



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

DANIELLE GABRIEL SELOTO

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

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

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

Botucatu

2021

DANIELLE GABRIEL SELOTO

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

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

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

Botucatu

2021

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

Seloto, Danielle Gabriel.

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

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

Orientador: Lilian Cristina Pereira

Coorientador: João Lauro de Vianna Camargo

Capes: 40105008

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

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

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

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

DEDICATÓRIA

À minha família

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

Capítulo 1 - Revisão da Literatura

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

Capítulo 2 - Manuscrito

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

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

RESUMO

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

ABSTRACT

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: Adenosine 5' Difosfato

ADP/o: Razão de ADP por Oxigênio

ANOVA: Análise de Variância

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

BSA: Albumina Soro Bovino

Ca⁺²: Cálcio

CCCP: Cianeto de Carbonila Clorofenilhidrazona

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CEMIB: Centro Multidisciplinar para investigação Biológica

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CN: Controle Negativo

CP: Controle Positivo

CsA: Ciclosporina A

Da: Daltons

DCA: 3,4 DicloroAnilina

DCPU: 3,4 Dicloro Fenil Ureia

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

DNA: Ácido Desoxiribonucleíco

DMSO: Dimetil Sulfóxido

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

ERONs: Espécies Reativas de Oxigênio e nitrogênio

EUA: Estados Unidos da América

GSH: Glutathione reduzida

GSSG: Glutathione Oxidada

H2DCFD: A 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

H2O2: Peróxido de Hidrogênio

HEPES: Ácido 2-[4-(2-hidroxiletil)-piperazinil-(1)]-etanossulfônico
KCl: Cloreto de Potássio
MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão
MOA: Modo de Ação
mtDNA: Ácido Desoxiribonucleíco Mitocondrial
mV: Milivolts
NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato) (forma reduzida)
NaOH: Hidróxido de Sódio
NAC: N acetil Cisteína
NEM: N-etil-maleimina
Nm: nanômetros
OH·: Radical Hidroxil
OPT :_-ftalaldeído
PCA: principal component analysis
PI: Fosfato Inorgânico
PTP: Poro de Transição de Permeabilidade
PM: Peso Molecular
PMM: Permeabilidade da Membrana Mitocondrial
RCR: Razão de Controle Respiratório
RR: Rutênio Red
TBA: Ácido Tio Barbitúrico
TBARs: Espécies Reativas ao Ácido Tio Barbiturico
T-BOOH: *t*-butilhidroperóxido
TPM: Transição de Permeabilidade Mitocondrial
TOXICAM: Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a saúde humana
USEPA: Agência de Proteção Ambiental Norte Americana
U.F.A: Unidade de Fluorescência Arbitrária

Capítulo 1

Revisão da
Literatura

Capítulo 1 - REVISÃO DA LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

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

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

1.1. DIURON

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

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

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

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

1.2. ESTUDOS EXPERIMENTAIS

O Diuron (CAS no 330-54-1) foi classificado pela Agência de Proteção Ambiental norte-americana (USEPA) como “provável cancerígeno para a espécie humana” após estudo de carcinogenicidade de dois anos apresentar aumento das incidências de carcinomas uroteliais na pelve renal e na bexiga de ratos Wistar expostos continuamente a 2.500 ppm (10.725µM) pela ração (USEPA, 1997; IYER, 2002). Estudos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa - Núcleo de Avaliação do Impacto Ambiental sobre a Saúde Humana (TOXICAM) - permitiram propor que o herbicida é citotóxico para o urotélio de ratos, onde o próprio produto parental e/ou seus metabólitos induzem sucessivamente degeneração celular, esfoliação e necrose seguidas de hiperplasia. Nesses estudos *in vivo* em que o Diuron foi administrado por via oral pela ração, em concentrações de até 2.500 ppm (10.725 µM), foram excluídos outros modos de ação nociva, como genotoxicidade, e alterações na composição urinária, como mudanças do pH ou a presença de sólidos urinários (cristais e cálculos) (NASCIMENTO et al., 2006; DA ROCHA et al., 2010, 2012, 2013, 2014; FAVA et al., 2015).

Após exposição oral, utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram observadas alterações uroteliais precoces nos ratos alimentados com ração contendo 2.500 ppm (10.725 µM) de Diuron. Essas alterações consistiram em células uroteliais edematosas (*swollen cells*), salientes para o lúmen; suas incidências e quantidade células aumentaram já no 3º dia de estudo e persistiram até o 7º dia. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) no 7º dia mostrou que essa alteração correspondia à degeneração hidrópica (edema) citoplasmática e nuclear, que resultava no alargamento e protrusão das células uroteliais superficiais para o lúmen vesical, com ruptura da membrana celular, necrose e esfoliação (DA ROCHA et al., 2012). Uma das causas este quadro morfológico é a disfunção mitocondrial, um dos parâmetros analisados no presente projeto.

Outros estudos mostraram aumento dose-dependente, a partir de 15 semanas de exposição, das incidências de necrose urotelial, hiperplasia e do índice de proliferação celular em ratos *Wistar* machos expostos a 2.500 ppm (10.725 μ M) do produto na ração (NASCIMENTO et al., 2006; DA ROCHA et al., 2013; FAVA et al., 2015). Esse efeito dose-resposta também foi observado quanto à expressão de genes relevantes para a carcinogênese em células uroteliais isoladas de bexiga urinária de ratos expostos a diferentes concentrações do Diuron por períodos variados. Foi possível observar, pela análise PCA (*Principal Component Analysis*) - ferramenta de resolução de dados que agrupa amostras de expressão gênica similares em um espaço tridimensional - evidente separação entre os grupos expostos a altas concentrações (1.250 e 2.500 ppm) (5.362 e 10.725 μ M) e a baixas concentrações (60, 125 e 500 ppm) (257, 536 e 2.145 μ M) após 07 dias ou 20 semanas de exposição pela ração (IHLASEH et al., 2011; 2014).

