

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS**  
**CAMPUS DE DRACENA**

Eduardo Morais Beretta

Médico

**EFEITOS DO INSETICIDA DIAZINON EM CÉLULAS DE**  
**HEPATOCARCINOMA HUMANO (HEPG2)**

Dracena

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS  
CAMPUS DE DRACENA**

Eduardo Morais Beretta

**EFEITOS DO INSETICIDA DIAZINON EM CÉLULAS DE  
HEPATOCARCINOMA HUMANO (HEPG2)**

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

Orientador: Prof.Dr. Fábio Erminio Mingatto

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Priscila Tartari

Dracena

2020

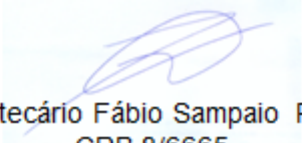
FICHA CATALOGRÁFICA  
Desenvolvida pela Seção Técnica de Biblioteca e Documentação  
Campus de Dracena

B492e Beretta, Eduardo Morais.  
Efeitos do inseticida Diazinon em células de  
Hepatocarcinoma humano (hepg2) / Eduardo Morais Beretta.  
-- Dracena: [s.n.], 2021.  
40 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
(Unesp). Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de  
Dracena. Área do conhecimento: Produção Animal, 2021.

Orientador: Fábio Erminio Mingatto  
Coorientadora: Priscila Tartari

1. Fígado. 2. Metabólitos. 3. Organofosforados. 4.  
Praguicidas. 5. Toxicidade. I. Título.



Bibliotecário Fábio Sampaio Rosas  
CRB 8/6665

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

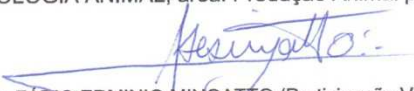
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Efeitos do Inseticida Diazinon em Células de Hepatocarcinoma Humano (HepG2)


**AUTOR: EDUARDO MORAIS BERETTA**

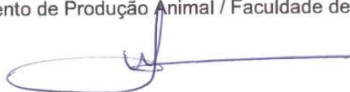
**ORIENTADOR: FÁBIO ERMINIO MINGATTO**

**COORIENTADORA: PRISCILLA APARECIDA TARTARI PEREIRA**

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

  
Prof. Dr. FÁBIO ERMINIO MINGATTO (Participação Virtual)  
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena – UNESP

  
Profa. Dra. FLAVIA THOMAZ VERÉCHIA RODRIGUES (Participação Virtual)  
Departamento de Produção Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP

  
Profa. Dra. MARILDA APARECIDA MILANEZ MORGADO DE ABREU (Participação Virtual)  
Departamento de Dermatologia / Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Dracena, 14 de dezembro de 2020

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Eduardo Morais Beretta – nascido em 19 de setembro de 1969, na cidade de Dracena-SP-Brasil, filho de Maria da Graça Morais Beretta e Valdomiro Beretta. Em novembro de 1993 concluiu graduação em Medicina pela Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), em janeiro de 1996 concluiu residência médica em Cirurgia Geral pela Faculdade de Medicina de Marília (FAMEMA), em fevereiro de 2007 Especialista em Cirurgia Plástica pela Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica, em novembro de 2016 Especialista em Medicina do Trabalho pela Associação Nacional de Medicina do Trabalho (ANAMT) e em fevereiro de 2019 iniciou no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, em nível de mestrado, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa Interunidades dos Câmpus de Dracena e Ilha Solteira, realizando estudos na área de “Bioquímica Metabólica e Toxicológica”, sob a orientação do Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que me deu saúde e força para ter concluído esse desafio. Agradeço à minha família por servir de estímulo para sempre progredir. Aos colegas de mestrado e pesquisa pela amizade e coleguismo. Aos meus alunos que são fonte fundamental de busca do conhecimento, em especial às alunas do LabMet: Camila Miranda e Layra Araújo e às alunas da Unifadra: Emmily da Silva e Beatriz Coimbra. Aos professores que sempre estiveram juntos em minha aprendizagem e em especial ao Prof.Dr. Fábio Erminio Mingatto, pela orientação, atenção, incentivo e paciência. Agradeço por ter sido o interlocutor real durante a construção deste trabalho.

Agradeço à Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena (FCAT) pela disponibilização do espaço e condições para realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processo nº 2018/22002-9.

Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário.

Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista.

Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.

BILL GATES

## RESUMO

O Diazinon (DZN) é um praguicida organofosforado extensamente utilizado na agricultura para o controle de insetos, na medicina veterinária como antiparasitário em animais de produção (mosca-do-chifre) e no controle de pragas domésticas (mosca doméstica). Existem muitos relatos na literatura de intoxicações de animais e humanos provocadas pela substância e o fígado é um dos órgãos afetados. O fígado desempenha um grande número de funções no organismo, dentre as quais se destacam o armazenamento e distribuição de nutrientes e a biotransformação de xenobióticos que ele recebe pela corrente sanguínea e sistema digestório. A biotransformação dos xenobióticos, realizada principalmente pelo citocromo P450, está associada à desintoxicação, porém ela pode representar um grande problema, pois os metabólitos produzidos podem ser altamente reativos e mais tóxicos que o composto de origem, tornando o fígado um importante alvo da toxicidade dessas substâncias. A mitocôndria é a organela responsável pela síntese da quase totalidade da Adenosina Trifosfato (ATP) necessária à manutenção da estrutura e função celular e é alvo de substâncias que podem exercer seu efeito tóxico de várias maneiras. As células HepG2 representam uma linhagem originada de um hepatoblastoma humano e têm sido utilizadas como modelo para investigação dos efeitos de xenobióticos sobre o fígado, pois apresentam características semelhantes às células de um fígado normal, além de possibilitarem o cultivo por longos períodos de tempo. Em um trabalho recente realizado pelo nosso grupo de pesquisa foi constatado que alterações na bioenergética e na transição da permeabilidade mitocondrial estão envolvidas na toxicidade do DZN. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi caracterizar os efeitos do DZN em células HepG2 para auxiliar na caracterização do seu mecanismo de toxicidade no fígado. As concentrações utilizadas foram de 25, 50, 75, 100, 125 e 150  $\mu\text{M}$  de DZN e os parâmetros avaliados foram: proliferação celular, viabilidade celular, potencial de membrana mitocondrial, determinação dos níveis de ATP e efeito da biotransformação. Os resultados demonstraram redução da proliferação celular e atividade metabólica concentração e tempo dependentes. Houve ainda a redução do potencial de membrana mitocondrial e da concentração de ATP, também tempo e dose dependentes. A biotransformação reduziu de maneira mais acentuada a viabilidade celular indicando possível efeito tóxico do Diazoxon.

**Palavras chave:** Fígado, Metabólitos, Organofosforados, Praguicidas, Toxicidade.

## ABSTRACT

Diazinon (DZN) is an organophosphorus pest widely used in agriculture for insect control, in veterinary medicine as an antiparasitic in production animals (horn fly) and in domestic pest control (house fly). There are many reports in the literature of animal and human intoxications caused by the substance and the liver is one of the affected organs. The liver performs a large number of functions in the body, among which the storage and distribution of nutrients and the biotransformation of xenobiotics that it receives through the bloodstream and digestive system stand out. The biotransformation of xenobiotics, mainly performed by cytochrome P450, is associated with detoxification, but it can represent a major problem, because the metabolites produced can be highly reactive and more toxic than the compound of origin, making the liver an important target of toxicity of these substances. The mitochondria is the organelle responsible for the synthesis of almost all the Adenosine Triphosphate (ATP) necessary for the maintenance of cellular structure and function and it is the target of substances that can exert their toxic effect in several ways. HepG2 cells represent a lineage originating from a human hepatoblastoma and have been used as a model for investigating the effects of xenobiotics on the liver, as they have similar characteristics to cells of a normal liver, as well as enabling cultivation for long periods of time. In a recent work by our research group has indicated that changes in bioenergetics and mitochondrial permeability transition are involved in DZN toxicity. Therefore, the objective of the present study was to characterize the effects of DZN on HepG2 cells to help characterize its mechanism of liver toxicity. The concentrations used were 25, 50, 75, 100, 125 and 150  $\mu\text{M}$  of DZN and the parameters evaluated were: cell proliferation, cell viability, mitochondrial membrane potential, determination of ATP levels and effect of biotransformation. The results demonstrated reduction of cell proliferation and metabolic activity concentration and time dependent. There was also a reduction of the mitochondrial membrane potential and the concentration of ATP, also time and dose dependent. Biotransformation reduced the cell viability more sharply indicating possible toxic effect of Diazoxon.

