

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/04/2023.



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

DANIELLE GABRIEL SELOTO

**Mecanismos de danos mitocondriais induzidos pelo
Diuron e seus metabólitos em mitocôndrias hepáticas**

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

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Cristina Pereira
Coorientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo

Botucatu

2021

DANIELLE GABRIEL SELOTO

Mecanismos de danos induzidos pelo Diuron e seus
metabólitos em Mitocôndrias Hepáticas

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

Orientadora: Profa. Dra. Lilian Cristina Pereira
Coorientador: Prof. Dr. João Lauro Viana de Camargo

Botucatu

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Seloto, Danielle Gabriel.

Mecanismos de dano induzidos pelo Diuron e seus
metabólitos em mitocôndrias hepáticas / Danielle Gabriel
Seloto. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Lilian Cristina Pereira

Coorientador: João Lauro de Vianna Camargo

Capes: 40105008

1. Diuron. 2. Mitocôndrias hepáticas. 3. Exposição a
praguicidas. 4. Citotoxicidade.

Palavras-chave: Análises toxicológicas in vitro;
Mitocôndria; Patologia toxicológica.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.” Marie Curie.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” Madre Teresa de Calcutá.

DEDICATÓRIA

À minha família

Dedico este trabalho à minha família, que é a minha base, em especial minha mãe Silvia Helena Gabriel que é minha referência e melhor amiga e esteve comigo em todos os meus processos não medindo esforços para me ajudar a realizar meus sonhos e ao meu padrasto André Ricardo que me acolheu como filha dando suporte, educação e amor incondicional. Dedico também aos meus avós Nelson Gabriel, Sônia Gabriel (Em memória), Aloísio Seloto (Em memória) e Ana Seloto e às minhas tias Rafaela Seloto e Maria José Gabriel que contribuíram muito na minha educação e formação pessoal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me dar forças em todos os momentos, sem Ele não seria possível e eu não teria chegado até aqui.

Em segundo lugar agradeço imensamente à minha orientadora Dra. Lilian Cristina Pereira por confiar no meu potencial e contribuir para meu desenvolvimento científico com muito carinho e atenção.

Agradeço ao Dr. João Lauro de Viana Camargo pela coorientação no trabalho, e também aos meus colegas de laboratório Thania Rios, Ítalo Bertoni, Bianca Lopes, Paulo Roberto, Joyce Rizzi e Taynara Aparecida, que em todos momentos me auxiliaram, ensinaram e fizeram parte da rotina do laboratório.

Agradeço a todos os funcionários da UNIPEX que de alguma forma auxiliaram esse projeto ser concretizado, e a todos meus amigos que fazem parte da minha vida, pelo apoio moral e conselhos.

Agradeço ao CNPq pelo auxílio financeiro concedido a este projeto (Processo no. 133611/2019-1).

SUMÁRIO

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

Capítulo 1 - Revisão da Literatura

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

Capítulo 2 - Manuscrito

1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. Animais experimentais	15
2.2. Isolamento mitocondrial	15
2.3. Respiração mitocondrial	16
2.4. Potencial de membrana mitocondrial	16
2.5. Inchamento mitocondrial	17
2.6. Lipoperoxidação de membrana	17
2.7. Níveis mitocondriais de grupos sulfidril de proteínas de membrana	18
2.8. Monitoramento de formação de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERONs)	18

2.9. Avaliação do Estado Redox dos Nucleotídeos de Piridina.....	19
2.10. Análise estatística	20
3. RESULTADOS.....	21
4. DISCUSSÃO	48
5. CONCLUSÃO	54
6. REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO 1.....	70

RESUMO

A utilização de praguicidas é motivo de preocupação devido aos possíveis efeitos tóxicos para a saúde humana. Entre os praguicidas, o Diuron, um composto derivado da ureia, é o décimo segundo herbicida mais vendido no Brasil, apesar de sua classificação pela Agência de Proteção Ambiental norte-americana (USEPA) como “provável cancerígeno para a espécie humana”. Sucessivos estudos sobre o potencial modo de ação (MoA) cancerígeno do Diuron no urotélio de ratos foram publicados por nosso grupo de pesquisa TOXICAM em periódicos com política editorial seletiva no exterior. No entanto, permanecem desconhecidos qual é o mecanismo de ação citotóxica deste herbicida, e qual de suas formas é responsável pela citotoxicidade, se o Diuron parental ou algum de seus metabólitos. Os estudos sobre o MoA do herbicida permitiram levantar a hipótese de que ele exerce sua toxicidade por provocar dano mitocondrial (mitotoxicidade). Levando em consideração que a biotransformação inicial do Diuron ocorre no fígado, o presente estudo procurou explorar aquela hipótese pela avaliação *in vitro* dos danos de mitocôndrias isoladas do fígado de ratos Wistar jovens. As mitocôndrias foram expostas ao Diuron ou a cada um de seus dois principais metabólitos, já demonstrados como citotóxicos para células humanas: 3,4-diclorofenilureia (DCPU) e 3,4-dicloroanilina (DCA). Nossos achados sugerem que o Diuron e seus metabólitos provocam ação desacopladora da fosforilação oxidativa, o que foi evidenciado pela dissipação do potencial de membrana mitocondrial e do consumo de oxigênio basal. Também, demonstramos que o metabólito DCA causou inchamento mitocondrial na sua maior concentração testada, um indicador morfofuncional de grave dano da organela. Nossos achados sugerem que o Diuron e seus metabólitos DCA e DCPU podem ser classificados como mitotóxicos, uma vez que foi observada disfunção mitocondrial.