Em roedores, os herbicidas derivados de ureia apresentam baixa toxicidade sistêmica, com dose letal média (DL50) de 1.017 mg/kg em ratos jovens normais, 437 mg/kg em ratos tratados com dieta deficiente em proteínas e de 2.390 mg/kg em ratos tratados com dieta rica em proteínas (BOYD & KRUPA, 1970). Apesar desta baixa toxicidade aguda, é de extrema importância ressaltar que seus produtos intermediários de degradação (metabólitos e fotoprodutos) podem ser mais tóxicos do que o herbicida em sua forma original. Por exemplo, a biotransformação do Diuron pela *Arthrobacter* sp., ou outros microorganismos gera metabólito de elevada toxicidade denominado 3,4 Dicloroanilina (TIXIER ET AL, 2002).

Estudos de toxicidade oral com ratos *Wistar* e cães *Beagle* expostos ao Diuron, permitiram detectar resíduos do herbicida em diferentes tecidos, sendo os maiores níveis encontrados nos rins e fígado (HODGE et al., 1967). Efeitos tóxicos, geralmente observados após a ingestão crônica na concentração de 250 ppm (1.072 μ M) (dose de 6,26 mg/kg em cães e 12,5

mg/kg em ratos), foram observadas alterações hematológicas, perda de peso, hemossiderose no fígado e hiperplasia da série eritróide (HAYES, 1982).

Estudo utilizando mitocôndrias isoladas de fígado de rato demonstrou que o Diuron inibiu a biossíntese (gliconeogênese) e estimulou a glicólise e a frutólise, que são fenômenos compensatórios para uma geração de ATP mitocondrial inibida e de acordo com este estudo, Diuron inibe a gliconeogênese de lactato + piruvato (proporção 10/1) em 60% em hepatócitos isolados na concentração de 0,5 mM (DA SILVA et al., 2017). Além disso, a transformação hepática de Diuron envolve uma série de desmetilação (MOREIRA et al., 2013), processos que requerem o uso de potência redutora na forma de NADPH e O₂ na cadeia de transporte de elétrons do retículo endoplasmático (SCHOLZ et al., 1973; DA SILVA et al., 2017).

Em peixes-zebra e células de hepatoblastoma humano HepG2, expostos a diferentes concentrações de Diuron (12,5µg/ml e 25 µg/ml) por 24e 48 horas, o Diuron causou fetotoxicidade e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células HepG2 tratadas (KAO et al., 2019).

Outro estudo conduzido por Rudzok e colaboradores demonstrou que o herbicida Diuron induz o citocromo P450 1A humano (CYP1A) na linha celular derivada de hepatoma humano HepG2 (RUDZOK et al., 2009).

Embora o modo de ação (MoA) citotóxico do Diuron tenha sido descrito em estudos experimentais, seu mecanismo de toxicidade ainda não foi estabelecido, especialmente sobre sua hepatotoxicidade. Deste modo, ensaios utilizando métodos alternativos *in vitro* podem auxiliar no esclarecimento mecanístico dos processos bioquímicos e celulares envolvidos no dano ocasionado pela exposição ao herbicida. Esses métodos *in vitro* não só permitem a análise detalhada de efeitos subcelulares como atendem ao movimento de cuidados éticos com animais de experimentação, pela sua substituição, refinamento e redução de uso (3R) (FENWICK et al., 2009).

1.3. IMPORTÂNCIA DA MITOCÔNDRIA

Mitocôndrias são organelas presentes em quase todas as células eucarióticas, responsáveis por transformar a energia dos alimentos em energia útil e transportável às células, através da molécula de adenosina-trifosfato (ATP). Essas organelas têm sido utilizadas como ferramenta para esclarecer o mecanismo de toxicidade de diferentes xenobióticos (LI et al., 2012; MURPHY, 2001).

A estrutura da mitocôndria consiste em duas membranas altamente especializadas (externa e interna), separadas por um espaço inter-membranas, que reveste o espaço interno denominada matriz mitocondrial. A membrana externa é permeável à maior parte de íons e moléculas pequenas ($PM < 1500$ Da) e contém proteínas associadas que promovem a comunicação entre as mitocôndrias e a rede metabólica (LESNEFSKY *et al.*, 2001). A membrana interna, por outro lado, é impermeável a quase todos os íons e moléculas polares e contém elevada quantidade de proteínas (cerca de 75%) (NICHOLLS; FERGUSON, 1982), dentre elas, proteínas que permitem o transporte de metabólitos específicos. Possui ainda o sistema transportador de elétrons e delimita o espaço da matriz mitocondrial, onde encontram-se inúmeras enzimas e cópias do genoma mitocondrial (DNAmít) (FREY; MANNELLA, 2000). Sua energia é obtida da adenosina-trifosfato (ATP) pelo ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa que ocorrem na matriz mitocondrial e na membrana mitocondrial interna, respectivamente (FRIEDMAN, NUNNARI, 2014; NI et al. 2015; ROUBICEK, SOUZA-PINTO, 2017). Na presença de agentes inibidores dessas vias metabólicas, uma pequena fração de O_2 disponível para a mitocôndria sofre redução incompleta e gera os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila ($OH^{\cdot}$), que se acumulam e podem levar ao estresse oxidativo intracelular, condição decorrente do desequilíbrio entre a produção

de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) e defesas antioxidantes.