**Keywords:** Liver, Metabolites, Organophosphates, Pesticides, Toxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do Diazinon .....	13
Figura 2 - Metabolismo do Diazinon no fígado .....	15
Figura 3 - Efeito do Diazinon sobre a quantidade de proteína celular da linhagem HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição .....	23
Figura 4 - Efeito do Diazinon sobre a capacidade de redução do MTT pela linhagem HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição .....	24
Figura 5 - Efeito do DZN sobre a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) pela linhagem de células HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição .....	25
Figura 6 - Efeito do DZN 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 .....	26
Figura 7- Efeito do DZN sobre o potencial de membrana mitocondrial na linhagem HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição .....	28
<b>Figura 8</b> -Efeito do Diazinon sobre a concentração de ATP nas células HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição .....	29
Figura 9 - Efeito da biotransformação induzida pelo 3-Metilcolantreno (2 µM) sobre a capacidade de redução do MTT pela linhagem HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição ao DZN .....	30
Figura 10 - Efeito da biotransformação induzida pelo Fenobarbital (1mM) sobre a capacidade de redução do MTT pela linhagem HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição ao DZN .....	31
Figura 11- Comparação dos efeitos do 3-Metilcolantreno (3-MC) e do Fenobarbital (PB) na citotoxicidade do DZN nas células HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição ao inseticida .....	32

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
CCCP	Cianeto de Carbonil m-clorofenil-hidrazona
CYP	Citocromo P450
DMSO	Dimetilsulfóxido
DZN	Diazinon
DZO	Diazoxon
FAO	Food and Agriculture Organization
HepG2	Linhagem celular de Hepatocarcinoma Humano
LDH	Lactato Desidrogenase
LMR	Limite Máximo de Resíduos
MEM	Minimum Essential Medium
MTT	Corante Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5 difeniltetrazólio
ONU	Organização das Nações Unidas
OP	Organofosforado
PB	Fenobarbital
PBS	Tampão Fosfato Salino
RPM	Rotações por Minuto
3-MC	3-Metilcolantreno
SRB	Sulforodamina B
t-BOOH	Terc-butilhidroperóxido

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	OBJETIVOS .....	17
2.1	Objetivo Geral .....	17
2.2	Objetivos Específicos .....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1	Reagentes .....	18
3.2	Cultura das Células hepg2.....	18
3.3	Ensaio Citotóxicos .....	19
3.3.1	Ensaio de proliferação celular.....	19
3.3.2	Ensaio de atividade metabólica celular .....	19
3.3.3	Liberação da enzima lactato desidrogenase.....	20
3.3.4	Ensaio de viabilidade celular pela exclusão do azul de tripan.....	20
3.4	Atividade Mitocondrial .....	20
3.4.1	Potencial de membrana mitocondrial.....	20
3.4.2	Determinação da concentração de ATP .....	21
3.5	Avaliação da Biotransformação .....	21
3.6	Análise Estatística .....	22
4	RESULTADOS .....	23
4.1	Ensaio Citotóxicos .....	23
4.1.1	Efeito do diazinon na proliferação celular .....	23
4.1.2	Efeito do diazinon na atividade metabólica celular .....	24
4.1.3	Efeito do diazinon na enzima lactato desidrogenase.....	25
4.1.4	Efeito do diazinon na viabilidade celular (Azul de Tripan).....	26
4.2	Ensaio de Atividade Mitocondrial .....	27
4.2.1	Efeito do diazinon no potencial de membrana mitocondrial .....	27
4.2.2	Efeito do diazinon na concentração de ATP .....	28
4.3	Efeito Da Biotransformação sobre a Toxicidade Do Diazinon.....	29
5	DISCUSSÃO .....	33
6	CONCLUSÃO.....	36
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de praguicidas sendo que sua utilização próxima a mananciais, áreas de preservação e áreas habitadas é um problema ambiental e de saúde pública (VASCONCELOS, 2018). A rigidez e evolução da legislação e do sistema de registro garantem que os produtos colocados à disposição do usuário sejam seguros, quando bem utilizados. Porém, os praguicidas podem ser tóxicos devido ao uso inadequado e sua toxicidade depende das propriedades dos ingredientes ativos e inertes do produto (TAVELLA *et al.*, 2011).

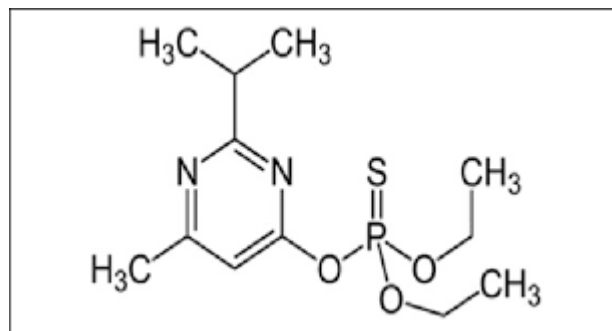
De acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO-2003), programa da Organização das Nações Unidas (ONU) responsável pela agricultura e alimentação, os praguicidas são definidos como qualquer substância usada para prevenir, destruir ou controlar qualquer praga de plantas e animais. Eles se dividem de acordo com a natureza da praga controlada, podendo ser inseticidas (controle de insetos), fungicidas (combate aos fungos), herbicidas (combate às plantas invasoras), desfoliantes (combate às folhas indesejadas) e fumigantes (combate às bactérias do solo) (PERES; MOREIRA, 2003). Os inseticidas se dividem por grupos químicos em quatro gerações: na primeira os produtos inorgânicos (não contém nenhum átomo de carbono), na segunda geração os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, na terceira são os reguladores de crescimento (Insect Growth Regulators) e fago-inibidores e a quarta geração de inseticidas os neonicotinóides. Os organofosforados são considerados biodegradáveis e apresentam eficiência no controle de uma ampla gama de pragas e insetos nas práticas agrícolas, veterinárias e domésticas, sendo que representam cerca de 50% do uso global de praguicidas amplamente usados nas lavouras (HAIDER; RAUF, 2014; MOHAMED; DAIM, 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) existem três milhões de casos de intoxicações por praguicidas e aproximadamente 200 mil mortes por ano, sendo os organofosforados os responsáveis pela maioria das intoxicações (BRICENO *et al.*, 2016). Os princípios ativos dessa classe agem como inibidores da enzima colinesterase nas sinapses do sistema nervoso central dos insetos-alvo resultando em paralisia. No mercado atual existe inúmeros pesticidas

organofosforados, sendo o Diazinon (DZN) um dos representantes mais utilizados em larga escala mundialmente (BERTONI *et al.*, 2017; ZAFIROPOULOS *et al.*, 2014).

O Diazinon (O, O-dietil-O-[2-isopropil-6-metil-4-pirimidinil] fosforotioato) (Figura 1) é um organofosforado (OP) considerado inseticida e acaricida. A sua classificação toxicológica é Classe II (BRASIL, 2020), sendo, portanto, um produto altamente tóxico. É utilizado em culturas como citros e maçã em aplicação foliar; o Intervalo de Segurança é 14 dias e o Limite Máximo de Resíduos (LMR) é 0,7mg/kg para citros e 0,5mg/kg para maçã (BRASIL, 2020). No uso veterinário é indicado para o controle da mosca-do-chifre e mosca doméstica em instalações rurais. A utilização domissanitária do DZN não é autorizada pela RE nº 2.519 de 09/09/19 (BRASIL, 2019). A exposição ao praguicida provoca uma série de efeitos tóxicos em animais experimentais como: disfunção do fígado, mudanças estruturais de proteínas, alterações nas enzimas hepáticas, inchaço das mitocôndrias nos hepatócitos, produção de radicais livres, depleção de antioxidantes e a indução de estresse oxidativo, além de causar dano celular e alterações no sistema neurológico, rins e pâncreas (EZZI *et al.*, 2016; NAJI; HEIDARIAN; SAMANI, 2017; HADICHEGENI *et al.*, 2018).

Figura 1- Estrutura química do Diazinon.



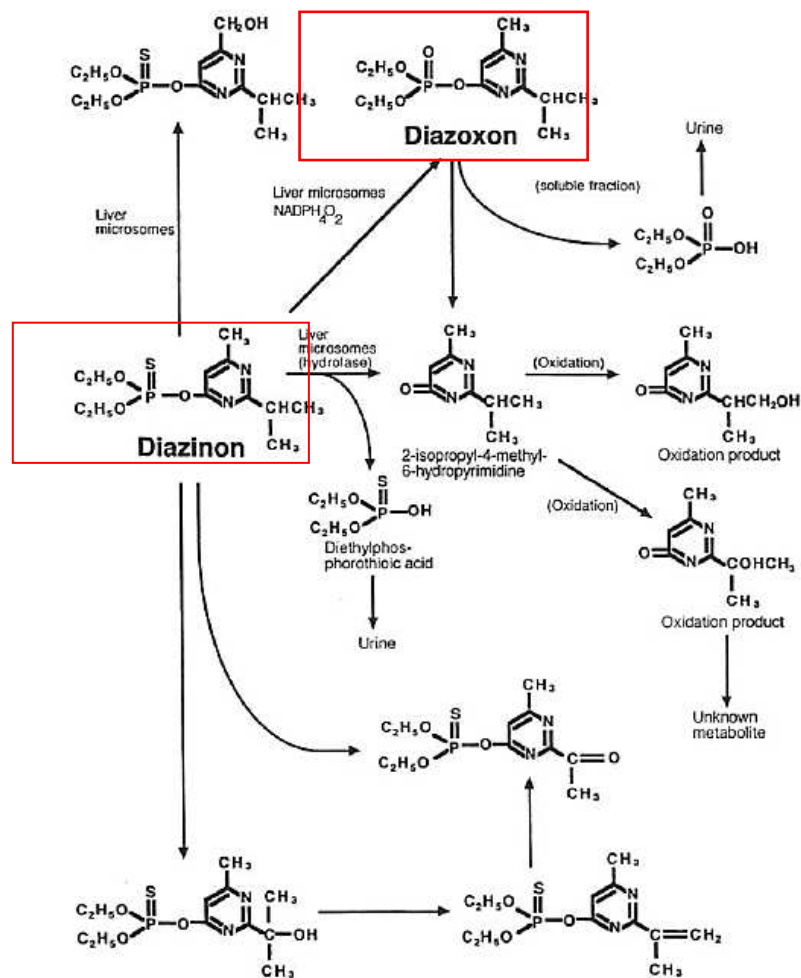
Fonte: Brasil (2020).