ABSTRACT

The use of pesticides is of concern because of the possible toxic effects on human health. Among pesticides, Diuron, a compound derived from urea, is the twelfth best-selling herbicide in Brazil, despite its classification by the North American Environmental Protection Agency (USEPA) as "probable carcinogen for the human species". Successive studies on the potential carcinogenic mode of action (MoA) of Diuron in the urothelium of rats have been published by our research group TOXICAM in journals with selective editorial policy abroad. However, it remains unknown what is the mechanism of cytotoxic action of this herbicide, and which of its forms is responsible for cytotoxicity, whether the parental Diuron or any of its metabolites. Studies on the herbicide's MoA have raised the hypothesis that it exerts its toxicity by causing mitochondrial damage (mitotoxicity). Taking into account that the initial biotransformation of Diuron occurs in the liver, the present study sought to explore that hypothesis by assessing the *in vitro* damage of mitochondria isolated from the liver of young Wistar rats. Mitochondria were exposed to Diuron or to each of its two main metabolites, which have already been shown to be cytotoxic to human cells: 3,4-dichlorophenylurea (DCPU) and 3,4-dichloroaniline (DCA). Our findings suggest that Diuron and its metabolites cause decoupling action from oxidative phosphorylation, which was evidenced by the dissipation of the mitochondrial membrane potential and the consumption of basal oxygen. We also demonstrated that the DCA metabolite caused mitochondrial swelling at its highest tested concentration, a morphofunctional indicator of severe organelle damage. Our findings suggest that Diuron and its metabolites DCA and DCPU can be classified as mitotoxicants, since mitochondrial dysfunction has been observed.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Efeitos do Diuron sob a fosforilação oxidativa utilizando Succinato como substrato oxidável.....	Página 22
FIGURA 2: Efeitos do DCA sob a fosforilação oxidativa utilizando Succinato como substrato oxidável.....	Página 23
FIGURA 3: Efeitos do DCPMU sob a fosforilação oxidativa utilizando Succinato como substrato oxidável.....	Página 24
FIGURA 4: Efeitos do Diuron sob a fosforilação oxidativa utilizando Glutamato e Malato como substrato oxidável.....	Página 25
FIGURA 5: Efeitos do DCA sob a fosforilação oxidativa utilizando Glutamato e Malato como substrato oxidável.....	Página 26
FIGURA 6: Efeitos do DCPMU sob a fosforilação oxidativa utilizando Glutamato e Malato como substrato oxidável.....	Página 27
FIGURA 7: Análise do Potencial de Membrana em mitocôndrias expostas ao Diuron	Página 29
FIGURA 8: Análise do Potencial de Membrana em mitocôndrias expostas ao DCA.....	Página 30
FIGURA 9: Análise do Potencial de Membrana em mitocôndrias expostas ao DCPMU.....	Página 31
FIGURA 10: Intumescimento osmótico mitocondrial após exposição ao Diuron	Página 33
FIGURA 11: Intumescimento osmótico mitocondrial após exposição ao DCA	Página 34
FIGURA 12: Intumescimento osmótico mitocondrial após exposição ao DCPMU.....	Página 35
FIGURA 13: Intumescimento osmótico mitocondrial com inibidores e DCA 500.....	Página 37

- FIGURA 14:** Formação e acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERONs) após exposição ao Diuron....Página 39
- FIGURA 15:** Formação e acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERONs) após exposição ao DCA.....Página 40
- FIGURA 16:** Formação e acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERONs) após exposição ao DCPMU..Página 41
- FIGURA 17:** Espécies Reativas ao Ácido Tio Barbitúrico (TBARs) induzidos pelo Diuron, DCA e DCPMU.....Página 43
- FIGURA 18:** Efeitos do Diuron, DCA e DCPMU sobre a oxidação dos grupos tiólicos de proteínas de membrana mitocondrial....
.....Página 45
- FIGURA 19:** Níveis de NAD(P)H em mitocôndrias expostas ao Diuron, DCA e DCPMU.....Página 47

