

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA IMUNOTOXICIDADE DE AGROTÓXICOS EM LINHAGENS
MONOCÍTICAS**

LARISSA VIVAN CESTONARO

PORTO ALEGRE, 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DA IMUNOTOXICIDADE DE AGROTÓXICOS EM LINHAGENS
MONOCÍTICAS

Tese apresentada por **Larissa Vivan Cestonaro** como pré-requisito para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo

PORTO ALEGRE, 2022

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e avaliada pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Diogo Andre Pilger (Banca Suplente)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Eliane Dallegrave (Banca Suplente)
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Prof. Dr. Flávio Manoel Rodrigues Da Silva Júnior
Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Profa. Dra. Ivana Grivicich
Universidade Luterana do Brasil-Canoas (ULBRA)

CIP - Catalogação na Publicação

Vivan Cestonaro, Larissa
Avaliação da imunotoxicidade de agrotóxicos em
linhagens monocíticas / Larissa Vivan Cestonaro. --
2022.
170 f.
Orientador: Marcelo Dutra Arbo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2022.

1. Agrotóxicos. 2. Imunotoxicidade. 3.
Interleucina-8. 4. Fator de necrose tumoral. 5.
Mitocôndrias. I. Dutra Arbo, Marcelo, orient. II.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho. À FAPERGS (ARD/FAPERGS Nº 19/2551 - 0001318-3) que disponibilizou os recursos financeiros necessários para a execução deste trabalho; ao PPGCF; ao Laboratório de Toxicologia (LATOX) da Faculdade de Farmácia desta Universidade, que disponibilizou equipamentos e materiais necessários para a realização das análises laboratoriais na elaboração da presente tese.

“É justo que muito custe o que muito vale.”
(Santa Tereza D’Ávila)

AGRADECIMENTOS

“Deus, dá-me sabedoria para enfrentar os momentos difíceis, paciência para esperar os teus planos e discernimento para escolher sempre o caminho do bem”.

Obrigada Deus, por sempre me atender.

Ao professor Dr. Marcelo Dutra Arbo, pela orientação desde o mestrado e contribuição para o meu amadurecimento.

À professora Dra. Marize Campos Valadares, por me receber em seu laboratório, na Universidade Federal de Goiás, durante a realização das missões de pesquisa no meu doutorado. Período de grande crescimento e amadurecimento pessoal e profissional.

À minha mãe, Carmivera Vivan, por sempre me apoiar, por me ensinar a lutar pelos meus objetivos. És minha maior incentivadora, o meu chão, minha base e meu porto seguro. Obrigada por acreditar no meu potencial quando eu mesma apresentava dúvidas. Sem você nada seria possível para que eu estivesse onde estou hoje, esse diploma é para você. Te amo, mãe!

Aos meus avós, Clair Luiz Vivan e Evôni Terezinha Ferreira Vivan que, com muito carinho e amor, sempre apoiaram e motivaram os meus estudos. Serei eternamente grata por serem tão presentes em minha vida. Se esta etapa foi concluída com êxito é porque eu tive o apoio de pessoas incríveis. Vocês fazem parte desta conquista!

Ao Francisco Benvegnú Trojan, meu namorado. Obrigada pelo apoio incondicional, amor e compreensão durante a elaboração deste trabalho. Te amo.

Aos meus amigos que estiveram sempre presentes, independente da distância física, por tornarem tudo mais leve, por todas as palavras de incentivo e força. Obrigada por terem sido presença, quando por vezes, todos são tão ausentes.

Às minhas colegas de laboratório, Aline Mocellin Conte, Fernanda Mocellin Conte e Yasmin Vendruscolo Piton. Obrigada pelos momentos de apoio, ensinamentos e descontração na nossa rotina, por vezes, cansativa. Serei eternamente grata por tê-las comigo durante essa caminhada.

A todos os integrantes do Laboratório de Ensino e Pesquisa em

Toxicologia In Vitro (Tox In) da Universidade Federal de Goiás. Quero deixar meu agradecimento por terem me recebido de braços abertos e proporcionarem dias de aprendizagem muito ricos, o auxílio de vocês foi essencial para realização dos meus experimentos.

Aos professores doutores por aceitarem o convite para compor a banca de avaliação desse trabalho.

Aos professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), agradeço pelo conhecimento compartilhado e amizade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, especialmente à Faculdade de Farmácia, pela estrutura oferecida para que isso fosse possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realizar o meu doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida durante a realização do doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), que disponibilizou os recursos financeiros necessários para a execução deste trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para que eu concluísse essa importante etapa da minha carreira acadêmica. Muito obrigada!

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de encarte para publicações e está organizada em seções dispostas da seguinte maneira: Parte I: Introdução e Objetivos; Parte II: Manuscritos 1, 2, 3 e 4; Parte III: Discussão, Conclusão, Referências Bibliográficas e Anexos.

A **Introdução** apresenta o embasamento teórico que nos levou ao desenvolvimento desta proposta de trabalho. Nos **Objetivos** constam os principais questionamentos do trabalho realizado.

Os **Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão** e as **Referências específicas** encontram-se no corpo de cada manuscrito, apresentados na forma de **Capítulo I, Capítulo II, Capítulo III e Capítulo IV**.

A seção **Discussão** contém uma interpretação geral dos resultados obtidos e que estão descritos nos capítulos.

A seção **Conclusões** aborda as conclusões gerais dos principais resultados da tese.

A seção **Referências Bibliográficas** lista a bibliografia utilizada nas seções Introdução e Discussão da tese.

RESUMO

Agrotóxicos são usados para o controle e prevenção de pragas durante o cultivo e após a colheita, melhorando a produtividade e a qualidade da produção agrícola. Estes compostos podem apresentar propriedades imunotóxicas e risco potencial para a saúde humana devido à exposição por meio de alimentos, água potável, meio ambiente e local de trabalho. Os distúrbios do sistema imunológico destacam-se por estarem intimamente ligados a múltiplos órgãos, incluindo os sistemas nervoso, endócrino, reprodutivo, cardiovascular e respiratório, levando a mudanças transitórias ou permanentes. Considerando a relevância dos agrotóxicos em nosso meio e o objetivo de aumentar a produtividade das culturas, se faz necessário elucidar os efeitos ainda não descritos ou bem compreendidos sobre a imunidade inata e adaptativa (celular e humoral), uma vez que estes agrotóxicos estão disponíveis no mercado são largamente utilizados. Também, ao considerar que os testes de imunotoxicidade não estão dentro dos novos *endpoints* exigidos para liberação de agrotóxicos publicado na nova RDC nº 294 da ANVISA, se faz necessário investigar efeitos até então não observados e, talvez, úteis em uma potencial reavaliação. Portanto, o presente estudo objetivou avaliar a potencial imunotóxico dos agrotóxicos clomazona, glifosato, imidacloprido e sulfentrazone em duas linhagens celulares (RAW 264.7 e THP-1). Foram revisados estudos durante os últimos dez anos sobre os mecanismos envolvidos na imunotoxicidade de fungicidas, herbicidas e inseticidas em células, animais e humanos (manuscrito I). Os mecanismos envolvidos na imunotoxicidade destas três classes analisadas estão relacionados a alterações em células imunes inatas e adaptativas, na resposta imune celular e humoral, bem como na alteração do sistema imunológico por vários mecanismos, como fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. O segundo manuscrito apresenta resultados da avaliação *in vitro* do efeito imunotóxico do imidacloprido utilizando macrófagos murinos RAW 264.7 após tempos de incubação curtos (24h) e longos (96h). Os resultados mostraram evidências do potencial efeito imunomodulador na resposta inflamatória associados à exposição crônica ao imidacloprido, indicando as mitocôndrias como reguladoras da resposta

imune inata por meio de diferentes mecanismos. O manuscrito 3 investigou a toxicidade dos três herbicidas comerciais (clomazona, glifosato e sulfentrazone) usando células THP-1 após 24 h de incubação para elucidar o papel de alguns mecanismos de toxicidade. O estresse oxidativo se mostrou como uma importante via de toxicidade do herbicida sulfentrazone. Além disso, foi observado que o herbicida clomazona apresentou uma despolarização mitocondrial, enquanto a sulfentrazone causou hiperpolarização após 24 h de incubação, trazendo novamente as mitocôndrias como um importante alvo de citotoxicidade mediada por herbicidas. Ademais, nossos resultados demonstraram que os níveis da citocina pró-inflamatória IL-8 foram significativamente aumentados em células THP-1 incubadas com glifosato após 24 h de exposição, evidenciando o efeito do glifosato como poderoso agente de imunotoxicidade celular. O quarto manuscrito por sua vez, traz dados da imunotoxicidade celular dos herbicidas clomazona, glifosato e sulfentrazone após 96 h de incubação utilizando como modelo *in vitro* células de macrófagos murinos RAW 264.7. Foi observado um aumento de radicais livres após incubação com os herbicidas clomazona e sulfentrazone em células RAW 264.7. A incubação com os herbicidas foi novamente relacionada com os efeitos imunotóxicos, demonstrada pela resposta inadequada das células RAW 264.7 após estimulação inflamatória. Novamente, foi observado que estes compostos afetam a função mitocondrial, despolarizando a mitocôndria após incubação com os agrotóxicos testados. Foi verificado também, alterações nos níveis de TNF após a exposição aos herbicidas clomazona, glifosato e sulfentrazone em células RAW 264.7. Nossos resultados sugerem que os agrotóxicos imidacloprido, clomazona, glifosato e sulfentrazone induzem alterações no sistema imunológico por vários mecanismos, como fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios e adicionalmente, evidenciamos que a mitocôndria é um dos alvos intracelulares do inseticida, bem como dos herbicidas aqui testados.

Palavras-chave: agrotóxicos; imunotoxicidade; interleucina 8; fator de necrose tumoral; mitocôndria.