O fígado desempenha uma função central no metabolismo, pois recebe grandes quantidades de nutrientes e xenobióticos que são absorvidos por meio do sistema digestório e transportados pelo sistema circulatório (circulação portal). Este órgão é o principal envolvido na biotransformação de substâncias exógenas (xenobióticos), com capacidade de converter compostos hidrofóbicos em hidrossolúveis, mais facilmente eliminados pelo organismo (GUILLOUZO, 1998). Esse processo de biotransformação (desintoxicação) é realizado principalmente pelo

sistema enzimático denominado cito cromo P450 (DANIELSON, 2002; IOANNIDES, 2002; WALTER, 2007). Evidências experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de drogas, toxinas ou seus metabólitos reativos formados pelo cito cromo P450 (MINGATTO *et al.*, 2007). Estudos apontam o envolvimento da mitocôndria na toxicidade do DZN (KALENDER, 2005; AHMADIAN, 2018; MIRANDA *et al.*, 2020).

O DZN é metabolizado no fígado por meio das reações de fase I e fase II da biotransformação, resultando na sua detoxificação ou bioativação (Figura 2). Os principais mecanismos degradativos são hidrólise do éster tiol, oxidação da cadeia lateral, hidroxilação do grupo isopropil e conjugação do anel pirimidil com a glutathione reduzida (MATSUMURA, 1985). Os produtos da ativação incluem vários diazinons-monohidróxidos (HAYES; LAWS, 1991) e o Diazoxon (DZO) (MATSUMURA, 1985), os quais são transformados posteriormente antes de serem excretados. Outros produtos principais incluem o 2-isopropil-6-metil-4-pirimidinol, ácido dietilfosforotióico, ácido dietilfosfórico e vários metabólitos oxidados (KEIZER *et al.*, 1991; BURGESS, 1996). O DZN mostrou ser mais tóxico em ratos diabéticos, nos quais o metabolismo hepático mediado pelo CYP1A2, responsável pela produção do DZO, está acelerado, indicando que este metabólito pode ser o principal responsável pela toxicidade do inseticida (UEYAMA *et al.*, 2008).

Figura 2 - Metabolismo do Diazinon no fígado.



Fonte: Adaptado de Larkin e Tejeerdema (2000).

A linhagem celular derivada de Hepatocarcinoma humano (HepG2) é um modelo bastante empregado na literatura científica em estudos de toxicidade hepática e do metabolismo de xenobióticos, uma vez que estas células mantêm muitas das funções especializadas de hepatócitos humanos normais (KNASMÜLLER *et al.*, 2004; MERSCH-SUNDERMANN *et al.*, 2004). As células HepG2 são metabolicamente ativas e são capazes de simular a função hepática de um organismo *in vitro* (VINKEN *et al.*, 2012). Raza, John e Benedict (2011) relataram 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.

Desta forma, o estudo das alterações relacionadas à citotoxicidade, bioenergética mitocondrial e os efeitos da biotransformação avaliados em células

HepG2 são de suma importância para entender o mecanismo de ação do DZN, para que se possa ajudar no tratamento ou na prevenção da intoxicação do fígado pelo inseticida.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Esse trabalho teve o objetivo de esclarecer os mecanismos bioquímicos envolvidos na toxicidade do DZN em células HepG2, avaliando o envolvimento da mitocôndria, bem como o efeito da biotransformação do inseticida.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Para tanto foram propostos os seguintes objetivos específicos:

I) Avaliar o potencial do DZN em interferir no crescimento de células HepG2 após a exposição em diferentes tempos e concentrações;

II) Avaliar o potencial do DZN em interferir na funcionalidade mitocondrial das células HepG2, por meio de ensaios que avaliam o potencial de membrana mitocondrial e a síntese de ATP;

III) Avaliar o efeito da biotransformação na toxicidade do DZN para as células HepG2.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Os ensaios experimentais realizados no Laboratório de Bioquímica Metabólica e Toxicológica (LabMet) da Unesp, Câmpus de Dracena, avaliaram a citotoxicidade do DZN por meio dos estudos de Proliferação Celular, Atividade Metabólica Celular, Liberação da Enzima LDH e Viabilidade Celular (Azul de Tripán). Os ensaios que avaliaram a atividade mitocondrial foram o Potencial de Membrana Mitocondrial e Determinação dos Níveis de ATP. Nos estudos da avaliação da biotransformação do DZN no fígado foram utilizados os ativadores do citocromo p450 Fenobarbital e 3-MC. Todos os ensaios, realizados em triplicata, contaram com controles positivos (máximo efeito tóxico) e controles negativos (ausência de efeito tóxico).

#### **3.1 Reagentes**

O DZN (Código 45428) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Todos os demais reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos com o mais alto grau de pureza disponíveis no mercado. As soluções foram preparadas com água ultra-filtrada em sistema purificador Millipore DirectQ-3<sup>®</sup> (Milli-Q<sup>®</sup>).

#### **3.2. Cultura das Células HepG2**

As células HepG2 (American Type Culture Collection, nº HB8065) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Daniel J. Dorta, da Universidade de São Paulo, Campus Ribeirão Preto. Essa linhagem foi isolada em 1979 do tecido hepático de um garoto argentino de 11 anos com um carcinoma hepatocelular diferenciado. Estas células apresentam morfologia semelhante às células do parênquima hepático e sintetizam e secretam muitas proteínas plasmáticas características de um fígado normal. As células foram mantidas em Meio "Minimum Essential Medium" (MEM) contendo L-glutamina 2mM 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, em estufa climatizada com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% O<sub>2</sub> e temperatura de 37°C. Após este procedimento, as quantidades adequadas de células foram plaqueadas e incubadas durante 24 h para assegurar uma boa adesão, antes de iniciar os experimentos.

Antes do plaqueamento realizou-se a avaliação da viabilidade das células pelo teste de exclusão com Azul de Tripán a 0,25% (m/v) (STROBER, 2015). Sendo assim, os experimentos foram realizados com cultivo de células que apresentaram uma viabilidade  $\geq 90\%$  no momento do plaqueamento.

### **3.3 Ensaios de Citotoxicidade**

#### **3.3.1 Ensaio de proliferação celular**

A proliferação celular foi avaliada utilizando-se sulforodamina B (SRB), de acordo com SKEHAN (1990). Aproximadamente  $5 \times 10^4$  células/mL foram incubadas em placas de 24 poços (BD – Falcon™, São Paulo, SP, Brasil) em DMEM completo, após 24 horas do plaqueamento das células aconteceu a exposição as diferentes concentrações (25, 50, 75, 100 e 150  $\mu\text{M}$ ) de DZN pelos tempos de 24 e 48 horas. Após incubação, o meio de cultivo foi removido e as células lavadas com Tampão Fosfato Salino (PBS). As células aderidas foram fixadas com metanol absoluto por 2 horas, em seguida foram lavadas com PBS e coradas com SRB 0,5% (m/v), preparada em ácido acético 1% (v/v). Depois de incubado por 60 minutos, o corante foi removido por meio de lavagem com solução de ácido acético 1% (v/v) até retirada completa do excesso de corante. O corante aderido às membranas da célula foi solubilizado em tampão Tris 10 mM, e a absorvância medida em 540 nm em um Espectrofotômetro leitor de placas (EZ Read 2000, Biochrom, Cambridge, USA).

#### **3.3.2 Ensaio de atividade metabólica celular**

A atividade metabólica celular foi avaliada por meio da redução do corante brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5 difeniltetrazólio (MTT), de acordo com Denizot; Lang (1986). As células HepG2 foram plaqueadas a uma densidade de  $2 \times 10^3$  células/mL e expostas as diferentes concentrações (25, 50, 75, 100 e 150  $\mu\text{M}$ ) de Diazinon. Foram realizadas pelo menos três repetições para cada amostra e cultivadas por 24 e 48 horas, com subsequente incubação das células com uma solução de MTT a 0,5% (5 mg/mL) numa atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$  à 37°C durante 3 h. Após este período, o meio nos poços foi descartado e os cristais de formazan formados dissolvidos em uma solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) em tampão de glicina 0,2 M, pH 10,2. A absorvância final foi avaliada a 570 nm de

comprimento de onda em um espectrofotômetro leitor de placas (EZ Read 2000, Biochrom, Cambridge, USA). Os resultados são apresentados como a diferença percentual em relação ao grupo controle.

### **3.3.3 Liberação da enzima lactato desidrogenase**

A atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) liberada foi avaliada usando um kit disponível comercialmente (Bioclin, Brasil). As células HepG2 ( $1 \times 10^5$  células/mL) foram cultivadas e incubadas com as concentrações de 25, 50, 75, 100 e 150  $\mu\text{M}$  do DZN por 24 e 48h. Após exposição das células ao DZN, os meios de cultura foram recolhidos e a LDH liberada avaliada a partir da diminuição da absorvância a 340 nm no espectrofotômetro (DU 800, Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA).

### **3.3.4 Ensaio de viabilidade celular pela exclusão do azul de tripan**

As células aderidas nas placas de culturas foram lavadas com PBS, tripsinizadas (onde as células ficam em contato com 5mL de tripsina por 6 minutos na incubadora para soltar as células da garrafa) e centrifugadas a 212 g por 5 minutos. Em seguida as células foram suspensas e 50  $\mu\text{L}$  da suspensão foram adicionados a 50  $\mu\text{L}$  da solução de azul de tripan (0,016%). O número de células viáveis ou incolores (sem danos na membrana) e as não viáveis ou coradas (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).

## **3.4 Atividade Mitocondrial**

### **3.4.1 Potencial de membrana mitocondrial**

As células HepG2 foram cultivadas a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/mL, em seguida, expostas ao Diazinon em concentrações 25, 50, 75, 100 e 150  $\mu\text{M}$ . Cada amostra foi testada com, pelo menos, três repetições. As células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e incubadas com uma solução de tetrametilrodamina metil éster (TMRM) 6,6  $\mu\text{M}$  a 37°C durante 30 min (IMBERTI *et al.*, 1993). 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 medida nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 e 590 nm, respectivamente, usando um espectrofluorímetro (RFPC 5301, Shimadzu, Tóquio, Japão). Os resultados foram apresentados como a percentagem da fluorescência em relação ao grupo controle (DMSO).