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: Adenosine 5' Difosfato

ADP/o: Razão de ADP por Oxigênio

ANOVA: Análise de Variância

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

BSA: Albumina Soro Bovino

Ca⁺²: Cálcio

CCCP: Cianeto de Carbonila Clorofenilhidrazona

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CEMIB: Centro Multidisciplinar para investigação Biológica

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CN: Controle Negativo

CP: Controle Positivo

CsA: Ciclosporina A

Da: Daltons

DCA: 3,4 DicloroAnilina

DCPU: 3,4 Dicloro Fenil Ureia

DCPMU: 3-(3,4 Dicloro Fenil) 1-Metil Ureia

DNA: Ácido Desoxiribonucleíco

DMSO: Dimetil Sulfóxido

EGTA: Ácido Etilenoglicol bis (L-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético

ERONs: Espécies Reativas de Oxigênio e nitrogênio

EUA: Estados Unidos da América

GSH: Glutationa reduzida

GSSG: Glutationa Oxidada

H2DCFD: A 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

H2O2: Peróxido de Hidrogênio

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

KCl: Cloreto de Potássio

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MOA: Modo de Ação

mtDNA: Ácido Desoxiribonucleico Mitocondrial

mV: Milivolts

NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato) (forma reduzida)

NaOH: Hidróxido de Sódio

NAC: N acetil Cisteína

NEM: N-etil-maleimina

Nm: nanômetros

OH $\cdot$: Radical Hidroxil

OPT : α -ftalaldeído

PCA: principal component analysis

PI: Fosfato Inorgânico

PTP: Poro de Transição de Permeabilidade

PM: Peso Molecular

PMM: Permeabilidade da Membrana Mitocondrial

RCR: Razão de Controle Respiratório

RR: Rutênio Red

TBA: Ácido Tio Barbitúrico

TBARs: Espécies Reativas ao Ácido Tio Barbiturico

T-BOOH: *t*-butilhidroperóxido

TPM: Transição de Permeabilidade Mitocondrial

TOXICAM: Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a saúde humana

USEPA: Agência de Proteção Ambiental Norte Americana

U.F.A: Unidade de Fluorescência Arbitrária

Capítulo 1

Revisão da
Literatura

Capítulo 1 - REVISÃO DA LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

Os praguicidas são definidos como substâncias químicas responsáveis por eliminar, repelir ou controlar ervas daninhas e estão entre os principais instrumentos de controle no atual modelo de agricultura brasileiro (IARC,1991). Os estados brasileiros que mais se destacam quanto a utilização de praguicidas são o Mato Grosso, que registrou 121.473,20 toneladas de ingrediente ativo (IA), seguido por São Paulo, com 92.514,67 toneladas de IA e pelo Rio Grande do Sul 74.291,50 toneladas de IA (IBAMA, 2019). Embora os praguicidas tenham alvos específicos, os efeitos adversos em seres humanos e outras espécies decorrentes da exposição aos compostos ainda não foram completamente esclarecidos. Desta forma, a caracterização dos efeitos tóxicos deve ser realizada a fim de determinar o consumo correto e ter conhecimento de suas consequências (IARC,1991).

É importante ressaltar que não são apenas os trabalhadores rurais que estão sujeitos a exposição aos praguicidas, mas também a população em geral através de resíduos veiculados pela ingestão de água e alimentos contaminados, sendo seus riscos ainda pouco conhecidos (WEISS, 2004; FEBER & CABRAL, 1991; IARC, 1991). A avaliação toxicológica dos praguicidas e a caracterização adequada de seu potencial toxicológico fornecerão informações valiosas para implementar medidas governamentais de saúde pública e regularização, inclusive do herbicida Diuron, dentro dos níveis adequados de segurança (MORRISON et al.,1992; WEISENBURGER, 1993).

1.1. DIURON

O Diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia) é um herbicida sistêmico que foi colocado no mercado em meados dos anos sessenta e têm sido altamente utilizado até hoje. O Diuron é derivado da ureia e é comumente

aplicado na pré- e pós-emergência de plantas infestantes em culturas de soja, algodão, banana, cana-de-açúcar, café, entre outros (DIAS et al., 2003; USEPA, 1997). Sua ação herbicida se dá pela inibição da reação de fotólise da água com consequente produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (ERONs) que levam à destruição peroxidativa de ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, impedindo a fotossíntese (GEOFFROY et al., 2002; FIELD et al., 2003).