ABSTRACT

Evaluation of the immunotoxicity of pesticides in monocytic lineages

Pesticides are used to control and prevent pests during cultivation and after harvest, improving productivity and the quality of agricultural production. These compounds may have immunotoxic properties and a potential risk to human health due to exposure to food, drinking water, the environment, and the workplace. Immune system disorders are closely linked to multiple organs, including the nervous, endocrine, reproductive, cardiovascular, and respiratory systems, leading to transient or permanent changes. Considering the relevance of pesticides in our environment and the objective of increasing crop productivity is necessary to elucidate the effects yet to be described or well understood since these pesticides available on the market are being used, it is necessary to elucidate the effects not yet described or well understood on innate and adaptive immunity (cellular and humoral) since these pesticides available on the market are being used. They also considered that immunotoxicity tests are not within the new endpoints required for pesticide release published in ANVISA's new RDC No. Therefore, the present study aimed to evaluate the immunotoxic potential of the pesticides clomazone, glyphosate, imidacloprid, and sulfentrazone in two cell lines (RAW 264.7 and THP-1). Studies were reviewed during the last ten years on the mechanisms involved in the immunotoxicity of fungicides, herbicides, and insecticides in cells, animals, and humans (manuscript I). The mechanisms involved in the immunotoxicity of these three analyzed classes are related to changes in innate and adaptive immune cells, in the cellular and humoral immune response, and the alteration of the immune system by various mechanisms, such as pro-inflammatory and anti-inflammatory factors. The second manuscript presents the in vitro evaluation of the immunotoxic effect of imidacloprid using RAW 264.7 murine macrophages after short (24h) and long (96h) incubation times. The results showed evidence of the potential immunomodulatory effect on the inflammatory response associated with chronic exposure to imidacloprid, indicating mitochondria as regulators of the innate immune response through different

mechanisms. Manuscript 3 investigated the toxicity of three commercial herbicides (clomazone, glyphosate, and sulfentrazone) using THP-1 cells after 24 h of incubation to elucidate the role of some toxicity mechanisms. Oxidative stress proved to be an essential pathway of toxicity of the herbicide sulfentrazone. Furthermore, it was observed that the herbicide clomazone showed mitochondrial depolarization, while sulfentrazone caused hyperpolarization after 24 h of incubation, bringing mitochondria back as an essential target of herbicide-mediated cytotoxicity. Furthermore, our results demonstrated that the levels of the pro-inflammatory cytokine IL-8 were significantly increased in THP-1 cells incubated with glyphosate after 24 h of exposure, evidencing the effect of glyphosate as a powerful agent of cellular immunotoxicity. The fourth manuscript, in turn, presents data on the cellular immunotoxicity of the herbicides clomazone, glyphosate, and sulfentrazone after 96 h of incubation using RAW 264.7 murine macrophage cells as an in vitro model. An increase in free radicals was observed after incubation with the herbicides clomazone and sulfentrazone in RAW 264.7 cells. Incubation with the herbicides was again related to immunotoxic effects, demonstrated by the inadequate response of RAW 264.7 cells after inflammatory stimulation. Again, these compounds were observed to affect mitochondrial function, depolarizing the mitochondria after incubation with the tested pesticides. Changes in TNF levels were also verified after exposure to the herbicides clomazone, glyphosate, and sulfentrazone in RAW 264.7 cells. Our results suggest that the pesticides imidacloprid, clomazone, glyphosate, and sulfentrazone induce alterations in the immune system by several mechanisms, such as pro-inflammatory and anti-inflammatory factors and, additionally, we show that mitochondria are one of the intracellular targets of the insecticide, as well as of the herbicides here tested.

Keywords: pesticides; immunotoxicity; interleukin 8; tumor necrosis factor; mitochondria.

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I

Table 1. Effects of fungicides in vivo and <i>in vitro</i>	44
Table 2. Effects of herbicides vivo and <i>in vitro</i>	47
Table 3. Effects of insecticides in vivo and <i>in vitro</i>	50

MANUSCRITO II

Table 1. EC ₅₀ values of the imidacloprid after 24 and 96 h of incubation in RAW 264.7 cells.....	93
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

MANUSCRITO III

Table 1. EC ₅₀ values data obtained by the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay after 24 h of incubation in THP-1 cells.....	114
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

MANUSCRITO IV

Table 1. EC ₅₀ data from the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and 3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride (neutral red - NR) assay after 96 h of incubation in RAW 264.7 cells.....	142
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

LISTA DE FIGURAS

MANUSCRITO I

- Figure 1.** Flow chart of strategic literature search.....**43**
- Figure 2.** Summary of mechanisms involving cellular and humoral immunity of fungicides, herbicides and insecticides.....**55**

MANUSCRITO II

- Figure 1.** Chemical structure of imidacloprid (PubChem [s.d.].....**88**
- Figure 2.** Cytotoxicity of IMI in RAW 264.7 cells, assessed by the reduction of MTT after 24h and 96h of incubation at 37 °C. The data are presented as a percentage of cell death to the negative control. Three independent experiments were carried out (quadruplicates tested for each concentration within each experiment).....**88**
- Figure 3.** Cytotoxicity of IMI in RAW 264.7 cells, assessed by neutral red (NR) uptake after 24h and 96h of incubation at 37 °C. The data are presented as a percentage of cell death to the negative control. Three independent experiments were carried out (quadruplicates tested for each concentration within each experiment).....**89**
- Figure 4.** Effect of IMI on the production of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species in RAW 264.7 cells, by the DCFH-DA method, after 24h and 96h of incubation. The values are expressed as a percentage of the control \pm SEM (n = 3 independent experiments carried out in eight replicates). Statistical comparisons within each time point were made by ANOVA/Bonferroni ($***p < 0.001$), while comparison between different time points were made by two-way ANOVA/Bonferroni ($***p < 0.001$).....**89**
- Figure 5.** Effect of the imidacloprid pesticide on the inflammatory response in RAW 264.7 cells, by the production of nitric oxide, after 24h and 96h of incubation. Values are expressed as a percentage of the control \pm SEM (n = 3 independent experiments performed in eight repetitions). Statistical comparisons within each time point were made by ANOVA/Bonferroni

(** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$), while comparison between different time points were made by two-way ANOVA/Bonferroni (*** $p < 0.001$).....90

Figure 6. Effect of IMI on the mitochondrial membrane potential in RAW 264.7 cells, by the TMRE method, after 24h (A) and 96h (B) of incubation. The values are expressed as a percentage of the control \pm SEM (n = 3 independent experiments carried out in eight replicates). Statistical comparisons within each time point were made by ANOVA/Bonferroni (*** $p < 0.001$), while comparison between different time points were made by two-way ANOVA/Bonferroni (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).....90

Figure 7. Effect of IMI exposure on succinate dehydrogenase activity (a), complex II activity (b), and complex IV activity (c) in RAW 264.7 cells, after 24h and 96h of incubation. Results are expressed as mean \pm SEM (n = 3 independent experiments performed in four replicates). Statistical comparisons within each time point were made by ANOVA/Bonferroni (*** $p < 0.001$), while comparison between different time points were made by two-way ANOVA/Bonferroni (* $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).....91

Figure 8. Effect of the imidacloprid pesticide in the comet assay (A) and LMW DNA assay (B) in RAW 264.7 cells, after 24h and 96h of incubation. Values are expressed as a percentage of the control \pm SEM (n = 3 independent experiments performed in eight replicates). Statistical comparisons within each time point were made by ANOVA/Bonferroni (*** $p < 0.001$), while comparison between different time points were made by two-way ANOVA/Bonferroni (*** $p < 0.001$).....91

MANUSCRITO III

Figure 1. Concentration–response curves of the tested pesticides after 24 h incubation in THP-1 cells at 37°C. Cell mortality was evaluated by the MTT reduction assay. Data are presented as percentage of cell death relative to the respective negative controls, after normalization to the positive control. Three independent experiments were performed (eight replicates tested for each concentration within each experiment).....112

Figure 2. Reactive species of oxygen and nitrogen (ROS/RNS) production, measured by the DCFH-DA assay, in THP-1 cells after 24 h incubations at

37°C. Results are expressed as percentage control ± SEM. Three independent experiments were performed (eight replicates for each concentration within each experiment). Statistical comparisons were made using one-way ANOVA/Bonferroni post hoc test (***p*<0.001 vs. control). Clo (clomazone); Gli (glyphosate); Sul (sulfentrazone); TBHP (tert-butyl hydroperoxide; positive control at 500 μM).....112

Figure 3. Mitochondrial membrane potential (Δψ_m) production, measured by the TMRE assay, in THP-1 cells after 24 h incubations at 37°C. Results are expressed as percentage control ± SEM. Three independent experiments were performed (eight replicates for each concentration within each experiment). Statistical comparisons were made using one-way ANOVA/Bonferroni post hoc test (***p*<0.01; ****p*<0.001 vs. control). Clo (clomazone); Gli (glyphosate); Sul (sulfentrazone); CCCP (carbonyl cyanide chlorophenylhydrazine; positive control at 5 μM).....113

Figure 4. The levels of interleukin-8 (IL-8), in the supernatant of THP-1 cells after 24 h incubations at 37°C. Results are expressed as percentage control ± SEM. Three independent experiments were performed (eight replicates for each concentration within each experiment). Statistical comparisons were made using one-way ANOVA/Bonferroni post hoc test (***p*<0.001 vs. control). Clo (clomazone); Gli (glyphosate); Sul (sulfentrazone).....113

MANUSCRITO IV

Figure 1. Chemical structure of clomazone, glyphosate, and sulfentrazone (PubChem [s.d.].....140

Figure 2. Concentration–response curves of the tested pesticides after 96 h incubation at 37°C in RAW 264.7 cells. Cell mortality was evaluated by the MTT reduction assay. Data are presented as percentage of cell death relative to the negative control. Three independent experiments were performed (eight replicates tested for each concentration within each experiment).....140

Figure 3. Concentration–response curves of the tested pesticides after 96 h incubation at 37 °C in RAW 264.7 cells. Cell viability was measured by the neutral red (NR) uptake assay. Data are presented as percentage of cell death relative to the negative control. Three independent experiments were performed (eight replicates tested for each concentration within each experiment).....**140**

Figure 4. Reactive species of oxygen and nitrogen (ROS/RNS) production, measured by the DCFH-DA assay, in RAW 264.7 cells after 96 h incubation with clomazone (Clo), glyphosate (Gli), and sulfentrazone (Sul) at 37 °C. Results are expressed as mean ± SEM. Three independent experiments were performed (eight replicates for each concentration within each experiment). Statistical comparisons were made using one-way ANOVA/Bonferroni post hoc test (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs. control). TBHP (tert-butyl hydroperoxide; positive control).....**141**

Figure 5. The inflammatory response measured by the production of nitric oxide, in RAW 264.7 cells, after 96h of incubation with clomazone (Clo), glyphosate (Gli), and sulfentrazone (Sul) at 37 °C. Results are expressed as mean ± SEM. Three independent experiments were performed (eight replicates tested for each concentration within each experiment).....**141**

Figure 6. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) measured by the TMRE assay, in RAW 264.7 cells after 96 h incubation with clomazone (Clo), glyphosate (Gli), and sulfentrazone (Sul) at 37 °C. Results are expressed as mean ± SEM. Three independent experiments were performed (eight replicates tested for each concentration within each experiment). Statistical comparisons were made using ANOVA/Bonferroni post hoc test (*** $p < 0.001$ vs. control). CCCP (carbonyl cyanide chlorophenylhydrazone; positive control at 100 mM).....**141**

Figure 7. Levels of TNF in the culture medium of RAW 264.7 cells after 96 h incubation at 37°C with clomazone (Clo), glyphosate (Gli), and sulfentrazone (Sul). Results are expressed as mean ± SEM. Three independent experiments were performed (three replicates for each

concentration within each experiment). Statistical comparisons were made using a one-way ANOVA/Bonferroni post hoc test (** $p < 0.01$ vs.

