



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

JOYCE SANTANA RIZZI

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

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

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

**Botucatu
2022**

Joyce Santana Rizzi

Mecanismos de danos induzidos pelo Triclopir
em mitocôndrias hepáticas

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

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

Botucatu
2022

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

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

Carl Sagan
Cientista

★ 1934 † 1996

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

Capítulo 1 - Revisão da Literatura

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

Capítulo 2 - Manuscrito

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

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

RESUMO

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

ABSTRACT

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

LISTA DE ABREVIATURAS

A.F.U: Arbitrary Fluorescence Unit

ADP/O: Razão de ADP por Oxigênio

ADP: Adenosine 5' Difosfato

ANOVA: Análise de Variância

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

BSA: Albumina Soro Bovino

Ca²⁺: Íon de cálcio

CaCl₂: Cloreto de cálcio

CCCP: Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona

CEMIB: Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CL₅₀: Concentração letal (mediana)

CYP: Citocromo

DL₅₀: Dose letal (mediana)

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DNA: Ácido Desoxiribonucleíco

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

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

ERONs: Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

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

GSH: Glutathione Reduzida

GSSG: Glutathione Oxidada

H₂DCFDA: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

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

K⁺: Íon Potássio

KCl: Cloreto de Potássio

KH₂PO₄: Fosfato de Potássio Dibásico

Koc médio: Coeficiente de partição normalizado pelo carbono orgânico

KOH: Hidróxido de Potássio

Kow: Coeficiente de partição n-octanol-água

MDA: Malondealdeído

MoA: Modo de ação

mtDNA: Ácido Desoxiribonucleico Mitochondrial

NAD(P)⁺: Nucleotídeos de piridina oxidados

NAD(P)H: Nucleotídeos de piridina reduzidos

NaOH: Hidróxido de Sódio

NC: Negative control

NEM: N-etilmaleimida

nm: Nanômetros

OPT: O-ftalaldeído

pH: Potencial Hidrogeniônico (escala logarítma)

Pi: Fosfato inorgânico

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

PM: Peso Molecular

PTPM: Poro de Transição de Permeabilidade Mitochondrial

RCR: Razão de Controle Respiratório

RNA: Ácido ribonucleico

T4: Tiroxina

TBA: Ácido Tiobarbitúrico

TBARs: Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TBOOH: tert-butyl hidroperóxido

TCA: Ácido Tricloroacético

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

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

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

Triclopir BEE: Éster 2-butoxietílico solúvel em óleo

Triclopir IPA: Isopropilamina

Triclopir TEA: Sal trietilamina

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

TSH: Hormônio tireoestimulante

USEPA: Agência de Proteção Ambiental Norte Americana

Capítulo 1

Revisão da
Literatura

Capítulo 1 - REVISÃO DA LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

1.1. Triclopir

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

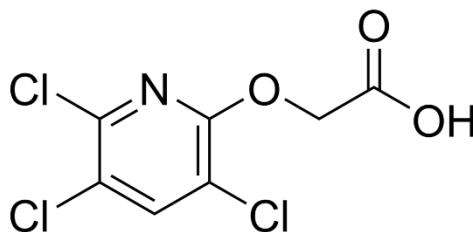


Figura 1: Estrutura química do ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiniloxiacético (Triclopir).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2. Estudos experimentais com triclopir

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3. Importância da mitocôndria

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. JUSTIFICATIVA

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

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

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

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

3.2 Específicos

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

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

4. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SAMAE, S. M.; RABBANI, S.; JOVANOVIĆ, B.; MOHAJERITEHRANI, M. R.; HAGHPANAH, V. Efficacy of the hatching event in assessing the embryo toxicity of the nano-sized TiO(2) particles in zebrafish: a comparison between two different classes of hatching-derived variables, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 116:121–128, 2015.

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

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

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

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

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

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

UPL, Open Ag. Triclon. Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos. Disponível em: https://br.uplon-line.com/download_links/ICorahatf8huQSfPWo81wP58AofS2Re13kc12Ho.pdf. Acesso em: 28 ago. 2022.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Capítulo 2

Manuscrito

Capítulo 2 - MANUSCRITO

De modo a atender às normas do Programa de Pós-Graduação em Patologia, o Capítulo II desta dissertação é composto por artigo científico a ser publicado na revista *Journal of environmental science and health*.

Triclopyr induces damage in liver mitochondria

RIZZI, J. S.^{1,2}; PEREIRA, L. C.^{2,3}

¹São Paulo State University (Unesp), Medical School, Botucatu; ²Center for Evaluation of Environmental Impact on Human Health (TOXICAM), Botucatu, São Paulo, Brazil; ³São Paulo State University (Unesp), School of Agriculture, Botucatu.

1. INTRODUCTION

Triclopyr herbicide (3,5,6-trichloro-2-pyridinyloxyacetic acid) is classified as a herbicide of the auxin hormone mimicking group (Holmes *et al.*, 1994; Cessna *et al.*, 2002). As a systemic herbicide of the pyridine group of herbicides, triclopyr controls weeds with foliar and root absorption in pastures and agricultural crops (Ahrens, 1994; Senseman, 2007). As it is an acid herbicide, depending on the characteristics of the soil, it has a high rate of leaching after the precipitation of the application (D'Antonino *et al.*, 2009).

