

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
CÂMPUS DE DRACENA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**

**CITOTOXICIDADE INDUZIDA PELO INSETICIDA  
IMIDACLOPRIDO EM CÉLULAS HEPG2**

**Anilda Rufino de Jesus Santos Guimarães**

Bióloga

**Dracena  
2020**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
CÂMPUS DE DRACENA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**

**CITOTOXICIDADE INDUZIDA PELO INSETICIDA  
IMIDACLOPRIDO EM CÉLULAS HEPG2**

**Anilda Rufino de Jesus Santos Guimarães**

**Orientador: Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp - Câmpus de Dracena, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Animal.

**Dracena  
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação  
Campus de Dracena

G947c

Guimarães, Anilda Rufino de Jesus Santos.  
Citotoxicidade induzida pelo inseticida imidacloprido em células HEPG2 / Anilda Rufino de Jesus Santos Guimarães. --  
Dracena: [s.n.], 2020.  
53 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp). Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2020.

Orientador: Fábio Erminio Mingatto

1. Citotoxicidade. 2. Estresse oxidativo. 3. Fígado. 4. Inseticida. 5. Morte celular. I. Título.



Bibliotecário Fábio Sampaio Rosas  
CRB 8/6665

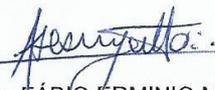
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

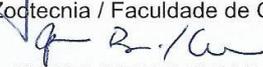
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Citotoxicidade induzida pelo inseticida imidacloprido em Células HepG2

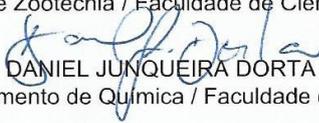
**AUTORA: ANILDA RUFINO DE JESUS SANTOS GUIMARÃES**

**ORIENTADOR: FÁBIO ERMINIO MINGATTO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL, área: Produção Animal pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Assoc. FÁBIO ERMINIO MINGATTO  
Curso de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

  
Profa. Dra. JAQUELINE DALBELLO BILLER  
Curso de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena

  
Prof. Dr. DANIEL JUNQUEIRA DORTA  
Departamento de Química / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP

Dracena, 14 de fevereiro de 2020

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Anilda Rufino de Jesus Santos Guimarães – nascida em 25 de setembro de 1987, na cidade de São Miguel dos Campos/AL - Brasil, filha de Maria Edite de Jesus e Aluísio Rufino da Silva. Ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela União das Faculdades de Dracena – UNIFADRA - Dracena (SP) em fevereiro de 2014, obtendo o grau de Licenciatura em Ciências Biológicas em dezembro de 2016. Esteve envolvida em atividades de pesquisa desde a graduação, desenvolvendo-as no Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica (LaBMeT), atuando principalmente nas áreas de Bioquímica Toxicológica e Metabolismo. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica FAPESP durante 8 meses. Em fevereiro de 2018, iniciou no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em nível de mestrado, área de concentração Produção Animal na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa Interunidades do Câmpus de Dracena, realizando estudos na área de “Bioquímica Metabólica e Toxicológica”, sob a orientação do Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto. Ao longo do mestrado foi bolsista CAPES, concluindo o curso em fevereiro de 2020.

## EPÍGRAFE

“Aqueles que semeiam com lágrimas, com cantos de alegria colherão. Aquele que sai chorando enquanto lança a semente, voltará com cantos de alegria, trazendo os seus feixes.”

**Salmos 126: 5-6**

“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês”, diz o Senhor, planos de fazê-los prosperar e não de lhes causar dano, planos de dar-lhes esperança e um futuro.”

**Jeremias 29:11**

“Mudaste o meu pranto em dança, a minha veste de lamento em veste de alegria, para que o meu coração cante louvores a ti e não se cale. Senhor, meu Deus, eu te darei graças para sempre.”

**Salmos 30:11-12**

## DEDICATÓRIA

Dedico:

A meus pais, **Maria Edite e Alúcio Rufino**. A meu esposo, **wellington Santos Guimarães**, companheiro e incentivador em todos os momentos e à minha filha, **Alicia Rufino Guimarães**, minha inspiração a prosseguir.

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por todas as bênçãos que tem me concedido e principalmente por ser tão presente nos momentos mais difíceis da minha vida, pois sem ele não alcançaria meus objetivos e nem teria forças para prosseguir diante dos obstáculos, obrigada Deus por me sustentar e me guiar em todos os momentos de minha vida.

Aos Meus Pais, Maria Edite e Alúcio Rufino, por todo carinho, cuidado e compreensão proporcionados a minha filha durante a minha ausência, ao meu esposo e minha filha, Wellington e Alicia, pelo o amor, incentivo e apoio, por apostar sempre no meu sucesso e também por acreditar na minha capacidade.

Ao meu orientador Prof. Adj. Fábio Erminio Mingatto, por ter acreditado no meu potencial e pela confiança depositada, agradeço por todo o apoio, paciência, dedicação e compreensão. O senhor é um excelente professor e orientador, tenho muito orgulho de ter sido sua orientada no mestrado. Suas orientações e críticas foram essenciais para instigar meu crescimento pessoal e profissional. Professor Fábio Erminio Mingatto que Deus te abençoe infinitamente.

A minha amiga do Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica (LaBMet), Camila Miranda por toda ajuda e companheirismo durante nossos dias de trabalho, por me consolar, me encorajar e apoiar nos momentos em que parecia que nada iria dá certo. Choramos muito, rimos muito e aprendemos bastante uma com a outra. Camila Miranda obrigada por tudo.

Aos técnicos de Laboratório da FCAT - Unesp Andréia, Edison, Heloisa e João, pelo auxílio nas análises, pelos conselhos, amizade e carinho. Que Deus abençoe imensamente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2015/19549-8 pelo financiamento do projeto de pesquisa, tornando possível a produção desta dissertação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## CITOTOXICIDADE INDUZIDA PELO INSETICIDA IMIDACLOPRIDO EM CÉLULAS HEPG2

**RESUMO** – O imidacloprido (IMD) é um inseticida neonicotinóide de uso veterinário e agrônômico utilizado mundialmente em larga escala. Este composto, apresenta toxicidade seletiva para os receptores pós-sinápticos da acetilcolina (nAChRs) em insetos e baixa toxicidade para mamíferos. Porém, dados na literatura demonstram efeitos nocivos induzidos pela substância em vários animais, sendo o fígado apontado como o principal órgão afetado. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do IMD em células de hepatoblastoma humano (HepG2) para elucidar os mecanismos envolvidos na ação tóxica da substância. As células HepG2 foram expostas ao IMD (250 - 2000 $\mu$ M) durante 24 e 48 horas. Após a exposição o IMD causou perda da viabilidade celular a partir da concentração de 500  $\mu$ M no tempo 24 horas e a partir de 250  $\mu$ M no tempo 48 horas de forma concentração e tempo-dependente. A capacidade metabólica das células, avaliada pelo teste do MTT, também foi afetada em ambos os tempos investigados resultando em uma diminuição a partir da concentração de 250  $\mu$ M no tempo 24 horas, enquanto que no tempo de 48 horas esse resultado só foi significativo a partir da concentração de 500  $\mu$ M. O IMD diminuiu o potencial de membrana mitocondrial nas células HepG2 apenas na maior concentração testada (2000  $\mu$ M) em ambos os tempos de incubação e induziu danos na membrana celular conforme observado pelos aumentos significantes na liberação da enzima lactato desidrogenase em relação ao controle a partir da concentração de 1000  $\mu$ M em 24 horas e a partir de 500  $\mu$ M em 48 horas exercendo também efeito concentração e tempo-dependente. O inseticida também induziu um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) em taxas superiores a 50% em relação ao controle nas concentrações acima de 500  $\mu$ M, após 24 horas de incubação e já na concentração de 250  $\mu$ M no tempo 48 horas. Os resultados do presente estudo indicam que o IMD induz citotoxicidade nas células HepG2 e que esse efeito pode estar associado ao aumento na geração de ERON, causando morte celular por necrose.

**Palavras-chave:** citotoxicidade, estresse oxidativo, fígado, inseticida, morte celular

## CYTOTOXICITY INDUCED BY IMIDACLOPRID INSECTICIDE HEPG2 CELL LINE

**ABSTRACT** –Imidacloprid (IMD) is a neonicotinoid insecticide for veterinary and agronomic use used worldwide on a large scale. This compound has selective toxicity to postsynaptic acetylcholine receptors (nAChRs) in insects and low toxicity to mammals. However, data in the literature demonstrate harmful effects induced by the substance in several animals, with the liver being identified as the main affected organ. In this sense, the objective of this work was to evaluate the effects of IMD in human hepatoblastoma (HepG2) cells to elucidate the mechanisms involved in the toxic action of the substance. HepG2 cells were exposed to IMD (250 - 2000  $\mu\text{M}$ ) for 24 and 48 hours. After exposure, IMD caused loss of cell viability from the concentration of 500  $\mu\text{M}$  in 24 hours and from 250  $\mu\text{M}$  in 48 hours in a concentration and time-dependent manner. The metabolic capacity of the cells, assessed by the MTT test, was also affected at both times investigated, resulting in a decrease from the concentration of 250  $\mu\text{M}$  in 24 hours, whereas in 48 hours this result was only significant from 500  $\mu\text{M}$  concentration. IMD decreased the mitochondrial membrane potential in HepG2 cells only at the highest concentration tested (2000  $\mu\text{M}$ ) at both incubation times and induced damage to the cell membrane as observed by the significant increases in the release of the enzyme lactate dehydrogenase compared to the control from concentration of 1000  $\mu\text{M}$  in 24 hours and from 500  $\mu\text{M}$  in 48 hours, also having a concentration and time-dependent effect. The insecticide also induced an increase in the production of reactive oxygen and nitrogen species (ERON) at rates greater than 50% in relation to the control in concentrations above 500  $\mu\text{M}$ , after 24 hours of incubation and already in the concentration of 250  $\mu\text{M}$  in time 48 hours. The results of the present study indicate that IMD induces cytotoxicity in HepG2 cells and that this effect may be associated with an increase in the generation of ERON, causing cell death by necrosis.

**Keywords:** cytotoxicity, oxidative stress, liver, insecticide, cell death

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
2 OBJETIVO .....	12
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	13
3.1 Praguicidas .....	13
3.1.1 Imidacloprido e seus efeitos tóxicos em animais .....	14
3.2 O fígado como alvo principal dos xenobióticos .....	17
3.3 Biotransformação do imidacloprido.....	18
3.4 Células HepG2 e citotoxicidade.....	20
3.5 Mitocôndrias como alvo de xenobióticos.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	23
4.1 Reagentes.....	23
4.2 Cultura das células HepG2 .....	23
4.2.1 Ensaio citotóxicos .....	24
4.2.1.1 Ensaio de proliferação celular.....	24
4.2.1.2 Ensaio de viabilidade celular.....	25
4.2.1.3 Potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ).....	25
4.2.1.4 Integridade da membrana celular .....	26
4.2.1.5 Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) .....	27
4.3 Análise Estatística.....	28
5 RESULTADOS .....	29
5.1 Efeito do IMD na proliferação celular .....	29
5.2 Efeito do IMD na viabilidade celular .....	31
5.3 Efeito do IMD no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ ) .....	33
5.4 Efeito do IMD na integridade da membrana celular .....	35
5.5 Efeito do IMD na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON).....	38
6 DISCUSSÃO .....	40
7 CONCLUSÃO.....	43
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

Os inseticidas neonicotinóides têm sido cada vez mais utilizados no mundo, representando, em 2014, mais de 25% do mercado global de praguicidas (CRADDOCK *et al.*, 2019). Isso se deve ao fato destes compostos serem considerados menos persistentes no meio ambiente e menos tóxicos para os organismos não alvos do que as classes mais antigas de praguicidas. Um dos inseticidas neonicotinóides que tem sido extensivamente usado em todo o mundo por apresentar baixa toxicidade em peixes e mamíferos é o imidacloprido (HAN; TIAN; SHEN, 2018; SENYILDIZ; KILINC; OZDEN, 2018).

O imidacloprido (IMD) é bastante usado para o controle de diversas pragas nas lavouras, no solo e no tratamento de sementes, e até mesmo no controle de pulgas, moscas e piolhos em animais domésticos e animais de fazenda (HUTCHINSON *et al.*, 2001; POSPISCHIL, 2002; FOSSEN, 2006). O IMD apresenta alta eficiência no controle de insetos pelo fato de ser altamente seletivo para os receptores pós-sinápticos da acetilcolina (nAChRs) interferindo no sistema nervoso central (TOMIZAWA *et al.*, 2005).

Embora o IMD seja apresentado no mercado como um inseticida seguro e de baixa toxicidade para os animais, estudos têm demonstrado que a exposição constante à substância é capaz de causar neurotoxicidade, genotoxicidade e efeitos sobre o sistema reprodutor e fígado, conforme observado em animais não direcionados como abelhas, peixes, aves e mamíferos (ABOU-DONIA *et al.*, 2008; BAL *et al.*, 2010; BAL *et al.*, 2012a; BAL *et al.*, 2012b; LONARE *et al.*, 2014; KATARIA *et al.*, 2016; STIVAKTAKIS *et al.*, 2016; VIEIRA *et al.*, 2018; ROGERS *et al.*, 2019; SRIAPHA *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019; ZEID *et al.*, 2019).

O fígado é o principal órgão envolvido nos processos metabólicos, o qual é responsável por receber grandes quantidades de nutrientes e xenobióticos que são absorvidos por meio do trato digestivo e veia porta. Além disso, é capaz de sintetizar e degradar uma variedade de moléculas de forma regulada. Entre as principais funções hepáticas estão a captação de aminoácidos, lipídios, carboidratos e vitaminas, com subsequente armazenamento, conversão metabólica e liberação no sangue e bile. Outra função hepática de extrema importância é a biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos), realizado principalmente pelo sistema enzimático denominado citocromo P450. Este processo converte substâncias

hidrofóbicas em hidrossolúveis facilitando na eliminação pelo organismo (GUILLOUZO, 1998; PONCE *et al.*, 2018). Dessa forma, o fígado se torna um alvo principal da toxicidade provocada pelos xenobióticos o que conseqüentemente pode acarretar lesão celular e perturbação da sua homeostase.

