UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos herbicidas tebutiuram e trifluralina e de seus efeitos na expressão de genes de resposta ao estresse celular

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Mariana Furio Franco Bernardes

Orientador: Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 09/05/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Franco-Bernardes, Mariana Furio

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos herbicidas tebutiuram e trifluralina e de seus efeitos na expressão de genes de resposta ao estresse celular. Ribeirão Preto, 2016.

139p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Dorta, Daniel Junqueira.

1. Praguicidas. 2. HepG2. 3. Morte celular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mariana Furio Franco Bernardes

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos herbicidas tebutiurum e trifluralina e de seus efeitos na expressão de genes de resposta ao estresse celular

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Junqueira
Dorta

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta tese...

Ao meu esposo, amor da minha vida Leandro Lazzarin Bernardes, que esteve ao meu lado durante toda jornada do meu doutorado, me incentivando e aconselhando. Obrigada pelo suporte e compreensão, principalmente no período em que ficamos longe um do outro durante a realização deste trabalho. Seu companheirismo sempre presente me ajudou a superar as dificuldades pelo caminho. Te amo!

Aos meu pais Uidelson José Franco e Nadir Furio Franco, que me proporcionaram um alicerce concreto baseado na honestidade, sobre o qual foi possível construir toda minha formação. Obrigada por apoiarem as minhas decisões e me oferecerem as ferramentas que me permitiram trilhar o caminho que escolhi. E ao meu irmão Lucas Furio Franco, que dividiu comigo as primeiras experiências da vida. Apesar das nossas diferenças, sempre teremos muito em comum.

Agradecimentos

Agradecer é uma demonstração de carinho e reconhecimento, é saber a importância de como, cada um, a sua maneira, contribuiu para a realização deste trabalho.

À meu orientador Prof. Dr. Daniel Junqueira Dorta, por abrir as portas de seu laboratório e compartilhar comigo seus conhecimentos sobre toxicologia, me incentivando no caminho da ciência e contribuindo para o meu crescimento. Obrigada pelas oportunidades e pelos ensinamentos!

À Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira, primeira docente com quem tive contato na USP, pela parceria e por me receber tão bem em seu laboratório. Agradeço também pelos conselhos e ensinamentos, que contribuíram grandemente para a minha formação.

À Prof. Dr. Kendall B Wallace, por me acolher em seu laboratório e em seu país, me orientando pacientemente e carinhosamente. Obrigada pelos conhecimentos e valores transmitidos.

Às professores, técnicos e alunos Dr Matthew Slattery, Dr. Sarah Lacher, Dr Kendra Nordgren, e Cheryl Zehowski, por me auxiliarem durante o estágio no exterior, pela parceria e amizade.

À Prof. Dr. Carlos Palmeira, pelas visitas ao Brasil e pela enorme atenção durante as reuniões de laboratório, que tanto acrescentaram para este trabalho.

Aos companheiros de laboratório Leka, Gisele, Murilo, Tati, Bárbara, Raissa, Raul, Vítor, Elisa e Janaina, pela ajuda no laboratório e pelas conversas, científicas ou não. Um agradecimento especial à Alana, pela colaboração dedicada e paciente. Obrigada por tornarem meus dias mais alegres.

As minhas companheiras de laboratório e amigas Lillian e Maria Júlia (Maju), pela colaboração direta nesse trabalho e pelos momentos de descontração, que me tornam mais feliz.

A Giovana Martorano, a quem tive a oportunidade e o prazer de co-orientar, e com quem também aprendi. Agradeço sua contribuição para este trabalho e os bons momentos de convivência.

Aos alunos da Profa. Dra. Danielle P de Oliveira, Flávia, Cibele, Camila, por dividirem comigo o espaço do laboratório por tantas vezes, pelo acolhimento e pelas conversas. Um agradecimento especial para o Otávio e para a Gabriela (Gabi), pela colaboração e companheirismo. Um agradecimento especial também ao Klaus, pela ajuda e disponibilidade sempre.

Aos professores Dr. Carlos Curti e Dra. Lúcia Fascioli, pela disponibilização de equipamentos utilizados neste trabalho. Agradeço também à Fabiana, pelo uso e manuseio do citômetro.

Aos funcionários da FCFRP e da FFCLRP, em especial à Rosana e à Rosemary Gerolineto, pela disponibilidade, atenção e carinho.

A Rhonda Peterson, que me recebeu durante o estágio no exterior, me incluiu em sua família, e ajudou a tornar esse período muito especial.

As minhas amigas da USP Gisele, Larissa, e Nádia, pelos bons momentos, principalmente nos horários do almoço. E aos meus amigos de fora da comunidade da USP, que tanto me fizeram feliz e motivada.

A minha família: tios, tias, primos, avós, sogros e cunhados, pelo suporte que tanto preciso para seguir em frente.

A agência de fomento Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido no país (2012/15220-3) e no exterior (2014/02170-3).

Agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

Eu jamais iria para a fogueira por uma opinião minha, afinal, não tenho certeza alguma. Porém, eu iria pelo direito de ter e mudar de opinião, quantas vezes eu quisesse.

Friedrich Nietzsche

RESUMO

FRANCO-BERNARDES, M. F. A. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos herbicidas tebutiurum e trifluralina e de seus efeitos na expressão de genes de resposta ao estresse celular.** 2016. 139f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Os herbicidas são destinados ao controle das ervas daninhas e seu uso torna o fornecimento de alimentos abundante e livre de pragas, porém a exposição ocupacional e ambiental a esses compostos pode trazer riscos à saúde. O Brasil é o maior consumidor de praguicidas desde 2008, e os herbicidas correspondem por 45% do volume dessas substâncias. O tebutiurum e a trifluralina são herbicidas muito utilizados em culturas de cana-de-açúcar, e apesar de serem descritos como seletivos em seu mecanismo de ação, seus efeitos em organismos não alvo, como células humanas, são pouco conhecidos. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos dos herbicidas tebutiuron e trifluralina em organismos não alvo. Para isso, utilizou-se a linhagem celular HepG2, e as concentrações testadas dos herbicidas foram de 1 a 100 $\mu\text{mol/L}$ e o tempo de exposição variou de 4 h à 14 dias de acordo com o ensaio. Utilizou-se também as linhagens TA98 TA100, TA97a e TA1535 da bactéria *S typhimurium*. Neste caso, as concentrações testadas dos herbicidas variaram de 0,1 à 5000 $\mu\text{g/placa}$ e o tempo de exposição foi de 66 h. As análises indicaram que o tebutiurum não apresenta potencial citotóxico, genotóxico, ou mutagênico nas condições testadas, evidenciando sua seletividade. Testes com a trifluralina, no entanto, mostraram que HepG2 apresentaram uma diminuição da capacidade em formar clones quando expostas à 100 $\mu\text{mol/L}$ por 14 dias, e uma redução na densidade celular quando expostas à 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ por 24, 48 e 72h. Tais efeitos ocorreram devido a uma diminuição da viabilidade celular, observada em 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ pelo ensaio MTT, e devido a um bloqueio no ciclo celular na fase S, evidenciado em 100 $\mu\text{mol/L}$, ambos nos tempos de 24, 48 e 72h. O tipo de morte celular inicialmente observada foi a apoptose, através da marcação por anexina V em 100 $\mu\text{mol/L}$ após 48 e 72 h de exposição, e através da condensação e fragmentação nuclear em 100 $\mu\text{mol/L}$ após 24 e 48 h de exposição. Em 72 h, observou-se também necrose em 100 $\mu\text{mol/L}$, por meio dos testes anexina V/PI e liberação de LDH. A morte celular pode estar relacionada à diminuição do potencial de membrana mitocondrial, observada em 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ após 24, 48 e 72h, e a um aumento na produção de espécies reativas, efeito observado em células expostas à 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina por 24 e 48 h. No entanto, observou-se que a via de resposta ao estresse oxidativo Keap1/Nrf2-ARE não foi ativada no tempo analisado de 24 h. Além disso, os testes de cometa e micronúcleo não indicaram potencial da trifluralina em provocar danos no material genético de HepG2. Complementarmente, o teste de Ames em linhagens de *S typhimurium* também não evidenciaram potencial mutagênico do herbicida. As análises com a trifluralina mostraram que o herbicida, apesar de não induzir genotoxicidade e mutagenicidade, possui potencial citotóxico em HepG2, indicando que pode afetar organismos não alvo, como células humanas.

Palavras-chave: Praguicidas; HepG2; *Salmonella typhimurium*; apoptose; necrose

ABSTRACT

FRANCO-BERNARDES, M. F. **Evaluation of cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity of the herbicides tebuthiuron and trifluralin and its effects on expression of cellular stress responses genes.** 2016. 139f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Herbicides are used to control weeds in agriculture. The use of these chemicals makes possible an abundant and pest free supply of food. However, occupational and environmental exposure to these compounds can lead to health risks. Brazil is the largest consumer of pesticides since 2008, and herbicides match for 45% of the volume of these substances. The tebutiurum and trifluralin herbicides are widely used in sugarcane crops, and although they are described as selective in its mechanism of action, effects on non-target organisms, such as human cells, are are poorly known. The aim of this work was to evaluate the effects of tebuthiuron and trifluralin herbicides on non-target organisms. To this end, we used the cell line HepG2, and herbicides were tested at concentrations of 1 to 100 μM and the exposure time ranged from 4 h to 14 days in accordance with the assay. We also used the strains TA100 TA98, TA97a and TA1535 of the bacterium *S. typhimurium*. In this case, the herbicide concentrations tested ranged from 0.1 to 5000 μg / plate and the exposure time was 66 h. Analyzes indicated that the tebutiurum has no cytotoxic, genotoxic or mutagenic potential at tested conditions, highlighting its selectivity. Tests with the Trifluralin, however, showed that HepG2 had a decreased ability in forming clones when exposed to 100 μM for 14 days, and a reduction in cell density when exposed to 50 and 100 μM of the herbicide for 24, 48 and 72h. These effects occurred due a decrease in cell viability observed at 50 and 100 μM by MTT assay, and due to a block in the cell cycle into S phase, as evidenced in 100 μM , both at 24, 48 and 72h. The type of cell death detected first was apoptosis. It was observed by staining with annexin V in cells exposed to 100 μM of trifluralin during 48 and 72 h, and through the nuclear condensation and fragmentation in exposure with 100 μM during 24 and 48 h of exposure. At 72 h, necrosis was also observed in 100 μM through the annexin V / PI and LDH assays. Cell death occurrence may be associated with decreased mitochondrial membrane potential observed in 50 and 100 μM after 24, 48 and 72h of exposure, and also may be associated with incresed production of reactive species, observed in cells exposed to 100 μM of trifluralin for 24 and 48 h. However, it was observed that the oxidative stress response pathway Keap1 / Nrf2-ARE was not activated within 24 hours. Furthermore, comet assay and micronucleus test indicated no potential of trifluralin in causing DNA damage of HepG2. In addition, the Ames test using *S. typhimurium* strains also showed no mutagenic potential of the herbicide. The analyzes showed that the trifluralin, despite not induce genotoxicity and mutagenicity, have cytotoxic potential in HepG2, indicating that can affect non-target organisms, such as human cells.

Keywords: Pesticides; HepG2; *Salmonella typhimurium*; apoptosis; necrosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do herbicida tebutiurum	3
Figura 2. Esquema mostrando a interferência de praguicidas no transporte de elétrons do fotossistema II (FSII).....	4
Figura 3. Estrutura química do herbicida trifluralina	5
Figura 4. Células HepG2 em garrafas de cultura, e vistas sob microscópio óptico invertido.....	9
Figura 5. Colônias de <i>Salmonella Typhimurium</i> formadas por revertentes espontâneos da TA 100	10
Figura 6. Fases do ciclo celular.....	12
Figura 7. Características morfológicas da apoptose	13
Figura 8. Características bioquímicas da apoptose.....	15
Figura 9. Vias extrínseca e intrínseca de regulação de morte celular por apoptose.	16
Figura 10. Características morfológicas da necrose	17
Figura 11. Danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio e / ou nitrogênio (ERONs).....	18
Figura 12. Esquema mostrando o Sistema de Defesa Antioxidante	19
Figura 13. Esquema mostrando a Via Keap1/Nrf2-ARE.....	21
Figura 14. Fluxograma dos eventos de Genotoxicidade e mutagenicidade	22
Figura 15. Imagem dos nucleóides formando cometas com diferentes graus de dano ao DNA.....	23
Figura 16. Micronúcleo a partir de fragmentação ou perda de cromossomo.....	24
Figura 17. Efeito do tebutiurum sobre a sobrevivência de HepG2 avaliada pelo ensaio clonogênico.....	69
Figura 18. Imagem da sobrevivência das colônias de HepG2 expostas ao tebutiurum avaliada pelo ensaio clonogênico.....	69
Figura 19. Efeito da trifluralina sobre a sobrevivência de HepG2 avaliada pelo ensaio clonogênico.....	70
Figura 20. Imagem da sobrevivência das colônias de HepG2 expostas à trifluralina avaliada pelo ensaio clonogênico.....	70

Figura 21. Efeito do tebutiurum sobre a proliferação de HepG2 avaliada pelo ensaio SRB.	72
Figura 22. Efeito da trifluralina sobre a proliferação de HepG2 avaliada pelo ensaio SRB.	72
Figura 23. Efeito do tebutiurum sobre a viabilidade de HepG2 avaliada pelo ensaio de MTT.	74
Figura 24. Efeito da trifluralina sobre a viabilidade de HepG2 avaliada pelo ensaio de MTT.	74
Figura 25. Representação da localização das células expostas ao tebutiurum por 24 h quanto às fases do ciclo celular.	75
Figura 26. Representação da localização das células expostas ao tebutiurum por 48 h quanto às fases do ciclo celular.	76
Figura 27. Representação da localização das células expostas ao tebutiurum por 72 h quanto às fases do ciclo celular.	77
Figura 28. Representação da localização das células expostas à trifluralina por 24h quanto às fases do ciclo celular.	78
Figura 29. Representação da localização das células expostas à trifluralina por 48h quanto às fases do ciclo celular.	79
Figura 30. Representação da localização das células expostas à trifluralina por 72h quanto às fases do ciclo celular.	80
Figura 31. Representação da localização das células expostas ao tebutiurum por 24 h nos quadrantes no experimento com Anexina V e Iodeto de propídio.	81
Figura 32. Representação da localização das células expostas ao tebutiurum por 48 h nos quadrantes no experimento com Anexina V e Iodeto de propídio.	82
Figura 33. Representação da localização das células expostas ao tebutiurum por 72 h nos quadrantes no experimento com Anexina V e Iodeto de propídio.	83
Figura 34. Representação da localização das células expostas à trifluralina por 24h nos quadrantes no experimento com Anexina V e Iodeto de propídio.	85
Figura 35. Representação da localização das células expostas à trifluralina por 48h nos quadrantes no experimento com Anexina V e Iodeto de propídio.	86
Figura 36. Representação da localização das células expostas à trifluralina por 72h nos quadrantes no experimento com Anexina V e Iodeto de propídio.	87
Figura 37. Efeito do tebutiurum sobre a condensação e fragmentação nuclear de HepG2.	89

Figura 38. Imagens de células coradas com Hoechst sob microscopia de fluorescência após exposição ao tebutiurô por 24 horas.....	90
Figura 39. Imagens de células coradas com Hoechst sob microscopia de fluorescência após exposição ao tebutiurô por 48 horas.....	91
Figura 40. Efeito da trifluralina sobre a condensação e fragmentação nuclear de HepG2.....	92
Figura 41. Imagens de células coradas com Hoechst sob microscopia de fluorescência após exposição à trifluralina por 24 horas.....	93
Figura 42. Imagens de células coradas com Hoechst sob microscopia de fluorescência após exposição à trifluralina por 48 horas.....	94
Figura 43. Efeito do tebutiurô sobre o potencial de membrana mitocondrial de HepG2.....	96
Figura 44. Efeito da trifluralina sobre o potencial de membrana mitocondrial de HepG2.....	96
Figura 45. Efeito do tebutiurô sobre a atividade da LDH extracelular de HepG2	98
Figura 46. Efeito da trifluralina sobre a atividade da LDH extracelular de HepG2	98
Figura 47. Efeito do tebutiurô no acúmulo de espécies reativas em HepG2. ...	100
Figura 48. Efeito da trifluralina no acúmulo de espécies reativas em HepG2. ...	100
Figura 49. Efeito do tebutiurô e da trifluralina na transcrição do gene NQO1 em HepG2.....	101
Figura 50. Efeito do tebutiurô e da trifluralina na ativação da sequência ARE em HepG2.....	102
Figura 51. Efeito do tebutiurô sobre o DNA de HepG2 avaliado pelo ensaio cometa.....	103
Figura 52. Efeito da trifluralina sobre o DNA de HepG2 avaliado pelo ensaio cometa.....	103
Figura 53. Efeito do tebutiurô sobre o Índice de Divisão Nuclear (IDN) em HepG2	104
Figura 54. Efeito do tebutiurô sobre a formação de micronúcleos em HepG2.....	104
Figura 55. Efeito da trifluralina sobre o Índice de Divisão Nuclear (IDN) em HepG2.....	105
Figura 56. Efeito da trifluralina sobre a formação de micronúcleos em HepG2.	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do tebutiurum sobre o ciclo celular de HepG2 em 24 h.....	75
Tabela 2. Efeito do tebutiurum sobre o ciclo celular de HepG2 em 48 h.....	76
Tabela 3. Efeito do tebutiurum sobre o ciclo celular de HepG2 em 72 h.....	77
Tabela 4. Efeito da trifluralina sobre o ciclo celular de HepG2 em 24 h.	78
Tabela 5. Efeito da trifluralina sobre o ciclo celular de HepG2 em 48 h.	79
Tabela 6. Efeito da trifluralina sobre o ciclo celular de HepG2 em 72 h..	80
Tabela 7. Efeito do tebutiurum sobre a indução de morte celular em HepG2 avaliada pelo ensaio Anexina V/PI em 24 h.	81
Tabela 8. Efeito do tebutiurum sobre a indução de morte celular em HepG2 avaliada pelo ensaio Anexina V/PI em 48 h.	82
Tabela 9. Efeito do tebutiurum sobre a indução de morte celular em HepG2 avaliada pelo ensaio Anexina V/PI em 72 h.	83
Tabela 10. Efeito da trifluralina sobre a indução de morte celular em HepG2 avaliada pelo ensaio Anexina V/PI em 24 h.	85
Tabela 11. Efeito da trifluralina sobre a indução de morte celular em HepG2 avaliada pelo ensaio Anexina V/PI em 48 h.	86
Tabela 12. Efeito da trifluralina sobre a indução de morte celular em HepG2 avaliada pelo ensaio Anexina V/PI em 72 h.	87
Tabela 13. Efeito do tebutiurum sobre a mutagenicidade em <i>Salmonella typhimurium</i>	108
Tabela 14. Efeito da trifluralina sobre a mutagenicidade em <i>Salmonella typhimurium</i>	109

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A+:	Marcação positiva para Anexina
AI-1:	Ativador da sequência ARE
ANOVA:	Análise de variância
ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARE:	Elemento de resposta antioxidante (<i>Antioxidant response element</i>)
ATCC:	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP:	Adenosina trifosfato
BN:	Células binucleadas
CA ²⁺ :	Íon cálcio
CAT:	Enzima catalase
CCCP:	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
cDNA:	DNA complementar (<i>complementar desoxirribonucleic acid</i>)
CM-H ₂ DCFDA:	Clorometil derivado do 2', 7'-diacetato diclorodihidrofluoresceína
CYP:	Citocromo P450
DCF:	2',7'-diclorofluoresceína
DCFH ₂	2',7'- diclorodihidrofluoresceína
DL50:	Dose letal 50 (Dose letal à 50% dos indivíduos testados)
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO:	Dimetil sulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ERONS:	Espécies Reativas de oxigênio e nitrogênio
FSII:	Fotossistema II
GPx:	Enzima glutatona peroxidase

GSH:	Glutationa em sua forma reduzida
GSSG:	Glutationa em sua forma oxidada
GST:	Enzima glutatona-S-transferase
HeLa:	Linhagem celular derivada de um tumor de colo de útero
HepG2:	Linhagem celular - <i>Human hepatocellular carcinoma cells</i>
His-:	Auxotrofia para histidina
H ₂ H ₂ :	Peróxido de hidrogênio
IDN:	Índice de divisão nuclear
Keap1:	Proteína <i>kelch-like ECH-associated protein 1</i>
LDH:	Lactato desidrogenase
LDHA:	Lactato desidrogenase
MEM:	Meio mínimo essencial (<i>Minimum Essential Medium</i>)
MMS:	Metilmetano Sulfonato
MN:	Micronúcleo
MTT:	Brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2-il) – 2,5 difenil tetrazolium
NAD ⁺ :	Nicotinamida-adenina dinucleotídio em sua forma oxidada
NADP:	Nicotinamida-adenina dinucleotídio-fosfato
NADPH:	Nicotinamida-adenina dinucleotídio-fosfato em sua forma reduzida
NQO1:	Quinona oxidoredutase 1
Nrf2:	Fator de transcrição <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
n° CAS:	Número de registro no <i>Chemical Abstracts Service</i>
OECD:	Organisation for Economic Co-operation and Development
O ₂ •-:	Radical ânion superóxido
•OH:	Radical hidroxila
PBS:	Tampão Fosfato-salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)

PCR:	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase chain reaction</i>)
PI:	Iodeto de propídio
PI+	Marcação positiva para Iodeto de Propídio
PS:	Fosfolipídio Fosfatidilserina (<i>Phospholipid Phosphatidylserine</i>)
P680:	Complexo P680
P680*:	Complexo P680 excitado
QA:	Quinina A
QB:	Quinina B
qPCR:	PCR quantitativa (<i>quantitative Polimerase Chain Reaction</i>)
q. s. p.	Quantidade suficiente para
RNA:	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RT-PCR:	Transcriptase reversa – Reação em cadeia da polimerase
SOD:	Enzima superóxido dismutase
SRB:	Sulforodamina B
TMRM:	Tetrametilrodamina metil ester
t-BOOH:	Terc-butil hidroperóxido
TPM:	Transição de permeabilidade mitocondrial
$\Delta\psi$:	Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Herbicidas	1
1.2 Linhagens celulares para realização de testes <i>in vitro</i>	7
1.3 Proliferação, sobrevida, e morte celular	11
1.4 Estresse oxidativo	18
1.5 Genotoxicidade e mutagenicidade	21
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Herbicidas utilizados e concentrações testadas	28
3.2 Cultivo, tripsinização e plaqueamento de HepG2.....	29
3.3 Ensaio de proliferação e morte celular	33
3.3.1 Ensaio clonogênico	33
3.3.2 Ensaio com o corante sulforodamina B (SRB)	34
3.3.3 Ensaio com o corante brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolium (MTT).	35
3.3.4 Análise do ciclo celular	37
3.3.5 Teste com o marcador Anexina V/PI	38
3.3.6 Análise de Condensação e fragmentação nuclear	41
3.3.7 Análise do Potencial de membrana mitocondrial.....	42
3.3.8 Análise da liberação de LDH	44
3.4 Ensaio de estresse oxidativo	46
3.4.1 Determinação do acúmulo de espécies reativas	46
3.4.2 RT-PCR quantitativo - Análise do gene <i>NQO1</i>	48
3.4.3 Ensaio repórter – Sequência ARE.....	53

3.5 Ensaio de genotoxicidade / mutagenicidade	54
3.5.1 Ensaio cometa.....	55
3.5.2 Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese	58
3.5.3 Teste <i>Salmonella</i> /microsoma	61
3.6 Análise estatística.....	66
3.6.1 Ensaio com HepG2.....	66
3.6.2 Teste <i>Salmonella</i> /microsoma	67
4 RESULTADOS.....	68
4.1 Proliferação, sobrevivência, e morte celular	68
4.1.1 Ensaio clonogênico	68
4.1.2 Ensaio com o corante SRB	71
4.1.3 Ensaio com o corante MTT	73
4.1.4 Análise do ciclo celular	75
4.1.5 Teste com o marcador Anexina V/PI	81
4.1.6 Análise de Condensação e fragmentação nuclear	88
4.1.7 Análise do Potencial de membrana mitocondrial.....	95
4.1.8 Análise de liberação de LDH	97
4.2 Estresse oxidativo	99
4.2.1 Determinação do acúmulo de espécies reativas	99
4.2.2 RT-PCR quantitativo - Análise do gene NQO1.....	101
4.2.3 Ensaio repórter – Sequência ARE.....	102
4.3 Genotoxicidade e mutagenicidade	103
4.3.1 Ensaio cometa.....	103
4.3.2 Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese	104
4.3.3 Teste <i>Salmonella</i> /microsoma	106
5 DISCUSSÃO	110
5.1 Proliferação, sobrevivência, e morte celular	110
5.2 Estresse oxidativo	116
5.3 Genotoxicidade e mutagenicidade	119
6 CONCLUSÕES	123
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

1 INTRODUÇÃO

1.1 Herbicidas

Os contaminantes emergentes compreendem uma nova categoria de substâncias que, podem ser recentes (sintetizadas a pouco tempo) ou não, naturais ou sintéticas, cujos estudos sobre os efeitos ou presença no ambiente são pouco conhecidos. Muitos não estão incluídos em programas de monitoramento ou inseridos em legislação de controle ambiental. Ocorrem no ar, solo e água, podendo atingir seres humanos, e nos últimos anos essa categoria tem atraído atenção de grupos como pesquisadores e indústrias (YAN et al., 2010)

As principais classes de contaminantes emergentes incluem produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal, plastificantes, retardantes de chama, surfactantes, nanomateriais, e praguicidas (PEREIRA et al., 2015). Os praguicidas, popularmente conhecidos como agrotóxicos, são definidos segundo a Lei Federal nº 7. 802 de 11/07/1989 (BRASIL, 1989), como:

- a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;
- b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Muitos benefícios em relação à saúde pública têm sido realizados com o uso de praguicidas. O fornecimento de alimentos tornou-se mais abundante e livre de pragas, e a ocorrência de doenças transmitidas por vetores foi reduzida drasticamente. Apesar dos benefícios dos praguicidas, seu potencial impacto sobre o ambiente e a saúde pública é substancial (BARR e NEEDHAM, 2002). Alguns praguicidas podem persistir no ambiente, permanecendo no local por anos. A contaminação ambiental ou o uso ocupacional dessas substâncias pode expor a população à resíduos de praguicidas, incluindo seus produtos de degradação presentes no ar, água e alimentos (MOSTAFALOU e ABDOLLAHI, 2013; FRANCO-BERNARDES et al., 2015).