LISTA DE ABREVIATURAS

- % TDNA - Porcentagem de DNA na cauda do cometa
- Ach - Neurotransmissor acetilcolina
- AChE - Acetilcolinesterase
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATP - Trifosfato de adenosina
- BMDMs – Macrófago derivado da medula óssea
- C - Domínios constantes
- CCCP- Carbonil cianeto m-clorofenil hidrazona
- CCD - Desordem do Colapso da Colônia
- CLO - Clomazona
- CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- DCFH-DA - 2', 7'-Diclorofluoresceína diacetato
- DCs - Células dendríticas
- DDT - Diclorodifeniltricloroetano
- DMEM - Meio eagle modificado por dulbecco
- ECPA- European Crop Protection Association
- EPI - Equipamentos de proteção individual
- FasL - Ligante Fas
- FBS - Soro fetal bovino
- FAPERGS - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
- GABA - Ácido gama aminobutírico
- GBH - Herbicidas à base de glifosato
- GHS - Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos
- GLI - Glifosato
- H - Proteínas compostas por duas cadeias pesadas
- IBAMA - Instituto do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
- IDA - Ingestão diária aceitável
- Igs - Imunoglobulinas
- IMI - Imidacloprido
- L - Proteínas compostas por duas cadeias leves

LATOX - Laboratório de Toxicologia
LMR - Limites máximos de resíduos
LMW - Baixo peso molecular
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MAPK - Proteína quinase ativada por mitogênio
MMS - Metanossulfonato de metila
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
nACh - Receptores nicotínicos de acetilcolina
nAChR - Agonistas do receptor nicotínico da acetilcolina
NaCl - Cloreto de sódio
NK - Natural killer
NKT - T Natural killer
NR - Neutral Red
PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
PARA - Programa para a Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
PBS - Solução salina tamponada com fosfato
PPGCF - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões
RER - Retículo endoplasmático rugoso
RNS - Espécies reativas intracelulares de nitrogênio
ROS - Espécies reativas intracelulares de oxigênio
SN - Sistema nervoso
SNC - Sistema nervoso central
SUL - Sulfentrazona
TBHP - Hidroperóxido de terc-butila
Tox In - Laboratório de Ensino e Pesquisa em Toxicologia *In Vitro*
Th - Células T auxiliares
TLR - Receptor toll-like
TLR4 - Receptor toll-like 4
TMRE - Etil éster perclorato de tetrametilrodamina
TNF - Fator de necrose tumoral
UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América

V - Domínios variáveis

VN - Vermelho neutro

WT - Tipo selvagem

SUMÁRIO

PARTE I	29
INTRODUÇÃO	29
OBJETIVOS	34
1. OBJETIVO GERAL	35
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
PARTE II	37
CAPÍTULO I	39
CAPÍTULO II	57
CAPÍTULO III	95
CAPÍTULO IV	115
PARTE III	143
DISCUSSÃO	145
CONCLUSÕES	159
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161

PARTE I



INTRODUÇÃO

O agrotóxico tem seu uso no controle e prevenção de pragas durante o cultivo e após a colheita, melhorando a produtividade e a qualidade da produção agrícola (González-Rodríguez et al., 2008; Brasil, 2013). O Brasil é um vasto país sul-americano, possui uma extensa área produtiva, uma grande população e, conseqüentemente, há a necessidade de produção de alimentos. Ademais, as condições climáticas e hábitos de cultivo, fazem com que o país consuma uma ampla variedade de agrotóxicos (Bastos e Cardoso, 2011; Carneiro et al., 2015).

Outro fenômeno comum de ocorrer no cenário da agricultura brasileira é a utilização incorreta destes produtos. Seja por uso excessivo, inadequado, erros na diluição ou aplicação e, pela não utilização de equipamentos de proteção individual (EPI). Estes fatores, aliados a vários outros, favorecem a ocorrência de intoxicações agudas, subcrônicas ou crônicas, em caráter acidental e/ou ocupacional. Tal utilização oportuniza a exposição dos consumidores dos produtos agrícolas *in natura* e/ou industrializados pela presença de concentrações elevadas de resíduos (Carneiro et al., 2015). Essas intoxicações também podem estar relacionadas dependendo da higienização efetuada nos alimentos, no modo de preparo e forma de consumo, o indivíduo ao consumir o alimento, estará ingerindo juntamente os agrotóxicos presentes nessa fonte alimentar (Pirsaheb et al., 2015).

Além disso, análises realizadas em leite materno já demonstraram a presença de resíduos de agrotóxicos organoclorados, indicando que a exposição dos seres humanos aos agrotóxicos inicia desde o nascimento (Bastos e Cardoso, 2011). Além dos efeitos agudos, prolongadas exposições aos agrotóxicos podem resultar em distúrbios neurológicos, reprodutivos, teratogênicos e imunológicos (Franco et al., 2010; Ma e Li, 2015; Kim et al., 2017). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), em um relatório divulgado sobre a saúde humana associada a agrotóxicos liberados, vários efeitos adversos à saúde foram observados, como irritações na pele e nos olhos, distúrbios nervosos

e distúrbios dos sistemas imunológico e endócrino (Corsini et al., 2013; Casida e Durkin, 2017).

A desregulação do sistema imunológico por agrotóxicos é um destes efeitos, que pode estar intimamente associada à predisposição a diferentes tipos de doenças, posto que o sistema imunológico é responsável pela defesa do organismo contra patologias. É relatado que a exposição ambiental e ocupacional a agrotóxicos pode induzir alterações transitórias ou permanentes do sistema imunológico, levando a distúrbios graves, tais como: inflamatórios, e doenças inflamatórias intestinais, artrite reumatoide, neoplasias e doenças metabólicas (Mokarizadeh et al., 2015). Os macrófagos são importantes células do sistema imunológico, que participam de defesas específicas (imunidade celular) ou não específicas (imunidade inata) in vivo (Navegantes et al., 2017).

Dentre as características apresentadas pelos macrófagos, destacam-se a plasticidade, heterogeneidade e pluripotência destas células, podendo se diferenciar em diferentes fenótipos e desempenhar funções especializadas em diferentes microambientes (Sica et al., 2012; Martinez et al., 2014). Ao passo que são ativados, exercem funções diferentes, podendo ser classificados principalmente em macrófagos ativados classicamente (M1) desempenhando um papel na vigilância imunológica e participando das respostas imunes positivas, produzindo citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Fong et al., 2008). Ou, em macrófagos ativados alternativos (M2), importantes na remodelação tecidual, regulam negativamente as respostas imunes para controlar a regulação imune e secretam citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e TGF- β (Gordon e Martinez 2010; Murray e Wynn, 2011). Evidências indicam que o equilíbrio entre as ativações dos macrófagos é importante para a saúde. Uma vez que, os desequilíbrios de ativação e inibição dos fenótipos M1 e M2 têm se mostrado associados ao desenvolvimento de muitas doenças inflamatórias (Liu et al., 2014).

Considerando a relevância dos agrotóxicos em nosso meio e o objetivo de aumentar a produtividade das culturas, se faz necessário elucidar os efeitos ainda não descritos ou bem compreendidos sobre a

imunidade inata e adaptativa (celular e humoral), uma vez que estes agrotóxicos estão sendo largamente utilizados. Também, ao considerar que os testes de imunotoxicidade não estão dentro dos novos *endpoints* exigidos para liberação de agrotóxicos publicado na nova RDC nº 294 da ANVISA, se faz necessário investigar efeitos até então não observados e, talvez, úteis em uma potencial reavaliação. Com isso, uso dos agrotóxicos clomazona, glifosato, imidacloprido e sulfentrazone vem se destacando e modelos de linhagens celulares, tais como macrófagos, têm sido amplamente utilizados para pesquisas associadas ao sistema imunológico. Por este motivo, torna-se relevante avaliar o potencial risco destes produtos como forma de evitar possíveis agravos à saúde humana e ambiental.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a imunotoxicidade dos agrotóxicos clomazona, glifosato, imidacloprido e sulfentrazone através de modelos *in vitro*.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Revisar mecanismos envolvidos na imunotoxicidade causada por fungicidas, herbicidas e inseticidas.

2) Avaliar a citotoxicidade dos agrotóxicos clomazona, glifosato, imidacloprido e sulfentrazone em macrófagos murinos RAW 264.7 e dos agrotóxicos clomazona, glifosato e sulfentrazone em células monocíticas humanas THP-1.

3) Avaliar a participação do estresse oxidativo como mecanismo de toxicidade dos agrotóxicos clomazona, glifosato, imidacloprido e sulfentrazone em macrófagos murinos RAW 264.7 e dos agrotóxicos clomazona, glifosato e sulfentrazone em células monocíticas humanas THP-1.

4) Avaliar o dano mitocondrial causado pelos agrotóxicos clomazona, glifosato, imidacloprido e sulfentrazone em macrófagos murinos RAW 264.7 e dos agrotóxicos clomazona, glifosato e sulfentrazone em células monocíticas humanas THP-1.

5) Investigar o dano ao DNA do agrotóxico imidacloprido em macrófagos murinos RAW 264.7.

Avaliar o perfil de interleucinas nas células RAW 264.7 e THP-1 após incubação com os agrotóxicos clomazona, glifosato e sulfentrazone.

PARTE II



CAPÍTULO I

MANUSCRITO 1

**Toxic effects of pesticides on cellular and humoral immunity: an
overview**

Manuscrito publicado na revista *Immunopharmacology and
Immunotoxicology*

DOI: 10.1080/08923973.2022.2096466 (Immunopharmacology and
Immunotoxicology, n. just-accepted, p. 1 – 30, 2022)

As seguintes páginas (42 – 56) foram excluídas porque correspondem ao manuscrito publicado na revista *Immunopharmacology and Immunotoxicology*.

