SOUDANI *et al.*, 2019), são apontados, os quais, gradativamente, colaboram com o acúmulo de gordura nos hepatócitos podendo desenvolver a DHGNA, o que pode ser um fator negativo para a qualidade de vida de toda população (MOLICA; BARRETO; MORAES, 2021).

- **2-4D**

Outro herbicida amplamente utilizado é 2,4-diclorofenoxiacético. Atualmente, em razão de sua eficiência, seletividade e valor acessível, é o segundo fitossanitário mais vendido no Brasil (MARCATO *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2019). Devido sua capacidade de imitar o fitormônio de crescimento vegetal auxina, induzindo a biossíntese do etileno que, por sua vez, estimula a senescência foliar e a produção do ácido abscísico (ABA), o qual dificulta a expansão e divisão celular, o 2,4-D é abundantemente utilizado como eliminador de plantas daninhas (MARCATO *et al.*, 2017; FREITAS *et al.*, 2019; ZUANAZZI *et al.*, 2020). A alta solubilidade do fitossanitário em água faz com que ele seja amplamente encontrado no meio ambiente. Além disso, dependendo das condições ambientais, o herbicida pode, inclusive, atingir lençóis freáticos e rios, favorecendo as contaminações ambientais e o surgimento de doenças na população (ZUANAZZI *et al.*, 2020).

No Brasil, infelizmente, o herbicida 2,4-D vem sendo usado indiscriminadamente e em combinação com glifosato para aumentar a eficiência no extermínio de ervas daninhas. Essa combinação de herbicidas atua negativamente na estrutura e funcionamento de microrganismos de água doce (LOZANO *et al.*, 2020) e nos humanos reforçam o aparecimento de disfunções metabólicas e outras anomalias (FREITAS *et al.*, 2019; ZUANAZZI *et al.*, 2020). Estudos

apontam que no fígado o 2,4-D promove aumento nos níveis de estresse oxidativo e da peroxidação lipídica, desregulando o metabolismo lipídico e o de carboidratos (MOLICA; BARRETO; MORAES, 2021).

Fungicidas:

- **Estrobilurinas**

Dentre os fungicidas utilizados para o controle de doenças nas áreas cultivadas, tem-se destacado os fungicidas do grupo das estrobilurinas (MAO *et al.*, 2020). Esse grupo apresenta eficiência no controle de várias doenças que atacam as plantações, e, embora haja diversos fitossanitários disponíveis no mercado, o seu uso tem aumentado nos últimos anos (SOARES *et al.*, 2011). Elas são extraídas do fungo *Strobilurus tenacellus* (PARREIRA *et al.*, 2009) e fazem parte do grupo dos inibidores de quinona oxidase (QoI), cuja toxicidade advém da inibição da atividade do complexo III mitocondrial e bloqueio da transferência de elétrons (CRUPKIN *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2020; PARREIRA *et al.*, 2009). Estudos anteriores sugerem que as estrobilurinas transferem elétrons entre os citocromos b e c1 para inibir a respiração mitocondrial de fungos alvo. Assim, este grupo de fungicidas podem inibir a síntese de ATP e, desta forma, causar estresse oxidativo do patógeno (ZHANG *et al.*, 2020).

Entre os fungicidas estrobilurínicos comercialmente disponíveis, piraclostrobina (PYR) e azoxistrobina (AZO) destacam-se. Desenvolvida pela BASF em 2000 (DOMINGUEZ *et al.*, 2021), a piraclostrobina (metil N-{2-[1-(4-clorofenil)-1H-pirazol-3-iloximetil]fenil}(N-metoxi)carbamato) (LUZ *et al.*, 2018) apresenta uma forte presença no setor agrícola internacional como substância ativa de vários produtos comerciais (Priaxor™, Comet®, Abacus® SC, Headline®, Vivarus®) recomendado para combater uma ampla gama de doenças fúngicas em milho, videira, frutas cítricas, batata, feijão, maçã, trigo, alface, entre outras. Embora a aplicação de PYR seja substancialmente benéfica (DOMINGUEZ *et al.*, 2021) e apresente uma meia-vida ambiental relativamente curta (1-4 dias) (LUZ *et al.*, 2018), o uso excessivo e/ou indevido implica um grande impacto negativo (DOMINGUEZ *et al.*, 2021). O fungicida azoxistrobina, quimicamente conhecido como metil (E)-2-{2[6-(2-cianofenoxi)pirimidin-4-iloxi]fenil}-3-metoxiacrilato, não se difere. Este éster metílico de ácido carboxílico tem a fórmula molecular de $C_{22}H_{17}N_3O_5$, massa molecular de $403,4\text{g/mol}^{-1}$, e meia-vida atmosférica estimada inferior a 2 dias (RODRIGUES *et al.*, 2013). Além disso, é usado como fungicida em mais de 400 sistemas de cultura diferentes e tem uma potente atividade contra os quatro principais grupos de fungos fitopatogênicos (NAASRI *et al.*, 2020).

- **Mancozebe**

Outro fungicida mundialmente utilizado é mancozebe. Devido seu baixo custo e eficácia contra aproximadamente 400 pragas diferentes (RUNKLE *et al.*, 2017; BIANCHI *et al.*, 2020) esse composto químico foi caracterizado como o terceiro mais utilizado no Brasil (IBAMA, 2020). A toxicidade desse fitossanitário, caracterizado como um fungicida de etileno bisditiocarbamato (EBCD) não seletivo com metabólitos etilenotiouréia (ETU), é dada pela ativação de radicais livre em detrimento do sistema de defesa antioxidante, por meio da inibição da atividade enzimática (ARANHA *et al.*, 2021). Além disso, a atuação de mancozebe ocorre através do bloqueio da formação de ergosterol, do citocromo C redutase ou a biossíntese da tubulina dos fungos, inviabilizando a propagação dos mesmos (MOLICA; BARRETO; MORAES, 2021). Estudos apontam que animais não-alvo, inclusive os humanos, são afetados pela toxicidade de curto prazo quando expostos a esse composto, principalmente ao ingerir alimentos ou água contaminados com mancozebe e/ou seus metabólitos (SESHOKA *et al.*, 2021). Dentre os efeitos tóxicos destacam-se os danos no DNA (BANO; MOHANTY, 2020), aumento na produção de ROS (BIANCHI *et al.*, 2020), alterações no equilíbrio dinâmico do tecido hepático (ARANHA *et al.*, 2021), além de aumento na proliferação desordenada de células, com o consequente aumento da incidência de tumores malignos mamários, pancreáticos, na glândula tireoide, entre outros (BIANCHI *et al.*, 2020; BANO; MOHANTY, 2020; ARANHA *et al.*, 2021).

Além dos fitossanitários acima apresentados, fipronil e bromacil, comumente utilizados no Brasil, destacam-se devido à atuação de seus princípios ativos. Considerando-se a ação deletéria ao fígado, merecem atenção especial.

1.2.3 Fipronil e bromacil: conhecendo os princípios ativos dos fitossanitários

O inseticida fipronil é um poderoso composto pertencente à família dos fenilpirazol desenvolvido por volta de 1987 pela companhia química e farmacêutica francesa Rhône-Poulenc (LIANG *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2020). Esse fitossanitário é amplamente utilizado mundialmente, representando 10% do consumo de fitossanitários (KIM *et al.*, 2019; SADARIA *et al.*, 2019; CHANG; TSAI, 2020). A rápida adoção desse composto químico no mercado foi devido à resistência que insetos-pragas haviam adquirido as outras classes de agroquímicos disponíveis (organofosforados, carbamatos e piretróides), além de suas vantagens físico-químicas, quando em comparação a outros agrotóxicos. Essas características viabilizaram a sua utilização sob diferentes formas de aplicação (LI *et al.*, 2020).

Considerando-se as características do fipronil, ele passou a ser utilizado também no controle de pragas urbanas (baratas e cupins), aplicação veterinária (pulgas e carrapatos) e na piscicultura. No entanto, o consumo generalizado vem contribuindo para o seu acúmulo nos diferentes ecossistemas por considerável intervalo de tempo (~1.000 dias em solos e sedimentos e até 1 ano em plantas lenhosas, por exemplo), e, conseqüentemente, diversos ambientes e organismos não-alvo são atingidos pela toxicidade do fitossanitário (LIANG *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2020).

Entre os organismos afetados pela utilização do fipronil no ambiente temos os insetos polinizadores, nesses animais o fipronil bloqueia os canais de cloro presentes no receptor GABA (ácido γ -aminobutírico), causando seu acúmulo nas junções sinápticas e a interrupção da transmissão neural do organismo, levando a uma hiperexcitação nervosa e a morte (LIANG *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2020). No caso dos vertebrados, os efeitos imediatos do contato com os fitossanitários são menos evidentes devido à reduzida afinidade aos receptores neuronais desses animais (ZHANG *et al.*, 2018), o que favorece ainda mais a sua utilização em larga escala. Entretanto, para vertebrados, incluindo o homem, a toxicidade de metabólitos do fipronil como a fipronil-sulfona é 20 vezes maior do que a encontrada nos insetos, com vários casos relatados de intoxicação de animais e humanos pelo metabólito (MEDEIROS *et al.*, 2015, CARRÃO *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2020).

A fipronil-sulfona é o resultado da biotransformação hepática do fipronil por meio da enzima citocromo P450 que ocorre em diversos grupos de animais, como cães, ratos, gado e humanos (ROQUES *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2015). A inibição do citocromo P450 afeta o metabolismo hepático e, conseqüentemente, inibe o metabolismo energético mitocondrial. Alguns autores demonstraram que o fipronil e seus metabólitos provocam mecanismos de apoptose, onde células do fígado sujeitas a baixas concentrações de fipronil ativam as enzimas caspase 3 e 7, ou ainda que a exposição crônica de mamíferos por via oral, resulta no aumento do peso do fígado e tamanho dos hepatócitos. Além disso, distúrbios na tireoide são frequentemente associados pela intoxicação causada pelo fipronil (ROQUES *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2015).

Bromacil (5-bromyo-3-s-butil-6-metiluracil), por outro lado, é um herbicida residual da família uracil, popularmente utilizado para o controle não seletivo de ervas daninhas de uma ampla gama de gramíneas anuais e perenes, ervas daninhas de folhas largas, certas espécies lenhosas, bem como para o controle seletivo de plantas daninhas em pomares de abacaxi e frutas cítricas (WILLIAMS *et al.*, 2014; BRENES-GUILLÉN *et al.*, 2019; JAMES *et al.*, 2021). Está

disponível sob nomes comerciais como Hyvar e Krovar (WILLIAMS *et al.*, 2014) e é popular devido à sua solubilidade e persistência (JAMES *et al.*, 2021).

Aproximadamente 100 mil libras de bromacil foram usados em culturas cítricas da Califórnia de 1992 a 2001. Os impactos econômicos positivos de seu uso generalizado levaram a muitos anos de exposição ambiental contínua a esse composto (WILLIAMS *et al.*, 2014). Como resultado desse uso generalizado, o bromacil é um contaminante ambiental potencialmente perigoso. É considerado relativamente menos biodegradável do que muitos outros herbicidas, pode persistir no solo por pelo menos 2 anos em quantidades efetivas (CHAUDHRY; CORTEZ, 1988), é altamente móvel (WILLIAMS *et al.*, 2014) e, por ser um composto solúvel em água (815 mg/L), mostrou um potencial de lixiviação para fora da zona de crescimento da planta (JAMES *et al.*, 2021) através do solo em direção às águas subterrâneas, particularmente durante períodos de chuvas fortes imediatamente após sua aplicação no campo (CHAUDHRY; CORTEZ, 1988). Além disso, alguns estudos relatam a interferência do composto na fotossíntese do fotossistema II das plantas. Bromacil concorre com plastoquinona para se ligar ao sítio Q_B no fotossistema II, inibindo assim a transferência de elétrons do sítio Q_A para o sítio Q_B. Consequentemente, além de seus organismos-alvo, esse herbicida pode ter um efeito prejudicial em ecossistemas inteiros, tornando-se um sério problema (WILLIAMS *et al.*, 2014; BRENES-GUILLÉN *et al.*, 2019).

Os altos níveis de bromacil em sistemas naturais têm consequências claras para a saúde humana e ambiental. A inibição do crescimento EC₅₀ do bromacil para várias espécies aquáticas de algas, plantas e animais invertebrados varia de 5 a 500 µg/L. Ainda, o bromacil é conhecido por inibir o crescimento e a absorção de nutrientes de linhagens celulares humanas, ser relativamente genotóxico e ter potencial carcinogênico. Assim, o bromacil é classificado como um possível cancerígeno pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA. A mesma agência estabeleceu limites de consumo diário de 90 µg/mL, 0,1 mg/kg/dia e 5000 µg/L para aconselhamento de saúde vitalício, dose de referência e nível equivalente de água potável, respectivamente. Por isso, é importante monitorar a exposição humana e ambiental ao bromacil (WILLIAMS *et al.*, 2014).

Consequentemente, devido ao alto consumo dos fitossanitários e considerando-se seus efeitos tóxicos, alternativas devem ser buscadas para melhor se monitorar a atuação desses compostos nos organismos não-alvo.

1.3 Modelo Alternativo: culturas celulares 3D

Culturas de células são ferramentas biotecnológicas importantes e necessárias que, nas últimas décadas, vêm auxiliando nas inovações tecnológicas e na pesquisa científicas, favorecendo análises bioquímicas, celulares e moleculares de processos patológicos e toxicológicos, bem como o desenvolvimento de novas drogas com aplicação farmacológica. Essa tecnologia se originou no final do século XIX, mas tomou grande propulsão após 2º Guerra Mundial com o estabelecimento da primeira linhagem celular (células HeLa) (ALHAQUE; THEMIS; RASHIDI, 2018; HABANJAR *et al.*, 2021). Desde então, o cultivo de células em formato bidimensional (2D) permaneceu como a metodologia predominante de crescimento e expansão celular *in vitro*, viabilizando muitos estudos. No entanto, as plataformas bidimensionais não recapitulam efetivamente os requisitos espaciais que são essenciais para a organização e as interações celulares que ocorrem *in vivo* (ALHAQUE; THEMIS; RASHIDI, 2018). Para se superar tais limitações da plataforma bidimensional, desenvolveram-se novas abordagens para recriar um ambiente fisiologicamente mais relevante na forma de cultura de células tridimensionais (3D) (ALHAQUE; THEMIS; RASHIDI, 2018).

O primeiro modelo de cultura de células 3D foi fornecido em 1992 por Petersen e Bissell, que descreveram estruturas organotípicas tridimensionais para imitar estruturas mamárias em casos cancerosos e não cancerosos (HABANJAR *et al.*, 2021). Como resultado, observou-se que as células cultivadas como modelos 3D exibem características que estão mais próximas das complexas condições *in vivo*, e, portanto, cultivá-las neste modelo as induz a se comportar de maneira mais próxima às condições naturais (RAVI *et al.*, 2014; JENSEN; TENG, 2020). Aliado a isso, a necessidade de modelos alternativos à experimentação animal, reforçaram a pesquisa e o desenvolvimento dos modelos de investigação 3D como forte aliada nos estudos modernos correlatos a análises de genotoxicidade e citotoxicidade de variados compostos, e para descoberta de drogas/agentes anticâncer (RAVI *et al.*, 2014).

Para essa tecnologia, entretanto, o desenvolvimento de arcabouços (*scaffolds*) e matrizes que sustentem o crescimento celular em culturas 3D é o grande desafio. Técnicas baseadas em *scaffolds* 3D, como suporte às matrizes elaboradas baseando-se em hidrogéis, material polimérico duro, fibra de vidro hidrofílica, organoides, e mesmo componentes de matriz extra celular (MEC), fornecem uma série de vantagens. Os *scaffolds* 3D são gerados usando-se vários polímeros naturais (colágeno, gelatina, elastina, fibroína de seda, alginato, quitosana, quitina, fibrina, fibrinogênio, etc.) e sintéticos (formas modificadas de ácido hialurônico e polietilenoglicol, hidrogéis, policaprolactona, etc.) (HABANJAR *et al.*, 2021). Desde métodos simples de sobreposição de líquidos, até co-culturas complexas, várias matrizes são utilizadas

(RAVI *et al.*, 2014). Entretanto, um grande desafio na utilização de culturas 3D é o preço de tais matrizes e seus arcabouços.

Nos últimos 10 anos a produção de sistemas de cultura tridimensionais baseados em organoides de múltiplos órgãos recebeu atenção considerável. O termo 'organoide' é definido como estruturas tridimensionais auto-organizadas que são cultivadas *in vitro* enquanto embebidas em uma matriz. Essas estruturas tridimensionais se assemelham muito ao seu órgão de origem; podem ser mono ou multicelulares (homo ou heterotípicos) e apresentam tamanho variável (50 a 150 μm) (HABANJAR *et al.*, 2021). Os organoides podem ser derivados de várias fontes celulares, como tecido primário, linhagens celulares, células-tronco embrionárias (ESCs), células-tronco adultas (ACs) e células-tronco pluripotentes (PSCs) (ALHAQUE; THEMIS; RASHIDI, 2018; CORRÒ; NOVELLASDEMUNT; LI, 2020). Historicamente, Holt Freter foi o primeiro a usar esferóides como modelo morfogênico em sua investigação do comportamento da pele durante o desenvolvimento em 1944. Então este modo foi considerado uma ferramenta poderosa em pesquisa e aplicações clínicas e é o melhor modelo celular *in vitro* para triagem de alto rendimento (HABANJAR *et al.*, 2021).

Diferentemente dos sistemas convencionais de cultura 2D, a abordagem 3D diminui o intervalo entre o sistema de cultura de células e a fisiologia celular (RAVI *et al.*, 2014). Os *scaffolds* porosos das culturas tridimensionais fornecem espaço para adesão e proliferação de células, trocas gasosas, uma ótima relação superfície/volume permitindo a migração, maior interação célula-célula e célula-matriz que são importantes para a diferenciação, e também a taxa de degradação que coincide com a taxa de formação do tecido (ALHAQUE; THEMIS; RASHIDI, 2018). Além disso, quando as células podem crescer na membrana basal como géis, há uma integração mútua das vias de sinalização. Ainda, as culturas 3D de tipos celulares homogêneos não apenas fornecem informações sobre a arquitetura de tecidos e pistas bioquímicas sobre o funcionamento das células, mas também nos dão uma importante vantagem tecnológica para estabelecer co-culturas de linhagens celulares heterogêneas. Isso resultou em um meio de entender melhor a complexidade prevalecente em um organismo completo (RAVI *et al.*, 2014; JENSEN; TENG, 2020).

Além disso, é comprovado que as culturas de células 3D mostraram diferenças na eficácia da previsão de hepatotoxicidade induzida por drogas. De acordo com Ravi *et al.* (2014), culturas 3D de hepatócitos ou células HepG2 foram menos suscetíveis às drogas anticancerígenas do que suas contrapartes 2D, provando sua melhor confiabilidade para testes de toxicidade. Portanto, devido suas qualidades, modelos alternativos de baixo custo precisam ser estabelecidos e validados para que as vantagens desse modelo sejam melhor exploradas.

1.4 Justificativa

Atualmente, as doenças hepáticas são consideradas um problema de saúde pública mundial, e a utilização exacerbada de fitossanitários pode ser apontada como um agente etiológico de tais patologias. Considerando-se as disfunções metabólicas hepáticas, a esteatose hepática não alcoólica, ou simplesmente esteatose, pode progredir a quadros de fibrose e/ou hepatocarcinoma, cujos aspectos moleculares não se encontram completamente elucidados e ainda são escassas as opções terapêuticas. Nesse contexto, novas abordagens na elucidação dos mecanismos de desenvolvimento dessas patologias são necessárias para se detalhar rotas mecanísticas alteradas no equilíbrio celular e sistêmico. Assim, utilizando-se da metodologia de cultivo celular e para superar as limitações do cultivo bidimensional, o estabelecimento de um modelo tridimensional de cultivo de células de baixo custo viabilizará análises toxicológicas dos efeitos dos contaminantes ambientais no metabolismo de células hepáticas, sendo uma estratégia que vai ao encontro da necessidade de métodos alternativos ao uso de animais nas pesquisas contemporâneas.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Estabelecer um modelo celular 3D de baixo custo utilizando-se co-culturas de células hepáticas para análises toxicológicas da atuação de fitossanitários no metabolismo pró-esteatótico.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar as condições de co-cultivo de células hepáticas, com a utilização de diferentes substratos de adesão para o cultivo 3D e a obtenção de organóides;
- Padronizar condições simuladoras de ambiente pró-esteatótico nas células em culturas 3D, comparando-se com o cultivo 2D, previamente padronizado no laboratório;
- Determinar as concentrações de trabalho de fitossanitários em culturas 2D e nas culturas celulares 3D, utilizando-se análises de citotoxicidade e de integridade celular;
- Acompanhar os efeitos dos fitossanitários nas co-culturas 2D e 3D, pela investigação de elementos correlatos ao metabolismo de lipídeos e ao estresse oxidativo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular e experimentação 3D (padronização do cultivo)

Células das linhagens de hepatócitos HepG2 (ATCC® HB-8065™) derivadas de hepatocarcinoma humano e de células estreladas hepáticas (CEH), LX-2 (XU et al., 2005) cedidas pelo professor Scott L. Friedman, NY, EUA, foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) contendo 10% de soro fetal bovino (SBF) e antibióticos. As culturas foram mantidas à temperatura de 37°C e incubadas em estufa com atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂). Para os ensaios que requeriam co-cultivo, as células foram semeadas na proporção de 7 hepátocitos: 3 CEH em culturas 2D ou sob diferentes combinações de substratos (agarose ultrapura, gelatina, alginato, colágeno tipo II e hidrogel, testados isoladamente e/ou em combinação) para o estabelecimento de culturas 3D.