A utilização do Diuron na agricultura e sua lenta degradação no solo possibilita sua dispersão para lençóis freáticos, correntes aquáticas e solo (DA ROCHA et al., 2013). Após sua biotransformação no fígado de mamíferos, o Diuron resulta em metabólitos potencialmente tóxicos para os seres humanos: 3-(3,4-diclorofenil)-1-metilureia (DCPMU), 3,4-diclorofenilureia (DCPU) e 3,4-dicloroanilina (DCA) (FIELD et al., 2003; GATIDOU, THOMAIDIS, 2007).

Em mamíferos, os metabólitos do Diuron são gerados durante a metabolização hepática. O Diuron é absorvido no trato gastrointestinal e por via dérmica. Em seres humanos, é metabolizado pelo fígado por hidroxilação e N-dealquilação, sendo excretado pela urina. Em ratos e cães foi observada excreção também pelas fezes (HAYES, 1982). Particularmente em humanos, a metabolização ocorre dentro de algumas horas por desmetilação, hidroxilação do anel aromático, N-oxidação, declorinação e conjugação com ácido glicurônico. A excreção do produto parental e seus metabólitos ocorre pela urina e, em menor quantidade, pelas fezes (HAYES, 1982; APVMA, 2011). Ainda há poucos estudos sobre o metabolismo e toxicidade do Diuron em humanos, porém, uma vez que o composto sofre metabolismo hepático e sua excreção é predominantemente renal, o fígado e a bexiga estão entre os principais órgãos envolvidos na toxicocinética desse herbicida e seus metabólitos. Por este motivo, a sua toxicidade utilizando mitocôndrias hepáticas foi avaliada nesse projeto.

5. CONCLUSÃO

- Não foi evidenciado estresse oxidativo após exposição ao Diuron e seus metabólitos DCA e DCPMU, pois esses compostos não acarretaram peroxidação lipídica da membrana, nem oxidação dos grupos sulfidrilas das proteínas de membrana ou dos nucleotídeos de piridina.
- Diuron, DCA e DCPMU nas mais altas concentrações testadas (100 e 500 $\mu\text{M/L}$) atuaram como desacopladores da fosforilação oxidativa mitocondrial.
- O metabólito DCA se mostrou ser mais tóxico que a molécula parental Diuron de acordo com nossos resultados obtidos. Assim, os resultados com mitocôndrias hepáticas isoladas sugerem que o Diuron e seus metabólitos DCA e DCPMU podem ser classificados como mitotóxicos, uma vez que provocaram disfunção mitocondrial no sistema *in vitro* adotado

6. REFERÊNCIAS

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Agrotóxicos no Brasil (2005). [Acesso em 23 de dezembro de 2017]. Disponível em http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html, 2005.

AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DOS EUA, 1997 Agência de Proteção Ambiental dos EUA, (USEPA), 1997. Carcinogenicity Peer Review of Diuron. Escritório de Prevenção, Pesticidas e Substâncias Tóxicas. Memorando de Linda Taylor e Esther Rinde a Phillip Errico e Larry Schnaubelt. Produtos Químicos Avaliados para Carcinogenic Potential, Washington, DC, 1997.

AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL DOS EUA, 2011 Agência de Proteção Ambiental dos EUA, (USEPA), 2011. Vendas e uso da indústria de pesticidas. Estimativas de mercado para 2006 e 2007. Divisão de Análise Biológica e Econômica, Escritório de Programas de Pesticidas, Escritório de Segurança Química e Prevenção de Poluição, Washington, DC, pp. 4-8, 2011.

AUTORIDADE AUSTRALIANA DE MEDICINA VETERINÁRIA PARA PESTICIDAS (APVMA), 2011. Australian Veterinary Medicine Authority for Pesticides (APVMA) Review of Toxicology and Metabolism / Toxicokinetics of Diuron Mammals Assessment of Human Health. Australian Government (2011)

AKERMAN, K.E.O.; WIKSTROM, M.K.F. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.*, v.68, p.191-197, 1976.

ALMEIDA, V. E. S. de; CARNEIRO, F. Brasil é o país que mais usa agrotóxicos no mundo. *Ecodebate Cidadania e Meio Ambiente*, Mangaratiba, 08 jul. 2010. Disponível em: <
<http://www.ecodebate.com.br/2010/07/08/brasil-e-o-pais-que-mais-usa-agrotoxicos-no-mundo-artigo-de-fernando-ferreira-carneiro-e-vicente-eduardo-soares-e-almeida>>. Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *Mol Pathol.*, 2000

AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINE AUTHORITY - APVMA. The reconsideration of approvals of the active constituent Diuron, registrations of products containing Diuron and their associated labels. *Tech. Assess. Rep.* 2, 40, 2005.

AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINE AUTHORITY - APVMA. Thereconsideration of approvals of the active constituent Diuron, registrations of products containing Diuron and their associated labels. *Tech. Assess. Rep.* 2, 40, 2005.

AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINE AUTHORITY - APVMA. Review of the mammalian toxicology and metabolism/toxicokinetics of Diuron. Diuron human health assessment. Australian Government, 2011.

BARJA, G. The quantitative measurement of the H₂O₂ generation in isolated mitochondria. *J. Bioenerg. Biomemb.*, v.34, p.227-233, 2002.

BOELSTERLI UA. Mechanistic toxicology: The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. Taylor and Francis, London; 312 p.; 2002.

BOYD EM, Krupta V. Protein deficiency diet and Diuron toxicity. J Agric Food Chem. 1970; 18:1104-1107.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. Meth. Enzymol., v.52C,p.302-310, 1978.

CAIN, K.; SKILLETER., D.N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.;MULLOCK, B. (Eds.). J. Biochem. Toxicol., Oxford: IRL Press, p.217-254, 1987.

CANNON J. R. Greenamyre J. T. (2011). The role of environmental exposures in neurodegeneration and neurodegenerative diseases. *Toxicol. Sci.* 124, 225–250, 2011.

CHANCE, B.; WILLIAMS; G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymol., NewYork, v.17, p.65-134, 1956.

CONVENTO B., Briquet M. Propriedades de 3- (3,4-Diclorofenil) -1,1-dimetilureia e outros inibidores do segmento citocromo bc1 da cadeia respiratória mitocondrial em *Saccharomyces cerevisiae* . EUR. J. Biochem. 1978; 82 : 473–481. doi: 10.1111 / j.1432-1033.1978.tb12041, 1978.

DA ROCHA, M.S.; ARNOLD, L.L.; PENNINGTON, K.L.; MUIRHEAD, D.; DODMANE, P.R.; ANWAR,M.M.; BATTALORA, M.; de CARMAGO,

J.L.V.; COHEN, S.M. Diuron-induced rat bladder epithelial cytotoxicity. *Toxicol. Sci.*, v. 130, p. 281-288, 2012

DA ROCHA, M.S., Nascimento, M.G., Cardoso, A.P.F., Lima, L.A.D. and Zelandi, E.A. 2010. Cytotoxicity and regenerative proliferation as the mode of action for Diuron-induced urothelial carcinogenesis in the rat. *Toxicological sciences* 113, 37-44, 2010.

DA ROCHA, M.S.; ARNOLD, L.L.; de OLIVEIRA, M.L.C.S.; CATALANO, S.M.I.; CARDOSO, A.P.F.; PONTES, M.G.N.; FERRUCIO, B.; DODMANE, P.R.; COHEN, S.M.; de CAMARGO, J.L.V. Diuron induced rat urinary bladder carcinogenesis: Mode of action and human relevance evaluations using the International Programme on Chemical Safety framework. *Crit. Rev. Toxicol.*, v. 44, p. 393-406, 2014.

DA ROCHA, M.S.; ARNOLD, L.L.; DODMANE, P.R.; PENNINGTON, K.L.; QIU, F.; de CAMARGO, J.L.V.; COHEN, S.M. Diuron metabolites and urothelial cytotoxicity: In vivo, in vitro and molecular approaches. *Toxicology*, v. 314, p. 238-246, 2013.

DA SILVA, M., Bracht, L., Parizotto, AV, Comar, JF, Peralta, RM, & Bracht, A. (2017). Os efeitos metabólicos do Diuron no fígado do rato. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 54, 53-61, 2017.

DIAS, N.M.P., Regitano, J.B., Christoffoleti, P.L., Tornisielo, V.L. (2003). Absorção e translocação do herbicida Diuron por espécies suscetíveis e tolerante de capim-colchão (*Digitaria spp*) *Planta Daninha* 21, 293-300, 2003.

DI LISA, F.; ZIEGLER, M. Pathophysiological relevance of mitochondria in NAD⁺ metabolism. *FEBS letters*, Amsterdam, v. 492, p. 4-8, 2001.

EMAUS, R.K.; GRUNWALD, R.; LEMASTERS, J.J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential

FAVA, R.M.; CARDOSO, A.P.F.; da ROCHA, M.S.; NASCIMENTO e PONTES, M.G.; de CAMARGO, J.L.V.; de OLIVEIRA, M.L.C.S. Evaluation of early changes induced by Diuron in the rat urinary bladder using different processing methods for scanning electron microscopy. *Toxicology*, v.333: p. 100–106, 2015.