As mitocôndrias são de extrema importância para a sobrevivência das células, pois são responsáveis pela síntese da quase totalidade do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular, proveniente da fosforilação oxidativa (NICHOLLS; FERGUSON, 2002). As mitocôndrias são consideradas o principal local de formação de espécies reativas de oxigênio, alterações na estrutura e função desta organela podem aumentar a formação das espécies reativas e levar a uma situação denominada de estresse oxidativo que pode resultar em oxidação de lipídios de membranas e outras biomoléculas (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009). Além disso, mitocôndrias danificadas podem gerar outros problemas às células, como por exemplo, consumo de ATP ou até mesmo produção ineficiente de ATP, além de alterar uma série de outros processos metabólicos que podem culminar em morte celular (YOULE; VAN DER BLIEK, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012).

A morte celular é a resposta a uma lesão celular, na qual os danos causados são irreversíveis. Existem diferentes tipos de morte celular, tais como apoptose, necrose, necroptose, autofagia, etc. Sendo que, cada uma possui características morfológicas e bioquímicas diferentes e algumas dessas características são comuns a mais de um tipo de morte celular (GALLUZZI *et al.*, 2012). Sendo assim, torna-se importante a avaliação dos efeitos do IMD em relação às células HepG2, no sentido de elucidar os mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade causada pelo inseticida. Assim, espera-se fornecer informações relevantes para o auxílio no tratamento em caso de intoxicação em animais e humanos.

## **2 OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do imidacloprido em células HepG2 para explorar os mecanismos bioquímicos envolvidos na ação tóxica da substância para o fígado.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Praguicidas

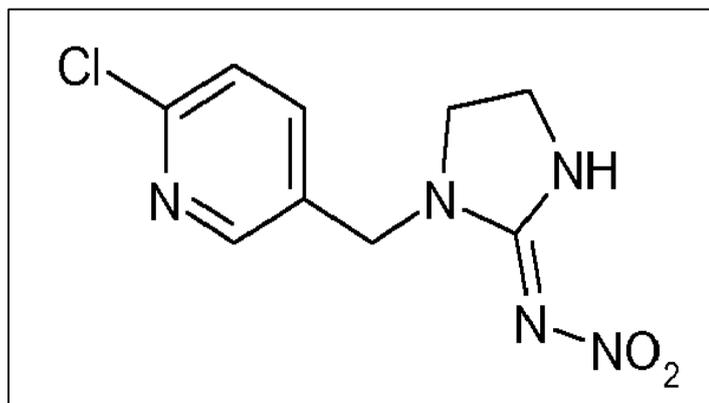
Os praguicidas estão cada vez mais presentes na sociedade e atualmente seu uso tem se tornado amplo, tanto nas práticas agrícolas como também no uso veterinário e residencial, pois apresentam eficácia no controle de diversas pragas (ervas daninhas, roedores, fungos, ácaros, insetos e nematódeos) garantindo alta produtividade na agropecuária. Estas substâncias são apresentadas em formulações sólidas ou líquidas que podem ser naturais, semissintéticas ou sintéticas utilizadas como inseticidas, acaricidas, fungicidas e rodenticidas, nomes comuns que indicam a principal função dos praguicidas (BAPTISTA, 1999; BIANCHI; MELL; MORALES, 2015; BUSZEWSKI *et al.* 2019). Entretanto, o uso intensivo de praguicidas pode aumentar a probabilidade de impactos negativos, como efeito toxicológico em organismos não alvos (plantas, mamíferos e microrganismos do solo e biota aquática), devido a produtos resultantes do seu metabolismo que originam resíduos, os quais podem ser persistentes e acumulados através das cadeias biológicas (PRESTON, 2002; BUSZEWSKI *et al.*, 2019).

Vários relatos na literatura têm demonstrado que o uso excessivo de praguicidas causa contaminação em rios, lagos e lagoas por meio da deriva de pulverização e da lixiviação do solo acarretando em efeitos indesejáveis, ecológicos e perigosos para a saúde de diversos organismos não alvos, além disso, a exposição prolongada a essas substâncias pode ocasionar mortes associadas ao contato ou à ingestão. Entre os anos de 2007 e 2014 foram registrados pelo Ministério da Saúde cerca de 25 mil casos de intoxicações por praguicidas (HAIDER; RAUF, 2014; SEESP, 2019). Apesar do sistema de registro e a legislação garantirem segurança quanto aos produtos colocados à disposição do usuário, quando bem utilizados, contudo existem dados na literatura que demonstram que os praguicidas podem ser tóxicos nas concentrações utilizadas, e que sua toxicidade depende das propriedades dos ingredientes ativos e inertes do produto (TAVELLA *et al.*, 2011). Devido aos riscos que os praguicidas podem provocar ao ser humano e em outros organismos não alvos, além dos impactos ao meio ambiente, tem surgido no meio científico uma preocupação significativa quanto aos efeitos adversos dessas substâncias (BUSZEWSKI *et al.*, 2019).

### 3.1.1 Imidacloprido e seus efeitos tóxicos em animais

O IMD (1-[(6-cloro-3-piridinil) metil]-N-nitro-2-imidazolidinimina) (Figura 1) é um inseticida neonicotinóide, geralmente aplicado como inseticida sistêmico que mata os insetos via ingestão ou contato prejudicando seu sistema nervoso central por meio do bloqueio dos receptores pós-sinápticos da acetilcolina, e além disso apresenta toxicidade específica para insetos e baixa toxicidade para mamíferos (TOMIZAWA *et al.*, 2005). Esse composto é amplamente usado em mais de 120 países no controle de diversas pragas no tratamento e proteção de várias culturas agrícolas, no uso doméstico e em animais de fazenda para o controle de pulgas e moscas. O IMD possui alta solubilidade em água, 514 mg L<sup>-1</sup> em pH = 7, decompõe-se rapidamente na água na presença de luz e na ausência a decomposição ocorre bem lentamente. Em condições aeróbias, o IMD é persistente com uma meia-vida da ordem de 1 a 3 anos, já na superfície do solo, a meia-vida é de 39 dias (HUTCHINSON *et al.*, 2001; FOSSEN, 2006; HAN; TIAN; SHEN, 2018).

Figura 1 - Estrutura molecular do IMD



Fonte: domínio público.

O uso intensivo do IMD pode contribuir para a contaminação do solo e dos recursos hídricos por meio da deriva de pulverização e da lixiviação do solo. Outro fator preocupante é a sua persistência em plantas, frutas, legumes e sementes, que conseqüentemente leva os animais e os seres humanos a uma exposição constante à substância, dessa forma o IMD pode representar um risco à saúde desses organismos e provocar uma ampla gama de efeitos adversos e dependendo da

quantidade absorvida e do tempo de exposição pode levar até mesmo à morte (BAL *et al.*, 2012a; VIEIRA *et al.*, 2018; ROGERS *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019). Existem muitos relatos na literatura demonstrando o potencial efeito tóxico do IMD em animais não direcionados como peixes, aves e mamíferos apresentando efeitos não apenas neurotóxico, mas também genotóxicos, reprodutivos e hepáticos (ABOU-DONIA *et al.*, 2008; BAL *et al.*, 2010; LONARE *et al.*, 2014; KATARIA *et al.*, 2016; STIVAKTAKIS *et al.*, 2016; BAL *et al.*, 2012a; BAL *et al.*, 2012b; VIEIRA *et al.*, 2018; SRIAPHA *et al.*, 2019; ZEID *et al.*, 2019).

Evidências experimentais demonstraram efeitos nocivos do IMD em diferentes concentrações testadas em ratos, camundongos, bovídeos e frangos em diferente tempos de exposição, os quais apresentaram lesão no fígado, como degeneração de hepatócitos, sinusóides hepáticos, congestão, dilatação venosa central, hemorragia (KAMMON *et al.*, 2010; MOHANY *et al.*, 2011; TOOR *et al.*, 2013), vasos sanguíneos hipertrofiados, lesões citoplasmáticas, núcleos picnóticos, infiltração de leucócitos, necrose hepática e liberação das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) no meio extracelular, mostrando hepatotoxicidade (MOHANY *et al.*, 2011; DUZGUNER; ERDOGAN, 2012; DESAI; PARIKH, 2013; SOUJANYA *et al.*, 2013; TOOR *et al.*, 2013; ARFAT *et al.*, 2014; KAPOOR *et al.*, 2014; QADIR *et al.*, 2014).

Sriapha *et al.* (2019) realizaram um estudo de uma série de casos de centros de intoxicação de 2010 a 2016, encontrando 128 casos de ingestão de IMD, dos quais quatro desenvolveram lesão hepática. Sendo que, três pacientes ingeriram concentrados líquidos solúveis e um grânulo de IMD dispersível em água. As doses estimadas de ingestão variaram de 2 a 35 g de IMD.

Vieira *et al.* (2018) testaram quatro concentrações de IMD (1,25; 12,5; 125 e 1250  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em peixe sul-americano *Prochilodus lineatus* durante 120 horas de exposição. Logo após observaram que o IMD induziu alterações significativas nos perfis enzimáticos de *P. lineatus*, com alterações na atividade de biotransformação e em enzimas antioxidantes em diferentes tecidos. Além disso, o IMD afetou o equilíbrio redox dos tecidos, pois danos oxidativos como lipoperoxidação e carbonilação de proteínas foram evidenciados no fígado, brânquias, rim e cérebro de peixes expostos a diferentes concentrações de IMD. Também foi observada uma diminuição da glicose no sangue, indicando um aumento da demanda energética. O IMD também causou danos ao DNA nos eritrócitos de peixes em todas as

concentrações avaliadas. Foi evidenciado que os órgãos mais afetados pela exposição ao IMD foram fígado e rim, seguidos pelas brânquias.

Hassan, Ela e Aziz (2019) avaliaram o efeito protetor da quercetina contra a toxicidade induzida por IMD em 36 ratos machos adultos, os quais foram divididos em 6 grupos e tratados com IMD na concentração de 45 e 90 mg/kg e quercetina a 100 mg/kg de peso corporal por 21 dias consecutivos. Os resultados observados foram danos no DNA, aumento dos níveis de ALT, AST, ureia sérica, creatinina, colesterol e glicose, mas diminuiu as concentrações de proteína total sérica e albumina e o peso corporal, com aumento nos níveis de triacilglicerol e colesterol. Os animais tratados com quercetina apresentaram níveis enzimáticos normais, indicando um efeito protetor.

Zeid *et al.* (2019) estudaram o efeito do IMD no cérebro e fígado de pombos (*Columba livia domestica*) no intuito de investigar os impactos tóxicos causados pelo composto. Quarenta aves machos foram divididas igualmente em quatro grupos: um grupo controle que recebeu óleo de milho via oral e três grupos que receberam IMD dissolvido em óleo de milho em três doses diferentes: 2, 3 e 6 mg/kg de peso corporal, também por via oral. Os resultados observados foram uma diminuição significativa na atividade sérica da enzima superóxido dismutase (SOD) e da concentração de glutathiona reduzida (GSH). Por outro lado, a concentração de malondialdeído (MDA) foi elevada. As concentrações de proteína sérica total, albumina, globulina e a razão A/G não sofreram alterações significantes nos grupos tratados com IMD, exceto a concentração de proteína total que diminuiu significativamente no grupo tratado com a maior dose de IMD em relação ao controle. Também foi observado aumento significativo na atividade sérica das enzimas ALT e lactato desidrogenase (LDH) e na concentração de ácido úrico nas doses de 3 e 6 mg/kg de peso corporal. Além disso, os tecidos cerebrais e hepáticos examinados de todos os grupos tratados com IMD mostraram alterações relacionadas à dosagem em sua morfologia estrutural e ultra-estrutural. Foram detectados resíduos de IMD nos músculos peitorais, fígado, cérebro e rins de todos os grupos tratados com IMD. Os autores concluíram que a administração oral do IMD induziu estresse oxidativo e efeitos prejudiciais no cérebro e no fígado dos pombos expostos ao inseticida.

Ressaltando que o IMD apresenta alta especificidade para receptores de insetos, sendo considerado altamente tóxico para os mesmos e pouco tóxico para

outros animais, muitos estudos têm demonstrado que o composto tem alta capacidade de danificar o fígado, como relatado anteriormente, porém o mecanismo de ação citotóxico neste órgão ainda não foi totalmente descrito.

### **3.2 O fígado como alvo principal dos xenobióticos**

O fígado é caracterizado como um órgão grande, sólido e bastante vascularizado, o qual desempenha uma função central no metabolismo. Ele absorve grandes quantidades de nutrientes por meio do trato digestivo e veia porta, sendo capaz de sintetizar e degradar uma variedade de moléculas de forma regulada. As principais funções hepáticas são a captação de aminoácidos, lipídios, carboidratos e vitaminas, com subsequente armazenamento, conversão metabólica e liberação no sangue e bile. Outra função hepática de extrema importância é a biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos). Este processo converte substâncias hidrofóbicas em hidrossolúveis facilitando na eliminação pelo organismo (GUILLOUZO, 1998; PONCE *et al.*, 2018).