Para se avaliar o processo de formação de organoides nas culturas tridimensionais as diferentes combinações de substrato foram preparadas adicionando-se solução salina tamponada com fosfato (PBS), contendo 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ e 2 mM KH₂PO₄. Para a formação dos hidrogéis foram utilizados gelatina, agarose, colágeno tipo II, alginato e ágar (a composição dos mesmos é apresentada na Tabela 1, em resultados e discussão). Todos os substratos foram esterilizados em autoclave (120°C por 20min), e na sequência foram depositados sobre placas de 6 ou 24 poços para realização das análises. Posteriormente, após polimerização dos substratos nas placas, as células foram semeadas de acordo com condições estabelecidas em nosso laboratório. Nas placas de 6 poços foram adicionados 1 ml dos substratos e 3×10^5 de HepG2 ou $1,5 \times 10^5$ de LX-2 para as culturas individuais, ou $2,1 \times 10^5$ de células HepG2 e $0,9 \times 10^5$ de células LX-2 para as co-culturas. Nas placas de 24 poços foram adicionadas 300 µl dos substratos e 3×10^4 células HepG2 ou a mesma quantidade de células LX-2, isoladamente, e para as co-culturas foram adicionadas $2,45 \times 10^4$ células HepG2 e $1,05 \times 10^4$ de células LX-2. Todas as culturas foram incubadas em estufa de CO₂ à 37°C por diferentes intervalos de tempo.

3.2 Preparo e diluições dos fitossanitários

Os fitossanitários utilizados no estudo foram adquiridos da empresa Merse e diluídos em água ou em DMSO nas concentrações estoque de 1 µM ou 10 µM para os fitossanitários

piraclostrobina e mancozebe, 183 μ M para o fipronil, e 1 nM ou 10 nM para o bromacil, e subsequentemente adicionados em meio de cultura nas concentrações avaliadas.

3.3 Análises da sobrevivência e integridade celular

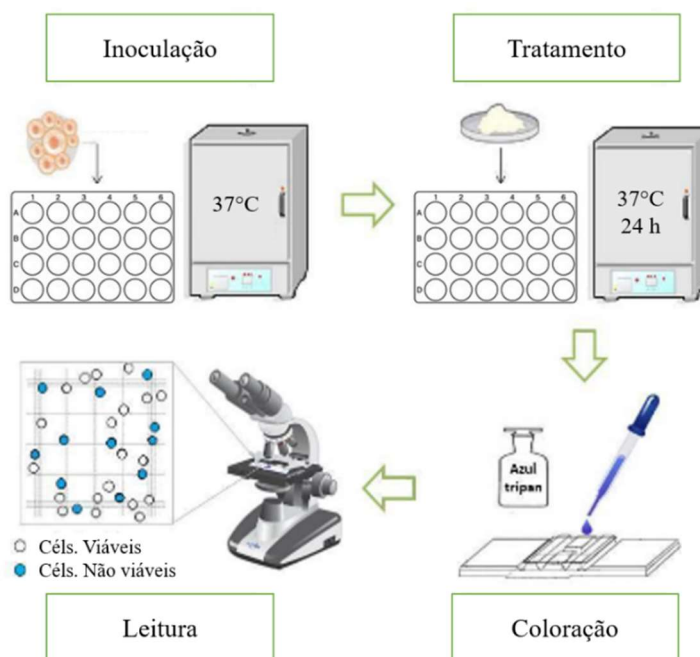
3.2.1 Análises de microscopia de campo claro

As análises iniciais de sobrevivência das células frente a incubação dos substratos ocorreram utilizando-se o microscópio invertido de campo claro, o qual possibilitou somente a observação do fenótipo/ aparência celular e suposição da condição em que a célula se encontrava. Análises de maior confiabilidade utilizando-se azul de tripano ocorreram posteriormente, após a escolha dos substratos a serem utilizados.

3.2.2 Azul de Tripano

Para se verificar a viabilidade das células nas diferentes condições e tempo de substrato, o corante azul de tripano foi utilizado. Para isso, as células foram inoculadas individualmente e/ou em co-cultura em placas de 24 poços, e crescidas em estufa à 37°C. Análises em intervalos de tempos regulares foram realizadas. Após, os tratamentos (fitossanitários e AGs) foram acrescentados nas culturas 3D. 24h depois, 15 μ L de corante foi adicionado às culturas crescidas e, posteriormente, as células foram contadas através da Câmara de Neubauer sob microscópio óptico (Figura 3). Para a contagem das células utiliza-se o princípio de que células viáveis excluem o corante, enquanto células não viáveis o retém. Controles positivos e negativos estiveram sempre presentes.

Figura 3 - Método de exclusão azul de tripano



Fonte: Adaptado de Almeida (2016).

3.2.3 MTT

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio) é conhecido pela capacidade de mensurar a viabilidade celular perante a incubação de células e substâncias potencialmente tóxicas. Este ensaio colorimétrico, além de rápido e barato, detecta células vivas a partir da formação de grânulos de formazan de cor azul nas cristas mitocondriais das células sobreviventes. Esse processo ocorre quando as enzimas redutase mitocondriais estão ativas e, logo, esta conversão está diretamente relacionada ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

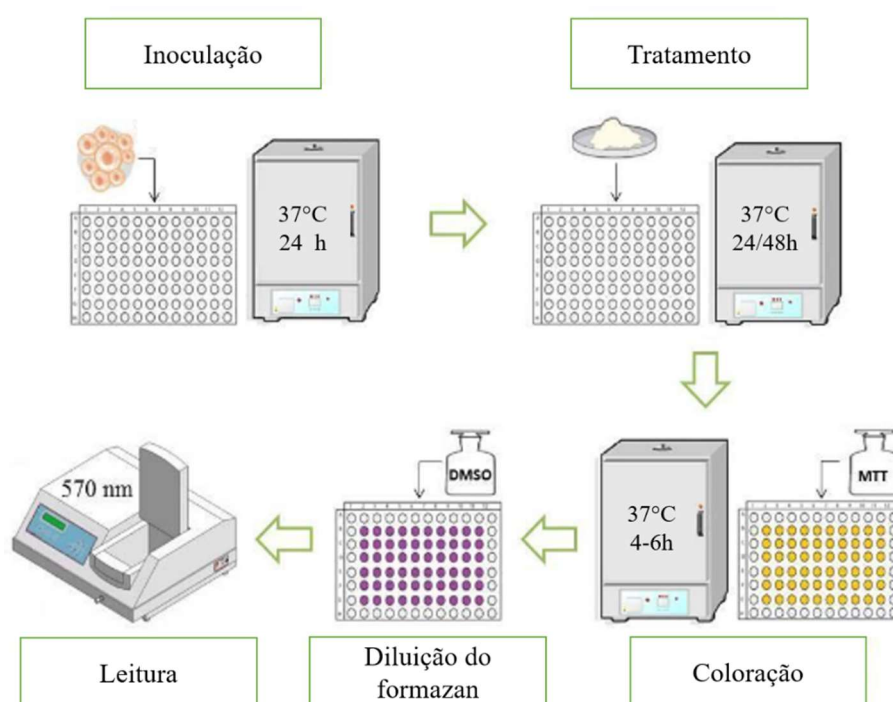
Para as análises dos efeitos dos pesticidas no modelo 3D estabelecido, ensaios de viabilidade celular (MTT) foram realizados utilizando-se o reagente Thiarolyl Blue Tetrazolium Bromide (Merse), e adaptando-se o protocolo descrito em Mosmann (1983). Diferentes fitossanitários foram avaliados em modelo 2D (piraclostrobina, mancozebe, fipronil e bromacil) para se avaliar a toxicidade dos mesmos em condições regulares de cultivo celular. As concentrações de trabalho norteadoras do estudo para os fitossanitários a serem investigados foram aquelas autorizadas pela agência regulamentadora ANVISA e permitidas para consumo diário (IDA).

Para os ensaios, e considerando-se o tempo de duplicação celular das culturas isoladamente ou em co-cultivo, células foram adicionadas em placas de 96 poços. Para essas análises, em cada um dos poços das microplacas foram cultivadas 5×10^3 células LX-2 ou 10

$\times 10^3$ células HepG2 isoladamente, ou 6×10^3 células combinadas em co-cultura ($4,2 \times 10^3$ HepG2 e $1,8 \times 10^3$ CEH, na proporção de 7 hepatócitos: 3 CEH). Após 24h de cultivo inicial, foram adicionadas diferentes concentrações dos fitossanitários às culturas, que foram novamente incubadas a 37°C a 5% de CO_2 por um intervalo subsequente de mais 24h e/ ou 48h.

Após os intervalos de incubação com os fitossanitários, o reagente Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi adicionado em cada um dos poços e incubado durante 4h - 6h em temperatura de 37°C a 5% de CO_2 . Em seguida, para viabilizar a leitura, foi adicionado DMSO para a solubilização dos cristais de formazan. Os ensaios foram realizados em tri ou quadruplicatas e os resultados foram avaliados em leitor ELISA de microplaca com absorvância de $\lambda = 570\text{ nm}$ (Figura 4).

Figura 4 - Esquema representativo das análises de viabilidade/ citotoxicidade do ensaio colorimétrico do MTT



Fonte: Adaptado de Almeida (2016).

3.3 Indução de quadro simulador de condições pró-esteatóticas e mensuração de triglicerídeos e glicose

Para simulação de quadro pró-esteatótico protocolo previamente padronizado em nosso laboratório utilizando-se co-cultivo celular 2D (BARBOSA, 2020; RAMOS, 2020) foi adotado

e adaptado às culturas 3D. Para essa simulação, 400 μ M de mistura de AG (ácido oléico e ácido palmítico) na proporção de 2:1 foram adicionados às co-culturas e essas incubadas por um intervalo de 24h. Para as análises da eficácia do modelo 3D em construção, análises paralelas foram realizadas com culturas 2D, consideradas controle experimental. Para a análise da eficiência do modelo alternativo 3D, os efeitos das induções pró-esteatóticas foram avaliados pela mensuração dos níveis de TG e glicose. Essas culturas foram utilizadas como nosso controle experimental positivo da indução de alterações lipídicas, frente aos tratamentos com os pesticidas.

Para se analisar o perfil lipídico na linhagem celular e avaliar fisiologicamente a função dos fitossanitários no processo pró-esteatótico, células em culturas 3D e 2D foram semeadas em co-cultura ($1,54 \times 10^5$ de HepG2 + $0,66 \times 10^5$ de LX-2) em placas de 6 poços sob condições previamente definidas. Após 48h para o crescimento dos esferoides, as células foram incubadas com a mistura de AG ou fitossanitários por mais 24h, e então coletadas para análise. Para tal, as células foram ressuspensas em tampão fosfato e centrifugadas à 3000 rpm por um intervalo de 4 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspendido em 100 μ L de PBS contendo 0,68 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e então colocado em tubos de 1,5 mL previamente tratados com NaOH 2% para remoção de contaminantes derivados de AGs exógenos ao ensaio. As mensurações de triacilgliceróis e glicose foram realizadas com a utilização dos reagentes comerciais Triglicérides Liquiform (Labtest) e Glicose Liquiform (Labtest), respectivamente, seguindo as recomendações dos fabricantes. As mensurações dos resultados foram realizadas em espectrofotômetro Thermo Biomate 3 UV-Vis (*Thermo Fisher Scientific*) com absorvância de $\lambda = 505$ nm. Controles positivos e negativos se fizeram presentes ao longo de toda a experimentação.

3.4 Análises estatísticas

Todos os ensaios foram realizados em no mínimo três repetições. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad, versão 5.0 (Prism Inc.). Foi realizado o teste ANOVA, seguido do teste de Dunnett's ou Tuckey e o valor $p < 0,05$ (*) para significância estatística.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando-se os objetivos do presente estudo, várias etapas de padronização foram realizadas. Na sequência são apresentados e discutidos os resultados obtidos.

4.1 Padronização do cultivo celular 3D

A padronização do modelo alternativo foi efetuada sob diferentes combinações de substratos (gelatina e agarose; gelatina, agarose e colágeno; gelatina e colágeno; colágeno; alginato e agarose; e, alginato e ágar) para a padronização do melhor protocolo alternativo, com o tempo e a combinação perfeita. Diante do proposto, analisou-se o comportamento das linhagens celulares HepG2 e LX-2 de maneira individual e, posteriormente, em co-cultura. Os ensaios foram realizados com cada uma das linhagens isoladas para se verificar a viabilidade das mesmas frente aos diferentes substratos e aos diferentes compostos químicos utilizados antes de adicioná-las às co-culturas. Essas análises foram críticas para se assegurar a confiabilidade do modelo 3D estabelecido. As células HepG2 foram utilizadas nas análises iniciais devido à sua alta capacidade metabolizadora. Estudos preliminares em nosso laboratório (RAMOS, 2020; PORTO, 2020) apontam que o co-cultivo de hepatócitos HepG2 com células LX-2 potencializam as análises de processos pró-esteatóticos aproximando-se muito dos estudos observados *in vivo*, portanto análises com misturas das células também foram realizadas. Os resultados são apresentados na sequência.

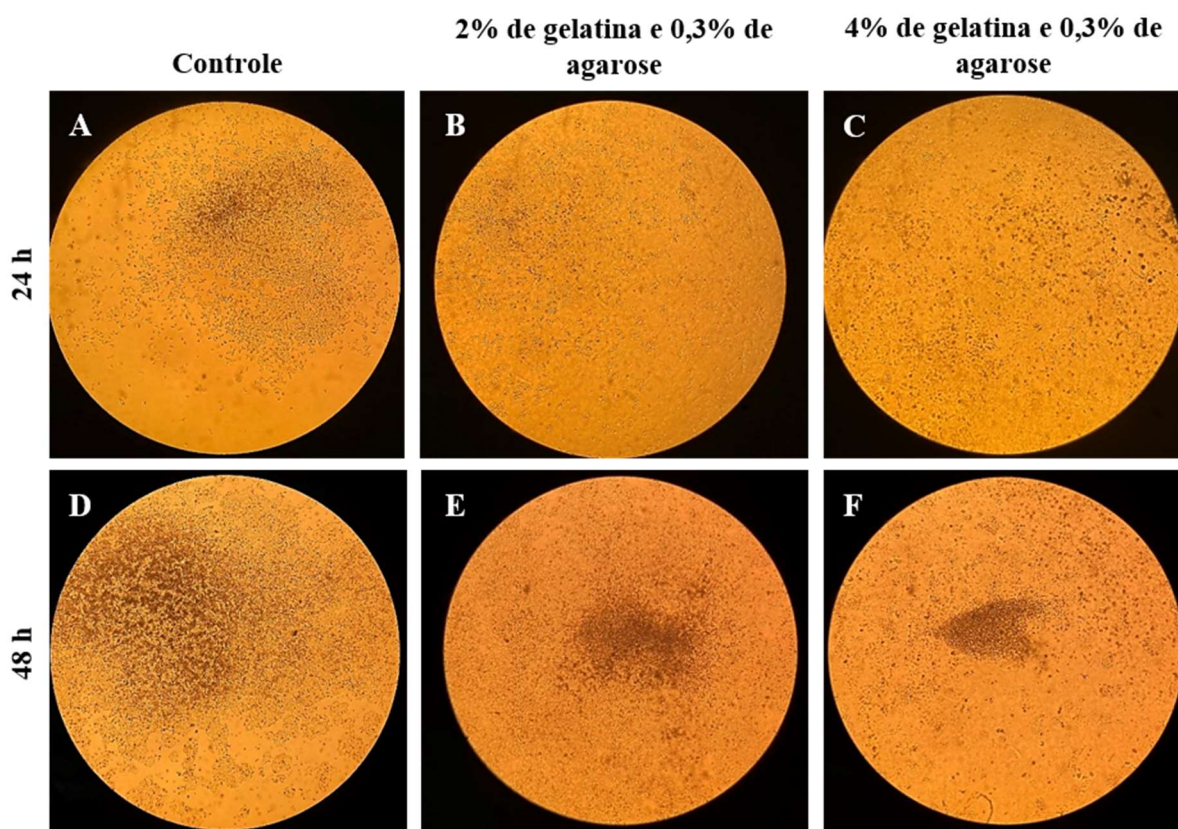
- **Gelatina e agarose**

O polímero de gelatina é um material biodegradável e biocompatível que consiste em 85-92% de proteínas, sais minerais e água. É um derivado molecular do colágeno tipo I e possui uma ampla gama de aplicações alimentícias, cosméticas e farmacêuticas. Além do baixo custo, o uso da gelatina pode servir como substituto das proteínas da MEC para fins de biomateriais (BELLO *et al.*, 2020). A agarose, por sua vez, é um polímero que possui alta resistência mecânica e forte estabilidade (JIAO *et al.*, 2022). Considerando-se tais características, misturas desses polímeros foram realizadas na primeira tentativa de se padronizar o modelo tridimensional.

Foram realizados dois ensaios distintos para se padronizar as concentrações de gelatina e agarose, respectivamente. O primeiro ensaio, realizado com células HepG2 em placa de 24 poços, foi norteador na escolha da quantidade de gelatina a ser utilizada. Ele consistiu em: (A) solução salina (PBS) contendo 2% de gelatina e 0,3% agarose; e (B) PBS contendo 4% de gelatina e 0,3% agarose. As soluções foram autoclavadas e, após sua polimerização na placa, as células foram adicionadas.

Após 24h e 48h (Figura 5) de cultivo das células HepG2, observou-se menores taxas de proliferação e maior taxa de mortes das células (caracterizadas por seu escurecimento visível sob microscópio de campo claro) no substrato contendo 4% de gelatina. Resultados similares foram encontrados no estudo realizado por Benning *et al.* (2017) em células epiteliais cultivadas em 5, 10 e 15% de gelatina. Os resultados demonstraram que, assim como no presente estudo, quanto menor a concentração percentual de gelatina, maior a proliferação celular. Portanto, para as próximas análises, somente 2% de gelatina foi utilizado.

Figura 5 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B e C) 24h e (D, E e F) 48h da incubação de células HepG2 a substratos contendo (B e E) 2% de gelatina e 0,3% de agarose e (C e F) 4% de gelatina e 0,3% de agarose. (A e D) controles do experimento. Ampliação de 40x.



Fonte: Arquivo pessoal.

Na sequência, outros ensaios, também realizados com células HepG2, possibilitaram selecionar as melhores concentrações de agarose: (A) PBS contendo 2% de gelatina e 0,5% de agarose; (B) PBS contendo 2% de gelatina e 0,6% de agarose; (C) PBS contendo 2% de gelatina e 0,8% de agarose; e (D) PBS contendo 2% de gelatina e 1% de agarose. A metodologia adotada é a mesma do ensaio anterior: autoclavagem dos substratos, inclusão destes às placas de cultura, espera de sua polimerização e posterior inclusão das células.

Os resultados demonstraram um melhor crescimento e desenvolvimento das células, observados sob microscópio invertido de campo claro, nos substratos que continham 0,6% e 0,8% de agarose. Contudo, os esferoides não foram formados assim como no estudo de Benning *et al.* (2017). Em Benning *et al.* (2017), a incorporação de glutaraldeído (um composto citotóxico) impossibilitou a formação dos esferoides nos hidrogéis de gelatina; em nossa pesquisa este composto não foi utilizado, portanto a não formação de esferoides se deve a outro motivo, sugerimos que as concentrações dos compostos utilizados acarretaram na toxicidade. Assim, as análises continuaram.