### **3.4.2 Determinação da concentração de ATP**

O nível de ATP nas células foi mensurado pelo kit de ensaio de ATP bioluminescente da Sigma-Aldrich (Código FLAA). O ensaio é baseado na oxidação da luciferina catalisada pela enzima luciferase de vagalume, que consome ATP com concomitante emissão de luz. Para este ensaio, as células HepG2 ( $1 \times 10^6$ /mL) foram cultivadas e tratadas com DZN por 24 h e 48 h. Posteriormente as culturas foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas (1500 rpm por 5 min). O sobrenadante foi descartado e as células tratadas com 1mL de ácido percloroacético 1 M gelado (4°C). Após centrifugação da mistura a 2000 g por 10 minutos, a 4°C, uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi retirada, neutralizada com KOH 2 M e acrescida de Tris-HCl 100 mM, pH 7,8 (q.s.p. 1 mL). A amostra neutralizada foi novamente centrifugada a 15000 g por 10 minutos, e as concentrações de ATP medidas seguindo-se as recomendações do fabricante do kit. A bioluminescência foi quantificada em um aparelho Luminômetro (Sirius I, Berthold Detection Systems, Pforzheim, Alemanha), e a concentração de ATP intracelular (nmol de ATP  $\times 10^6$  células<sup>-1</sup>) calculada utilizando uma curva padrão de ATP.

### **3.5 Avaliação da Biotransformação**

As células HepG2 foram expostas ao DZN após o tratamento prévio com os indutores do citocromo P450 (CYP): Fenobarbital (PB) 1 mM (dissolvido em solução salina tamponada com fosfato estéril) e 3-Metilcolantreno (3-MC) 2 µM (dissolvido em DMSO) por 48 h. Para a indução do CYP, o meio de cultura foi trocado a cada 24 h. A concentração de DMSO no meio de cultura não excedeu 0,1% (v/v). A viabilidade celular foi monitorada pelo ensaio do MTT conforme descrito no item 3.3.2.

### **3.6 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 Dunnett, o qual realiza a comparação entre os tratamentos e o controle, e os resultados com valor de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. O programa utilizado foi o GraphpadPrism, versão 4.0 para o Windows, do Graphpad Software (San Diego, CA, USA).

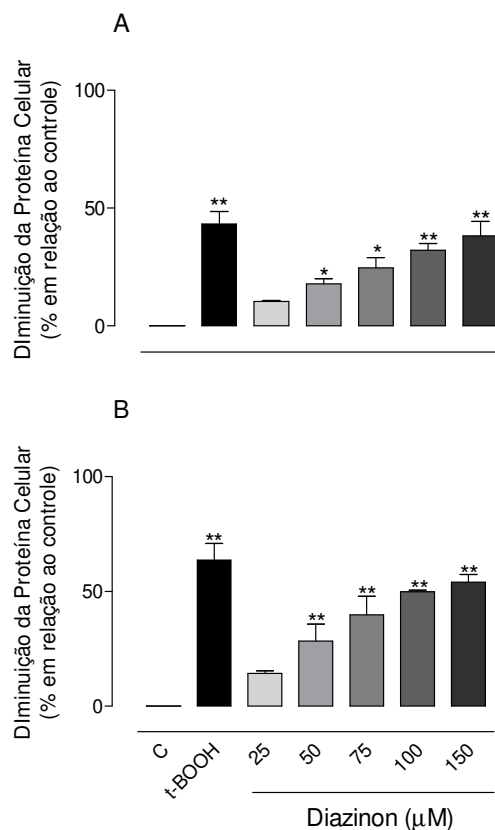
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Ensaios Citotóxicos

#### 4.1.1 Efeito do diazinon na proliferação celular

O DZN afetou a quantidade de proteína celular, um indicador de proliferação das células HepG2, nos tempos de 24 e 48 horas de exposição de maneira concentração e tempo dependentes conforme demonstrado na Figura 3. Foi observado que após 24 (Figura 3A) e 48 horas (Figura 3B) de incubação o inseticida inibiu a proliferação celular significativamente a partir de 50  $\mu\text{M}$  quando comparado ao controle.

Figura 3 - Efeito do Diazinon 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 populações de células. \*,\*\* Estatisticamente significante em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ , respectivamente). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; t-BOOH = controle positivo com adição de terc-butilhidroperóxido 100  $\mu\text{M}$ .

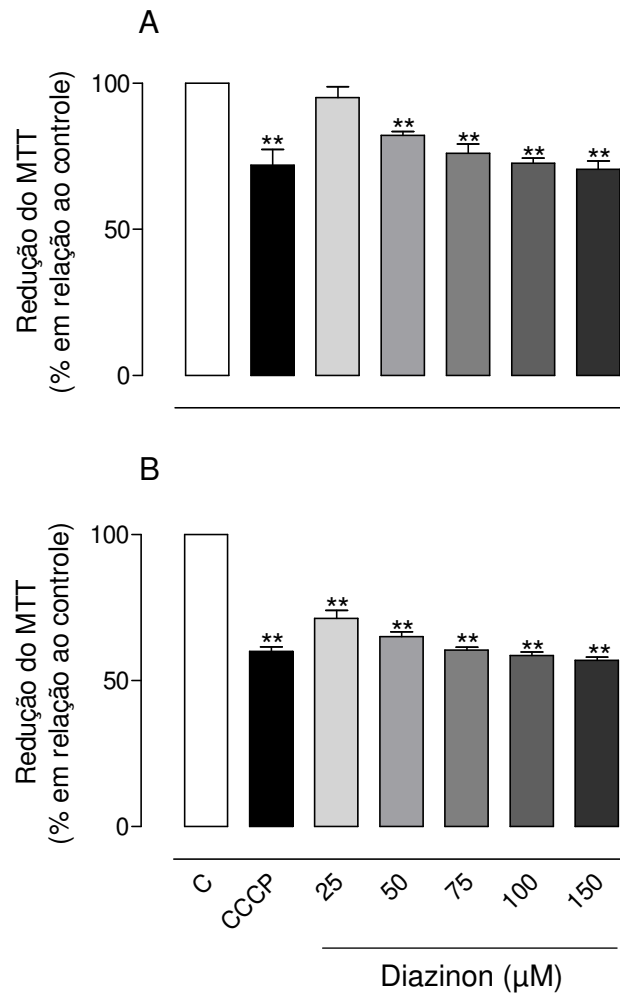


Fonte: Programa Graphpadrism 4.0, (2020).

#### 4.1.2 Efeito do diazinon na atividade metabólica celular

A presença do DZN afetou a capacidade metabólica das células de maneira tempo e dose-dependente, quando realizado o teste do MTT (Figura 4). Foi observada uma diminuição significativamente na viabilidade após 24 horas de incubação a partir da concentração 50  $\mu\text{M}$  (Figura 4A), já no tempo de 48 horas este parâmetro foi afetado em todas as concentrações (Figura 4B).

Figura 4 - Efeito do Diazinon 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 populações de células. \*\* Estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (\*\* $P < 0,01$ ). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CCCP = controle positivo com adição de cianeto de carbonil m-clorofenil-hidrazona 10  $\mu\text{M}$ .

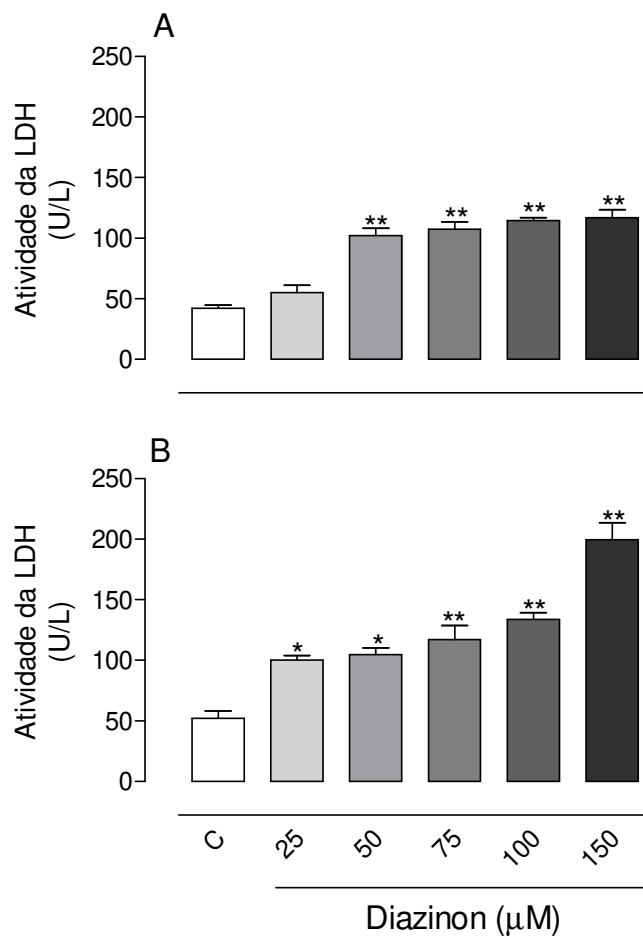


Fonte: Programa Graphpad Prism 4.0, (2020).

#### 4.1.3 Efeito do diazinon na enzima lactato desidrogenase

A integridade da membrana foi avaliada por meio da liberação da lactato desidrogenase. A presença do DNZ induziu danos na membrana celular e o consequente aumento na atividade enzimática em ambos os tempos analisados (Figura 5). No tempo de 24 horas houve liberação significativamente de LDH a partir de 50  $\mu\text{M}$  (Figura 5A) e no tempo de 48 horas em todas as concentrações (Figura 5B).

Figura 5 - Efeito do Diazinon sobre a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) pela linhagem de células HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de quatro experimentos com diferentes populações de células. \*,\*\* Estatisticamente significante em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ ). DMSO = controle, apenas 0,1% de DMSO.