A atividade do fígado no metabolismo de substâncias exógenas é mediada principalmente pelo citocromo P450 (CYP). Embora as reações de biotransformação estejam associadas ao processo de desintoxicação, em alguns casos o metabolismo do xenobiótico é prejudicial às células devido à produção de metabólitos altamente reativos, mais tóxicos do que o composto de origem, entre eles, eletrófilos, radicais e ERO; estes, por sua vez, podem reagir diretamente com macromoléculas celulares ou iniciar reações em cadeia. As enzimas do CYP são uma superfamília de monooxigenases, muitas das quais são responsáveis por metabolizar xenobióticos. Apesar de existirem 18 famílias destas enzimas em humanos, as famílias 1-4 parecem possuir o maior envolvimento no metabolismo de químicos exógenos. Dentro dessas famílias, existem importantes subfamílias e isoformas que contribuem substancialmente ao metabolismo de xenobióticos. Algumas das isoformas de CYP hepáticas mais importantes incluem 3A4, 2C19, 1A1, 2B6 e 3A5 (CABONI; SAMMELSON; CASIDA, 2003; TANG *et al.*, 2004; DAS *et al.*, 2006).

O fígado possui aproximadamente 300 bilhões de células, sendo os hepatócitos a principal unidade funcional, os quais representam 80% do total que constituem o parênquima hepático. Os hepatócitos são responsáveis pelo metabolismo e armazenamento de nutrientes e glicogênio e sob condições de jejum

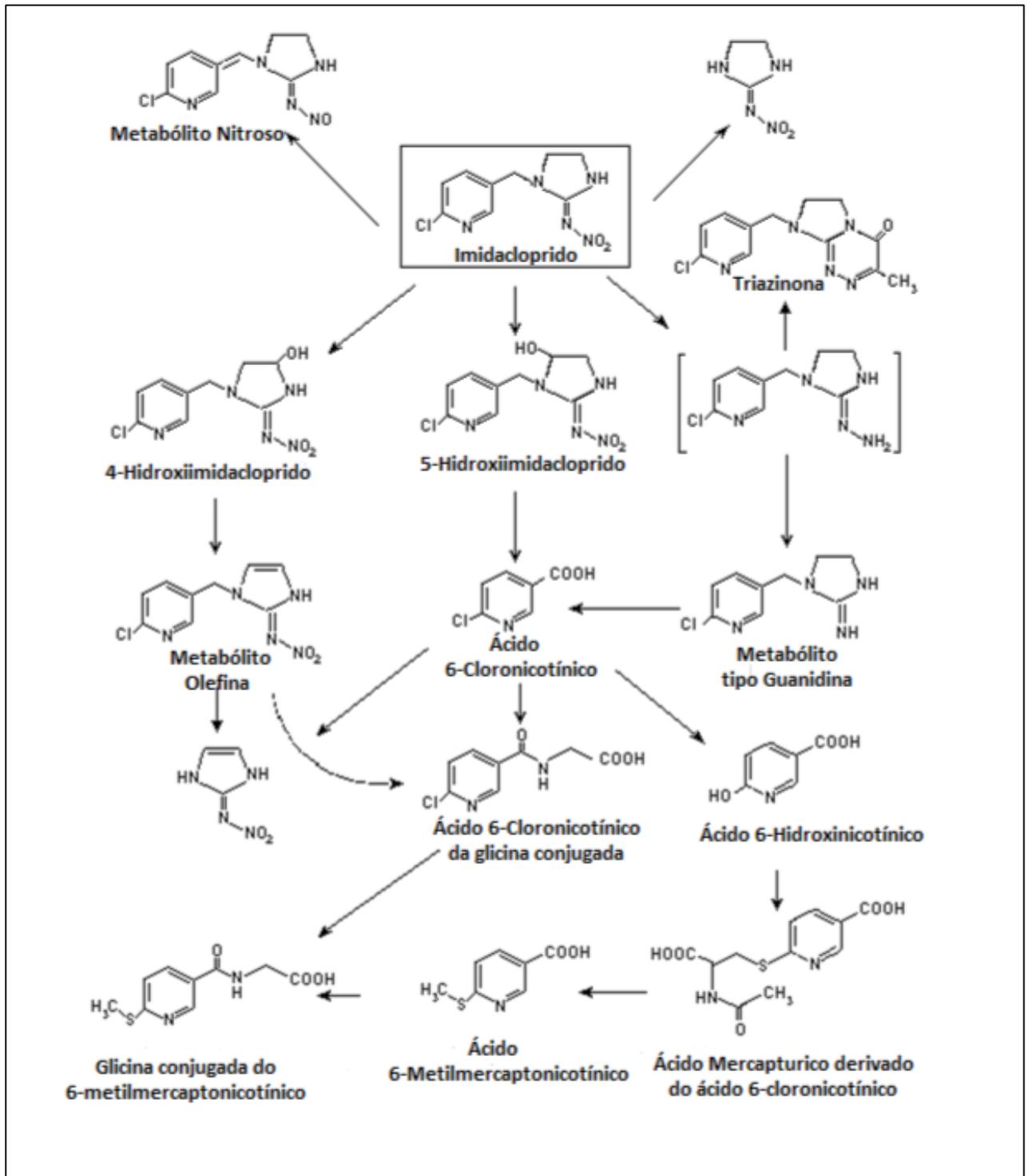
produz glicose, além de regular o metabolismo lipídico e sintetizar lipoproteínas, dessa forma o fígado é essencial na homeostase metabólica (GUILLOUZO, 1998; MINGATTO *et al.*, 2002; GUELFY *et al.*, 2015; PONCE *et al.*, 2018).

O fígado é o principal órgão envolvido no processo de biotransformação e metabolismo de xenobióticos, dessa forma, torna-se o principal alvo dos mecanismos de toxicidade dessas substâncias. A biotransformação, geralmente ocorre para inativar as substâncias tóxicas, que foram absorvidas pelos organismos, na forma de metabólitos (produtos solúveis em água) que serão excretadas pelo organismo, entretanto os metabólitos formados podem ser mais tóxico do que o composto de origem e desencadear mecanismo de hepatotoxicidade (THOMPSON; THOMPSON, 1990; TOLEDO FILHO; VIEIRA, 1990).

### **3.3 Biotransformação do IMD**

A biotransformação do IMD em mamíferos é mediada por duas enzimas, o citocromo P450 3A4 (CYP3A4) e a aldeído oxidase (AOX), essa atividade ocorre principalmente em duas vias, sendo a primeira oxidação da molécula, formando o ácido 6-cloronicotínico, que reage posteriormente com glicina para formar o conjugado ácido hipúrico e a segunda pela hidroxilação do anel imidazolidina na posição 4 ou 5, formando assim seus metabólitos (COSTA *et al.*, 2009; SOLECKI2001) (Figura 2).

Figura 2 - Via metabólica do IMD em ratos



Fonte: Solecki (2001)

### 3.4 Células HepG2 e citotoxicidade

As células HepG2 correspondem a uma linhagem celular derivada de um hepatoblastoma humano e tem sido comumente utilizada como ferramenta na avaliação de metabolismo de xenobióticos e toxicidade hepática. Este modelo experimental está entre os sistemas *in vitro* mais sofisticados que auxiliam no estudo da citotoxicidade induzida por xenobióticos permitindo uma compreensão sobre o transporte, metabolismo e eliminação dessas substâncias pelo fígado e na interação e indução de hepatotoxicidade (GEBHARDT *et al.*, 2003; HOUCK *et al.*, 2009; JUDSON *et al.*, 2010; KANSMULLER *et al.*, 1998). Devido à função essencial que o fígado desempenha no organismo, principalmente a de absorção e biotransformação/desintoxicação de substâncias, torna-se um importante alvo para os efeitos nocivos dos xenobióticos, pelos quais podem provocar perturbação da sua homeostasia e danos até mesmo irreversíveis (JAESCHKE *et al.*, 2002).

As células HepG2 possuem morfologia semelhante ao parênquima hepático e mantêm as características e a maioria das funções especializadas dos hepatócitos normais (KANSMULLER *et al.*, 1998; LIEBEL *et al.*, 2015). Além do mais, secretam proteínas plasmáticas como albumina, fibrinogênio e plasminogênio e tem a capacidade de realizar a biotransformação de muitos, mas não todos, compostos xenobióticos (LeCLUYSE *et al.*, 2012), uma vez que as células HepG2 apresentam níveis mais baixos das enzimas da fase I e II do que em hepatócitos humanos recém-isolados (RUEFF; DAWSON; MENDELL, 1996; WALTER; WILLEM, 2007). Alguns autores têm estimulado a atividade de biotransformação dessas células empregando ativadores seletivos de CYPs, tais como  $\beta$ -naftoflavona, rifampicina, fenobarbital e etanol (MATSUDA *et al.*, 2002; LIU; ZHANG; XING, 2011; BOEHME *et al.*, 2010) antes de testes de citotoxicidade, o que permite uma melhor avaliação do efeito tóxico considerando a produção de metabólitos.

Uma das características do cultivo da linhagem HepG2 é o crescimento em monocamada e pequenos agregados, aderidas à superfície e são não-tumorigênicas, além disso apresenta facilidade na manipulação e alta reprodutibilidade de experimentos em comparação com os hepatócitos primários. Outra característica importante é que são células metabolicamente ativas e são capazes de simular a função hepática de um organismo *in vitro* (VINKEN *et al.*, 2012). Raza, John e Benedict (2011) relatam vantagens na utilização de células

HepG2 mostrando que na utilização de um único sistema a avaliação se torna mais eficiente, sendo possível identificar múltiplos alvos metabólicos e moleculares em toxicidades induzidas por xenobióticos.

A citotoxicidade, ou potencial citotóxico, é a capacidade de um agente induzir efeitos adversos na célula, seja na sua estrutura ou até mesmo na função de um ou mais componentes celular. A lesão celular pode ser desencadeada por vários agentes tóxicos entre eles estão os praguicidas, pelos quais podem induzir citotoxicidade, onde a ação mecânica destas substâncias são diversas como por exemplo: interferência na integridade das membranas, interferência no metabolismo, degradação ou liberação de componentes celulares e na divisão celular entre outros (EKWALL, 1983; SEIBERT, 1996).

Nesse sentido, as células HepG2 têm sido extensivamente utilizadas como sistema de teste para a elucidação de hepatotoxicidade. Portanto, as mesmas foram escolhidas para este estudo, pelo fato do fígado ser apontado na literatura como alvo principal da ação do IMD e os mecanismos envolvidos ainda não terem sido totalmente esclarecidos.

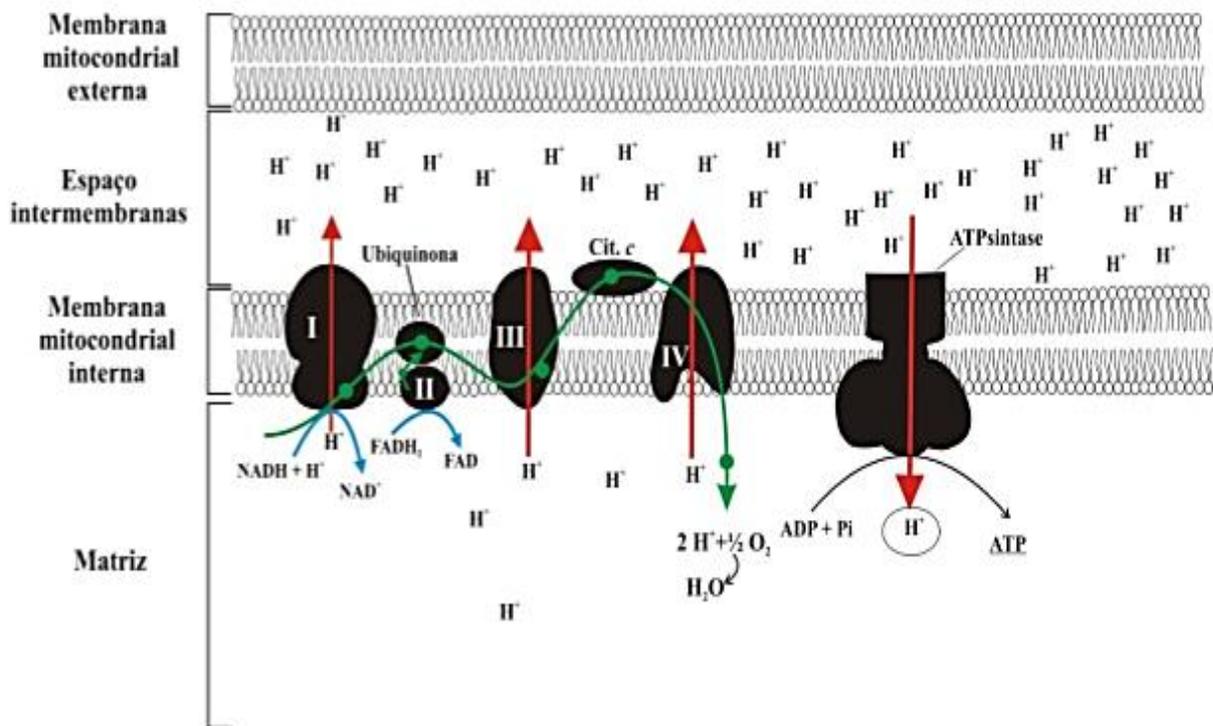
### **3.5 Mitocôndrias como alvo de xenobióticos**

As mitocôndrias são organelas intracelulares que não apresentam formas e dimensões fixas, sendo estas características dependentes do estado metabólico dos tecidos nos quais se localizam (DAUM, 1985). Tipicamente, as mitocôndrias existentes no parênquima hepático apresentam dimensões de 0,45 µm de diâmetro e 4,42 µm de comprimento. O número dessas organelas por hepatócitos varia de 800 (SCHEFFLER, 1999) a 1312 mitocôndrias/célula, o que representa em torno de 17% do volume celular (VAN GURP *et al.*, 2003). Essa organela apresenta DNA e RNA próprio e características específicas, além de estarem diretamente ligadas à regulação de várias funções celulares dependentes de energia, como o metabolismo intermediário, regulação iônica, motilidade e proliferação celular (PEDERSEN, 1999).