Praguicida é um termo utilizado para agrupar classes de compostos que atuam como herbicidas (controlam plantas daninhas), inseticidas (usado no controle de insetos), fungicidas (controlam fungos), nematicidas (controlam nematóides) e acaricidas (usados no controle de ácaros), dentre outros (RODRIGUES e ALMEIDA, 2005).

Os herbicidas são produtos químicos fitotóxicos utilizados para a inibição do crescimento ou destruição de diversas ervas daninhas. Estas podem ser definidas como plantas que crescem onde não são desejadas. Esta definição possui uma perspectiva antropocêntrica e não é adequada para discussão de ecossistemas. O termo “ervas daninhas no presente trabalho se refere a espécies de plantas que interferem com a produção de culturas, e que se não forem controladas, causam perdas na produção agrícola (NORRIS e KOGAN, 2005).

A aplicação de herbicidas em solos agrícolas é uma prática bem estabelecida e eficaz no controle do crescimento destas plantas (GUPTA, 2007). Devido à extensão da agricultura intensiva em todo o mundo, durante os últimos 30 anos, as variedades e quantidades de herbicidas utilizados para melhorar o rendimento das culturas aumentaram consideravelmente. Dessa forma, eles tornaram-se alguns dos poluentes orgânicos que ocorrem mais frequentemente em águas naturais e, portanto, grande preocupação tem surgido sobre os seus possíveis efeitos sobre a saúde humana e do ambiente (BENITEZ et al., 2006).

O Brasil tem sido o maior consumidor mundial de praguicidas desde 2008, seguido pelos Estados Unidos. Em 2010, o consumo dessas substâncias no Brasil aumentou em 190%, uma taxa de crescimento correspondente a mais do dobro da taxa de crescimento global de mercado no mesmo ano (93%) (RIGOTTO et al., 2014). O consumo brasileiro de praguicidas foi de 936 mil toneladas na safra 2010/2011. Este valor correspondeu a US\$ 8,5 bilhões em transações financeiras envolvendo dez empresas que controlam 75% do mercado de agrotóxicos no país (ANVISA, 2013; RIGOTTO et al., 2014). Herbicidas respondem por 45% do volume de praguicidas consumidos no Brasil, seguido por fungicidas (14%) e inseticidas (12%) (RIGOTTO et al., 2014).

Para identificar os herbicidas é útil agrupá-los de acordo com sua estrutura química básica e com seu mecanismo de atuação nas plantas. Considera-se que o mecanismo de ação diz respeito ao primeiro ponto do metabolismo das plantas onde o herbicida atua.

O tebutiurum, de nome químico 1-(5-Tert-butil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1,3-dimetilurea, é um herbicida pré emergente seletivo para o controle de plantas daninhas. A definição de pré e pós emergente está relacionada ao momento da aplicação do produto químicos. Herbicidas pré emergentes são aplicados antes do desenvolvimento das plantas daninhas, e pós emergentes são aplicados após a emergência das plantas daninhas. O tebutiurum pertence ao grupo químico das uréias substituídas (Fig. 1) e seu mecanismo de ação sobre as plantas está relacionado com a inibição do fotossistema II da fotossíntese (FSII). No Brasil, é amplamente utilizado em culturas de cana de açúcar (ADAPTAR, 2016).

Figura 1. Estrutura química do herbicida tebutiurum

Fonte: Adaptado de PUBCHEM

No fotossistema II, ocorre a excitação do complexo P680 (P680*), que doa um elétron para a feofitina, ficando no estado oxidado. O P680 então usa um elétron da fotólise (oxidação) da água para voltar ao estado anterior. A feofitina, que recebeu o elétron do P680*, doa esse elétron para a quinona A (QA), que por sua vez doa para a Quinona B (QB). A quinona B se dissocia do fotossistema II e transfere os elétrons para um complexo chamado b6f, que por sua vez irá transferir os elétrons para o fotossistema I, dando continuidade ao processo de fotossíntese. O complexo P680 é formado por dois dímeros de clorofila (D1 e D2). Os herbicidas inibidores do fotossistema II exercem sua ação fitotóxica ligando-se ao nicho da proteína D1, no qual a quinona B deveria ligar-se para receber os elétrons da quinona A (Fig. 2). Isto bloqueia o transporte de elétrons no fotossistema e gera moléculas de clorofila mais carregadas energeticamente (KRUSE et al., 2001). Essa clorofila reage com o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO), que irão reagir com

os lipídios formadores das membranas, originando a peroxidação lipídica, danificando os organismos-alvo (HESS, 2000).

Figura 2. Esquema mostrando a interferência de praguicidas no transporte de elétrons do fotossistema II (FSII).

A seta larga mostra o detalhe da ligação de praguicidas inibidores do fotossistema II (FSII) no nicho da proteína. QA = Quinona A. QB = Quinona B. PQ = plastoquinona. P680* = complexo P680 excitado. P680 = complexo P680. Fonte: Adaptado de OLIVEIRA JUNIOR, 2001.

O tebutiuron tem uma meia-vida longa de cerca de um ano em solos (Helling, 2005), especialmente em ambientes ricos em carbono ou com baixos índices de chuva (CHANG e STRIKE, 1977), mas podem ter uma meia vida baixa, de até 20 dias, sob condições específicas (CERDEIRA et al., 2007). É considerado altamente móvel, apresentando alto potencial de deslocamento no solo (ADAPTAR, 2016). Devido à sua elevada solubilidade em água, persistência relativamente forte e mobilidade no solo, o herbicida pode atingir ambiente aquáticos, principalmente águas subterrâneas (FRANCO-BERNARDES, 2014, ADAPTAR, 2016).

Quanto a toxicidade do tebutiuron, existem dados de estudos de metabolismo com o herbicida que foram realizados em ratos, coelhos, cães e camundongos. O herbicida foi administrado através de infusão forçada com dose única de produto

radiomarcado (10 a 160 mg/kg). Observou-se rápida absorção e extensiva metabolização nas espécies testadas. Após 4 dias da administração do produto, o total de radioatividade recuperada foi de 74% a 107% da dose administrada. Na dose mais baixa, a radioatividade foi eliminada após 1 dia. A eliminação se deu principalmente pela urina e pelas fezes, porém excreção biliar foi encontrada em ratos (ADAPTAR, 2016).

Os efeitos agudos observados com a marca comercial COMBINE 500 SC, composta por tebutiurum 500 g/L (50% m/v) e por ingredientes inertes 633 g/L (63,3% m/v) foram: DL50 oral para ratos de 1.464 mg/kg e DL50 dérmica > 2.000 mg/kg. Em animais de laboratório, o produto mostrou-se levemente irritante aos olhos e não irritante a pele. Estudos crônicos com o tebutiurum mostraram ausência de efeito tóxico em ratos expostos diariamente a 80 mg/kg por 2 anos, em camundongos expostos a doses tão altas quando 200 mg/kg durante toda vida, e em cães expostos a 25 mg/kg por um ano (ADAPTAR, 2016).

A trifluralina ($\alpha, \alpha \alpha$ - trifluoro - 2,6 - dinitro - N, N - dipropil - p - toluidina) é um herbicida incorporado ao solo usado em muitas culturas agrônômicas e hortícolas, por exemplo, soja, algodão e cana de açúcar, de modo a controlar uma variedade de gramíneas e ervas daninhas de folhas largas (PROBST et al., 1967). Este herbicida pode ser classificado como pré - emergente, uma vez que é aplicado ao solo antes do tempo habitual de aparecimento das plantas daninhas não desejadas (GUPTA, 2007). A trifluralina pertence ao grupo químico das dinitroanilinas (Fig. 3) e atua principalmente em meristemas e tecidos de órgãos subterrâneos, como raízes, gemas, epicótilo, hipocótilo, rizomas, tubérculos e sementes (DEUBER, 1992; FERNANDES et al, 2009).

Figura 3. Estrutura química do herbicida trifluralina.

Fonte: Adaptado de PUBCHEM

O mecanismo de ação do herbicida está relacionado com a deficiência de crescimento dos meristemas através da inibição da polimerização dos microtúbulos a partir de subunidades de tubulina livres, resultando em inchaço característico nas extremidades das raízes (VAUGHN e LEHNEN, 1991; EBERT et al., 1992). Herbicidas dinitroanilina, tais como a trifluralina, apresentam um radical NO_2 , que promove a ligação com moléculas de tubulina. O complexo formado, herbicida - tubulina, limita a formação de microtúbulos e, conseqüentemente, as fibras do fuso, uma das estruturas responsáveis por uma divisão celular bem-sucedida, impedindo o desenvolvimento da planta (ANTHONY e HUSSEY, 1999; FERNANDES et al., 2009).

A trifluralina é facilmente degradada sob a luz solar em todos os meios, com meias-vida podendo variar de minutos a vários meses, dependendo do substrato. Além disso, também é degradada quimicamente e por microorganismos. Este herbicida tem baixa solubilidade em água e é fortemente ligada a componentes do solo. Uma vez aplicada e incorporada no solo, a trifluralina permanece com baixo potencial de contaminação das águas subterrâneas. É raramente detectada em águas de superfície e, se presente, normalmente ocorre abaixo do nível de quantificação. (GROVER et al., 1997).

Quanto a toxicidade da trifluralina, resultados obtidos com roedores em laboratório, sugerem que em humanos, a Trifluralina não é absorvida pela pele (<1%) ou pelo sistema gastrointestinal após ingestão. O herbicida é metabolizado completamente e excretado em menos de 3 dias, em maior parte pelas fezes e em menor parte pela urina (ADAPTAR, 2016).

Os efeitos agudos observados com a marca comercial TRIFLURALINA NORTOX GOLD, composta por trifluralina 450 g/L (45% m/v) e por ingredientes inertes 597 g/L (59,7% m/v) foram: DL50 oral para ratos >2000 mg/kg e DL50 dérmica para ratos > 2000 mg/kg, sendo um produto considerado moderadamente irritante para os olhos e não classificado como irritante para a pele (NORTOX, 2016). No entanto, efeitos agudos como ocorrência de irritações na pele, olhos e mucosas, dores de cabeça, tonturas e vômitos, associados a confirmação de exposição à trifluralina, sugerem intoxicação (ADAPTAR, 2016). Quanto aos efeitos crônicos, estudos em ratos demonstraram alterações hemolíticas por provável disfunção renal. Em fêmeas houve aumento dos rins e do peso das glândulas suprarrenais, evidenciando nefrotoxicidade (ADAPTAR, 2016).

Os herbicidas têm um grau variável de especificidade, ou seja, alguns afetam apenas plantas específicas, e outros atingem um maior número de espécies. As diferenças bioquímicas em plantas permitem projetar formulações que têm potencial de toxicidade seletiva, atingindo apenas os organismos alvo, sem afetar a cultura de interesse (GUPTA, 2007). Portanto, entende-se por seletividade a capacidade de um determinado herbicida em eliminar as plantas daninhas de uma cultura, sem reduzir a produtividade e a qualidade do produto de interesse econômico (NEGRISOLI et al., 2004). Segundo Oliveira Junior (2001), a detoxificação dos herbicidas no metabolismo das plantas de interesse pode ocorrer devido à produção de enzimas que metabolizam a molécula herbicida.

Porém, hoje se sabe, que os herbicidas não só afetam os organismos-alvo, mas também organismos não alvo, que são expostos aos herbicidas de diferentes classes químicas, e podem assim ingeri-los ou absorve-los através da pele ou do sistema respiratório (LIVINGSTONE, 2001). Estima-se que do total de herbicida aplicado, apenas uma pequena parte atinge os sítios de ação, sendo a maior parte perdida via pulverizações, deposições fora do alvo, escoamento, fotodegradação, dentre outros. Isto não só aumenta o custo de proteção das culturas, como também causa grave poluição ambiental, podendo afetar os seres humanos (WANG; LIU, 2007).

Apesar de alguns herbicidas serem descritos como seletivos no seu mecanismo de ação, sua gama de seletividade é limitada apenas aos organismos testados (ZACHARIA et al., 2010). Assim, nos últimos anos, o interesse em avaliar os efeitos dos herbicidas, especialmente em organismos não-alvo, está aumentando, mas há ainda poucos estudos disponíveis sobre os herbicidas tebutiuram e trifluralina.

Assim, o estudo desses compostos é de extrema importância, para que efeitos como a presença ou ausência de citotoxicidade e genotoxicidade sejam elucidados. Um dos modelos muito utilizados para se realizar testes com substâncias de interesse são as culturas de células, permitindo análises *in vitro*. Estas análises apresentam inúmeras vantagens em relação aos testes *in vivo*.

1.2 Linhagens celulares para realização de testes *in vitro*

Modelos de cultura celular têm várias vantagens em relação a outros sistemas experimentais, incluindo questões éticas relacionadas a estudos com animais ou humanos, possibilidade de criopreservação, facilidade de controle das condições

experimentais, necessidade de pequenas quantidades das substâncias em estudo e baixo custo (WALUM et al., 1990; O'BRIEN et al., 2000). Embora os sistemas de cultura de células não possam replicar totalmente as condições encontradas no organismo, desde que os limites do modelo sejam levados em consideração, a cultura celular é uma ferramenta valiosa (FRESHNEY, 1994; O'BRIEN et al., 2000).

A técnica de cultura celular permite o estudo do comportamento das células em um ambiente controlado, fora do organismo. Os pioneiros com a utilização de células fora do organismo foram Harrison, em 1907, e Carrel, em 1912. Harrison obteve êxito em cultivar o cordão nervoso de um sapo em coágulo linfático, e Carrel, trabalhando com células cardíacas de embrião de galinha, descobriu a importância da troca dos nutrientes em que as células eram cultivadas (FRESHNEY, 2005; ALVES e GUIMARÃES, 2010).

As células em cultivo podem ser classificadas quanto à aderência, sendo aderentes ou não aderentes, e quanto à frequência de divisão que podem atingir, sendo linhagens finitas ou contínuas. As células aderentes são oriundas de tecidos duros e, por isso, são dependentes de ancoragem, ou seja, necessitam de adesão a uma superfície de contato para que possam iniciar a sua proliferação. As células não aderentes podem ser cultivadas em suspensão no meio e são derivadas de tecidos que não necessitam de ancoragem para proliferar e sobreviver. Essa capacidade está restrita às células hematopoiéticas, às linhagens transformadas ou às células de tecido tumoral (FRESHNEY, 2005).

As culturas primárias de células são provenientes de uma fonte viva saudável, obtidas por desagregação mecânica ou enzimática. Com a continuidade do cultivo dessas células, suas características originais podem ser mantidas, havendo grande similaridade com o tecido *in vivo*, porém, essas células têm baixa frequência de divisão, constituindo uma linhagem finita. Existem ainda células que mantêm a maioria das características do tecido original, porém são transformadas e sofrem alterações em genes que controlam o ciclo celular, possuem alta capacidade proliferativa e têm uma maior frequência de divisão. Essas células podem ser mantidas em cultura por um grande período de tempo, constituindo uma linhagem contínua. Muitas das linhagens contínuas podem ser propagadas até oitenta passagens. Células podem ser transformadas em cultura por meio de agentes químicos, físicos, ou utilizando-se vírus. Porém, células transformadas podem ser obtidas de tecidos já mutados, como tecidos tumorais. Em 1954, George Gey cultivou células derivadas de um câncer de

útero humano, estabelecendo a linhagem HeLa, e promovendo um aumento no interesse pelo cultivo de células (FRESHNEY 2005; ALVES e GUIMARÃES, 2010).

A linhagem celular HepG2 (Fig. 4) foi isolada em 1979 por Aden et al, a partir de um hepatoblastoma primário de um menino argentino de 11 anos. Células HepG2 são aderentes e apresentam alta frequência de divisão, o que caracteriza uma linhagem contínua. Essa linhagem é muito utilizada em ensaios toxicológicos, uma vez que as células têm uma morfologia epitelial semelhante às células parenquimáticas do fígado e sintetizam e secretam várias das proteínas plasmáticas características de células hepáticas humanas normais. Em particular, a HepG2 mantém a atividade de muitas enzimas das fases I e II, como CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, e glutathiona-S-transferases, e também possuem enzimas antioxidantes (KNOWLES et al., 1980; KANASMULLER et al., 1998; KANASMULLER et al., 2004). Além disso, as células HepG2 são capazes de expressar a proteína supressora tumoral p53, um componente essencial de resposta celular a danos no DNA, e que está envolvido nos mecanismos de defesa principalmente pela ativação da transcrição de genes responsáveis pela apoptose e parada no ciclo celular (URANI et al., 2014). Essa linhagem foi utilizada na realização de todos os ensaios citotóxicos propostos no presente trabalho, bem como nas análises genotóxicas de cometa e micronúcleo.

Figura 4. Células HepG2 em garrafas de cultura, e vistas sob microscópio óptico invertido.

Aumento na objetiva de 25x. Fonte: Google imagens e próprio autor.

Além dos modelos eucariotos, os procariontes podem se mostrar úteis em bioensaios para detecção de substâncias que induzem mutações e danos primários no DNA (HOUK, 1992). As culturas bacterianas possuem determinadas vantagens em relação a experimentos *in vivo* ou com culturas de células de mamíferos, como

facilidade de manipulação, custo e tempo experimental reduzidos e genoma já sequenciado, permitindo alterações controladas (MARON e AMES, 1983).

Diferentes linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium* são utilizadas no teste de Ames, ou ensaio *Salmonella typhimurium/microsoma*, como as linhagens TA98, TA100 (Fig. 5), TA97a e TA1535. Este ensaio foi designado para detectar mutações, e têm se tornado cada vez mais reconhecido pela comunidade científica e corporações como uma importante ferramenta de análise de substâncias químicas (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Cada linhagem empregada no teste apresenta diferentes mutações em vários genes no operon histidina, e, portanto, torna possível a detecção do mecanismo pelo qual as substâncias provocam a mutação, uma vez que o crescimento de determinada linhagem em ambiente sem histidina revela ocorrência de mutação reversa (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Figura 5. Colônias de *Salmonella Typhimurium* formadas por revertentes espontâneos da TA 100

Fonte: MORTELMANS e ZEIGER, 2000.

O ensaio *Salmonella /microsoma* teve seu início em 1966, quando Ames e Whitfield (1966) propuseram um conjunto de linhagens mutantes para histidina com o objetivo de realizar triagens de possíveis mutágenos. Os autores utilizaram um procedimento chamado *spot test*, previamente utilizado por Szybalski (1958) e Iyer e por Szybalski (1958), em linhagens de *E. coli*. Em 1973, Ames e colaboradores (1973 a; 1973 b) desenvolveram o método de incorporação de placas, que promoveu maior sensibilidade e poder quantitativo ao teste (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Posteriormente, foi desenvolvido o protocolo pré-incubação (AMES et al., 1975).

Uma vez que as bactérias não possuem o sistema de metalolização via citocromo P450, no ensaio *Salmonella /microsoma* utiliza-se ativação metabólica exógena, feita mediante adição de um homogeneizado de células de fígado de rato tratado com o indutor enzimático Aroclor 1254 (fração S9). Essa ativação metabólica é importante, uma vez determinadas substâncias podem gerar metabólitos mutagênicos através do citocromo P450, presente nos vertebrados (JARVIS et al., 1996).

Os modelos *in vitro* mostram-se, portanto, como uma importante ferramenta para a realização de testes citotóxicos, genotóxicos/mutagênicos e moleculares em substâncias cujos efeitos sobre o organismo sejam desconhecidos.

1.3 Proliferação, sobrevida, e morte celular

A proliferação, sobrevida, e morte celular são moduladas por múltiplos sinais, e o equilíbrio entre as taxas de proliferação e morte das células, eventos acoplados, promovem a homeostase nos tecidos, que sofrem um constante processo de renovação celular (GRIVICICH et al., 2007; FULDA et al., 2010).

Sob condições que provocam estresse, a homeostase é prejudicada, e a célula pode responder ao estresse de formas variadas, dependendo do seu tipo e gravidade. Essa resposta pode ser de proteção adequada à célula, possibilitando e permitindo sua sobrevivência, ou, caso o estresse seja tão severo que incapacite essa proteção, a resposta celular poderá ser a ativação de morte celular (FULDA et al., 2010).

Devido a danos no DNA, que ocorrem comumente, as células podem remover o dano e restaurar o DNA, podem ativar um ponto de checagem (*checkpoint*) de dano, interrompendo o ciclo celular e permitindo a reparação e prevenção da transmissão dos danos, podem produzir uma resposta na transcrição que irá beneficiar o funcionamento celular, ou podem entrar em apoptose, processo que irá eliminar as células altamente danificadas e desreguladas. No entanto, falhas em qualquer uma dessas vias causa instabilidade genômica, podendo levar à carcinogênese (SANCAR et al., 2004).

Uma diminuição ou bloqueio da proliferação celular pode ser decorrente da interrupção do ciclo celular e/ou da indução da morte celular por apoptose (BIRT et al., 2001). O ciclo celular consiste em um ciclo de duplicação e divisão do conteúdo celular por meio do qual novas células são originadas. Em células eucariontes, esse

ciclo é dividido em quatro etapas: G₁, S, G₂, e M. As três primeiras fases compõem a intérfase, período em que a célula realiza a transcrição de genes, sintetiza proteínas e cresce em massa. A fase G₁ (do inglês *gap*, que significa lacuna), é o intervalo entre o término da fase M e início da fase S. Na fase S (de síntese), ocorre a replicação do DNA nuclear, e G₂ é a fase de intervalo entre a fase S e a M. A fase M, por sua vez, é compreendida pela mitose, em que ocorre a divisão nuclear, e a citocinese, em que ocorre a divisão celular (Fig. 6) (ALBERTS et al., 2009).

Figura 6. Fases do ciclo celular.

Fonte: Adaptado de ALBERSTS et al., 2009.

Os pontos de checagem de danos no DNA compreendem vias bioquímicas que retardam ou interrompem a progressão do ciclo celular em resposta a danos, e são definidos com base na transição em que está sendo interrompida, como G₁/S, intra-S, e G₂/M *checkpoints*. Inicialmente, o termo ponto de checagem era definido como ponto em que a integridade do DNA é examinada, antes da progressão no ciclo celular, posteriormente, esse termo começou a incluir outras respostas celulares além da interrupção do ciclo, como indução de reparo no DNA e a apoptose. Essa maior abrangência tem base no fato de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular também poderem levar à indução de reparo do DNA e apoptose. Porém, tanto os reparos quanto a apoptose podem ocorrer independentemente dos *checkpoints*, (SANCAR et al., 2004).

A apoptose é um dos mecanismos de morte celular que participa de várias situações fisiológicas, como na organogênese e hematopoiese normal e na reposição fisiológica de certos tecidos maduros. Porém, este mecanismo pode ser

desencadeado por fatores externos, como a baixa quantidade de nutrientes e exposição à xenobióticos que provocam danos no DNA e aumento de espécies reativas do oxigênio, por exemplo. Assim, é um mecanismo rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interação da célula com o meio externo (ISRAELS; ISRAELS, 1999; GRIVICICH et al., 2007).

Um padrão de alterações morfológicas marcantes e coordenadas caracteriza a apoptose. Inicialmente ocorre retração celular, que leva à perda de aderência célula-célula e célula-matriz. A morfologia da maioria das organelas não é alterada, apenas as mitocôndrias podem apresentar ruptura na membrana externa. Há condensação da cromatina ao redor da periferia nuclear e a desintegração do núcleo em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. A membrana celular forma prolongamentos, que vão aumentando em número e tamanho. São formados então os corpos apoptóticos, que são fagocitados por macrófagos e removidos sem causar resposta inflamatória (Fig. 7) (GRIVICICH et al., 2007; ANAZETTI; MELO, 2007).

Figura 7. Características morfológicas da apoptose.

Fonte: Adaptado de HAIL et al., 2006.

Uma das primeiras alterações bioquímicas na célula associada a apoptose inclui alterações na assimetria do fosfolípídeo fosfatidilserina na membrana plasmática. A membrana de uma célula viável possui uma distribuição assimétrica de fosfolípidios em sua bicamada lipídica, e moléculas de fosfatidilserina são mantidas ativamente na face interna da membrana por meio da ação de uma translocase dependente de ATP, que transporta tais moléculas da face externa para a interna da bicamada lipídica. Na apoptose, os mecanismos celulares que mantêm essa

assimetria se tornam inativos, e ocorre a presença de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática (WU et al., 2006).

A inativação da translocase, simultaneamente com a ativação da *scramblase*, que aumenta o movimento de *flip flop*, movendo alatoriamente fosfolípidios de uma face da membrana para a outra, tem demonstrado ser responsável pela externalização da fosfatidilserina (VERHOVEN et al., 1995; WOLFS et al., 2005; VAN GENDEREN, 2008). Tyurina e colaboradores (2004) postulam que na apoptose, o citocromo *c* liberado pelas mitocôndrias (durante a permeabilização da membrana mitocondrial externa) oxidam a fosfatidilserina da face interna da membrana, modulando a externalização desse fosfolípido. Uma possível explicação, segundo os autores, é de que essa oxidação interfere na interação da fosfatidilserina com a translocase, levando à redução na eficiência da enzima e ao acúmulo do fosfolípido no exterior da membrana. Na face externa da membrana plasmática, a fosfatidilserina atua como sinal para fagocitose da célula apoptótica por macrófagos, o que torna a reação inflamatória reduzida ou ausente, e evita o comprometimento dos tecidos (WU et al., 2006).