FAVA, R.M.; SALES, B.C.P.; NASCIMENTO e PONTES, M.G.; BENEDITO, O.L.; SOUZA, N.P.

FEBER A, Cabral R. Toxic epidemics caused by alimentary exposure to pesticides: a review. *Food Additives Contam.* 1991; e o restante da referência???

FIELD, J.A. et al. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. *J. Environ. Qual.*, v. 32, n. 1, p. 171–179, 2003.

FIELD, J.A. et al. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. *J. Environ. Qual.*, v. 32, n. 1, p. 171–179, 2003

FIELD, J.A. et al. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. *J. Environ. Qual.*, v. 32, n. 1, p. 171–179, 2003.

FREZZA, C.; CIPOLAT, S.; SCORRANO, L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat. Protoc.*, v. 2, 287 – 295, 2007.

FRIEDMAN JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature*. 2014;505(7483):335–43, 2014.

GATIDOU, G.; THOMADIS, N.S. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. *Aquat. Toxicol.*, v. 85, n. 3, p. 184–191, 2007.

GEOFFROY, L. et al. Effect of oxyfluorfen and Diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, v. 72, n. 3, p. 178–185, 2002.

GUNTER, T. E.; PFEIFFER, D. R. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *American Journal of Physiology*, Washington, v. 258, p. C755-C789, 1990.

GUNTER, Y. E.; BUNTINAS, L.; SPARAGNA, G. C.; GUNTER, K. K. The mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *American Journal of Physiology*, Washington, v. 267, n. 36, p. C313-C339, 1994.

GUNTER, T. E.; YULE, D. I.; GUNTER, K. K.; ELISEEV, R. A.; SALTER, J. D. Calcium and mitochondria. *FEBS Letters*, Amsterdam, v. 567, p. 96-102, 2004.

HALESTRAP, A. A pore way to die. *Nature*, v. 434, p. 578-579, 2005.

HALESTRAP, A. P. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochemical Society Transactions*, v. 34, p. 232-237, 2006.

HALESTRAP, A. P.; WOODFIELD, K. Y.; CONNERN, C. P. Oxidative stress, thiol reagents and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 6, p. 3346-3354, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. Oxford University Press, New York., 1999.

HAUGAARD, N. Reflections on the role of the thiol group in biology. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, v.899, p.148-158, 2000.

Hayes WJ Jr. *Pesticides studied in man*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1982; p. 672, 1982.

HAYES, W.J.Jr. (1982). *Pesticides studied in man*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, p. 672.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.*, v. 74, p. 214–226, 1976.

HODGE HC, Downs WL, Panner B, Smith D, Maynard E, Clayton J Jr, Rhodes R. Oral toxicity and metabolism of Diuron in rats and dogs. *Food Cosmet. Toxicol.* 1967; 5: 513.

IHLASEH, S.M.; BAILEY, K.A.; HESTER, S.D.; JONES, C.; REN, H.; CARDOSO, A.P.F. et al. Transcriptional profile of Diuron-induced toxicity

on the urinary bladder of male wistar rats to inform mode of action. *Toxicol Sci.*, v. 122, n.2, p. 330–8, 2011.

IHLASEH-CATALANO, S.M.; BAILEY, K. A.; CARDOSO, A.P.F.; REN, H.; FRY, R.C.; de CAMARGO, J.L.V. et al. Dose and temporal effects on gene expression profiles of urothelial cells from rats exposed to Diuron. *Toxicology*, v. 325, p. 21–30, 2014
in isolated rat liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 850, p.436-448, 1986.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). (1991). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. WHO International Life Sciences Institute. 53, 612.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). WHO International Life Sciences Institute. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 1991

IYER, P. Evidence on the development and reproductive toxicity of Diuron: draft reproductive and cancer hazard assessment. Office of environmental health hazard assessment, California Environmental Protection Agency, 43p. 2002.

JAESCHKE, H., et al., Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicology Science*, Orlando, v. 65, p. 166–176, 2002.

JOCELYN, P.C. Spectrophotometric assay of thiols. *Methods Enzymol.*, v. 143, p.44-67, 1987.

JOHNSTON, J.J. Introduction to Pesticides and Wildlife. American Chemical Society. Washington, cap 1, 2000.

LEMASTERS, J.J; DIGIUSEPPI, J.; NIEMINEM, A.L.; HERMAN, B. Blebbing, free calcium and mitochondrial membrane potential preceding cell death hepatocytes. *Nature*, v.325, p.78-81, 1987.