As mitocôndrias são responsáveis pela produção de energia utilizada pelas células por meio da fosforilação oxidativa (NICHOLLS; FERGUSON, 2013). A energia liberada pela oxidação de substratos na cadeia respiratória é usada para transportar prótons através da membrana interna, gerando a força próton-motora que impulsiona a síntese de ATP pela F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintase (Figura 3). São organelas

de suma importância para a manutenção e sobrevivência das células. Mitocôndrias danificadas podem causar sérios problemas às células, como, por exemplo, maior produção de ERON, consumo de ATP ou até mesmo produção ineficiente de ATP, além de alterar uma série de outros processos metabólicos (YOULE; VANDER BLIEK, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012; MAIOLI, 2012).

Figura 3 - Representação esquemática da cadeia respiratória mitocondrial acoplada à síntese de ATP



Fonte: Maioli (2012).

Evidências experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de xenobióticos. Os efeitos tóxicos sobre as mitocôndrias podem ocorrer por mecanismos diretos e indiretos, levando a disfunções mitocondriais (NADANACIVA *et al.*, 2007; MINGATTO *et al.*, 2007; DYKENS *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009; GARCIA *et al.*, 2010; CASTANHA ZANOLI *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012). Dados na literatura demonstram que existem várias substâncias químicas que ocasionam citotoxicidade por consequência de disfunção mitocondrial (PEREIRA *et al.*, 2012).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

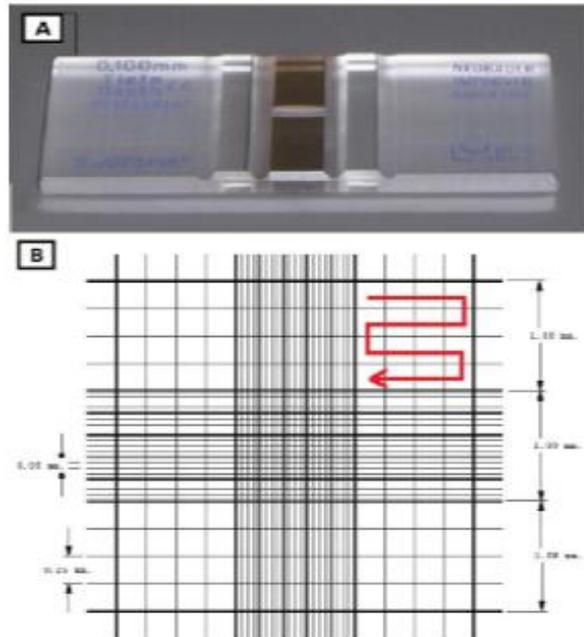
### 4.1 Reagentes

O IMD (Código 37894) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo, SP, Brasil). Em todos os ensaios foram empregados reagentes de alto grau analítico disponíveis comercialmente e as soluções foram preparadas com água ultra-filtrada em sistema purificador Millipore DirectQ-3<sup>®</sup> (Milli-Q<sup>®</sup>). As substâncias lipofílicas, incluindo o IMD, foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo que este não excedeu a concentração de 0,1% do volume total nos ensaios experimentais.

### 4.2 Cultura das células HepG2

As células HepG2 (American Type Culture Collection, n° HB8065) foram cultivadas em Meio "Minimum Essential Medium" (MEM) contendo L-glutamina 2 mM e sais de Earle ajustado com 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, aminoácidos não-essenciais 0,1 mM e piruvato de sódio 1 mM, suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina G 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL, em frascos de cultura mantidos em estufa climatizada com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura de 37°C. Após este procedimento, as quantidades adequadas de células para cada análise foram plaqueadas e incubadas durante 24 horas para assegurar uma boa adesão, antes de iniciar os experimentos. Antes do plaqueamento das células foi realizada a avaliação da viabilidade das mesmas pelo teste de exclusão com azul de tripan a 0,25% (ALTMAN *et al.*, 1993), por meio de contagem em câmara de Neubauer (Figura 4) usando um microscópio (CARL ZEISS, Germany) com objetiva de 10x. Os experimentos foram realizados apenas com cultivo de células que apresentaram uma viabilidade  $\geq 90\%$  no momento do plaqueamento.

Figura 4 - Câmara de Neubauer utilizada para avaliação da viabilidade celular por meio da exclusão do azul de tripan (0,25%). (A) visão macroscópica da câmara; (B) visão microscópica da organização dos quadrantes utilizados para a contagem das células



Fonte: Guelfi (2015).

## 4.2.1 Ensaios citotóxicos

### 4.2.1.1 Ensaio de proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada utilizando-se a sulforodamina B (SRB), de acordo com Skehan *et al.*(1990).  $5 \times 10^4$  células/mL foram incubadas em placas de 24 poços no meio “MEM” completo. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram expostas as diferentes concentrações (250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000  $\mu\text{M}$ ) de IMD pelos tempos de 24 e 48 horas. Após a incubação, o meio de cultivo foi removido e as células lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7.4, 10 mM). As células aderidas foram então fixadas com metanol absoluto por duas horas, lavadas com PBS estéril e coradas com SRB 0,5% (m/v) dissolvida em solução de ácido acético a 1% (v/v). Depois de incubado por 60 minutos, o corante foi removido por meio de lavagem com solução de ácido acético a 1% (v/v) até retirada completa do excesso de corante. O corante aderido às membranas da célula foi solubilizado em tampão Tris 10 mM, pH = 10 e a absorvância foi medida em 540 nm em um leitor de microplacas.

**Princípio:** A SRB é um corante capaz de ligar-se estequiometricamente com os aminoácidos básicos da proteína celular, sendo portanto, amplamente utilizado nos ensaios de proliferação, pois a quantidade de corante aderida na parede celular é proporcional ao número de células presentes ao final do ensaio (SKEHAN *et al.*,1990).

#### 4.2.1.2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada por meio do corante brometo de 3-(4,5 dimetiliazol-2il)-2,5 difeniltetrazólio (MTT), de acordo com Denizot e Lang (1986). As células HepG2 foram plaqueadas a uma densidade de  $2 \times 10^3$  células/mL em 200  $\mu$ L de meio de cultura (MEM completo) em placas de 96 poços e expostas às diferentes concentrações de IMD (250, 500, 1000 e 2000  $\mu$ M) nos tempos de 24 e 48 horas. As células foram subsequentemente incubadas com uma solução de MTT a 0,5% (5 mg/mL) numa atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 3 h. Após este período, o meio nos poços foi descartado e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 200  $\mu$ L de solução de DMSO (99,7%) em tampão de glicina 0,2 M, pH 10,2. A absorvância final foi avaliada em 570 nm de comprimento de onda num leitor de microplacas. Os resultados foram apresentados como a diferença percentual em relação ao grupo controle (C= sem adição do IMD).

**Princípio:** Durante o ensaio o corante MTT é clivado pelas desidrogenases das mitocôndrias das células funcionais, o que leva à redução do mesmo formando o composto “sal de Formazan” de coloração roxa. Sendo assim, neste procedimento a quantidade de “sal de Formazan” produzida é utilizada como indicativo proporcional da quantidade de células viáveis no ensaio (DENIZOT; LANG ,1986).

#### 4.2.1.3 Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )

Para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial nas células HepG2 foi utilizado o corante fluorescente tetrametilrodamina metil éster (TMRM). As células foram cultivadas a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/mL e, em seguida, expostas ao IMD (250, 500, 1000 e 2000  $\mu$ M). As células foram então lavadas com PBS,

tripsinizadas e incubadas com uma solução de TMRM 6,6  $\mu\text{M}$  a 37°C durante 30 min. As amostras foram subsequentemente lisadas com uma solução de Triton X-100 a 0,1% (v/v) e a TMRM capturada e retida pelas mitocôndrias foi avaliada nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 e 590 nm, respectivamente, usando um espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tóquio, Japão). Os resultados foram apresentados como a porcentagem da fluorescência em relação ao grupo controle (C= sem adição do IMD).

**Princípio:** A técnica consiste no monitoramento das alterações da fluorescência do corante fluorescente TMRM, um composto catiônico permeável à membrana celular que é rapidamente sequestrado pelas mitocôndrias intactas das células. A intensidade de fluorescência estabelece uma relação estequiométrica com o potencial de membrana mitocondrial, ou seja, quanto maior for a polarização mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) maior será a fluorescência (IMBERTI *et al.*, 1993).

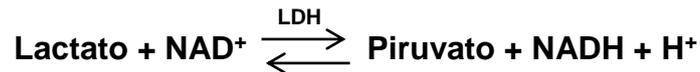
#### 4.2.1.4 Integridade da membrana celular

A integridade da membrana celular foi avaliada pela medida da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada pelas células. As células HepG2 foram cultivadas a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/mL em meio de cultura sem vermelho defenol “Minimum Essential Medium modified by Dulbecco” (DMEM) e incubadas com o IMD em placas de cultivo de 24 poços, utilizando as concentrações de 250, 500, 1000 e 2000  $\mu\text{M}$  do inseticida. Foi utilizado como controle positivo 10  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 (0,2%, v/v) por 15 minutos a 37°C. Após o período de tratamento adequado (24 ou 48 horas), a atividade da LDH presente no meio de cultura foi determinada com a utilização de um kit comercial (LABORCLIN, Brasil), preparado imediatamente antes do uso. Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, acondicionados em gelo, foram adicionados a uma cubeta termostaticada à temperatura de 37°C, contendo 1 mL do substrato oriundo do kit comercial.

A leitura da absorvância foi realizada utilizando comprimento de onda de 340 nm durante 4 minutos em Espectrofotômetro DU800 (Beckman, Fullerton, USA) e convertida em valores de atividade da LDH utilizando a fórmula de conversão, a seguir, indicada no kit:

**Atividade (LDH) = [(Abs<sub>inicial</sub> – Abs<sub>final</sub>) / tempo de leitura] x fator de conversão**

**Princípio:** A LDH é uma enzima citosólica que atua no metabolismo anaeróbico catalisando a transformação reversível de piruvato a lactato ao final da glicólise com o auxílio do sistema de coenzimas NADH/NAD<sup>+</sup>. Sendo assim, a perda da integridade da membrana pode ser medida pela quantificação da atividade da enzima LDH liberada no meio de cultivo por meio da reação a seguir:



As células aderidas nas placas de culturas foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a 212 g por 5 minutos. Posteriormente, as células com ruptura na membrana celular foram quantificadas pelo método de exclusão do azul de tripan. O número de células viáveis (sem danos na membrana) e as não viáveis (com danos na membrana) foram verificados por contagem em câmara de Neubauer usando um microscópio (CARL ZEISS, Germany), com objetiva de 10x (ALTMAN *et al.*, 1993).

**Princípio:** O método de exclusão do azul de tripan é utilizado para a determinação do número de células viáveis (com membrana celular intacta). Este método consiste no princípio de que células viáveis são capazes de excluir o azul de tripan, que atravessa a membrana do seu citosol. Enquanto células não viáveis (com membrana celular danificada) são incapazes de excluí-lo. A quantificação é feita contando as células coradas (não viáveis) e as incolores (viáveis) com uma câmara de Neubauer (STROBER, 2015).

#### **4.2.1.5 Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON)**

A produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) foi avaliada usando a sonda fluorescente 5,6-clometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, acetil éster (CM-H<sub>2</sub>DCFDA) (CHERNYAK *et al.*, 2006). As células HepG2 foram cultivadas a uma densidade de 1 × 10<sup>5</sup> células/mL. Após a incubação com o IMD nas concentrações de 250, 500, 1000 e 2000 µM, as células foram ainda incubadas com uma solução de CM-H<sub>2</sub>DCFDA a 2 mM, a 37°C durante 1 h. A fluorescência do

CM-H<sub>2</sub>DCFDA foi subsequentemente medida utilizando um espectrofluorímetro modelo RFPC 5301 (Shimadzu, Tóquio, Japão), nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 503 e 528 nm, respectivamente. Os resultados foram apresentados como a diferença entre o grupo controle negativo. Uma solução de terc-butilhidroperóxido (100 µM) foi usada para induzir a produção de ERON.

**Princípio:** A quantidade de ERON pode ser avaliada pelo emprego da sonda CM-H<sub>2</sub>DCFDA, a qual é permeável às membranas celulares e hidrolisada por esterases que removem grupos acetato formando o composto não fluorescente DCFDA, que na presença de ERON é rapidamente oxidado e transformado em DCF. Este último apresenta alta intensidade de fluorescência em 528 nm quando excitado em 503 nm sendo assim, um indicador de formação e acúmulo de ERON nas células (LEBEL *et al.*, 1992).