Para a visualização de células que possuem fosfatidilserina na face externa, o marcador anexina V tem sido utilizado. Os membros da família anexina podem se ligar a fosfolípidos carregados negativamente, na presença de íons Ca^{2+} . A anexina V, especificamente, possui alta afinidade com a fosfatidilserina, dotada de carga negativa, e, portanto, representa um valioso marcador na detecção de apoptose (VAN GENDEREN et al., 2008).

Ainda, quando sinais de morte atingem a mitocôndria, ocorre um colapso no potencial da membrana mitocondrial interna e uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). Nesse momento, além da liberação de moléculas que podem provocar apoptose, ocorre uma perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (ERO), o que provoca a oxidação de biomoléculas, aumentando ainda mais o colapso no potencial de membrana mitocondrial (LOEFFLER; KREMER, 2000; KROEMER; REED, 2000; GRIVICICH, 2007).

A Figura 8 ilustra alguns eventos que ocorrem no interior da célula durante a apoptose. Pode-se observar a presença de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática, a ligação desse fosfolípido com a anexina V na presença de

Ca^{2+} , a redução no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$), e a liberação do citocromo c.

Figura 8. Características bioquímicas da apoptose

FS = Fosfatidilserina. $\Delta\psi$ = Potencial de membrana mitocondrial. Fonte: Adaptado de ENZOLIFESCIENCES.

Há duas vias principais de regulação da apoptose: a via extrínseca, que é mediada por receptores de morte presentes na membrana plasmática, e a via intrínseca, mediada pela mitocôndria. Tanto na via extrínseca quanto na intrínseca há a participação das caspases (*Cystein-dependent aspartate-specific protease*), que clivam seus alvos nos resíduos de ácido aspártico. Em ambas as vias, as caspases iniciadoras enviam sinais para as caspases efetoras, que executam eventos intracelulares que resultarão na morte celular programada (Fig. 9) (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997; GRIVICICH, 2007). Os eventos das fases efetora (em que ocorre a ativação das proteases e nucleases) e de degradação irão resultar nas características estruturais da apoptose (HAIL et al., 2006).

Figura 9. Vias extrínseca e intrínseca de regulação de morte celular por apoptose.

Fonte: Adaptado de HAIL et al., 2006.

Na via extrínseca de regulação da apoptose, quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas capazes de recrutarem caspases iniciadoras (caspase-8), que irão ativar caspases efetoras (caspase-3), executando a morte por apoptose (GRIVICICH, 2007).

Na via intrínseca, diversos sinais atuam modulando a permeabilização da membrana mitocondrial externa. A via mitocondrial pode ser ativada por vários estímulos, incluindo compostos citotóxicos, resultando na ativação de proteínas pró-apoptóticas. Estas proteínas induzem a permeabilização da membrana mitocondrial externa através da formação de canais que causa a liberação, além de outras substâncias, de pequenos íons, solutos e citocromo c para o citosol. O citocromo c liberado se associa a uma proteína adaptadora, formando um complexo chamado apoptossomo, que promove, na presença de ATP, a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9, ativa, que irá ativar as caspases efetoras (caspase 3), ocasionando a apoptose (GREEN; KROMER, 1998). O complexo catalítico gerado pelos sinais mitocondriais e a ação das caspases ativadas de via extrínseca são sinais convergentes responsáveis pela ativação das caspases efetoras 3 e 7 (HAIL et al., 2006).

Outro tipo de morte celular é a necrose, que é caracterizada por rápida desregulação da homeostasia. A necrose ocorre, geralmente, em resposta à injúria severa às células (BRAS et al., 2005). No entanto, estudos tem sugerido que a necrose também pode ser regulada geneticamente, com a função de manter a integridade do organismo (ZONG; THOMPSON, 2006).

As características morfológicas e bioquímicas da necrose compreendem em intumescimento celular, intumescimento das organelas, desorganização do citoplasma, rompimento das organelas e da membrana plasmática e liberação do conteúdo celular (Fig. 10). Consequentemente a essa liberação, ocorre uma resposta inflamatória e dano às células vizinhas (GRIVICICH et al., 2007).

Figura 10. Características morfológicas da necrose.

Fonte: Adaptado de HAIL et al., 2006.

Apesar de tratados individualmente, evidências tem apontado para uma interdependência entre os diferentes mecanismos de morte celular. Um exemplo são células em fase avançada de apoptose quando não são fagocitadas, que podem apresentar características necróticas devido à perda de energia celular e integridade da membrana plasmática. Esse processo é conhecido como necrose apoptótica (MAJNU; JORIS, 1995; BRAS 2005). Além disso, é importante ter ciência de outros tipos de morte celular além da apoptose e da necrose, como a autofagia, a mitose catastrófica e a senescência (GRIVICICH, 2007).

1.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando a taxa de produção de espécies reativas de oxigênio e / ou de nitrogênio (ERONs) excede a taxa de sua decomposição por sistemas antioxidantes (ALMEIDA et al., 2005). Espécies reativas correspondem aos produtos da redução incompleta do oxigênio molecular, como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($\cdot OH$), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (STEGEMAN et. al., 1992; MATES 2000). As ERONs são potentes oxidantes e podem reagir com moléculas celulares críticas, levando a danos em membranas biológicas, causando peroxidação lipídica, danos na mitocôndria, e danos ao DNA (Fig. 11) e consequentemente podem acarretar em morte celular (VAN DER OOST et al., 2003).

Figura 11. Danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio e / ou nitrogênio (ERONs).

Fonte: Google imagens

As espécies reativas de oxigênio são produzidas e degradadas durante a função celular normal de organismos aeróbios, uma vez que eles necessitam de oxigênio para a geração de energia através da fosforilação oxidativa, processo que gera subprodutos reativos (LUSHCHAK, 2006). Outro processo que pode gerar espécies reativas é a biotransformação de xenobióticos, em que ocorrem reações para transformar um produto lipofílico em hidrofílico, para ser mais facilmente eliminado. Essas reações podem formar subprodutos reativos (VAN DER OOST et al., 2003).

A exposição a alguns xenobióticos, especialmente poluentes químicos tóxicos, como determinados praguicidas, podem levar a um aumento exacerbado da produção de ERONs, e consequentemente ao estresse oxidativo (NORDBERG; ARNER, 2001; ALMEIDA et al., 2005).

Como mecanismos de defesa antioxidante, organismos aeróbios apresentam sistemas enzimáticos e não enzimáticos, que podem evitar a formação das ERONs, reagir com essas espécies, ou reparar os danos provocados por elas. Antioxidantes não enzimáticos incluem a glutathiona reduzida (GSH), o ácido ascórbico (vitamina C), o β -caroteno (vitamina B), e o α -tocoferol (vitamina E) (KLING; OLSSON, 2000). Essas moléculas participam diretamente em reações de óxido-redução, fazendo uma varredura nos produtos de oxidação. Elas são consumidas ou modificadas durante esses processos, e devem ser repostos ou regeneradas a fim de recuperarem suas funções (DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 2010).

Importantes enzimas antioxidantes fazem parte do mecanismo de defesa enzimático. A superóxido dismutase (SOD) catalisa a conversão do ânion reativo superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular. A glutathiona peroxidase (GPx) catalisa o metabolismo de peróxidos lipídicos (ROOH) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), envolvendo a oxidação concomitante da glutathiona reduzida (GSH) à sua forma oxidada (GSSG). Já as catalases, são enzimas que facilitam a remoção do H_2O_2 , metabolizado em oxigênio molecular (O_2) e água. E a glutathiona S-transferase (GST) catalisa a conjugação da GSH com várias substâncias eletrofílicas (BARATA et al., 2005). A Figura 12 ilustra o sistema antioxidante de algumas enzimas.

Figura 12. Esquema mostrando o Sistema de Defesa Antioxidante.

$O_2^{\cdot-}$ = Radical ânion superóxido. H_2O_2 = Peróxido de hidrogênio. SOD = superóxido dismutase. GST = Glutathiona-S-Transferase. GPx = Glutathiona peroxidase. CAT = Catalase. GSH = Glutathiona reduzida. GSSG = Glutathiona oxidada. Fonte: próprio autor.

Outra importante enzima antioxidante é a quinona oxidoredutase 1 (NQO1), que catalisa a redução de quinonas endógenas (como metabólitos do estrogênio) e exógenas e de seus derivados à hidroquinonas, compostos excretados mais facilmente. A NQO1 utiliza tanto o NADH quanto o NADPH como cofatores, e promove a redução das quinonas utilizando dois elétrons. Assim, impede que as quinonas participem de reações que poderiam levar a uma depleção de sulfidril, ou a redução da quinona por um único elétron, o que levaria à formação de semiquinonas, moléculas que apresentam alta tendência em reagir com o oxigênio e formar ERONs. (ROSS et al., 2000; DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 2010).

As células podem responder a um dano, como aqueles produzidos por estresse oxidativo, de diversas formas. Podem ativar o sistema de reparo, um ponto de checagem no ciclo celular, levar à morte celular, ou produzir uma resposta na transcrição de determinados genes (SANCAR et al., 2004). A enzima NQO1 pode ser facilmente induzida, e é regulada pela via Keap1/Nrf2-ARE. Essa via de sinalização regula transcricionalmente a expressão de uma vasta quantidade de genes que codificam enzimas antioxidantes. Tal regulação ocorre em resposta a flutuações das condições ambientais intra e extra-celulares quanto à presença de estressores oxidativos (DINKOVA-KOSTOVA; TALALAY, 2010; NORDGREN; WALLACE, 2014; YIN et al., 2013).

A sigla ARE remete a “elemento de resposta antioxidante”, do inglês *antioxidant response element*, e corresponde a uma sequência de DNA (TGAG/CNNNGC) na região promotora de vários genes de defesa antioxidante (NORDGREN; WALLACE, 2014). A atividade dessa sequência é modulada pelo fator de transcrição Nrf2, (do inglês *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) (LEISER; MILLER, 2010).

Sob condições normais, o fator de transcrição Nrf2 se mantém ligado à forma reduzida da proteína Keap1 (*kelch-like ECH-associated protein 1*) no citoplasma, e é regularmente degradado. A proteína Keap1 contém resíduos de cisteína sensíveis a ERONs, e podem ter sua conformação alterada quando em contato com esses estressores. Sob condições de estresse oxidativo, ocorre reações de oxidação ou conjugação nos resíduos de cisteína da proteína Keap1, que mudam sua conformação e perdem a capacidade de ligação com fator Nrf2. Consequentemente, há um acúmulo de Nrf2 livre no citoplasma, o que aumenta sua translocação para o núcleo, onde forma heterodímeros com outros fatores de transcrição como *c-Jun* e *small Maf*, e se se liga à sequência ARE, ativando-a. Essa sequência irá então iniciar a transcrição do gene

antioxidante, aumentando sua expressão (MA; HE, 2012; VOMHOF-DEKREY; PICKLO, 2012; NORDGREN; WALLACE, 2014). A Figura 13 ilustra a via Keap1/Nrf2-ARE.

Figura 13. Esquema mostrando a Via Keap1/Nrf2-ARE

Fonte: próprio autor.

1.5 Genotoxicidade e mutagenicidade

Os agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, formando adutos, alteração oxidativa, ou mesmo quebras na molécula de DNA. Na grande maioria dos casos a lesão é reparada pelo próprio sistema de reparo da célula ou a mesma é eliminada. Caso a lesão seja fixada, provocando mutações, que podem perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é considerado mutagênico (Fig. 14) (UMBUZEIRO; ROUBICEK 2003). Embora as mutações possam surgir espontaneamente, a maioria delas é provocada por agentes físicos, químicos ou biológicos (MATSUMOTO, 2004).

Figura 14. Fluxograma dos eventos de Genotoxicidade e mutagenicidade.

Fonte: próprio autor.

As mutações podem ocorrer em dois diferentes níveis: mutação gênica (ou mutação de ponto) e mutação cromossômica. Na mutação gênica, ocorrem alterações em pares de bases únicos do DNA ou em um pequeno número de pares de bases. Esse tipo de mutação pode ocorrer por substituição de pares de base, que poderá acarretar na leitura de um aminoácido diferente, modificando a proteína final, ou por adição e deleção de pares de base. Uma única adição ou deleção de pares de base pode provocar um deslocamento no quadro de leitura, uma vez que a sequência do mRNA é lida em grupos de 3 pares de bases (códon), e isso interfere na sequência de polipeptídeos, também modificando a proteína final (GRIFFITHS et al. 2001).

Na mutação cromossômica, ocorrem alterações em uma região cromossômica, cromossomos inteiros ou até mesmo em grupos inteiros de cromossomos. Esse tipo de mutação pode ser classificado em numérica, em que ocorre alteração no número de cromossomos da célula, e em mutação estrutural, em que ocorre uma alteração na forma ou no tamanho de um cromossomo (GRIFFITHS et al. 2001).

Como mecanismo de defesa das células às mutações, ocorre a ativação do sistema de reparo, que pode agir diretamente no DNA, reparando o erro. Esse sistema de reparo pode ser ativado diretamente ou após um bloqueio no ciclo celular. Nesse caso, após o reparo do erro, a célula segue o ciclo celular, no entanto, se o dano não puder ser reparado ou houver muitas lesões no DNA, o ciclo pode ser bloqueado

permanentemente conduzindo ao envelhecimento da célula ou induzindo apoptose (SANCAR et al., 2004)

As mutações são a fonte de variabilidade genética de uma população, sendo, portanto fundamentais para a manutenção das espécies. Porém, podem causar doenças tanto aos indivíduos como a seus descendentes, dependendo da quantidade, do tipo e do local onde ocorrem (UMBUZEIRO; ROUBICEK, 2003).

Para a detecção de uma amplitude de danos que abrange desde mutações gênicas até danos cromossômicos e aneuploidias, utiliza-se testes em eucariotos. E para a análise de agentes que induzem mutações gênicas e de danos primários no DNA, ensaios com procariontes são muito úteis, como o teste com *Salmonella typhimurium* (HOUK, 1992).

O ensaio cometa e o teste do micronúcleo são amplamente utilizados na avaliação genotóxica, principalmente por causa da sensibilidade de ambos para detectar danos no DNA (ÇAVAS; KONEN, 2007), e o teste *Salmonella/microsoma* tem sido extensivamente utilizado para avaliação rápida da ação de substâncias químicas na molécula de DNA (AMES et al., 1975; VARGAS et al., 1993).

A detecção de quebras no DNA através do ensaio do cometa analisa núcleos celulares isolados submetidos a uma solução alcalina para relaxamento do DNA. Estes núcleos, chamados agora de nucleóides, passam por uma eletroforese na qual os fragmentos de DNA migram, e os nucleóides portadores de danos assumem o aspecto de um cometa, sendo que o tamanho da cauda do cometa reflete a extensão do dano ao DNA (DAVID, 2007), como mostrado na Figura 15.

Figura 15: Imagem dos nucleóides formando cometas com diferentes graus de dano ao DNA.

Na esquerda para a direita: nucleóides classe 0 (sem dano), classe 1 (pouco dano) classe 2 (dano médio) e classe 3 (muito dano), segundo classificação visual. Fonte: KOBAYASHI et al., 1995

As vantagens de se empregar o ensaio do cometa para avaliar danos no DNA incluem: mensuração de danos em células individuais; o baixo número de células necessário para a realização do teste; possibilidade de ser realizado em qualquer tipo de célula eucariótica nucleada e ser um método muito sensível para detectar danos no DNA (LEE; STEINERT, 2003).

O ensaio cometa não é utilizado para verificar mutações, mas sim lesões genômicas que se não forem corrigidas, podem ser processadas levando às mutações, o que as caracteriza como lesões pré-mutagênicas (KAMMANN et al., 2001). Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção (TICE, 1995). Por meio desse ensaio, é possível avaliar danos em células em proliferação ou não, *in vivo* ou *in vitro*, sendo bem aplicado com o propósito de análises genotóxicológicas.

O teste do micronúcleo é utilizado para detectar substâncias que causam mutações cromossômicas. Os micronúcleos são formações de material nuclear que aparecem no citoplasma como pequenos núcleos satélites do núcleo principal. Os micronúcleos podem ser resultantes de eventos celulares que levam a fragmentação do material genético, como, por exemplo, os fragmentos acêntricos, decorrentes de quebras cromossômicas durante o processo de divisão celular (agente clastogênico); ou ainda de perdas de cromossomos inteiros que não são incorporados ao núcleo principal, durante o ciclo celular, pela inativação do fuso mitótico (agente aneugênico). Assim, as substâncias indutoras de micronúcleo podem ser classificadas como de ação clastogênica ou aneugênica (Fig. 16) (FENECH, 2000).

Figura 16: Micronúcleo a partir de fragmentação ou perda de cromossomo

- a) formação de micronúcleo a partir de perda e fragmentação.
 - b) formação de uma ponte citoplasmática e de micronúcleo.
- Fonte: Adaptado de RIBEIRO e MARQUES, 2003.

A presença de micronúcleo é um fenômeno natural, porém as exposições a compostos genotóxicos aumentam a sua frequência nas células. Os MNs formados por agentes genotóxicos só apareceram após um ciclo de divisão celular (SALVADORI et al., 2003), portanto, a frequência de micronúcleos dentro de uma população de células é altamente dependente da cinética da proliferação celular (AL-SABTI; METCALFE, 1995).

O teste de *Salmonella/microsoma*, também conhecido como teste de Ames, é capaz de detectar substâncias que causam mutações gênicas. Bruce Ames e colaboradores (1975) desenvolveram um teste *in vitro*, de curta duração, que combinado a um sistema de metabolização *in vitro* (fração S9) desenvolvido por Mallinckrodt em 1971, mostrou uma alta correlação entre vários mutágenos e carcinógenos conhecidos (MARON; AMES, 1983). A técnica combinada com a fração S9, um sistema exógeno de ativação metabólica de mamífero, foi um componente chave para o teste, uma vez que as bactérias são incapazes de metabolizar substâncias químicas através de citocromos P450, como em mamíferos e outros vertebrados (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

O teste *Salmonella/microsoma* emprega linhagens do procarioto *Salmonella Typhimurium* que apresentam mutações nos genes responsáveis pela biossíntese de histidina (his⁻) e, como resultado, não conseguem sintetizar esse aminoácido, sendo incapazes de crescer em meio de cultura sem histidina. Dessa forma, outra mutação é necessária para que as bactérias consigam crescer na ausência do referido aminoácido. Essa mutação reversa ocorre quando os organismos são expostos a agentes mutagênicos. A frequência de mutação reversa é então medida pela contagem das colônias que crescem em meio sem histidina (MARON; AMES, 1983).

A especificidade das linhagens de *S. typhimurium* fornece informações sobre os tipos de mutações que são induzidas. As linhagens TA98 e TA100 são utilizadas para se estudar o metabolismo de nitrocarcinógenos já que em comum apresentam características de serem nitroredutases-deficientes (MARON; AMES, 1983). As linhagens TA 98 e TA 100, detectam, respectivamente, produtos químicos que causam mutações por deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*), e substituição

dos pares de bases do DNA (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Essas linhagens foram utilizadas como métodos de triagem para a realização do teste *Salmonella/microsoma*, uma das análises genotóxicas realizadas no presente trabalho. Além delas, também foram utilizadas as linhagens TA97a e TA1535, que detectam, respectivamente, produtos químicos que causam mutações por *frameshift*, e substituição dos pares de bases do DNA (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e moleculares apresentados pelos herbicidas tebutiurum e trifluralina, que possuem diferentes mecanismos de ação herbicida.

2.2 Objetivos específicos

- a) Verificar a capacidade dos herbicidas tebutiurum e trifluralina em interferir na proliferação celular da linhagem de células HepG2;
- b) Analisar o ciclo celular de HepG2 expostas aos herbicidas tebutiurum e trifluralina;
- c) Estudar e caracterizar o potencial dos herbicidas tebutiurum e trifluralina em induzir a morte celular em HepG2;
- d) Analisar possíveis mecanismos de morte celular em HepG2 expostas aos herbicidas tebutiurum e trifluralina;
- e) Verificar o efeito dos herbicidas tebutiurum e trifluralina sobre o potencial de membrana mitocondrial em modelo celular, que é relacionado à via intrínseca de morte celular;
- f) Avaliar se há indicativo de ocorrência de estresse oxidativo em linhagem de células HepG2 expostas aos herbicidas tebutiurum e trifluralina;
- g) Verificar se há ativação da via de resposta antioxidante Keap1/Nrf2-ARE em células HepG2 expostas aos herbicidas tebutiurum e trifluralina;
- h) Avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade dos herbicidas tebutiurum e trifluralina em HepG2 e linhagens de *Salmonella*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Herbicidas utilizados e concentrações testadas

Os herbicidas tebutiurum e trifluralina, ambos padrão analítico, foram adquiridos da Sigma-Aldrich, USA. O tebutiurum possui fórmula molecular $C_9H_{16}N_4OS$, peso molecular 228,31 e número CAS 34014-18-1. A trifluralina possui fórmula molecular $C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$, peso molecular 335,28 e número CAS 1582-09-8.

No presente trabalho, foram realizados testes *in vitro* com HepG2 (modelo eucarioto) e com linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium* (modelo procarioto).

Nos ensaios com HepG2, as concentrações testadas de cada herbicida foram de 1; 5; 10; 20; 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$. Para o tebutiurum, essas concentrações correspondem respectivamente à 0,22; 1,14; 2,28; 4,56; 11,41 e 22,8 mg/L . Para a trifluralina, correspondem respectivamente à 0,33; 1,67; 3,35; 6,70; 16,76 e 33,52 mg/L .

As soluções dos herbicidas foram preparadas em dimetil sulfóxido (DMSO > 99,5%). Este é um solvente muito utilizado em testes toxicológicos, no entanto altas concentrações podem causar toxicidade à HepG2. Dados na literatura mostram que concentrações de até 1% de DMSO são seguras para esse tipo celular (SONG et al., 2012).

No presente trabalho, em ensaio com HepG2, foi utilizado um máximo de 0,5% de DMSO para todas as concentrações testadas. Com o objetivo de eliminar a interferência do solvente no ensaio, foram feitas soluções estoque de 0,2; 1; 2; 4; 10 e 20 mmol/L dos herbicidas em DMSO com o objetivo de padronizar o volume de substância diluída no solvente adicionado às células para obtenção da concentração final de herbicida desejada. Para o q-RT-PCR e ensaio repórter, técnicas moleculares, as células tratadas foram expostas à 0,1% de DMSO. Para os demais ensaios com HepG2, as células tratadas foram expostas à 0,5% de DMSO.

No teste com a bactéria *Salmonella typhimurium*, com as linhagens de triagem TA98 e TA100, as concentrações utilizadas de cada herbicida foram 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000; 2500 e 5000 $\mu\text{g/placa}$. Com as linhagens TA97a e TA1535, as concentrações utilizadas de cada herbicida foram 10; 100; 1000; 2500 e 5000 $\mu\text{g/placa}$.

O DMSO também é muito utilizado no ensaio *Salmonella/microsoma* como solvente de substâncias insolúveis em água. É relativamente não tóxico para a *S. typhomurium* e para as enzimas da fração microsomal S9. Pode ser usado até a concentração de 500 µL/placa (MARON et al., 1981).

A concentração de DMSO utilizada nesse teste também foi padronizada para eliminar a interferência do solvente no ensaio. Foram preparadas soluções estoque dos herbicidas em DMSO nas concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 mg/L, e 1; 10; 25 e 50 g/L. Utilizou-se 100 µL de cada uma dessas soluções para se obter as concentrações finais de 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000; 2500 e 5000 µg/placa. No controle negativo, foi utilizado DMSO na concentração de 100 µL/placa, padronizando assim o volume utilizado do solvente.

3.2. Cultivo, tripsinização e plaqueamento de HepG2

As células HepG2, de origem da *American Type Culture Collection* (ATCC), N^o HB 8065, foram utilizadas na realização dos ensaios de análise de proliferação e morte celular, nos ensaios de análise do estresse oxidativo, e nos ensaios cometa e micronúcleo, que analisam genotoxicidade/mutagenicidade.

As células em cultura, pelo ciclo celular, vão se proliferando, dando origem à novas células, e consequentemente aumentando sua confluência, preenchendo a área do frasco de cultura. No momento em que as células atingem uma confluência de 70-80%, é necessário fazer uma subcultura, que consiste na remoção do meio de cultura e transferência das células para um novo frasco de cultivo para subsequente crescimento. Se a subcultura não for realizada, começa a haver exaustão de nutrientes, acúmulo de metabólitos tóxicos, inibição da motilidade celular, inibição por contato e redução na adesão celular, fatores que podem levar à morte celular. (FRESHNEY, 2005).

Por se tratar de uma linhagem contínua, as células HepG2 podem ser mantidas congeladas em nitrogênio líquido e descongeladas para uso, e podem atingir aproximadamente 80 passagens, no entanto, em experimentos, são utilizadas culturas em até 10^a passagem. O número de passagens indica quantas vezes as células foram submetidas ao processo de subcultura. O método de subcultura utilizado depende do tipo celular. No caso de HepG2, por se tratar de uma célula aderente, a subcultura é feita por meio da tripsinização. Este método utiliza a enzima proteolítica denominada

tripsina para o desprendimento das células dos frascos de cultura por meio da degradação da matriz glicoproteica extracelular (FRESHNEY, 2005).

Todo o manuseio de HepG2 durante a manutenção da cultura e tripsinização foi feito em ambiente estéril, utilizando-se capela de fluxo laminar, bem como foram utilizadas soluções e materiais estéreis. Em cultura, as células permaneceram em frascos de 25 cm², 75 cm², ou 150 cm², sendo que o tamanho do frasco utilizado variou de acordo com o número de células necessário em cada ensaio. As células foram mantidas em incubadora a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂.

Para a tripsinização, utilizou-se as seguintes soluções:

Meio de cultura: O meio de cultura *Minimum Essential Medium* (MEM) foi suplementado com 10% de soro fetal, penicilina G 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL. O meio de cultura foi mantido em geladeira

Solução salina PBS (Phosphate Buffered Saline): Foram dissolvidos 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 0,2 g de fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄), 8,0 g de cloreto de sódio (NaCl), 1,15 g de fosfato dibásico de sódio anidro (Na₂HPO₄), em água deionizada q.s.p. 1000mL, sendo agitados até a completa dissolução. O pH da solução foi corrigido para 7,4 com hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl). Realizou-se então a esterilização da solução por meio de autoclave à 120 °C por 30 min.