Although triclopyr has a moderate half-life, due to its high use, this molecule is found in the environment and can be potentially toxic to soil, water and animals (Cessna *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2019).

Toxic compounds, including emerging contaminants of concern, can induce cytotoxicity by different cellular and subcellular mechanisms (Mishra and Chan, 2014). Mitochondria are organelles responsible for several cellular functions, considered as sources of cellular strength due to their irreplaceable importance in metabolism. They are present in almost all eukaryotic cells and have been used as a tool to clarify mechanisms of toxicity of different types of xenobiotics (Alberts *et al.*, 1997; Protti *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012).

In order for mitochondria to perform their functions, it is necessary that they maintain their integrity in terms of their functioning and morphology (Pereira *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2012). Xenobiotics can interfere with the balance between energy generation and use, causing cellular damage. Different xenobiotics induce

poor mitochondrial performance, decreasing energy production, generating and accumulating oxidative stress due to the presence of Reactive Oxygen and Nitrogen Species (RONS), opening mitochondrial permeability transition pores (PTPM), causing swelling and possibly cell death (Lipskaya, 2001; Navarro and Boveris, 2007; Ferreira *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013).

In this context, and in order to elucidate the mechanisms of damage induced by triclopyr, mitochondria isolated from the liver of healthy and young male Wistar rats were used, since the liver is a central organ of biotransformation of exogenous and endogenous substances, rich in mitochondria (Knasmüller *et al.*, 1998).

2. MATERIAL AND METHODS

This work was carried out at campus of the São Paulo State University (Unesp) “Júlio de Mesquita Filho”, in Botucatu, SP - Brazil, at the TOXICAM laboratory. Standard solutions of triclopyr herbicide (3,5,6-trichloro-2-pyridinyloxyacetic acid, $C_7H_4Cl_3NO_3$), Sigma, CAS: 55335-06-3, purity $\geq 99\%$ was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO). The doses used were between 0.5 to 500 μM on a logarithmic scale.

2.1. Experimental animals

Male and young Wistar rats were used (Ethical Commission on the Use of Animals - CEUA nº 1356/2020, Annex 1), weighing around 180 g, acquired from the Multidisciplinary Center for Biological Research (CEMIB) of Unicamp, Campinas, SP - Brazil. The animals were kept under controlled conditions in the vivarium of the Department of Pathology, Faculdade de Botucatu School of Medicine, with constant temperature (21 ± 3 °C) and relative humidity ($50 \pm 20\%$), four cycles of daily air exhaustion and 12/12 hour light/dark period for approximately one week. Water and basal feed were provided *ad libitum*.

Mitochondrial isolation

Hepatic mitochondria were isolated by differential centrifugation. After euthanizing the animals, the liver was immediately removed, minced into approximately 50 mL of standard solution containing Sucrose 250 mM, EGTA 1

mM and Hepes-KOH 10 mM, pH 7.2, at 4 °C, and homogenized three times for 15 seconds at 1 minute intervals in a Potter-Elvehjen homogenizer. The suspension was centrifuged at 770 *g* for 5 minutes and the resulting supernatant centrifuged at 9800 *g* for 10 minutes. The pellet was resuspended with 10 ml of standard solution containing Sucrose 250 mM, EGTA 0.3 mM and Hepes-KOH 10 mM, pH 7.2, and centrifuged at 4500 *g* for 15 minutes. The final mitochondrial pellet was suspended with 1 ml of standard solution containing Sucrose 250 mM and Hepes-KOH 10 mM, pH 7.2, and used within a period of 3 hours (Pedersen *et al.*, 1978). The mitochondrial protein was determined by the biuret reaction (PEDERSEN *et al.*, 1978; CAIN and SKILLETER, 1987). The exposure of mitochondria isolated from liver of Wistar rats to triclopyr was performed *in vitro*.

2.2. Mitochondrial respiration with glutamate and malate and with succinate

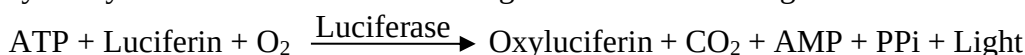
Oxygen consumption by mitochondria energized from complex I by the addition of glutamate and malate (5 μ M) and oxygen consumption by mitochondria energized from complex II by the addition of potassium succinate (5 μ M plus Rotenone 2.5 μ M) were polarographically monitored on oxygraph equipped with a Clark type electrode (Model Hansatech Oxygraph⁺, England) (CHANCE and WILLIAMS, 1956). Mitochondria (1 mg protein) were incubated in 1 mL of standard solution containing Sucrose 250 mM, Potassium Chloride 65 mM, Hepes-KOH 10 mM, Dibasic Potassium Phosphate (K_2HPO_4) and EGTA 0.3 mM. State 3 respiration was created with 400 nmoles of ADP (Sigma, Ref.: 20398-34-9) (Cain and Skilleter, 1987). The respiratory control ratio (RCR) was provided by dividing the rate of oxidative consumption (V_3) by the return to baseline mitochondrial state (V_4). To determine the ratio of ADP per molecule of oxygen, the amount of inserted ADP (400 nmoles) was divided by the oxygen consumption during the oxidative consumption stage (V_3).