### 4.3 Análise estatística

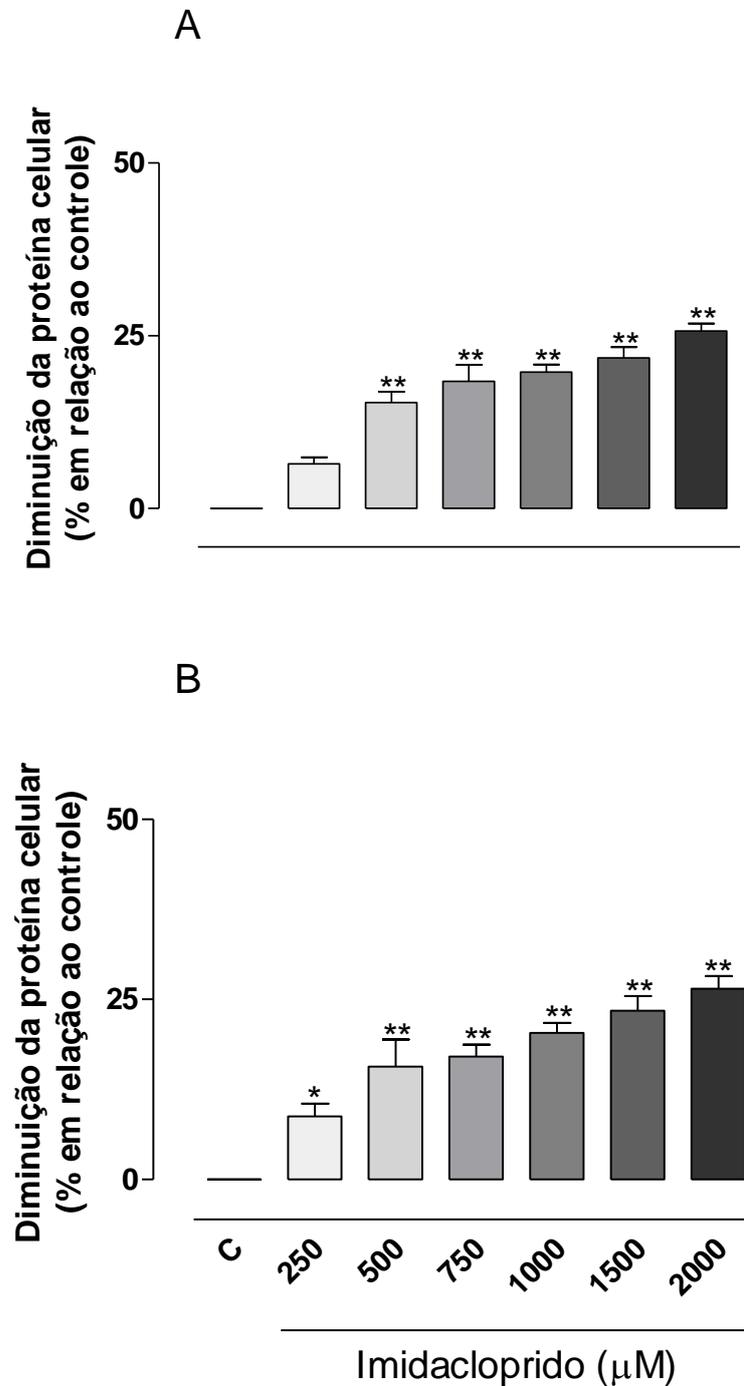
A significância estatística dos dados experimentais foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), sendo a comparação de médias realizada por meio do teste de Dunnet, o qual realiza a comparação entre os tratamentos e o controle, e os resultados com valor de  $P < 0,05$  considerados estatisticamente significantes. O programa utilizado foi o Graphpad Prism, versão 4.0 para o Windows (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Efeito do IMD na proliferação celular**

O IMD afetou a proliferação das células HepG2 nos tempos de 24 e 48 horas de exposição de maneira concentração e tempo-dependentes conforme demonstrado na Figura 5. Foi observado que após 24 horas de incubação o inseticida inibiu a proliferação celular a partir de 500  $\mu\text{M}$  (Figura 5A), e após 48 horas, o inseticida apresentou inibição significativa a partir da concentração 250  $\mu\text{M}$  (Figura 5B).

Figura 5 – Efeito do inseticida IMD sobre a quantidade de proteína celular da linhagem HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos com diferentes culturas de células. \*\*\*Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ , respectivamente). C = controle, apenas 0,1% de DMSO.

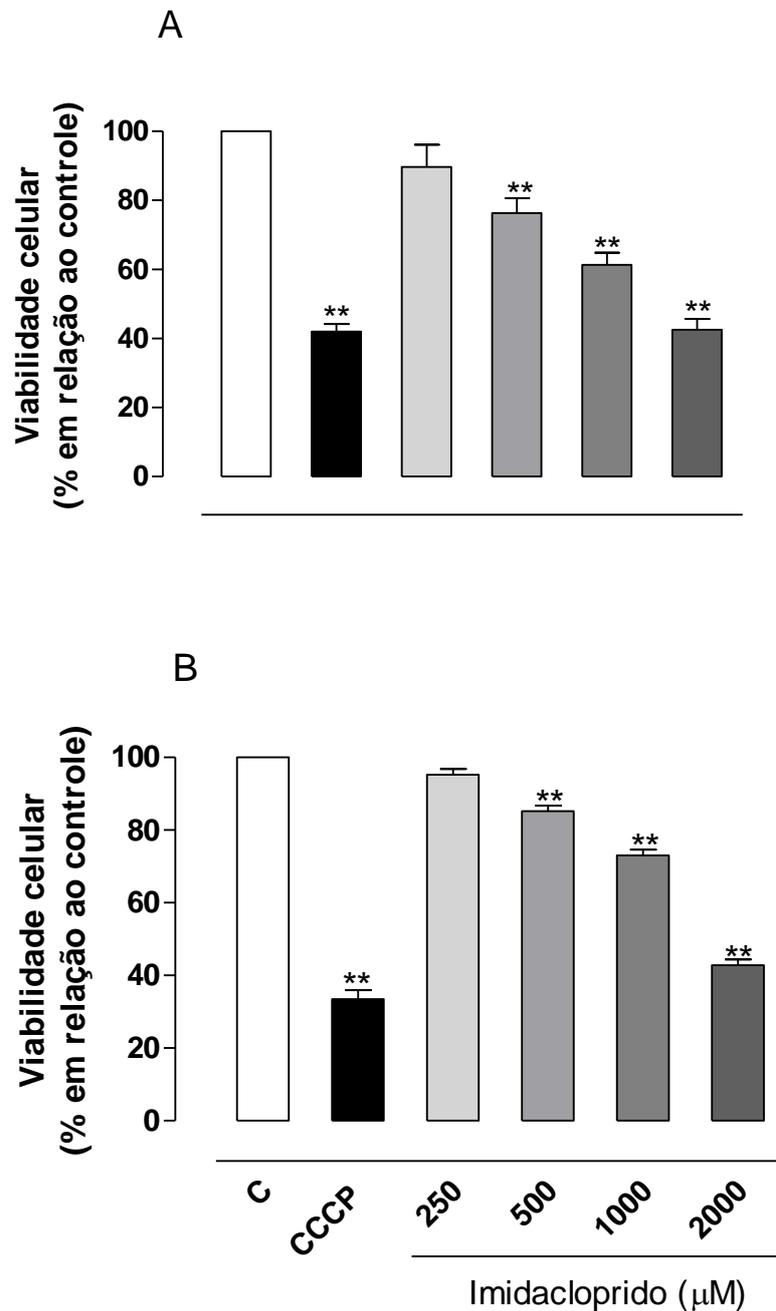


Fonte: Elaborado pela autora.

## 5.2 Efeito do IMD na viabilidade celular

O IMD afetou a capacidade metabólica das células de maneira dose-dependente, quando avaliada pelo teste do MTT (Figura 6). Foi observada uma diminuição na viabilidade após 24 horas de incubação a partir da concentração 500  $\mu\text{M}$  (Figura 6A), enquanto que no tempo de 48 horas este parâmetro também só foi afetado a partir da concentração de 500  $\mu\text{M}$  (Figura 6B).

Figura 6 - Efeito do inseticida IMD sobre a capacidade de redução do MTT pela linhagem HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos com diferentes culturas de células. \*\*Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (\*\*P<0,01). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CCCP= cianeto de carbonil m-clorofenil-hidrazona 10  $\mu$ M.

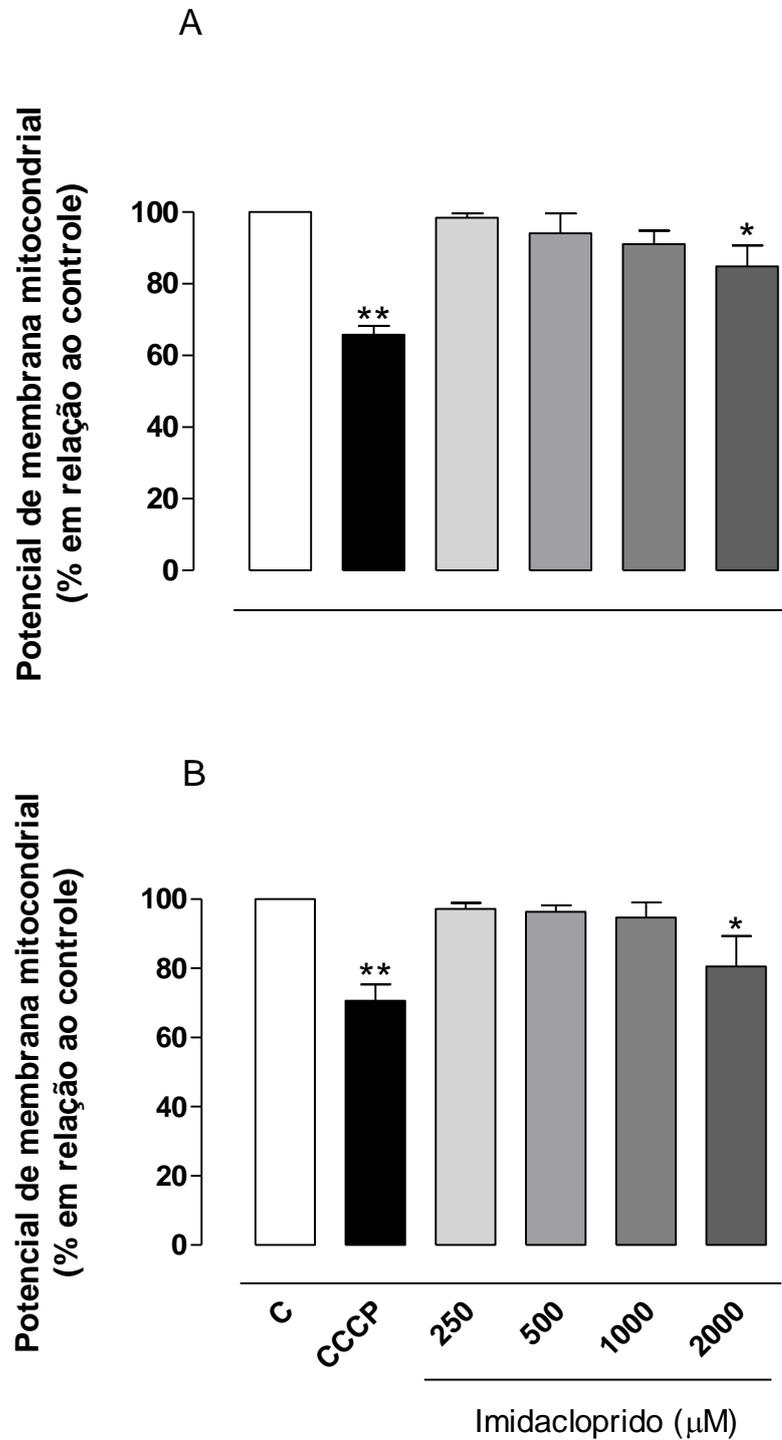


Fonte: Elaborado pela autora.

### **5.3 Efeito do IMD no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )**

As alterações no potencial de membrana mitocondrial ocasionadas pela exposição das células HepG2 ao IMD foram observadas nos tempos 24 e 48 horas conforme demonstrado na Figura 7, com efeito significativo em ambos os tempos somente na maior concentração analisada (2000  $\mu$ M).

Figura 7 - Efeito do inseticida IMD sobre o potencial de membrana mitocondrial na linhagem HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos com diferentes culturas de células. \*\*\*Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ , respectivamente). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CCCP= cianeto de carbonil m-clorofenil-hidrazona 25  $\mu\text{M}$ .

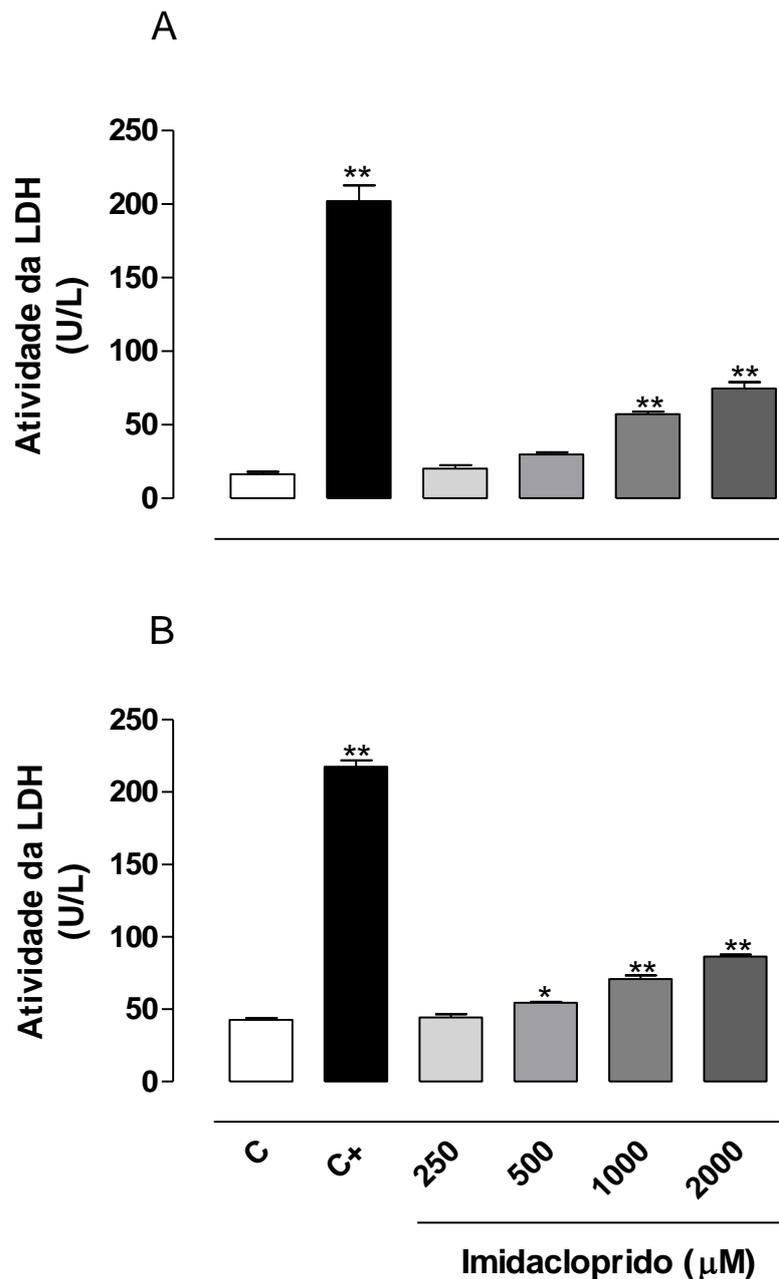


Fonte: Elaborado pela autora.