Tripsina 10%: Utilizou-se solução de tripsina em EDTA 10x proveniente da Sigma. Foi realizada a diluição desta em PBS estéril na proporção 1:9 (10 mL de tripsina em EDTA 10x para 90 mL de PBS). A solução preparada dentro da capela de fluxo laminar e mantida em geladeira.

No processo de tripsinização, na capela de fluxo laminar, realizou-se o descarte do meio de cultura presente no frasco contendo as células. Adicionou-se, para frascos de 75 cm², 10 mL de PBS estéril para lavagem das células aderidas (ou 5 mL para frascos de 25 cm², ou ainda 15 mL para frascos de 150 cm²). O PBS foi descartado e adicionou-se 5mL da solução de tripsina 10% nos frascos de 75 cm² (3mL para frascos de 25 cm², e 10 mL para frascos de 150 cm²). O frasco foi colocado em incubadora a

37°C, e a tripsina ficou em contato com as células por 3 min. As células foram então desprendidas da parede do frasco de cultura por meio de suaves batidas na lateral. Novamente na capela de fluxo laminar, a tripsina foi inativada utilizando-se meio de cultura suplementado no mesmo volume em que foi adicionada tripsina. Em seguida, todo o conteúdo do frasco foi transferido para um tubo cônico estéril, e submetido à centrifugação a 212 g por 5 min. Dentro da capela de fluxo, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi suspenso em 1 mL de meio de cultura. Finalmente, 0,5 mL dessa suspensão foi transferida para um novo frasco de 75 cm², contendo 15 mL de meio de cultura (5 mL em frascos de 25 cm², ou 30 mL em frascos de 150 cm²).

O desprendimento das células por tripsina é utilizado não somente para a realização de subcultura, mas também para a realização do plaqueamento celular. No plaqueamento, um determinado número de células é adicionado em poços de placas de cultura, com o objetivo de padronizar a quantidade de células a serem submetidas às diferentes concentrações das substâncias a serem analisadas.

O plaqueamento foi realizado em culturas até no máximo 10ª passagem contendo células com confluência de 70-80%. No plaqueamento, as células foram tripsinizadas e o *pellet* suspenso em 10 mL de meio de cultura. Após homogeneização, foi reservado em um microtubo 10 µL dessa suspensão celular para teste de viabilidade por Azul de Tripán, explicado mais adiante. Foi reservado também 10 µL dessa mesma suspensão celular em outro microtubo, sendo o conteúdo transferido para a câmara de *Newbauer* para a realização da contagem das células, e posterior cálculo para estimar a quantidade de suspensão celular apropriada para ser distribuída em cada poço da placa para a cultura. Esse cálculo foi realizado segundo a seguinte fórmula:

$$\text{n}^{\circ} \text{ células} = [N \times 10^4] / 4$$

Onde N é o número de células contadas nos 4 quadrantes da câmara de *Newbauer*, 10⁴ é fator da câmara, e 4 é o número total de quadrantes. O fator da câmara fornece o resultado de quantidade de células por mL, pois o volume de suspensão celular que a câmara de *Newbauer* comporta é 0,1 mm³. Portanto, para calcular o volume para mL, multiplica-se por 10⁴ (0,1 mm³ x 10⁴ = 1000 mm³).

O número de células necessário em cada poço da placa de cultura é específico para cada ensaio e, a partir dos dados até então obtidos, basta uma regra de 3 para encontrar o volume da suspensão celular que deve ser coletado para satisfazer a quantidade de células exigida, como mostrado abaixo:

nº células (calculado acima) ----- 1 mL

nº células necessário por poço --- x

Finalmente, foi pipetado o volume de suspensão celular (x) em cada poço da placa, perfazendo o número de células necessário para o ensaio. As placas foram então mantidas em incubadora a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Uma vez que em cada experimento uma quantidade diferente de células é preconizada, utilizaram-se as placas de cultura adequadas para o número de células e tempo de exposição do teste.

Durante o plaqueamento, no momento em que é realizada a contagem das células em um dos lados da câmara de Newbauer, realizou-se também o teste de viabilidade por Azul de Tripán no outro lado da câmara. Esse corante penetra as células e cora as células inviáveis de azul. Foi feita uma mistura contendo 10 µL da suspensão celular a ser plaqueada, reservada em um microtubo, e 10 µL do Azul de Tripán 0,25% em PBS. Essa mistura foi adicionada à câmara de *Newbauer* e realizou-se a contagem de 100 células sob microscópio óptico, coradas ou não de azul. A porcentagem de células não coradas representa a porcentagem de células viáveis. Foi realizado o plaqueamento apenas quando a viabilidade celular foi > 80%, caso contrário, o plaquemento deve ser cancelado e uma nova cultura iniciada.

Após o plaqueamento, realizou-se o tratamento, ou seja, a adição das substâncias a serem analisadas nas concentrações desejadas, bem como a adição de substância no controle positivo e do veículo no controle negativo. As células tratadas permaneceram incubadas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, durante o tempo desejado, e o experimento propriamente dito foi realizado.

Para todos os ensaios com HepG2, foram realizados 3 experimentos independentes, garantindo assim a triplicata biológica. Em cada um desses experimentos, as concentrações dos herbicidas testados, bem como seus controles,

foram analisadas em triplicata, ou seja, em 3 poços distintos da placa de cultura, garantindo assim a triplicata técnica.

3.3 Ensaios de proliferação e morte celular

3.3.1 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico, executado de acordo com FRANKEN e colaboradores (2006), avalia a habilidade de uma única célula se dividir em uma colônia. Esse ensaio é frequentemente utilizado para analisar a capacidade de sobrevivência celular.

A solução utilizada neste ensaio foi:

Glutaraldeído 6% (v:v) e cristal violeta 0,5% (m:v) em PBS: 24 mL de uma solução inicial de glutaraldeído 50% (Sigma G-7651) foi adicionada à 176 mL de PBS. Posteriormente, adicionou-se 1g de cristal ao volume total de 200 mL da solução. A solução foi armazenada em geladeira.

Neste ensaio, 300 células/4 mL de meio de cultura suplementado com soro fetal foram incubadas em placas de cultura individuais de 60mm. Após 24 h de incubação, realizou-se o tratamento com tebutiuram e trifluralina, e as células permaneceram expostas por 14 dias incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂, sendo que no 7º dia de exposição, foi realizada a troca do meio de cultura com reaplicação das substâncias testadas.

Após 14 dias, na bancada (ambiente não estéril), o meio de cultura foi descartado e as placas lavadas com 4 mL de PBS. As colônias formadas foram coradas durante 4h com 4 mL da solução de glutaraldeído 6% e cristal violeta 0,5% diluídos em PBS. Posteriormente, o corante foi descartado e as colônias lavadas com PBS por duas vezes. Foi então realizada de forma visual a contagem das colônias formadas, e realizado o cálculo da sobrevivência celular, como mostrado a seguir:

$$\% \text{ sobrevivência} = \frac{\text{número de colônias da amostra}}{\text{número de colônias do C -}} \times 100$$

Para este ensaio, foi utilizado 0,5% de DMSO no controle negativo e 13 $\mu\text{mol/L}$ de doxorrubicina no controle positivo. A doxorrubicina se liga ao DNA, inibindo a síntese do ácido nucleico. Dessa forma interfere no ciclo celular e consequentemente na capacidade das células em formar colônias.

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata e os resultados analisados estatisticamente. Foi então construído o gráfico da porcentagem de sobrevivência em relação ao controle negativo.

3.3.2 Ensaio com o corante sulforodamina B (SRB)

O ensaio SRB é também conhecido como teste de proliferação celular, e foi desenvolvido por Skehan et al (1990). O ensaio utiliza o corante sulforodamina B, uma aminoxantina de cor rosa brilhante que possui dois grupos sulfônicos capazes de se ligar às porções terminais dos aminoácidos das células quando em solução fracamente ácida. Em condições básicas, essa ligação dissocia-se (McCAFFREY et al., 1988; VICHAI *et al.*, 2006). Como a ligação do SRB com os aminoácidos da membrana é estequiométrica, a quantidade de corante extraído de células coradas é diretamente proporcional ao número de células ao final do ensaio. Portanto, quanto maior a absorvância, maior o número de células. Apesar de receber o nome de proliferação celular, o ensaio pode indicar tanto uma alteração na proliferação das células quanto uma ocorrência de morte celular, uma vez que esses dois fatores podem interferir no número de células ao final do teste.

Neste ensaio, foram utilizadas as seguintes soluções:

Ácido acético 1%: Para esta solução, 5 mL de ácido acético glacial foram adicionados à 495 mL de água destilada. A solução foi homogeneizada e mantida na geladeira.

Metanol/Ácido acético: Adicionou-se 1 mL de ácido acético 1 % preparado previamente em 99 mL de metanol. A solução foi armazenada no freezer.

Sulforodamina 0,5%: Utilizou-se 100 mL de acético 1% preparado previamente, e acrescentou-se 0,5 g de Sulforodamina. Esta solução foi armazenada em geladeira.

Solução Tris 10 mM, pH10,0: Para esta solução, foram adicionados 0,607 g de Tris em água deionizada q.s.p. 500mL. O pH foi ajustado para 10,00 e a solução mantida em geladeira.

No presente trabalho, o ensaio avaliou a quantidade celular diante da exposição aos herbicidas usando diferentes concentrações e tempos de exposição. Aproximadamente 5×10^4 células/2 mL de meio de cultura suplementado com soro fetal foram incubadas em placas de cultura de 24 poços. Após 24 h, as células foram tratadas com os herbicidas tebutiuram e trifluranina, que permaneceram expostas nos tempos de 24h, 48h ou 72h.

Após esse tempo de incubação, a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂, as células foram levadas à bancada (ambiente não estéril), lavadas com 2mL PBS e fixadas com 1 mL da solução metanol/ácido acético 1% por 2 horas. O fixador foi retirado e as células foram coradas com 500 µL da solução sulforodamina B 0,5% por 1 hora. As células foram então lavadas com 2mL de ácido acético 1% por oito vezes, para retirada do excesso de sulforodamina. O corante aderido nas células foi solubilizado com tampão Tris 10mmol/L pH 10, e sua absorbância quantificada por espectrofotometria a 540 nm. O modelo do equipamento utilizado foi CARY 50MPR, Varian. O *software* utilizado foi o Cary Win UV.

Para este ensaio, foi adicionado 0,5% de DMSO no controle negativo e 0,5 mmol/L de t-BOOH no controle positivo. O t-BOOH inibe a defesa antioxidante das células, e na concentração utilizada, leva as células à morte por estresse oxidativo.

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata e os resultados analisados estatisticamente. Foi então construído o gráfico da porcentagem da absorbância do SRB em relação ao controle negativo, indicando a porcentagem da proliferação e/ou morte celular em relação ao controle negativo.

3.3.3 Ensaio com o corante brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolium (MTT).

O ensaio MTT, também conhecido como ensaio de viabilidade celular, foi desenvolvido inicialmente por Mosmann (1983). Este ensaio utiliza o corante brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2-il) – 2,5 difenil tetrazolium (MTT). Este corante é reduzido por

enzimas microssomais e, em menor parcela, pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase, formando o composto “sal de formazan” de coloração roxa característica, o qual pode ser quantificado por espectrofotômetro. Este ensaio, portanto, avalia a presença de mitocôndrias funcionais, o que indica a presença indireta de células viáveis no ensaio, fornecendo dados sobre indução de morte celular.

Para este ensaio, foram utilizadas as soluções:

Meio de cultura sem vermelho de fenol: Foi utilizado DMEM sem vermelho de fenol suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). Portanto, utilizou-se 90 mL do meio de cultura e 10 mL de SBF. A solução foi mantida em geladeira. Solução preparada dentro da capela de fluxo laminar.

MTT 5mg/mL em PBS: 50 mg de MTT foram diluídos em 10 mL de PBS. A solução foi preparada dentro da capela de fluxo laminar e armazenada em geladeira.

Glicina 0,2M, pH 10,2: Foram dissolvidos 0,15 g de glicina em 10 mL de água deionizada. O pH foi ajustado para 10,2. A solução foi mantida na geladeira.

Para o ensaio, aproximadamente 2×10^3 células/200 μ L de meio de cultura suplementado com soro fetal foram incubadas em placas de cultura de 96 poços. Após 24 h de incubação, diferentes concentrações de tebutirom e trifluralina foram adicionadas às células, que tiveram tempos de exposição de 24h, 48h ou 72h, incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂.

Após o período, dentro da capela de fluxo laminar, as células foram lavadas com 200 μ L de PBS e adicionou-se 180 μ L de meio de cultura sem vermelho de fenol e 20 μ L de MTT em 5mg/mL em PBS. As células foram então novamente incubadas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ por 3 horas e no escuro. Posteriormente, na bancada, o meio de cultura e MTT foram descartados e os cristais de formazan produzidos foram solubilizados com 200 μ L de DMSO e 25 μ L de solução glicina 0,2M, pH 10,2. Finalmente, realizou-se a leitura da absorbância da solução (cristais de formazan/DMSO/glicina) em espectrofotometria a 570 nm. O modelo do equipamento utilizado foi CARY 50MPR, Varian. O *software* utilizado foi o Cary Win UV.

Para este ensaio, foi adicionado 0,5% de DMSO no controle negativo e 10 $\mu\text{mol/L}$ de CCCP no controle positivo. O CCCP é um desacoplador da cadeia transportadora de elétrons, interferindo na produção de ATP, e consequentemente, na viabilidade celular.

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata e os resultados analisados estatisticamente. Foi então construído o gráfico da porcentagem da absorvância do Sal de formazan em relação ao controle negativo, indicando a porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle negativo.

3.3.4 Análise do ciclo celular

Este ensaio permite analisar a população celular em cada uma das fases G0/G1, S e G2/M do ciclo. Isso é possível devido a diferença na quantidade de material genético entre essas fases. Células em G2/M, até antes da citocinese, possuem o dobro da quantidade de DNA das fases G0/G1. A fase S, em que ocorre a síntese de DNA, irá apresentar quantidade intermediária de material genético. Além disso, o ensaio também permite identificar células em apoptose, uma vez que pode detectar populações de células em sub-G0, que indicam DNA fragmentado. Ensaio de ciclo celular foram descritos por Crissman e Steinkamp (1973) e Braylan e colaboradores (1982).

As seguintes soluções foram utilizadas para este ensaio:

RNAse (10mg/mL): 0,01 g de RNAse foi dissolvido em 1 mL de água deionizada. A solução foi mantida no freezer.

Iodeto de Propídio (PI) 50 $\mu\text{g/mL}$ (Estoque): 500 μg de PI foram dissolvidos em 10 mL de água deionizada. A solução foi armazenada em geladeira protegida da luz.

Iodeto de Propídio (PI) 5 $\mu\text{g/mL}$: Em 4450 μL de água deionizada, foram adicionados 5 mg de citrato de sódio, 500 μL da solução de PI 50 $\mu\text{g/mL}$, e 5 μL de Triton X-100.

Aproximadamente 1×10^5 células/3 mL de meio de cultura suplementado com soro fetal foram incubadas em placas de cultura de 6 poços. Após 24 h de incubação, foi realizado o tratamento com diferentes concentrações dos herbicidas tebutiuram e trifluralina, e as células permaneceram expostas por 24h, 48h ou 72h, incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂.

Após esse período, na bancada (ambiente não estéril), as células foram tripsinizadas e mantidas em tubos cônicos. Foi feita uma centrifugação a 212 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspendidas em 500 µL de PBS gelado e mantidas em gelo. Foi adicionado 500 µL de etanol 100%, e as células assim ficaram mantidas durante 1 hora. Ao término deste período, acrescentou-se 1 mL de soro bovino fetal nos tubos, que foram centrifugados nas mesmas condições a 212 g por 5 min. Os sobrenadantes foram aspirados cuidadosamente e adicionou-se 2 mL de PBS em cada tubo. Foi feita uma nova centrifugação e os sobrenadantes foram descartados. Adicionou-se ao pellet 330 µL de PBS e 1 µL de solução de RNase (10mg/mL), e incubou-se em banho-maria a 37° C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 125 µL de solução de iodeto de propídeo (5mg de PI/ 100mL de solução de citrato de sódio 1,12% p/v), e realizou-se a transferência das amostras para tubos de citometria. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, realizou-se as análises por citometria de fluxo, no equipamento FACSCanto I (Bencton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), onde foram analisados 10.000 eventos, e os resultados foram avaliados pelo programa MOD-FIT.

Para este ensaio, foi adicionado 0,5% de DMSO no controle negativo e 16 µg/mL de cisplatina no controle positivo. A cisplatina é um agente alquilante do DNA, inibindo sua replicação, e consequentemente interferindo no ciclo celular, podendo levar à apoptose.

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata e os resultados analisados estatisticamente. Foi então construída uma tabela mostrando as populações de células em cada uma das fases do ciclo, e populações de células em SubG0.

3.3.5 Teste com o marcador Anexina V/PI

A exposição de fosfatidil serina na face externa da membrana é um indicativo de morte celular por mecanismos apoptóticos. Portanto, para a identificação deste tipo

de morte, têm-se utilizado anexina V, um marcador que tem a capacidade de se ligar fortemente aos fosfolípides de membrana plasmática, através de suas cargas negativas na presença de íons cálcio. Sugere-se que a anexina-V não penetra na membrana plasmática. Dessa forma, a translocação da fosfatidilserina da face interna para a face externa da membrana e a ligação do marcador anexina-V é uma evidência de apoptose (THIAGARAJAN; TAIT, 1990; VERHOVEN et al., 1995; MOCHIZUKI et al., 2003). O ensaio com anexina V é comumente realizado com o uso associado de iodeto de propídio, o qual liga-se ao DNA celular em caso de rompimento da membrana celular, aspecto característico de morte celular por necrose (PEC et al., 2003).

Os resultados deste ensaio, por meio de citometria, mostram populações de células em quatro diferentes quadrantes. No quadrante 1 (Q1), estão as células marcadas com PI apenas, ou seja, PI+A-, indicando células em necrose. No quadrante 2 (Q2), estão as células marcadas tanto com PI quanto com anexina (PI+A+), indicando que essas células sofrem necrose e apoptose simultaneamente. Uma vez que os processos de morte estão relacionados, é possível que células apoptóticas que não foram fagocitadas entrem em necrose, gerando essa dupla marcação. No quadrante 3 (Q3), se encontram células que não foram marcadas nem por PI, nem por Anexina (PI-A-), o que indica células viáveis. E por fim, no quadrante 4 (Q4), encontram-se células marcadas apenas por Anexina (PI-A+), o que indica células em apoptose.

Para a realização deste ensaio, foram utilizadas as soluções:

Tampão de ligação 10x (Estoque), pH 7,4: Esta solução é composta por Hepes 0,1mol/L, NaCl 1,4 mol/L e CaCl₂ 25 mmol/L. Portanto, foram pesados, 1,19 g de Hepes, 4,090 g de NaCl e 0,138 g de CaCl₂, e diluídos em água deionizada q.s.p. 50mL. O pH foi ajustado para 7,4 e a solução foi filtrada em capela de fluxo laminar, e posteriormente, mantida em geladeira.

Iodeto de Propídio (PI) 50 µg/mL (Estoque): 500 µg de PI foram dissolvidos em 10 mL de água deionizada. A solução foi armazenada em geladeira protegida da luz.

Anexina V 0,25 µg/mL em tampão de ligação: Em 4320 µL de água deionizada, foram misturados 480 µL de tampão de ligação 10x (previamente preparado), e 48 µL de anexina. Esta solução deve ser preparada em capela de fluxo laminar no momento do uso.

Iodeto de Propídio (PI) 5 µg/mL em tampão de ligação: Em 3768 µL de água deionizada, foram misturados 432 µL de tampão de ligação 10x (previamente preparado), e 480 µL de PI 50 µg/mL (previamente preparado). Esta solução deve ser preparada em capela de fluxo laminar no momento do uso.

No presente trabalho, aproximadamente 1×10^5 células/3 mL de meio de cultura suplementado com soro fetal foram incubadas em placas de cultura de 6 poços por 24 h. Após esse período, realizou-se a exposição das células por 24h, 48h, ou 72h, que permaneceram incubadas com as substâncias tebutiuram e trifluralina a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂.

As células então foram tripsinizadas em ambiente não estéril (bancada), e mantidas em tubos cônicos. Foram centrifugadas à 212 g por 5 min, lavadas com PBS gelado, centrifugadas novamente à 212 g por 5 min e mantidas em gelo. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi suspenso novamente em 100 µL de Anexina V 0,25 µg/mL em tampão de ligação (com exceção da amostra “branco”, que foi suspensa em 200 µL de PBS). As células permaneceram incubadas com essa solução no gelo por 15 min. As amostras foram transferidas para tubos de citômetro, e no momento da leitura, foi adicionado às amostras 100 µL da solução PI 5 mg/mL em tampão de ligação (exceto na amostra “branco”). O branco deve passar pela leitura somente com 200 µL de PBS, adicionado anteriormente. A análise das células foi realizada utilizando citometria de fluxo, no equipamento FACSCanto I (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), onde foram analisados 10.000 eventos.

Para este ensaio, foi adicionado 0,5% de DMSO no controle negativo e 0,16 mg/L de cisplatina no controle positivo. A cisplatina é um agente alquilante do DNA, inibindo sua replicação, e consequentemente interferindo no ciclo celular. Nessa concentração utilizada leva à morte celular.

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata e os resultados analisados estatisticamente. Foi então construída uma tabela mostrando a população de células (em porcentagem) em cada quadrante.

3.3.6 Análise de Condensação e fragmentação nuclear

Para a análise da morfologia do núcleo é utilizado o corante fluorescente Hoechst 33342, que é permeável nas membranas celulares e se une a ligações adenina-timina, corando o núcleo de azul, sendo utilizado, portanto para avaliação de ciclo celular e apoptose (KIECHLER e ZHANG 2002). Depois de coradas, as células são analisadas por microscopia de fluorescência, e as alterações morfológicas nucleares características de apoptose (condensação da cromatina e núcleos fragmentados) são analisadas visualmente.

Foram utilizadas as seguintes soluções na realização deste ensaio:

Hoechst 33342 a 1 mg/mL (Estoque): 10 mg de Hoechst 33342 foram dissolvidos em 10 mL de água deionizada. A solução foi mantida em geladeira.

Hoechst 33342 a 5 µg/mL em PBS: 50 µL da solução de Hoechst a 1 mg/mL previamente preparada foi adicionada à 10 mL de PBS. A solução foi feita no momento do uso.

Solução de montagem: Para o preparo da solução de montagem, foram utilizados 9 mL de glicerol, 1 mL de tampão CAPs 0,1 mol/L, pH 9, e 0,1% de p-phenylenediamine, sendo pesado, portanto, 0,01 g dessa substância para o preparo de 10 mL de solução. Foram então feitas alíquotas de 1mL dessa solução, que foram mantidas a -80 °C.

No ensaio, 5×10^4 células/2 mL de meio de cultura suplementado com soro fetal foram cultivadas sobre lamínulas em placas de cultura de 12 poços, que permaneceram em incubação por 24 h. Posteriormente, foi realizado o tratamento das células, que permaneceram incubadas com diferentes concentrações de tebutiuram e triflurana a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. Os tempos de exposição de 24h, 48h, e 72 h foram analisados.

Após este período, em ambiente não estéril (bancada), as células foram lavadas com 1 mL de PBS e fixadas (sobre as lamínulas), utilizando 1 mL de metanol absoluto à -20°C por duas horas. O metanol foi retirado e as células foram lavadas

com 1 mL de PBS por três vezes. Realizou-se então a coloração com Hoechst 33342 a 5 µg/mL por 30 min no escuro. Foram utilizados 200 µL dessa solução por poço. Após a coloração, o corante foi retirado e realizou-se duas lavagens com 1 mL de PBS. As células permaneceram mergulhadas em PBS até a montagem das lâminas. Para a montagem, as lâminas foram limpas com álcool 70% e uma gota da solução de montagem foi colocada sobre elas. As lamínulas foram cuidadosamente transferidas da placa para as lâminas com uma pinça, sendo colocadas sobre a solução de montagem, com as células voltadas para baixo, em contato com a solução. As lamínulas foram então vedadas nas bordas com esmalte transparente e foram mantidas na geladeira até a leitura em microscópio de fluorescência. Foram analisadas 300 células por lâmina. A análise foi feita em comprimentos de onda de excitação de 330-380 nm e de emissão de 480 nm. O microscópio utilizado foi o Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss, em um aumento de 40 vezes. O *software* utilizado para as análises foi o AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss).

Para este ensaio, foi adicionado 0,5% de DMSO no controle negativo e não foi utilizado controle positivo, pois uma vez corados os núcleos das células, é possível afirmar que não houve erro de técnica no experimento, e a morfologia dos núcleos pode ser analisada, identificando a presença ou não de condensação e fragmentação nuclear.

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata e os resultados analisados estatisticamente. Portanto, em um único experimento, foram feitas três lâminas por concentração testada. Foi então construído o gráfico da porcentagem de células com condensação / fragmentação nuclear em relação ao controle negativo.

3.3.7 Análise do Potencial de membrana mitocondrial

Este ensaio avalia as possíveis alterações na funcionalidade mitocondrial, uma vez que o colapso do potencial de membrana mitocondrial é um dos sinais indicativos de morte celular. Este ensaio utiliza a sonda catiônica fluorescente TMRM. As mitocôndrias com potencial de membrana intacto mantêm em seu interior uma carga negativa, portanto captam a sonda TMRM. Ao final do ensaio, a fluorescência das amostras é analisada, sendo diretamente proporcional ao potencial de membrana mitocondrial.