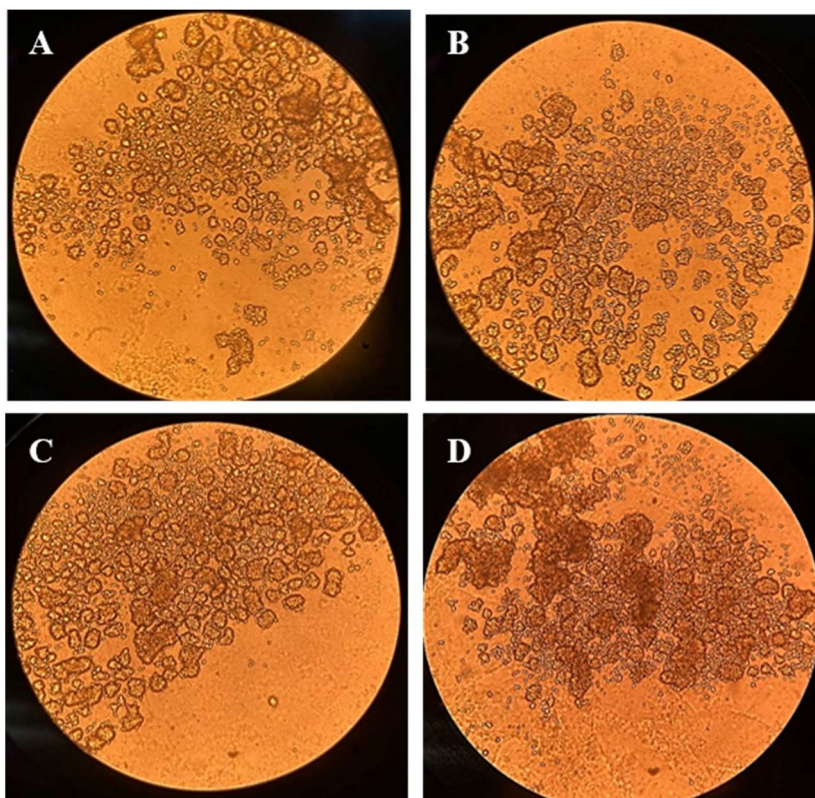
- **Gelatina, agarose e colágeno tipo II**

De acordo com Bello *et al.* (2020), as proteínas da MEC, que são geralmente produzidas e secretadas por fibroblastos e outros tipos de células como as células epiteliais, desempenham papéis significativos no crescimento e desenvolvimento celular *in vivo*. Vários tipos de colágeno (a proteína MEC mais abundante), por exemplo, fornecem enorme resistência à tração e integridade estrutural nos tecidos conjuntivos, tendões e pele. Portanto, quando utilizado como biomaterial *in vitro*, o colágeno não só proporciona integridade estrutural, mas também regula a capacidade de proliferação e diferenciação das células.

Devido às características correlatas entre o colágeno e gelatina, supomos que a mistura de ambos pudesse complementar as características físico-químicas e funcionais do substrato, favorecendo a formação de esferoides. Por isso, na nova análise foram preparados dois ensaios distintos para se averiguar a atuação do colágeno nas células 3D. O primeiro ensaio apresentou 4 diferentes soluções com as seguintes concentrações de agarose, gelatina, colágeno tipo II e PBS: (A) PBS contendo 2% de gelatina, 0,6% de agarose e 1% de colágeno; (B) PBS contendo 2% de gelatina e 0,6% de agarose; (C) PBS contendo 2% de gelatina, 0,8% de agarose e 1% de colágeno; e (D) PBS contendo 2% de gelatina e 0,8% de agarose. As soluções foram autoclavadas, depositadas em placas de 24 poços para formação de uma malha 3D e na sequência as células HepG2 foram semeadas.

Para se avaliar a formação dos esferoides, as culturas de células HepG2 foram acompanhadas por 48h. A Figura 6 apresenta os resultados do experimento e evidenciam que as malhas montadas com as soluções contendo 0,6% de agarose ficaram visualmente melhores, em termos de esferoides crescidos (Figuras 6 A e 6 B), assim como aquelas que continham colágeno em sua composição (Figuras 6 A e 6 C). Os resultados vão de encontro ao encontrado em Benning *et al.* (2017), confirmando que a inclusão de colágeno torna o substrato capaz de suportar o brotamento de esferoides.

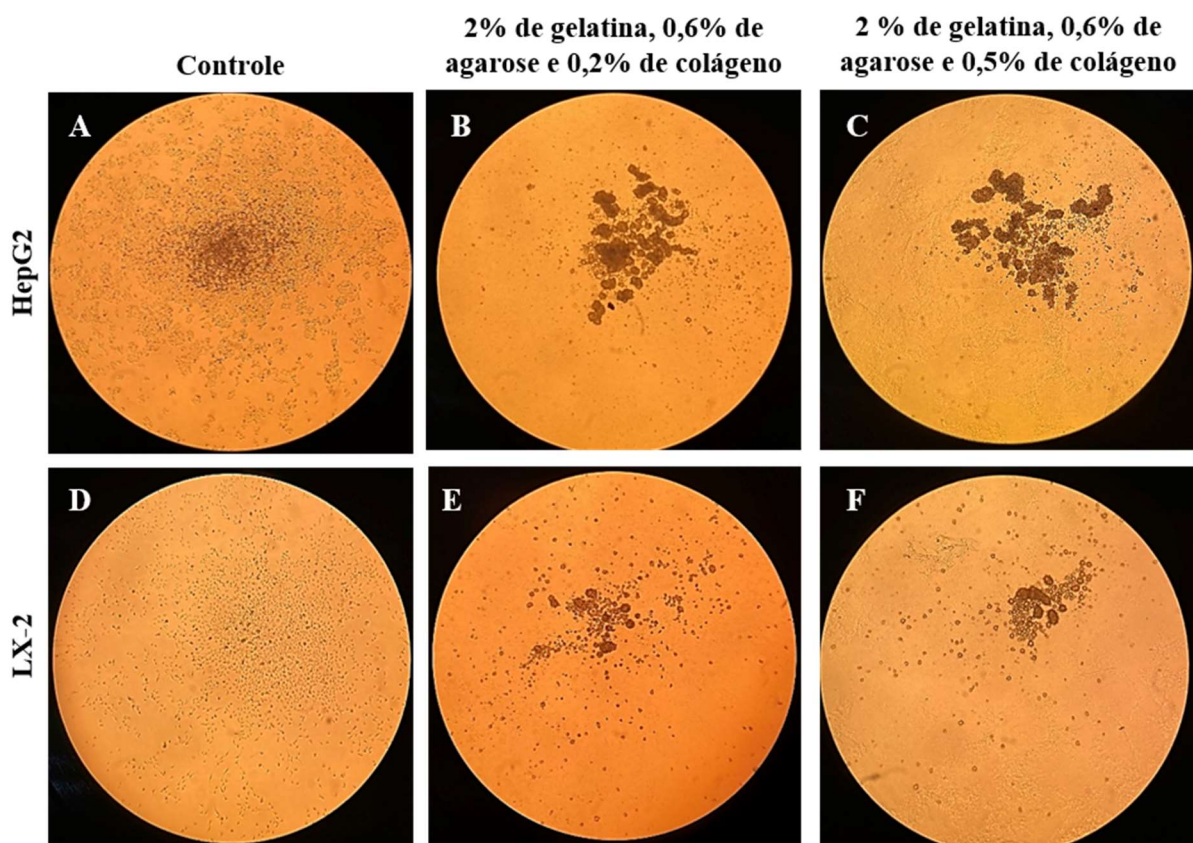
Figura 6 - Análises de microscopia de campo claro após 48h da incubação de células HepG2 ao substrato contendo (A) 2% de gelatina, 0,6% de agarose e 1% de colágeno; (B) 2% de gelatina e 0,6% de agarose; (C) 2% de gelatina, 0,8% de agarose e 1% de colágeno; e (D) 2% de gelatina e 0,8% de agarose. Ampliação de 100x.



Fonte: Arquivo pessoal.

Verificada a eficácia do colágeno e da agarose na formação dos esferoides utilizando-se as células HepG2, ensaios com a linhagem celular LX-2 foram realizados para um refinamento das concentrações de colágeno. As malhas foram montadas com as seguintes soluções: (A) PBS contendo 2% de gelatina, 0,6% de agarose e 0,2% de colágeno; e (B) PBS contendo 2% de gelatina, 0,6% de agarose e 0,5% de colágeno. As soluções foram autoclavadas e inseridas na placa de 24 poços. Após a polimerização dos substratos, foram adicionados a eles células HepG2 ou células LX-2 (Figura 7). Nessa etapa a análise da formação de organoides com as duas culturas se fez necessária tanto para se avaliar a eficiência do modelo, como para avaliar a sua toxicidade.

Figura 7 - Análises de microscopia de campo claro após 48h da incubação de células hepáticas (A, B e C) HepG2 e (D, E e F) LX-2 cultivada por 48h em (B e E) 2% de gelatina, 0,6% de agarose e 0,2% de colágeno; e (C e F) 2% de gelatina, 0,6% de agarose e 0,5% de colágeno. (A e D) controles do experimento. Ampliação de 100x.



Fonte: Arquivo pessoal.

Como anteriormente, os resultados das análises, baseadas em observações realizados sob microscópio invertido de campo claro, sugeriram que as soluções contendo 0,6% de agarose ficaram melhores, em termos visuais de organoides crescidos, assim como aquelas que continham colágeno em sua composição. No entanto, mesmo em menores concentrações, as células morreram após um maior período de incubação.

- **Gelatina e colágeno tipo II**

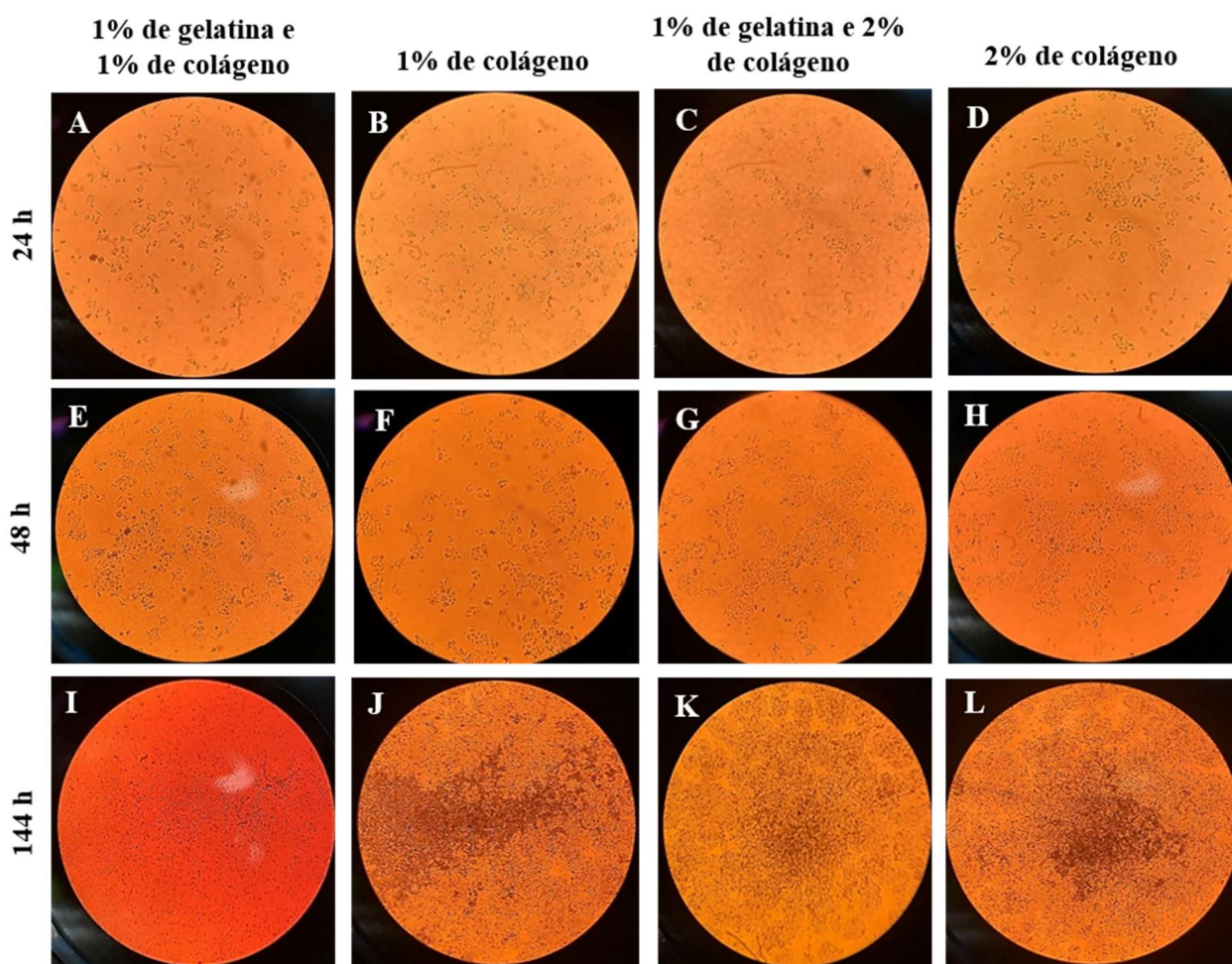
Continuando as análises de formação de organoides 3D na presença de colágeno, a malha foi novamente preparada, mas agora somente com a gelatina. Várias soluções foram avaliadas: (A) PBS contendo 1% de gelatina e 1% de colágeno; (B) PBS contendo 1% de colágeno; (C) PBS contendo 1% de gelatina e 2% de colágeno; e (D) PBS contendo 2% de colágeno. Após serem autoclavadas, distribuídas em placas de 24 poços e polimerizadas, células HepG2 foram novamente semeadas nos poços.

Com o passar de poucos dias, a morte visual das células é observada (Figura 8). No entanto, os resultados obtidos através da análise em microscópio invertido de campo claro

demonstraram que a solução contendo 1% de gelatina e 2% de colágeno (Figura 6 C, G e K) cresceu e se desenvolveu melhor na cultura, e por isso foi novamente testada.

O novo experimento, agora apenas com gelatina e colágeno, demonstrou um resultado claro sobre a resposta das células aos substratos após 6 dias (144h) de análise (Figura 8 I, J, K e L). Nas condições avaliadas, a maioria das células visualmente morreram, no entanto fica claro que a maior quantidade de morte foi registrada nas soluções que havia apenas colágeno (Figura 8 B, D, F, H, J e L), em comparação às soluções que apresentavam gelatina e colágeno (Figura 8 A, C, E, G, I e K). Além disso, as soluções com 2% de colágeno (Figura 8 D, H e L) apresentaram menor viabilidade das células, comparativamente às soluções com 1% de colágeno (Figuras 8 B, F e J).

Figura 8 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B, C e D) 24h, (E, F, G e H) 48h e (I, J, K e L) 144h da incubação de células HepG2 ao substrato contendo (A, E e I) 1% de gelatina e 1% de colágeno; (B, F e J) 1% de colágeno; (C, G e K) 1% de gelatina e 2% de colágeno; e (D, H, L) 2% de colágeno. (A-H) Ampliação de 100x. (I-L) Ampliação de 40x.

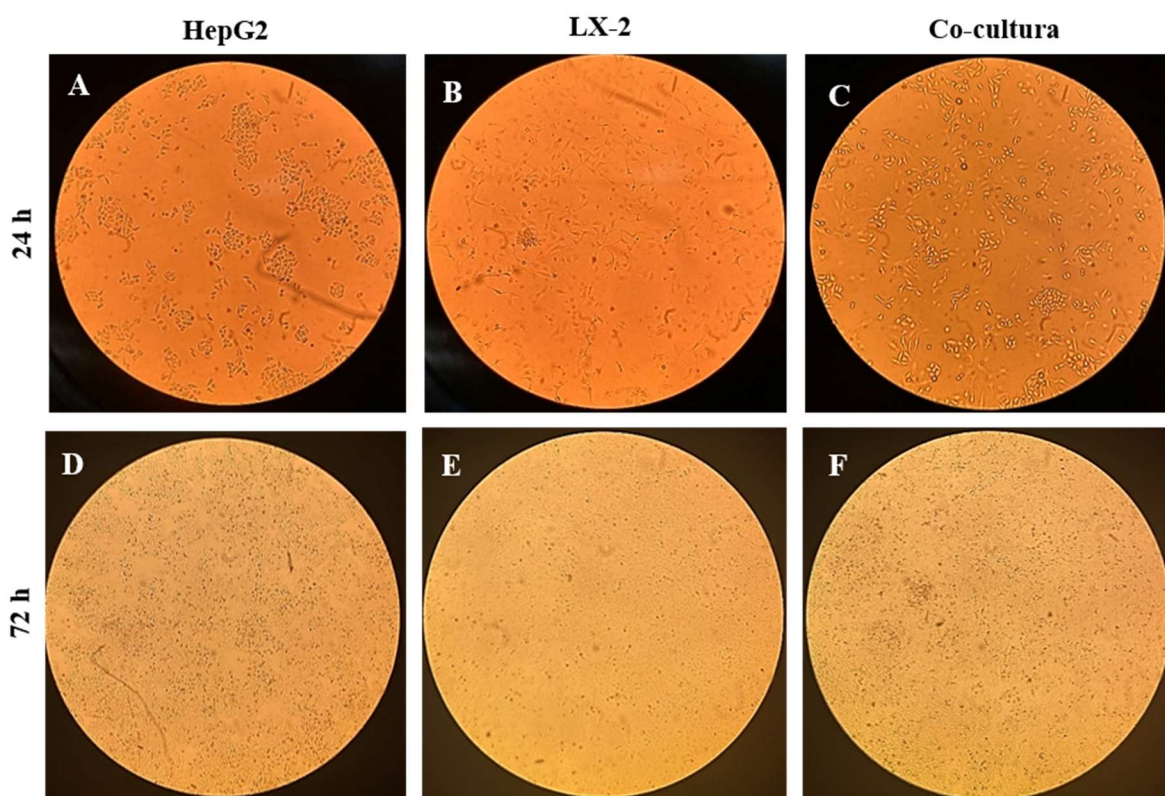


Fonte: Arquivo pessoal.

Com base no resultado anterior, e para se analisar o comportamento do colágeno nas outras linhagens celulares, um segundo ensaio foi realizado em placa de 6 poços com a solução 3 do experimento anterior (PBS contendo 1% de gelatina e 2% de colágeno), utilizando-se células isoladas HepG2 e LX-2, ou células em co-cultura.

Os resultados, após análises em microscópio invertido de campo claro, mais uma vez demonstraram a morte das células após um maior período de incubação conforme demonstra a Figura 9.

Figura 9 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B e C) 24h e (D, E e F) 72h da incubação de células (A e D) HepG2, (B e E) LX-2 e (C e F) co-cultura, ao substrato contendo 1% de gelatina e 2% de colágeno. (A, B e C) Ampliação de 100x. (D, E e F) Ampliação de 40x.



Fonte: Arquivo pessoal.

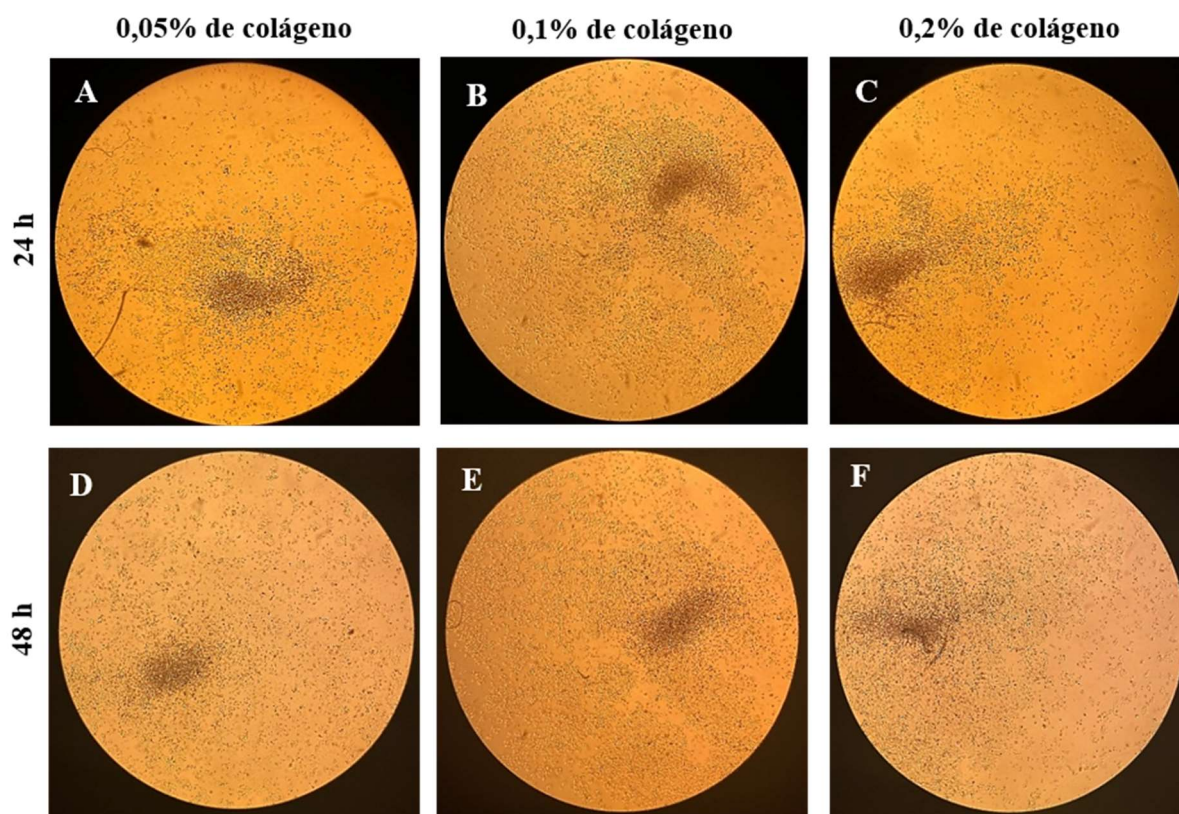
• Colágeno tipo II

De acordo com protocolo elaborado pela Merck (2022), o colágeno não pode ser autoclavado; portanto, para verificar novamente sua eficácia na formação de esferóides, um novo preparo e esterilização de soluções para malha 3D foram realizadas como seguem: (A) PBS contendo 0,05% de colágeno; (B) PBS contendo 0,1% de colágeno; e (C) PBS contendo 0,2% de colágeno.