#### **5.4 Efeito do IMD na integridade da membrana celular**

O IMD induziu danos na membrana celular em ambos os tempos investigados de maneira dose e tempo-dependente (Figura 8), pois foram observados aumentos significantes na atividade enzimática da LDH em relação ao controle no tempo de 24 horas a partir de 1000  $\mu\text{M}$  (Figura 8A) e no tempo 48 horas já a partir da concentração de 500  $\mu\text{M}$  (Figura 8B).

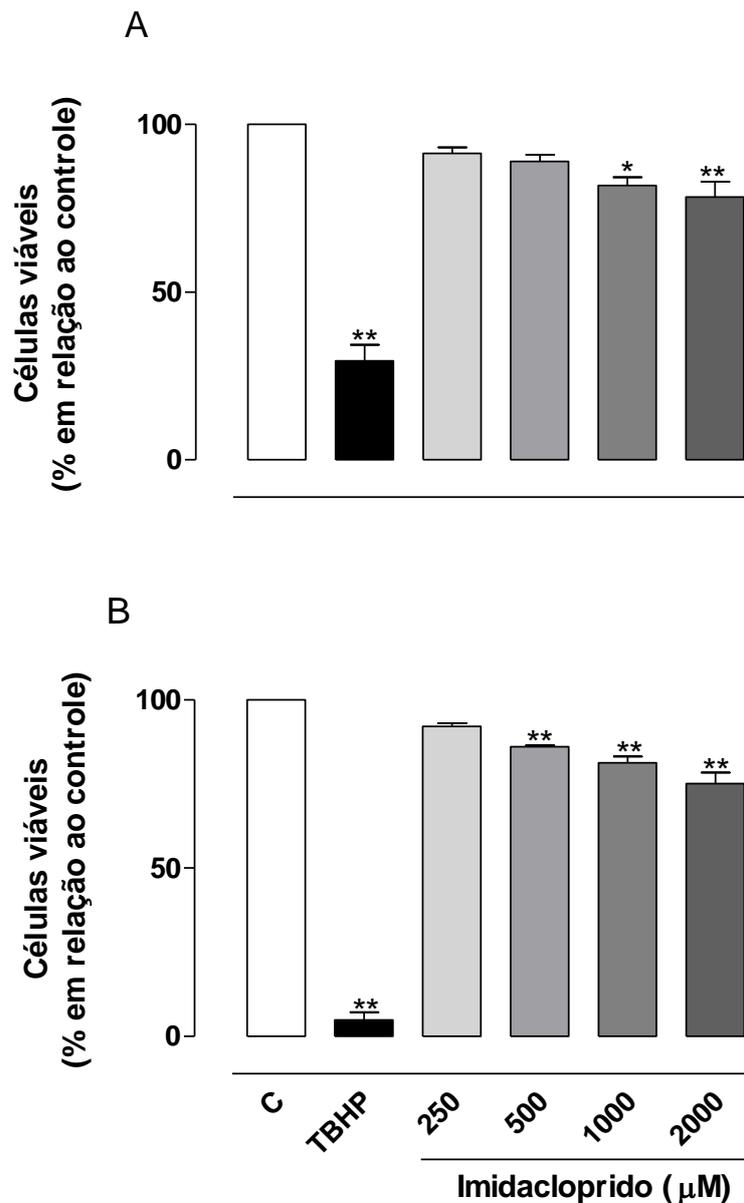
Figura 8 - Efeito do inseticida IMD sobre a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) pela linhagem HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos com diferentes culturas de células. \*\*\*Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ , respectivamente). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; C+= Triton X-100 (0,2%).



Fonte: Elaborado pela autora.

Os danos à membrana provocados pelo IMD foram comprovados pela avaliação da porcentagem de células viáveis que foi realizada por meio da exclusão do corante azul de tripan (Figura 9).

Figura 9 - Efeito do inseticida IMD sobre a viabilidade das células da linhagem HepG2, avaliada pela exclusão do corante azul de tripan, após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos com diferentes culturas de células. \*\*\*Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ , respectivamente). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; TBHP = *t*-butilhidroperóxido 100  $\mu$ M.

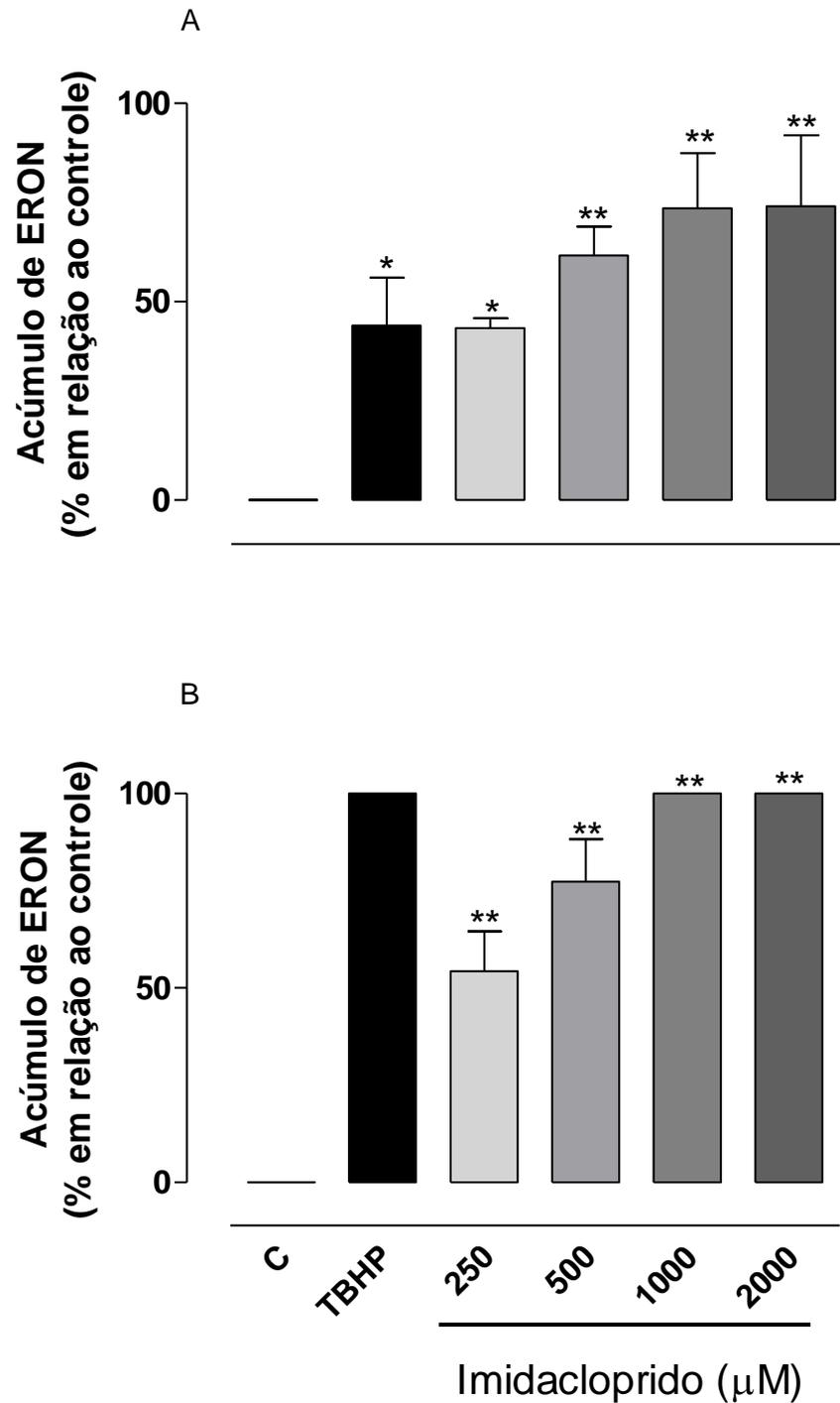


Fonte: Elaborado pela autora.

### **5.5 Efeito do IMD na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON)**

Os resultados demonstram que ocorreu acúmulo de espécies reativas após a exposição das células HepG2 ao IMD de maneira tempo e dose-dependente (Figura 10), sendo que o inseticida mostrou ser responsável pela produção de ERON em taxas superiores a 50% nas concentrações acima de 500  $\mu\text{M}$ , após 24 horas de incubação (Figura 10A) e à partir de 250  $\mu\text{M}$  após 48 horas (Figura 10B).

Figura 10 - Efeito do inseticida IMD sobre o acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERON) na linhagem HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos com diferentes culturas de células. \*\*\*Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ , respectivamente). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; TBHP = *t*-butilhidroperóxido 100  $\mu$ M.



Fonte: Elaborado pela autora.

## 6 DISCUSSÃO

O IMD tem sido extensivamente usado em todo o mundo na agricultura e na medicina veterinária e, conseqüentemente, a exposição aos resíduos do inseticida tem se tornado constante, colocando em risco a saúde humana e animal devido à sua toxicidade. Apesar de ser apresentado como inseticida seguro e de baixa toxicidade para mamíferos, vários trabalhos tem demonstrado ação tóxica do IMD, não só em mamíferos, mas também em outros organismos não alvos (BAL *et al.*, 2012a; BAL *et al.*, 2012b; VIEIRA *et al.*, 2018; SRIAPHA *et al.*, 2019; ROGERS *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019; ZEID *et al.*, 2019).

Os resultados do presente trabalho mostraram que o IMD foi capaz de causar toxicidade em células HepG2 após os tempos de 24 e 48 horas de exposição. A perda da viabilidade celular foi observada pela inibição da proliferação celular que ocorreu a partir da concentração de 500  $\mu\text{M}$  após 24 horas, já em 48 horas o efeito aumentou, sendo significativo a partir de 250  $\mu\text{M}$  de forma dose e tempo-dependente. Outro fator que contribuiu para a perda da viabilidade celular, com base no ensaio de MTT, foram os danos mitocondriais, por meio dos quais o IMD afetou a capacidade metabólica das células, este efeito foi significativo a partir da concentração 500  $\mu\text{M}$  em ambos os tempos de incubação (24 e 48 horas). Esses resultados estão em concordância com os resultados de 48 horas nos testes de LDH e com o teste de azul de tripan mostrando que a perda da viabilidade pode estar associada com a perda da integridade da membrana que conseqüentemente leva à morte celular.

Estudo realizado por Bizerra *et al.* (2020) utilizando hepatócitos isolados de ratos normais e de ratos previamente tratados com dexametasona (estimulador do citocromo P450) expostos ao IMD (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM) durante 0 a 120 minutos, mostrou que o inseticida não foi capaz de reduzir a viabilidade celular em hepatócitos de ratos normais, uma vez que não foi observado efeito significativo na atividade das enzimas alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), porém, o IMD diminuiu a viabilidade celular nos hepatócitos isolados dos ratos previamente tratados com a dexametasona nas concentrações 1,5, 2,0 e 3,0 mM, indicando que a biotransformação do composto interfere em sua toxicidade. Essa hipótese é corroborada no presente estudo, uma vez que em células HepG2, o IMD já exerceu efeito sobre a viabilidade celular na concentração de 500  $\mu\text{M}$  nos tempos

de 24 e 48 horas de exposição, demonstrando que o tempo de biotransformação é um fator importante no potencial citotóxico do IMD.

Indicações de lesão celular podem ser avaliadas pela despolarização mitocondrial, uma vez que o colapso do potencial de membrana compromete a energia e, conseqüentemente, causa danos à integridade da célula (IMBERTI *et al.*, 1993). O IMD diminuiu o potencial de membrana mitocondrial em células HepG2 na maior concentração testada (2000  $\mu\text{M}$ ) nos dois tempos de incubação (24 e 48 horas). No estudo de Bizerra *et al.* (2018) usando mitocôndrias isoladas de fígado de rato o IMD (50 - 200  $\mu\text{M}$ ) não dissipou o potencial de membrana, porém, diminuiu a síntese de ATP, sendo que esse efeito foi atribuído à uma inibição do  $F_0F_1$ -ATP sintase pelo inseticida. Em outro estudo usando hepatócitos isolados de fígado de rato permeabilizados com digitonina (BIZERRA *et al.*, 2020) o IMD também não dissipou o potencial de membrana mitocondrial em nenhuma das concentrações testadas (50,100,150 e 200  $\mu\text{M}$ ) confirmando os achados nas mitocôndrias isoladas. Sendo assim, nossos resultados reforçam essa propriedade do IMD, pois mesmo com concentrações mais altas do que os estudos anteriores (250, 500 e 1000  $\mu\text{M}$ ) e tempo de exposição mais prolongado (24 e 48 horas) não foi observado efeito significativo no potencial de membrana mitocondrial, a não ser na concentração 2000  $\mu\text{M}$ .