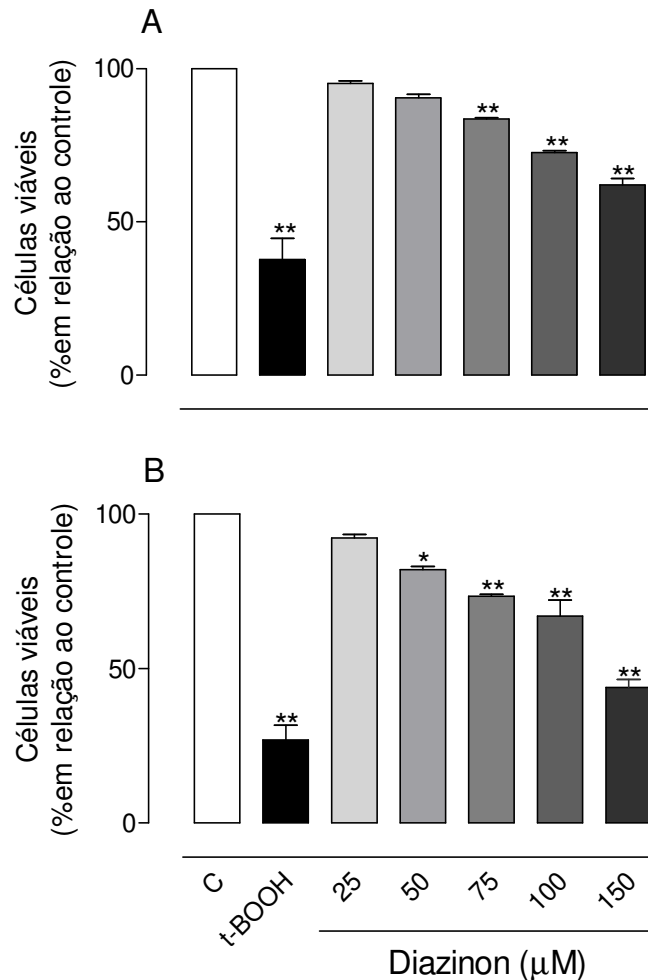


Fonte: Programa Graphpad Prism 4.0, (2020).

#### 4.1.4 Efeito do diazinon na viabilidade celular (Azul de Tripán)

Os danos à membrana provocados pela presença do DZN foram comprovados pela avaliação da porcentagem de células viáveis realizada por meio da exclusão do corante azul de tripan nos tempos 24 e 48 horas, conforme demonstrado nas Figuras 6A e 6B, respectivamente.

Figura 6- Efeito do Diazinon 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; t-BOOH = controle positivo com adição de terc-butilhidroperóxido 100  $\mu$ M.



Fonte: Programa Graphpad Prism 4.0, (2020).

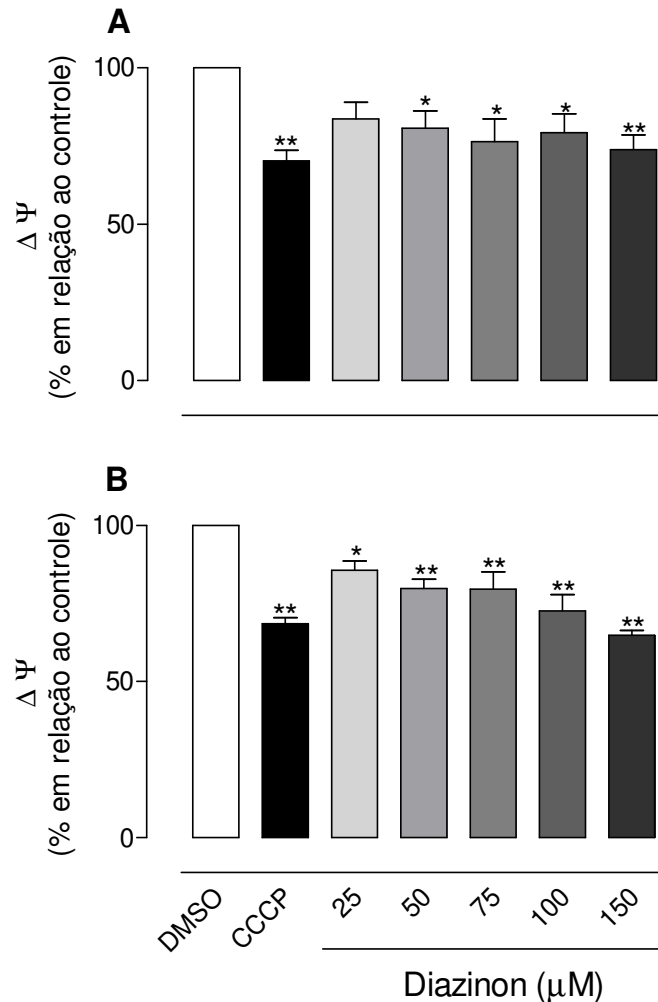
## 4.2 Ensaio de Atividade Mitocondrial

### 4.2.1 Efeito do diazinon no potencial de membrana mitocondrial

O colapso do potencial de membrana compromete a energia e, conseqüentemente, danos à integridade da célula. A despolarização mitocondrial foi medida utilizando o corante fluorescente TMRM, um composto catiônico permeável à membrana celular, o qual é rapidamente sequestrado pela mitocôndria de células intactas, e produz uma relação estequiométrica entre a fluorescência e o potencial de membrana mitocondrial (IMBERTI *et al.*, 1993).

As alterações no potencial de membrana mitocondrial ocasionadas pela exposição das células HepG2 ao DZN foram observadas nos tempos 24 e 48 horas conforme demonstrado na Figura 7A e 7B, respectivamente. Foi observada uma diminuição significativa no potencial de membrana a partir de 50  $\mu$ M quando as células foram expostas ao inseticida durante 24 horas, já no tempo de 48 horas a diminuição foi significativa em todas as concentrações testadas (25 a 150  $\mu$ M), apresentando um efeito tempo e dose-dependente.

Figura 7 - Efeito do Diazinon 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 significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ ). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CCCP = controle positivo com adição de cianeto de carbonil m-clorofenil-hidrazona 25  $\mu\text{M}$ .

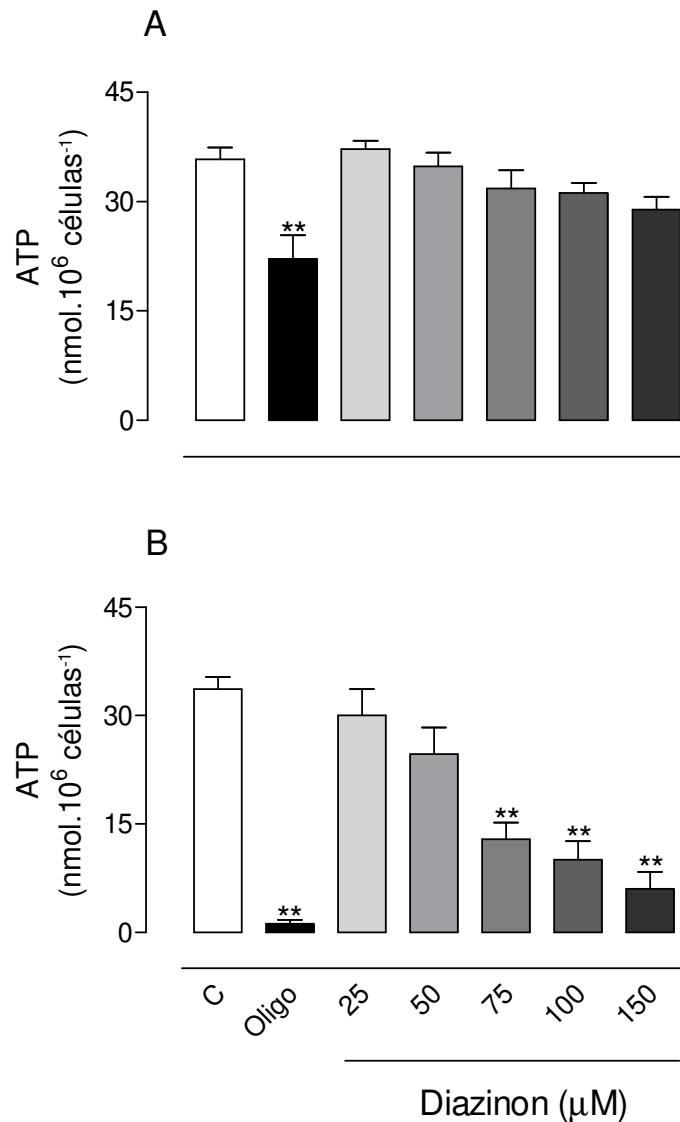


Fonte: Programa Graphpadrism 4.0, (2020).

#### 4.2.2 Efeito do diazinon na concentração de atp

O efeito do DZN sobre os níveis de ATP nas células HepG2 está demonstrado na Figura 8. Com 24h de exposição não houve significância estatística (Figura 8 A), contudo o inseticida reduziu significativamente a concentração de ATP nas células HepG2 após 48h de incubação nas concentrações acima de 75  $\mu\text{M}$  (Figura 8B).

Figura 8 - Efeito do Diazinon sobre os níveis de ATP nas células HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de três experimentos com diferentes populações de células. \*\* Estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (\*\* $P < 0,01$ ). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; Oligo = controle positivo com adição de oligomicina 1 mg/mL.