Neste ensaio, foram utilizadas as seguintes soluções:

Meio de cultura sem vermelho de fenol: Foi utilizado DMEM sem vermelho de fenol suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). Portanto, utilizou-se 90 mL do meio de cultura e 10 mL de SBF. A solução foi mantida em geladeira.

TMRM 1mmol/L em DMSO: 0,0015 g de TMRM foram dissolvidos em 3 mL de DMSO. Foram feitas alíquotas de 90 µL da solução, protegidas da luz e armazenadas a -20 °C.

Triton 0,1%: 100 µL de Triton X-100 foi diluído em 100 mL de água deionizada e armazenado em geladeira.

Aproximadamente 1×10^5 células/3 mL de meio de cultura suplementado com soro fetal foram incubadas em placas de cultura de 6 poços. Após 24 h, as células foram tratadas com diferentes concentrações de tebutiuram e trifluralina por 24h, 48h ou 72h de exposição, permanecendo incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂.

Após esse período, na bancada, as células foram tripsinizadas e transferidas para tubos cônicos. As células foram centrifugadas à 212 g por 5 min e lavadas com 1 mL de PBS. Adicionou-se então 597 µL de meio de cultura sem vermelho de fenol e 3 µL da solução TMRM 1 mmol/L, obtendo-se assim a sonda TMRM na concentração final de 6,6 µmol/L. As células permaneceram incubadas com a sonda por 30 minutos a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, e protegidas da luz. Ao final desta etapa, as amostras foram centrifugadas a 212 g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 2 mL de Triton 0,1% (v/v). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2.000 g por 5 minutos e a fluorescência da TMRM captada e retida pelas mitocôndrias foi determinada no sobrenadante em 485 e 590 nm, para excitação e emissão, respectivamente, utilizando um espectrofluorímetro. O equipamento utilizado foi o F-4500 Fluorescence Spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japão). O software utilizado foi o FI Solutions.

Para este ensaio, foi adicionado 0,5% de DMSO no controle negativo e 25 µmol/L de CCCP no controle positivo. O CCCP é um desacoplador da cadeia

transportadora de elétrons, e na concentração utilizada, provoca dissipação no potencial de membrana mitocondrial.

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata e os resultados analisados estatisticamente. Foi então construído o gráfico da porcentagem da fluorescência, emitida pela TMRM, em relação ao controle negativo.

3.3.8 Análise da liberação de LDH

Para este ensaio, utilizou-se o kit comercial LDH Liquiform (Labtest), e foram seguidas as instruções de uso do fabricante. A lactato desidrogenase (LDH, EC: 1.1.1.27) é uma enzima citosólica presente em vários organismos que atua no sistema glicolítico e no metabolismo anaeróbico através da catálise reversível de piruvato à lactato ao final da via glicolítica, com o auxílio do sistema de coenzimas NADH/NAD⁺ (ANAZETTI; MELO, 2007), segundo a reação:

Ao final do ensaio, analisa-se o decréscimo da absorvância em 340 nm devido a oxidação do NADH, que é proporcional à atividade da LDH da amostra.

Com a ocorrência de necrose, há perda de integridade da membrana e consequente liberação dessa enzima, por isso, a quantificação da LDH no meio de cultura tem sido utilizada para a identificação de desse tipo de morte celular.

As soluções utilizadas neste ensaio foram:

Meio de cultura sem vermelho de fenol: Foi utilizado DMEM sem vermelho de fenol suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). Portanto, utilizou-se 90 mL do meio de cultura e 10 mL de SBF. A solução foi preparada na capela de fluxo laminar e mantida em geladeira.

Reagente 1 + Reagente 2 do kit comercial LDH Liquiform (Labtest): O reagente 1 é composto por NADH 360 µmol/L e azida sódica 0,095%. O reagente 2 contém tampão 250 mmol/L (pH 7,5), piruvato de sódio 6 mmol/L e azida sódica 0,095%. Para

o ensaio, todo o volume do reagente 1 é misturado a todo o volume do reagente 2 do kit. Tanto a mistura quanto os reagentes 1 e 2 podem ser armazenados em geladeira, sendo a mistura estável por até 8 dias.

Triton 20%: 5 mL de Triton X-100 foi diluído em 100 mL de água deionizada e armazenado em geladeira.

No presente trabalho, aproximadamente 1×10^5 células/3 mL de meio de cultura sem vermelho de fenol, e suplementado com soro fetal, foram incubadas em placas de cultura de 6 poços. 24 h depois, foram adicionadas diferentes concentrações de tebutirom e trifluralina às células, que permaneceram expostas por 24h, 48h, ou 72h com as substâncias, incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂.

Após o período de exposição, as células foram levadas à bancada e o meio de cultura foi recolhido e mantido em banho de gelo. Em uma cubeta, foi adicionado 1 mL da solução composta pelos reagentes 1 e 2 do kit comercial LDH Liquiform, que contém piruvato e NADH, substrato para LDH. O reagente permaneceu incubado por 3 minutos a 37 °C (pré-aquecimento) no espectrofotômetro Shimadzu UV 1800. Adicionou-se então 100 µL do meio de cultivo recolhido inicialmente, e a absorbância foi analisada em 340 nm por 10 minutos a 37 °C. O *software* utilizado foi o UV Probe 2.35. A atividade da LDH foi então calculada seguindo a fórmula:

$$A = [(A_1 - A_2) / 2] \times 1,746.$$

Sendo A = atividade de LDH na amostra, em U/mL, A₁ = absorbância inicial em 340 nm, A₂ = absorbância final em 340 nm, e 1,746 é o fator do teste.

O fator é calculado segundo a fórmula:

$$\text{Fator} = (VT \times 1000) / (\epsilon \times VA \times d)$$

Onde VT = volume total do ensaio em mL (1 mL no caso), 1000 é a conversão de U/mL para U/L, ϵ = absortividade milimolar do NADH (6,3), VA = volume da amostra em mL (0,1 mL no caso), e d = espessura da solução (1).

Para este ensaio, foi adicionado 0,5% de DMSO no controle negativo e Triton no controle positivo. O Triton induz uma permeabilização na membrana celular, levando-a à necrose. Essa permeabilização provoca a liberação de LDH. Para o controle positivo, as células desse grupo foram tripsinizadas, centrifugadas a 212 g por 5 min., e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 1 mL de PBS e 10 µL de Triton X-100 (preparado 20% em água MiliQ). As células foram incubadas por 15 minutos a 37 °C e centrifugadas à 755 g, por 10 minutos, 4 °C. O sobrenadante foi mantido em gelo até sua leitura, nos mesmos parâmetros que as amostras.

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata e os resultados analisados estatisticamente. Foi então construído o gráfico da atividade de LDH extracelular das amostras.

3.4 Ensaios de estresse oxidativo

O ensaio repórter e o qRT-PCR foram realizados com a parceria do prof. Dr. Kendall Wallace, da Universidade de Minnessota – Duluth.

3.4.1 Determinação do acúmulo de espécies reativas

O acúmulo de espécies reativas é indicativo de estresse oxidativo, que por sua vez está envolvido com o desenvolvimento de mecanismos citotóxicos. Para este ensaio, utilizou-se a sonda de CM-H₂DCFDA, que é desacetilada à DCFH₂. Essa molécula reage com as espécies reativas presentes no meio intracelular e consequentemente é oxidada ao composto fluorescente DCF. A fluorescência emitida é então analisada em espectrofluorímetro, sendo diretamente proporcional à quantidade de espécies reativas presentes no interior das células.

As soluções utilizadas neste ensaio foram:

Meio de cultura sem vermelho de fenol: Foi utilizado DMEM sem vermelho de fenol suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). Portanto, utilizou-se 90 mL do meio de cultura e 10 mL de SBF. A solução foi mantida em geladeira.

Sonda CM-H₂DCFDA 2mmol/L em DMSO: A sonda (Invitrogen), é adquirida aliquoteada em frascos contendo 50 µg de CM-H₂DCFDA. Para a obtenção da concentração de 2mmol/L, adiciona-se ao frasco da sonda, 43 µL de DMSO.

Assim, avaliamos a produção e acúmulo das espécies reativas, expondo aproximadamente 1×10^5 células em 3 mL de meio de cultura suplementado com soro fetal. As células foram primeiramente incubadas em placas de cultura de 6 poços, e permaneceram incubadas por 24 h. Posteriormente, realizou-se os tratamentos com os herbicidas tebutiuron e trifluralina, e as células ficaram 24h, 48h, ou 72h expostas às substâncias, incubadas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂.

Após a incubação com o tratamento no tempo desejado, as células foram levadas em ambiente não estéril, na bancada, tripsinizadas e transferidas para tubos cônicos. Foi feita uma centrifugação a 212 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 1 mL de PBS. A sonda CM-H₂DCFDA foi então adicionada. Para atingir uma concentração final da sonda de 5 µmol/L, primeiramente 500 µL de meio de cultura sem vermelho de fenol foram adicionados ao *pellet* de células, e posteriormente 1,3 µL da sonda (2mmol/L em DMSO) foi pipetado. As células permaneceram incubadas com o meio e com CM-H₂DCFDA a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ por 1 hora. Após esse período, as células foram centrifugadas à 212 g por 5 min, o sobrenadante foi descartado, e as células foram lavadas com 1 mL de PBS duas vezes. O *pellet* de células foi suspenso novamente em 2 mL de PBS, e a fluorescência do sobrenadante foi analisada por espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de 503 nm de excitação e 529 nm de emissão. O equipamento utilizado foi o F-4500 Fluorescence Spectrophotometer (Hitachi, Tokyo, Japão). O software utilizado foi o FI Solutions.

Para este ensaio, foi adicionado 0,5% de DMSO no controle negativo e 100 µmol/L de t-BOOH no controle positivo. O t-BOOH inibe a defesa antioxidante das células, levando a um acúmulo de espécies reativas no meio intracelular.

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata e os resultados analisados estatisticamente. Foi então construído o gráfico da porcentagem da fluorescência de DCF em relação ao controle negativo, indicando a quantidade de espécies reativas presente nas células em relação ao controle negativo.

3.4.2 RT-PCR quantitativo - Análise do gene *NQO1*

Com a técnica qPCR, é possível analisar a transcrição de genes de interesse, analisando a quantidade de RNA produzido em uma determinada amostra. Por isso, o RNA é extraído, e a partir dele se produz o o DNA complementar (cDNA), uma molécula mais estável, por meio da transcriptase reversa (RT). Finalmente, realiza-se a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) utilizando-se o cDNA produzido. A qPCR amplifica a sequência de interesse, o que possibilita sua análise. Uma curva padrão é utilizada para o cálculo do número de cópias produzidas ao final da reação. Além disso, na qPCR, é realizada a reação das amostras com *primers* específicos para a amplificação de sequências de interesse, e a reação das amostras com *primers* utilizados como *housekeeping*, ou genes de referência. O uso da curva padrão torna possível o resultado em número de cópias. Calcula-se então o número de cópias (gene interesse) / número de cópias (housekeeping), para o resultado final por amostra. Neste ensaio, também é realizada a curva de melting. Um único pico na curva indica especificidade do *primer*, e permite a validação do ensaio.

Neste ensaio, utilizou-se os reagentes presentes nos seguintes kits:

kit RNeasy (Qiagen): Utilizado para a lise das células e extração de RNA.

Conjunto RNase-Free DNase (Qiagen): Este conjunto foi utilizado para eliminar possíveis moléculas de DNA durante a extração do RNA.

Kit Omniscript RT (Qiagen): Kit para a realização da RT-PCR.

FastStart SYBR Green I (Roche Diagnostics): Para a realização da qPCR.

HotStart PCR mix (Qiagen): Utilizado para a PCR feita a fim de testar validação dos conjuntos de *primers*.

QIAquick PCR purification kit (Qiagen): Kit utilizado para purificação das sequências amplificadas pelos *primers*, a fim de gerar as curvas padrão.

Para o ensaio, inicialmente, 2×10^5 células / 2mL de meio suplementado com soro fetal foram incubadas em placas de 12 poços por 24 h. Depois desse período, realizou-se o tratamento das células com tebutiuram e trifluralina, que permaneceram expostas por 24 h.

Posteriormente, foi realizada a lise das células na capela de fluxo laminar. Utilizou-se o Kit RNeasy (Qiagen). Para a lise, as células foram lavadas com 1 mL de PBS por duas vezes, adicionou-se então 350 µL do tampão RLT do kit (acrescido de 10 µL de 2-mercaptoetanol por 1 mL de tampão), as células foram coletadas utilizando-se um rodinho para desprende-las da placa de cultura, transferidas para um microtubo e mantidas a -80°C , para posterior realização da extração do RNA.

Na extração do RNA, utilizando-se o kit RNeasy (Qiagen), as células foram descongeladas, homogeneizadas utilizando-se uma seringa, e pipetou-se 350 µL de etanol 70%. Todo o volume da suspensão celular foi então transferido para a coluna presente no kit (*RNeasy spin column*), acoplada a um microtubo de 2 mL. As células foram centrifugadas à 8000 g por 30 segundos, e o líquido, que ficou armazenado no microtubo abaixo da coluna, foi descartado. Adicionou-se à coluna 350 µL do tampão RW1, também presente no kit, foi feita uma nova centrifugação à 8000 g por 30 segundos, e o líquido no microtubo foi descartado. Em seguida, foi realizado um protocolo com DNase, com o objetivo de eliminar moléculas de DNA durante a extração do RNA. Para isso, foram adicionados diretamente à coluna 80 µL da solução de DNase + tampão RDD (10 µL de DNase + 70 µL de tampão RDD). Esses reagentes se encontram no Conjunto RNase-Free DNase (Qiagen). A solução ficou em contato com a coluna por 15 min. Após esse período, adicionou-se 350 µL do tampão RW1, e realizou-se uma centrifugação à 8000 g por 30 segundos, descartando-se depois o líquido do microtubo. Após realizado esse protocolo com DNase, foram pipetados 500 µL do tampão RPE (kit RNeasy) à coluna. Centrifugou-se à 8000 g por 1 minuto, com o objetivo de retirar todo o etanol da coluna, descartou-se o microtubo de 2mL com o líquido. Um novo microtubo de 2 mL foi acoplado à coluna e realizou-se uma centrifugação à 12000 g por 1 minuto, e o microtubo foi descartado com o líquido. Um microtubo com tampa de 1,5 mL foi então acoplado à coluna. Pipetou-se 30 µL de água livre de RNase diretamente à coluna. A água ficou em contato com a coluna por 1 minuto. Realizou-se uma centrifugação à 8000 g por 1 minuto, eluindo assim o RNA à água no microtudo de 1,5 mL.

Uma vez que o RNA é instável, foi feita a produção de cDNA com a RT-PCR, utilizando-se o kit Omniscript RT (Qiagen). Realizou-se a leitura da quantidade de RNA da amostra no *nanodrop* e 1,5 µg de RNA total foi usado para gerar cDNA com *primers* randômicos. Uma *master mix* contendo componentes do kit foi previamente preparada, calculando-se, por amostra: tampão (2 µL), dNTP (2 µL), *primers* randômicos (4 µL), RNAsin (0,25 µL) e a enzima RTO (1 µL), totalizando um volume de 9,25 µL. Adicionou-se então, em um microtubo de 0,5 mL, para cada amostra, 9,25 µL da *master mix* previamente preparada e 10,75 µL da amostra + dH₂O (perfazendo a quantidade de 1,5 µg de RNA total), totalizando um volume de 20 µL. As amostras foram então submetidas à RT-PCR (5 min a 37 °C, 60 min a 37 °C, 3 min a 93 °C, e ∞ a 4 °C), gerando assim o cDNA, molécula estável que pode ser armazenada a – 20 °C.

A qPCR é realizada tanto com o gene de interesse quanto com o *housekeeping*, amplificando ambas as sequências por meio de seus respectivos pares de *primers*. O *housekeeping* é um gene de referência utilizado como normalizador na análise de expressão gênica. O RNA ribossômico 18 S é uma sequência muito utilizada com esta finalidade. Assim, diluições do cDNA produzido foram feitas para a posterior realização da qPCR, e consequente amplificação dos genes de interesse e *housekeeping*, utilizando-se seus respectivos pares de *primers*. Para análise do gene de interesse *NQO1*, utilizou-se uma diluição de 1:10, e para a análise do *housekeeping 18 S*, uma diluição de 1:100.

Foram também preparadas as diluições seriadas da curva padrão. Para o gene de interesse *NQO1*, preparou-se as diluições, em número de cópias, de 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 5×10^1 e 5×10^0 , que irão perfazer após mistura com a *master mix*, diluições, em número de cópias, de 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , e 1×10^1 . Para o *housekeeping 18 S*, preparou-se as diluições, em número de cópias, de 5×10^8 , 5×10^7 , 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 e 5×10^2 , que irão perfazer após mistura com a *master mix*, diluições, em número de cópias, de 1×10^9 , 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 e 1×10^3 .

Para a qPCR, utilizou-se o equipamento LightCycler (Roche Diagnostics), o *software* LightCycler®, e o Kit FastStart SYBR Green I (Roche Diagnostics). Uma *master mix* foi previamente preparada, calculando-se, por amostra: dH₂O (6 µL), MgCl₂ (0,8 µL), *L primer* (0,5 µL), *R primer* (0,5 µL) e LC Rxn mix (1 µL), totalizando

um volume de 8,8 µL. Nos capilares do LightCycler, foram pipetados 8,8 µL da Master mix previamente preparada e 2,2 µL da amostra ou curva padrão, totalizando um volume de 10 µL. Os capilares foram centrifugados a 212 g por 1 min, colocados no equipamento, e a qPCR foi realizada. O tipo de análise foi quantificação absoluta, e foi realizada a curva de melting. Após a PCR, com os valores em número de cópias do gene de interesse *NQO1* e do gene *housekeeping 18S*, obtidos por meio da curva padrão, foi realizado o cálculo:

$$n^{\circ} \text{ cópias } NQO1 / n^{\circ} \text{ cópias } 18S$$

Esse cálculo foi realizado em todas as amostras, permitindo a análise da transcrição do *NQO1*.

Os *primers* foram desenhados utilizando-se a informação de sequência a partir da base de dados GenBank (BENSON et al., 2013) com o Primer-BLAST. O gene de interesse utilizado foi o *NQO1*. O *upper primer* foi o 5' -GTG GAG TCG GAC CTC TAT GC -3', e o *lower primer* foi o 5' – GTT CGC AGG GTC CTT CAG TT – 3'. O gene *housekeeping* utilizado foi o ribossomo 18 S (18S). O *upper primer* foi o 5' - CGC CGC TAG AGG TGA AAT TCT -3', e o *lower primer* foi o 5' CAG TCG GCA TCG TTT ATG GTC - 3'.

Para a curva padrão, primeiramente foi realizada a validação dos *primers*, posteriormente a purificação dos produtos de interesse, e por fim, gerou-se a curva. Para a validação dos *primers*, realizou-se uma PCR com o *template* (5 µL por amostra), os *primers* (10 µL por *primer* por amostra), e o HotStart PCR mix (25 µL por amostra), totalizando um volume de 50 µL. O *template* consiste na mistura de cDNA feito a partir da mesma espécie para qual o primer foi feito. No caso, o *template* foi uma mistura de cDNA feito a partir de amostras de HepG2 (célula de humanos). Foi realizada então a PCR com 3 amostras (totalizando um volume de 150 µL, sendo 50 µL em cada microtubo). Os parâmetros da PCR foram: 15 min de ativação à 95 °C, 35 ciclos de denaturação, anelamento e extensão, sendo 30 seg de denaturação à 94 °C, 30 seg de anelamento à 60 °C, 1 min extensão à 72 °C, e finalmente, 10 min de extensão final à 72 °C, e ∞ a 4 °C. Os produtos amplificados foram então avaliados

em gel de eletroforese, e uma vez que este apresentou apenas uma banda, pôde-se constatar a amplificação apenas dos produtos de interesse.

Posteriormente, os produtos de interesse foram purificados utilizando-se o QIAquick PCR *purification kit* (Qiagen). Para isso, as amostras foram colocadas em um mesmo microtubo. Em seguida, adicionou-se o tampão PB à amostra na proporção de 5:1. Uma vez que o volume de amostra era de 150 µL, utilizou-se 750 µL de PB. A amostra foi adicionada à coluna presente no kit, com seu respectivo tubo coletor de 2 mL. Foi realizada uma centrifugação à 17000 *g* por 30-60 segundos e descartou-se o líquido da coluna. Foram adicionados 700 µL do tampão PE (acrescido de etanol 96-100%, como especificado no rótulo) à coluna. Foi realizada uma nova centrifugação à 17000 *g* por 30-60 segundos, o tubo coletor foi descartado e um novo foi acoplado à coluna. Foi realizada então uma centrifugação à 17000 *g* por 1 min. O tubo coletor foi também descartado e um tubo de 1,5 mL foi acoplado à coluna. Foram então adicionados 30 µL do tampão EB (10 mM Tris Cl, pH 8,5) no centro da coluna. O tampão permaneceu em contato com a coluna por 1 minuto, e posteriormente foi realizada a centrifugação à 17000 *g* por 1 min. Realizou-se então a leitura da quantidade de cDNA no nanodrop, que mostra o valor em ng/ µL. A partir desse valor, e sabendo-se o número de pares de base da sequência, foi feito o cálculo do número de cópias por µL presente na amostra. Em seguida, foi calculado o volume de água e amostra necessários para obtenção de 5×10^9 número de cópias. A partir dessa diluição, realizou-se diluições seriadas para obtenção de 5×10^8 , 5×10^7 , até 5×10^0 número de cópias. Para obtenção de 5×10^8 , utilizou-se 5 µL da diluição de 5×10^9 , e 45 µL de água. Para de 5×10^7 , utilizou-se 5 µL da diluição de 5×10^8 , e 45 µL de água, e assim por diante. Dessa forma, foi gerada a curva padrão.

Para este ensaio, foi adicionado 0,1% de DMSO no controle negativo e 5 µmol/L de AI-1 no controle positivo. O AI-1 é um composto cloroquinolinona que interagem com a Keap1 e diminui sua interação com Nrf2, que por sua vez migra para o núcleo e ativa a sequência ARE, aumento assim a transcrição de *NQO1*.

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata e os resultados analisados estatisticamente. Foi então construído o gráfico do n° de cópias *NQO1* / n° de cópias 18S.

3.4.3 Ensaio repórter – Sequência ARE

No ensaio repórter, utiliza-se um plasmídio contendo uma sequência sintética ARE associada ao gene da luciferase. Com a exposição à substância teste, se houver ativação da via Keap1/Nrf2-ARE, a sequência ARE é ativada, e consequentemente irá ocorrer a transcrição do gene da luciferase, produzindo RNA mensageiro, que por sua vez é traduzido, dando origem à enzima luciferase. Com a presença da luciferina no ensaio, a luciferase gera sinais luminescentes. Dessa forma, a emissão de luminescência indica a ativação da sequência ARE. Utiliza-se também um plasmídio contendo um gene housekeeping e o gene da luciferase, para a normalização.

Os reagentes utilizados neste ensaio foram:

Reagentes para a transfecção: Para a transfecção, utilizou-se, por poço, 0,15 µL do reagente de transfecção FuGENE6 (Roche), 3,18 µL de meio de cultivo sem soro (OptiMEM *serum free*), e 1,67 µL do plasmídeo GoClone, 30 ng/µL, desejado (de interesse ARE ou o *housekeeping* LDHA), totalizando um volume de 5 µL por poço. Essa mistura foi feita no momento do uso. O FuGENE6 é responsável pela transfecção do plasmídio na célula.

MISSION® LightSwitch Luciferase Assay Reagent™ (Sigma): Todo o substrato presente no kit foi dissolvido em 100 µL do solvente (metanol), também presente no kit. Posteriormente, todo o volume do substrato dissolvido (100 µL) foi transferido para um tubo cônico contendo 10 mL do tampão (presente no kit). Essa mistura é suficiente para 100 poços (de placas de 96 poços) e é preparada no momento do uso.

No ensaio, primeiramente foi realizado o preparo dos reagentes para a transfecção do plasmídeo. Uma *master mix* com o FuGENE6 (Roche), o plasmídeo desejado (de interesse ou *housekeeping*), e o meio de cultivo sem soro (OptiMEM *serum free*), foi realizada (como mostrado no preparo do reagente). A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 30 min. Após esse período, foi realizado o plaqueamento de $1,5 \times 10^4$ células/ 95 uL de meio de cultura (OptiMEM), suplementado com 10% de soro fetal e sem antibióticos, em placas brancas de 96 poços (Corning). Placas de cultivo de fundo branco permitirão, ao final do ensaio, a

análise da luminescência. Adicionou-se também em cada poço, 5 µL da mistura de transfecção previamente preparada, totalizando um volume de 100 µL por poço. As células foram incubadas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, por 24 h, período em que ocorreu a transfecção do plasmídeo nas células. Realizou-se então o tratamento com as substâncias, e as células HepG2 ficaram expostas por 24 h, incubadas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂.

Após esse período, as placas foram mantidas, protegidas da luz, em freezer - 80 °C por um período que pode variar entre 2 h e *overnight*. Esse congelamento aumenta a lise das células, e consequentemente, aumenta o sinal da luciferase. Posteriormente, as células foram descongeladas a temperatura ambiente, e adicionou-se 100 µL da mistura de luciferina, solvente e tampão (MISSION® LightSwitch Luciferase Assay Reagent™).

As placas foram então protegidas da luz e incubadas a temperatura ambiente por 30 min. Finalmente, foi realizada a leitura da luminescência por 2 seg, com o uso do leitor de microplacas Envision (PerkinElmer). O Software utilizado foi o SoftMax Pro 5.4.4. Os resultados foram então normalizados com base no *housekeeping*.

A sequência do ARE_synthRE utilizada foi TCACAGTGACTCAGCAAAATTTCACAGTGACTCAGCAAAATTTTCACAGTGACTCAGCAAAATT. O *housekeeping* utilizado foi o LDHA, enzima lactato desidrogenase, presente a grande maioria das células, responsável por catalisar o piruvato à lactato na via glicolítica.