As células são dependentes de ATP para realizar diversas funções como metabolismo e atividades fisiológicas, no entanto, danos causados às mitocôndrias que são as organelas responsáveis pela produção de ATP, podem causar danos as células e até mesmo acarretar em morte celular (EGUCHI; SHIMIZU; TSUJIMOTO, 1997; SKULACHEV, 2000). Uma vez que a capacidade metabólica das células foi afetada pelo IMD, conforme observado no ensaio de MTT, também foi avaliada a integridade da membrana celular. Os resultados demonstraram que o IMD induziu danos na membrana celular causando a liberação da enzima LDH, pois foram observados aumentos significantes na atividade desta enzima em relação ao controle a partir da concentração de 1000  $\mu\text{M}$  em 24 horas, e conforme aumentou o tempo de exposição, o efeito foi intensificado tendo sido significativo a partir de 500  $\mu\text{M}$  em 48 horas.

Os danos à membrana provocados pelo IMD foram comprovados pela avaliação da porcentagem de células viáveis que foi realizada por meio da exclusão do corante azul de tripan demonstrando mecanismo de morte celular por necrose,

uma vez que, ocorreu o extravasamento do conteúdo celular, indicando um mecanismo de morte com rompimento da membrana. Além das evidências encontradas no presente estudo de que o IMD pode causar morte celular por necrose, trabalho recente encontrado na literatura científica demonstrou que o inseticida também foi capaz de induzir estresse oxidativo e morte celular por apoptose em fígado de camundongos na dose de 5 mg/kg de peso corporal durante 14 dias resultando em hepatotoxicidade (SHAO *et al.*, 2020).

Estudo anterior realizado por Abd-Elhakim, Mohammed e Mohamed (2018) mostrou a capacidade do IMD de provocar danos oxidativos nos tecidos cerebrais de ratos após receberem oralmente 1 mg de IMD/kg de massa corpórea. Este efeito foi evidenciado pelos altos níveis de proteína carbonil, 8-hidroxi-guanosina e malondialdeído e redução da capacidade antioxidante total. Nossos resultados mostraram que o IMD promoveu o acúmulo de ERON em taxas superiores a 50% nas concentrações acima de 500  $\mu\text{M}$ , já após 24 horas de incubação e 250  $\mu\text{M}$  no tempo 48 horas, podendo levar ao estresse oxidativo. Sabendo que o estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a concentração das espécies reativas e os sistemas antioxidantes celulares e teciduais, e que o mesmo pode induzir alterações moleculares nas células e resultar em lesão celular e até mesmo a morte celular (ONG; SHAN; CHIA, 2002), um aumento exacerbado da produção de ERON provocado pelo IMD pode estar relacionado ao mecanismo de toxicidade induzido pelo inseticida nas células HepG2.

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados do presente estudo sugerem que o IMD pode induzir o bloqueio da proliferação celular, causar diminuição na atividade metabólica das células e consequentemente provocar uma perda na integridade da membrana, causando a morte celular por necrose. Uma vez que o IMD também induziu aumento da produção de ERON, sugere-se que a toxicidade induzida pelo IMD nas células HepG2 esteja relacionada à indução de estresse oxidativo. Este mecanismo pode estar envolvido na hepatotoxicidade apresentada pelo inseticida.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-DONIA, M. B.; GOLDSTEIN, L. B.; BULLMAN, S.; TU, T.; KHAN, W. A.; DECHKOVSKAIA, A. M.; AND ABDEL-RAHMAN, A. A. Imidacloprid induces neurobehavioral deficits and increases expression of glial fibrillary acidic protein in the motor cortex and hippocampus in offspring rats following in utero exposure. **Journal Toxicology Environmental Health, part A**, v. 71, p. 119-130, 2008.
- ABD-ELHAKIM, Y.; MOHAMMED, H. H.; MOHAMED, W. A. M.; Imidacloprid impacts on neurobehavioral performance, oxidative stress, and apoptotic events in the brain of adolescent and adult rats. **Journal of agricultural food chemistry**, v. 66 p. 13513-13524, 2018.
- ARFAT, Y.; MAHMOOD, N.; TAHIR, M. U.; RASHID, M.; ANJUM, S.; ZHAO, F.; LI, D.; SUN, Y.; HU, L.; ZHIHAO, C.; YIN, C.; SHANG, P.; QIAN, A-R. Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 554-561, 2014.
- BAL, R.; ERDOGAN, S.; THEOPHILIDIS, G.; BAYDAS, G.; NAZIROGLU, M. Assessing the effects of the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the cholinergic synapses of the stellate cells of the mouse cochlear nucleus using whole-cell patchclamp recording. **Neurotoxicology**, v. 31, p. 113-120, 2010.
- BAL, R.; NAZIROGLU, M.; TURK, G.; YILMAZ, O.; KULOGLU, T.; ETEM, E.; BAYDAS, G. Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. **Cell Biochemistry Function**, v. 30, p. 492–499, 2012.
- BAL, R.; TURK, G.; TUZCU, M.; YILMAZ, O.; KULOGLU, T.; GUNDOGDU, R.; GUR, S.; AGCA, A.; ULAS, M.; CAMBAY, Z.; TUZCU, Z.; GENCOGLU, H.; GUVENC, M.; OZSAHIN, A. D.; KOCAMAN, N.; ASLAN, A.; ETEM, E. Assessment of imidacloprid toxicity on reproductive organ system of adult male rats. **Journal Environmental Science and Health, part B: Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v. 47, p. 434-444, 2012.
- BAPTISTA, G. C. Desenvolvimento do uso de pesticidas / inseticidas. Manual de resíduos de pesticidas em alimentos. [S.l.]: **GARP-Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas**, 1999. p. 6-11.
- BIANCHI, J.; MELLO, D. C. C.; MORALES, M. A. M. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and Salmonella typhimurium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 174-183, 2015.
- BIZERRA, P. F. V.; GUIMARÃES, A. R. J. S.; MAIOLI, M. A.; MINGATTO, F. E. Imidacloprid affects rat liver mitochondrial bioenergetics by inhibiting FoF1-ATP synthase activity. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 81, p. 229-239, 2018.
- BIZERRA, P. F. V.; GUIMARÃES, A. R. J. S.; MIRANDA, C. A.; CONSTANTIN, R. P.; UTSUNOMIYA, K. S.; GILGLIONI, E. H.; CONSTANTIN, J.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; MAIOLI, M. A.; MINGATTO, F. E. Enhanced cytotoxicity of imidacloprid by

biotransformation in isolated hepatocytes and perfused rat liver.

**Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2020.

BOMBARDI, L. M. **Lançado na Europa mapa do envenenamento de alimentos no Brasil**. Araçatuba: Sindicato dos Engenheiros no Estado de São Paulo- SEESP, 2019. Disponível em:

<https://www.seesp.org.br/site/index.php/comunicacao/noticias/item/18371-lancado-na-europa-mapa-do-envenenamento-de-alimentos-no-brasil>. Acesso em: 22 out. 2019.

BOEHME, K.; DIETZ, Y.; HEWITT, P.; MUELLER, S.O. Activation of P53 in HepG2 cells as surrogate to detect mutagens and promutagens in vitro. **Toxicology Letters**, v.198, p.272-281, 2010.

BUSZEWSKI, B.; BUKOWSKA, M.; LIGOR, M.; BARANOWSKA, I. S. A holistic study of neonicotinoids neuroactive insecticides: properties, applications, occurrence, and analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 34723- 34740, 2019.

CABONI, P.; SAMMELSON, R. E.; CASIDA, J. E. Phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and GABAergic action: ethiprole compared with fipronil. **Journal of agricultural food chemistry**, v. 51, p. 7055-7061, 2003.

CASTANHA ZANOLI, J. C.; MAIOLI, M. A.; MEDEIROS, H. C. D.; MINGATTO, F. E. Abamectin affects the bioenergetics of liver mitochondria: A potential mechanism of hepatotoxicity. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 51-56, 2012.

CHERNYAK, B.V.; IZYMOV, D.S.; LYAMZAEV, K. G.; PASHKOVSKAYA, A. A.; PLETJUSHKINA, O.Y.; ANTONENKO, Y.N.; SAKHAROV, D.V.; WIRTZ, K.W.A.; SKULACHEV, V.P. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, p. 525-534, 2006.

COSTA, C.; SILVARI, V.; MELCHINI, A.; CATANIA, S.; HEFFRON, J. J.; TROVATO, A. Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 672, p. 40-44, 2009.

CRADDOCK, H. A.; HUANG, D.; TURNER, P. C.; QUIRÓS-ALCALÁ, L.; PAYNE-STURGES, D.C. Trends in neonicotinoid pesticide residues in food and water in the United States, 1999-2015. **Environmental Health**, v. 18, n. 1, p. 7, 2019.

DANIELSON, P. B. The cytochrome P450 superfamily: Biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. **Current Drug Metabolism**, v. 3, p. 561-597, 2002.

DAS, P.C.; CAO, Y.; CHERRINGTON, N.; HODGSON, E.; ROSE, R. L. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 164, p. 200-214, 2006.

DAUM, G. Lipids of mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 822, p. 1-42, 1985.

DEMSIA, G.; VLASTOS, D.; GOUMENOU, M.; MATTHOPOULOS, D. P. Assessment of the genotoxicity of imidacloprid and metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. **Mutation Research**, v. 634, p. 32-39, 2007.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric Assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reability, **Journal of Immunological Methods**, 22, v. 89, p. 271 – 277, 1986.

DESAI, B.; PARIKH, P. Biochemical alterations on exposure of imidacloprid and curzate on fresh water fish *Oreochromismossambicus* and *Labeorohita*. **Indian Journal of Forensic Medicine and Toxicology**, v. 7, p. 87-91, 2013.

DURO, P. N.; TEIXEIRA, J. G.; PINTO, A. P. **Desenvolvimento de métodos eletroquímicos para quantificação de neonicotinóides em amostras de água contaminadas**. 2003. f.15-20. Dissertação (Mestrado em Análises Químicas Ambientais) - Universidade de Évora, 2003.

DUZGUNER, V.; ERDOGAN, S. Chronic exposure to imidacloprid induces inflammation and oxidative stress in the liver & central nervous system of rats. **Pesticides Biochemistry and Physiology**, v. 104, p. 58-64, 2012.

DYKENS, J. A.; JAMIESON, J. D.; MARROQUIN, L. D.; NADANACIVA, S.; XU, J. J.; DUNN, M. C.; SMITH, A. R.; WILL, Y. In vitro assessment of mitochondrial dysfunction and cytotoxicity of nefazodone, trazodone and buspirone. **Toxicological Sciences**, v. 103, p. 335-345, 2008.

EGUCHI, Y.; SHIMIZU, S.; TSUJIMOTO, Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. **Cancer Research**, v. 57, p. 1835–1840, 1997

EU - EUROPEAN UNION. Commission implementing regulation (EU) No 485/2013 of 24 May 2013 “amending Implementing Regulation (EU) No 540/2011, as regards the conditions of approval of the active substances clothianidin, thiamethoxam and imidacloprid, and prohibiting the use and sale of seeds treated with plant protection products containing those active substances”. **Official Journal of the European Union**, 25 maio. 2013. L 139/12-26, 2013.

FOSSSEN, M. **Environmental fate of imidacloprid**. 2006. Disponível em: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/lmidclprdfate2.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2019.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; VANDENABEELE, P.; BRANCO, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions on cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differentiation**, v. 19, p. 107-120, 2012.

GARCIA, A. F.; MEDEIROS, H. C. D.; MAIOLI, M. A.; LIMA, M. C.; ROCHA, B. A.; COSTA, F. B.; CURTI, C.; GROppo, M.; MINGATTO, F. E. Comparative effects of

lantadene A and its reduced metabolite on mitochondrial bioenergetics. **Toxicon**, v. 55, p. 1331-1337, 2010.

GEBHARDT, R.; HENGSTLER, J.G.; MÜLLER, D.; GLÖCKNER, R.; BUENNING, P.; LAUBE, B.; SCHMELZER, E.; ULLRICH, M.; UTESCH, D.; HEWITT, N.; RINGEL, M.; HILZ, B.R.; BADER, A.; LANGSCH, A.; KOOSE T.; BURGER, H.J.; MAAS, J.; OESCH, F, New hepatocyte in vitro systems for drug metabolism: metabolic capacity and recommendations for application in basic research and drug development, standard operation procedures. **Journal Drug Metabolism Reviews** , v. 35, p. 145–213, 2003.

GUELFY, M.; MAIOLI, M. A.; TAVARES, M. A.; MINGATTO, F. E. Citotoxicity of fipronil on hepatocytes isolated from rat and effects of its biotransformation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, p. 843-853, 2015.

GUILLOUZO, A. Liver cell models in in vitro toxicology. **Environmental Health Perspectives**, Washington, v. 106, suppl. 2, p. 511-532, 1998.

HAIDER, J. M.; RAUF, A. Sub-lethal effects of diazinon on hematological indices and blood biochemical parameters in indian carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). **Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 947-953, 2014.

HAN, W.; TIAN, Y.; SHEN, X. Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: an overview. **Chemosphere**, v. 192, p. 59-65, 2018.

HASSAN, A. M.S.; ELA, F. I. A. E.; AZIZ, A. M. A. Investigating the potential protective effects of natural product quercetin against imidacloprid-induced biochemical toxicity and DNA damage in adults rats. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 727-735, 2019.

HOUCK, K. A.; DIX, D. J.; JUDSON, R. S.; KAVLOCK, R. J.; YANG, J.; BERG, E. L. Profiling bioactivity of the ToxCast chemical library using BioMAP primary human cell systems. **Journal Biomol Screen**, v. 14, p. 1054–1066, 2009.

HUTCHINSON, M. J.; JACOBS, D. E.; MENCKE, N. Establishment of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) on the ferret (*Mustela putorius furo*) and its control with imidacloprid. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 15, p. 212-214, 2001.

IMBERTI, R.; NIEMINEM, A. L.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J. J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporine A and trifluoperazine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 265, p. 392-400, 1993.