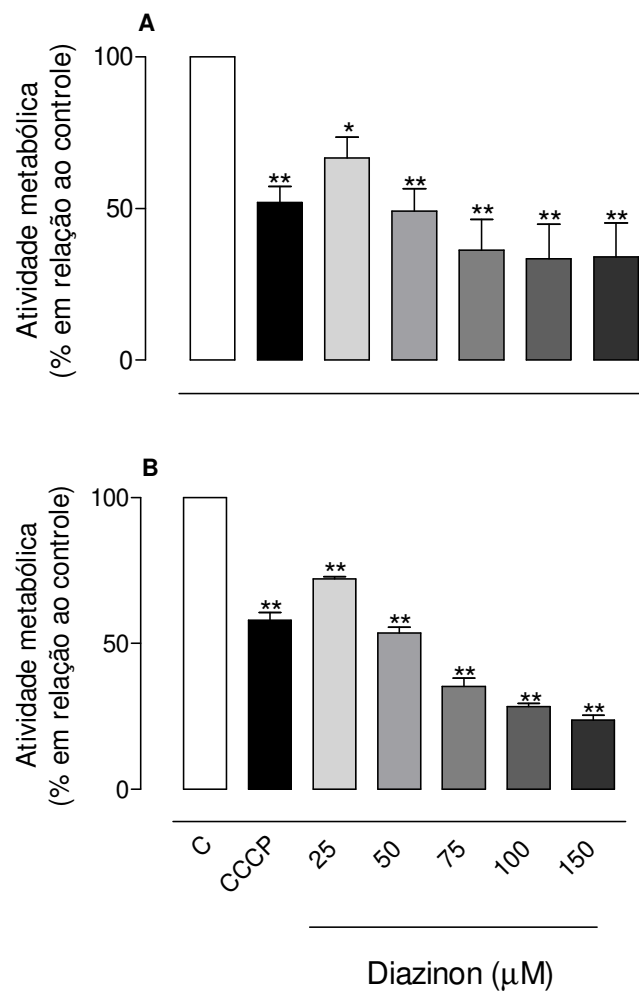
Fonte: Programa Graphpad Prism 4.0, (2020).

#### 4.3 Efeito da Biotransformação sobre a Toxicidade do Diazinon

O efeito da biotransformação sobre a citotoxicidade do DZN nas células HepG2 foi avaliada por meio do ensaio MTT, conforme observado nas (Figuras 9 e 10). A pré-incubação das células HepG2 com o 3-Metilcolantreno por 48 h aumentou o efeito citotóxico do DZN observado pela maior diminuição na atividade metabólica

tanto após 24 horas (Figura 9A) como após 48 horas (Figura 9B) de incubação, mantendo também o efeito dose e tempo-dependente.

Figura 9 - Efeito da biotransformação induzida pelo 3-Metilcolantreno (2  $\mu$ M) sobre a capacidade de redução do MTT pela linhagem HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição ao DZN. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de 3-6 experimentos com diferentes populações de células. \*\*\*,\*\*Estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (\* $P < 0,05$  e \*\* $P < 0,01$ ). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CCCP = controle positivo com adição de cianeto de carbonil m-clorofenil-hidrazona 10  $\mu$ M.

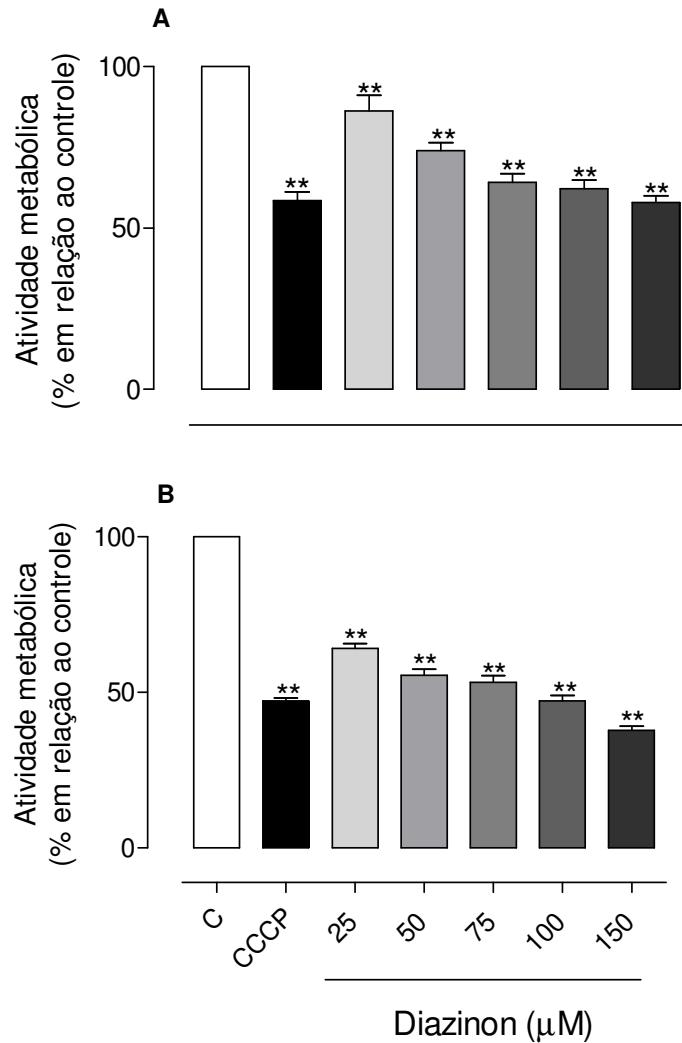


Fonte: Programa Graphpad Prism 4.0, (2020).

Quando as células HepG2 foram pré-incubadas com o fenobarbital por 48 h, também foi observado aumento do efeito citotóxico do DZN tanto após 24 horas

(Figura 10A) como após 48 horas (Figura 10B) de incubação, também de maneira dose e tempo-dependente.

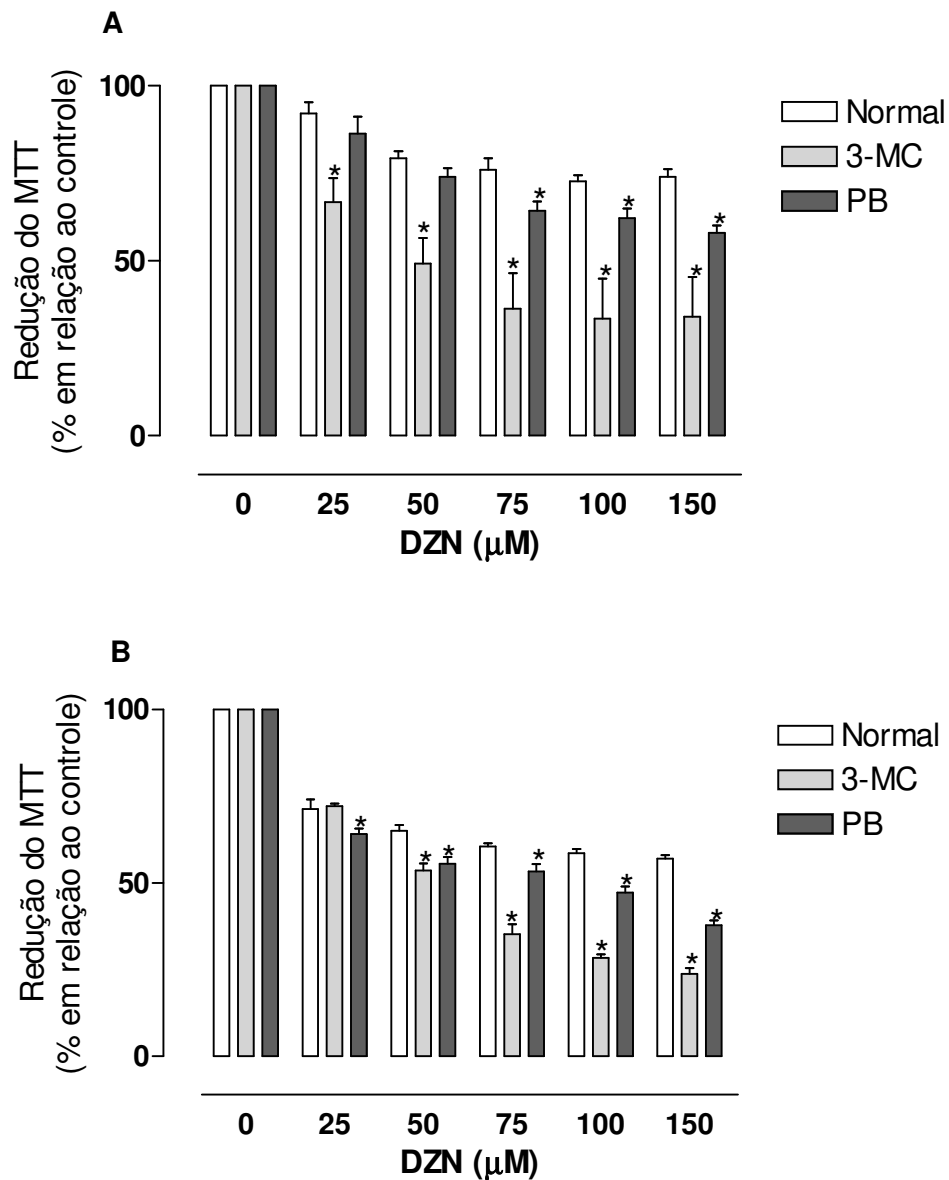
Figura 10 - Efeito da biotransformação induzida pelo Fenobarbital (1mM) sobre a capacidade de redução do MTT pela linhagem HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição ao DZN. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de 3-6 experimentos com diferentes populações de células. \*\*Estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (\*\*P<0,01). C = controle, apenas 0,1% de DMSO; CCCP = controle positivo com adição de cianeto de carbonil m-clorofenil-hidrazona 10  $\mu$ M.



Fonte: Programa Graphpad Prism 4.0, (2020).