Esse capítulo aborda o estudo que objetivou revisar estudos durante os últimos dez anos sobre os mecanismos envolvidos na imunotoxicidade de fungicidas, herbicidas e inseticidas em células, animais e humanos. Os mecanismos envolvidos na imunotoxicidade destas três classes analisadas estão relacionados a alterações em células imunes inatas e adaptativas, na resposta imune celular e humoral, bem como na alteração do sistema imunológico por vários mecanismos, como fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios.

CAPÍTULO II

MANUSCRITO 2

Immunomodulatory effect of imidacloprid on macrophage RAW 264.7 cells

Manuscrito a ser submetido à revista *Toxicology in vitro*.

As seguintes páginas (60 – 94) foram excluídas porque correspondem ao manuscrito que será submetido à revista *Toxicology Letters*.

Esse capítulo aborda o estudo que objetivou avaliar a imunotoxicidade celular de três herbicidas (clomazona, glifosato e sulfentrazone) após 96 h de incubação em macrófagos murinos RAW 264.7 para elucidar o papel de algumas vias toxicológicas. Este é o primeiro relato dos efeitos de clomazona e sulfentrazone em células RAW 264.7, incluindo diminuição dos níveis de TNF, mostrando o impacto dos herbicidas no sistema imunológico.

CAPÍTULO III

MANUSCRITO 3 – SHORT COMMUNICATION

Mitochondrial impairment related to the immunotoxicity of the herbicides clomazone, glyphosate and sulfentrazone in THP-1 cells

Manuscrito a ser submetido à revista *Toxicology Research*.

As seguintes páginas (98 – 114) foram excluídas porque correspondem ao manuscrito que será submetido à revista *Toxicology Research*.

Esse capítulo aborda o estudo que objetivou avaliar a toxicidade dos três herbicidas comerciais (clomazona, glifosato e sulfentrazone) usando células THP-1 após 24 h de incubação para elucidar o papel de algumas vias toxicológicas, como geração de espécies reativas, comprometimento mitocondrial e perfil de interleucina que estiveram previamente envolvidos na toxicidade de pesticidas.

Observou-se um potencial efeito imunotóxico dos agrotóxicos sobre as células THP-1, principalmente o glifosato, por ser um poderoso agente de imunotoxicidade celular. Foi possível verificar aumento do estresse oxidativo, bem como dos níveis de IL-8. Além disso, foi observada disfunção mitocondrial. Além disso, as mitocôndrias são um alvo importante da citotoxicidade mediada por herbicidas e devem ser investigadas em profundidade.

CAPÍTULO IV

MANUSCRITO 4

***In vitro* immunotoxic evaluation of herbicides in murine RAW 264.7
cells**

Manuscrito a ser submetido à revista *Toxicology Letters*.

As seguintes páginas (118 – 140) foram excluídas porque correspondem ao manuscrito que será submetido à revista *Toxicology Letters*.

Esse capítulo aborda o estudo que objetivou avaliar a imunotoxicidade celular de três herbicidas (clomazona, glifosato e sulfentrazone) após 96 h de incubação em macrófagos murinos RAW 264.7 para elucidar o papel de algumas vias toxicológicas. Este é o primeiro relato dos efeitos de clomazona e sulfentrazone em células RAW 264.7, incluindo diminuição dos níveis de TNF, mostrando o impacto dos herbicidas no sistema imunológico.

PARTE III



DISCUSSÃO

Nos últimos anos evidências vêm demonstrando que os agrotóxicos podem afetar o sistema imune através de diferentes mecanismos (Díaz-Resendiz et al., 2015; Mokarizadeh et al., 2015; Dhouib et al., 2016; Lee and Choi, 2020; Cestonaro et al., 2020). Até o momento, sabe-se que o funcionamento do sistema imunológico e o desenvolvimento de distúrbios imunológicos dependem da dose e da duração da exposição aos agrotóxicos bem como desempenham um papel importante no desenvolvimento de várias doenças crônicas (Gangemi et al., 2016). Apesar dos esforços realizados para relatar os distúrbios do sistema imunológico em humanos expostos a agrotóxicos, há muitas limitações apresentadas, tais como a falta de informações sobre os níveis de exposição, diferenças nos procedimentos de administração de agrotóxicos, bem como na interpretação dos resultados obtidos (Taghavian et al., 2016).

Os principais desafios encontrados por pesquisadores não são apenas referentes a identificação dos efeitos dos agrotóxicos no sistema imunológico, mas também na determinação da forma e da duração da exposição, uma vez que há uma necessidade clara de estudos epidemiológicos e experimentais mais bem planejados e padronizados para identificar a associação exata entre os níveis de exposição e os efeitos tóxicos, a fim de estabelecer novos biomarcadores de exposição (Gangemi et al. 2016). Portanto, o presente estudo teve como principal objetivo avançar nessa linha e aprofundar o conhecimento relativo ao mecanismo da imunotoxicidade de alguns agrotóxicos mundialmente utilizados.

Estudos previamente publicados por nosso grupo de pesquisa apontaram alguns agrotóxicos comumente utilizados em lavouras da região central do estado do Rio Grande do Sul (Nascimento et al., 2017; Nascimento et al., 2018; Cestonaro et al., 2020). Estes dados serviram como embasamento para seleção de quatro agrotóxicos, um inseticida neonicotinóide, o imidacloprido (IMI), e três herbicidas, clomazona (CLO), glifosato (GLI) e sulfentrazone (SUL) que apresentam poucos estudos relacionados a potenciais efeitos a longo prazo, bem como dos mecanismos de toxicidade envolvidos. A seleção também levou em

consideração as alterações imunológicas apresentadas nos agricultores, como aumento dos níveis de imunoglobulinas e do complemento C3 e diminuição do complemento C4, diminuição da expressão moléculas de adesão LFA-1 e ICAM-1 em monócitos e aumento moléculas de adesão LFA-1 e ICAM-1 em linfócitos. Além disso, também foi observada uma correlação negativa significativa entre a atividade da butirilcolinesterase (BuChE) e os níveis de imunoglobulina G, sugerindo um possível efeito direto da exposição ao agrotóxico no sistema imunológico (Cestonaro et al., 2020).

Estudos *in vitro*, *in vivo* e epidemiológicos indicam que os agrotóxicos causam danos potenciais a humanos e mamíferos (Desforges et al., 2015; Hu et al., 2017; Han et al., 2018; Bojarski and Witeska, 2020). Nesse sentido, o manuscrito 1 publicado na revista *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, abordou os mecanismos relacionados a imunotoxicidade de diferentes agrotóxicos, que podem levar a predisposição a diferentes tipos de transtornos psiquiátricos, cânceres, alergias, doenças autoimunes e infecciosas (Mokarizadeh et al., 2015), respostas inflamatórias, estresse oxidativo, plasticidade neural e inflamação neurogênicas (Shaffo et al., 2018). E também, sobre seus efeitos específicos em leucócitos, como células T e B, células NK e macrófagos (Lee et al., 2020) com o objetivo de aprofundar o conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos por trás destes xenobióticos, buscando alternativas de compreensão no desenvolvimento de certos distúrbios e doenças causadas em decorrência a essa exposição, bem como alternativas para detectá-los precocemente e prevenir agravos maiores à saúde.

Os benefícios que os agrotóxicos fornecem, ao controlar organismos que são considerados prejudiciais, resultam em melhores rendimentos e qualidade das colheitas. Além do controle de doenças, auxiliam na economia monetária devido à proteção do produto de deterioração (Lebailly et al., 2015). No entanto, a variedade de efeitos adversos à saúde que os agrotóxicos apresentam ganharam destaques em debates mundiais. Por exemplo, foi relatado que a imunotoxicidade dos

agrotóxicos é mais evidente em agricultores durante a temporada de pulverização. Especificamente, o DNA de linfócitos B e T em agricultores mostrou mais danos do que em não agricultores, indicando o potencial de causar imunotoxicidade por meio de seus efeitos genotóxicos em humanos (Lebailly et al., 2015).

O progresso na biologia nos últimos anos dependeu muito da tecnologia de cultura de células. A influência da tecnologia de cultura de células encontrou ampla aplicação no campo da toxicologia. As culturas de células são utilizadas em laboratórios citogenéticos, bioquímicos e moleculares para pesquisas e estudos toxicológicos (Phelan e May, 2016). O uso de linhagens celulares comerciais é bastante apropriado para investigar efeitos pró-inflamatórios que envolvem ativação de macrófagos. As vantagens de estudos *in vitro* levam em consideração a reprodutibilidade do estudo, bem como, impedir uma potencial interferência de moléculas produzidas por outras células do sistema imunológico (Del-Ángel et al., 2015).

Duas linhagens de células clássicas, THP-1 humanas e RAW264.7 de camundongo, têm sido amplamente utilizadas para estudar as funções, mecanismos e vias de sinalização de macrófagos (Castaneda et al., 2017; Shiratori et al., 2017). A linhagem celular THP-1 é um monócito obtido a partir do sangue de uma criança com leucemia aguda (Tsuchiya et al. 1980, ATCC 2006). Essas células apresentam capacidade fagocítica, expressão de lisozima e teste negativo para o vírus Epstein-Barr (Tsuchiya et al. 1980). Além disso, essa linhagem pode sofrer diferenciações induzidas por compostos do tipo ésteres de forbol como, por exemplo, 12-Otetradecanolforbol-13-acetato (TPA) ou forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Tsuchiya et al. 1980, Stokes & Doxsee 1999, ATCC 2006).

Dentre as vantagens do uso da linhagem celular THP-1 como modelo de diferenciação monócito/macrófago *in vitro* são a invariabilidade da sua função de macrófago e a reprodutibilidade do crescimento celular, permitindo estudos em diferentes estágios (normal *versus* ativado) (Theus et al., 2004). Estudos já demonstraram a utilização da linhagem celular THP-1 diferenciada como modelo experimental para maturação de células

dendríticas humanas (Berges et al 2005) e, como modelo para a avaliação da resposta inflamatória a diferentes ácidos graxos poliinsaturados (Zhao et al. 2005).

Já a linhagem de macrófagos RAW 264.7 são células de camundongos Balb-C que possuem propriedades de macrófagos normais artificialmente obtidas a partir da infecção com o vírus Albelson (Chanput et al., 2014). Essa linhagem tem sido amplamente utilizada em estudos que envolvem análise de atividade pró-inflamatória ou anti-inflamatórias de fármacos, extratos de plantas ou outros agentes químicos (Del-Ángel et al., 2015). Estudos descrevem que essas células são apropriadas como modelo de estudos *in vitro* utilizando macrófagos. Além disso, são capazes de realizar pinocitose e fagocitose, bem como matar células-alvo por citotoxicidade dependente de anticorpos (Fuentes et al., 2014).