Para este ensaio, foi adicionado 0,1% de DMSO no controle negativo e 5 µmol/L de AI-1 no controle positivo. O AI-1 é um composto cloroquinolinona que interagem com a Keap1 e diminui sua interação com Nrf2, que por sua vez migra para o núcleo e ativa a sequência ARE.

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata e os resultados analisados estatisticamente. Foi então construído o gráfico da luminescência da luciferase normalizada.

3.5 Ensaios de genotoxicidade / mutagenicidade

Os ensaios de genotoxicidade / mutagenicidade foram realizados com a parceria da prof. Dra. Danielle Palma de Oliveira, no departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

3.5.1 Ensaio cometa

Este teste é capaz de detectar danos no DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. O Ensaio Cometa foi introduzido por ÖSTLING e JOHANSON (1984), e aperfeiçoado por SINGH e colaboradores (1988), que passou a utilizar solução alcalina para o relaxamento do DNA. A dupla fita de DNA, quando exposta a um pH alcalino, sofre desnaturação, separando-se em fitas simples (GONTIJO; TICE, 2003), permitindo assim, além da detecção de quebras de fita simples e ligações cruzadas, a observação de quebras de dupla-fita, sítios álcil-lábeis, sítios abásicos e excisão de sítios incompletos de reparo (COLLINS, 2004).

O ensaio foi realizado, no presente trabalho, de acordo com o método descrito por Tice e colaboradores (2000), com modificações.

Neste ensaio, foram utilizadas as seguintes soluções:

Agarose normal 1,5% (preparo das lâminas): Nesta solução, 1,5 g de agarose ultra-pura foi adicionada à 100 mL de água ultra-pura + PBS (90 mL de água e 10 mL de PBS). A solução foi aquecida em forno de micro-ondas até começar a ferver e ficar translúcida. A solução foi então mantida em banho-maria a 60 °C para estabilizar a temperatura, e as lâminas foram pré-gelatinizadas, ou seja, foram embebidas em agarose, tiveram a face de baixo limpa, e foram deixadas secar à temperatura ambiente. Essa solução pode ser armazenada em geladeira, e aquecida à 60 °C no momento do uso.

Agarose baixo ponto de fusão 0,5%: 500 mg de agarose baixo ponto de fusão foram dissolvidos em à 100 mL de água ultra-pura + PBS (90 mL de água e 10 mL de PBS). A mistura foi aquecida em forno de micro-ondas, sem ferver, e até ficar homogênea. A solução foi então mantida no banho-maria à 37 °C para o uso. Essa solução pode ser amrmazenada em geladeira, e aquecida à 37 °C no momento do uso.

Solução de lise (estoque): Esta solução é preparada com NaCl 2,5 mol/L, EDTA 100 mmol/L, e Tris 10 mol/L. Para o preparo de 1,6 L de solução, foram pesados 233,7 g de NaCl, 59,52 g de EDTA, e 1,92 g de Tris. Esses sais foram dissolvidos em 1 L de

água ultra-pura, com o uso de um agitador magnético. Pérolas de NaOH foram adicionadas durante a dissolução, o pH foi ajustado para 10,0, e o volume da solução foi ajustado para 1,6L com água ultra-pura. A solução foi então armazenada em geladeira.

Solução de lise (Uso): Para o preparo de 400 mL dessa solução, foram adicionados 4 mL de Triton X-100, 40 mL de DMSO, e 1,15 g de SDS em q. s. p. 400 mL da solução de lise estoque. Esta solução deve ser feita aproximadamente 2 h antes do uso com a luz apagada. Foi armazenada em *coppling*, na geladeira e protegida da luz, até o momento do uso.

Solução de EDTA 200 mmol/L (Solução A): 7,44 g de EDTA foram dissolvidos em 50 mL de água destilada. Para a dissolução, foi utilizado NaOH, e o pH foi ajustado para 10,0. A solução foi armazenada em geladeira.

Solução de NaOH 10 mol/L (Solução B): Na capela de exaustão, 100 g de NaOH foram adicionados aos poucos em um béquero em banho de gelo contendo 250 mL de água destilada. A solução foi armazenada em geladeira.

Solução de eletroforese (NaOH 300 mmol/L, EDTA 1 mmol/L): 10 mL da solução A e 60 mL da solução B foram diluídos em q. s. p. 2 L de água destilada gelada. O pH dessa solução deve ser superior a 13,0. Essa solução foi preparada no momento do uso.

Solução de neutralização (Tris 0,4 mol/L): 77,6 g de Tris foram dissolvidos em q. s. p. 1,6 L de água destilada. O pH foi ajustado para 7,5 utilizando HCL fumegante (na capela de exaustão). A solução foi armazenada em geladeira.

Solução de coloração com Brometo de Etídio (20 µg/mL): 10 µL da solução de Brometo de Etídio 10 mg/mL (Invitrogen) foram diluídos em 4990 µL de água destilada. Essa solução foi conservada em temperatura ambiente protegida da luz.

Neste ensaio, aproximadamente 2×10^5 células/2 mL de meio de cultura suplementado com soro fetal foram incubadas em placas de cultura de 24 poços, que

permaneceram por um período de 24 h na incubadora. Posteriormente, realizou-se o tratamento com as diferentes concentrações dos herbicidas tebutiuram e trifluralina por um período de 4h de exposição. As células foram mantidas incubadas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂.

No ensaio, as células foram tripsinizadas, transferidas para tubos cônicos, e centrifugadas à 212 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e foram reservados 10 µL do *pellet* de células, que foram mantidos em um microtubo em banho de gelo para posterior análise com Azul de Tripán. Em seguida, o *pellet* de células dos tubos cônicos foi embebido em 150 µL de agarose baixo ponto de fusão 0,5%, mantendo-se a mistura aquecida a 37°C. A suspensão de células em agarose foi distribuída em duas lâminas pré-gelatinizadas (75 µL em cada lâmina), sendo, portanto, confeccionadas duas lâminas por tratamento. As lâminas foram então cobertas com lamínula, de modo a espalhar as células, e levadas à geladeira por 10 min. Após esse período, as lamínulas foram retiradas, e as lâminas foram dispostas em um *coppling* contendo 400 mL de solução de lise (Uso), e protegido da luz. As células ficaram em contato com essa solução por 2 h, na geladeira, para promover a lise celular, expondo o material genético.

Durante esse período de 2 h, foi feito o teste de viabilidade com o Azul de Tripán. 10 µL do Azul de Tripán a 0,25% em PBS foram adicionados aos 10 µL de células, previamente reservados em um microtubo. Foi feita a contagem de 100 células na câmara de *Newbauer*, sob microscópio óptico, e o experimento teve continuidade uma vez constatada a viabilidade celular > 80% (mais de 80% das células não incorporaram o corante, permanecendo translúcidas).

Após as 2 h na solução de lise, e constatada a alta viabilidade celular, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese, contendo solução de eletroforese. As células permaneceram na cuba desligada, em contato com essa solução alcalina por 20 min, para que ocorra o desnovelamento das cadeias de DNA. Posteriormente, a cuba foi ligada e as lâminas foram submetidas a uma corrente elétrica (25V/cm, 300 mA e 30W) a 12 °C, por 20 min, de modo a induzir a migração dos fragmentos de DNA resultantes de danos. O princípio desta técnica baseia-se no fato de que o DNA da célula que não apresentar dano migrará de forma homogênea formando um círculo. Caso o DNA apresente dano, serão formados fragmentos de diversos tamanhos, de modo que, na eletroforese, os fragmentos menores migrem mais rapidamente em relação aos fragmentos maiores (OLIVE; BANÁTH; DURAND,

1990). Após a corrida de eletroforese, as lâminas foram transferidas para um *coppling* contendo 400 mL solução de neutralização, e permaneceram em contato com essa solução por 20 min na geladeira. Em seguida, as lâminas foram secas ao ar livre, e depois mantidas por 5 min em um *coppling* contendo 400 mL de etanol absoluto, para a fixação do material. As lâminas foram então colocadas para secar ao ar livre e armazenadas a temperatura ambiente até o momento da leitura.

Para a leitura, as lâminas foram coradas com 20 µL da solução de brometo de etídio 20 µg/mL e analisadas no microscópio de fluorescência Olympus Bx50 (Olympus America INC, Melville, NY) sob objetiva de 40x. Utilizando-se o software Comet IV, 100 nucleóides de cada concentração testada foram contados e analisados, sendo 50 por lâmina, utilizando-se, portanto, 2 lâminas. As células que apresentam um nucleóide com aspecto circular foram identificadas como não apresentado dano. As células lesadas foram identificadas por apresentarem o aspecto de um cometa. O parâmetro utilizado para avaliar a extensão do dano ao DNA foi o Tail Moment, que analisa tanto o comprimento quanto a intensidade da cauda (ou porcentagem de DNA na cauda).

Para este ensaio, foi adicionado 0,5% de DMSO no controle negativo e 15 µg/mL de MMS no controle positivo. O MMS é um agente genotóxico que promove metilação no DNA, enfraquecendo ligações e formando sítios álcali-lábeis, tornando o DNA susceptível a quebras.

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata e os resultados analisados estatisticamente. Foi então construído o gráfico do tail moment das amostras.

3.5.2 Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese

O ensaio empregado no presente trabalho é descrito por Fenech (2000). Este teste avalia quebras ou perdas cromossômicas. O teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese utiliza a Citoxalasina B, um inibidor da actina que age no final da divisão celular impedindo a citocinese. Ao final do ensaio, são analisados os micronúcleos apenas de células binucleadas (devido ao bloqueio da citocinese). Uma vez que a formação dos micronúcleos ocorre após a divisão celular, o bloqueio da citocinese garante a análise de micronúcleos em células que passaram apenas por um ciclo de divisão.

As soluções utilizadas no presente trabalho foram:

Citocalasina B 2 mg/mL (Solução mãe): 2,5 mL de DMSO estéril foram adicionados ao frasco contendo 5 mg de citocalasina B (Sigma). A solução, preparada em capela de fluxo laminar, foi então homogeneizada, protegida da luz e armazenada em congelador.

Citocalasina B 300 µg/mL (Solução de Uso): 300 µL da solução mãe de Citocalasina B (2 mg/L) foram diluídos em 1,7 mL de PBS estéril. A solução, preparada em capela de fluxo laminar, foi então homogeneizada, protegida da luz e armazenada em congelador.

Solução de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1% m/v: 1 g de citrato de sódio foi dissolvido em 100 mL de água deionizada. A mistura foi agitada até completa dissolução. A solução foi mantida em geladeira, e deve estar gelada no momento do uso.

Metanol/Ácido acético 3:1: Para 80 mL de solução, foi realizada a mistura de 20 mL de ácido acético glacial e 60 mL de metanol.

Laranja de acridina 10 µg/mL: 20 µL da solução de 10 mg/mL (Sigma) foram diluídos em 20 mL de PBS + água deionizada (2 mL de PBS em 18 mL de água). A solução foi mantida em geladeira.

No ensaio, aproximadamente 5×10^5 células/5 mL de meio de cultura suplementado com soro fetal foram incubadas em garrafas de cultura de 25 cm². Após 24 h de incubação, foram acidonadas diferentes concentrações de tebutiuram e trifluralina, e as células permaneceram por um período de 20h em exposição aos herbicidas, em incubadora a 37 ° em atmosfera com 5% de CO₂. Em seguida foram adicionados 50 µL da solução de citocalasina B. Os frascos foram então colocados na incubadora por mais 28 horas.

Após esse período, as células foram tripsinizadas e transferidas para tubos cônicos. Foi feita uma centrifugação à 212 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e foram reservados 10 µL do *pellet* de células, que foram mantidos em um microtubo

em banho de gelo para posterior análise com Azul de Tripán. Foram adicionados, ao *pellet* de células dos tubos cônicos, 5mL da solução de citrato de sódio gelada e foi feita a homogeneização por aproximadamente 5 min. Em seguida, foram adicionados 20µL de formol em cada tubo, que novamente tiveram o conteúdo homogeneizado. O material foi submetido a uma nova centrifugação a 212 *g* por 5 min. O sobrenadante foi descartado e 5mL do fixador metanol/ácido acético 3:1 foi adicionado. O conteúdo foi homogeneizado e centrifugado a 212 *g* por 5 min. O sobrenadante foi retirado, e novamente foram adicionados 5mL do fixador metanol/ácido acético 3:1, feita a homogeneização e centrifugação a 212 *g* por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e com o *pellet* de células com uma pequena quantidade de fixador, foram confeccionadas duas lâminas (havendo, portanto, duas lâminas por tratamento). Para a confecção das lâminas, 50µL da suspensão celular em fixador foram dispensadas nas lâminas. Finalmente, as lâminas então foram secas ao ar livre e armazenadas a temperatura ambiente até o momento da leitura.

Foi feito então o teste de viabilidade com o Azul de Tripán. 10 µL do Azul de Tripán a 0,25% em PBS foram adicionados aos 10 µL de células, previamente reservados em um microtubo. Foi feita a contagem de 100 células na câmara de *Newbauer*, sob microscópio óptico, e o experimento teve continuidade uma vez constatada a viabilidade celular > 80% (mais de 80% das células não incorporaram o corante, permanecendo translúcidas).

Para a leitura das lâminas, estas foram coradas com 1 mL de Laranja de acridina 10 µg/mL e ficaram em contato com essa solução por aproximadamente 1 min. O excesso de corante foi retirado e as células foram analisadas em microscópio de fluorescência. Foi feita a contagem de 500 células binucleadas (BN) em uma lâmina e 500 em outra, considerando a quantidade de micronúcleos em cada célula BN. Portanto, um total de 1000 células binucleadas foram analisadas. Os danos no DNA de células expostas a cada concentração de herbicida foram comparados com o controle positivo e com o controle negativo. Foi feita também a contagem de 500 células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e tetranucleadas no total, sendo 250 células em cada lâmina. Essa contagem teve como finalidade a realização do índice de divisão nuclear (IDN), que pode ser calculado por meio da fórmula:

$$\text{IDN} = [\text{M1} + 2 (\text{M2}) + 3 (\text{M3}) + 4 (\text{M4})] / \text{N}$$

Onde M1-M4 representam os números de células com 1, 2, 3 e 4 ou mais núcleos, respectivamente, e N é o número total de células contadas. Esse índice fornece uma medida do estado proliferativo das células viáveis. Além disso, foi analisada a porcentagem de células binucleadas. Segundo Fenech (2000), para a análise de micronúcleos, as células devem apresentar um percentual de células binucleadas (BN) acima de 35%.

Para o ensaio do micronúcleo, foi adicionado 0,5% de DMSO no controle negativo e 0,03 µg/mL de doxorubicina no controle positivo. Cada concentração foi avaliada em triplicata e os resultados analisados estatisticamente. A doxorubicina se liga ao DNA, inibindo a síntese do ácido nucleico. Dessa forma interfere no ciclo celular e consequentemente na formação de micronúcleos.

Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata e os resultados analisados estatisticamente. Foram então construídos dois gráficos: Um do índice de divisão nuclear das amostras, e outro da porcentagem de micronúcleos por 1000 células binucleadas (BN) em relação ao controle negativo.

3.5.3 Teste *Salmonella*/microsoma

Para o teste de mutagenicidade com *Salmonella*, foi utilizado o protocolo da pré-incubação desenvolvido por Ames *et al* (1975). Esse protocolo realiza a etapa de incubação, a 37°C, por um período de 20 a 30 min, das linhagens de *S. typhimurium* com substância teste antes da etapa do plaqueamento em Agar mínimo. Essa incubação baseia-se no princípio de que metabólitos mutagênicos de vida curta possuem uma maior possibilidade de interagir com as linhagens em um pequeno volume de mistura pré-incubada, se comparado com o plaqueamento imediato (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

As bactérias utilizadas no teste *Salmonella*/microsoma foram submetidas à avaliação de características genéticas. Foram utilizadas apenas bactérias que atenderam as seguintes características: dependência de histidina, mutação *rfa*, plasmídeo PKM101 (exceto 97a), deleção *uvrB* e taxa de reversão espontânea dentro da faixa para cada linhagem.

As linhagens de *S. typhimurium* utilizadas no presente trabalho foram a TA98 (hisD3052, *rfa*, Δ bio, Δ uvrB, pKM101 - que detecta mutação por deslocamento de quadro de leitura), TA 100 (hisG46, *rfa*, Δ bio, Δ uvrB, pKM101 – que detecta mutação

por substituição de par de base), TA97a (hisD6610, rfa, Δ bio, Δ uvrB, pKM101 - que detecta mutação por deslocamento de quadro de leitura) e TA1535 (hisG46, rfa, Δ bio, Δ uvrB - que detecta mutação por substituição de par de base). Os herbicidas foram testados em diferentes concentrações na presença e na ausência do sistema de metabolização exógeno (S9), uma vez que as bactérias não possuem sistema próprio de metabolização.

Para este ensaio, foram utilizadas as seguintes soluções:

Solução de glicose 10%: 20 g de glicose foram dissolvidos em 200 mL de água deionizada. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min e mantida em banho maria a 55 °C por 15 min para estabilizar a temperatura. Esta solução deve ser preparada no dia do uso.

Solução de ágar: Em um frasco *shott*, coloca-se 780 mL de água deionizada e 15 g de bacto agar. Coloca-se também, no interior do frasco, uma barra magnética. Esta solução será solubilizada durante o processo de autoclave, a 121 °C por 20 min. A solução foi mantida em banho maria a 55 °C por 15 min para estabilizar a temperatura. Deve ser preparada no dia do uso.

Solução de Vogel Bonner (50x): Composto por 10 g de sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 91,43 g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), 500 g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), 175 g de fosfato de sódio e amônio ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), e água destilada aquecida q. p. 1000 mL. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min e mantida em banho maria a 55 °C por 15 min para estabilizar a temperatura. Esta solução pode ser armazenada em geladeira.

Solução de biotidina 0,5 mol/L: 0,0195 g de L-histidina e 0,0305 g de D-biotina foram dissolvidos em água destilada aquecida q. p. 250 mL. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min e mantida em banho maria a 55 °C por 15 min para estabilizar a temperatura. Esta solução pode ser armazenada em geladeira, protegida da luz.

Solução de ágar mínimo e preparo das placas de petri: Na capela de fluxo laminar, coloca-se 780 mL da solução de ágar no agitador magnético sob

aquecimento. Adiciona-se à solução de ágar, 200 mL da solução de glicose 10%, 20 mL da solução de Vogel Bonner 50x e 12 mL da solução de biotidina 0,5 mol/L. Finalmente, foram distribuídos 20 mL da solução final de ágar mínimo em placas de petri estéreis (autoclavada a 121 °C por 20 min). As placas devem então permanecer em temperatura ambiente, na capela de fluxo laminar.

Caldo nutriente: 25 g do nutriente Broth n °2 (OXOID) foram dissolvidos a frio em água destilada q. s. p. 1000 mL. Em seguida, foram distribuídos 20 mL dessa solução em frascos shott de 100 mL, que foram autoclavados a 121 °C por 20 min. Esta solução pode ser armazenada em geladeira.

Tampão fosfato 0,2 mol/L: Nesta solução, são misturadas as soluções A e B.

Para a solução A, foram dissolvidos 28,4 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) em 1000 mL de água destilada.

Para a solução B, foram dissolvidos 27,6 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em 1000 mL de água destilada.

Para a solução final de fosfato 0,2 mol/L, foi feita a mistura de 880 mL da solução A com 120 mL da solução B, e o pH foi ajustado para 7,4. O pH foi ajustado com as próprias soluções, sendo utilizada a solução A para elevar o pH e a solução B para diminuir. A solução foi então autoclavada a 121 °C por 20 min, e estocada em frasco escuro a temperatura ambiente.

NADP 0,1 mol/L: Na capela de fluxo laminar, 0,7654 g de NADP (β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) foram dissolvidos em 10 mL de água destilada estéril. A solução foi filtrada em membrana de 0,22 μm e armazenada a - 20 °C.

Glicose-6-fosfato 1 mol/L: Na capela de fluxo laminar, 2,821 g de glicose-6-fosfato foram dissolvidos em 10 mL de água destilada estéril. A solução foi filtrada em membrana de 0,22 μm e armazenada a - 20 °C.

Solução de sais (KCl 1,65 mol/L e MgCl_2 0,4 mol/L): 8,13 g de cloreto de magnésio (MgCl_2) e 12,3 g de cloreto de potássio (KCl) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada. A solução foi então autoclavada a 121 °C por 20 min, e armazenada em geladeira.

Fração S9: Este reagente é adquirido liofilizado, armazenado a - 20 °C, e no momento do uso, em capela de fluxo laminar, é dissolvido em 2,1 mL de água destilada estéril. A fração S9 é preparada a partir de microsomas de células de fígado de rato, tratado com o indutor enzimático Aroclor 1254 e separado por centrifugação a 9000 g.

Mistura S9 4% v/v: Cada 100 mL da mistura é composto por 39,5 mL de água destilada estéril, 50 mL de tampão fosfato 0,2 mol/L, 4 mL de NADP 0,1 mol/L, 0,5 mL de glicose-6-fosfato 1 mol/L, 2 mL da solução de sais (KCl 1,65 mol/L e MgCl₂ 0,4 mol/L) e 4 mL da fração S9. Esta mistura deve ser preparada em capela de fluxo laminar no momento do uso).

Ágar de superfície (Top ágar): 5 g de cloreto de sódio (NaCl), e posteriormente 6 g de bacto agar, foram dissolvidos em água destilada q. s. p. 1000 mL. A solução foi solubilizada no momento da esterilização em autoclave a 121 °C por 20 min. Após resfriamento, pode ser armazenada em geladeira.

Água de diluição: Para a água de diluição, utiliza-se as soluções A e B.

Para a solução A, foram dissolvidos 34 g de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) em 1000 mL de água destilada.

Para a solução B, 81,1 g de cloreto de magnésio (MgCl₂.6H₂O) foram dissolvidos em 1000 mL de água destilada.

Para a solução final da água de diluição, 1,25 mL da solução A e 5 mL da solução B foram adicionados à água destilada q. s. p. 1000 mL. A solução foi distribuída frascos *shott*, de modo que cada frasco contenha 90 mL da solução, e posteriormente foi autoclavada a 121 °C por 20 min. Esta solução pode ser mantida em geladeira.

Ágar nutriente e preparo das placas de petri para teste de viabilidade: Para esta solução, 25 g de nutriente Broth n°2 (OXOID) foram dissolvidos a frio em 1000 mL de água destilada. Posteriormente, adicionou-se 15 g de bacto agar. A completa dissolução ocorreu durante a autoclavagem, a 121 °C por 20 min. A solução foi então mantida em banho maria a 55 °C por 15 min para estabilização da temperatura. Posteriormente, essa solução foi mantida aquecida em agitador magnético no interior

da capela de fluxo laminar. Finalmente, foram distribuídos 20 mL da solução final de ágar mínimo em placas de petri estéreis (autoclavada a 121 °C por 20 min). As placas devem então permanecer em temperatura ambiente, na capela de fluxo laminar.

A primeira etapa do teste consiste no preparo das placas de Petri com Agar mínimo e placas com ágar nutriente (como descrito acima), e no cultivo das linhagens de *Salmonella*. Para o cultivo, as bactérias armazenadas em criotubo foram descongeladas, e 100 µL da cultura bacteriana foram adicionados ao frasco contendo 20 mL de caldo nutriente. O frasco foi protegido da luz e mantido a 37° C em agitação de 150 a 170 rpm no *shaker* por um período de 16 h. Nesse período ocorre a proliferação das bactérias. Posteriormente, os frascos de cultura foram transferidos para a geladeira até o momento do uso.

Na segunda etapa, para o ensaio na ausência de S9, foram colocados, em tubo de ensaio, 100 µL da cultura de bactérias em caldo nutriente da linhagem desejada (10^9 células), 100 µL da amostra (concentração desejada do herbicida ou da substância utilizada nos controles) e 500 µL de tampão fosfato 0,2 mmol/L. Para o ensaio na presença de S9, em vez do tampão fosfato, foram adicionados 500 µL da fração S9. Posteriormente, os tubos de ensaio foram homogeneizados e incubados a 37° C por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 2 mL de ágar de superfície em cada tubo de ensaio, que foram homogeneizados novamente. O conteúdo de cada tubo de ensaio foi então vertido em sua placa de Petri (preparada com 20 mL de ágar mínimo). As placas foram então incubadas invertidas a 37°C durante 66 h. Após colocar as placas na incubadora, foi realizado o teste de viabilidade das bactérias, detalhado mais abaixo. Passado o período de 66 h, as colônias revertentes foram contadas e os resultados expressos em números de revertentes por placa, baseando-se na inclinação da curva dose-reposta.

Para o controle negativo, utilizou-se 100 µL de DMSO. Os controles positivos usados na ausência de mistura S9 foi de 0,5 µg / placa de óxido de 4-nitroquinolina para as linhagens TA98 e TA100, 5 µg / placa de óxido de 4-nitroquinolina para TA97, e 5 µg / placa de azida de sódio para TA1535. O controle positivo utilizado na presença de S9 foi de 2,5 µg / placa de 2-aminoantraceno para todas as linhagens testadas. O óxido de 4-nitroquinolina é um composto mutagênico e carcinogênico que liga covalentemente às macromoléculas como DNA e proteínas. Além disso, pode induzir dano ao DNA por meio da produção de espécies reativas. O 2-aminoantraceno é um

composto que exerce efeito mutagênico após ser metabolizado pelo sistema P450, por isso muito utilizado como controle positivo de mutágenos após metabolização.

Cada concentração foi avaliada em triplicata e os resultados analisados estatisticamente. Foi construída então uma tabela com o número de colônias revertentes das amostras. Para a verificação da indução ou não de mutagenicidade pelas substâncias teste, além da análise estatística comparando-se os valores dos tratamentos em relação ao controle negativo, foi analisada também a potência mutagênica, que é a inclinação da reta formada pelos valores do número de colônias revertentes do controle negativo e dos tratamentos. Essa inclinação da reta é feita individualmente para cada herbicida substância testada, e para cada linhagem com S9 e para cada linhagem sem S9.