As soluções foram deixadas em agitação por 1h a 37°C. Posteriormente, foi colocado 500 ul de solução por poço na placa de 24 poços. Após 3 h, foi retirado 400 ul da solução e aplicada UV por 20 minutos enquanto a solução secava. Além do novo procedimento de esterilização e polimerização, foi incluído em cada um dos poços meio de cultura e células isoladas HepG2 e LX-2.

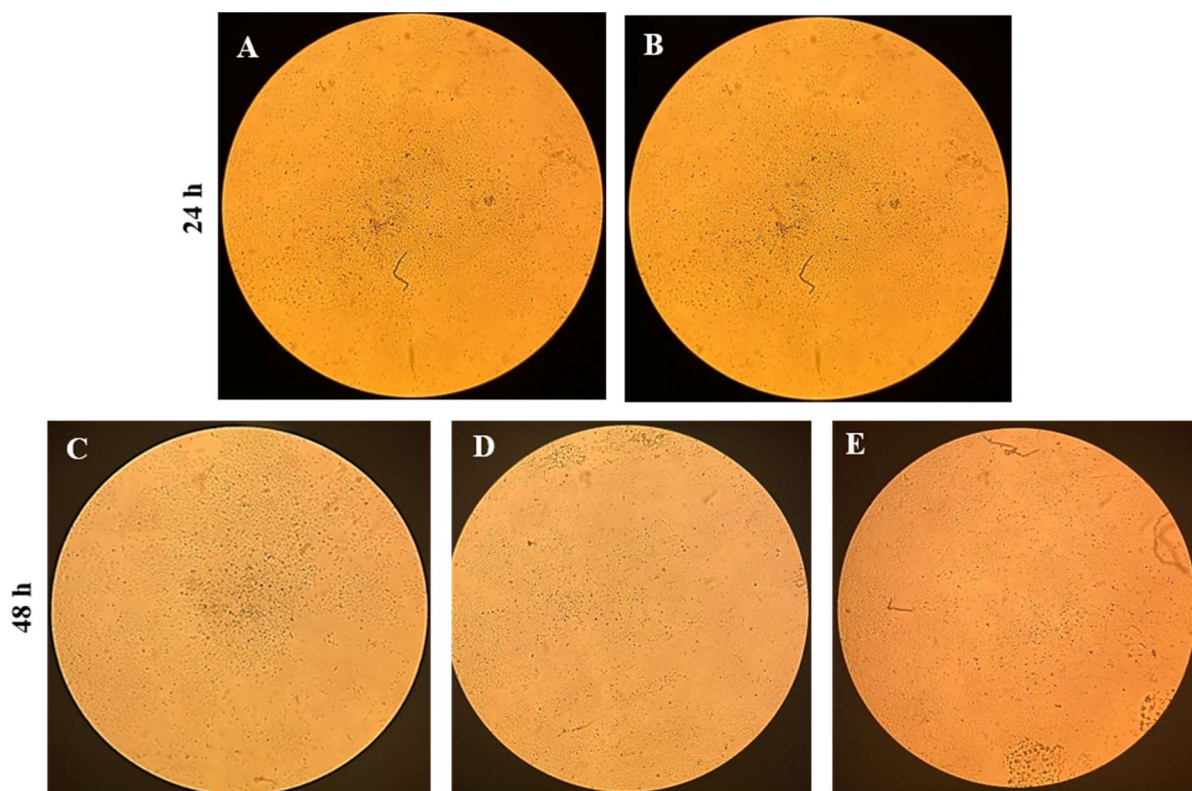
Considerando-se os resultados do novo experimento (Figuras 10 e 11) percebeu-se que o colágeno não alterou visualmente a morfologia das células e, portanto, não possibilitou o brotamento de esferoides. Deste modo, sua utilização descartada.

Figura 10 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B e C) 24h e (D, E e F) 48h da incubação de células HepG2 ao substrato contendo (A e D) 0,05% de colágeno; (B e E) 0,1% de colágeno; e (C e F) 0,2% de colágeno. Ampliação de 40x.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 11 - Análises de microscopia de campo claro após (A e B) 24h e (C, D e E) 48h da incubação de células LX-2 ao substrato contendo (A e C) 0,05% de colágeno; (D) 0,1% de colágeno; e (B e E) 0,2% de colágeno. Ampliação de 40x.



Fonte: Arquivo pessoal.

- **Alginato e agarose**

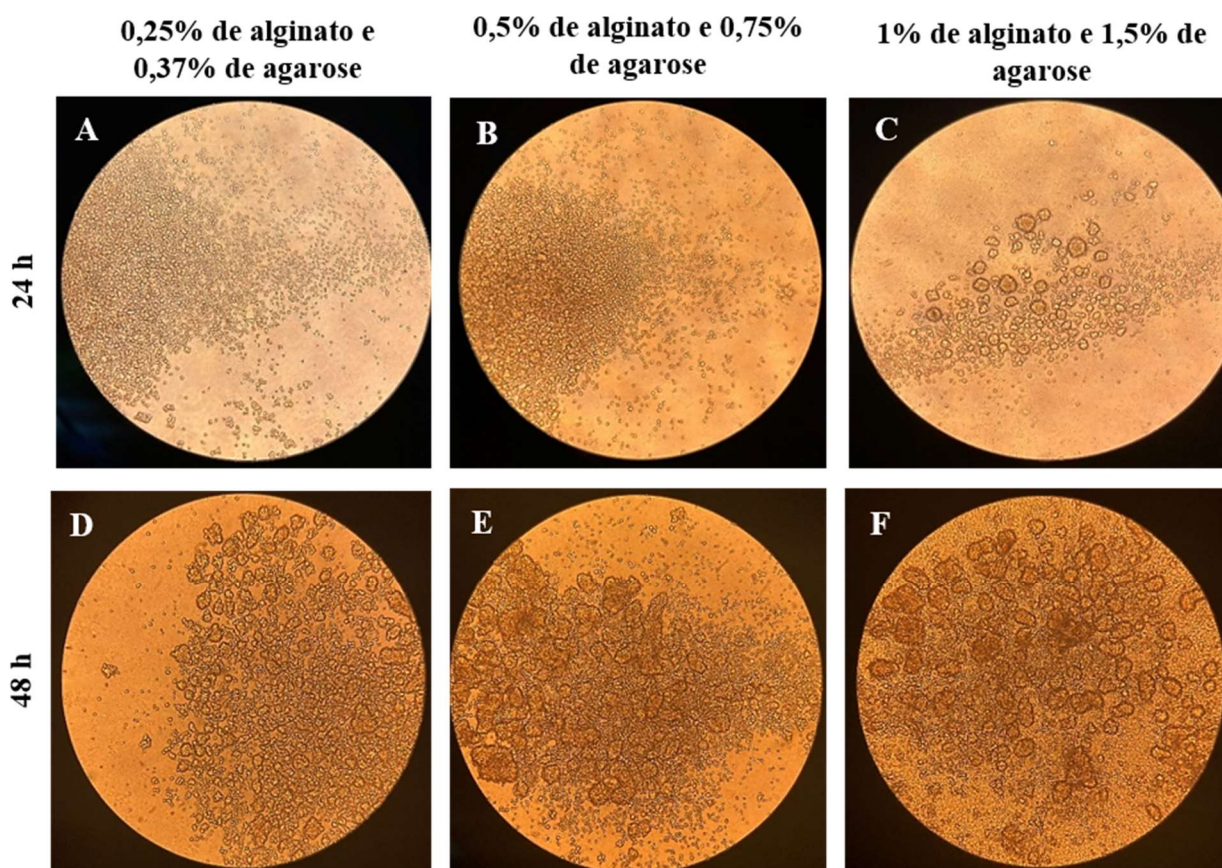
Considerando-se as várias tentativas de padronização do modelo de cultura celular 3D de baixo custo, novas alternativas foram avaliadas. Para essa etapa, misturas de agarose e alginato foram avaliadas quanto à eficiência na produção de organoides.

De acordo com López-Marcial *et al.* (2018), agarose e alginato de sódio têm sido amplamente utilizados para engenharia de tecidos devido à sua capacidade de promover a proliferação celular e a produção de matriz. A agarose é um polissacarídeo natural obtido de algas marinhas com várias aplicações na engenharia tecidual como regeneração de tecido neuronal e cartilagem. No entanto, devido à baixa capacidade de adesão celular, é essencial sua associação com alguns hidrogéis, como o alginato. O alginato também é um polissacarídeo de origem natural derivado de algas marinhas, que vem sendo utilizado como *scaffold* devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, facilidade de geleificação e baixo custo (TOFANI, 2019). Portanto, fundamentados na obra de López-Marcial *et al.* (2018), foram preparadas 3 diferentes soluções, com a proporção de 2 partes de alginato: 3 partes de agarose, conforme segue: (A) PBS contendo 0,25% de alginato e 0,37% de agarose; (B) PBS contendo 0,5% de alginato e 0,75% de agarose; e (C) PBS contendo 1% de alginato e 1,5% de agarose. As soluções

foram esterilizadas em autoclave e inseridas na placa de 24 poços. Após a polimerização dos mesmos, células isoladas HepG2 e LX-2 foram adicionadas.

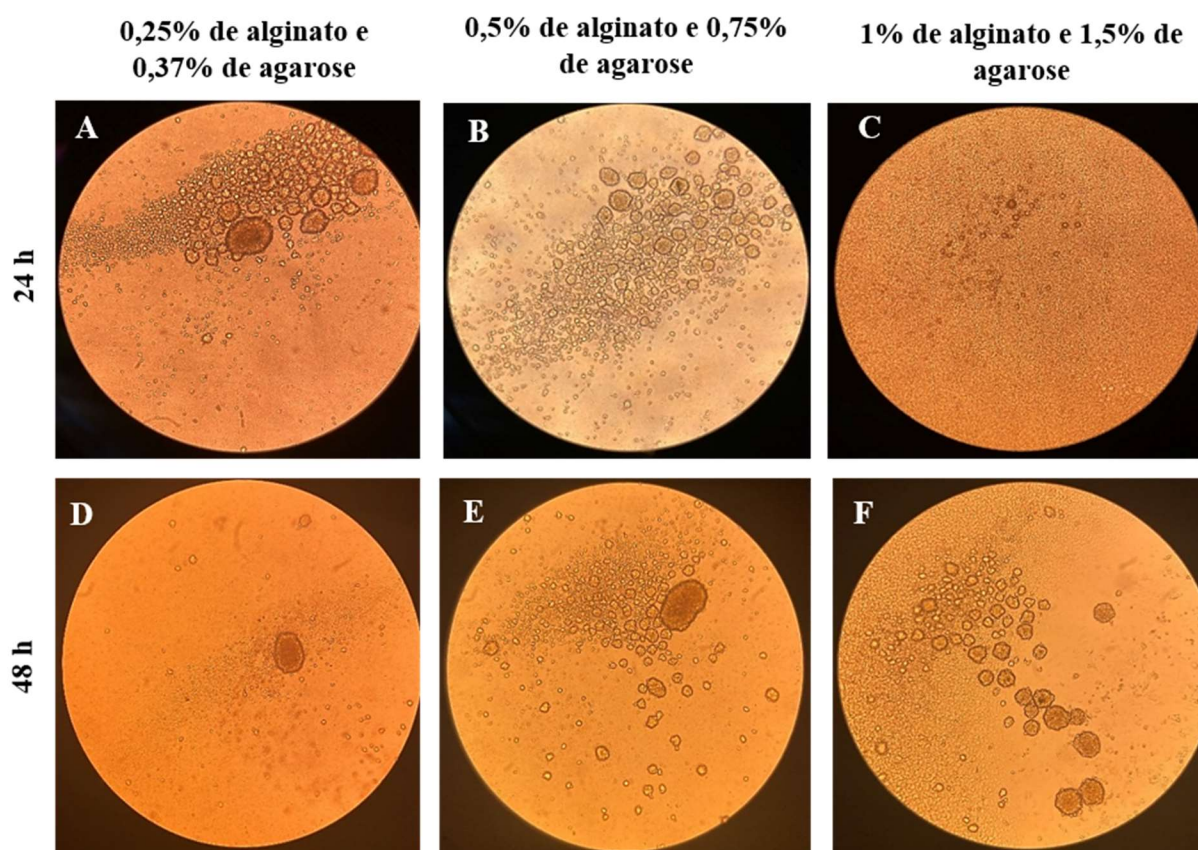
Após 48h de experimento, resultados extremamente satisfatórios foram presenciados: os esferoides foram formados em todas as condições e linhagens celulares (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B e C) 24h e (D, E e F) 48h da incubação de células HepG2 ao substrato contendo (A e D) 0,25% de alginato e 0,37% de agarose; (B e E) 0,5% de alginato e 0,75% de agarose; e (C e F) 1% de alginato e 1,5% de agarose. Ampliação de 100x.



Fonte: Arquivo pessoal.

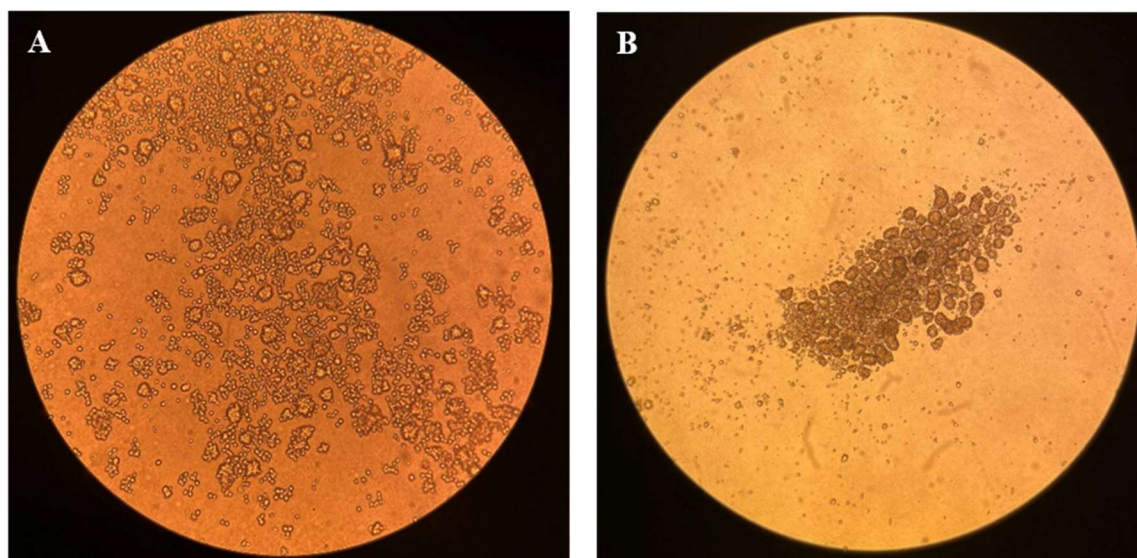
Figura 13 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B e C) 24h e (D, E e F) 48h da incubação de células LX-2 ao substrato contendo (A e D) 0,25% de alginato e 0,37% de agarose; (B e E) 0,5% de alginato e 0,75% de agarose; e (C e F) 1% de alginato e 1,5% de agarose. Ampliação de 100x.



Fonte: Arquivo pessoal.

Para se caracterizar os melhores substratos para a formação dos esferoides, assim, como determinar tempos ideais de incubação das células nesses substratos, análises posteriores foram realizadas buscando se avaliar a viabilidade e integridade celular, além da confiabilidade do modelo em induzir quadros pró-esteatóticos (item “4.1.1 Ensaios de viabilidade/ citotoxicidade celular – análises de azul de tripano”). Na sequência, as mesmas análises foram realizadas com co-culturas para se avaliar o comportamento celular frente a malha agarose: alginato (Figura 14).

Figura 14 - Análises de microscopia de campo claro após (A) 24h e (B) 48h da incubação de células hepáticas em co-cultura (HepG2 e LX-2) ao substrato contendo 0,25% de alginato e 0,37% de agarose. Ampliação de 100x.



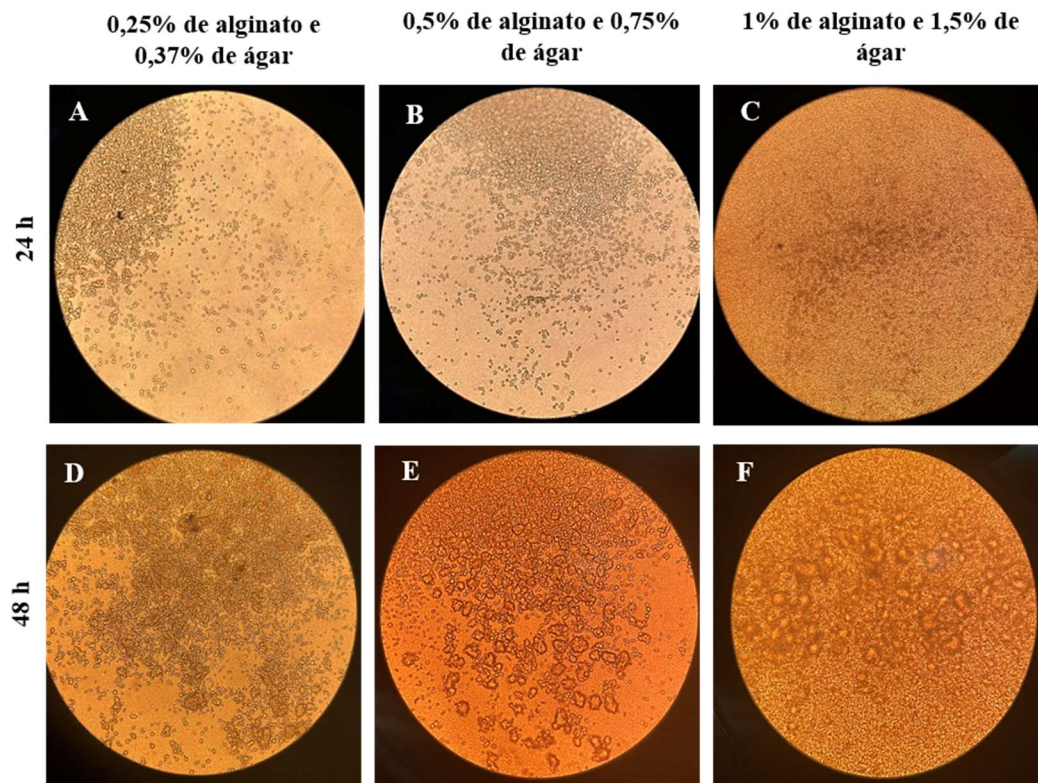
Fonte: Arquivo pessoal.

- **Alginato e ágar**

Além da combinação alginato e agarose, de acordo com Abe-Fukasawa *et al.* (2018), outro importante polissacarídeo tradicionalmente utilizado para estudos biológicos é o ágar. No presente estudo o combinamos com o alginato de sódio para testar a sua capacidade na formação de esferoides em culturas celulares. Para tanto, assim como no ensaio anterior, foram preparadas 3 diferentes soluções com a proporção de 2 alginato: 3 ágar, conforme consta a seguir: (A) PBS contendo 0,25% de alginato e 0,37% de ágar; (B) PBS contendo 0,5% de alginato e 0,75% de ágar; e (C) PBS contendo 1% de alginato e 1,5% de ágar. As soluções foram autoclavadas, inseridas à placa de 24 poços e, após a polimerização dos mesmos, células isoladas HepG2 e LX-2 foram adicionadas.