O manuscrito 2, submetido na revista *Toxicology in vitro*, avaliou a toxicidade *in vitro* do IMI, um inseticida neonicotinoide após tempos de incubação curtos (24h) e longos (96h) usando macrófagos murinos RAW 264.7 como modelo *in vitro*. Os inseticidas neonicotinoides possuem atividades similares as do neurotransmissor acetilcolina, ou seja, atuam como agonistas dos receptores nicotínicos de acetilcolina (Nicotine Acetylcholine Receptors - nAChR) (Casida and Durkin, 2013). Ao se ligar nos nAChR, importantes na neurotransmissão colinérgica em insetos e mamíferos, interrompem a transdução do sinal colinérgico neuronal, que não é degradado pela acetilcolinesterase, causando hiperexcitabilidade e morte de insetos alvo (Tomizawa e Casida, 2011; Casida and Durkin, 2013).

Insetos não-alvo, como as abelhas, frequentemente entram em contato com esses inseticidas sistêmicos (Pisa et al., 2015). Embora a exposição das abelhas ocorra em concentrações mais baixas de neonicotinoides, o uso indiscriminado dessa classe de agrotóxicos tem sido fortemente associado ao fenômeno chamado de Desordem do Colapso da Colônia (Colony Collapse Disorder - CCD). Esse fenômeno, caracterizado pelo desaparecimento súbito das abelhas na colmeia (Rondeau et al., 2014; Rundlöf et al., 2015) afeta várias espécies de abelhas que são responsáveis por cerca de 80% da polinização promovida por insetos e contribuem para

o equilíbrio do ecossistema (Ollerton et al., 2011; Gill et al., 2012).

Estudos verificaram que os neonicotinoides, em doses e concentrações sub-letais, podem não provocar a morte imediata das abelhas, mas levar a alterações comportamentais que comprometem o funcionamento da colônia, como desordens na aprendizagem e memória, isso dificulta a capacidade de navegação das abelhas e o retorno para a colônia (Han et al., 2010; Henry et al., 2012; Yang et al., 2012; Teeters et al., 2012). O IMI é considerado um dos inseticidas mais importantes no mercado mundial de produtos utilizados na proteção de lavouras, está presente em mais de 120 países e em mais de 140 tipos de culturas (como por exemplo, lavouras de arroz, algodão, trigo, cevada, sorgo, canola, milho e beterraba) (Jeschke et al., 2011).

Além de intoxicar as abelhas que estão no campo, os inseticidas sistêmicos, como é o caso do IMI, foram detectados no pólen e néctar, o que indica que todos os indivíduos da colônia estão expostos a este agrotóxico (Wu et al., 2011). Recentemente, o uso de três inseticidas neonicotinoides (o IMI, a clotianidina e o tiametoxam) estão em moratória pela Comissão Europeia (2013), devido às crescentes preocupações sobre o risco que eles podem representar para as abelhas e outros polinizadores (Gross, 2013; EFSA, 2013a; EFSA, 2013b; EFSA, 2013c; EFSA, 2018; EFSA e Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, 2014).

O presente estudo mostrou um potencial efeito imunomodulador em macrófagos murinos expostos ao IMI, provavelmente devido a algum distúrbio mitocondrial, conforme observado pelos ensaios de redução do MTT e pela despolarização da membrana mitocondrial principalmente após um longo tempo de incubação (96 h). Os resultados obtidos corroboram com estudos prévios que reportam o efeito do IMI no comprometimento da bioenergética mitocondrial de abelhas, resultando na depleção de trifosfato de adenosina (ATP) (Nicodemo et al., 2014); em mariposas, impedindo a função mitocondrial e induzindo o estresse oxidativo, o que contribui para a redução do crescimento juntamente com seu efeito neurotóxico (Nareshkumar et al., 2017) e em fígado de rato, inibindo a função da enzima FoF1-ATP sintase, com consequente comprometimento da bioenergética

mitocondrial (Bizerra et al., 2018).

O IMI induziu a uma despolarização mitocondrial e uma estimulação das atividades do complexo II e SDH. Esses resultados afetam a fosforilação oxidativa, resultando em diminuição da síntese de ATP. A fosforilação oxidativa é a etapa final do metabolismo produtor de energia em organismos e ocorre nas mitocôndrias. De forma generalista, a fosforilação oxidativa pode ser dividida em duas partes: a cadeia transportadora de elétrons (ou cadeia respiratória) e a síntese de ATP (caracterizada por enzimas da classe das ATP sintases) (Nelson e Cox, 2005). Evidências vêm demonstrando que a toxicidade aguda ou crônica de muitos xenobióticos pode ser causada por meio da interferência na síntese e no uso de ATP (Liu et al., 2017; Choi et al., 2018; Luz et al., 2018).

Apesar de ser essencial para o metabolismo energético, a fosforilação oxidativa produz espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem causar danos a muitos componentes celulares, incluindo DNA, proteínas e lipídeos (Gou et al., 2013). O efeito diferente do esperado para o IMI na produção de radicais livres estar associado com o desenho experimental e também com o tipo de molécula oxidativa analisada. Por fim, há indícios de um potencial efeito imunomodulador e que a mitocôndria desempenha um papel crucial na citotoxicidade mediada pelo inseticida em células RAW 264.7.

No terceiro manuscrito, apresentamos um potencial efeito imunotóxico dos herbicidas (CLO, GLI e SUL) nas células THP-1. A CLO é um herbicida usado para controlar ervas daninhas e gramíneas de folhas largas. Além disso, é utilizada em muitas culturas, incluindo soja, algodão, tabaco e arroz (AGROFIT, 2020b). Em um estudo realizado com camundongos que foram tratados com 46 $\mu\text{M}/\text{kg}$ de CLO por via intraperitoneal (i.p.) diariamente durante 4 semanas, foi observado que os níveis séricos de IgA, IgG e IgM foram significativamente menores do que os do grupo controle. Além disso, foi observada uma redução na capacidade de proliferação de linfócitos (Nassef, 2017).

O GLI, outro agrotóxico avaliado, é um herbicida de amplo espectro que foi introduzido para controle de ervas daninhas em campos de

produção agrícola em 1974. O uso de GLI para a produção agrícola é generalizado, tanto em países industrializados como em desenvolvimento. Além disso, o GLI também é amplamente utilizado em situações não agrícolas, como nas margens de estradas, sobre e ao lado de trilhos de trem e em pré e pós-cultivo de campos, bem como para o controle da vegetação de árvores e pomares (Benbrook, 2016). Por ser amplamente utilizado para matar ervas daninhas perenes (Kanissery et al., 2019), tanto o GLI quanto seu produto de degradação já possuem relatos de toxicidade aguda e crônica (El Agrebi et al., 2020).

Por fim, avaliou-se o herbicida SUL, um agrotóxico de aplicação pré-emergente, seletivo condicional que também apresentou um aumento da morte celular diretamente proporcional ao aumento das concentrações após 96h de incubação. Sua utilização é indicada em culturas de cana-de-açúcar, soja, café, eucalipto, citros, fumo, além de seu uso em pátios industriais (AGROFIT, 2020c). Pouco se sabe sobre a toxicidade deste agrotóxico em mamíferos sem referências detalhadas. Embora exista um estudo que tenha apontado para a toxicidade embrionária/fetal de filhotes de ratos expostos ao herbicida SUL (25 e 50 mg/kg) durante os 6 dias primeiros de gestação e no período de organogênese (6-15 dias), os conhecimentos sobre seus potenciais efeitos tóxicos ainda são limitados (De Castro et al., 2007).

Além do perfil citotóxico nas células THP-1 após 24 h de exposição, foi observado também um aumento do estresse oxidativo, bem como dos níveis de IL-8. Estudos avaliando os efeitos do GLI (agrotóxico que mais tem sido estudado nos últimos anos), na saúde humana relatam uma ampla gama de consequências causados por eles (Hao et al., 2019; Martinez et al., 2019; Zhang et al., 2019; Peillex et al., 2020). Associações da exposição à herbicidas inibidores de colinesterase com a redução do volume expiratório forçado (VEF1) e diminuição da capacidade vital forçada (CVF) e a exposição ao ácido diclorofenoxiacético foram observadas após a indução da inflamação pulmonar com aumento do risco de câncer de pulmão, por causa de suas ações à nível celular, como o estresse oxidativo (Ratanachina et al., 2019; Hao et al., 2019; Kaur et al., 2021).

Neste estudo, foi possível observar uma despolarização mitocondrial e hiperpolarização mitocondrial após as exposições. Sugerindo o sistema imunológico como alvo da exposição a herbicidas, as mitocôndrias provaram ser um importante alvo de citotoxicidade mediada por herbicidas e devem ser investigadas em profundidade. Alterações nas membranas mitocondriais também foram observadas com herbicidas à base de GLI (GBHs). Essas alterações ocorrem, pois, o GLI gera um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna para prótons e Ca^{2+} , causando uma alta concentração intracelular de Ca^{2+} . Esse episódio gera uma indução a mudanças estruturais na membrana mitocondrial interna que, por sua vez, é prejudicial à célula uma vez que gera elevação dos níveis de GBHs e à ativação de caspases. Podendo levar à desregulação da função e à morte celular (Costas-Ferreira et al., 2022; Strilbytska et al., 2022).

Como já mencionado no manuscrito 3, poucos estudos se concentraram em células imunes e nenhum investigou os efeitos dos herbicidas CLO, GLI e SUL em células RAW 264.7. Assim, avaliou-se a imunotoxicidade dos três herbicidas utilizando a linhagem celular RAW 264.7 como modelo *in vitro* para elucidar o papel de algumas vias de toxicidade após 96 h de exposição.

Ao observar os resultados dos testes de citotoxicidade, é possível concluir que os três herbicidas apresentaram o mesmo perfil de citotoxicidade para as células RAW 264.7, após 96 h de incubação. Novamente, o GLI se mostrou como sendo o mais tóxico entre os herbicidas testados. Diversos estudos têm relatado a citotoxicidade celular deste herbicida, confirmando nossos achados (Abdel-Halim and Osman, 2020; Peillex and Pelletier, 2020; Tóth et al., 2020; Truzzi et al., 2021).