Quando há aumento na geração de superóxido ou deficiência nas defesas antioxidantes, ocorre uma condição conhecida como estresse oxidativo: o H_2O_2 acumula na mitocôndria e, na presença de Fe^{2+} , produz o radical $\text{OH}\cdot$ via reação de Fenton-Haber-Weiss. Este radical é capaz de induzir citotoxicidade por meio de danos oxidativos em macromoléculas como proteínas e DNA, e provocar peroxidação dos lipídios da membrana. (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; URSO; CLARKSON, 2003).

A exposição aos xenobióticos pode induzir abertura do poro de transição de permeabilidade (PTP), um processo que está correlacionado com os mecanismos de morte celular (LEMASTERS, 1999). A Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM) é um fenômeno mediado pela abertura de poros de natureza proteica na membrana da mitocôndria, como consequência do contato da organela com altas concentrações de Ca^{2+} e/ou estresse oxidativo (PEREIRA, 2012). Esse fenômeno, que pode ser inibido por Ciclosporina A (CsA), leva à difusão de solutos de até 1500 Da, dissipação do potencial de membrana mitocondrial e depleção dos níveis de ATP (RASOLA; BERNARDI, 2007), além de provocar inchamento mitocondrial, causando o rompimento da membrana externa e consequente liberação de proteínas, como a citocromo *c*, que está envolvida no processo de apoptose (HALESTRAP, 2005).

Algumas características da membrana interna são de grande importância fisiológica como, por exemplo, o poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) (BOELSTERLI, 2002). O PTPM é composto por 5 complexos proteicos, alguns xenobióticos apresentam capacidade de induzir sua abertura e alterar a permeabilidade mitocondrial (NICHOLLS, FERGUSON, 1982; BOELSTERLI, 2002). Como consequência, o potencial eletroquímico da membrana entra em colapso e a fosforilação oxidativa é afetada. Ainda, a diferença de osmolaridade entre a

matriz mitocondrial e o citosol possibilita o influxo de água e causa o inchamento da organela. Esses acontecimentos podem estar relacionados com os diferentes mecanismos de morte celular, como apoptose, necrose e autofagia (BOELSTERLI, 2002).

Além das várias funções mitocondriais, elas também orquestram as sinalizações celulares para vida ou morte celular através de sistemas integrados e reações bioquímicas (RASOLA e BERNARDI, 2007).

De acordo com o exposto, a função da mitocôndria é complexa e altamente regulada, tornando essa organela essencial para a homeostase metabólica e sobrevivência das células. Portanto, a ação de substâncias potencialmente tóxicas às mitocôndrias pode resultar em disfunção da organela e, conseqüentemente, citotoxicidade (PEREIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Embora a legislação brasileira não indique monitoração do Diuron nos compartimentos ambientais do país, esse herbicida persiste no ambiente, contaminando potencialmente o solo e os sistemas aquáticos. Seu uso considerável na agricultura, associado aos seus efeitos nocivos identificados em mamíferos, em particular para o urotélio de ratos, sugerem que as populações humanas possam estar sob algum risco. Este contexto mostra a necessidade de pesquisas que melhor elucidem os mecanismos de toxicidade do Diuron.

Já está estabelecido que a disfunção mitocondrial resulta em dano celular, já que essa organela é fundamental na manutenção de processos biológicos (HAYES, 1982). A mitocôndria é indicada como biosensor da toxicidade de xenobióticos, pois alguns deles têm a capacidade de causar disfunções no funcionamento da cadeia transportadora de elétrons e isso pode levar à diminuição na produção de ATP, formação de radicais livres e alterações no mecanismo de regulação de cálcio intracelular. Esses eventos são capazes de induzir abertura do PTPM, um acontecimento que está intimamente relacionado a mecanismos de apoptose e morte celular. (PEREIRA et al. 2012, 2013). O presente estudo procurou documentar os efeitos do Diuron e seus metabólitos sobre mitocôndrias isoladas do fígado de ratos na tentativa de identificar processos bioquímicos envolvidos no mecanismo de citotoxicidade desses compostos.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Este projeto visou estudar *in vitro* os mecanismos de dano induzidos pelo Diuron e seus metabólitos DCA e DCPMU em mitocôndrias hepáticas isoladas de fígado de ratos Wistar.

3.2. Específicos

- Avaliar os efeitos da exposição do Diuron e seus metabólitos sobre a bioenergética de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar.
- Avaliar os efeitos da exposição do Diuron e seus metabólitos sobre o estado redox de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar.
- Avaliar os efeitos da exposição do Diuron e seus metabólitos sobre o inchamento de mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar.

Capítulo 2

Manuscrito

Capítulo 2: Manuscrito¹

De modo a atender às normas do Programa de Pós-Graduação em Patologia, o Capítulo II desta tese é composto por artigo científico a ser publicado na revista Revinter- Sistema de Referência ABNT

1. INTRODUÇÃO

O Diuron [3- (3,4-diclorofenil) -1,1-dimetilureia; CAS no. 330-54-1] é um herbicida derivado da ureia, eficiente no controle de ampla variedade de plantas daninhas infestantes. No estado de São Paulo, por exemplo, é comumente utilizado em plantações de cana de açúcar, café, soja, entre outras culturas. Sua ação herbicida é consequência da sua capacidade de agir como um inibidor eficiente da fotossíntese, bloqueando o local de ligação da plastoquinona ao fotossistema II na membrana tilacóide dos cloroplastos, que inibe a produção de energia e oxigênio fotossintético em plantas e algas, impedindo a transferência de elétrons para esse intermediário (YEBRA et al. 2004). A molécula foi introduzida no mercado em meados da década de 50 e desde então é utilizado como um dos principais herbicidas disponíveis no mercado. Atualmente o Diuron encontra-se como o décimo segundo herbicida mais utilizado no Brasil (ANVISA, 2019; IBAMA, 2019).