2.3. ATP production

Mitochondrial ATP was determined by chemiluminescence using the luciferin-luciferase system. The mitochondrial suspension (1 mg protein/mL) was centrifuged at 9000 *g* for 5 minutes at 4 °C, and the sediment containing the

mitochondria was treated with 1 mL of HClO₄. After centrifugation at 14000 *g* for 5 minutes at 4 °C, aliquots (100 uL) of the supernatant were neutralized with 570 uL of KOH 2 M, added to 830 uL Tris-HCl 100 mM, pH 7.8 and again centrifuged at 15000 *g* for 10 minutes at 4 °C. The luminescence of the supernatant was measured using a kit from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA, Ref.: 213-579-1) using an Synergy HTX (Biotek).

The ATP present in the sample is consumed during the oxidation of Luciferin, catalyzed by the luciferase enzyme with light emission according to the reaction:



When the concentrations of luciferin, luciferase and oxygen are kept constant, ATP is the limiting reagent, the amount of light emitted is proportional to the ATP present (Thore, 1979).

2.4. Mitochondrial membrane potential

The mitochondrial membrane potential was determined spectrofluorimetrically by the equipment Synergy HTX (Biotek) monitoring the changes in the fluorescence of safranin-O (Sigma, Ref.: 477-73-6), a fluorescent cationic dye that is electrophoretically distributed in the mitochondrial matrix in response to the negative charge of the inner membrane (Lemasters *et al.*, 1987). Were used 495 nm excitation and 586 nm emission wavelengths. Mitochondria (1 mg of protein) were incubated in standard solution containing Sucrose 125 mM, Potassium Chloride (KCl) 65 mM and Hepes-KOH 10 mM plus Safranin-O 10 µM, in final volume of 1 mL and energized by the addition of Potassium Succinate 5 mM (+ Rotenone 2.5 µM). The decrease in membrane potential observed by the electrogenic influx of the cation is linearly correlated with the increase in the fluorescence intensity of the dye as it is released from the mitochondria (Akerman and Wikstrom, 1976; Emaus *et al.*, 1986).

2.5. Effects on Ca²⁺ uptake and release

Extramitochondrial calcium was monitored using Calcium Green 5N (Molecular Probes) (Invitrogen, Ref.: C3737) (Murphy *et al.*, 1996). The standard solution was composed of Sucrose 125 mM, KCl 25 mM, Hepes-KOH 50 mM (pH 7.4), CaCl₂

10 μ M, Rotenone 2.5 μ M and Calcium Green 5N 100 μ M (final volume 1 mL). Mitochondria were energized with Succinate 5 mM and fluorescence was continuously monitored at 37 °C in a equipment Synergy HTX (Biotek), using excitation and emission wavelengths of 506 and 532 nm, respectively.

2.6. Mitochondrial swelling

Mitochondrial swelling was monitored by increasing the apparent absorption of the mitochondrial suspension (0.6 mg protein/mL), incubated in 3 mL of standard solution at 540 nm. The mitochondrial increase was accompanied by a decrease in suspension turbidity and therefore a proportional decrease in absorption (Lemasters *et al.*, 1987) and then were evaluated in a spectrophotometer model Shimadzu CPS-240A.

2.7. Monitoring the formation of reactive oxygen and nitrogen species (RONS)

The formation of Reactive Oxygen and Nitrogen Species (RONS) was monitored spectrofluorimetrically by the Synergy HTX equipment (Biotek), using the fluorescent probe H₂DCFDA (Sigma, Ref.: 4091-99-0) at wavelengths of 503 nm for excitation and 529 nm for emission. Mitochondria (1 mg protein/mL) were incubated in standard solution containing Sucrose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes-KOH 10 mM pH 7.2 plus Rotenone 2.5 μ M and H₂DCFDA 2 μ M and energized by the addition of Potassium Succinate 5 mM. DCFDA is a molecule that after crossing biological membranes is hydrolyzed by esterases releasing the non-fluorescent compound DCFH. However, in the presence of RONS, it is quickly oxidized and transformed into DCF, which presents a high quantum yield of fluorescence when excited at 503 nm. Thus, the increase in fluorescence is directly proportional to the production of RONS by mitochondria (Cathcart, Schwiers and Ames, 1983).

2.8. Evaluation of the redox state of pyridine nucleotides

The redox state of the pyridine nucleotides was monitored fluorimetrically using the Synergy HTX equipment (Biotek) for 366 nm excitation and 450 nm for emission. Mitochondria (1 mg protein/mL) were incubated in standard solution containing Sucrose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes-KOH 10 mM plus Rotenone 2.5

μM and energized by the addition of Potassium Succinate 5 mM. Reduced pyridine nucleotides (NAD(P)H) are fluorescent, while oxidized pyridine nucleotides (NAD(P)⁺) are not fluorescent. Thus, changes in fluorescence intensity reflect changes in the redox state of pyridine nucleotides (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

2.9. Mitochondrial membrane lipoperoxidation

Mitochondria (1 mg/mL) were pre-incubated in 1 mL of standard solution KCl 65 mM, Hepes-KOH 10 mM at pH 7.2, plus rotenone 2.5 μM and Succinate 5 mM. After 30 minutes, under stirring, 1 mL of Thiobarbituric Acid (TBA) (Millipore, Ref.: 504-17-6) 1% (m/v) (prepared in NaOH 50 mM), 0.1 mL of NaOH 10 mM and 0.5 mL of 20% Phosphoric Acid (m/v) for 40 minutes at 94 °C. After cooling, the malondialdehyde-thiobarbituric acid complex (MDA-TBA) was extracted after addition of 2 mL of N-butanol and centrifugation at 2500 *g* for 2 minutes. The absorbance was determined at 535 nm and the MDA concentration, in nmoles/mg of protein, was calculated from $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Buege and Aust, 1978).