Os herbicidas podem ser classificados de várias maneiras, modo de ação, método de aplicação e outros. Muitos fatores determinam quando, onde e como um determinado herbicida pode ser usado de forma mais eficaz. Um método comum de classificação de herbicidas é pelo seu modo de ação e local de destino. Cada modo de ação do herbicida tem um local alvo específico que é referido como um mecanismo de ação. Esta é

geralmente uma enzima/proteína que é inibida pelo herbicida a nível molecular. O mecanismo de ação para alguns herbicidas induz a geração de ROS em plantas como efeitos secundários após os locais alvo específicos serem suficientemente inibidos. Caverzan et al. (2019) relata que após o herbicida atingir e inibir o local alvo específico, uma série de eventos de estresse é iniciada pela sinalização dos sistemas de defesa da planta contra perturbações. Neste caso, o estresse oxidativo gerado é responsável por uma parte importante dos danos celulares e teciduais. Do total de grupos conhecidos de herbicidas classificados de acordo com o modo de ação, 71% deles são conhecidos por causar superprodução de ROS após a inibição do local alvo. Os resultados demonstram, portanto, certa evidência dos danos celulares observados para a clomazona e sulfentrazone e a superprodução de ROS após exposição celular, o que corrobora com nossos achados.

Majoritariamente, o processo de produção de ATP ocorre através da fosforilação oxidativa. Quando a atividade de algum complexo mitocondrial é inibida pela presença de xenobióticos, o processo de transferência de elétrons é interrompido, assim como a produção de ATP, levando a diminuição da capacidade energética celular proveniente da fosforilação oxidativa (Mostafalou; Abdollahi, 2013). O $\Delta\psi_m$, necessário para a produção de ATP, pode ser considerado um parâmetro funcional mitocondrial importante, sendo que alterações neste parâmetro são observadas em uma grande variedade de células com disfunção na fosforilação oxidativa (Abramov et al., 2010).

A inibição da cadeia de transporte de elétrons reduz o efluxo de prótons através da membrana interna mitocondrial e geralmente está associada à despolarização mitocondrial, mas condições inibitórias parciais do complexo I têm sido associadas à hiperpolarização $\Delta\psi_m$ (Forkink et al., 2014). Portanto, considerando as alterações observadas na membrana mitocondrial associadas ao aumento da produção de ROS, aqui demonstramos que a incubação por 96 h a CLO, GLI e SUL despolarizou a mitocôndria. Tais efeitos afetam negativamente os processos energéticos das mitocôndrias, bem como, esses resultados indicam possíveis

mecanismos de toxicidade dos herbicidas em organismos não-alvo. Por outro lado, um estudo conduzido em zebrafish (*Danio rerio*) expostos a GBHs (0,065, 1,0 e 10,0 mg L⁻¹) por 7 dias observou a hiperpolarização de $\Delta\psi_m$ nas células cerebrais dos peixes (Pereira et al., 2018). Juntos, estes achados reforçam a hipótese de que a mitocôndria é um importante alvo deste herbicida.

O NO é uma importante molécula sinalizadora que atua em muitos tecidos para regular várias funções fisiológicas. Dentre as isoformas desta enzima, está o macrófago ou isoforma induzível (iNOS ou NOS-2). A expressão da iNOS é induzida em uma ampla faixa celular durante a inflamação, e a atividade da iNOS é independente do cálcio (Förstermann e Sessa, 2012). Observamos que os níveis de NO após o desafio com LPS em comparação com o controle foram afetados para os herbicidas GLI e SUL após 96 h de incubação. Este resultado é consistente com um estudo de revisão que avaliou o óxido nítrico na toxicidade de outro agrotóxico também da classe dos herbicidas, o paraquat. Os autores sugerem que o NO esteja envolvido no mecanismo de toxicidade mediada por paraquat (Morán et al., 2010).

O TNF é uma citocina pró-inflamatória que é produzida por várias células, como macrófagos, monócitos, linfócitos T e B e células natural killer (Tracey e Cerami, 1993). Está envolvido na proliferação celular, diferenciação, inflamação e apoptose (Goetz et al., 2004; Savan e Sakai, 2004). No presente estudo, encontramos uma notável diminuição nos níveis de TNF em todos os herbicidas testados, sugerindo que a exposição a eles pode afetar a expressão ou função de TNF e, portanto, perturbam a função imunológica das células RAW 264.7.

De uma maneira geral, os efeitos agudos dos herbicidas têm sido extensivamente estudados, no entanto, as complicações a longo prazo da exposição permanecem amplamente desconhecidas (Collotta et al., 2013). Uma exposição de curto prazo, como observado no manuscrito 3, causará toxicidade aguda com seus efeitos na saúde. No entanto, a toxicidade crônica resulta da exposição repetida a um agrotóxico por um longo período de tempo, de vários meses a anos, como observado no manuscrito 4,

fornecheram informações valiosas sobre um potencial mecanismo de ação e toxicidade dos herbicidas.

Embora as concentrações usadas neste estudo estejam acima da exposição humana diária típica (Gillezeau et al., 2019), nosso estudo avaliou o efeito imunotóxico dos agrotóxicos, levando em consideração que a exposição pode ocorrer das mais variadas formas e fontes e levar a predisposição de uma série de doenças, dependendo do produto que foi utilizado, do tempo de exposição e quantidade de produto absorvido pelo organismo. Especificamente nos trabalhadores da agricultura e pecuária, de empresas desinsetizadoras, de transporte e comércio de agrotóxicos e de indústrias de formulação destes produtos. Essa população está exposta a estes compostos durante muito tempo de suas vidas através da inalação, contato dérmico ou oral durante a manipulação, aplicação e preparo e também através da ingestão de alimentos e água contaminadas. Esses resultados aumentam a necessidade de conscientização sobre os efeitos prejudiciais que as exposições a estes agrotóxicos podem ter na saúde humana desta população.

Outro ponto importante a ser destacado é que, em nossos estudos, utilizou-se agrotóxicos vendidos comercialmente. Sabe-se que os agrotóxicos são vendidos em uma variedade de formulações, as quais podem se diversificar pelas propriedades físicas e químicas de seus ingredientes ativos. As formulações podem conter uma ou mais substâncias ativas e outros ingredientes denominados inertes ou coformulantes que podem atuar como veículos, emulsionantes, odorificantes, tampões, solventes, estabilizadores ou conservantes. Hoje em dia, a importância desta questão não pode ser subestimada, pois de acordo com a European Crop Protection Association (ECPA), há cada vez mais agrotóxicos falsificados e ilegais entrando no mercado (ECPA, 2020).

Devido ao grande número de produtos consumidos no país, a necessidade de avaliar e regular os produtos agrícolas utilizados em todo território brasileiro é realizado por três órgãos oficiais que compartilham de forma independente o peso e a responsabilidade desta tarefa. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), avalia os riscos dos agrotóxicos

para a saúde humana, o Instituto do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) avalia os riscos ao meio ambiente, enquanto o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) avalia a eficiência desses compostos na melhoria da produtividade agrícola (Brasil, 2006).

Desde o primeiro decreto regulamentador de uso de inseticidas e fungicidas no Brasil (Decreto 24 114/34 de 1934) (Brasil, 1934), várias alterações foram realizadas. Até o ano de 2019, reiterava a Normativa 3 do Ministério da Saúde (Brasil 1992), mas a partir de uma mudança, a ANVISA regulamentou os critérios para avaliação e classificação toxicológica de princípios ativos e das formulações. Também regulamentou os requisitos para avaliação do risco alimentar decorrente da exposição humana a resíduos de agrotóxicos, por meio dos RDCs nº 294 e nº 295, respectivamente (ANVISA, 2019 a, b).

Paralelamente, a ANVISA também publicou a Instrução Normativa 34, que relaciona componentes não autorizados para uso em agrotóxicos e formulações relacionadas (ANVISA, 2019c). O principal objetivo desta reclassificação foi colocar o Brasil no mesmo nível de outros países, atualizando e tornando mais claros os critérios de avaliação e classificação toxicológica. Esta reclassificação adota parâmetros com base nos padrões do Sistema GHS, acrônimo para The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals - Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (ANVISA, 2019a, b).

Muitos países, órgãos e agências reguladoras já têm sistemas implantados para cumprir todos ou alguns dos objetivos estabelecidos pelo GHS, entretanto, nem sempre são compatíveis, o que obriga as empresas a manter vários esquemas para atender as exigências de diferentes agências reguladoras dos países para os quais exportam. Assim, o GHS fornece instruções para atender às exigências básicas de qualquer sistema (Abiquim/Detec, 2005). Desta forma, a ANVISA ao implementar esse sistema de comunicação, segue as mesmas instruções que outros órgãos e agências reguladoras globais.

Como mencionado anteriormente, a avaliação de toxicidade obrigatória para o registro de um agrotóxico no Brasil abrange a avaliação tanto de ingredientes quanto de produtos formulados. Até 2019, essa avaliação exigia nove *endpoints* de toxicidade para ingredientes ativos e oito para produtos formulados. De acordo com a nova RDC 294, devem ser avaliados dezesseis desfechos toxicológicos para ingredientes ativos e nove para produtos formulados, dentre eles, podemos citar os desfechos de toxicidade crônica e mecanismo de ação (ANVISA, 2019a).

Após o recebimento dos dados fornecidos pelas empresas, a ANVISA analisa conforme os novos critérios implementados, possibilitando inferir os riscos para a saúde humana e classificar o produto quanto à toxicidade de maneira adequada (ANVISA, 2019a, b). Além disso, a avaliação toxicológica das impurezas e produtos de degradação, que podem ser encontrados nas formulações também passou a ser obrigatória, uma vez que sua presença foi declarada no produto final. As impurezas geralmente estão presentes na ordem de 0,1% -1%, e para resolver esta questão, a RDC nº 294 menciona modelos como ferramentas de triagem para a avaliação toxicológica de ingredientes ativos e impurezas, que podem ser confirmadas posteriormente em modelos biológicos (ANVISA, 2019a).

A forma na qual o GHS define a classificação para fins de rotulagem do produto é de acordo com o desfecho de morte, no entanto, os critérios do GHS para perigos ao meio ambiente e à saúde são harmonizados para cada categoria. Ao analisar os critérios de perigos à saúde, nota-se que, apenas são analisados estudos toxicológicos agudos (com base no LD50 (oral, dérmica) ou no LC50 (inalação)), não levando em consideração os efeitos a longo prazo, como é o caso da imunotoxicidade. Mesmo fornecendo parâmetros para análise da toxicidade sistêmica para órgãos-alvo específicos, em exposições repetidas, o valor de referência para dose repetida refere-se aos efeitos vistos em um teste padrão de toxicidade de 90 dias conduzido em ratos, podendo ser base para extrapolação de valores de referência equivalentes para estudos de toxicidade de duração maior ou menor. Tal abordagem para os sistemas de classificação

existentes não leva em consideração exposições crônicas, como é o caso de agricultores durante seu ciclo de vida (Abiquim/Detec, 2005).