Para o ensaio de viabilidade, 100 µL da cultura bacteriana em caldo nutriente foram adicionadas ao frasco contendo 90 mL de água de diluição (diluição -3). Esta mistura foi homogeneizada e 100 µL dessa solução foram transferidos para outro frasco contendo 90 mL de água de diluição (diluição -6). A mistura foi novamente homogeneizada. Posteriormente, 100 µL deste segundo frasco foram adicionados em uma placa (preparada com 20 mL de ágar nutriente) e espalhados por meio de uma alça Drigalski fazendo movimentos circulares (diluição -7). Este teste foi feito em duplicata. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após esse período, é feita a contagem das células e a viabilidade deve estar na faixa de $1,0 - 2,0 \times 10^9$ células/mL, ou seja, é necessário haver entre 100 e 200 colônias nas placas.

3.6 Análise estatística

3.6.1 Ensaios com HepG2

Em todos os ensaios com HepG2, foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata. Ou seja, em cada experimento, as concentrações dos herbicidas testados, bem como seus controles, foram analisados em 3 poços distintos da placa de cultura, garantindo assim uma triplicata técnica. Foi feita então a média desses valores, compreendendo uma unicata biológica ($n = 1$). Para se obter uma triplicata biológica ($n = 3$), foram realizados três experimentos independentes. Para

análise estatística e construção dos gráficos e tabelas, foram utilizados os valores das triplicatas biológicas ($n = 3$).

A análise estatística foi feita comparando-se células do controle negativo (expostas ao solvente DMSO) com células expostas a diferentes concentrações de um herbicida e com células expostas à um controle positivo (substância de efeito conhecido) em um determinado período de tempo. Portanto, a análise estatística foi feita separadamente para cada herbicida em cada tempo de exposição. Os gráficos com diferentes tempos de exposição colocados lado a lado tiveram o intuito de facilitar o entendimento com base na boa estética de apresentação dos dados.

Os testes estatísticos utilizados foram a análise de variância *One Way* (ANOVA *One Way*), seguido do pós-teste de Dunnet. As análises foram feitas por meio do programa GraphPrism, versão 5.0. Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.6.2 Teste *Salmonella*/microsoma

Para o ensaio *Salmonella*/microsoma, cada linhagem testada (TA 98, TA100, TA97a e TA1535), com e sem S9, foram analisadas independentemente. Foi realizado um único experimento em triplicata com cada linhagem com S9 e um único experimento em triplicata com cada linhagem sem S9.

A análise estatística foi feita, para cada linhagem com S9 e para cada linhagem sem S9, comparando-se o número de revertentes de bactérias do controle negativo (expostas ao solvente DMSO) com o número de revertentes de bactérias expostas a diferentes concentrações de um herbicida. Portanto, a análise estatística foi feita separadamente para cada herbicida em cada linhagem e com S9 e sem S9.

Os resultados foram expressos através da inclinação da reta nos gráficos e foram analisados por meio do software Salanal, um programa estatístico desenvolvido pelo Integrated Laboratory Systems, Research Triangle Park, N.C. USA, usando o modelo de Bernstein, que utiliza tanto a ANOVA quanto a regressão linear.

4 RESULTADOS

4.1 Proliferação, sobrevivência, e morte celular

4.1.1 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico, é um ensaio realizado para análise da viabilidade celular após exposição a um xenobiótico. Quanto ao tebutiuram, nas condições testadas, o ensaio clonogênico não apontou diferença significativa entre as células tratadas e o controle negativo (Figs. 17 e 18). Porém, foi possível verificar que células expostas à 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina por 14 dias apresentaram um número de colônias 35% menor do que no controle negativo (Figs. 19 e 20). Essa diferença é estatisticamente significativa.

Figura 17. Efeito do tebutiurum sobre a sobrevivência de HepG2 avaliada pelo ensaio clonogênico.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de tebutiurum em DMSO no tempo de 14 dias. Utilizou-se 13 $\mu\text{mol/L}$ de doxorrubicina no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média de sobrevivência $\pm$ o desvio padrão (em porcentagem em relação ao controle negativo). $n = 3$. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Figura 18. Imagem da sobrevivência das colônias de HepG2 expostas ao tebutiurum avaliada pelo ensaio clonogênico.

As células HepG2 foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de tebutiurum em DMSO durante 14 dias. Utilizou-se 13 $\mu\text{mol/L}$ de doxorrubicina no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. Fonte: do autor.

Figura 19. Efeito da trifluralina sobre a sobrevivência de HepG2 avaliada pelo ensaio clonogênico.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina em DMSO no tempo de 14 dias. Utilizou-se 13 $\mu\text{mol/L}$ de doxorrubicina no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média de sobrevivência $\pm$ o desvio padrão (em porcentagem em relação ao controle negativo). $n = 3$. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Figura 20. Imagem da sobrevivência das colônias de HepG2 expostas à trifluralina avaliada pelo ensaio clonogênico.

As células HepG2 foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina em DMSO durante 14 dias. Utilizou-se 13 $\mu\text{mol/L}$ de doxorrubicina no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. Fonte: do autor.

4.1.2 Ensaio com o corante SRB

O ensaio SRB é muito utilizado para analisar tanto a viabilidade como a proliferação celular, já que como discutido em material e métodos, a quantidade de corante extraído de células coradas é apenas diretamente proporcional ao número de células ao final do ensaio. Por meio desse teste foi possível observar, nas condições testadas, que o tebutiuram não provocou diferença estatisticamente significativa no número de células HepG2 que foram expostas ao herbicida em relação ao controle negativo (Fig. 21).

Quanto a exposição à trifluralina, foi possível observar um menor número de células HepG2 quando expostas por 24h, nas concentrações de 50 $\mu\text{mol/L}$ e 100 $\mu\text{mol/L}$, com diferença estatisticamente significativa. Já após 48h e 72h, uma redução significativa do número de células já é observada em exposições a partir de 10 $\mu\text{mol/L}$ do herbicida (Fig. 22). HepG2 expostas à 10 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina durante 72h apresentaram redução de aproximadamente 10% no número de células em relação ao controle negativo, e em células expostas à 100 $\mu\text{mol/L}$, essa redução foi de 49%.

Figura 21. Efeito do tebutiurrom sobre a proliferação de HepG2 avaliada pelo ensaio SRB.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiurrom em DMSO nos tempos de 24h, 48h e 72h. Utilizou-se 0,5 mmol/L de t-BOOH no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média da absorvância do SRB +- o desvio padrão (em porcentagem em relação ao controle negativo). n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Figura 22. Efeito da trifluralina sobre a proliferação de HepG2 avaliada pelo ensaio SRB.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de trifluralina em DMSO nos tempos de 24h, 48h e 72h. Utilizou-se 0,5 mmol/L de t-BOOH no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média da absorvância do SRB +- o desvio padrão (em porcentagem em relação ao controle negativo). n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

4.1.3 Ensaio com o corante MTT

O tebutiuram não interferiu na viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas, em nenhum tempo de exposição, uma vez que a viabilidade de HepG2 expostas ao herbicida não diferiu significativamente em relação ao controle negativo (Fig. 23). A trifluralina, por sua vez, diminuiu significativamente a viabilidade celular nas maiores concentrações testadas (50 $\mu\text{mol/L}$ e 100 $\mu\text{mol/L}$) em todos os tempos de exposição (Fig. 24). Em 48 h, células expostas à 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina apresentaram, respectivamente, viabilidade celular 26 % e 30% menores do que o controle negativo.

Figura 23. Efeito do tebutiuram sobre a viabilidade de HepG2 avaliada pelo ensaio de MTT.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiuram em DMSO nos tempos de 24h, 48h e 72h. Utilizou-se 10 µmol/L de CCCP no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média da absorvância do sal de formazan (SF) +- o desvio padrão (em porcentagem em relação ao controle negativo). n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Figura 24. Efeito da trifluralina sobre a viabilidade de HepG2 avaliada pelo ensaio de MTT.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de trifluralina em DMSO nos tempos de 24h, 48h e 72h. Utilizou-se 10 µmol/L de CCCP no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média da absorvância do sal de formazan (SF) +- o desvio padrão (em porcentagem em relação ao controle negativo). n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

4.1.4 Análise do ciclo celular

Foi possível observar que o tebutiurum não causou influência significativa no ciclo celular de HepG2 expostas ao herbicida em nenhuma das concentrações testadas, nos tempos de 24, 48 e 72h (Tabelas 1, 2, e 3, e Figs 25, 26, e 27).

Tabela 1. Efeito do tebutiurum sobre o ciclo celular de HepG2 em 24 h.

	G1		S		G2/M		Apoptose (Sub-G0)	
C+	60,04%	± 17,31%	31,75%	± 6,43%*	7,99%	± 10,55%	37,06%	± 5,30%*
C-	56,04%	± 0,95%	43,06%	± 1,96%	0,90%	± 1,03%	0,15%	± 0,08%
1	56,24%	± 2,41%	43,16%	± 2,39%	0,61%	± 0,36%	0,18%	± 0,19%
5	56,79%	± 1,48%	42,57%	± 2,05%	0,65%	± 0,83%	0,60%	± 0,58%
10	57,69%	± 3,21%	41,94%	± 3,12%	0,37%	± 0,11%	0,48%	± 0,75%
20	56,87%	± 1,68%	42,48%	± 1,60%	0,85%	± 0,19%	0,37%	± 0,29%
50	56,07%	± 1,10%	42,64%	± 0,60%	1,29%	± 1,04%	0,14%	± 0,08%
100	56,30%	± 2,60%	42,86%	± 1,93%	0,85%	± 0,83%	0,93%	± 0,65%

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiurum em DMSO por 24 h. Utilizou-se 16 µg/mL de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Os valores indicam a média da população de células em cada fase do ciclo +- o desvio padrão. n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet (p < 0,05). Fonte: do autor.

Figura 25. Representação da localização das células expostas ao tebutiurum por 24 h quanto às fases do ciclo celular.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiurum em DMSO por 24 h. Utilizou-se 16 µg/mL de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Fonte: do autor.

Tabela 2. Efeito do tebutiurum sobre o ciclo celular de HepG2 em 48 h.

	G1		S		G2/M		Apoptose (SubG-0)	
C+	42,10%	± 14,84%	44,99%	± 13,72%	12,91%	± 1,11%*	66,27%	± 23,0%*
C-	54,06%	± 4,41%	42,85%	± 3,78%	3,10%	± 2,55%	1,70%	± 2,28%
1	55,42%	± 4,54%	43,74%	± 4,25%	0,83%	± 0,30%	1,35%	± 1,23%
5	54,74%	± 4,37%	44,48%	± 3,76%	0,77%	± 0,78%	1,08%	± 0,42%
10	55,27%	± 3,46%	43,23%	± 3,97%	1,50%	± 0,94%	1,36%	± 0,49%
20	55,77%	± 4,95%	43,38%	± 4,30%	0,84%	± 0,72%	0,85%	± 0,82%
50	55,54%	± 3,27%	42,77%	± 3,81%	1,68%	± 0,67%	0,54%	± 0,23%
100	57,12%	± 3,86%	41,65%	± 3,99%	1,23%	± 0,26%	0,64%	± 0,29%

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiurum em DMSO por 48 h. Utilizou-se 16 µg/mL de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Os valores indicam a média da população de células em cada fase do ciclo +- o desvio padrão. n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet (p < 0,05). Fonte: do autor.

Figura 26. Representação da localização das células expostas ao tebutiurum por 48 h quanto às fases do ciclo celular.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiurum em DMSO por 48 h. Utilizou-se 16 µg/mL de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Fonte: do autor.

Tabela 3. Efeito do tebutiuram sobre o ciclo celular de HepG2 em 72h.

	G1		S		G2/M		Apoptose (SubG-0)	
C+	62,61%	± 16,61%	32,84%	± 10,17%	4,55%	± 6,44%	41,14%	± 10,70%*
C-	64,46%	± 5,66%	33,71%	± 2,53%	1,83%	± 3,17%	5,27%	± 3,31%
1	61,65%	± 5,76%	36,32%	± 3,19%	2,03%	± 3,46%	4,81%	± 3,33%
5	59,98%	± 4,63%	37,71%	± 0,78%	2,38%	± 3,81%	6,41%	± 4,65%
10	58,83%	± 5,26%	38,33%	± 0,55%	2,83%	± 4,91%	7,24%	± 3,15%
20	61,51%	± 3,37%	37,33%	± 1,93%	1,16%	± 2,01%	6,31%	± 3,70%
50	61,30%	± 3,47%	37,39%	± 1,59%	1,31%	± 2,26%	5,57%	± 3,40%
100	62,47%	± 4,21%	36,48%	± 2,64%	1,06%	± 1,83%	6,86%	± 3,87%

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiuram em DMSO por 72 h. Utilizou-se 16 µg/mL de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Os valores indicam a média da população de células em cada fase do ciclo +- o desvio padrão. n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet (p < 0,05). Fonte: do autor.

Figura 27. Representação da localização das células expostas ao tebutiuram por 72 h quanto às fases do ciclo celular.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiuram em DMSO por 72 h. Utilizou-se 16 µg/mL de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Fonte: do autor.

Também foi possível observar estatisticamente uma maior população de células na fase S do ciclo, quando expostas à 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina, em 24, 48, e 72 h, sugerindo bloqueio do ciclo celular nessa fase. Além disso, foi possível observar, em 72 h, aumento significativo na população de células em SubG0, indicando DNA fragmentado, característica de apoptose. Tabelas 4, 5, e 6, e Figuras 28, 29, e 30.

Tabela 4. Efeito da trifluralina sobre o ciclo celular de HepG2 em 24 h.

	G1		S		G2/M		Apoptose (SubG-0)	
C+	59,02%	$\pm$ 11,02%	32,98%	$\pm$ 8,39%*	8,00%	$\pm$ 2,63%*	21,64%	$\pm$ 0,19%*
C-	55,74%	$\pm$ 0,26%	42,66%	$\pm$ 1,19%	1,60%	$\pm$ 1,33%	0,59%	$\pm$ 0,41%
1	55,03%	$\pm$ 3,75%	44,24%	$\pm$ 3,26%	0,72%	$\pm$ 1,04%	0,46%	$\pm$ 0,41%
5	53,95%	$\pm$ 3,95%	44,36%	$\pm$ 2,41%	1,69%	$\pm$ 2,37%	0,53%	$\pm$ 0,26%
10	55,16%	$\pm$ 4,29%	43,90%	$\pm$ 3,68%	0,95%	$\pm$ 1,45%	0,50%	$\pm$ 0,70%
20	54,39%	$\pm$ 1,92%	44,47%	$\pm$ 0,42%	1,14%	$\pm$ 1,68%	0,17%	$\pm$ 0,18%
50	52,48%	$\pm$ 2,93%	45,72%	$\pm$ 1,86%	1,80%	$\pm$ 2,20%	1,18%	$\pm$ 1,86%
100	47,10%	$\pm$ 3,89%	51,83%	$\pm$ 3,60%*	1,07%	$\pm$ 0,30%	2,17%	$\pm$ 2,01%

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina em DMSO por 24 h. Utilizou-se 16 $\mu\text{g/mL}$ de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Os valores indicam a média da população de células em cada fase do ciclo $\pm$ o desvio padrão. $n = 3$. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Figura 28. Representação da localização das células expostas à trifluralina por 24 h quanto às fases do ciclo celular.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de tebutiuram em DMSO por 24 h. Utilizou-se 16 $\mu\text{g/mL}$ de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Fonte: do autor.

Tabela 5. Efeito da trifluralina sobre o ciclo celular de HepG2 em 48h.

	G1		S		G2/M		Apoptose (SubG-0)	
C+	42,10%	± 14,84%	44,99%	± 13,72%	12,91%	± 1,11%	66,27%	± 23,00%*
C-	54,62%	± 5,26%	40,75%	± 2,50%	4,63%	± 4,39%	2,12%	± 1,17%
1	53,02%	± 5,57%	43,46%	± 1,95%	3,52%	± 3,73%	0,69%	± 0,91%
5	51,95%	± 6,61%	44,49%	± 3,24%	3,56%	± 3,38%	1,08%	± 0,61%
10	52,02%	± 7,11%	43,61%	± 1,58%	4,37%	± 5,53%	1,49%	± 0,13%
20	51,98%	± 4,92%	44,37%	± 1,51%	3,65%	± 3,89%	0,77%	± 0,32%
50	50,03%	± 1,94%	47,38%	± 1,49%	2,60%	± 3,13%	3,26%	± 2,40%
100	46,19%	± 5,26%	51,17%	± 1,32%*	2,63%	± 4,01%	6,98%	± 1,08%

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de trifluralina em DMSO por 48 h. Utilizou-se 16 µg/mL de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Os valores indicam a média da população de células em cada fase do ciclo +- o desvio padrão. n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet (p < 0,05). Fonte: do autor.

Figura 29. Representação da localização das células expostas à trifluralina por 48 h quanto às fases do ciclo celular.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiurum em DMSO por 48 h. Utilizou-se 16 µg/mL de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Fonte: do autor.

Tabela 6. Efeito da trifluralina sobre o ciclo celular de HepG2 em 72 h.

	G1		S		G2/M		Apoptose (SubG-0)	
C+	62,61%	± 16,61%	32,84%	± 10,17%	8,87%	± 0,34%	41,14%	± 10,70%*
C-	61,63%	± 3,18%	36,36%	± 2,47%	2,01%	± 3,48%	4,74%	± 1,19%
1	59,33%	± 3,95%	37,70%	± 1,71%	2,97%	± 5,14%	2,89%	± 1,60%
5	60,36%	± 3,21%	37,84%	± 2,50%	1,80%	± 3,12%	5,94%	± 2,24%
10	60,70%	± 2,62%	38,63%	± 3,17%	0,67%	± 1,16%	6,55%	± 2,77%
20	62,71%	± 0,98%	36,78%	± 1,77%	0,50%	± 0,87%	5,90%	± 0,86%
50	57,87%	± 5,54%	41,86%	± 5,77%	0,27%	± 0,23%	18,36%	± 10,24%
100	48,90%	± 0,77%	49,34%	± 2,67%*	1,76%	± 1,97%	28,59%	± 8,30%*

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de trifluralina em DMSO por 72 h. Utilizou-se 16 µg/mL de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Os valores indicam a média da população de células em cada fase do ciclo +- o desvio padrão. n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Figura 30. Representação da localização das células expostas à trifluralina por 72 h quanto às fases do ciclo celular.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiurum em DMSO por 72 h. Utilizou-se 16 µg/mL de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Fonte: do autor.

4.1.5 Teste com o marcador Anexina V/PI

Os resultados do ensaio indicam que o tebutiurum não provoca morte celular, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e as concentrações testadas, no tempo de 24 horas (Tabela 7 e Fig. 31), 48 horas (Tabela 8 e Fig. 32) e 72 horas (Tabela 9 e Fig. 33).

Tabela 7. Efeito do tebutiurum sobre a indução de morte celular em HepG2 avaliada pelo ensaio Anexina V/PI em 24 h.

	PI+ A- (Q1)		PI+ A+ (Q2)		PI- A- (Q3)		PI- A+ (Q4)	
C+	11,88	± 2,89*	76,33	± 5,29*	6,08	± 1,87*	5,69	± 4,19
C-	3,58	± 0,77	3,59	± 1,35	88,53	± 5,07	3,87	± 3,71
1 µmol/L	3,24	± 1,04	3,54	± 1,38	88,62	± 5,46	4,59	± 3,27
5 µmol/L	3,42	± 0,42	2,63	± 0,64	91,76	± 1,80	2,30	± 0,88
10 µmol/L	3,58	± 0,92	4,08	± 0,83	83,77	± 5,45	4,61	± 1,64
20 µmol/L	4,81	± 1,91	4,67	± 2,15	83,43	± 9,59	6,02	± 3,76
50 µmol/L	3,48	± 0,93	2,84	± 1,11	90,58	± 2,72	3,07	± 0,80
100 µmol/L	3,94	± 1,01	3,17	± 1,25	89,76	± 3,09	3,14	± 0,92

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiurum em DMSO por 24 h. Utilizou-se 0,16 mg/L de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Os valores indicam, em porcentagem, a média da população de células em cada quadrante +- o desvio padrão. n = 3. PI+ = Iodeto de propídio positivo; PI- = Iodeto de propídio negativo; A+ = Anexina positivo; A- = Anexina negativo. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet (p < 0,05). Fonte: do autor.

Figura 31. Representação da localização das células expostas ao tebutiurum por 24 h nos quadrantes no experimento com Anexina V e Iodeto de propídio.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiurum em DMSO por 24 h. Utilizou-se 0,16 mg/L de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Q1 = PI+ A-; Q2 = PI+ A+; Q3 = PI- A-; Q4 = PI- A+. Fonte: do autor.

Tabela 8. Efeito do tebutiurum sobre a indução de morte celular em HepG2 avaliada pelo ensaio Anexina V/PI em 48 h.

	PI+ A- (Q1)	PI+ A+ (Q2)	PI- A- (Q3)	PI- A+ (Q4)
C+	17,27 ± 14,18*	80,98 ± 13,21*	1,03 ± 0,38*	0,71 ± 0,59
C-	2,80 ± 0,75	3,52 ± 0,68	88,37 ± 2,46	5,33 ± 3,71
1	2,80 ± 1,42	3,64 ± 1,50	88,46 ± 1,61	5,10 ± 3,37
5	3,38 ± 1,64	3,26 ± 0,92	88,34 ± 2,23	5,02 ± 3,95
10	2,78 ± 1,03	3,61 ± 1,18	87,71 ± 3,31	5,88 ± 5,19
20	2,34 ± 0,79	3,10 ± 0,88	86,62 ± 6,66	7,68 ± 7,58
50	2,46 ± 0,80	3,78 ± 1,59	87,80 ± 2,09	5,77 ± 3,03
100	2,49 ± 0,85	3,60 ± 1,53	87,73 ± 1,97	6,17 ± 3,02

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de tebutiurum em DMSO durante 48 h. Utilizou-se 0,16 mg/L de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Os valores indicam, em porcentagem, a média da população de células em cada quadrante +- o desvio padrão. n = 3. PI+ = Iodeto de propídio positivo; PI- = Iodeto de propídio negativo; A+ = Anexina positivo; A- = Anexina negativo. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Figura 32. Representação da localização das células expostas ao tebutiurum por 48 h nos quadrantes no experimento com Anexina V e Iodeto de propídio.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de tebutiurum em DMSO por 48 h. Utilizou-se 0,16 mg/L de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Q1 = PI+ A-; Q2 = PI+ A+; Q3 = PI- A-; Q4 = PI- A+. Fonte: do autor.

Tabela 9. Efeito do tebutiurum sobre a indução de morte celular em HepG2 avaliada pelo ensaio Anexina V/PI em 72 h.

	PI+ A- (Q1)	PI+ A+ (Q2)	PI- A- (Q3)	PI- A+ (Q4)
C+	41,38 ± 26,25*	49,29 ± 32,22*	7,86 ± 7,32*	148 ± 0,78
C-	5,12 ± 2,40	2,40 ± 1,59	85,90 ± 5,86	2,50 ± 0,92
1	6,00 ± 2,00	2,66 ± 1,60	88,60 ± 0,74	2,77 ± 0,73
5	6,18 ± 2,03	2,22 ± 1,52	89,36 ± 2,02	2,22 ± 1,28
10	6,64 ± 1,15	2,76 ± 1,60	87,28 ± 1,07	3,33 ± 1,50
20	6,16 ± 1,24	2,82 ± 1,87	87,53 ± 0,66	3,51 ± 1,23
50	6,98 ± 0,83	3,12 ± 2,16	87,01 ± 1,48	2,90 ± 0,92
100	6,78 ± 1,26	2,49 ± 1,81	87,98 ± 0,97	2,73 ± 0,60

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de tebutiurum em DMSO por 72 h. Utilizou-se 0,16 mg/L de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Os valores indicam, em porcentagem, a média da população de células em cada quadrante +- o desvio padrão. n = 3. PI+ = Iodeto de propídio positivo; PI- = Iodeto de propídio negativo; A+ = Anexina positivo; A- = Anexina negativo. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Figura 33. Representação da localização das células expostas ao tebutiurum por 72 h nos quadrantes no experimento com Anexina V e Iodeto de propídio.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de tebutiurum em DMSO por 72 h. Utilizou-se 0,16 mg/L de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Q1 = PI+ A-; Q2 = PI+ A+; Q3 = PI- A-; Q4 = PI- A+. Fonte: do autor.

Ainda em relação ao teste com o marcador Anexina V/PI, HepG2 expostas por 24 horas à trifluralina 100 $\mu\text{mol/L}$ apresentaram diminuição significativa de células iodeto de Propídio negativo/Anexina negativo (PI-A-), ou seja, células que não possuem indicativo de morte celular. Nesse tempo de exposição, não foi notado nenhum aumento significativo de células nos outros quadrantes analisados, positivos para anexina V e / ou PI, como mostrado pela Tabela 10 e Figura 34. Este fato ocorre pelo fato de que há um aumento do número de células em outros 2 quadrantes (PI+A-) e (PI-A+), sem que estes aumentos se tornem estatisticamente significantes.

Após 48 horas, pode-se observar, nas células expostas a 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina, um aumento significativo na porcentagem de células Anexina positivo (PI-A+), indicando apoptose (Tabela 11 e Fig. 35).

No tempo de 72 horas, nas células expostas a 100 μM de trifluralina, houve diferença estatisticamente significativa em PI+A- e em PI-A+, indicando ocorrência tanto de apoptose quanto de necrose (Tabela 12 e Fig. 36).

Tabela 10. Efeito da trifluralina sobre a indução de morte celular em HepG2 avaliada pelo ensaio Anexina V/PI em 24 h.