Este herbicida se degrada lentamente na água, sendo desta forma persistente no meio ambiente. Sua meia-vida é cerca de cento e quatorze dias na água, fazendo com que o composto original e seus produtos de degradação estejam presentes em águas e solos por longo tempo (APVMA, 2011).

A Agência de Proteção Ambiental norteamericana (USEPA) listou o Diuron como provável cancerígeno humano, baseando-se em estudos que apresentaram tumores uroteliais na bexiga e pelve renal de ratos Wistar após a exposição prolongada ao composto (USEPA, 1997). Embora o modo de ação (MoA) adverso do Diuron sobre o urotélio esteja bem estabelecido, o real mecanismo de dano desse composto ainda é desconhecido (DA ROCHA et al., 2010).

Estudos indicam que os produtos resultantes da degradação hepática do Diuron podem ser mais tóxicos que a própria molécula parental. Neste

contexto, os metabólitos 3,4-dicloroanilina (DCA) e 3-(3,4-diclorofenil)-1-metilureia (DCPMU) têm se mostrado tão tóxico ou mais que a molécula parental, o Diuron (MOHHAMED et al., 2020). DCA induz efeitos negativos nos organismos aquáticos, como alterações morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (SCHEIL et al., 2009; MHADHBI e BEIRAS, 2012).

Após a exposição de Diuron e seus metabólitos, as substâncias se mostraram presentes em urina de ratos Wistar, sendo o metabólito DCPU presente em maior quantidade, seguido pelo DCPMU e DCA. Dentre os efeitos observados no MOA do Diuron, pôde-se observar inchamento de células uroteliais (*swollen cells*) de ratos Wistar machos (DA ROCHA et al., 2013).

A mitocôndria é a principal organela presente no nosso sistema responsável por transformar a energia dos alimentos em energia útil às células, sendo de suma importância para a manutenção das funções celulares. Para isso, a mitocôndria obtém oxigênio e substratos derivados da glicose, ácidos graxos e aminoácidos, promovendo a conversão destes substratos em moléculas de ATP. Naturalmente, isso depende da integridade morfológica e funcional da mitocôndria. Quando xenobióticos agem como inibidores da cadeia respiratória presente na organela, o oxigênio disponível pode sofrer redução incompleta e gerar radicais livres, como o radical superóxido (O_2^-), por meio da reação catalisada de NADH ou pelo ciclo da ubiquinona. Este aumento na produção de superóxido, ou deficiências no sistema antioxidantes, podem gerar estresse oxidativo. Este, na presença de Ferro, produz o radical Hidroxila ($\bullet OH$) via reação de Fenton-Haber-Weiss. Este radical está intimamente ligado a danos oxidativos que podem ser irreversíveis para a manutenção e funcionamento celular. Esses eventos também podem induzir a formação dos poros de transição de permeabilidade (PTP), o que compromete as funções mitocondriais, desencadeando apoptose e inchamento

mitocondrial (BOELSTERLI, 2002; LI et al., 2012; MURPHY, 2001; DORTA, 2013; PEREIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2012).

O Diuron é persistente no ambiente e potencialmente tóxico, porém, a legislação brasileira não prevê a monitoração desse herbicida nos compartimentos ambientais do país. No entanto, seu uso considerável na agricultura, associado aos seus efeitos nocivos em mamíferos, em particular para o urotélio de ratos, mostram a necessidade do desenvolvimento de pesquisas que melhor elucidem os mecanismos de sua toxicidade e eventual relevância desta toxicidade para a espécie humana (DA ROCHA et al, 2013). Está estabelecido que disfunção mitocondrial pode resultar em dano celular, já que essa organela é fundamental para a manutenção de processos biológicos (PEREIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2012). Dessa forma, a mitocôndria isolada foi utilizada para esclarecer os processos bioquímicos envolvidos no mecanismo de toxicidade do Diuron. Essa organela complexa e altamente regulada é essencial para a manutenção de processos biológicos como sobrevivência e homeostase metabólica e, portanto, a interação de substâncias potencialmente tóxicas em diversos pontos deste sistema pode resultar em disfunção mitocondrial e consequente toxicidade (BOELSTERLI, 2002).

Com o intuito de elucidar a toxicodinâmica do Diuron e seus metabólitos foram utilizadas mitocôndrias isoladas de fígado de ratos Wistar machos saudáveis, uma vez que o fígado é um órgão central de biotransformação de substâncias exógenas e endógenas (KNASMULLER et al., 1998).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas soluções padrões do herbicida Diuron (CAS: 330-54-1, pureza $\geq 98\%$) e de seus metabólitos 3-4-dicloroanilina (DCA) (CAS: 95-76-1, pureza 98%) e N-(3,4-diclorofenil)-3-metilurea (DCPMU) (CAS: 3567-62-2, 98%) (Sigma-Aldrich, USA). Foi utilizado o solvente DMSO em diferentes soluções para manter a mesma quantidade de solvente nos experimentos. As doses utilizadas foram entre 0,5 a 500 $\mu\text{mol/L}$ em escala logarítmica, uma faixa de concentrações que compreende as concentrações que induziram danos, de acordo com a literatura e resultados prévios do Toxicam para estes compostos (FIELD et al., 2003; DA ROCHA et al., 2013). A exposição das mitocôndrias isoladas ao Diuron e seus metabólitos foi realizada *in vitro*.