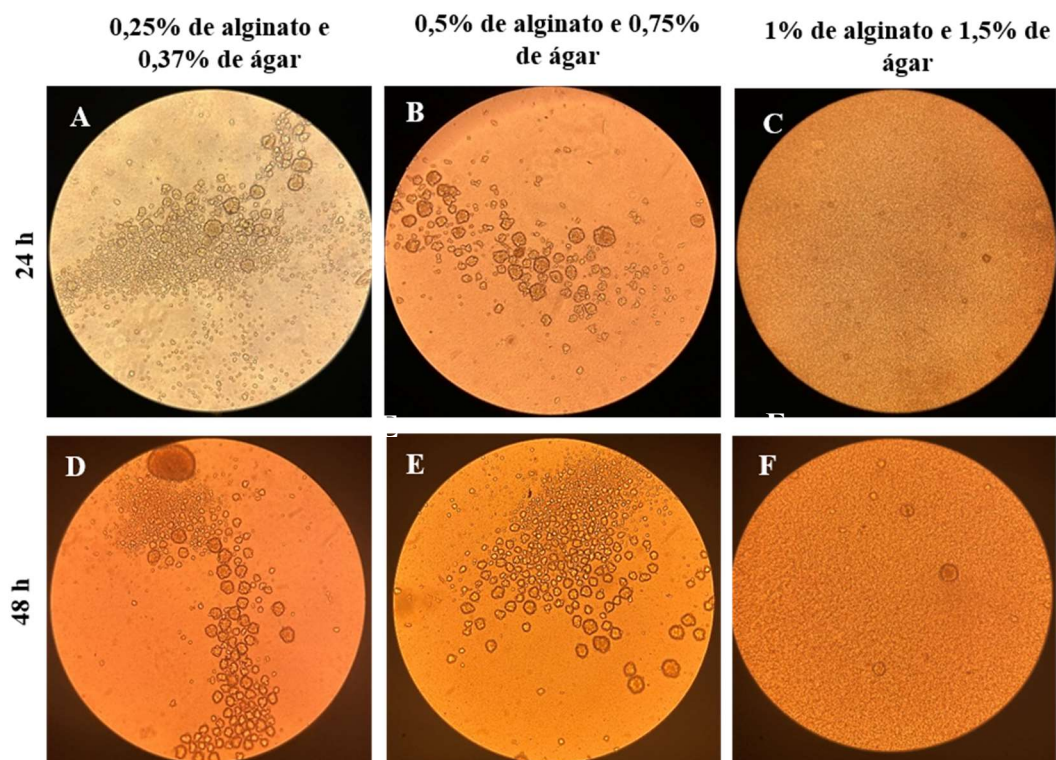
Passadas 48h do início do experimento o resultado não se distinguiu do anterior: os esferoides tridimensionais também foram formados em todas as condições e linhagens celulares (Figuras 15 e 16).

Figura 15 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B e C) 24h e (D, E e F) 48h da incubação de células HepG2 ao substrato contendo (A e D) 0,25% de alginato e 0,37% de ágar; (B e E) 0,5% de alginato e 0,75% de ágar; e (C e F) 1% de alginato e 1,5% de ágar. Ampliação de 100x.



Fonte: Arquivo pessoal.

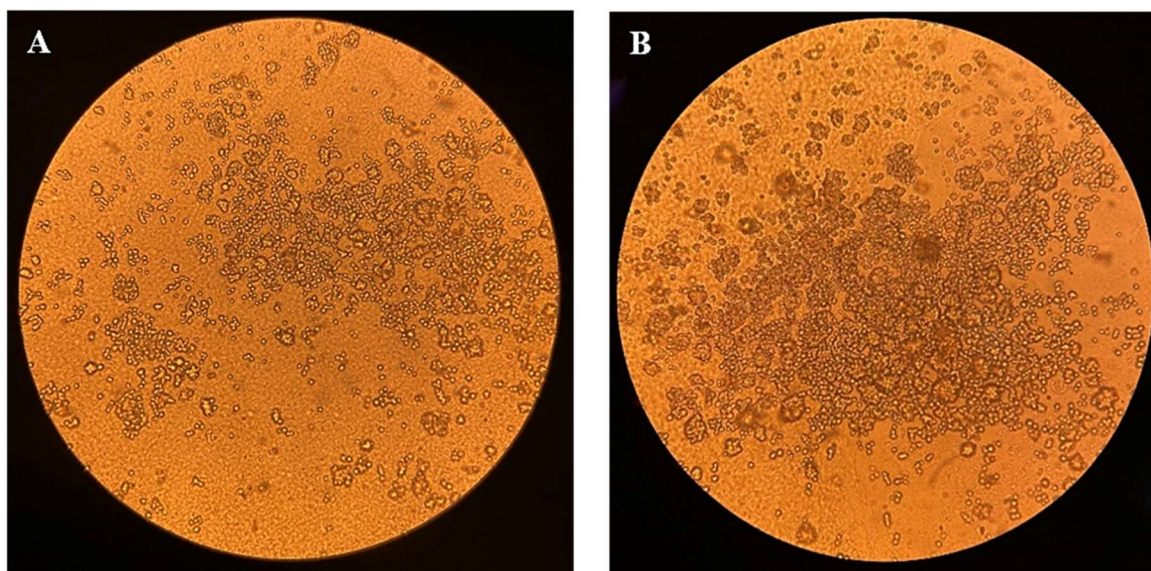
Figura 16 - Análises de microscopia de campo claro após (A, B e C) 24h e (D, E e F) 48h da incubação de células LX-2 ao substrato contendo (A e D) 0,25% de alginato e 0,37% de ágar; (B e E) 0,5% de alginato e 0,75% de ágar; e (C e F) 1% de alginato e 1,5% de ágar. Ampliação de 100x.



Fonte: Arquivo pessoal.

Análises subsequentes para se avaliar a viabilidade, integridade celular e a confiabilidade do modelo em induzir quadros pró-esteatóticos foram realizadas e também são apresentadas no item “4.1.1”. Da mesma maneira que a exposição anterior (alginato + agarose), aqui também foram realizados ensaios com co-cultura, os quais estão apresentados abaixo (Figura 17).

Figura 17 - Análises de microscopia de campo claro após (A) 24h e (B) 48h da incubação de células hepáticas em co-cultura (HepG2 e LX-2) ao substrato contendo 0,5% de alginato e 0,75% de ágar. Ampliação de 100x.



Fonte: Arquivo pessoal.

Considerando-se os resultados observados, uma característica interessante foi notada nas culturas de células cultivadas sob alginato de sódio + agarose/ ágar: os esferoides foram formados e ficaram suspensos na placa. Tal aspecto é descrito em Tofani (2019), e caracterizado por “flutuação forçada”. De acordo com a autora, a técnica da flutuação forçada é baseada na formação de esferoides devido ao impedimento da adesão celular em superfícies não aderentes. Os materiais hidrofílicos e neutros como o ágar e a agarose podem ser utilizados nessa técnica uma vez que inibem as interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a superfície celular e a placa de cultura (TOFANI, 2019), favorecendo a interação célula-célula.

Em suma, os resultados para padronização da obtenção de esferoides celulares podem ser resumidos como segue (Tabela 1):

Tabela 1 - Síntese dos resultados obtidos na padronização do modelo 3D.

Substrato	Células	Resultados
Gelatina e agarose	HepG2	Maior proliferação e menor taxa de morte das células no substrato contendo 2% de gelatina e 0,6% / 0,8% de agarose, após 48h. No entanto, esferoides não foram formados.
Gelatina, agarose e colágeno	HepG2 e LX-2	Formação de bons esferoides nas concentrações de 2% de gelatina, 0,6% de agarose e 0,2% / 0,5% de colágeno, após 48h. No entanto, as células morreram após um maior período de incubação.
Gelatina e colágeno	HepG2, LX-2 e co-cultura	Soluções com 2% de colágeno apresentaram menor viabilidade das células, em comparação às com 1% de colágeno, após 144 h. No entanto, os resultados demonstraram grande taxa de morte com o passar do tempo de incubação das células.
Colágeno	HepG2 e LX-2	O colágeno serviu como nutriente para o crescimento das células, não alterando sua morfologia e não formando esferoides.
Alginato e agarose	HepG2, LX-2 e co-cultura	Esferoides foram formados em todas as condições e linhagens celulares, após 48h.
Alginato e ágar	HepG2, LX-2 e co-cultura	Esferoides foram formados em todas as condições e linhagens celulares, após 48h.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.1 Ensaios de viabilidade/ citotoxicidade celular – análises de azul de tripano

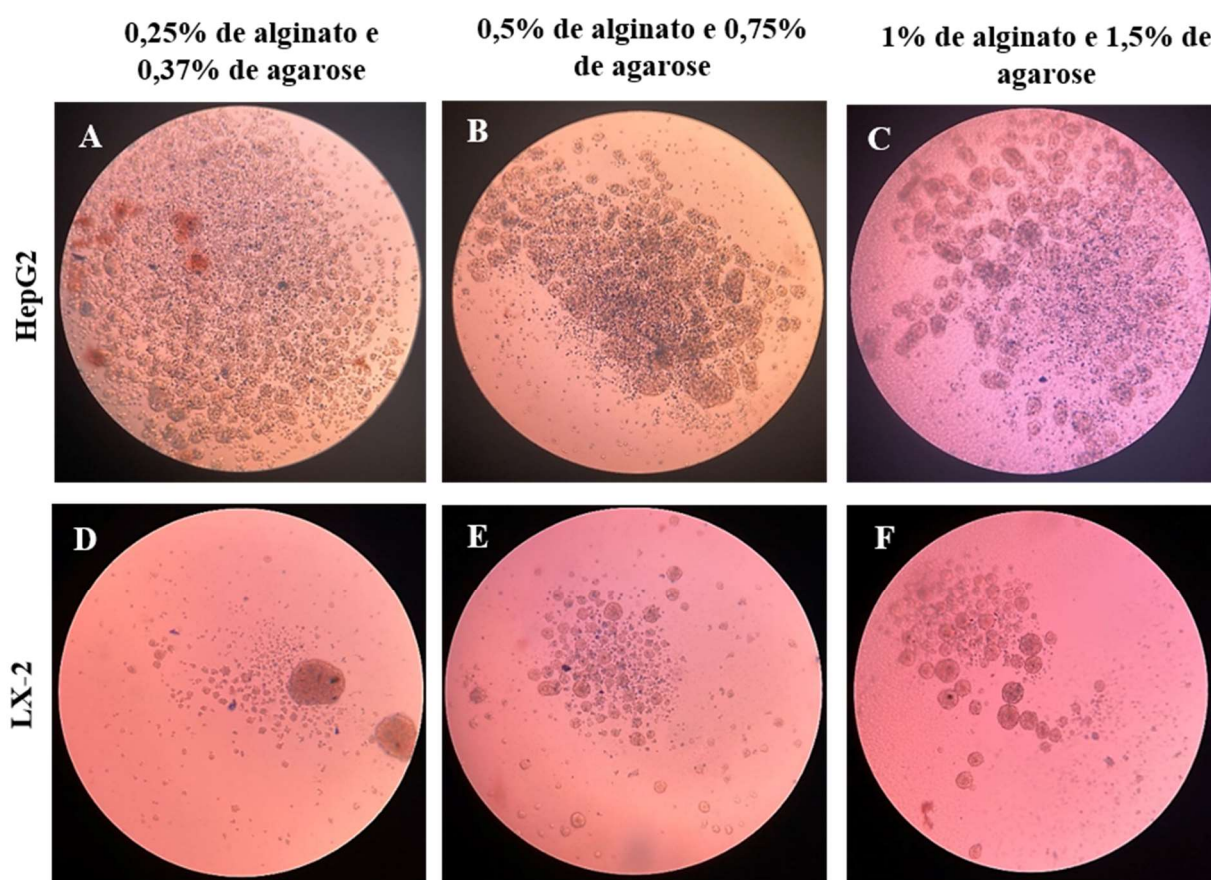
O número de células viáveis frente às diferentes concentrações, tempo e combinações de substratos foi verificada através do método de exclusão de azul de tripano. Este método avalia a integridade da membrana celular, através da capacidade de permeabilização do corante. As células viáveis são impermeáveis a este corante, enquanto as células não viáveis permitem a penetração do corante devido à presença de poros na membrana.

Para este projeto, a análise foi realizada com os substratos contendo alginato + agarose, e alginato + ágar, que foram os que possibilitaram o melhor desenvolvimento dos esferoides de células hepáticas através da observação sob microscópio óptico. Os efeitos das concentrações analisadas são aquelas descritas anteriormente [(A) 0,25% de alginato e 0,37% de agarose/ ágar;

(B) 0,5% de alginato e 0,75% de agarose/ ágar; e (C) 1% de alginato e 1,5% de agarose/ ágar]. Após 48h de inclusão das células isoladas HepG2 e LX-2, o corante azul de tripano foi adicionado; as células foram fotografadas e na sequência contadas. As Figuras 18 e 19 apresentam representações das células HepG2 e LX-2, respectivamente; a Tabela 2 sintetiza a porcentagem de células viáveis nos ensaios.

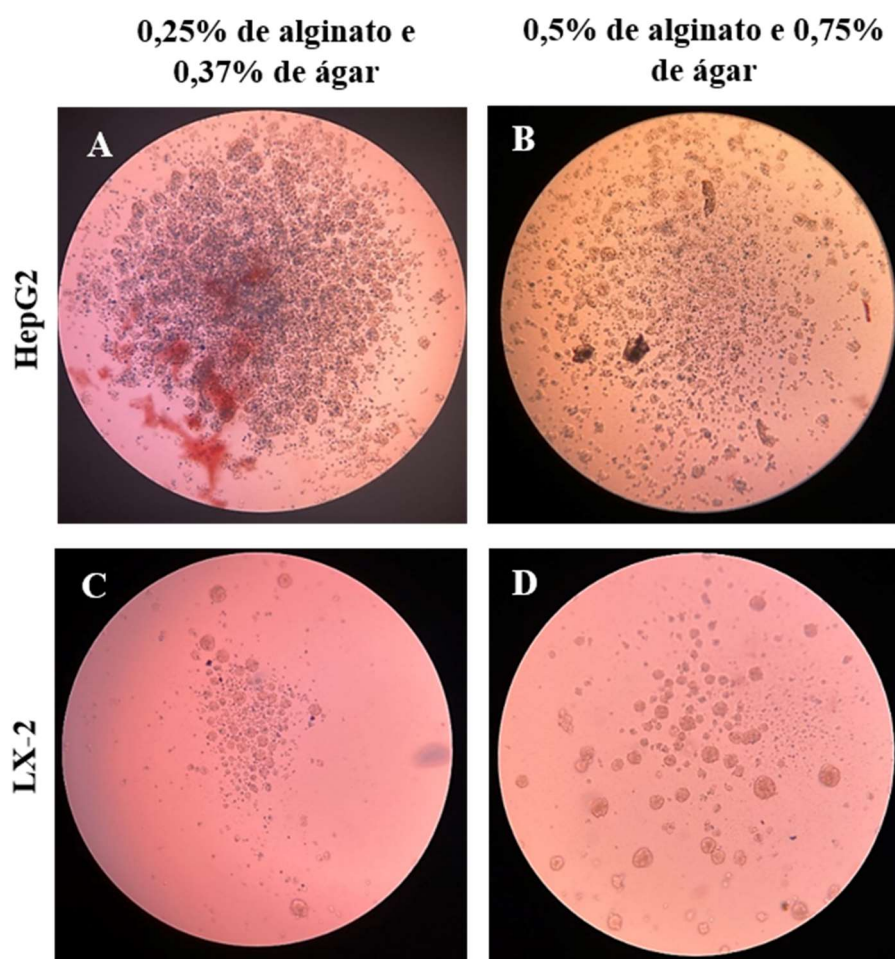
Os resultados apresentaram maior viabilidade das células HepG2 e LX-2 quando cultivadas na presença dos substratos contendo 0,25% de alginato e 0,37% de agarose, e 0,5% de alginato e 0,75% de ágar, assim, estes foram considerados para as análises posteriores. Vale destacar que a experimentação com as condições de substrato contendo 1% de alginato e 1,5% de ágar foi impossibilitado devido à espessura da malha, portanto, imaginando na inviabilidade do substrato em análises posteriores, essa também foi descartada.

Figura 18 - Análises de azul de tripano após 48h da incubação de hepáticas (A, B e C) HepG2 e (D, E e F) LX-2 ao substrato contendo (A e D) 0,25% de alginato e 0,37% de agarose; (B e E) 0,5% de alginato e 0,75% de agarose; e (C e F) 1% de alginato e 1,5% de agarose. Ampliação de 100x.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 19 - Análises de azul de tripano após 48h da incubação de células hepáticas (A e B) HepG2 e (C e D) LX-2 ao substrato contendo (A e C) 0,25% de alginato e 0,37% de ágar; e (B e D) 0,5% de alginato e 0,75% de ágar. Ampliação de 100x.



Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 2 - Viabilidade celular após 48h da incubação de células hepáticas HepG2 e LX-2 ao substrato contendo alginato de sódio e agarose/ ágar.

Célula	Solução	Viabilidade
HepG2	0,25% de alginato e 0,37% de agarose	71,42%
	0,5% de alginato e 0,75% de agarose	56,25%
	1% de alginato e 1,5% de agarose	66,66%
	0,25% de alginato e 0,37% de ágar	69,56%
	0,5% de alginato e 0,75% de ágar	70%
	1% de alginato e 1,5% de ágar	-
LX-2	0,25% de alginato e 0,37% de agarose	80%

	0,5% de alginato e 0,75% de agarose	66,66%
	1% de alginato e 1,5% de agarose	42,85%
	0,25% de alginato e 0,37% de ágar	66,66%
	0,5% de alginato e 0,75% de ágar	75%
	1% de alginato e 1,5% de ágar	-

Fonte: Elaborado pela autora.

Verificada as concentrações ideais de alginato + agarose/ ágar nas células isoladas; ensaios com co-cultura (HepG2 e LX-2) foram realizados. Os resultados possibilitaram confirmar a confiança de tais concentrações, assim como o tempo protótipo do experimento, definido em 48h (Tabela 3).

Tabela 3 - Viabilidade celular após 48h e 72h da incubação de células hepáticas HepG2 e LX-2 co-cultivadas no substrato contendo alginato de sódio e agarose/ ágar.

Tempo	Solução	Viabilidade
48h	0,25% de alginato e 0,37% de agarose	82,63%
	0,5% de alginato e 0,75% de ágar	88,17%
72h	0,25% de alginato e 0,37% de agarose	80,9%
	0,5% de alginato e 0,75% de ágar	87,7%

Fonte: Elaborado pela autora.

Uma vez definida as melhores concentrações indutoras da malha 3D, foi verificado o efeito da indução do quadro pró-esteatótico nos esferoides. Para isso, os esferoides foram incubados com 400 μ M da mistura de AGs (plamítico e oleico), seguindo metodologia estabelecida em nosso laboratório (BARBOSA, 2020; RAMOS, 2020).

Estudos mostraram que o ácido oleico induz a síntese de triglicerídeos e, consequente, indução de esteatose mais eficientemente que o ácido palmítico (MORAVCOVA *et al.*, 2015). Por outro lado, o ácido palmítico demonstra ser um agente citotóxico mais agressivo que o ácido oleico, pois leva à formação de espécies reativas de oxigênio (RICCHI *et al.*, 2009; MORAVCOVA *et al.*, 2015). Portanto, a combinação entre esses dois AGs atua de maneira mais eficaz na indução do modelo esteatótico celular e é respaldada pela literatura (RICCHI *et al.*, 2009).

No projeto em questão, as análises com azul de tripano mostraram que a incubação com a concentração de 400 μ M de AGs no substrato contendo alginato e ágar resultou em esferóides com maior viabilidade (74,14%), quando comparado com o substrato contendo alginato e agarose (54,5%).

Constatada a sobrevivência celular sob condições pró-esteatótica em co-cultura, a malha escolhida para prosseguirmos com os ensaios foi a contendo 0,5% de alginato e 0,75% de ágar.

4.2 Validação da funcionalidade do modelo alternativo 3D para análises toxicológicas da atuação de fitossanitários no metabolismo pró-esteatótico

4.2.1 Ensaio de viabilidade/ citotoxicidade celular – análises de MTT frente a diferentes concentrações de fitossanitários

Anteriormente foi descrito sobre a utilização de fitossanitários nas culturas 3D, no entanto, antes da utilização dos pesticidas foram realizados ensaios de MTT com células cultivadas no modelo 2D. Essas análises permitiram indicar concentrações e tipos de fitossanitários que viabilizassem a sobrevivência de pelo menos 70% das células. Diversos fitossanitários foram avaliados nessa etapa. Para nortear análises seguras com o modelo 3D em padronização, agrotóxicos foram testados em concentrações diversas. Abaixo estão apresentados os resultados dos fitossanitários testados e tabulados em gráficos pelo programa GraphPad Prism 5.0.

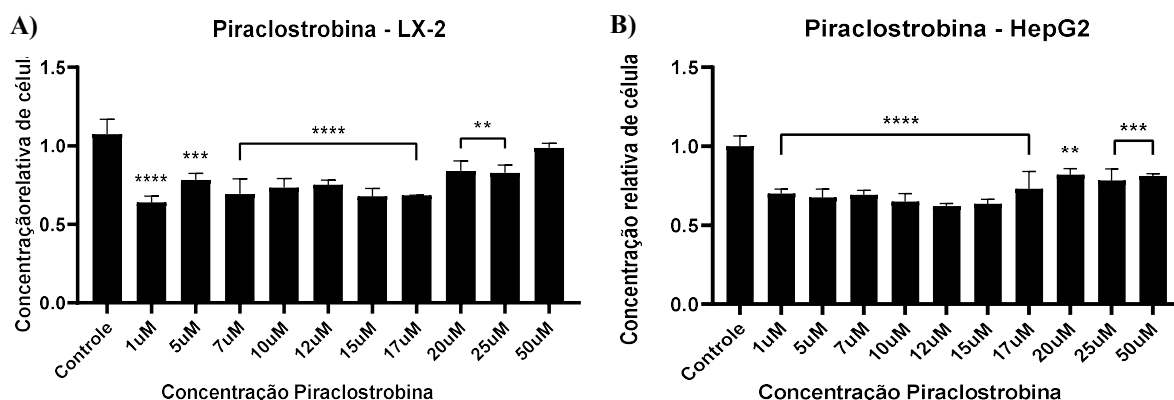
- **Piraclostrobina**

O primeiro agrotóxico avaliado quanto ao seu potencial citotóxico às culturas celulares, foi o fungicida estrobilurínico piraclostrobina. As análises foram realizadas para ambas linhagens celulares e está apresentado na Figura 20. Podemos perceber uma significativa redução da viabilidade das células HepG2 e LX-2 em praticamente todas as concentrações do composto piraclostrobina, exceto em 50 μ M das células LX-2, sugerindo alterações no metabolismo celular. Aliado a essas análises, a alteração do fenótipo das células (dados não mostrados) sugeriu a presença de mecanismos de estresse celular que são pró indutores de morte celular.