O efeito do 3-MC foi mais acentuado do que o Fenobarbital (PB) tanto após 24 horas como após 48 horas de incubação das células com o DZN quando comparado ao efeito do inseticida nas células HepG2 que não tiveram o citocromo P450 estimulado, conforme mostrado na (Figura 11).

Figura 11 - Comparação dos efeitos do 3-Metilcolantreno (3-MC) e do Fenobarbital (PB) na citotoxicidade do DZN nas células HepG2 após 24 (A) e 48 (B) horas de exposição ao inseticida. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM de 3-6 experimentos com diferentes populações de células. \*Estatisticamente significativo em relação ao efeito do DZN nas células normais (sem tratamento prévio) (\* $P < 0,05$ ).



Fonte: Programa Graphpad Prism 4.0, (2020).

## 5 DISCUSSÃO

As numerosas formas de uso do DZN, sobretudo nas proximidades de habitações humanas e o uso inadequado em animais de produção, indicam sua grande disponibilidade e potencial exposição acidental ou intencional, podendo ocasionar intoxicações agudas, subagudas ou crônicas e até mesmo fatais (HEYNDRYC *et al.*, 1974; POLKLIS *et al.*, 1980; CASTRO *et al.*, 2007; GRECCO *et al.*, 2009; SHAH *et al.*, 2010; PAPOUTSIS *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2013). Neste trabalho foram avaliados os efeitos do DZN sobre as células HepG2 para colaborar na descoberta dos mecanismos envolvidos na toxicidade induzida pelo inseticida no fígado. Os experimentos de proliferação e viabilidade celular com ensaios de SRB e MTT são testes indicados para avaliar a potencial interferência de um agente na viabilidade celular (MOSMAN, 1983).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o DZN foi capaz de causar toxicidade em células HepG2 após os tempos de 24 e 48 horas de exposição. A inibição da proliferação celular foi observada pela diminuição da proteína celular que ocorreu a partir da concentração de 50  $\mu\text{M}$  em ambos os tempos de incubação (24 e 48 horas), sendo o efeito concentração e tempo-dependente. Essa dificuldade na proliferação está associada à alterações na integridade da membrana celular (LDH) onde o DZN induziu a liberação de LDH a partir de 50  $\mu\text{M}$  em 24 horas e em 48 horas a partir de 25  $\mu\text{M}$ . Os danos à membrana celular provocados pelo DZN também foram comprovados por meio da exclusão do corante azul de tripan (avaliação da porcentagem de células viáveis) onde em 24 horas o inseticida foi capaz de causar danos a partir de 25  $\mu\text{M}$  e em 48h danos a partir de 50  $\mu\text{M}$ .

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 DZN afetou a capacidade metabólica das células, sendo que este efeito foi significativo a partir da concentração 25  $\mu\text{M}$  após 24 horas e 50  $\mu\text{M}$  após 48 horas de incubação.

As células são dependentes de ATP para realizar diversas funções como metabolismo e atividades fisiológicas, portanto, danos causados às mitocôndrias, que são as organelas responsáveis pela produção da maior parte do ATP, podem causar prejuízos e até mesmo acarretar em morte celular. Uma vez que a

capacidade metabólica das células foi afetada pelo DZN, conforme observado no ensaio de MTT, também foi avaliado o efeito do inseticida sobre a concentração de ATP nas células. Os resultados demonstraram que o DZN diminuiu a concentração de ATP nas células HepG2 somente após 48 horas de incubação, indicando que este pode ser um efeito tardio na intoxicação que leva à morte das células. Esse efeito está de acordo com os relatos da literatura de que a apoptose, a qual requer ATP, é o principal tipo de morte celular envolvida na toxicidade do DZN (ALUIGI; GUIDA; FALUGI, 2010; RUSH *et al.*; 2010; LARI *et al.*, 2013; LARI *et al.*, 2014) e, ainda, é mais um indício de que a liberação do citocromo C descrita nas mitocôndrias isoladas (MIRANDA *et al.*, 2020), seria um evento primário na indução da morte celular induzida pelo DZN.

Ao analisar o potencial de membrana mitocondrial observou-se uma diminuição significativa a partir de 50  $\mu\text{M}$  quando as células foram expostas ao inseticida durante 24 horas, já no tempo de 48 horas a diminuição foi significativa em todas as concentrações testadas (25 a 150  $\mu\text{M}$ ), apresentando um efeito tempo e dose-dependente. Os resultados de concentração de ATP e potencial de membrana obtidos neste estudo corroboram os resultados apresentados por Miranda *et al.*,(2020) que avaliaram os efeitos do DZN em mitocôndrias isoladas de fígado de rato e demonstraram a capacidade do DZN em causar alterações na bioenergética mitocondrial e induzir a transição de permeabilidade mitocondrial. A transição de permeabilidade mitocondrial pode induzir a morte celular de duas formas: A) por necrose devido à depleção do ATP e desregulação da homeostase cálcica sem a liberação do citocromo C ou B) por apoptose, quando o citocromo C e outras proteínas podem ser liberadas para o citosol através do poro de transição de permeabilidade promovendo a ativação das Caspases (SUSIN *et al.*, 1998; BERNARDI *et al.*, 2001).

O DZN é rapidamente metabolizado *in vivo* pelas enzimas do citocromo P450 do fígado, principalmente em seu análogo, Diazoxon (DZO) (FABRIZI *et al.*, 1999; KAPPERS *et al.*, 2001), o qual é conhecido por ser um forte inibidor da acetilcolinesterase (AChE) e responsável pela maior parte da neurotoxicidade aguda induzida pelo DZN (SIDIROPOULOU *et al.*, 2009; ČOLOVIĆ *et al.*, 2015). O DZN mostrou ser mais tóxico em ratos diabéticos, nos quais o metabolismo hepático mediado pelo CYP1A2, responsável pela produção do DZO, está acelerado,

indicando que este metabólito pode ser o principal responsável pela toxicidade do composto (UEYAMA *et al.*, 2008) entretanto, a contribuição efetiva do DZO para os efeitos adversos do DZN no fígado ainda não foi adequadamente descrita.

De acordo com Choi *et al.*, (2015) o Fenobarbital é um efetivo indutor das isoformas do citocromo P450: CYP2B6 e CYP3A4 e o 3-Metilcolantreno (3-MC) é um indutor da isoforma CYP1A2 em células HepG2, e essas três isoformas estão envolvidas na biotransformação do DZN em humanos (SAMS *et al.*, 2004). Nesse sentido, nossos resultados mostram que a pré-incubação das células HepG2 com os ativadores do citocromo P450, 3-MC e Fenobarbital, potencializou o efeito tóxico do inseticida, uma vez que foi observada uma maior redução na viabilidade das células após 24 h e 48 h de incubação com o DZN, e sugere que esse maior efeito tóxico é devido à ação do seu metabólito DZO.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o DZN é tóxico para as células HepG2, uma vez que o inseticida reduz a proliferação e viabilidade das células, afetando a atividade metabólica e provocando danos à membrana celular. Observou-se ainda que as mitocôndrias são organelas alvo do inseticida por meio dos efeitos sobre o potencial de membrana e alteração dos níveis de ATP. A viabilidade das células HepG2 foi reduzida de maneira mais acentuada após o estímulo da biotransformação do DZN, indicando que o efeito tóxico pode ser decorrente, principalmente, da ação de seu metabólito DZO. Estudos futuros a serem realizados pelo nosso grupo de pesquisa com o DZO poderão corroborar esta hipótese.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADIAN, E.; KHOSROUSHAHI, A. Y.; EGHBAL, M. A.; EFTEKHARI, A. Betanin reduces organophosphate induced cytotoxicity in primary hepatocyte via an anti-oxidative and mitochondrial dependent pathway. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 144, p. 71-78, 2018.

ALMEIDA, A. F.; ALARI, F. D. O.; SENO, M. C. Z.; LIMA, M. M. D.; NASCIMENTO, S. T.; CHIQUITELLI NETO, M. Efficiency of partial treatment of cattle infested with horn fly using 40% diazinon. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 4, p. 554-558, dez. 2013 .

ALUIGI, M. G.; GUIDA, C.; FALUGI, C. Apoptosis as a specific biomarker of diazinon toxicity in NTera2-D1 cells. **Chemico-biologicalinteractions**, v. 187, n. 1-3, p. 299-303, 2010.

BERNARDI, P.; PETRONILLI, V.; DI LISA, F.; FORTE, M. A mitochondrial perspective on cell death. **Trends in Biochememical Sciences**, v. 26, n. 2, p. 112-117, 2001.

BERTONI, E. S.; BIONDO, A. W.; MINOZZO, C. D.; BRUM, J. S.; BARROS FILHO, I. R.; PEROTTA, J. H. Acute poisoning by organophosphate in bovine cattle of Parana state. **Archives of Veterinary Science**, v. 22, n. 4, p. 62-66, 2017.

BRASIL. ANVISA. Setor regulado. **Regularização de produtos e serviços**. Agrotóxicos. Monografias autorizadas. D10 – Diazinona. 22 out. 2020.

BRASIL. Secretaria Geral da Presidência da República. Imprensa Nacional. Resolução-Re Nº 2.495, de 5 de Setembro de 2019. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 set. 2019.

BRICENO, G.; BRICEÑO, G.; SCHALCHLI, H.; RUBILAR, O.; TORTELLA, G. R.; MUTIS, A.; BENIMELI, C. S.; DIEZ, M. C. Increased diazinon hydrolysis to 2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol in liquid medium by a specific *Streptomyces* mixed culture. **Chemosphere**, v. 156, p. 195-203, 2016.

CASTRO, M. B. DE; MOSCARDINI, A. R. C.; REIS JR, J. L.; NOVAES, E. D. P. F.; BORGES, J. R. J. Intoxicação aguda por diazinon em bovinos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1498-1501, 2007.