2.1. Animais experimentais

Foram utilizados 52 ratos Wistar jovens (Comissão Ética no Uso de Animais- CEUA nº 1288/2019, Anexo 1) pesando aproximadamente 180g, adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp/Campinas, SP. Os animais foram mantidos sob condições controladas no Biotério do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Campus de Rubião Jr., com temperatura (21 ± 3 °C) e umidade relativa do ar ($50 \pm 20\%$) constantes, quatro ciclos de exaustão de ar diário e período de 12/12 horas claro/escuro. Água e ração basal foram fornecidas *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados por decapitação.

2.2. Isolamento mitocondrial

As mitocôndrias hepáticas foram isoladas por centrifugação diferencial. Após a eutanásia dos animais, o fígado foi imediatamente removido, picotado em 50 mL de meio contendo sacarose 250 mmol/L, EGTA 1 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, a 4 °C, e homogeneizado três vezes por 15 segundos com intervalos de 1 minuto em

homogeneizador Potter-Elvehjen. A suspensão foi centrifugada a 770 *g* por 5 minutos e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 9.800 *g* por 10 minutos.

O sedimento foi ressuspenso com 10 mL de meio contendo sacarose 250 mmol/L, EGTA 0,3 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, e centrifugado a 4.500 *g* por 15 minutos. O sedimento mitocondrial final foi suspenso com 1 mL de meio contendo sacarose 250 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,2, e utilizado dentro de um período de 3 horas (PEDERSEN *et al.*, 1978; LIN *et al.*, 2000; YEN *et al.*, 1989; FREZZA, CIPOLAT, SCORRANO, 2007). A proteína mitocondrial foi determinada pela reação de biureto (PEDERSEN *et al.*, 1978; CAIN e SKILLETER, 1987).

2.3. Respiração mitocondrial

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias energizadas pela adição de succinato de potássio (5 μ mol/L) ou por glutamato e malato (5 μ mol/L) foi monitorado polarograficamente em um oxígrafo equipado com eletrodo tipo Clark (Modelo Hansatech Oxygraph⁺) (CHANCE e WILLIANS, 1956). As mitocôndrias (1 mg de proteína) foram incubadas em 1,0 mL do meio padrão de respiração contendo Sacarose 250 mmol/L, Cloreto de Potássio 65 mmol/L, Hepes KOH 10 mmol/L, Fosfato de Potássio dibásico (K₂HPO₄) e EGTA 0,3 mmol/L. A respiração de estado III foi iniciada com 400 nmoles de ADP (CAIN e SKILLETER, 1987).

2.4. Potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado espectrofluorimetricamente (Synergy HTX, Biotek) monitorando-se as alterações na fluorescência da safranina-O, um corante catiônico fluorescente que se distribui eletroforicamente na matriz mitocondrial em resposta à carga negativa da membrana interna (LEMASTERS *et al.*, 1987). Foram utilizados como comprimentos de onda de excitação 495 nm e de emissão 586 nm. As mitocôndrias (1 mg de proteína) foram incubadas no meio de reação padrão contendo Sacarose, Cloreto de Potássio (KCl) 130 mM e Hepes KOH 10mM acrescido de safranina-O 10 μ mol/L, em volume final de 2 mL e

energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol/L (+ rotenona 2,5 µmol/L). A diminuição do potencial de membrana observada pelo influxo eletrogênico do cátion correlaciona-se linearmente com o aumento da intensidade de fluorescência do corante na medida em que ele é liberado das mitocôndrias (ÅKERMAN e WIKSTRÖM, 1976; EMAUS et al., 1986).

2.5. Inchamento mitocondrial

O inchamento mitocondrial foi monitorado pela diminuição da absorbância aparente da suspensão de mitocôndrias (0,6 mg proteína/mL), incubadas em 1,5 mL do meio padrão, em 540 nm, usando-se um espectrofotômetro (Shimadzu CPS- 240A). O inchamento mitocondrial foi acompanhado de diminuição na turbidez da suspensão e, portanto, de diminuição proporcional na absorbância (LEMASTERS et al., 1987). Uma vez que foi observado inchamento mitocondrial, foi avaliado o efeito das substâncias frente aos moduladores do inchamento mitocondrial: Ciclosporina A (3 µmol/L), Vermelho de Rutênio (0,5 µmol/L e 3 µmol/L), N- Etil- Maleimida (NEM) (15 µmol/L) e N-acetil-cisteína (NAC) (12 µmol/L). Os moduladores foram acrescidos no meio de reação contendo Sacarose 250 mmol/L, Cloreto de Potássio (KCl) 65 mmol/L e Hepes KOH 10 mmol/L, Succinato 5 mmol/L, Rotenona 2,5 µmol/L e Cloreto de Cálcio 10 µmol/L previamente à exposição das mitocôndrias aos compostos. A avaliação do inchamento foi realizada em espectrofotômetro modelo Shimadzu CPS- 240A.

2.6. Lipoperoxidação de membrana

A suspensão mitocondrial (1mg de proteína/ mL) foi incubada com 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% (m/v) (preparado em NaOH 50 mmol/L), 0,1 mL de NaOH 10 mmol/L e 0,5 mL de ácido fosfórico 20% (m/v), durante 20 minutos, a 85 °C. O complexo malondialdeído-ácido

tiobarbitúrico (MDA-TBA) foi extraído com 2 mL de N-butanol e a absorvância determinada em 535 nm. A concentração de MDA, em nmoles/mg de proteína, foi calculada a partir de um $\varepsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BUEGE e AUST, 1978).