Nossos resultados corroboram com dados obtidos por Regueiro *et al.* (2015), em que a PYR apresentou altos níveis de toxicidade em neurônios corticais após um curto período de exposição. A PYR inibe o complexo III da respiração mitocondrial, como apresentado

anteriormente. Essa inibição diminui a geração de ATP e a despolarização da membrana mitocondrial, levando ao aumento do cálcio citosólico e a morte celular (REGUEIRO *et al.*, 2015). Considerando-se tal comportamento, optamos por não utilizar esse fungicida, assim como outros dessa classe de compostos químicos, nas análises posteriores.

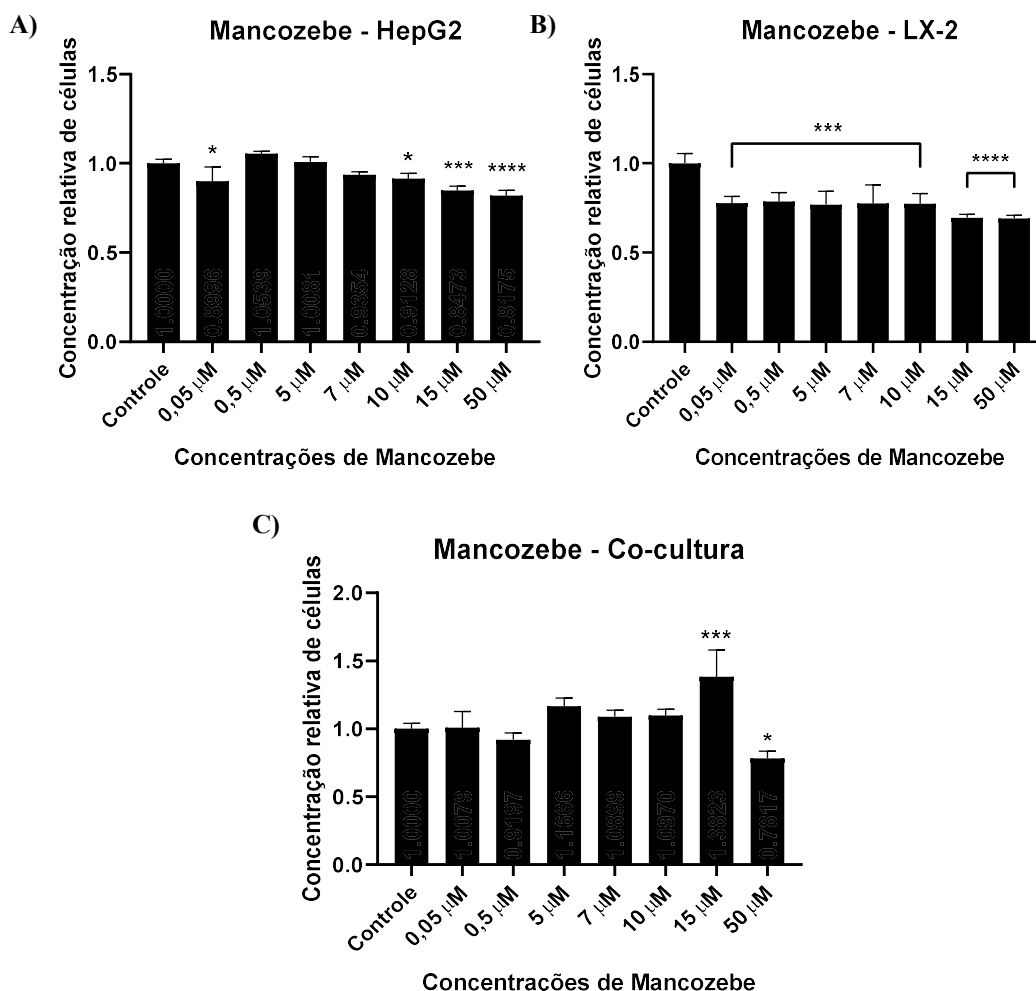
Figura 20 - Ensaio de citotoxicidade (MTT) realizado por 48h na presença do agrotóxico piraclostrobina. A) Células LX-2. B) Células HepG2. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Tukey, onde * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ em comparação com o controle.



- **Mancozebe**

O segundo agrotóxico avaliado quanto ao seu potencial citotóxico nas culturas celulares foi o mancozebe, um fungicida mundialmente conhecido e utilizado. A Figura 21 apresenta os resultados do MTT nas linhagens celulares isoladas (HepG2 e LX-2) e nas co-culturas. Os resultados obtidos são semelhantes nas duas linhagens celulares isoladas, apontando redução da viabilidade nas culturas incubadas com as maiores concentrações do pesticida e sugerindo morte celular. Os resultados da co-cultura não apresentaram resultados diferentes estatisticamente do controle, com exceção da concentração de 15 µM e 50 µM. Esse resultado contrapõe os dados de Mohammadi-Sardoo *et al.* (2021), onde o mancozebe diminuiu a viabilidade de co-culturas de células germinativas de Sertoli pelo aumento dos níveis de ROS, que ocasionou na ativação da via MAPK e na indução de apoptose nas células tratadas (MOHAMMADI-SARDOO *et al.*, 2021). Considerando-se os resultados obtidos, os estudos de Mohammadi-Sardoo *et al.* (2021) e considerando-se que a diluição de tal fitossanitário tenha ocorrido em DMSO e não água, optamos em descartá-lo das análises, já que tais fatores poderiam alterar os resultados posteriores.

Figura 21 - Ensaio de citotoxicidade (MTT) realizado por 24h na presença do agrotóxico mancozebe. A) Células HepG2. B) Células LX-2. (C) Células em co-cultura. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Tukey, onde * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ em comparação com o controle.

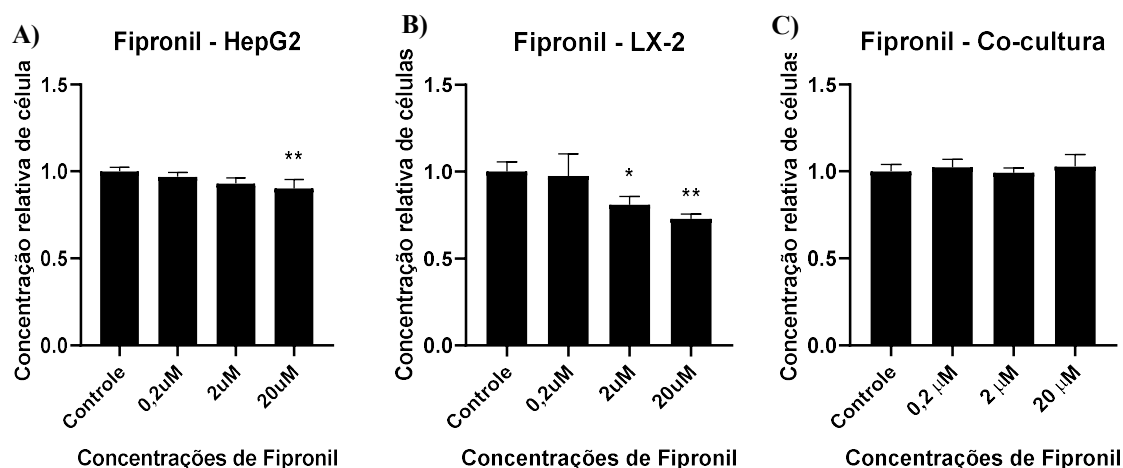


- **Fipronil**

O terceiro fitossanitário a ter seus efeitos analisados nas culturas celulares foi o fipronil. Assim como na análise anterior, este consistiu em testes nas linhagens celulares isoladas de HepG2, LX-2 e em co-cultura (Figura 22). Os resultados demonstraram que as maiores concentrações investigadas deste fitossanitário reduziram significativamente a viabilidade das células, mas ainda dentro dos limites de sobrevivência necessários para as análises subsequentes (70%). Entretanto, os resultados obtidos contrariam o que foi descrito na pesquisa de Vidau *et al.* (2011). O autor utilizou células de adenocarcinoma epitelial da linhagem Caco-2 e sua análise demonstrou que o fipronil induziu processos apoptóticos nas células nas concentrações de 25 µM a 150 µM. Esses eventos ocorreram devido a alterações celulares como a condensação do núcleo, o colapso do equilíbrio do potencial da mitocôndria, liberação do citocromo c e ativação da caspase-3, sendo estes agentes relacionados ao processo de apoptose celular (VIDAU *et al.*, 2011). Além

disso, estudos relacionados ao composto fipronil demonstram que quando ingerido ou em contato com humanos e/ ou animais, o fitossanitário apresenta ação neurotóxica através da inibição da produção do receptor GABA e de ATP, eventos que podem levar a quadros de apoptose celular (VIDAU *et al.*, 2011; KARTHEEK, 2018). Comparativamente, os resultados sugerem que as diferenças encontradas nos estudos se correlacionam com as particularidades do metabolismo de cada célula e/ ou organismo analisado. Dessa maneira, o efeito do pesticida foi avaliado nas análises subsequentes.

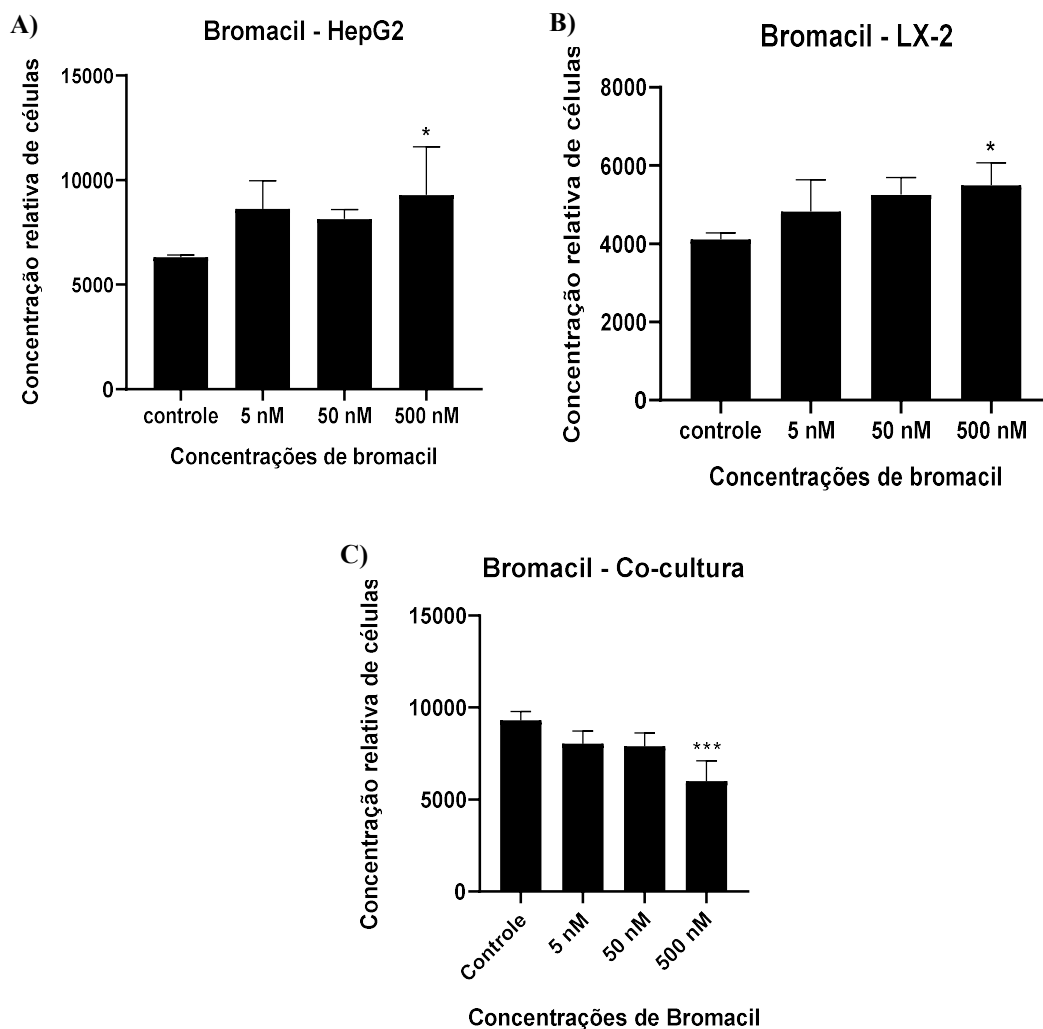
Figura 22 - Ensaio de citotoxicidade (MTT) realizado por 24h na presença do agrotóxico fipronil. A) Células HepG2. B) Células LX-2. (C) Células em co-cultura. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Tukey, onde * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ em comparação com o controle.



• Bromacil

A classe de pesticidas dependentes de uracila, representada pelo herbicida bromacil, também tiveram seus efeitos funcionais sobre as culturas hepáticas avaliados. Este consistiu em testes nas linhagens celulares isoladas de HepG2, LX-2 e em co-cultura (Figura 23). Os resultados demonstraram um aumento da viabilidade celular nas culturas cultivadas isoladamente e uma diminuição da viabilidade celular nos ensaios das co-culturas celulares. Compostos químicos com formulação baseada em estrutura de uracila estão presentes em agentes anti-neoplásicos (fluorouracil, floxuridine, capecitabine) - quimioterápicos hepatotóxicos que podem também induzir quadros de disfunções metabólicas celulares (LIVERTOX, 2012) e, conseqüentemente, quadros de acúmulo de lipídeos. A investigação de fitossanitários sintetizados com base na molécula de uracila, torna-se uma proposta a ser considerada por seus efeitos potencialmente deletérios na população.

Figura 23 - Ensaio de citotoxicidade (MTT) realizado por 72h na presença do agrotóxico Bromacil. A) Células HepG2. B) Células LX-2. (C) Células em co-cultura. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Tukey, onde * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ em comparação com o controle.



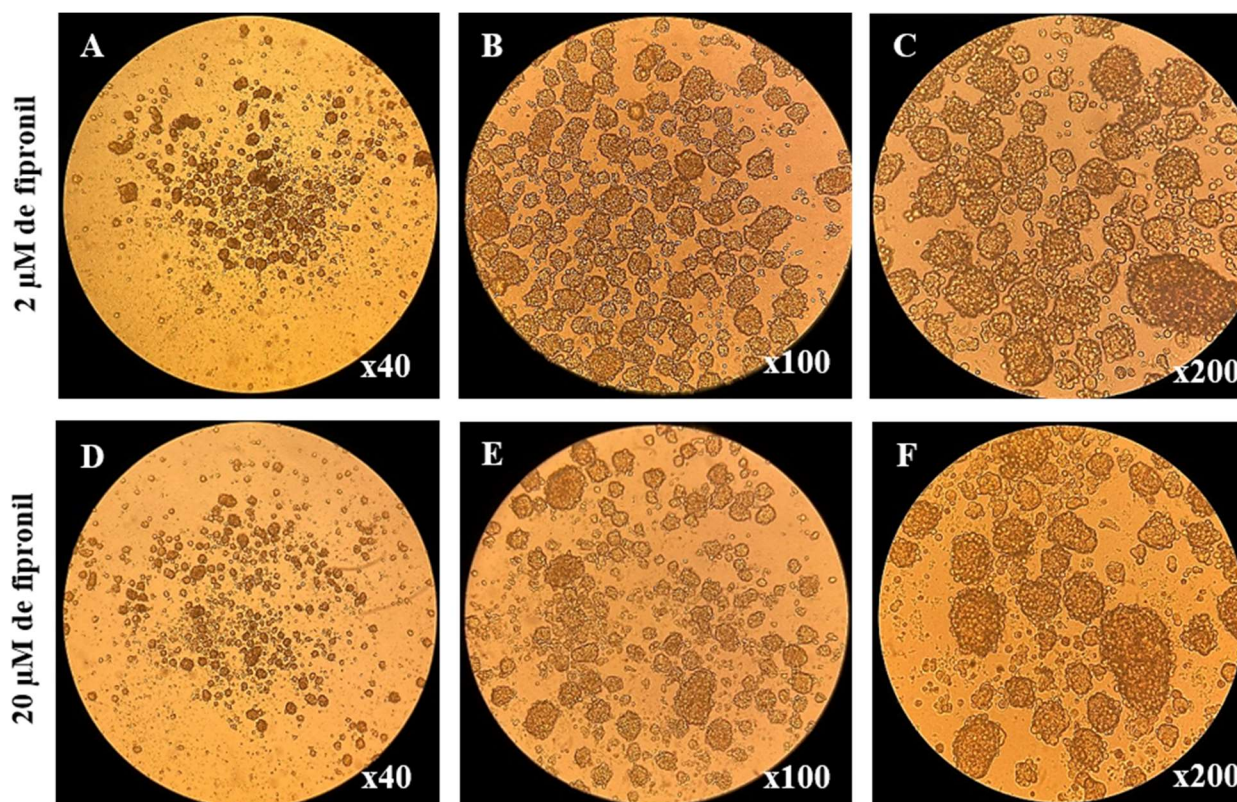
Assim, considerando-se o conjunto dos resultados obtidos, as concentrações de 2 μM e 20 μM de Fipronil, e 5 nM e 50 nM de Bromacil foram escolhidas para serem analisadas nos ensaios subsequentes.

4.2.2 Efeitos dos fitossanitários na viabilidade celular - análises de azul de tripano

Dada a padronização do modelo celular 3D e a escolha dos fitossanitários a serem analisados, na sequência, para se corroborar os resultados dos ensaios de MTT quanto aos efeitos dos fitossanitários na viabilidade celular das culturas 3D, foram realizados ensaios de contagem celular na presença de azul de tripano. Nessas análises foram utilizadas células

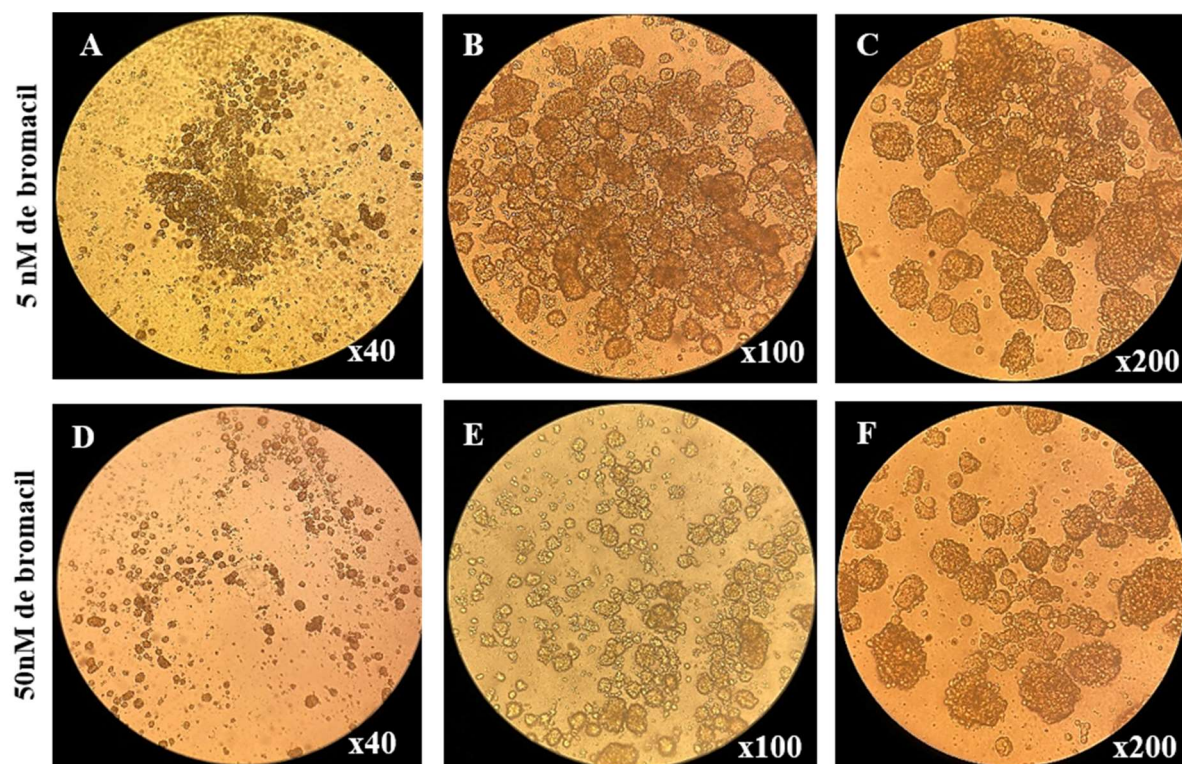
incubadas com os fitossanitários fipronil (2 μ M e 20 μ M) (Figura 24) e bromacil (5 nM e 50 nM) (Figura 25) por um intervalo de 24h após a formação dos esferoides.