Desta forma, com a nova regulamentação, os agrotóxicos receberam classificações toxicológicas atualizadas com objetivo de determinar o potencial de periculosidade dos produtos. Além disso, essa regulamentação busca a redução do risco aos trabalhadores pelo contato direto com o produto e também aos consumidores finais dos alimentos, conforme os parâmetros adotados pela Toxicologia Regulatória Moderna do século 21. Contudo, ainda há muito a ser feito, como mais estudos abordando os potenciais efeitos a longo prazo de agrotóxicos para a contribuição ao avanço científico, gerando novas informações para uma melhor elucidação dos mecanismos de toxicidade destes produtos.

CONCLUSÕES

Com base nos objetivos do trabalho e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Os agrotóxicos interferem na resposta imune inata e adaptativa;
- Estudos em células, animais e humanos demonstram a imunotoxicidade dos agrotóxicos na resposta imune celular e humoral;
- Fungicidas, herbicidas e inseticidas alteram o sistema imunológico por vários mecanismos, como fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios;
- A formulação comercial de IMI demonstrou efeito imunomodulador na resposta inflamatória;
- Os efeitos imunotóxicos observados neste estudo estão associados à exposição crônica ao IMI;
- A mitocôndria se mostrou um importante alvo de citotoxicidade do IMI, bem como dos herbicidas CLO, GLI e SUL;
- O sistema imunológico mostrou-se acometido após a exposição a herbicidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Halim, K. Y.; Osman, S. R. Cytotoxicity and oxidative stress responses of imidacloprid and glyphosate in human prostate epithelial WPM-Y. 1 cell line. **Journal of toxicology**, v. 2020, 2020.

Abramov, A. Y. et al. Mechanism of neurodegeneration of neurons with mitochondrial DNA mutations. **Brain**, v. 133, n. 3, p. 797–807, 2010.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa nº 34: Estabelece e divulga a lista de componentes não autorizados para uso em agrotóxicos e similares**. Diário Oficial da União. Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Edição 46, Seção 1, páginas 90-91, Brasília, DF, 29 de julho de 2019c. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-34-de-29-de-julho-de-2019-207941936>. Acessado em 10 de dezembro de 2020.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA). **Dados da coleta e análise de 2010**. Brasília: ANVISA, 2011. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 18 dez. 2016.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada 294: Dispõe sobre os critérios de avaliação e classificação toxicológica, priorizando a análise e comparação da ação toxicológica dos agrotóxicos, componentes, afins e preservativos da madeira, e dá outras providências**. Diário Oficial da União. Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Edição 146, Seção 1, página 78, Brasília, DF, 31 de julho de 2019a. Disponível em: https://www.normasbrasil.com.br/norma/resolucao-294-2019_381153.html. Acessado em 12, dez 2020.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada 295: Dispõe sobre os critérios para avaliação do risco alimentar decorrente da exposição humana a resíduos de agrotóxicos, no âmbito da ANVISA, e dá outras providências**. Diário Oficial da União. Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Edição 146, Seção 1, página 85, Brasília, DF, 31 de julho de 2019b. Disponível em: https://www.normasbrasil.com.br/norma/resolucao-295-2019_381152.html. Acessado em 12 de dez 2020.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Seminário Mercado de Agrotóxico e Classificação**. Brasília: Anvisa, 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+impr+ensa/menu+-+noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agr+otoxicos+em+2012>>. Acesso em: 07 dez. 2020.

AGROFIT. MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Consulta de ingrediente ativo: Imidacloprido**. 2020. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 14 de dez. 2020a.

AGROFIT. MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Consulta de ingrediente ativo: Clomazona.** 2020. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 14 de dez. 2020b.

AGROFIT. MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUARIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Consulta de ingrediente ativo: Sulfentrazona.** 2020. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 14 de dez. 2020c.

Arbo, M. D. et al. In vitro neurotoxicity evaluation of piperazine designer drugs in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, p. 121-130, 2016.

Associação Brasileira da Indústria Química (ABQUIM). Departamento de Assuntos Técnicos (DETEC). **O que é o GHS? Sistema harmonizado globalmente para a classificação e rotulagem de produtos químicos.** São Paulo: ABIQUIM/DETEC, 2005. 69p.

ATCC – American type culture collection THP-1 Catalog Details: TIB-202 [online].

Bastos, L. H. P. et al. Possíveis fontes de contaminação do alimento leite, por agrotóxicos, e estudos de monitoramento de seus resíduos: uma revisão nacional. **Cadernos de Saúde Coletiva, Rio de Janeiro**, v. 19, p. 51-60, 2011.

Benbrook, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, p. 1-15, 2016.

Berges, C. et al. A cell line model for the differentiation of human dendritic cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 333, n. 3, p. 896-907, 2005.

Bizerra, P. F. et al. Imidacloprid affects rat liver mitochondrial bioenergetics by inhibiting FoF1-ATP synthase activity. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 81, p. 229-239, 2018.

Boelsterli, U. A. Disruption of mitochondrial function and mitochondria-mediated toxicity. **Mechanistic Toxicology: The Molecular Basis of How Chemicals Disrupt Biological Targets**, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p. 357-389, 2007.

Bojarski, B.; Witeska, M. Blood biomarkers of herbicide, insecticide, and fungicide toxicity to fish—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 19236-19250, 2020.

Brasil. **Decreto 24.114, de abril de 1934: Aprova o Regulamento de Proteção Fitossanitária.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 de abril de 1934. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1930-1949/D24114.htm. Acessado em 10 de dezembro de 2020.

Brasil. **Instrução Normativa Conjunta nº 2, de 27 de setembro de 2006: Estabelece procedimentos para fins de reavaliação agrônômica ou toxicológica ou ambiental de agrotóxicos, seus componentes e**

semelhantes. Diário Oficial da União. Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. N_188, Seção 1, páginas 126, Brasília, DF.

Brasil. Instrução Normativa nº 3 de 16 de janeiro de 1992. Ministério da Saúde. Ratifica os termos das “Diretrizes e orientações relativas à autorização de registros, renovação de registros e prorrogação do uso de agrotóxicos e afins nº 1 de 12/09/91”. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1992/prt0003_16_01_1992.html. Acessado em 10 de dez 2020.

Brum, A. et al. Hematological and histopathological changes in silver catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes) exposed to clomazone herbicide in the Madre River, Santa Catarina State, Southern Brazil. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 49, p. 169-175, 2014.

Carneiro, F. F. et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** EPSJV/Expressão Popular, 2015.

Casida, J. E.; Durkin, K. A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 99-117, 2013.

Casida, J. E.; Durkin, K. A. Pesticide chemical research in toxicology: lessons from nature. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, p. 94-104, 2017.

Castaneda O. A., et al. Macrophages in Oxidative Stress and Models to Evaluate the Antioxidant Function of Dietary Natural Compounds. **Journal of food and drug analysis**, v. 25, n. 1, p. 111-118, 2017.

Cattaneo, R. et al. Tissue biochemical alterations of *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide containing clomazone under rice-field conditions. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, p. 97-106, 2012.

Caverzan, A. et al. Defenses against ROS in crops and weeds: the effects of interference and herbicides. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 5, p. 1086, 2019.

Cestonaro, L. V. et al. Biochemical, hematological and immunological parameters and relationship with occupational exposure to pesticides and metals. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 29291-29302, 2020.

Chanput W., et al. THP-1 Cell Line: An In Vitro Cell Model for Immune Modulation Approach. **International immunopharmacology**, v. 23, n. 1, p. 37-45, 2014.

Choi, S. E. et al. NF-κB/p53-activated inflammatory response involves in diquat-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. **Environmental Toxicology**, v. 33, n. 10, p. 1005-1018, 2018.

Collotta, M. et al. Epigenetics and pesticides. **Toxicol**, v. 307, p. 35–41, 2013.

Cooper, J.; Dobson, H. Hans. The benefits of pesticides to mankind and the environment. **Crop Protection**, v. 26, p. 1337-1348, 2007.

Corsini, E. et al. Pesticide induced immunotoxicity in humans: a comprehensive review of the existing evidence. **Toxicology**, v. 307, p. 123-135, 2013.

Costas-Ferreira C., et al. Toxic Effects of Glyphosate on the Nervous System: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4605, 2022.

Crestani, M. et al. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. **Chemosphere**, v. 67, p. 2305-2311, 2007.

De Castro, V. L. S. S. et al. Evaluation of neurodevelopmental effects on rats exposed prenatally to sulfentrazone. **Neurotoxicology**, v. 28, p. 1249-1259, 2007.

Del-Ángel, M. et al. Anti-inflammatory effect of natural and semi-synthetic phthalides. **European Journal of Pharmacology**, v. 752, p. 40-48, 2015.

Desforges, J. P. W. et al. Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals. **Environment International**, v. 86, p. 126-139, 2016.

Dhouib, I. et al. From immunotoxicity to carcinogenicity: the effects of carbamate pesticides on the immune system. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 9448-9458, 2016.

Díaz-Resendiz, K. J. G. et al. Modulation of immune response by organophosphorus pesticides: fishes as a potential model in immunotoxicology. **Journal of immunology research**, v. 2015, 2015.

Dos Santos Miron, D. et al. Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v. 74, p. 1-5, 2008.

Dos Santos Miron, D. et al. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 3, p. 398-403, 2005.

El Agrebi, N. et al. Honeybee and consumer's exposure and risk characterization to glyphosate-based herbicide (GBH) and its degradation product (AMPA): Residues in beebread, wax, and honey. **Science of The Total Environment**, v. 704, p. 135312, 2020.

European Crop Protection Association. **Illegal Pesticides**. Disponível em: <https://www.ecpa.eu/stewardship/counterfeit-illegal-pesticides#section3949>. Acesso em 21 de dez 2020.

European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin. **EFSA Journal**, v. 11, p. 3066, 2013a.

European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid. **EFSA Journal**, v. 11, p. 3068, 2013b.

European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam.

EFSA Journal, v. 11, p. 3067, 2013c.

Evrard, E. et al. Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*.

Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 152, p. 321-331, 2010.

Fong C. H., et al. An Antiinflammatory Role for IKKbeta Through the Inhibition of "Classical" Macrophage Activation. **The Journal of experimental medicine**, v. 205, n. 6, p. 1269-1276, 2008.

Forkink, M. et al. Mitochondrial hyperpolarization during chronic complex I inhibition is sustained by low activity of complex II, III, IV and V. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1837, n. 8, p. 1247-1256, 2014.

Förstermann, U.; Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2012.