2.7. Níveis mitocondriais de grupos sulfidril de proteínas de membrana

A suspensão mitocondrial (1mg de proteína/ mL) foi tratada com ácido perclórico (concentração final de 5%) e centrifugada a 3400 g por 10 minutos.

O sedimento foi suspenso com 0,2 mL de Triton X-100 10% (p/v) e acrescido de 1 mL do meio contendo TRIS 500 mmol/L, pH 7,6. A quantidade de grupos sulfidril de proteínas foi calculada a partir de $\varepsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, usando-se a diferença na absorvância determinada em 412 nm, antes e 5 minutos após a adição de DTNB 0,2 mmol/L. (JOCELYN, 1987). O ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) reage rapidamente com grupamentos sulfidril, formando dissulfetos mistos e o ânion *p*-nitrotiofenol, que apresentam coloração amarela, com intensidade proporcional à quantidade de grupos sulfidril (HAUGAARD, 2000).

2.8. Monitoramento da formação de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERON)

A geração de ERON foi monitorada espectrofluorimetricamente (Synergy HTX, Biotek) utilizando a sonda fluorescente H₂DCFDA nos comprimentos de onda de 503 nm para excitação e 529 nm para emissão. As mitocôndrias (1,0 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio padrão de reação contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L, pH 7,2 acrescidos de Rotenona 2,5 $\mu\text{mol/L}$ e H₂DCFDA 2 $\mu\text{mol/L}$ e energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol/L. Foi realizado controle negativo (basal – sem adição dos compostos) e positivo induzido por *t*-butilhidroperóxido 300 $\mu\text{mol/L}$. O DCFDA é uma molécula que após atravessar as membranas biológicas é hidrolisado por esterases, liberando o

composto não fluorescente DCFH. Porém, este em presença de ERON é rapidamente oxidado e transformado em DCF que apresenta alto rendimento de fluorescência quando excitado em 503 nm. Sendo assim, o aumento da fluorescência é diretamente proporcional à produção de ERON pelas mitocôndrias (AMES, 1983).

2.9. Avaliação do Estado Redox dos Nucleotídeos de Piridina

O estado redox dos nucleotídeos de piridina foi monitorado fluorimetricamente utilizando o equipamento Synergy HTX Biotek para excitação 366 nm e 450nm para emissão. As mitocôndrias (1,0 mg de proteína/mL) foram incubadas em meio padrão de reação contendo Sacarose 125 mmol/L, KCl 65 mmol/L, Hepes-KOH 10 mmol/L acrescido de rotenona 2,5 μ mol/L e energizadas pela adição de succinato de potássio 5 mmol/L. Foi realizado controle negativo (basal – sem adição dos compostos) e positivo induzido por *t*-butilhidroperóxido 300 μ mol/L (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Os nucleotídeos de piridina reduzidos (NAD(P)H) são fluorescentes, enquanto que os nucleotídeos de piridina oxidados (NAD(P)⁺) não o são. Assim, alterações na intensidade de fluorescência refletem mudanças no estado redox dos nucleotídeos de piridina.

2.10. Análise estatística

Os resultados foram analisados através do Programa GraphPad Prism, versão 5.0 para Windows, GraphPad Software (San Diego, CA, USA). A significância estatística dos dados experimentais foi analisada pela análise da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett para comparação entre os vários grupos tratados e o controle. Os resultados com valor de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos em relação ao controle negativo.

4. DISCUSSÃO

A utilização do Diuron na agricultura e sua lenta degradação no solo possibilita sua dispersão para o solo e lençóis freáticos, levando a contaminações aquáticas e terrestres. As características físico-químicas e microbiológicas do solo, e as propriedades físico-químicas do praguicida, influenciam sua degradação no ambiente, que resulta em metabólitos potencialmente tóxicos para os seres humanos: 3-(3,4-diclorofenil)-1-metilureia (DCPMU), 3,4-diclorofenilureia (DCPU) e 3,4-dicloroanilina (DCA) (FIELD ET AL., 2003 GATIDOU, THOMASIDIS, 2007).

Inúmeras substâncias químicas utilizadas na agricultura (praguicidas) são suspeitas de serem potenciais mutagênicos, cancerígenos e toxicantes mitocondriais (mitotóxicos) (MOHAMMED et al., 2020). Embora os praguicidas tenham alvos específicos, todos os possíveis efeitos adversos em seres humanos e em outras espécies animais ainda não foram devidamente caracterizados, devendo ser estudados para realizar a avaliação adequada do seu risco (IARC, 1991).

Segundo JAESCHKE et al. (2002), o fígado é o principal local de biotransformação de substâncias químicas e, portanto, é um importante alvo em que drogas e xenobióticos exercem seus efeitos adversos. Somado a isso, a disfunção mitocondrial é um mecanismo de suma importância na patogênese de muitos toxicantes em mamíferos, associada principalmente à toxicidade hepática (AMACHER, 2005).

Os estudos aqui apresentados foram realizados para elucidar o eventual potencial toxicológico das interações do Diuron e seus metabólitos, DCA e DCPMU, com as mitocôndrias hepáticas isoladas de rato Wistar, que constituem um clássico modelo experimental para estudos sobre alterações bioenergéticas mitocondriais provocadas por agentes tóxicos (PEREIRA et al., 2012).

Segundo DA ROCHA et al. (2013) gerou-se a hipótese de que o mecanismo de ação para carcinogenicidade urotelial de Diuron em altas doses em ratos envolve biotransformação metabólica do composto para metabólitos tóxicos, principalmente DCPU, que são excretados e concentrados na urina, levando à citotoxicidade, começando com degeneração, necrose e esfoliação das células uroteliais seguidas por proliferação celular regenerativa sustentada, levando a hiperplasia e eventualmente tumores. Nossos achados mostram que além do urotélio, o fígado pode também sofrer com o efeito tóxico de Diuron e seus metabólitos, que foram capazes de alterar *in vitro* parâmetros da função mitocondrial. Particularmente, o metabólito DCA, na maior concentração testada (500 $\mu\text{mol/L}$), gerou inchamento mitocondrial, um indicador de comprometimento morfofuncional grave da organela (PEREIRA et al., 2012).

A transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) pode ser regulada através de inibidores que impedem a formação de PTPs (Poros de transição de permeabilidade). A substância imunossupressora Ciclosporina A (CsA) se liga ao Cyp D, bloqueando sua ligação com o ANT. Vários estudos também relataram que a abertura do PTP é melhorada quando há depleção dos nucleotídeos de adenina, que se ligam ao ANT e, de forma contrária, a adição de ATP ou ADP é capaz de inibir a formação de poros (HALESTRAP, 2006). Ainda, uma vez que o potencial de membrana pode induzir a TPM, a presença de reagentes de grupos tióis, como o N-etilmaleimida (NEM), eleva o potencial aparente a valores de voltagem mais negativos, diminuindo a probabilidade de abertura do poro (PETRONILLI *et al.*, 1994; PESTANA, 2010). Por fim, a elevada concentração de Ca^{+2} na matriz mitocondrial também pode desencadear o processo de abertura do poro de transição de permeabilidade. O consumo de cálcio para a matriz é alcançado por um uniporter sensível ao Vermelho de Rutênio (RR) (BERNARDI e RASOLA, 2007).

Neste estudo ficou evidente que o Diuron e o DCPMU não possuem habilidade em causar o inchamento mitocondrial nas doses testadas, mas, por outro lado, o DCA, na sua maior concentração de 500 $\mu\text{mol/L}$, causou inchamento mitocondrial. Este fenômeno compreende genericamente uma série de fenômenos, que podem ser quantificados como alterações da absorção de luz com o uso de espectrofotômetros. Na concentração de 500 $\mu\text{mol/L}$ o modulador clássico Ciclosporina A (CsA), um imunossupressor que se liga a proteína ciclofilina D, um componente essencial do agregado proteico que forma o PTPM, prevenindo sua abertura, foi possível observar que o CsA preveniu o inchamento mitocondrial deixando o PTPM fechado impedindo seu inchamento. Já a acentuada transição de permeabilidade observada com exposição ao DCA aparentemente corresponde ao mecanismo clássico de indução, uma vez que a adição de ciclosporina A ao meio reacional previne parcialmente este efeito, porém, em nosso estudo, outros moduladores testados nessa concentração não conseguiram impedir o inchamento da organela. O processo não foi inibido em iguais proporções de Vermelho de Rutênio, NEM e NAC, moduladores potenciais da TPM (HE e LEMASTERS, 2002).

O Diuron e seus metabólitos alteraram a respiração mitocondrial. As maiores concentrações utilizadas (100 e 500 $\mu\text{mol/L}$) apresentam efeito desacoplador dos compostos, visto que as mitocôndrias apresentam dificuldade de retornarem ao estado basal quando comparadas ao controle negativo, após a fosforilação do ADP adicionado no ensaio. Esses resultados estão de acordo com os achados de Diablo e colaboradores em 1974 que também demonstraram o efeito desacoplador do Diuron. Durante o metabolismo mitocondrial, espécies reativas de oxigênio são formadas pelos complexos I e III da cadeia respiratória, especialmente o ânion superóxido (O_2^-), a H_2O_2 , e radical $\text{OH}^\cdot$. Em condições de estresse oxidativo causados por xenobióticos e toxicantes, a geração de O_2^- e, conseqüentemente, o acúmulo de H_2O_2 , podem estar aumentados em mitocôndrias formando, por

meio da reação de Fenton-Haber-Weiss, radicais $\text{OH}\cdot$ que atacam lipídios de membrana dando início ao processo de lipoperoxidação (HALLIWELL;

GUTTERIDGE, 1999). Nossos resultados demonstraram que Diuron e o DCPMU não foram capazes de estimular a produção destas espécies. Por outro lado, o DCA na sua maior concentração causou a produção de espécies reativas de oxigênio. Contudo, quando analisados em conjunto, nossos resultados mostram que mesmo a indução de ERONs pelo DCA 500 $\mu\text{mol/L}$, não foi suficiente para disparar um efeito cascata de estresse oxidativo na organela.

A formação de espécies reativas de oxigênio é aumentada quando os níveis de ADP estão reduzidos e o potencial de membrana está aumentado, condição que reflete o estado 4 da respiração. No estado 3, quando o potencial de membrana está diminuído, mas os níveis de ADP estão altos, ocorre diminuição da formação de radicais livres oriundos da cadeia transportadora de elétrons (TURUNEN; OLSSON; DALLNER, 2004). Por outro lado, a diminuição do potencial de membrana mitocondrial devido ao desacoplamento inibe a geração de radicais livres de oxigênio através da cadeia respiratória (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001). O Diuron e seus metabólitos exerceram ação desacopladora da fosforilação oxidativa, nas maiores concentrações testadas e isso foi evidenciada pela dissipação do potencial de membrana e do consumo de oxigênio basal nessas concentrações.