Figura 24 - Análises de microscopia de campo claro de co-cultura de células hepáticas HepG2 e LX-2 cultivadas por 48h em substrato contendo 0,5% de alginato e 0,75% de ágar + 24h com (A, B e C) 2 μ M de fipronil e (D, E e F) 20 μ M de fipronil. (A e D) Ampliação de 40x. (B e E) Ampliação de 100x. (C e F) Ampliação de 200x.



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 25 - Análises de microscopia de campo claro de co-cultura de células hepáticas HepG2 e LX-2 cultivadas por 48h em substrato contendo 0,5% de alginato e 0,75% de ágar + 24h com (A, B e C) 5 nM de bromacil e (D, E e F) 50 nM de bromacil. (A e D) Ampliação de 40x. (B e E) Ampliação de 100x. (C e F) Ampliação de 200x.



Fonte: Arquivo pessoal.

As análises das co-culturas demonstraram viabilidade celular superior a 70% em todas as condições, mas com uma redução da mesma de maneira dose-dependente (Tabela 4).

Tabela 4 - Viabilidade celular após 24h da incubação dos fitossanitários fipronil e bromacil ao co-cultivo de células hepáticas no substrato contendo alginato de sódio e ágar.

Condição	Viabilidade
Controle	85,74%
Fipronil 2 μ M	80,17%
Fipronil 20 μ M	80,13%
Bromacil 5 nM	82,2%
Bromacil 50 nM	76,10%

Fonte: Elaborado pela autora.

Assim, considerando-se os resultados obtidos, que corroboram os resultados obtidos com as análises das células em cultura 2D, o modelo 3D estabelecido foi incubado com os fitossanitários fipronil e bromacil para correlacionar a toxicidade dos mesmos com os seus

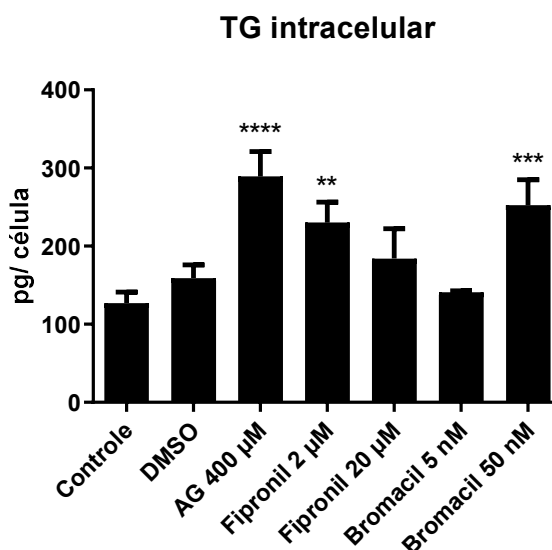
potenciais pró-esteatóticos pela mensuração de triglicerídeos e moléculas de glicose, como segue.

4.3 Indução de quadro simulador de condições pró-esteatóticas e mensuração de triglicerídeos e glicose

As células de mamíferos podem expressar diversas espécies lipídicas diferentes (MURO; ATILLA-GOKCUMEN; EGGERT, 2014), e na esteatose ocorre um desbalanço entre elas (BARBOSA, 2020). Um estudo publicado por Puri *et al* (2007) buscou identificar alterações na homeostase lipídica que podem ser importantes na fisiopatologia de DHGNA. Sua análise mostrou um aumento na composição de TGs, fosfolípidos e colesterol livre, corroborando, inclusive, na evidência existente de que o acúmulo de TGs é um fator-chave do fígado gorduroso (PURI *et al.*, 2007).

Assim, considerando-se essas informações e para corroborar a aplicabilidade do modelo 3D na avaliação de quadros pró-esteatóticos, níveis de triglicerídeos (TGs) e glicose foram mensuradas nas co-culturas após a exposição das mesmas aos fitossanitários fipronil e bromacil. Como controle experimental dos níveis de indução de condições pró-esteatóticas foram utilizadas 400 μ M da mistura de AG, como reportado anteriormente (tópico 4.1.1). A Figura 26 apresenta os resultados obtidos.

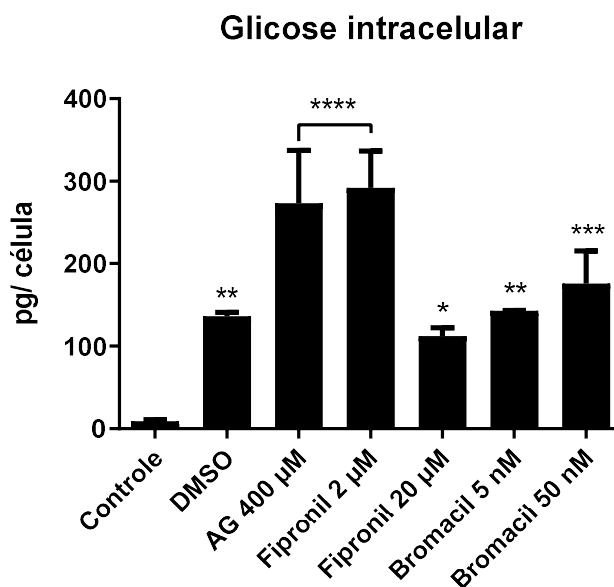
Figura 26 - Ensaio enzimático colorimétrico de triglicerídeos realizado por 24h em células co-cultivadas no modelo 3D padronizado na presença de AGs, fipronil 2 μ M e 20 μ M, e bromacil 5 nM e 50 nM. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Tukey, onde * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ em comparação com o controle.



Os resultados demonstraram aumentos estatisticamente significativos no acúmulo de TG na condição incubada com a mistura de AG, corroborando a funcionalidade do modelo. Cabe a observação de que os resultados da incubação com o solvente dos AGs, DMSO, são apresentados e apontam que o mesmo não interfere na indução do quadro pró-esteatótico. Paralelamente, observam-se alterações metabólicas nas culturas frente a incubação com os pesticidas. As análises processadas com o pesticida fipronil foram realizadas com concentrações acima da IDA (2 e 20 μM) recomendadas pela ANVISA, e os resultados apontam aumento de TG. Simultaneamente, bromacil em concentrações maiores que a IDA (50 nM) também apresentam aumento expressivo no acúmulo lipídico intracelular, sugerindo desbalanço metabólico e ambiente que pode favorecer quadros pró-esteatóticos.

Além dos AGs, os carboidratos também são importantes macromoléculas utilizadas na produção de energia (KIM, 2016). A metabolização da glicose, um importante carboidrato, gera piruvato que, por sua vez, será oxidado através do ciclo de Krebs na mitocôndria, gerando ATP (RUI, 2011). Dada tal característica, a Figura 27 mostra o acúmulo nos níveis de glicose nas culturas incubadas com os fitossanitários e demonstra um balanço global desses níveis, corroborando os efeitos desses agrotóxicos no metabolismo pro-esteatótico.

Figura 27 - Ensaio enzimático colorimétrico de glicose realizado por 24h em células co-cultivadas no modelo 3D padronizado na presença de AGs, Fipronil 2 μM e 20 μM , e Bromacil 5 nM e 50 nM. Os resultados foram submetidos à análise estatística *One Way ANOVA*, seguido pelo teste de Tukey, onde * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ em comparação com o controle.



Confrontando com os dados do TG, pode-se supor que, se há uma diminuição nos níveis de lipídeos celulares, é provável que a célula tente obter sua fonte de energia a partir de outro substrato, como a glicose. Logo, se há níveis menores de lipídeos na condição de 5 nM de bromacil, provavelmente a célula estaria utilizando a glicose para fins energéticos, o que explicaria seus níveis intracelulares reduzidos nesta condição.

5. CONCLUSÃO

O modelo 3D de co-cultura de células hepáticas HepG2 e LX-2 foi estabelecido e sua eficiência para a avaliação dos efeitos deletérios de fitossanitários no desenvolvimento de quadros pró-esteatóticos foi comprovada.

As análises demonstraram que as células hepáticas co-cultivadas no substrato preparado com 0,5% de alginato + 0,75% ágar por um intervalo de 48h formaram os melhores esferoides, com viabilidade superior a 70%.

O substrato 3D apresentou viabilidade celular satisfatória na concentração de 400 μ M de AGs após 24h de exposição, semelhantemente aos dados já obtidos em cultura 2D no nosso laboratório. Com relação aos fitossanitários investigados, o inseticida fipronil (nas concentrações 2 μ M e 20 μ M) e o herbicida bromacil (nas concentrações de 5 nM e 50 nM) puderam ser utilizados na padronização do modelo construído, por apresentaram menores resultados de citotoxicidade às células nas concentrações utilizadas.

A mensuração de TGs e glicose, após a exposição aos AGs e aos fitossanitários, demonstraram aumento estatisticamente significativo nos tratamentos quando comparados com o grupo controle, certificando a aplicabilidade do modelo 3D na avaliação do quadro pró-esteatótico. Futuras análises moleculares e celulares irão avaliar a sensibilidade do modelo para efetivamente comprovar o seu potencial biotecnológico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMALEK, Manal F. Nonalcoholic fatty liver disease: another leap forward. **Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 85-86, 8 jan. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-020-00406-0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41575-020-00406-0>. Acesso em: 2 mar. 2022.
- ABE-FUKASAWA, Natsuki *et al.* Novel 3D Liquid Cell Culture Method for Anchorage-independent Cell Growth, Cell Imaging and Automated Drug Screening. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-12, 26 fev. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-21950-5>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-21950-5>. Acesso em: 5 mar. 2022.
- ALHAQUE, Sharmin; THEMIS, Michael; RASHIDI, Hassan. Three-dimensional cell culture: from evolution to revolution. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [S.L.], v. 373, n. 1750, p. 20170216, 21 maio 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2017.0216>. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2017.0216>. Acesso em: 5 mar. 2022.
- AL-ERYANI, Laila *et al.* Identification of environmental chemicals associated with the development of toxicant associated fatty liver disease in rodents. **Toxicol Pathol**, [S.L.], v. 4, n. 43, p. 482-497, 2015. DOI: 10.1177/0192623314549960. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25326588/>. Acesso em: 15 ago. 2022.
- ALMEIDA, Helaine Mirelli de. **Influência dos extratos hidroalcoólicos da entrecasca e da folha de *Pseudobombax marginatum* (St. Hill) Rob. Ssobre o crescimento de células de câncer cervical**. 2016. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Naturais, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, 2016. Disponível em: <http://docplayer.com.br/58313012-Helaine-mirelli-de-almeida.html>. Acesso em: 25 ago. 2022.
- ANUSHIRAVANI, Amir; SEPANLOU, Sadaf Ghajarieh. Burden of Liver Diseases: a review from Iran. **Middle East Journal Of Digestive Diseases**, [S.L.], v. 11, n. 4, p. 189-191, 5 nov. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.15171/mejdd.2019.147>. Disponível em: <http://www.mejdd.org/index.php/mejdd/article/view/2171>. Acesso em: 1 fev. 2022.
- ARANHA, M. L. G., Garcia, *et al.* Biochemical and histopathological responses in peripubertal male rats exposed to agrochemicals isolated or in combination: A multivariate data analysis study. **Toxicology**, 447, 1-52, 2021.
- ARRESE, Marco *et al.* Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. **Digestive Diseases And Sciences**, [S.L.], v. 61, n. 5, p. 1294-1303, 3 fev. 2016.
- ARMSTRONG, Laura E.; GUO, Grace L. Understanding environmental contaminants' direct effects on non-alcoholic fatty liver disease progression. **Curr Environ Health Rep**, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 95-104, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s40572-019-00231-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40572-019-00231-x>. Acesso em: 27 fev. 2022.
- ASRANI, Sumeet K. *et al.* Burden of liver diseases in the world. **Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 151-171, jan. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>. Disponível em: [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(18\)32388-2/fulltext](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(18)32388-2/fulltext). Acesso em: 5 set. 2022.

- BANO, F.; MOHANTY, B. Thyroid disrupting pesticides mancozebe and fipronil in mixture caused oxidative damage and genotoxicity in lymphoid organs of mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 79, 1-8, 2020.
- BARBOSA, Thaís Porto. **Estabelecimento de um modelo celular pró-esteatótico e as particularidades mecanísticas de atuação do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico**. 2020. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2020.
- BARBOSA, E. A. *et al.* Evaluation of leaf and root absorptions of glyphosate in the growth of coffee plants. **Arquivos do Instituto Biológico**, 87, 1-8, 2020.
- BELCHIOR, D.C.V. *et al.* Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 34, n. 1, p. 135-151, 2014.
- BELLO, Alvin Bacero *et al.* Engineering and Functionalization of Gelatin Biomaterials: from cell culture to medical applications. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 164-180, 1 abr. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0256>. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.teb.2019.0256>. Acesso em: 24 nov. 2021.
- BENEDICT, M.; ZHANG, X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. **World journal of hepatology**, v. 9, n. 16, p. 715, 2017.
- BENNING, Leo *et al.* Assessment of hydrogels for bioprinting of endothelial cells. **Journal Of Biomedical Materials Research Part A**, [S.L.], v. 106, n. 4, p. 935-947, 29 nov. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.36291>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.a.36291>. Acesso em: 1 dez. 2021.
- BIANCHI, S. *et al.* Association between female reproductive health and mancozebe: Systematic review of experimental models. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 17(7), 1-15, 2020.
- BISSELL, D. Inflammation and Hepatic Fibrosis. **Semin Liver Dis**, v. 30, n. 03, p. 211-4, 2010.
- BRENES-GUILLÉN, Laura *et al.* Tolerance and sorption of Bromacil and Paraquat by thermophilic cyanobacteria *Leptolyngbya* 7M from Costa Rican thermal springs. **Journal Of Contaminant Hydrology**, [S.L.], v. 226, p. 103539, out. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconhyd.2019.103539>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0169772219301019?via%3Dihub>. Acesso em: 5 mai. 2022.
- BUGIANESI, Elisabetta; PETTA, Salvatore. NAFLD/NASH. **Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 77, n. 2, p. 549-550, ago. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2022.02.006>. Disponível em: [https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278\(22\)00081-2/fulltext](https://www.journal-of-hepatology.eu/article/S0168-8278(22)00081-2/fulltext). Acesso em: 25 nov. 2021.
- BUZZETTI, Elena; PINZANI, Massimo; TSOCHATZIS, Emmanuel A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism**, [S.L.], v. 65, n. 8, p. 1038-1048, ago. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2015.12.012>. Disponível em: [https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495\(15\)00383-2/fulltext](https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495(15)00383-2/fulltext). Acesso em: 25 nov. 2021.

CARRÃO, D. B. *et al.* In vitro inhibition of human CYP2D6 by the chiral pesticide fipronil and its metabolite fipronil sulfone: Prediction of pesticide-drug interactions. **Toxicology Letters**, 313, 196–204, 2019.

CHANG, Y.-N.; TSAI, T.-H. Preclinical transplacental transfer and pharmacokinetics of fipronil in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, 48(10), 886–893, 2020.

CHAUDHRY, G R; CORTEZ, L. Degradation of bromacil by a *Pseudomonas* sp. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 54, n. 9, p. 2203-2207, set. 1988. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.54.9.2203-2207.1988>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.54.9.2203-2207.1988>. Acesso em: 15 nov. 2021.

CHEN, Yen-Ying; YEH, Matthew M. Non-alcoholic fatty liver disease: a review with clinical and pathological correlation. **Journal Of The Formosan Medical Association**, [S.L.], v. 120, n. 1, p. 68-77, jan. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2020.07.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0929664620302953?via%3Dihub>. Acesso em: 15 dez. 2021.

CHOUDHARY, Narendra Singh; DUSEJA, Ajay. Genetic and epigenetic disease modifiers: non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and alcoholic liver disease (ALD). **Translational Gastroenterology And Hepatology**, [S.L.], v. 6, p. 1-17, jan. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.21037/tgh.2019.09.06>. Disponível em: <https://tgh.amegroups.com/article/view/5865/html>. Acesso em 16 mai. 2022.

CORRÒ, Claudia; NOVELLASDEMUNT, Laura; LI, Vivian S.W.. A brief history of organoids. **American Journal Of Physiology-Cell Physiology**, [S.L.], v. 319, n. 1, p. 151-165, 1 jul. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2020>. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpcell.00120.2020>. Acesso em: 3 mai. 2022.

COSTA, Lucio G. *et al.* Neurotoxicity of pesticides: a brief review. **Frontiers In Bioscience**, [S.L.], v. 13, p. 1240-1249, 2008.

CRUPKIN, Andrea C. *et al.* Evaluation of hematological parameters, oxidative stress and DNA damage in the cichlid *Australoheros facetus* exposed to the fungicide azoxystrobin. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 207, p. 111286, jan. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111286>.

DOMINGUEZ, Alfredo Nicolás *et al.* Experimental and theoretical vibrational study of the fungicide pyraclostrobin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S.L.], v. 259, p. 119888, out. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2021.119888>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651320311246?via%3Dihub>. Acesso em: 27 mar. 2022.

DUTRA, Rodrigo Marciel Soares; SOUZA, Murilo Mendonça Oliveira de. Impactos negativos do uso de agrotóxicos à saúde humana. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, [S.L.], v. 24, n. 13, p. 127-140, jun. 2017.

FREITAS, L. M. *et al.* Animal models in the neurotoxicology of 2,4-D. **Human & Experimental Toxicology**, 38(10), 1178–1182, 2019.

FRIEDMAN, S.L.. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiological reviews**, v. 88, n. 1, p. 125-172, 2008.

FRIEDRICH, Karen *et al.* Agrotóxicos: mais venenos em tempos de retrocessos de direitos. **Okara: Geografia em Debate**, João Pessoa, v. 12, n. 2, p. 326-348, 2018.

GAMA, Allyne Ferreira. **Avaliação espaço/temporal e influência da composição sedimentar na distribuição dos agrotóxicos mais utilizados na mesorregião do Rio Jaguaribe - Goiás**. 2018. 174 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Marinhas Tróicas, O Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

GAMA, Patrícia. Órgãos associados ao sistema digestório. In: JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; SILVA FILHO, José Carneiro da. **Histologia básica: texto e atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2017. Cap. 16. p. 330-343. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527732178/cfi/6/10!/4/2/2/4@0:67.2>. Acesso em: 2 fev. 2022.

GAMEIRO, Nathália. **Debate aborda impactos de agrotóxicos na saúde e meio ambiente**. Fiocruz, Brasília. 2018.

GODOI, Emiliano Lobo de; DOMINGOS, Ana Tereza Souza. Políticas Públicas e sua interface com o consumo de agrotóxicos no Brasil. **Revista Direitos Sociais e Políticas Públicas (Unifafibe)**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 181-212, 22 dez. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.25245/rdsp.v8i3.813>. Disponível em: <https://portal.unifafibe.com.br/revista/index.php/direitos-sociais-politicas-pub>. Acesso em: 21 out. 2021.

GONÇALVES, O. S. *et al.* Glyphosate-induced impact on the functional traits of the *Bacillus* sp. FC1 isolate. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 50, 1-7, 2020.

HABANJAR, Ola *et al.* 3D Cell Culture Systems: tumor application, advantages, and disadvantages. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 22, p. 12200, 11 nov. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222212200>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/22/12200>. Acesso em: 26 jan. 2022.

HARDY, T. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and disease spectrum. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, p. 451-496, 2016.

HERNANDEZ-GEA, V.; FRIEDMAN, S.L.. **Pathogenesis of Liver Fibrosis**. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, v. 6, n. 1, p. 425-56, 2011.

HEYMANN, Felix; TACKE, Frank. Immunology in the liver - from homeostasis to disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 88-110, 13 jan. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2015.200>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2015.200>. Acesso em: 16 jan. 2022.

HORN, Christian L. *et al.* Role of Cholesterol-Associated Steatohepatitis in the Development of NASH. **Hepatology Communications**, [S.L.], v. 6, n. 1, p. 12-35, 24 ago. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/hep4.1801>. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep4.1801>. Acesso em: 23 mai. 2022.

HOWELL, G. *et al.* **Alterations in cellular lipid metabolism produce neutral lipid accumulation following exposure to the organochlorine compound trans-non achlor in rat primary hepatocytes**. Department of Basic Sciences, Mississippi State University College of Veterinary Medicine, Mississippi State, Mississippi. Environmental Toxicology. 2018.

HUANG, Yongcheng; COHEN, Jonathan C.; HOBBS, Helen H. Expression and Characterization of a PNPLA3 Protein Isoform (I148M) Associated with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 286, n. 43, p. 37085-37093, out. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m111.290114>. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)50735-7/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)50735-7/fulltext). Acesso em: 14 abr. 2022.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**, Os 10 ingredientes ativos mais vendidos. Brasil: Autor. 2020. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#>. Acesso em: 14 abr. 2022.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Agrotóxico**. 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos>. Acesso em: 18 abr. 2021.