CHOI, J. M.; OH, S. J.; LEE, S. Y.; IM, J. H.; OH, J. M.; RYU, C. S.; KIM, S. K. HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. **Archives of pharmaceutical research**, v. 38, n. 5, p. 691-704, 2015.

ČOLOVIĆ, M. B.; VASIĆ, V. M.; AVRAMOVIĆ, N. S.; GAJIĆ, M. M.; DJURIĆ, D. M.; KRSTIĆ, D. Z. In vitro evaluation of neurotoxicity potential and oxidative stress responses of diazinon and its degradation products in rat brain synaptosomes. **Toxicology letters**, v. 233, n. 1, p. 29-37, 2015.

DANIELSON, P. B. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. **Current drug metabolism**, v. 3, n. 6, p. 561-597, 2002.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

EZZI, L.; HAOUAS, Z.; SALAH, I. B.; SAKLY, A.; GRISSA, I.; CHAKROUN, S.; CHEIKH, H. B. Toxicopathic changes and genotoxic effects in liver of rat following exposure to diazinon. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 11, p. 11163-11170, 2016.

FABRIZI, L. GEMMA, S.; TESTAI, E.; VITTOZZI, L. Identification of the cytochrome P450 isoenzymes involved in the metabolism of diazinon in the rat liver. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 13, n. 1, p. 53-61, 1999.

GRECCO, F. B.; SCHILD, A. L.; SOARES, M. P.; RAFFI, M. B.; SALLIS, E. S. V.; DAMÉ, M. C. Intoxicação por organofosforados em búfalos (*Bubalus bubalis*) no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 211-214, 2009.

GUILLOUZO, A. Liver cell models in in vitro toxicology. **Environmental health perspectives**, v. 106, n. suppl 2, p. 511-532, 1998.

HADICHEGENI, S.; GOLIAEI, B.; TAGHIZADEH, M.; DAVOODMANESH, S.; TAGHAVI, F.; HASHEMI, M. Characterization of the interaction between human serum albumin and diazinon via spectroscopic and molecular docking methods. **Human & experimental toxicology**, v. 37, n. 9, p. 959-971, 2018.

HAIDER, M. J.; RAUF, A. Sub-lethal effects of diazinon on hematological indices and blood biochemical parameters in Indian carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 6, p. 947-953, 2014.

HAYES, W. J.; LAWS, E. R. **Handbook of pesticide toxicology**. San Diego: Academic Press, v.3, 1991.

HEYNDRICKX, A.; VAN HOOFF, F.; DE WOLF, L.; VAN PETEGHEM, C. Fatal diazinon poisoning in man. **Journal of the Forensic Science Society**, v. 14, n. 2, p. 131-133, 1974.

BURGESS, P.; HARPER, C.; TODD, G. D.; WOHLERS, D. (**Toxicological profile for diazinon (update)**). Atlanta, GA: Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human-Services, 1996.

IMBERTI, R.; NIEMINEN, A. L.; HERMAN, B. R. I. A. N.; LEMASTERS, J. J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 265, n. 1, p. 392-400, 1993.

IOANNIDES, C. **Enzyme systems that metabolise drugs and other xenobiotics**. 1. ed. J. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons 2002.

KALENDER, S. OGUTCU, A.; UZUNHISARCIKLI, M.; AÇIKGOZ, F.; DURAK, D.; ULUSOY, Y.; KALENDER, Y. Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect

of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. **Toxicology**, v. 211, n. 3, p. 197-206, 2005.

KAPPERS, W. A.; EDWARDS, R. J.; MURRAY, S.; BOOBIS, A. R. Diazinon is activated by CYP2C19 in human liver. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 177, n. 1, p. 68-76, 2001.

KEIZER, J.; D'AGOSTINO, G.; VITTOZZI, L. The importance of biotransformation in the toxicity of xenobiotics to fish. I. Toxicity and bioaccumulation of diazinon in guppy (*Poeciliareticulata*) and zebra fish (*Brachydaniorerio*). **Aquatic toxicology**, v. 21, n. 3-4, p. 239-254, 1991.

KNASMÜLLER, S. MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W. W.; HOELZL, C.; MAJER, B. J. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. **Toxicology**, v. 198, n. 1-3, p. 315-328, 2004.

LARI, P. RASHEDINIA, M.; ABNOUS, K.; HOSSEINZADEH, H. Alteration of protein profile in rat liver of animal exposed to subacute diazinon: a proteomic approach. **Electrophoresis**, v. 35, n. 10, p. 1419-1427, 2014.

LARI, P.; ABNOUS, K.; IMENSHAHIDI, M.; RASHEDINIA, M.; RAZAVI, M.; HOSSEINZADEH, H. Evaluation of diazinon-induced hepatotoxicity and protective effects of crocin. **Toxicology and industrial health**, v. 31, n. 4, p. 367-376, 2013.

LARKIN, D. J.; TJEERDEMA, R. S. Fate and effects of diazinon. **Reviews of environmental contamination and toxicology**, v. 166, p. 49-82, 2000.

MATSUMURA, F. **Toxicology of insecticides**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1985.

MERSCH-SUNDERMANN, V.; KNASMÜLLER, S.; WU, X. J.; DARROUDI, F.; KASSIE, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigen toxic and co genotoxic agents. **Toxicology**, v. 198, n. 1-3, p. 329-340, 2004.

MINGATTO, F. E.; DORTA, D. J.; DOS SANTOS, A. B.; CARVALHO, I.; SILVA, C. H.; SILVA, V. B.; CURTI, C. Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potential mechanism accounting for hepatotoxicity of monocrotaline. **Toxicol**, v. 50, n. 5, p. 724-730, 2007.

MIRANDA, C. A.; GUIMARÃES, A. R. D. J. S.; BIZERRA, P. F. V.; MINGATTO, F. E. Diazinon impairs bioenergetics and induces membrane permeability transition on mitochondria isolated from rat liver. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 83, n. 17-18, p. 616-629, 2020.

MOHAMED, M.; DAIM, A. Synergistic protective role of ceftriaxone and ascorbic acid against subacute diazinon-induced nephrotoxicity in rats. **Cytotechnology**, v. 68, p. 279-289, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAJI, A. R.; HEIDARIAN, E.; GHATREH-SAMANI, K. Evaluation of the effects of the hydroalcoholic extract of Terminalia chebula fruit on diazinon-induced liver toxicity and oxidative stress in rats. **Avicenna journal of phytomedicine**, v. 7, n. 5, p. 454, 2017.

PAPOUTSIS, L.; MENDONIS, M.; NIKOLAOU, P.; ATHANASELIS, S.; PISTOS, C., MARAVELIAS, C.; SPILIOPOULOU, C. Development and validation of a simple GC-MS method for the simultaneous determination of 11 anticholinesterase pesticides in blood-clinical and forensic toxicology applications. **Journal of forensic sciences**, v. 57, n. 3, p. 806-812, 2012.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio?:** agrotóxicos, saúde e ambiente [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003. p.384.

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, n. 1-2, p. 15-24, 2011.

RUSH, T.; LIU, X. Q.; HJELMHAUG, J.; LOBNER, D. Mechanisms of chlorpyrifos and diazinon induced neurotoxicity in cortical culture. **Neuroscience**, v. 166, n. 3, p. 899-906, 2010.

SAMS, C.; COCKER, J.; LENNARD, M. S. Biotransformation of chlorpyrifos and diazinon by human liver microsomes and recombinant human cytochrome P450s (CYP). **Xenobiotica**, v. 34, n. 10, p. 861-873, 2004.

SHABTAI, I. A.; MISHAEL, Y. G. Catalytic polymer-clay composite for enhanced removal and degradation of diazinon. **Journal of hazardous materials**, v. 335, p. 135-142, 2017.

SHAH, M. D.; IQBAL, M. Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 12, p. 3345-3353, 2010.

SIDIROPOULOU, E.; SACHANA, M.; FLASKOS, J.; HARRIS, W.; HARGREAVES, A. J.; WOLDEHIWET, Z. Diazinon oxon affects the differentiation of mouse N2a neuroblastoma cells. **Archives of toxicology**, v. 83, n. 4, p. 373-380, 2009.

SKEHAN, P. Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., ... & Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

STROBER, W. **Trypan Blue exclusion test of cell viability current protocols in immunology**, edited by John E. Coligan. [S.l.: s.n.], 2015.

SUSIN, S. A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1366, n. 1-2, p. 151-165, 1998.

TAVELLA, L. B.; SILVA, Í. N.; OLIVEIRA FONTES, L.; DIAS, J. R. M.; LIMA SILVA, M. I. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 7, n. 2, p. 06-12, 2012.

UEYAMA, J.; KAMIJIMA, M.; ASAI, K.; MOCHIZUKI, A.; WANG, D.; KONDO, T.; HASEGAWA, T. Effect of the organophosphorus pesticide diazinon on glucose tolerance in type 2 diabetic rats. **Toxicology letters**, v. 182, n. 1-3, p. 42-47, 2008.

VASCONCELOS, Y. Agrotóxicos na berlimda. **Pesquisa FAPESP**, v. 271, p. 18-27, 2018.

VINKEN, M. Gap junctions and non-neoplastic liver disease. **Journal of hepatology**, v. 57, n. 3, p. 655-662, 2012.

WESTERINK, W. M.A; SCHOONEN, W. 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, n. 8, p. 1581-1591, 2007.

ZAFIROPOULOS, A.; TSAROUHAS, K.; TSITSIMPIKOU, C.; FRAGKIADAKI, P.; GERMANAKIS, I.; TSARDI, M.; TSATSAKIS, A. M. Cardiotoxicity in rabbits after a low-level exposure to diazinon, propoxur, and chlorpyrifos. **Human & experimental toxicology**, v. 33, n. 12, p. 1241-1252, 2014.