IOANNIDES, C. **Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics**. Chichester: John Wiley & Sons, 2002.

JAESCHKE, H.; GORES, G. J.; CEDERBAUM, A. I.; HINSON, J. A.; PESSAYRE, D.; LEMASTERS, J. J. Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicology Science**, v. 65, p. 166-176, 2002.

JUDSON, R. S.; HOUCK, K. A.; KAVLOCK, R. J. KNUDSEN, T. B.; MARTIN, M. T.; MORTENSEN, H. M.; REIF, D. M.; ROTROFF, D. M.; SHAH, I.; RICHARD, A. M.;

DIX, D. J. In vitro screening of environmental chemicals for targeted testing prioritization: the ToxCast project. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p. 485-492, 2010.

KAMMON, A. M.; BRAR, R. S.; BANGA, H. S.; SODHI, S. Patho-biochemical studies on hepatotoxicity and nephrotoxicity on exposure to chlorpyrifos and imidacloprid in layer chickens. **Veterinarski Arhiv**, v. 80, p. 663-672, 2010.

KANSMULLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUD, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, v. 402, p. 185-202, 1998.

KAPOOR, U.; SRIVASTAVA, M. K.; TRIVEDI, P.; GARG, V.; SRIVASTAVA, L. P. Disposition and acute toxicity of imidacloprid in female rats after single exposure. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 190-195, 2014.

KATARIA, S. K.; CHHILLAR, A. K.; KUMAR, A.; TOMAR, M.; MALIK, V. Cytogenetic and hematological alterations induced by acute oral exposure of imidacloprid in female mice. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 59-65, 2016.

KAUR, B.; SANDHU, H.; KAUR, R. Toxic effects of subacute oral exposure of imidacloprid on biochemical parameters in crossbred cow calves. **Toxicology International**, p. 13-43, 2006.

KOH, J. Y.; CHOI, D. W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. **Journal of Neuroscience Methods**, v.20, p.83-90, 1987.

KOWALTOWSKI, A. J.; SOUZA-PINTO, N. C.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, p. 333-343, 2009.

KUMAR, A.; VERMA, A.; KUMAR, A. Accidental human poisoning with a neonicotinoid insecticide, imidacloprid: A rare case report from rural India with a brief review of literature. **Egyptian Journal Forensic Sciences**, v. 3, p. 123-126, 2013.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, n. 5, p. 227-231, 1992.

LeCLUYSE, E. L.; WITEK, R. P.; ANDERSEN, M. E.; POWERS, M. J. Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 42, p. 501 – 548, 2012.

LEMASTERS, J.J. V. Necroptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. **American Journal of Physiology**, v. 276, p. G1-G6, 1999.

LEMASTERS, J. J. QIAN, T.; BRADHAM, C. A.; BRENNER, D. A.; CASCIO, W. E.; TROST, L. C.; NISHIMURA, Y.; NIEMINEN, A. L.; HERMAN, B. Mitochondrial dys

function in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 31, p. 305–319, 1999.

LI, Y.; COUCH, L.; HIGUCHI, M.; FANG, J. L.; GUO, L. Mitochondrial dysfunction induced by sertraline, an antidepressant agent. **Toxicological Sciences**, v. 127, p. 582-591, 2012.

LIEBEL, S.; RIBEIRO, C. A. O.; MAGALHÃES, V. F.; SILVA, R. C.; ROSSI, S. C.; RANDI, M. A. F.; NETO, F. F. Low concentrations of cylindrospermopsin induce increases of reactive oxygen species levels, metabolism and proliferation in human hepatoma cells (HepG2). **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 479-488, 2015.

LIU, L.; ZHANG, Z.; XING, D. Cell death via mitochondrial apoptotic pathway due to activation of Bax by lysosomal photodamage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 53–68, 2011.

LONARE, M.; KUMAR, M.; RAUT, S.; BADGUJAR, P.; DOLTADE, S.; TELANG, A. Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: a protective effect of curcumin. **Neurochemistry International**, v. 78, p. 122-129, 2014.

MAIOLI, M. A.; LEMOS, D. E.; GUELFY, M.; MEDEIROS, H. C. D.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MINGATTO, F. E. Mechanism for the uncoupling of oxidative phosphorylation by juliprosopine on rat brain mitochondria. **Toxicol**, v. 60, p. 1355-1362, 2012.

MATSUDA, H.; KINOSHITA, K.; SUMIDA, A.; TAKAHASHI, K.; FUKUEN, S.; FUKUDA, T.; TAKAHASHI, K.; YAMAMOTO, I.; AZUMA, J. Taurine modulates induction of cytochrome P450 3A4 mRNA by rifampicin in the HepG2 cell line. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1593, p. 93-98, 2002.

MINGATTO, F. E.; RODRIGUES, T.; PIGOSO, A. A.; UYEMURA, S. A.; CURTI, C.; SANTOS, A. C. The critical role of mitochondrial energetic impairment in the toxicity of nimesulide to hepatocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 601-607, 2002.

MINGATTO, F. E.; DORTA, D. J.; SANTOS, A. B.; CARVALHO, I.; SILVA, C. H. T. P.; SILVA, V. B.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; CURTI, C. Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potential mechanism accounting for hepatotoxicity of monocrotaline. **Toxicol**, v. 50, p. 724–730, 2007.

MOHAMED, F.; GAWARAMMANA, I.; ROBERTSON, T. A.; ROBERTS, M. S.; PALANGASINGHE, C.; ZAWAHIR, S.; JAYAMANNE, S.; KANDASAMY, J.; EDDLESTON, M.; BUCKLEY, N. A.; DAWSON, A. H.; ROBERTS, D. M. Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: a neonicotinoid insecticide. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e5127, 2009.

MOHANY, M.; BADR, G.; REFAAT, I.; EL-FEKI, M. Immunological and histological effects of exposure to imidacloprid insecticide in male albino rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 2106–2114, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NADANACIVA, S.; DYKENS, J. A.; BERNAL, A.; CAPALDI, R. A.; WILL, Y. Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 223, p. 277–287, 2007.

NICHOLLS, D.G; FERGUSON, S.J. **Bioenergetics 3**. San Diego: Academic Press, 2002.

NICOTERA, P.; LEIST, M.; FERRANDO-MAY, E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, v. 102-103, p. 139-142, 1998.

NORTOX. **Imidacloprid**. 2019. Disponível em:  
[http://www.nortox.com.br/files/produtos/bula/061323000000\\_13032015.pdf](http://www.nortox.com.br/files/produtos/bula/061323000000_13032015.pdf).  
Acessoem: 02 fev. 2019.

OBANA, H.; OKIHASHI, M.; AKUTSO, K.; KITAGAWA, Y.; HORI, S.; Determination of Neonicotinoid Pesticide Residues in Vegetables and Fruits with Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography Mass Spectrometry, **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 51, p. 2501, 2003.

ONG, C. N.; SHAN, A. M.; CHIA, S. E. Biomarkers for male reproductive health hazards: are they available? **Toxicology Letters**, v. 134, p. 17-30, 2002.

PEREIRA, L. C.; SOUZA, A. O.; PAZIN, M.; DORTA, D. J. Mitocôndria como alvo para avaliação de toxicidade de xenobiótico, **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 25, p. 1-14, 2012.

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 in Cell Biology**, v. 20, p. 411–481, 1978.

PONCE, H. A. G., SÁNCHEZ, A. R. R., JUÁREZ, F. J., MOSHAGE, H. Natural dietary pigments: Potential mediators against hepatic damage induced by over-the-counter non-Steroidal anti-Inflammatory and analgesic drugs. **Nutrients**, v. 10, p. 117, 2018.

POSPISCHIL, R. Imidacloprid fly bait: a fast acting formulation against flies in livestock. *In*: INTERNATIONAL CONFERENCE ON URBAN PESTS, 4., 2002, Charleston. **Proceedings** [...].Charleston: Pocahontas Press, 2002. p. 457-458.

PRESTON, B. L. Indirect effects in aquatic ecotoxicology: implications for ecological risk assessment. **Journal of Environmental Management**, v. 29, p. 311–323, 2002.

QADIR, S., LATIF, A., ALI, M., AND IQBAL, F. Effects of imidacloprid on the hematological and serum biochemical profile of Labeorohita. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 46, n.4, p. 1085–1090, 2014.

RAZA, H.; JOHN, A.; BENEDICT, S. Acetylsalicylic acid-induced oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p.15-24, 2011.

ROGERS, K. H.; MCMILLIN, S.; OLSTAD, K. J.; POPPENG, R. H. Imidacloprid Poisoning of Songbirds Following a Drench Application of Trees in a Residential Neighborhood in California, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, p. 1724- 1727, 2019.

RUEFF, A.; DAWSON, A. J. L. R.; MENDELL, L. M. Characteristics of nerve growth factor induced hyperalgesia in adult rats: dependence on enhanced bradykinin-1 receptor activity but not neurokinin-1 receptor activation. **Pain**, v. 66, p. 359-372, 1996.

SANTOS, A. B.; DORTA, D. J.; PESTANA, C. R.; MAIOLI, M. A.; CURTI, C.; MINGATTO, F. E. Dehydromonocrotaline induces cyclosporine A-insensitive mitochondrial permeability transition/cytochrome c release. **Toxicol**, p. 1-7, 2009.

SCHEFFLER, I. E. **Mitochondria**. New York: Wiley-Liss, 1999. 351 p.

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

SENYILDIZ, M.; KILINC, A.; OZDEN, S. Investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of widely used neonicotinoid insecticides in HepG2 and SH-SY5Y cells. **Toxicology and Industrial Health**, v. 34, p. 375-383, 2018.

SHAO, B.; WANG, M.; CHEN, A.; ZHANG, C.; LIN, L.; ZHANG, Z.; CHEN, A. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester against imidacloprid-induced hepatotoxicity by attenuating oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, inflammation and apoptosis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2020.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J.T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SKULACHEV, V.P. Mitochondria in programmed death phenomena: a principle of biology: it is better to die than to be wrong. **IUBMB Life**, v. 49, p. 365-373, 2000.

SOLECKI, R. **Pesticide residues in food 2001**: Toxicological evaluations IMIDACLOPRID. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr07.htm>. Acesso em: 02 abr. 2020.

SOUJANYA, S.; LAKSHMAN, M.; KUMAR, A. A.; REDDY, A. G. Evaluation of the protective role of vitamin C in imidacloprid-induced hepatotoxicity in male Albino rats. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 4, p. 63–67, 2013.

SRIAPHA, C.; TRAKULSRICHAI, S.; P. INTARAPRASONG, P.; WONGVISAWAKORN, S.; TONGPOO, A.; SCHIMMEL, J. Imidacloprid poisoning case series: potential for liver injury. **Clinical Toxicology**, v. 57, 2019.

STIVAKTAKIS, P. D.; KAVVALAKIS, M. P.; TZATZARAKIS, M. N.; ALEGAKIS, A. K.; PANAGIOTAKIS, M. N.; FRAGKIADAKI, P.; VAKONAKI, E.; OZCAGLI, E.; HAYES, W. A.; RAKITSKII, V. N.; TSATSAKIS, A. M. Long-term exposure of rabbits to imidacloprid as quantified in blood induces genotoxic effect. **Chemosphere**, v. 149, p. 108–113, 2016.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 111, p. A3.B.1-A3.B.3, 2015.

TANG, J.; USMANI, K. A.; HODGSON, E.; ROSE, R. L. In vitro metabolism of fipronil by human and rat cytochrome P450 and its interactions with testosterone and diazepam. **Chemico-Biological Interactions**, v. 147, p. 319-329, 2004.

TAVELLA, L. B.; SILVA, I. N.; FONTES, L. O.; DIAS, J. R. M.; SILVA, M. I. L. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 7, n. 2, p. 6-12, 2011.

THOMPSON, J.S.; THOMPSON, M. W. Genética bioquímica humana: farmacogenética. *In*: THOMPSON, J. S.; THOMPSON, M. W. **Genética médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p.124-133.

TOLEDO-FILHO, A.; VIEIRA, B. Farmacogenética. *In*: TOLEDO-FILHO, A.; VIEIRA, B. **Farmacologia aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 318-325.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, E.; Thiachloprid, imidacloprid and their imine derivatives upregulate the  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptor in M10 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 169, p.114, 2000.

TOMIZAWA, M.; LEE, D. L.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 247–268, 2005.

TOOR, H. K.; SANGHA, G. K.; KHERA, K. S. Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of female albino rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 105, p. 1–4, 2013.

VAN GURP, M. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, n. 3, p. 487-497, 2003.

VIEIRA, C. E. D.; PÉREZ, M.R.; ACAYABA, R. D.; MONTAGNER, C. C.; REIS, R. C. B. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 195, p. 125-134, 2018.

VINKEN, M.; PAUWELS, M.; ATEES, G.; VIVIER, M.; VANHAECKE, T.; ROGIERS, V. Screening of repeated dose toxicity data present in SCC(NF)P/SCCS safety evaluations of cosmetic ingredients. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 405–412, 2012.

WALTER, M. A.; WILLEM, G. E. J. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1581-1591, 2007.

YOULE, R. J.; VAN DER BLIEK, A. M. Mitochondrial fission, fusion and stress. **Science**, v. 337, p. 1062-1066, 2012.

ZHANG, T.; SONG, S.; BAI, X.; HE, Y.; ZHANG, B.; GUI, M.; KANNAN, K.; LU, S.; HUANG, Y.; SUN, H. A nationwide survey of urinary concentrations of neonicotinoid insecticides in China. **Environment International**, v. 132, p. 105-114, 2019.

ZEID, E. H. A.; ALAM, R.T.M.; ALI, S. A.; HENDAWI, M.Y. Dose-related impacts of imidacloprid oral intoxication on brain and liver of rock pigeon (*Columba livia domestica*), residues analysis in different organs. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 167, p. 60-68, 2019.