JAMES, Trevor K. *et al.* Degradation of atrazine and bromacil in two forestry waste products. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-12, 8 fev. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-021-83052-z>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-83052-z>. Acesso em: 2 set. 2022.

JENSEN, Caleb; TENG, Yong. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? **Frontiers In Molecular Biosciences**, [S.L.], v. 7, p. 1-15, 6 mar. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2020.00033/full>. Acesso em: 2 set. 2022.

JIAO, Weijie *et al.* Study of Several Alginate-Based Hydrogels for In Vitro 3D Cell Cultures. **Gels**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 147, 27 fev. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/gels8030147>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2310-2861/8/3/147>. Acesso em: 25 jul. 2022.

KARANJIA, R. N. *et al.* Hepatic steatosis and fibrosis: Non-invasive assessment. **World journal of gastroenterology**, v. 22, n. 45, p. 9880, 2016.

KARTHEEK, R.M.; DAVID, M. Assessment of fipronil toxicity on wistar rats: a hepatotoxic perspective. **Toxicology Reports**, [S.L.], v. 5, p. 448-456, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.02.019>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29854616/>. Acesso em: 05 out. 2022.

KIM, J. B. Dynamic cross talk between metabolic organs in obesity and metabolic diseases. **Experimental & molecular medicine**, v. 48, n. 3, p. e214-e214, 2016.

KIM, Y. A. *et al.* Distribution of fipronil in humans, and adverse health outcomes of in utero fipronil sulfone exposure in newborns. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 222(3), 524-532, 2019.

KLINGELHÖFER, D. *et al.* Glyphosate: How do ongoing controversies, market characteristics, and funding influence the global research landscape? **Science of The Total Environment**, 765, 1-13, 2021.

KMIEC, Z. Cooperation of liver cells in health and disease: with 18 tables. **Springer Science & Business Media**, 2001.

LARA, Stephanie Sommerfeld de *et al.* A agricultura do agronegócio e sua relação com a intoxicação aguda por agrotóxicos no Brasil. **Hygeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, [S.L.], v. 15, n. 32, p. 1-19, 22 out. 2019. DOI:

<http://dx.doi.org/10.14393/hygeia153246822>. Disponível em:

<https://seer.ufu.br/index.php/hygeia/article/view/46822>. Acesso em: 25 jul. 2022.

LEE, Gun-Hwi; CHOI, Kyung-Chul. Adverse effects of pesticides on the functions of immune system. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S.L.], v. 235, p. 1-7, set. 2020.

LI, X., *et al.* Determination of residual fipronil and its metabolites in food samples: A review. **Trends in Food Scienc & Technology**, 97, 185–195, 2020.

LIANG, S., *et al.* Fipronil residues and risk assessment of Chinese marketed fruits and vegetables: A long-term investigation over 6 years. **Food Control**, 106, 1-19, 2019.

LIN, H. *et al.* Role of microRNAs in inflammation-associated liver cancer. **Cancer Biol Med**, v. 13, n. 4, p. 407-425, 2016.

LIU, Y. *et al.* Inflammation: The Common Pathway of Stress-Related Diseases. **Front Hum Neurosci**, v. 11, 2017.

LIVERTOX. **LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]**. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012. Pyrimidine Analogues. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548604/>. Acesso em: 5 out. 2022.

LÓPEZ-MARCIAL, Gabriel R. *et al.* Agarose-Based Hydrogels as Suitable Bioprinting Materials for Tissue Engineering. **Acs Biomaterials Science & Engineering**, [S.L.], v. 4, n. 10, p. 3610-3616, 14 set. 2018. American Chemical Society (ACS). DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00903>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsbiomaterials.8b00903>. Acesso em: 13 set. 2022.

LOZANO, V. L. *et al.* Primary production of freshwater microbial communities is affected by a cocktail of herbicides in an outdoor experiment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 201, 1-11, 2020.

LUZ, Anthony L. *et al.* The high-production volume fungicide pyraclostrobin induces triglyceride accumulation associated with mitochondrial dysfunction, and promotes adipocyte differentiation independent of PPAR γ activation, in 3T3-L1 cells. **Toxicology**, [S.L.], v. 393, p. 150-159, jan. 2018. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2017.11.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300483X17303402?via%3Dihub>. Acesso em: 13 set. 2022.

MANNE, Vignan; HANDA, Priya; KOWDLEY, Kris V.. Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease/Nonalcoholic Steatohepatitis. **Clinics In Liver Disease**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 23-37, fev. 2018. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cld.2017.08.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1089326117300685?via%3Dihub>. Acesso em: 13 set. 2022.

MAO *et al.* Embryonic development and oxidative stress effects in the larvae and adult fish livers of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to the strobilurin fungicides, kresoxim-methyl and pyraclostrobin. **Science Of The Total Environment**, China, v. 729, ago. 2020. 139031. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139031>. Acesso em: 13 jan. 2022.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Registros concedidos - 2005 – 2020**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>. Acesso em: 16 abr. 2021.

MARCATO, A. C. C. *et al.* Herbicide 2,4-d: A review of toxicity on non-target organisms. **Water, Air, & Soil Pollution**, 228(3), 1-12, 2017.

MEDEIROS, H. C. D. *et al.* Effect of fipronil on energy metabolism in the perfused rat liver. **Toxicology Letters**, 236(1), 34–42, 2015.

MENDONÇA, Lisbeth Menezes *et al.* Associação entre aumento de peso e fatores de risco cardiovascular em pacientes com doença hepática gordurosa não alcoólica. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, [S.L.], v. 50, n. 1, p. 36-44, 2021.

MERCK. **Collagen Attachment Protocols, Solubility, and Stability**. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/collagen-product-protocols>. Acesso em: 28 set. 2022.

MESNAGE, R. *et al.* Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. **Scientific Reports**, 7(1), 1–15, 2017.

MESSINA, Antonietta *et al.* Pluripotent-Stem-Cell-Derived Hepatic Cells: hepatocytes and organoids for liver therapy and regeneration. **Cells**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 1-22, 12 fev. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells9020420>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/2/420>. Acesso em: 1 out. 2022.

MOHAMMADI-SARDOO, Mohaddeseh *et al.* Cytotoxicity of mancozeb on Sertoli–germ cell co-culture system: role of mapk signaling pathway. **Toxicology And Industrial Health**, [S.L.], v. 37, n. 11, p. 674-684, 13 out. 2021. SAGE Publications. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/07482337211044028>. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/07482337211044028>. Acesso em: 14 abr. 2022.

MOLICA, LR; BARRETO, II; MORAES, KCM Doenças fitossanitárias e hepáticas no Brasil: um desafio de saúde pública no Brasil. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, [S.L.], v. 10, n. 9, pág. e15910917835, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i9.17835. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/17835>. Acesso em: 14 abr. 2022.

MONSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. **Journal of Immunology Methods**, [S.L.], v. 65, n. 12, p. 55-63, 1983.

MOON, Andrew M.; SINGAL, Amit G.; TAPPER, Elliot B.. Contemporary Epidemiology of Chronic Liver Disease and Cirrhosis. **Clinical Gastroenterology And Hepatology**, [S.L.], v. 18, n. 12, p. 2650-2666, nov. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2019.07.060>. Disponível em: [https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565\(19\)30849-3/fulltext](https://www.cghjournal.org/article/S1542-3565(19)30849-3/fulltext). Acesso em: 17 jun. 2022.

MORAVCOVA, A. *et al.* The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture. **Physiological research**, [S.L.], v. 64, p. S627, 2015.

MOREIRA, Josino C. *et al.* Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 299-311, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-81232002000200010>. Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/csc/a/6dhP7dyPDNVqfTrn4ccKqJF/?lang=pt>. Acesso em: 15 jun. 2022.

MURO, E.; ATILLA-GOKCUMEN, G. E.; EGGERT, U. S.L. lipids in cell biology: how can we understand them better? **Molecular biology of the cell**, [S.L.], v. 25, n. 12, p. 1819-1823, 2014.

NAASRI, Sahar *et al.* N -acetylcysteine reduced the immunotoxicity effects induced in vitro by azoxystrobin and iprodione fungicides in mice. **Environmental Toxicology**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 562-571, 23 nov. 2020.

NASCIMENTO, D. Z. do, *et al.* O desafio das agências reguladoras ao redor do mundo no uso do glifosato. **Saúde e Sociedade**, [S.L.], 28(4), 297–298, 2019.

NELSON, David L.; COX, Michael M. Catabolismo dos ácidos graxos. In: NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. Cap. 17. p. 650-668. Disponível em:

<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582715345/>. Acesso em: 16 fev. 2022.

NI, Y. ao *et al.* Pathological process of liver sinusoidal endothelial cells in liver diseases. **World journal of gastroenterology**, [S.L.], v. 23, n. 43, p. 7666, 2017.

NORONHA, Victor Fernando Costa Macedo *et al.* Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica e Síndrome Metabólica. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [S.L.], n. 57, p. 4095, 27 ago. 2020. Revista Eletronica Acervo Saude. DOI:

<http://dx.doi.org/10.25248/reas.e4095.2020>. Disponível em:

<https://acervomais.com.br/index.php/saude/article/view/4095>. Acesso em: 17 out. 2021.

NOOIJER, Annemiek De *et al.* A narrative review of factors associated with the development and progression of non-alcoholic fatty liver disease. **Gastrohep**, [S.L.], p. 180-191, 2 ago. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ygh2.354>. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ygh2.354>. Acesso em: 2 jun. 2022.

PACIFICO, Lucia *et al.* Pediatric nonalcoholic fatty liver disease: a clinical and laboratory challenge. **World Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 2, n. 7, p. 275-288, 27 jul. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.4254/wjh.v2.i7.275>. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v2/i7/275.htm>. Acesso em: 21 jul. 2022.

PARREIRA, Douglas Ferreira *et al.* Resistência de Fungos a Fungicidas Inibidores de Quinona. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 24-35, 2009.

PETTA, Salvatore *et al.* Pathophysiology of Non Alcoholic Fatty Liver Disease.

International Journal Of Molecular Sciences, [S.L.], v. 17, n. 12, p. 2082, 11 dez. 2016.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17122082>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/17/12/2082>. Acesso em: 13 ago. 2022.

PORTIER, C. J. A comprehensive analysis of the animal carcinogenicity data for glyphosate from chronic exposure rodent carcinogenicity studies. **Environmental Health**, [S.L.], 19(1), 1-18, 2020.

PURI, P. et al. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, [S.L.], v. 46, n. 4, p. 1081-1090, 2007.

RAMOS, Letícia Ferreira. **Análise funcional do microRNA-1914-5p no metabolismo lipídico e associação com o processo pró-esteatótico em hepatócitos humanos**. 2020. 166 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2020.

RAMOS, Maria Lúcia Henrique *et al.* Perfil epidemiológico dos casos de intoxicação por agrotóxicos de 2013 a 2017 no Brasil. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 6, n. 7, p. 43802-43813, 2020. Brazilian Journal of Development. DOI: <http://dx.doi.org/10.34117/bjdv6n7-119>. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/12751/10700>. Acesso em: 25 ago. 2022.

RAVI, Maddaly *et al.* 3D Cell Culture Systems: advantages and applications. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 230, n. 1, p. 16-26, 29 set. 2014. Wiley. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.24683>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.24683>. Acesso em: 21 dez. 2021.

REGUEIRO, Jorge *et al.* Toxicity evaluation of new agricultural fungicides in primary cultured cortical neurons. **Environmental Research**, [S.L.], v. 140, p. 37-44, jul. 2015. Elsevier BV. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2015.03.013>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0013935115000845?via%3Dihub>. Acesso em: 23 nov. 2021.

RESS, Claudia; KASER, Susanne. Mechanisms of intrahepatic triglyceride accumulation. **World Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 22, n. 4, p. 1664-1673, 28 jan. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i4.1664>. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v22/i4/1664.htm>. Acesso em: 21 set. 2022.

RICHARDSON, Jason R. *et al.* Neurotoxicity of Pesticides. **Acta Neuropathol**, [S.L.], v. 3, n. 138, p. 343-362, set. 2019.

RICCHI, M. et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. **Journal of gastroenterology and hepatology**, [S.L.], v. 24, n. 5, p. 830-840, 2009.

RIGOTTO, Raquel Maria; AGUIAR, Ada Cristina Pontes. Por que morreu VMS? Sentinelas do desenvolvimento sob o enfoque socioambiental crítico da determinação social da saúde. **Saúde Debate**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 112, p. 92-109, 2017.

RODRIGUES, Elsa Teresa *et al.* Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: a review. **Environment International**, [S.L.], v. 53, p. 18-28, mar. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.12.005>. Acesso em: 13 jan. 2022.

RODRIGUEZ, Montserrat A. de La Rosa; KERSTEN, Sander. Regulation of lipid droplet-associated proteins by peroxisome proliferator-activated receptors. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, [S.L.], v. 1862, n. 10, p. 1212-1220, out. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.07.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1388198117301385?via%3Dihub>. Acesso em: 13 jan. 2022.

ROQUES, B. B. *et al.* Cyp450-dependent biotransformation of the insecticide fipronil into fipronil sulfone can mediate fipronil-induced thyroid disruption in rats. **Toxicological Sciences**, [S.L.], 127(1), 29-41, 2012.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. **Comprehensive physiology**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 177-197, 2011.

RUNKLE, J., Flocks, J. *et al.* A systematic review of Mancozebe as a reproductive and developmental hazard. **Environment International**, [S.L.], 99, 29-42, 2017.

SADARIA, A. M. *et al.* Retrospective nationwide occurrence of fipronil and its degradates in U.S. wastewater and sewage sludge from 2001—2016. **Water Research**, [S.L.], 155, 465–473, 2019.

SANTELLO, Lara Cavalari. **Análise do potencial indutor de esteatose hepática dos fitossanitários CURBIX® 200 SC e REGENT® 80 WG em linhagem celular HEPG2**. 2020. 49 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2020.

SENOO, H. *et al.* **Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative –past, present and future**. *Cell Biology International*, [S.L.], v. 34, n. 12, p. 1247-72, 2010.

SESHOKA, M., *et al.* Endocrine-disrupting activity of the fungicide mancozebe used in the Vhembe District of South Africa. **African Journal of Aquatic Science**, [S.L.], 46(1), 100–109, 2021.

SHAUNAK, Meera *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease and childhood obesity. **Archives Of Disease In Childhood**, [S.L.], v. 106, n. 1, p. 3-8, 14 mai. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2019-318063>. Disponível em: <https://adc.bmj.com/content/106/1/3>. Acesso em: 23 abr. 2022.

SILVA, Alline Moraes. **Análise da utilização de agrotóxicos no brasil**. 2018. 57 f. Monografia (Especialização) - Curso de Agronomia, Departamento de Economia Agrícola, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018. Disponível em: http://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/35515/1/tcc_2018_amsilva.pdf. Acesso em: 16 abr. 2021.

SILVA, L. C. M. *et al.* Acute and chronic toxicity of 2,4-D and fipronil formulations (Individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Ecotoxicology**, [S.L.], 29(9), 1462–1475, 2020.

SILVA, Rafaela Rodrigues da. **Plantas medicinais no tratamento da doença hepática gordurosa: uma revisão da literatura e uma avaliação do conhecimento popular**. 2021. 83 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2020.

SINGH, Sukhpreet; OSNA, Natalia A.; KHARBANDA, Kusum K. Treatment options for alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease: a review. **World Journal Of Gastroenterology**, [S.L.], v. 23, n. 36, p. 6549-6570, 28 set. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v23.i36.6549>. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v23/i36/6549.htm>. Acesso em: 14 jan. 2022.

SOARES, Luís Henrique *et al.* Aplicação de diferentes estrobilurinas na cultura da soja. **Revista da Fzva**, Uruguaiana, v. 18, n. 1, p. 78-97, 2011. Disponível em: <http://repositorio.bc.ufg.br/handle/ri/13997>. Acesso em: 14 jan. 2022.

- SOUDANI, N. *et al.* Glyphosate disrupts redox status and up-regulates metallothionein I and II genes expression in the liver of adult rats. Alleviation by quercetin. **General physiology and biophysics**, [S.L.], 38(02), 123–134, 2019.
- SOUZA, Gustavo dos Santos *et al.* Presença de agrotóxicos na atmosfera e risco à saúde humana: uma discussão para a vigilância em saúde ambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 22, n. 10, p. 3269-3280, out. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1413-812320172210.18342017>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/MgCbWzKQ6bYyWMKxhdCJGTg/?lang=pt>. Acesso em: 2 out. 2022.
- STEPANOVA, Maria *et al.* Direct and Indirect Economic Burden of Chronic Liver Disease in the United States. **Clinical Gastroenterology And Hepatology**, [S.L.], v. 15, n. 5, p. 759-766, mai. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cgh.2016.07.020>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356516304414>. Acesso em: 3 mar. 2022.
- SUN, Xue *et al.* Protective effects of glycyrrhizic acid against non-alcoholic fatty liver disease in mice. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 806, p. 75-82, jul. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.04.021>. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299917302765> Acesso em: 30 jan. 2022.
- TOFANI, Larissa Bueno. **Estabelecimento de sistemas de cultivo tridimensionais (3D) utilizando células de câncer de ovário como plataforma para ensaios de toxicidade**. 2019. 136 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/ Usp, Ribeirão Preto, 2019. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-22092021-143825/publico/Tese_simplificada_corrigida.pdf. Acesso em: 15 set. 2022.
- VICINI, J. L. *et al.* Glyphosate in livestock: Feed residues and animal health1. **Journal of Animal Science**, [S.L.], 97(11), 4509–4518, 2019.
- VIDAU, C. *et al.* **Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y**. *NeuroToxicology*. 2011.
- VIEIRA, Karina Amante; RIEGER, Débora Kurrle; DALTOÉ, Felipe Perozzo. Tratamento nutricional na doença hepática gordurosa não alcoólica: aspectos relevantes na composição de macronutrientes. **Demetra: Alimentação, Nutrição e Saúde**, Florianópolis, v. 15, p. 1-15, 2020.
- WALLACE, M.; MANN, D.; FRIEDMAN, S. Emerging and Disease-Specific Mechanisms of Hepatic Stellate Cell Activation. **Seminars In Liver Disease**, [S.L.], v. 35, n. 02, p. 107-18, 2015.
- WANG, Kai *et al.* Respiratory Toxicity of Azoxystrobin, Pyraclostrobin and Coumoxystrobin on *Chlorella vulgaris*. **Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology**, [S.L.], v. 104, n. 6, p. 799-803, 9 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-020-02869-y>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00128-020-02869-y>. Acesso em 17 set. 2022.
- WHO. Int. World Health Organization. (2020). **The top 10 causes of death**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Acesso em: 02 fev. 2022.
- WILLIAMS, Ryan M. *et al.* In Vitro Selection of a Single-Stranded DNA Molecular Recognition Element Specific for Bromacil. **Journal Of Nucleic Acids**, [S.L.], v. 2014, p. 1-

8, 2014. Hindawi Limited. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/102968>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jna/2014/102968/>. Acesso em: 21 set. 2022.

XU, L. *et al.* Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. **Gut**, [S.L.], v. 54, n. 1, p. 142-151, 2005.

YANG, Jason S.; PARK, Yeonhwa. Insecticide Exposure and Development of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 66, n. 39, p. 10132-10138, 7 set. 2018. American Chemical Society (ACS). DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03177>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.8b03177>. Acesso em 17 nov. 2021.

ZÁMBÓ, Veronika *et al.* Lipotoxicity in the liver. **World Journal Of Hepatology**, [S.L.], v. 5, n. 10, p. 550-557, 27 out. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.4254/wjh.v5.i10.550>. Disponível em: <https://www.wjgnet.com/1948-5182/full/v5/i10/550.htm>. Acesso em: 23 set. 2021.

ZENG, X. *et al.* Banana condensed tannins scavenge glyphosate in aqueous solution through non-covalent interaction. **S.L.WT**, [S.L.], 131, 1-6, 2020.

ZHANG, B. *et al.* Interactions of fipronil within fish and insects: Experimental and molecular modeling studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S.L.], 66(23), 5756-5761, 2018.

ZHANG, Cheng *et al.* Ecotoxicology of strobilurin fungicides. **Science Of The Total Environment**, China, v. 742, p. 1-8, nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140611>. Acesso em: 13 jan. 2022.

ZHAO, Juanjuan *et al.* Pathological functions of interleukin-22 in chronic liver inflammation and fibrosis with hepatitis B virus infection by promoting T helper 17 cell recruitment. **Hepatology**, [S.L.], v. 59, n. 4, p. 1331-1342, 1 mar. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/hep.26916>. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.26916>. Acesso em: 25 jan. 2022.

ZUANAZZI, N. R. *et al.* Analysis of global trends and gaps for studies about 2,4-D herbicide toxicity: A scientometric review. **Chemosphere**, [S.L.], 241, 1-12, 2020.