KAO CM, Ou WJ, Lin HD, Eva AW, Wang TL, Chen SC. Toxicity of Diuron in HepG2 cells and zebrafish embryos. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2019 May 15; 172:432-438. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.036. Epub Feb 6, 2019

KNASMULLER S, Gottmann E, Steinkellner H, Fomin A, Pickl C, Paschke A, God R e Kundi M (1998) Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated solo with plant bioassays. *Mutat Res* 420: 37-48, 1998.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A., E. Ca^{2+} -induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. *American Journal of Physiology*, Washington, v. 269, n. 38, p. C141-C147, 1995.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E.; CASTILHO, R. F. Mitochondrial membrane protein thiol reactivity with *N*-ethylmaleimide or mersalyl is modified by Ca^{2+} : correlation with mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1318, p. 395-402, 1997.

KOWALTOWSKI, A.; VERCESI, A. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, New York, v. 26, p. 463-471, 1999.

KOWALTOWSKI, A. J. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v. 33, p. 241-250, 2000.

KLAUNIG, JE, Xu, Y., Bachowski, S., 1995. Oxidative Stress in non-genotoxic carcinogenesis Toxicol. Lett. 82-83, 683-6, 1995.

LI Y, Couch L, Higuchi M, Fang, J-L, Guo L. Mitochondrial dysfunction induced by Sertraline, an antidepressant agent, Toxicol Sci. 2012; 127: 589-91, 2012.

LIN, A.T.L.; HSU, T.H.; YANG, C.H.; CHANG, L.S. Effects of aging on mitochondrial enzyme activity of rat urinary bladder. Urol. Int., v. 65, p. 144 – 147, 2000.

LITSKY, M. L.; PFEIFFER, D. R. regulation of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter by external adenine nucleotides: The uniporter behaves like a gated channel which is regulated by nucleotides and divalent cations. Biochemistry, Washington, v. 36, p. 7071-7080, 1997.

MADUNGWE, N. B. et al. Critical role of mitochondrial ROS is dependent on their site of production on the electron transport chain in ischemic heart. American Journal of Cardiovascular Disease, 6(3), p. 93-108, 2016.

MARTINEZ T. N., Greenamyre J. T. (2012). Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. Antioxid. Redox Signal. 16, 920–934, 2012.

MURPHY, M. P. How understanding the control of energy metabolism can help investigation of mitochondrial dysfunction, regulation and pharmacology. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 1504, p. 1-11, 2001.

MHADHBI, L., BEIRAS, R. toxicidade aguda de sete pesticidas selecionados (alachlor, atrazina, dieldrin, Diuron, pirimifos-metil, clorpirifós, diazinon) para o meio marinho peixe (pregado, *psetta maxima*). água ar solo poluente. 223, 5917–5930, 2012.

MOHAMMED, A.M., Karttunen, V., Huuskonen, P., Huovinen, M., Auriola, S., Vahakangas, K., 2018. Transplacental transfer and metabolism of Diuron in human placenta. Toxicol. Lett. 295, 307–313, 2018.

MOHAMMED AM, Huovinen M, Vähäkangas KH. Toxicity of Diuron metabolites in human cells. Environ Toxicol Pharmacol. 2020.

MOREIRA, Avaliação da toxicidade “in vivo” de um herbicida comercial e seus componentes químicos Diuron e hexazinona na presença e ausência de cloro. 81f. Dissertação de Mestrado – Universidade de Ribeirão Preto. Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnológicas. Ribeirão Preto, 2012.

MORRISON HI, Wilkins K, Semenciw R, Mao Y, Wigle D. Herbicides and cancer. J Natl. Cancer Inst. 1992;

NASCIMENTO, M.G.; de OLIVEIRA, M.L.C.S.; LIMA, A.S.; de CAMARGO, J.L.V. Effects of Diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the urinary bladder of male Wistar rats. Toxicology, v. 224, n.1-2, p. 66–73, 2006.

NASCIMENTO, M.G.; de OLIVEIRA, M.L.C.S.; LIMA, A.S.; de CAMARGO, J.L.V. Effects of Diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the urinary bladder of male Wistar rats. Toxicology, v. 224, n.1-2, p. 66–73, 2006.

NINOMIYA-TSUJI J. (2008). Mitochondrial dysfunction. In Molecular and Biochemical Toxicology. 4th ed. (SmartR. C.Hodgson R., Eds.), pp. 319–332. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2008.

NI HM, Williams JA, Ding WX. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. Redox Biol. Elsevier; 2015; 4:6–13, 2015.