2.10. Mitochondrial levels of sulfhydryl groups of membrane proteins

The determination of sulfhydryl groups was performed by adding the reagent 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) (Sigma, Ref.: 69-78-3). Mitochondria (0.4 mg/mL) were pre-incubated in 1 mL of standard solution containing Sucrose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes-KOH 10 mM, Succinate 5 mM, Rotenone 2.5 μM and CaCl_2 10 μM , pH 7.2, plus Rotenone 2.5 μM and Succinate 5 mM. After 30 minutes, 300 μL of trichloroacetic acid (TCA) 30% (w/v) was added, and the samples were centrifuged at 7400 *g* for 15 minutes at 25 degrees. The supernatant was discarded and 1 mL of K⁺ phosphate buffer 0.5 M pH 7.6 was added to the precipitate to solubilize the precipitate with the aid of a homogenizer. Samples were incubated at room temperature for 10 minutes. Afterwards, DTNB 10 mM was added, vortexed, kept at rest for 5 minutes at room temperature and centrifuged for 2 minutes at 7400 *g*. The DTNB reacts quickly with sulfhydryl groups, forming mixed disulfides and the p-nitrothiophenol anion, which have a yellow color, with intensity proportional to the amount of sulfhydryl groups (Oliveira, 2003). The reading was performed at $\lambda = 412 \text{ nm}$. The amount of sulfhydryl groups was calculated using the molar

extinction coefficient of 13600 M^{-1} (Yamamoto *et al.*, 2002).

2.11. Determination of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) levels

The content of reduced glutathione in mitochondria was determined by fluorescence using o-phthalaldehyde (OPT) (Sigma, Ref.: 643-79-8) as an indicator at 350 and 420 nm as excitation and emission wavelengths, respectively (Hissin and Hilf, 1976). Mitochondria (1 mg/mL) were pre-incubated for 30 minutes at 30 °C with different concentrations of the test substance in a standard solution containing Sucrose 125 mM, KCl 25 mM, Hepes-KOH 50 mM pH 7.2, added with 5 mM succinate, 2 μM rotenone and 10 μM CaCl_2 . After the incubation time, 0.5 ml of trichloroacetic acid (TCA) 13% (w/v) was added, then the samples were centrifuged at 9000 *g* for 3 minutes, for protein precipitation. After centrifugation, aliquots of the supernatant (100 μL) were removed and added to a solution composed of NaH_2PO_4 10 mM and EGTA 5 mM, pH 8,0 (1.8 mL), and 100 μL of OPT (1 mg/mL). Fluorescence was determined after 15 minutes on a Synergy HTX (Biotek) GSSG levels were determined by adding 250 μL of N-ethyl-maleimide (NEM) 0.04 M to 250 μL aliquots of supernatant. After 20 minutes of incubation at room temperature, 500 μL of NaOH 10 M was added and 100 μL of this solution was added to 2 mL of NaOH 1 M and 100 μL of OPT (1 mg/mL). Fluorescence was determined after 15 minutes of incubation in the dark and the result determined by the GSH/GSSG ratio.

2.12. Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet's test to compare the treated groups in relation to their respective negative controls using the GraphPrism program (San Diego, USA), version 5.0 for Windows. A significant difference was assumed when $p \leq 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Although the target organ of triclopyr is the kidney, being excreted with more than 90% as original triclopyr acid, it does not exclude the possibility that this compound is potentially toxic to the liver, the main organ involved in numerous physiological processes and because it is a very active organ, it is rich in mitochondria (Timchalk *et al.*, 1988; Jaeschke *et al.*, 2002; Amacher, 2005).

Mitochondria, when healthy, maintain electron transport coupling with proton pumping so that it is able to generate ATP. Its coupling can be measured by the relationship between the rate of active breathing (state 3) and at rest (state 4), referred to as RCR (Hartung *et al.*, 1985). By breaking the coupling, the uncouplers stimulate state 4 respiration, interfering with the production of ATP without interrupting the transport of electrons through the respiratory chain (Garcia, 2009).

Although the results with succinate as oxidizable substrate demonstrate that there were no significant changes in the values of RCR and ADP/O, there was an alteration in state 4 induced by the higher concentration of triclopyr (500 μM) suggesting decoupling, which is confirmed with the decrease in RCR from the concentration of 5 μM of triclopyr using glutamate and malate as oxidizable substrate because low values of RCR indicate changes in the respiratory chain and, therefore, in the mitochondrial bioenergetics (Lehninger *et al.*, 2000).