Fuentes, A. L. et al. Lipopolysaccharide-mediated enhancement of zymosan phagocytosis by RAW 264.7 macrophages is independent of opsonins, laminarin, mannan, and complement receptor 3. **Journal of Surgical Research**, v. 189, n. 2, p. 304-312, 2014.

Franco, R. et al. Molecular Mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: relevance to Parkinson's disease. **Chemical-Biological Interactions**, v. 188, p. 289-300, 2010.

Gangemi, S. et al. Occupational and environmental exposure to pesticides and cytokine pathways in chronic diseases. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 38, p. 1012-1020, 2016.

Gill, R. J. et al. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. **Nature**, v. 491, p. 105-108, 2012.

Gillezeau, C. et al. The evidence of human exposure to glyphosate: a review. **Environmental Health**, v. 18, n. 1, p. 1-14, 2019.

Goetz, F. W. et al. Tumor necrosis factors. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 5, p. 487-497, 2004.

González-Rodríguez, R. M. et al. Occurrence of fungicide and insecticide residues in trade samples of leafy vegetables. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1342-1347, 2008.

Gordon S., Martinez F. O. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, 2010.

Gross, M. EU ban puts spotlight on complex effects of neonicotinoids. 2013.

Guo, C. et al. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. **Neural regeneration research**, v. 8, p. 2003, 2013.

Han, P. et al. Quantification of toxins in a Cry1Ac+ CpTI cotton cultivar and its potential effects on the honey bee *Apis mellifera* L. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 1452-1459, 2010.

Han, W. et al. Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. **Chemosphere**, v. 192, p. 59-65, 2018.

Hao Y., et al. Evaluation of the cytotoxic effects of glyphosate herbicides in human liver, lung, and nerve. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**. v. 59, n. 9, p. 737-744, 2019.

Hao Y., et al. Evaluation of the cytotoxic effects of glyphosate herbicides in human liver, lung, and nerve. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 54, n. 9, p. 737-744, 2019.

Hartley, J. W. et al. Expression of infectious murine leukemia viruses by RAW264. 7 cells, a potential complication for studies with a widely used mouse macrophage cell line. **Retrovirology**, v. 5, p. 1-6, 2008.

Heikal, A. A. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. **Biomarkers in Medicine**, v. 4, p. 241-263, 2010.

Henry, M. et al. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science**, v. 336, p. 348-350, 2012.

<http://www.atcc.org/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=TIB-202>

Hu, L. et al. The association between non-Hodgkin lymphoma and organophosphate pesticides exposure: A meta-analysis. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 319-328, 2017.

Jeschke, P. et al. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2897-2908, 2011.

Kanissery, R. et al. Glyphosate: Its environmental persistence and impact on crop health and nutrition. **Plants**, v. 8, p. 499, 2019.

Kaur G., et al. Exposures to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid with or without endotoxin upregulate small cell lung cancer pathway. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2021.

Kim, K. H. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 525-535, 2017.

Lebailly, P. et al. DNA damage in B and T lymphocytes of farmers during one pesticide spraying season. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 88, p. 963-972, 2015.

Lee, G. H.; Choi, K. C. Adverse effects of pesticides on the functions of immune system. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, p. 108789, 2020.

Liu Y. C., et al. Macrophage polarization in inflammatory diseases. **International journal of biological sciences**, v. 10, n. 5, p. 520, 2014.

Liu, Q. et al. Organochloride pesticides impaired mitochondrial function in hepatocytes and aggravated disorders of fatty acid metabolism. **Scientific**

reports, v. 7, p. 1-11, 2017.

Luz, A. L. et al. The high-production volume fungicide pyraclostrobin induces triglyceride accumulation associated with mitochondrial dysfunction, and promotes adipocyte differentiation independent of PPAR γ activation, in 3T3-L1 cells. **Toxicology**, v. 393, p. 150-159, 2018.

Ma, J.; Li, X. Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. **Chemosphere**, v. 128, p. 293-298, 2015.

Manassas, EUA. 2006. [Acessado em 2022]. Disponível em:

Martinez A., Al-Ahmad A. J. Effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid on an isogenic model of the human blood-brain barrier. **Toxicology Letters**. V. 304, p. 39–49, 2019.

Martinez F. O.; Gordon S. The M1 and M2 Paradigm of Macrophage Activation: Time for Reassessment. **F1000prime reports**, v. 6, 2014

Merly, L.; Smith, S. L. Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something? **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 39, p. 55-58, 2017.

Mokarizadeh, A. et al. A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 25, p. 258-278, 2015.

Moraes, B. S. et al. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v. 68, p. 1597-1601, 2007.

Morán, J. M. et al. Nitric oxide in paraquat-mediated toxicity: A review. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 24, n. 6, p. 402-409, 2010.

Mostafalou, S.; Abdollahi, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, n. 2, p. 157–177, 2013.

Murray P. J.; Wynn T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews immunology**, v. 11, n. 11, p. 723-737, 2011.

Murussi, C. R. et al. Integrated assessment of biomarker response in carp (*Cyprinus carpio*) and silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to clomazone. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, p. 646-654, 2015.

Nareshkumar, B. et al. Imidacloprid impedes mitochondrial function and induces oxidative stress in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* larvae (Hubner: Noctuidae). **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 50, p. 21-32, 2018.

Nascimento, S. et al. Environmental exposure and effects on health of children from a tobacco-producing region. **Environmental Science and**

Pollution Research, v. 24, p. 2851-2865, 2017.

Nascimento, S. et al. Exposure to environment chemicals and its possible role in endocrine disruption of children from a rural area. **Environmental Research**, v. 167, p. 488-498, 2018.

Nassef, M. Immunobiochemical modulations caused by clomazone in Swiss albino mice. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 78, p. 1-8, 2017.

Navegantes K. C, et al. Immune Modulation of Some Autoimmune Diseases: The Critical Role of Macrophages and Neutrophils in the Innate and Adaptive Immunity. **J Transl Med**. v. 15, n. 1 p. 1-21, 2017.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6 ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1119 p, 2005.

Nicodemo, D. et al. Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 33, p. 2070-2075, 2014.

Ollerton, J. et al., How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, p. 321-326, 2011.

Peillex C., Pelletier M. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. **Journal of Immunotoxicology**. v. 17, n. 1, p. 163-174, 2020.

Peillex, C.; Pelletier, M. The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. **Journal of Immunotoxicology**, v. 17, n. 1, p. 163-174, 2020.

Pereira, A. G. et al. Low-concentration exposure to glyphosate-based herbicide modulates the complexes of the mitochondrial respiratory chain and induces mitochondrial hyperpolarization in the *Danio rerio* brain. **Chemosphere**, v. 209, p. 353-362, 2018.

Pereira, L. et al. Hematological and biochemical alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, p. 1-8, 2013.

Phelan, K.; May, K. M. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. **Current protocols in cell biology**, v. 66, n. 1, p. 1.1. 1-1.1. 22, 2015.

Pignati, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3281-3293, 2017.

Pirsaheb, M. et al. Organochlorine pesticides residue in breast milk: a systematic review. **Medical Journal of the Islamic Republic of Iran**, v. 29, p. 1-10, 2015.

Pisa, L. W. et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 68-102, 2015.

Ratanachina J., et al. Pesticide exposure and lung function: a systematic review and meta-analysis. **Occupational Medicine**, v. 70, n. 1, p. 14-23, 2020.

Rondeau, G. et al. Delayed and time-cumulative toxicity of imidacloprid in bees, ants and termites. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-8, 2014.

Rundlöf, M. et al. Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. **Nature**, v. 521, p. 77-80, 2015.

Savan, R.; Sakai, M. Presence of multiple isoforms of TNF alpha in carp (*Cyprinus carpio* L.): genomic and expression analysis. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 1, n. 17, p. 87-94, 2004.

Shaffo, F. C. et al. Mechanisms of organophosphorus pesticide toxicity in the context of airway hyperreactivity and asthma. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 315, p. L485-L501, 2018.

Shiratori H., et al. THP-1 and Human Peripheral Blood Mononuclear Cell-Derived Macrophages Differ in Their Capacity to Polarize In Vitro. **Molecular immunology**, v. 88, p. 58-68, 2017.

Sica A.; Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas.

The Journal of clinical investigation, v. 122, n. 3, p. 787-795, 2012.

Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. **Dados de produção e consumo de agrotóxicos**. 2011. Disponível em: <www.sindag.com.br>. Acesso em: 20 dez. 2016.

Stokes R. W.; Doxsee D. The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the Macrophage-like cell line THP-1: A comparison with human monocyte-derived macrophages. **Cell Immunol.** v. 197, p. 1-9, 1999.

Strilbytska O. M., et al. The effects of low-toxic herbicide Roundup and glyphosate on mitochondria. **EXCLI journal**, v. 21, p. 183, 2022.

Taghavian, F. et al. Comparative toxicological study between exposed and non-exposed farmers to organophosphorus pesticides. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 18, p. 89, 2016.

Teeters, B. S. et al. Using video-tracking to assess sublethal effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, p. 1349-1354, 2012.

Theus S. A.; Cave M. D.; Eisenach K. D. Activated THP-1 cells: an attractive model for the assessment of intracellular growth rates of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. **Infect Immun.** v. 72, n. 2, p. 1169-1173, 2004.

Tomizawa, M.; Casida, J. E. Unique neonicotinoid binding conformations conferring selective receptor interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2825-2828, 2011.

Tóth, G., et al. Cytotoxicity and hormonal activity of glyphosate-based herbicides. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 115027, 2020.

Tracey, K. J.; Cerami, A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. **Annual review of cell biology**, v. 9, n. 1, p. 317-343, 1993.

Truzzi, F. et al. Comparative Evaluation of the Cytotoxicity of Glyphosate-Based Herbicides and Glycine in L929 and Caco2 Cells. **Frontiers in Public**

Health, v. 9, p. 643898, 2021.

Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **Int. J. Cancer**. v. 26, p. 171-176, 1980.

Walpole, S. C. et al. The weight of nations: an estimation of adult human biomass. **BMC Public Health**, v. 12, p. 1-6, 2012.

Winstone, J. K. et al. Glyphosate infiltrates the brain and increases pro-inflammatory cytokine TNF α : implications for neurodegenerative disorders. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2022.

Wu, J. Y. et al. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. **PloS One**, v. 6, p. e14720, 2011.

Yang, E. C. et al. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. **PloS One**, v. 7, p. e49472, 2012.

Zhang L., et al. Exposure to Glyphosate-Based Herbicides and Risk for Non-Hodgkin Lymphoma: A Meta-Analysis and Supporting Evidence. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**. v. 781, p. 186-206, 2019.

Zhao, G. et al. Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 336, n. 3, p. 909-917, 2005.