NICHOLLS DG, Ferguson SJ. Bioenergetics 2. Academic Press Inc.: London, 1982.

PEDRAJAS, JR, Peinado, J., Lopez-Barea, J., 1995. Estresse oxidativo em peixes expostos a xenobióticos modelo: formas oxidadas modificadas de Cu, Zn-superóxido dismutase como biomarcadores em potencial. Chem-Biol.Interagir. 98, 267-282, 1995.

PEDRAJAS, JR, Gavilanes, F., Lopez-Barea, J., et al., 1998. Incubação da superóxido dismutase com malondialdeído e 4-hidroxi-2-o nonenal forma novas isoformas e adutos ativos. Uma avaliação de xenobióticos em peixes. Chem. Biol. Interagir. 116, 1-17, 1998.

PEDERSEN, P.L.; GREENAWALT, J.W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G.L.; SOPER, J.W.; BUSTAMENTE, E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. Methods Cell. Biol., v. 20, p.411- 481, 1978.

PEREIRA LC, de Souza AO, Dorta DJ. Polybrominated Diphenyl Ether Congener (BDE-100) induces mitochondrial impairment, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2013; 112: 418-424,2013.

PEREIRA LC, Souza AO de, Pazin M, Dorta DJ. Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico. *Revista Brasileira de Toxicologia*. 2012;25(1-2): 1-14, 2012.

PERES, F; MOREIRA, J Costa; CLAUDIO, L. Os impactos dos agrotóxicos sobre a saúde e o ambiente. Os impactos dos agrotóxicos sobre a saúde e o ambiente ciência & saúde coletiva, Rio de janeiro, v. 12, n. 1, p. 4-5, jan./mar. 2007.

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

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.*, v. 1, n. 6, p. 3159-3165, 2006

ROUBICEK DA, Souza-Pinto NCD. Mitochondria and mitochondrial DNA as relevant targets for environmental contaminants. *Toxicology*. Elsevier;2017;S0300-483X(17)30179-8, 2017.

RUDZOK S, Schmücking E, Graebisch C, Herbarth O, Bauer M. A indutibilidade do citocromo P450 1A humano por xenobióticos relevantes para o ambiente na linha celular derivada de hepatoma humano HepG2. *Environ Toxicol Pharmacol*. Nov, 2009.

SHAUGHNESSY D. T.WorthL .JrLawler C. P.McAllister K. A.LongleyM. J.CopelandW. C. (2010).Meeting report: Identification of biomarkers for early detection of mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion*10, 579–581, 2010.

SCHMIDT C. W. (2010). A closer look at climate change skepticism. *Environ. Health Perspect.* 118, a536–a540, 2010.

SADUN A. (1998). Acquired mitochondrial impairment as a cause of optic nerve disease. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 96, 881–923, 1998.

SCARPA, A. Measurements of cation transport with metallochromic indicators. *Methods Enzymol.*, New York, v. 56, p.301-338, 1979.

TANNER C. M. Kamel F. Ross G. W. Hoppin J. A. Goldman S. M. Korell M. Marras C. Bhudhikanok G. S. Kasten M. Chade A. R. et al. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* 119, 866–872, 2011.

TIXIER C. Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthrobacter* sp. N2: structure, ecotoxicity and fate of Diuron metabolite with soil fungi. *Chemosphere*, 2002;46(4):519-26.

TURUNEN, M.; OLSSON, J.; DALLNER, G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1660, p. 171-199, 2004.

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

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. Carcinogenicity peer review of Diuron. Office of prevention, pesticides and toxic substances. Cincinnati, 1997;22 p. IYER, P. Evidence on the development and reproductive toxicity of Diuron: draft reproductive and

cancer hazard assessment. Office of environmental health hazard assessment, California Environmental Protection Agency, 43p. 2002.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. Carcinogenicity peer review of Diuron. Office of prevention, pesticides and toxic substances. Cincinnati, 1997; 22 p., 1997.

WEISENBURGER D. Perspective in pathology: human health effects of agrichemical use. Hum Pathol. 1993

WEISS B, Amler S, Amler RW. Pesticides. Pediatrics. 2004;

YEBRA DM, Kiil S, Dam-Johansen K (2004) Tecnologia antiincrustante - etapas passadas, presentes e futuras em direção a revestimentos antiincrustantes eficientes e ecológicos. Prog Org Coat 50 (2): 75-104. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2003.06.001>, 2004.

YEN, T.C.; CHEN, Y.S.; KING, K.L.; YEH, S.H.; WEI, Y.H. Liver mitochondrial respiratory functions decline with age. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 165, p. 944–1003, 1989.