NADH generated in the mitochondrial matrix during the Krebs cycle are oxidized by complex I (NADH dehydrogenase), which transfers these electrons to ubiquinone (Lehninger *et al.*, 2000). When there is an increase in NADH oxidation, with a higher concentration of triclopyr evaluated, complex I is overloaded.

At the end of the respiratory chain, ATP synthase acts by causing ADP to bind to Pi to form ATP through the two linked complexes, the F1-ATPase complex and the Fo-ATPase complex (FoF1) which is a molecular motor linked to the membrane that uses proton motive force to drive ATP synthesis (NICHOLLS and FERGUSON, 1982).

When ATPase activity is stimulated by an uncoupler, the dysfunction can cause ATP synthase inverse, causing the proton translocators to accelerate the rate

of ATP hydrolysis, allowing the breakdown of ATP to ADP and Pi (NICHOLLS and FERGUSON, 1982) which may justify the decrease in ATP in all triclopyr concentrations evaluated, including the fact that triclopyr acts by stimulating the ATPase proton pump activity in plants (AHRENS, 1994).

This hypothesis is supported because the ability of uncouplers to induce rapid ATP hydrolysis by altering the ATPase was studied through CCCP, demonstrating that uncouplers can act on ATPase causing ATP depletion (Chernyak *et al.*, 1994), which may be the reason way in which triclopyr acts on isolated mitochondria.

Thus, the electrical potential generated by ATP hydrolysis induces reverse electron transfer, which is more clearly evidenced in the NAD⁺ binding sites of complex I (NICHOLLS and FERGUSON, 1982), with a decrease in RCR being observed at from 5 μ M concentrations of triclopyr, demonstrating that triclopyr acts prominently in complex I mitochondrial since the uncoupler effect is most evidenced when mitochondria received glutamate and malato when compared to succinate energization, in this case, the mitochondrial uncoupling is noted only in the highest concentration of triclopyr evaluated.

Mitochondrial uncoupling dissipates the proton gradient formed in the inter-membrane space, generating a permeability in the inner mitochondrial membrane to hydrogen ions (Speakman *et al.*, 2004) which was also evidenced at concentrations of 100 μ M and 500 μ M of triclopyr in addition to the calcium uptake test and efflux analysis, which had the gradient dissipated at the highest concentration evaluated, demonstrating alteration in mitochondrial bioenergetics.

The ability to retain calcium by isolated mitochondria is evaluated in order to understand the extent of the PTPM opening, which must be kept closed, making the membrane impermeable to most ions and polar molecules (Boelsterli, 2002). Disruptions of the mechanism that regulates intracellular Ca²⁺ homeostasis is usually the first event that develops irreversible injury, although some types of cell death can occur by Ca²⁺ independent mechanisms, this event compromises mitochondrial function and can activate irreversible catabolic effects (Nicotera *et al.*, 1992).

The release of Ca^{2+} by the reverse of the uptake pathway occurs when the membrane potential drops (Nicholls, 1978), for example, in the presence of uncouplers (Richter and Frei, 1988).

Mitochondrial damage caused by toxic agents when initially manifested by a decrease in membrane potential and followed by ATP depletion usually affects Ca^{2+} homeostasis because the mechanisms responsible for regulation require energy and any mitochondrial dysfunction with subsequent ATP depletion invariably results in disruption of intracellular Ca^{2+} homeostasis (Daloce, 1995). However, even with decoupling and dissipation of the calcium gradient, it was not enough to cause mitochondrial swelling.

As expected, there was no formation of RONS in any of the triclopyr concentrations because the electron transport chain, after the dissipation of the potential caused by the light decoupling, works in an accelerated way to resume the proton gradient (Speakman *et al.*, 2004) causing a regulation in the production of mitochondrial RONS due to the decrease in the probability of incomplete reduction of O_2 (Kowaltowski, Castilho and Vercesi, 2001; Garcia, 2009).

Likewise, triclopyr concentrations also did not induce the formation of MDA, a lipid peroxidation product, or the oxidation of sulfhydryl groups of mitochondrial membrane proteins, preserving them, due to the absence of RONS formation (Halliwell and Gutteridge, 1999).

The coenzymes NAD(P)H and NAD(P)^+ were also evaluated in their reduced and oxidized forms, respectively. NAD(P)H , which participates in the biosynthesis of fatty acids and steroid compounds, also has the function of combating the harmful effects of RONS by converting them into NAD(P)^+ . In addition to the importance of NAD(P)H in the cytosol for the synthesis of fatty acids, cholesterol and DNA, it is used in the mitochondria for the production of ATP and has an important role in the regeneration of reduced glutathione, helping in the homeostasis of the redox regulation process (Zorov *et al.*, 2014).

Even if the results are negative for any evidence of RONS formation, there was significant oxidation of NAD(P)H at a concentration of 500 μM of triclopyr, which

may be related to the decrease in RCR caused by mitochondrial uncoupling when glutamate and malate is used as an oxidizable substrate.

Mitochondrial respiratory complex I (NADH/ubiquinone oxidoreductase) is essential for the maintenance of the NAD^+/NADH ratio through NADH dehydrogenase activity (Santidrian *et al.*, 2013). Complex I is the guardian of the respiratory chain and catalyzes the first step of NADH oxidation. It elevates the NAD^+/NADH ratio and translocates protons across the inner mitochondrial membrane, leading to energy production (Mayr *et al.*, 2008).