O presente estudo mostrou que o dano mitocondrial do Diuron não envolve a indução de peroxidação e lipoperoxidação lipídica no estado redox mitocondrial. O NAD(P)H quando monitorado em meio reacional, não sofreu oxidação mensurável após exposição das mitocôndrias pelas substâncias testadas, fortalecendo a hipótese que Diuron e seus metabólitos não provocam alterações no estado redox mitocondrial. Este é um evento benéfico para a célula, pois os nucleotídeos de piridina são extensivamente armazenados no interior da mitocôndria, onde são envolvidos em diferentes funções relacionadas ao metabolismo energético e sinalização celular. A liberação de NAD⁺ pelas organelas pode iniciar e até mesmo amplificar eventos

patológicos e fisiológicos (DI LISA e ZIEGLER, 2001). Desta forma, a ausência de efeitos oxidantes do conteúdo de NAD(P)H, associada à preservação dos grupamentos tiólicos de proteínas em seu estado reduzido e a não presença de lipoperoxidação, suportam a hipótese que Diuron e seus metabólitos não interferem com eventos associados ao estresse oxidativo. A ausência de participação ativa de estresse oxidativo no mecanismo de toxicidade dos compostos é sustentada pelo ensaio onde verificamos a oxidação dos nucleotídeos de piridina (NAD(P)H mitocondriais).

Tais observações, no entanto, não são demonstrativas de que estes compostos não induzam outras alterações mitocondriais. De fato, nossos resultados sugerem possível alteração na estrutura mitocondrial e deficiência na manutenção do potencial de membrana.

O Diuron e seus metabólitos testados apresentaram ação desacopladora da fosforilação oxidativa, evidenciada pela dissipação do potencial de membrana mitocondrial e do consumo de oxigênio basal. Embora esses compostos tenham apresentado efeito desacoplador na fosforilação oxidativa, nossas análises demonstraram que eles foram incapazes de induzir ERONs em Diuron e em DCPMU.

O monitoramento do estado redox mitocondrial é um indicativo importante de toxicidade de compostos, pois a formação de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio (ERONs) e o consequente ataque dos mesmos aos componentes mitocondriais bem como à membrana mitocondrial podem promover a formação de Poros de Transição de Permeabilidade Mitocondrial (PTPM) o que pode levar à morte celular.

As patologias associadas às doenças mitocondriais destacam a importância da função mitocondrial para a saúde. Os efeitos mitocondriais demonstrados por inúmeros toxicantes, levam à preocupação de que as mitocôndrias atuam como um alvo importante para muitos tóxicos ambientais, por meio de diferentes mecanismos de toxicidade. A possibilidade de que contaminantes ambientais podem atingir as

mitocôndrias já foi observada anteriormente, por exemplo o Paraquat parece agir em grande parte por ciclos redox de uma forma análoga à adriamicina (MARTINEZ E GREENAMYRE, 2012 ;SHAUGHNESSY ET AL., 2010).

É válido observar que as exposições provavelmente afetam outros alvos além das mitocôndrias e, em alguns casos, os efeitos mitocondriais podem ser secundários a efeitos em outros lugares. Embora muitos desses produtos químicos causem outros efeitos além da toxicidade mitocondrial, a importância dos efeitos mitocondriais é, em alguns casos, sustentada pelo fato de que há sobreposição nas patologias observadas após exposições e doenças mitocondriais. Por exemplo, a rotenona, paraquat e manganês estão todos associados à doença de Parkinson ou sintomas relacionados (CANNON E GREENAMYRE, 2011; TANNER ET AL., 2011).

5. CONCLUSÃO

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

6. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- NINOMIYA-TSUJI J. (2008). Mitochondrial dysfunction. In Molecular and Biochemical Toxicology. 4th ed. (SmartR. C.Hodgson R., Eds.), pp. 319–332. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2008.
- NI HM, Williams JA, Ding WX. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. Redox Biol. Elsevier; 2015; 4:6–13, 2015.
- NICHOLLS DG, Ferguson SJ. Bioenergetics 2. Academic Press Inc.: London, 1982.
- PEDRAJAS, JR, Peinado, J., Lopez-Barea, J., 1995. Estresse oxidativo em peixes expostos a xenobióticos modelo: formas oxidadas modificadas de Cu, Zn-superóxido dismutase como biomarcadores em potencial. Chem-Biol.Interagir. 98, 267-282, 1995.
- PEDRAJAS, JR, Gavilanes, F., Lopez-Barea, J., et al., 1998. Incubação da superóxido dismutase com malondialdeído e 4-hidroxi-2-o nonenal forma novas isoformas e adutos ativos. Uma avaliação de xenobióticos em peixes. Chem. Biol. Interagir. 116, 1-17, 1998.
- PEDERSEN, P.L.; GREENAWALT, J.W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G.L.; SOPER, J.W.; BUSTAMENTE, E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. Methods Cell. Biol., v. 20, p.411- 481, 1978.
- PEREIRA LC, de Souza AO, Dorta DJ. Polybrominated Diphenyl Ether Congener (BDE-100) induces mitochondrial impairment, Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2013; 112: 418-424,2013.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO 1

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Criação através da Portaria DSM nº 811 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1288/2019-CEUA

Certificamos que a proposta intitulada: **"Mecanismos de danos mitocondriais induzidos pelo diuron e seus metabólitos em mitocôndrias hepáticas"**, conduzida pela Pesquisadora: **Danielle Gabriel Seloto**, sob orientação da Profa. Lillian Cristina Pereira, registrada com o nº 1288/2019, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – 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 de 28 de março de 2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	28/02/2021
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	81
Idade/Peso	4 semanas – 180 gramas
Sexo	Macho
Origem	Biotério CENIB - Unicamp



Lucileia Stocco Gotthardt
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP



Prof. Adjunto Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Diário Rubião Junior, s/mo – Botucatu – S. P. CEP: 18-618-970 Fones: (14) 3880-1608 e 3880-1609 E-mail Secretária: ceua@fmb.unesp.br