It is also known that from the glutathione reductase enzyme, NAD(P)H from the pentose cycle is also oxidized to reduce GSSG to GSH so that there is antioxidant homeostasis and for this reason the GSH/GSSG ratio was evaluated (Comhair and Erzurum, 2002).

Glutathione is the main sulfhydryl group present in the antioxidant cell defense, mainly in its reduced form (GSH), and the high ratio between GSH/GSSG is important for the maintenance of the redox state (Höer *et al.*, 2001; Pastore *et al.*, 2003; Tapiero and Tew, 2003).

The results showed that there were no significant changes in the ratio between GSH/GSSG, as well as no changes in membrane sulfhydryl groups, demonstrating that triclopyr does not have the ability to alter the mitochondrial redox status.

Although this work aims to study the mechanisms of damage induced by triclopyr in hepatic mitochondria, which, when damaged, can harm the health of the individual, it is important to consider that exposure to triclopyr may affect other targets, in addition to those already have been studied previously (Shaughnesst *et al.*, 2010; Cannon and Greenamyre, 2011; Martinez and Greenamyre, 2012).

These data support the idea that mitochondria suffer damage related to their bioenergetics when exposed to triclopyr.

4. CONCLUSION

Triclopyr acts as a mitochondrial uncoupler, altering mitochondrial parameters and amount of ATP, in addition to dissipating the mitochondrial membrane potential and its calcium homeostasis gradient, demonstrating the ability to alter mitochondrial bioenergetics without altering the mitochondrial structure.

In addition, NAD(P)H oxidation, even without the production of RONS, can be explained by the alteration in the respiratory chain when glutamate and malate are used as oxidizable substrates, since complex I increases the NAD^+/NADH ratio and damages this complex can compromise the oxidation of NAD(P)H.

However, triclopyr does not have the property of RONS formation, as well as it does not lipid peroxide the mitochondrial membrane, it preserves the sulfhydryl groups of the mitochondrial membrane, in addition to maintaining the normality of the GSH/GSSG ratio, evidence of the inability of mitochondrial redox dysregulation.

ACKNOWLEDGMENT: This work was carried out with the support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) - nº 88887.481968/2020-00 and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Brasil (FAPESP) - nº 18/00229-1.

5. REFERENCES

- Ahrens, W. H. (Ed.) **Herbicide Handbook**. Champaign, IL: Weed Science Society of America, 7th edition, p. 352, 1994.
- 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. doi: 10.1016/0014-5793(76)80434-6.
- Alberts B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. **Biologia Molecular da Célula**. 3^{ed}. Porto Alegre: Artes Médicas; p. 1549, 1997.
- Amacher, D. Drug-associated mitochondrial toxicity and its detection. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 16, p. 1829–1839, 2005. doi: 10.2174/0929867054546663.
- Boelsterli, U. A. Mechanistic toxicology: The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. **Taylor and Francis**. London, v. 23, p. 312, 2002.
- Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.**, v. 52C, p. 302-310, 1978. doi: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6.
- 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. The role of environmental exposures in neurodegeneration and neurodegenerative diseases. **Toxicol. Sci.** v. 124, p. 225–250, 2011. doi: 10.1093/toxsci/kfr239.
- Cathcart, R.; Schwiers, E.; Ames, B. N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 134, p. 111-116, 1983. doi: 10.1016/0003-2697(83)90270-1.
- Cessna, A. J.; Grover, R.; Waite, D. T. Environmental Fate of Triclopyr. **Rev. Environ Contam Toxicol.** v. 174, p. 19-48., 2002. doi: 10.1007/978-1-4757-4260-2_2.
- Chance, B.; Williams, G. R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv. Enzymol.**, New York, v. 17, p. 65-134, 1956. doi: 10.1002/9780470122624.ch2.
- Chernyak, B. V.; Dedova, V. N.; Gabaib, V. L. Mitochondrial ATP hydrolysis and ATP depletion in thymocytes and Ehrlich ascites carcinoma cells. **FEBS Letters** 337 56-59, 1994. doi: 10.1016/0014-5793(94)80629-2
- Comhair, S. A. A.; Erzurum, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v. 283, p. 246-255, 2002. doi: 10.1152/ajplung.00491.2001.
- Daloco, E. J. Permeabilização Da Membrana Mitocondrial Interna Por Citrulina e Ca²⁺. Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, visando a obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Curitiba, 1995.
- D'Antonino, L.; Silva, A. A.; Ferreira, L. R.; Cecon, P. R.; França, A. C. E.; Silva, G. R. Lixiviação do picloram em argissolo vermelho-amarelo e latossolo vermelho-amarelo com diferentes valores de pH. **Planta Daninha** v. 27, p. 589-600, 2009. doi: 10.1590/S0100-83582009000300021.
- Emaus, R. K.; Grunwald, R.; Lemasters, J. J. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat liver mitochondria: spectral and metabolic properties. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 850, p. 436-448, 1986. doi: 10.1016/0005-2728(86)90112-x.
- Ferreira, M.; Aguiar, T.; Vilarinho, L. Cadeia Respiratória Mitocondrial: Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Déficit do Complexo I. **Arq Med.** v. 22, p. 49-56, 2008.
- Garcia, A. F. **Efeitos de lantadenos sobre a bioenergética em mitocôndrias isoladas de fígado de rato**. Tese (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araçatuba, p. 99, 2009.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford, p. 1-25, 1999.
- Hartung, K. J.; Jung, K.; Minda, R.; Kunz W. The mitochondrial respiratory function as indicator of the ischemic injury if the rat kidney. **Biomed Biochim Acta**;44:1435-43, 1985. PMID: 4084249.
- 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. doi: 10.1016/0003-2697(76)90326-2.
- Höer, N. F.; Júnior, L. R.; Kubota, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 112-119, 2001.
- Holmes, S. B.; Thompson, D. G.; Wainio-Keizer, K. L.; Capell, S. S.; Staznik, B. Effects of lethal and sublethal concentrations of the herbicide, triclopyr butoxyethyl ester, in the diet of zebra finches. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, p. 319-327, 1994. doi: 10.7589/0090-3558-30.3.319.
- Jaeschke, H.; Gores, G. J.; Cederbaum, A. I.; Hinson, J. A.; Pessayre, D.; Lemasters, J. J. Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicology Science**, Orlando, v. 65, p. 166–176, 2002. doi: 10.1093/toxsci/65.2.166.
- Knasmüller, S.; Gottmann, E.; Steinkellner, H.; Fomin, A.; Pickl, C.; Paschke, A.; God, R.; Kundi, M. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated solo with plant bioassays. **Mutat Res.** v. 420, p. 37-48, 1998. doi: 10.1016/s1383-5718(98)00145-4.
- Kowaltowska, A. J.; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**. v. 495, p. 12-15, 2001. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02316-x.
- Lehninger, A. L.; Nelson, I. L.; Cox, M. M. Fosforilação oxidativa e fotofosforilação: In: Lehninger, A. L.; Nelson, I. L.; Cox, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2^a ed. São Paulo: Sarvier; 2000.
- Lemasters, J. J.; Digiuseppi, J.; Nieminen, A. L.; Herman, B. Blebbing, free calcium and mitochondrial membrane potential preceding cell death hepatocytes. **Nature**, v. 325, p. 78-81, 1987. doi: 10.1038/325078a0.
- Li, Y.; Couch, L.; Higuchi, M.; Fang, J. L.; Guo, L. Mitochondrial dysfunction induced by Sertraline, an antidepressant agent, **Toxicol Sci.** v. 127, p. 589-91, 2012. doi: 10.1093/toxsci/kfs100.
- Lipskaya, T. Y. U. Mitochondrial creatine kinase: Properties and function. **Biokhimiia**. v. 66, p. 1361-1376, 2001. doi: 10.1023/a:1012428812780.

Martinez, T. N.; Greenamyre, J. T. Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Antioxid. Redox Signal.** v. 16, p. 920–934, 2012. doi: 10.1089/ars.2011.4033.

Mayr, J. A.; Meierhofer, D.; Zimmermann, F.; Feichtinger, R.; Kögler, C.; Ratschek, M.; Schmeller, N.; Sperl, W.; Kofler, B. Loss of complex I due to mitochondrial DNA mutations in renal oncocytoma. *Clin Cancer Res.* Apr 15;14(8):2270–5, 2008. doi: 10.1158/1078-0432.

Mishra, P.; Chan, D. C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. **Nature Reviews.** v. 15, p. 634–646, 2014. doi: 10.1038/nrm3877.

Murphy, A. N.; Bredesen, D. E.; Cortopassi, G.; Wang, E.; Fiskum, G. Bcl-2 potentiates the maximal calcium uptake capacity of neural cell mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v.93, p.9893–9898, 1996. doi: 10.1073/pnas.93.18.9893

Navarro, A.; Boveris, A. Brain mitochondrial dysfunction in aging: conditions that improve survival, neurological performance and mitochondrial function. **Front Biosci.** v. 12, p. 1154–63, 2007. doi: 10.2741/2133.

Nicholls, D. G. The regulation of extramitochondrial free calcium ion concentration by rat liver mitochondria. **Biochem. J.**, London, v. 176, p. 463–474, 1978. doi: 10.1042/bj1760463

Nicotera, P.; Bellomo, G.; Orrenius, S. Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v. 32, p. 449–470, 1992. doi: 10.1146/annurev.pa.32.040192.002313.

Oliveira, H. C.; Cosso, R. G.; Alberici, L. C.; Maciel, E. N.; Pastore, A.; Federici, G.; Bertini, E.; Piemonte, F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, p. 19–39, 2003. doi: 10.1016/s0009-8981(03)00200-6.

Oliveira, H. C.; Cosso, R. G.; Alberici, L. C.; Maciel, E. N.; Salerno, A. G.; Dorighello, G. G.; Velho, A. J., Faria, E. C., Vercesi, A. E. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. *The FASEB Journal*, Bethesda, v. 19, p.278–280, 2005. doi: 10.1096/fj.04-2095fje.

Pedersen, P. L.; Greenawalt, J. W.; Reynafarje, B.; Hüllihen, 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. doi: 10.1016/s0091-679x(08)62030-0.

Pereira, L. C.; De Souza, A. O.; Dorta, D. J. Polybrominated Diphenyl Ether Congener (BDE-100) induces mitochondrial impairment. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology.** v. 112, p. 418–424, 2013. doi: 10.1111/bcpt.12046. Epub 2013 Feb 23.

Pereira, L. C.; De Souza, A. O.; Pazin, M.; Dorta, D. J. Mitocôndria como Alvo para Avaliação de Toxicidade de Xenobiótico. **Revista Brasileira de Toxicologia.** v. 25, p. 1–14, 2012.

Protti, A.; Carré, J.; Frost, M. T.; Taylor, V.; Stidwill, R.; Rudiger, A.; Singer M. Succinate recovers mitochondrial oxygen consumption in septic rat skeletal muscle. **Crit Care Med.** v. 35, p. 2150–2155, 2007. doi: 10.1097/01.ccm.0000281448.00095.4d.

Richter, F.; Frei, B. Ca²⁺ release from mitochondria induced by prooxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, USA, v. 4, p. 365–375, 1988. doi: 10.1016/0891-5849(88)90088-3

Rodrigues, E. T.; Alpéndurada, M. F.; Guimarães, A.; Avó, F.; Ferreira, B.; Pardal, M. A. The environmental condition of an estuarine ecosystem disturbed by pesticides. **Environmental Science and Pollution Research.** v. 26, p. 24075–24087, 2019. doi: 10.1007/s11356-019-05751-5

Roubicek, D. A.; Souza-Pinto, N. C. D. Mitochondria and mitochondrial DNA as relevant targets for environmental contaminants. **Toxicology. Elsevier.** v. 391, p. 100–108, 2017. doi: 10.1016/j.tox.2017.06.012.

Salerno, A. G.; Dorighello, G. G.; Velho, J. A.; Faria, E. C.; Vercesi, A. E. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria. **FASEB J.** v. 19, p. 278–280, 2005. doi: 10.1096/fj.04-2095fje.

Santidrian, A. F.; Matsuno-Yagi, A.; Ritland, M.; Seo, B. B.; LeBoeuf, S. E.; Gay, L. J.; Yagi, T.; Felding-Habermann, B. Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. *J Clin Invest.* Mar;123(3):1068–81, 2013. doi: 10.1172/JCI64264.

Senseman, S. A. (Ed.), **Herbicide Handbook.** 9^a ed. Lawrence, EUA: Weed Science Society of America, 458 p., 2007.

Shaughnesst, D. T.; Worth, L.; Lawler, C. P.; Mcallister, K. A.; Longley, M. J.; Copeland, W. C. Meeting report: Identification of biomarkers for early detection of mitochondrial dysfunction. **Mitochondrion.** v. 10, p. 579–581, 2010. doi: 10.1016/j.mito.2010.02.001.

Speakman, J. R.; Darren, A.; Talbot, C. S.; Sam, S.; McLaren, J. S.; Redman, P.; Krol Jackson, D. M.; Johnson, M. S.; Brand, M. D. Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer **Aging Cell**, v. 3, p. 87–95, 2004. doi: 10.1111/j.1474-9728.2004.00097.x.

Tapiero, H.; Tew, K. D. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine e Pharmacotherapy.** v. 57, p. 145–155, 2003. doi: 10.1016/s0753-3322(03)00043-x.

Thore, A. Thechnical aspects of bioluminescent firefly luciferase assay of ATP. *Science Tools*, Stockholm, v. 26, n. 2, p. 30–34, 1979.

Timchalk, C.; Dryzga, M. D.; Kastl, P. E. Triclopyr: Tissue Distribution and Metabolism of 14C Labeled Triclopyr in Fischer 344 Rats (Report of The **Dow Chemical Company** No. HET K-42085-40. v. 62, p. 71–87, 1988.

Yamamoto, K.; Masubuchi, Y.; Narimatsu, S.; Kobayashi, S.; Horie, T. Toxicity of ethacrynic acid in isolated rat hepatocytes. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 16, p. 151–158, 2002. doi: 10.1016/s0887-2333(01)00107-2.

Zovoc, D. B.; Juhaszova, M.; Sollott, S. J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. **Physiol Rev.** 94(3): 909–950, 2014. doi: 10.1152/physrev.00026.2013.

6. ANEXO 1 – Certificado de aprovação pelo CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1356/2020 – CEUA

Certificamos que o projeto intitulado: **"Mecanismos de danos induzidos pelo triclopyr em mitocôndrias hepáticas"**, conduzido pela Pesquisadora: **Joyce Santana Rizzi** – Orientador: Profa. Dra. Lillian Cristina Pereira, registrada com o nº **1356/2020**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião ordinária de 28 de outubro de 2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	03 de novembro de 2022
Espécie/Linhagem/Raça	Rato Wistar
Nº de animais	81
Idade/Peso	45 Dias – 180 gramas
Sexo	Machos
Origem	CEMIB



Sara Rosa Stanley Sampaio
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP



Profa. Associada Bertha Furian Polegato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Diário Rubião Júnior, s/nº – Botucatu – SP. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.18.80 – E-mail: Secretaria: ceua@fmb.unesp.br