	PI+ A- (Q1)		PI+ A+ (Q2)		PI- A- (Q3)		PI- A+ (Q4)	
C+	10,91	± 4,49*	81,21	± 9,02*	4,97	± 2,48*	2,90	± 2,66
C-	4,00	± 1,90	2,58	± 0,14	90,45	± 0,88	2,95	± 1,61
1 µmol/L	3,56	± 0,74	2,39	± 0,25	90,44	± 2,27	3,61	± 3,05
5 µmol/L	3,02	± 1,16	2,33	± 0,28	90,55	± 2,29	4,13	± 3,43
10 µmol/L	3,38	± 1,34	2,47	± 0,29	89,75	± 2,47	4,42	± 3,49
20 µmol/L	4,00	± 0,18	2,63	± 0,72	87,78	± 5,46	5,58	± 4,86
50 µmol/L	4,03	± 1,62	2,68	± 0,42	85,77	± 2,72	7,51	± 4,08
100 µmol/L	6,30	± 1,72	3,77	± 1,13	80,72	± 5,10*	9,24	± 5,26

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de trifluralina em DMSO por 24 h. Utilizou-se 0,16 mg/L de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Os valores indicam, em porcentagem, a média a média da população de células em cada quadrante +- o desvio padrão. n = 3. PI+ = Iodeto de propídio positivo; PI- = Iodeto de propídio negativo; A+ = Anexina positivo; A- = Anexina negativo. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Figura 34. Representação da localização das células expostas à trifluralina por 24 h nos quadrantes no experimento com Anexina V e Iodeto de propídio.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de trifluralina em DMSO por 24 h. Utilizou-se 0,16 mg/L de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Q1 = PI+ A-; Q2 = PI+ A+; Q3 = PI- A-; Q4 = PI- A+. Fonte: do autor.

Tabela 11. Efeito do trifluralina sobre a indução de morte celular em HepG2 avaliada pelo ensaio Anexina V/PI em 48 h.

	PI+ A- (Q1)	PI+ A+ (Q2)	PI- A- (Q3)	PI- A+ (Q4)
C+	11,08 ± 5,25*	81,44 ± 2,58*	2,91 ± 0,45*	4,60 ± 2,74
C-	3,85 ± 1,08	3,30 ± 1,77	89,13 ± 1,00	3,72 ± 1,53
1 µmol/L	3,68 ± 0,57	2,77 ± 1,03	90,29 ± 0,36	3,29 ± 0,99
5 µmol/L	3,66 ± 1,16	2,40 ± 0,82	89,77 ± 0,97	4,17 ± 2,02
10 µmol/L	3,17 ± 0,98	3,59 ± 2,03	83,68 ± 4,38	9,53 ± 4,18
20 µmol/L	3,96 ± 2,52	3,07 ± 1,52	83,16 ± 4,82	8,12 ± 5,56
50 µmol/L	3,49 ± 0,86	3,00 ± 1,55	81,54 ± 6,86	11,97 ± 6,07
100 µmol/L	3,02 ± 0,73	2,73 ± 1,28	66,71 ± 13,59*	27,53 ± 13,10*

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de trifluralina em DMSO por 48 h. Utilizou-se 0,16 mg/L de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Os valores indicam, em porcentagem, a média e o desvio padrão da população de células em cada quadrante +- o desvio padrão. n = 3. PI+ = Iodeto de propídio positivo; PI- = Iodeto de propídio negativo; A+ = Anexina positivo; A- = Anexina negativo. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet (p < 0,05). Fonte: do autor.

Figura 35. Representação da localização das células expostas à trifluralina por 48 h nos quadrantes no experimento com Anexina V e Iodeto de propídio.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de trifluralina em DMSO por 48 h. Utilizou-se 0,16 mg/L de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Q1 = PI+ A-; Q2 = PI+ A+; Q3 = PI- A-; Q4 = PI- A+. Fonte: do autor.

Tabela 12. Efeito do trifluralina sobre a indução de morte celular em HepG2 avaliada pelo ensaio Anexina V/PI em 72 h.

	PI+ A- (Q1)		PI+ A+ (Q2)		PI- A- (Q3)		PI- A+ (Q4)	
C+	30,38	± 5,76*	62,97	± 1,66*	8,33	± 3,63*	4,51	± 3,66
C-	7,23	± 2,51	2,35	± 1,09	87,27	± 2,30	3,15	± 0,74
1 µmol/L	7,47	± 0,80	3,41	± 3,05	85,78	± 3,43	3,33	± 0,63
5 µmol/L	6,60	± 1,53	3,29	± 3,11	87,62	± 2,43	2,52	± 0,53
10 µmol/L	7,31	± 0,82	2,87	± 2,50	87,20	± 2,94	2,59	± 0,34
20 µmol/L	7,04	± 1,94	2,44	± 1,15	85,30	± 4,79	5,19	± 3,68
50 µmol/L	7,73	± 2,35	2,81	± 1,69	82,66	± 7,14	6,80	± 3,77
100 µmol/L	14,99	± 11,15*	4,70	± 4,46	66,11	± 11,90*	14,17	± 5,04*

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de trifluralina em DMSO por 72 h. Utilizou-se 0,16 mg/L de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Os valores indicam, em porcentagem, a média a média da população de células em cada quadrante +- o desvio padrão. n = 3. PI+ = Iodeto de propídio positivo; PI- = Iodeto de propídio negativo; A+ = Anexina positivo; A- = Anexina negativo. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Figura 36. Representação da localização das células expostas à trifluralina por 72 h nos quadrantes no experimento com Anexina V e Iodeto de propídio.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de trifluralina em DMSO por 72 h. Utilizou-se 0,16 mg/L de cisplatina no controle positivo (C+) e 0,5% de DMSO no controle negativo (C-). Q1 = PI+ A-; Q2= PI+A+; Q3= PI-A-; Q4=PI-A+. Fonte: do autor.

4.1.6 Análise de Condensação e fragmentação nuclear

Neste ensaio foi realizada a exposição de HepG2 aos herbicidas por 24 h, 48h, e 72 h, no entanto, células expostas a ambas substâncias por 72 h apresentaram uma morfologia destoante dos outros tempos de exposição, com características de alta deterioração, o que inviabilizou a contagem das células. Por esse motivo, estão apresentados os resultados apenas em 24 e 48h de exposição.

O herbicida tebutiuram não provocou condensação e fragmentação nuclear em HepG2 nas condições analisadas. Nenhuma das concentrações testadas do herbicida diferiu significativamente em relação ao controle negativo quanto ao número de células condensadas e fragmentadas (Fig. 37). Nas Figuras 38 e 39, é possível observar as imagens das células sob microscopia de fluorescência.

Figura 37. Efeito do tebutiurrom sobre a condensação e fragmentação nuclear de HepG2.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de de tebutiurrom em DMSO nos tempos de 24h e 48h. Utilizou-se 0,5% de DMSO no controle negativo e não foi utilizado controle positivo. As barras indicam a média de células com condensação / fragmentação nuclear (C/F nuclear) +- o desvio padrão (em porcentagem em relação ao controle negativo). n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet (p < 0,05).
Fonte: do autor.

Figura 38. Imagens de células coradas com Hoechst sob microscopia de fluorescência após exposição ao tebutiurôm por 24h.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de de tebutiurôm em DMSO por 24 horas. Utilizou-se 0,5% de DMSO no controle negativo e não foi utilizado controle positivo. Aumento na objetiva de 40x. A seta indica células condensada/fragmentada. Fonte: do autor.

Figura 39. Imagens de células coradas com Hoechst sob microscopia de fluorescência após exposição ao tebutiurum por 48h.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de de tebutiurum em DMSO por 48 horas. Utilizou-se 0,5% de DMSO no controle negativo e não foi utilizado controle positivo. Aumento na objetiva de 40x. As setas indicam células condensadas/fragmentadas. Fonte: do autor.

Em relação à trifluralina, os resultados estatisticamente significantes indicaram que a exposição à 100 µmol/L do herbicida provocou condensação e fragmentação nuclear em um maior número de células em relação ao controle negativo, tanto em 24h quanto em 48h de exposição. O número de células condensadas/fragmentadas expostas à 100 µmol/L de trifluralina foi aproximadamente cinco vezes maior quando comparado ao controle negativo (Fig. 40). Nas Figuras 41 e 42, é possível observar as imagens das células sob microscopia de fluorescência.

Figura 40. Efeito da trifluralina sobre a condensação e fragmentação nuclear de HepG2.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de de trifluralina em DMSO nos tempos de 24h e 48h. Utilizou-se 0,5% de DMSO no controle negativo e não foi utilizado controle positivo. As barras indicam a média de células com condensação / fragmentação nuclear (C/F nuclear) +- o desvio padrão (em porcentagem em relação ao controle negativo). n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Figura 41. Imagens de células coradas com Hoechst sob microscopia de fluorescência após exposição à trifluralina por 24h.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de de trifluralina em DMSO por 24 horas. Utilizou-se 0,5% de DMSO no controle negativo e não foi utilizado controle positivo. Aumento na objetiva de 40x. As setas indicam células condensadas/fragmentadas. Fonte: do autor.

Figura 42. Imagens de células coradas com Hoechst sob microscopia de fluorescência após exposição à trifluralina por 48 h.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de de trifluralina em DMSO por 48 horas. Utilizou-se 0,5% de DMSO no controle negativo e não foi utilizado controle positivo. Aumento na objetiva de 40x. As setas indicam células condensadas/fragmentadas. Fonte: do autor.

4.1.7 Análise do Potencial de membrana mitocondrial

O Tebutiuram não alterou o potencial de membrana mitocondrial em nenhum dos três tempos de exposição, sendo que todas as concentrações testadas não diferiram estatisticamente do controle negativo (Fig. 43). Já a trifluralina, nas concentrações de 50 $\mu\text{mol/L}$ e 100 $\mu\text{mol/L}$, diminuiu significativamente o potencial de membrana das células analisadas em 24h, 48h e 72h (Fig. 44). No tempo de 72 h, células expostas à 50 $\mu\text{mol/L}$ deste herbicida apresentou um potencial de membrana mitocondrial 31% menor do que as células do controle negativo, e em células expostas à 100 $\mu\text{mol/L}$ da trifluralina, essa diferença foi de aproximadamente 63%.

Figura 43. Efeito do tebutiurum sobre o potencial de membrana mitocondrial de HepG2.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiurum em DMSO nos tempos de 24h, 48h e 72h. Utilizou-se 25 µmol/L de CCCP no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média da fluorescência emitida pela TMRM +- o desvio padrão (em porcentagem em relação ao controle negativo). n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet (p < 0,05). Fonte: do autor.

Figura 44. Efeito da trifluralina sobre o potencial de membrana mitocondrial de HepG2.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de trifluralina em DMSO nos tempos de 24h, 48h e 72h. Utilizou-se 25 µmol/L de CCCP no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média da fluorescência emitida pela TMRM +- o desvio padrão (em porcentagem em relação ao controle negativo). n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet (p < 0,05). Fonte: do autor.

4.1.8 Análise de liberação de LDH

Por meio do ensaio da liberação da enzima LDH é avaliada a ocorrência de necrose, já que a enzima só aparecerá aumentada caso haja um aumento na permeabilidade da membrana celular e assim seu extravazamento. Neste ensaio, observamos que células expostas às concentrações testadas do tebutiuram, por 24, 48, e 72 h, não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle quanto à liberação de LDH (Fig. 45). A exposição à trifluralina na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$, por sua vez, induziu um aumento significativo na liberação de LDH após 72 h, sendo essa liberação aproximadamente o dobro comparada ao controle negativo (Fig. 46).

Figura 45. Efeito do tebutiurum sobre a atividade da LDH extracelular de HepG2.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiurum em DMSO nos tempos de 24h e 48h. Utilizou-se triton (20%) no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média da atividade da LDH +- o desvio padrão. n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$).
Fonte: do autor.

Figura 46. Efeito da trifluralina sobre a atividade da LDH extracelular de HepG2.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de trifluralina em DMSO nos tempos de 24h, 48h e 72h. Utilizou-se triton (20%) no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média da atividade da LDH +- o desvio padrão. n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$).
Fonte: do autor.

4.2 Estresse oxidativo

4.2.1 Determinação do acúmulo de espécies reativas

Neste ensaio, pode-se perceber que a exposição ao Tebutiurrom não provocou aumento significativo de espécies reativas depois de 24, 48, ou 72 h em nenhuma das concentrações testadas (Fig. 47).

No entanto, pode-se perceber um aumento significativo das espécies reativas nas células expostas à 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina, tanto em 24 h quanto em 48 h de exposição, sendo que no tempo de 48 h, as células expostas apresentaram 86% mais espécies reativas do que o controle negativo. Porém, em 72 h de exposição, há uma diminuição de espécies reativas em células expostas à 100 $\mu\text{mol/L}$ (Fig. 48). Ressalta-se, no entanto, que após 72 h de incubação já há um decréscimo significativo no número de células nas maiores concentrações testadas. Este efeito não esperado de diminuição no acúmulo de ERO, pode ser devido ao fato de haver um número de células significativamente menor nas maiores concentrações testadas após este período de incubação.

Figura 47. Efeito do tebutiuram no acúmulo de espécies reativas em HepG2.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiuram em DMSO nos tempos de 24h, 48h e 72h. Utilizou-se 0,5 mmol/L de t-BOOH no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média da fluorescência do DCF +- o desvio padrão (em porcentagem relação ao controle negativo). n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Figura 48. Efeito da trifluralina no acúmulo de espécies reativas em HepG2.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de trifluralina em DMSO nos tempos de 24h, 48h e 72h. Utilizou-se 0,5 mmol/L de t-BOOH no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média da fluorescência do DCF +- o desvio padrão (em porcentagem relação ao controle negativo). n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

4.2.2 RT-PCR quantitativo - Análise do gene NQO1

Este teste avalia a transcrição do gene *NQO1* analisando a quantidade de seu mRNA presente na amostra. Devido aos custos da técnica, neste ensaio, foram selecionadas apenas algumas concentrações dos herbicidas a serem testadas, sendo para o tebutiuron, cujo efeito foi negativo para todos os ensaios realizados até então, apenas a concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$, e para a trifluralina, foram selecionadas as concentrações de 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$. Além disso, este ensaio foi realizado apenas no tempo de 24 h de exposição.

Todos os tratamentos testados apresentaram uma expressão de *NQO1* semelhante quando comparado com o controle negativo (Fig. 49), tanto para o tebutiuron quanto para a trifluralina, indicando que a exposição a esses herbicidas não induz aumento da transcrição desse gene, que origina a enzima antioxidante NQO1.

Figure 49. Efeito do tebutiuron e da trifluralina na transcrição do gene *NQO1* em HepG2.

As células foram expostas às concentrações de 100 $\mu\text{mol/L}$ de tebutiuron, e 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina em DMSO no tempo de 24 h. Utilizou-se 5 $\mu\text{mol/L}$ de AI-1 no controle positivo e 0,1% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média do número de cópias de NQO1/18 S +- o desvio padrão. n = 3. Trif = Trifluralina. Teb = Tebutiuron * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

4.2.3 Ensaio repórter – Sequência ARE

Este ensaio avalia a ativação da sequência antioxidante ARE, que está presente na região promotora de vários genes que codificam enzimas antioxidantes.

Com base nos dados da ausência de alteração observada no ensaio de expressão do gene *NQO1*, foram selecionadas apenas as concentrações de 10 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de tebutiurum e 10 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina para serem testadas, ambas no tempo de exposição de 24 h apenas.

Neste ensaio, pode-se observar que ambos os herbicidas, em todas as concentrações testadas, não diferiram do controle negativo (Fig. 50).

Figure 50. Efeito do tebutiurum e da trifluralina na ativação da sequência ARE em HepG2.

As células foram expostas às concentrações de 10 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de tebutiurum e de 10 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina em DMSO no tempo de 24 h. Utilizou-se 5 $\mu\text{mol/L}$ de AI-1 no controle positivo e 0,1% de DMSO no controle negativo. LDHA foi usada para normalização. As barras indicam a média da luminescência da luciferina-luciferase $\pm$ o desvio padrão. $n = 3$. Trif = Trifluralina. Teb = Tebutiurum. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

4.3 Genotoxicidade e mutagenicidade

4.3.1 Ensaio cometa

O tebutiurum e a trifluralina, nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$, em 4h de exposição, não induziram danos no DNA de HepG2, como evidenciado pelo ensaio cometa (Figs. 51 e 52). O teste de Azul de Tripan mostrou viabilidade celular acima de 90% para todos os tratamentos (Dados não mostrados).

Figura 51. Efeito do tebutiurum sobre o DNA de HepG2 avaliado pelo ensaio cometa.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de tebutiurum em DMSO por 4h. Utilizou-se 15 $\mu\text{g/mL}$ de MMS no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média do tail moment +- o desvio padrão. $n = 3$. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Figura 52. Efeito da trifluralina sobre o DNA de HepG2 avaliado pelo ensaio cometa.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina em DMSO por 4h. Utilizou-se 15 $\mu\text{g/mL}$ de MMS no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média do tail moment +- o desvio padrão. $n = 3$. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

4.3.2 Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese

Em relação ao índice de divisão nuclear (IDN), que fornece uma medida do estado proliferativo das células viáveis, não houve diferença significativa das células expostas ao tebutiurum, nas condições testadas, comparando-se com o controle negativo (Fig. 53). Além disso, a frequência de micronúcleos também não diferiu significativamente nos grupos tratados em relação ao controle negativo (Fig.54). O teste de Azul de Tripán mostrou viabilidade celular acima de 90% para todos os tratamentos (Dados não mostrados).

Figura 53. Efeito do tebutiurum sobre o Índice de Divisão Nuclear (IDN) em HepG2.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiurum em DMSO por 66h. Utilizou-se 0.03 µg/mL de doxorrubicina no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média do IDN +- o desvio padrão. n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Figura 54. Efeito do tebutiurum sobre a formação de micronúcleos em HepG2.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de tebutiurum em DMSO por 66h. Utilizou-se 0.03 µg/mL de doxorrubicina no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média de micronúcleos (MN) por 1000 células binucleadas (BN) +- o desvio padrão (em porcentagem em relação ao controle negativo). n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Da mesma forma que o tebutiurum, a trifluralina, nas condições testadas, também não provocou diferença estatisticamente significativa no IDN dos grupos tratados em relação ao controle negativo, assim como não mostrou diferença significativa no número de micronúcleos das células expostas em relação ao controle negativo. (Figs. 55 e 56).

Figura 55. Efeito da trifluralina sobre o Índice de Divisão Nuclear (IDN) em HepG2.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de trifluralina em DMSO por 66h. Utilizou-se 0.03 µg/mL de doxorrubicina no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média do IDN +- o desvio padrão. n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

Figura 56. Efeito da trifluralina sobre a formação de micronúcleos em HepG2.

As células foram expostas às concentrações de 1, 5, 10, 20, 50 e 100 µmol/L de trifluralina em DMSO por 66h. Utilizou-se 0.03 µg/mL de doxorrubicina no controle positivo e 0,5% de DMSO no controle negativo. As barras indicam a média de micronúcleos (MN) por 1000 células binucleadas (BN) +- o desvio padrão (em porcentagem em relação ao controle negativo). n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o teste de Dunnet ($p < 0,05$). Fonte: do autor.

4.3.3 Teste *Salmonella*/microsoma

Neste ensaio, utilizou-se linhagens de *Salmonella typhimurium* que detectam mutações pontuais por deslocamento de quadro de leitura (TA 98 e TA 97a) e por substituição de pares de base (TA100 e TA1535). O teste foi realizado com e sem ativação metabólica e foi calculada a potência mutagênica das substâncias em cada linhagem, com e sem ativação metabólica.

Primeiramente o ensaio foi feito em *S. typhimurium* TA98 e TA100, que podem detectar cerca de 90% dos mutágenos em uma população (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Para essas linhagens, a concentração mínima testada de cada herbicida foi de 0,01 µg/placa, e a máxima foi de 5000 µg/placa. No entanto, as bactérias TA98 mostraram-se inviáveis quando expostas ao tebutiurum na concentração de 5000 µg/placa, com e sem ativação metabólica, e quando expostas à trifluralina na concentração de 5000 µg/placa com ativação metabólica, o que impossibilitou a contagem do número de colônias revertentes. Nesses casos, a maior concentração analisada do herbicida foi de 2500 µg/placa para TA98 sem ativação metabólica, e 1000 µg/placa para TA98 com ativação metabólica.

Por meio de *S. typhimurium* TA98 e TA100, nas concentrações analisadas, foi possível observar que o número de revertentes histidina positivo nas bactérias de ambas as linhagens expostas aos herbicidas não diferiu significativamente do número de revertentes do controle negativo, indicando ausência de mutagenicidade (Tabelas 13 e 14).

O ensaio foi realizado também com as linhagens TA97a e TA1535, uma vez que a *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) preconiza a realização deste teste com um mínimo de 4 linhagens (OECD, 1997). Com base nos resultados negativos nos testes com a TA98 e a TA100, a concentração mínima testada de cada herbicida em TA97a e TA1535 foi de 10 µg/placa, e a máxima foi de 5000 µg/placa. As bactérias da linhagem TA97a mostraram-se inviáveis quando expostas ao tebutiurum na concentração de 5000 µg/placa, com ativação metabólica, o que impossibilitou a contagem do número de colônias revertentes. Assim, nesse caso, a maior concentração analisada do herbicida foi de 2500 µg/placa.

A linhagem TA97a mostrou resultados negativos para o teste, nas condições testadas, uma vez que bactérias expostas a ambos os herbicidas não diferiu do controle negativo quanto ao número de colônias revertentes. Já bactérias da linhagem TA1535,

com ativação metabólica, expostas tanto ao tebutiurum quanto à trifluralina na concentração de 5000 µg/placa tiveram número de colônias revertentes significativamente maior do que no controle negativo (Tabelas 13 e 14). No entanto, nesses casos estatisticamente significantes, a potência mutagênica do tebutiurum foi 0,002518, e a potência mutagênica da trifluralina foi 0,001004.

A potência mutagênica se trata da inclinação da reta formada pelos valores dos números de colônias revertentes de cada concentração analisada de um herbicida e do grupo controle negativo. A potência mutagênica é calculada para cada linhagem com S9 e para cada linhagem sem S9. Uma vez que a potência mutagênica de ambos os herbicidas que apresentaram resultado estatisticamente significativo foi menor que 0,01, os resultados foram considerados negativos, pois não há significado biológico no aumento estatístico observado.

Tabela 13. Efeito do tebutiurum sobre a mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*.

Concentração	Média de revertentes por placa $\pm$ Desvio padrão							
	TA 98		TA 100		TA97a		TA1535	
	Ausência de S9	Presença de S9	Ausência de S9	Presença de S9	Ausência de S9	Presença de S9	Ausência de S9	Presença de S9
Cont. negativo	33,8 $\pm$ 4,4	47,0 $\pm$ 6,9	207,8 $\pm$ 7,0	229,8 $\pm$ 24,6	168,0 $\pm$ 15,1	168,8 $\pm$ 9,9	10,0 $\pm$ 2,1	7,8 $\pm$ 1,8
0,01 μ g/placa	33,7 $\pm$ 3,1	49,7 $\pm$ 3,2	189,3 $\pm$ 21,4	253,0 $\pm$ 17,4	---	---	---	---
0,10 μ g/placa	38,7 $\pm$ 7,8	52,0 $\pm$ 3,6	204,7 $\pm$ 17,4	253,7 $\pm$ 21,1	---	---	---	---
1 μ g/placa	35,7 $\pm$ 7,2	50,0 $\pm$ 1,4	193,5 $\pm$ 2,1	235,0 $\pm$ 7,2	---	---	---	---
10 μ g/placa	33,3 $\pm$ 6,7	54,0 $\pm$ 6,1	196,0 $\pm$ 5,7	241,0 $\pm$ 6,1	178,7 $\pm$ 23,5	195,7 $\pm$ 4,5	10,3 $\pm$ 4,0	7,7 $\pm$ 5,5
100 μ g/placa	30,5 $\pm$ 9,2	53,7 $\pm$ 6,1	200,7 $\pm$ 5,9	245,7 $\pm$ 19,0	174,3 $\pm$ 12,9	166,7 $\pm$ 37,7	9,0 $\pm$ 1,7	6,0 $\pm$ 4,0
1000 μ g/placa	29,3 $\pm$ 6,4	58,3 $\pm$ 1,5	201,7 $\pm$ 8,4	232,7 $\pm$ 11,6	166,0 $\pm$ 18,0	187,5 $\pm$ 6,4	15,0 $\pm$ 5,6	14,0 $\pm$ 2,6
2500 μ g/placa	37,3 $\pm$ 4,5	---	209,7 $\pm$ 8,5	---	157,7 $\pm$ 24,0	201,0 $\pm$ 31,8	18,3 $\pm$ 2,5	15,3 $\pm$ 5,1
5000 μ g/placa	#	#	141,3 $\pm$ 36,5	199,0 $\pm$ 25,0	126,0 $\pm$ 8,5	#	16,3 $\pm$ 7,5	18,0 $\pm$ 2,0*
Cont. positivo	540,0 $\pm$ 104,6*	3944 $\pm$ 33,9*	2216 $\pm$ 837,2*	3464 $\pm$ 169,7*	572,0 $\pm$ 24,0*	1944 $\pm$ 396,0*	982,5 $\pm$ 51,6*	1412 $\pm$ 198,0*

As bactérias foram expostas às concentrações de 0,01; 0,1; 1; 10; 100, 1000, 2500 e 5000 μ g/placa de tebutiurum em DMSO por 66 h. Para o controle negativo, utilizou-se 100 μ L de DMSO. Os controles positivos usados na ausência de mistura S9 foi de 0,5 μ g / placa de óxido de 4-nitroquinolina para as linhagens TA98 e TA100, 5 μ g / placa de óxido de 4-nitroquinolina para TA97, e 5 μ g / placa de azida de sódio para TA1535. O controle positivo utilizado na presença de S9 foi de 2,5 μ g / placa de 2-aminoantraceno para todas as linhagens testadas. Os valores indicam a média do número de colônias revertentes +- o desvio padrão. n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o modelo de Bernstein ($p < 0,05$), do software Salanal. --- indica que o teste não foi realizado na concentração em questão. # indica que a concentração testada foi tóxica para a linhagem de *Salmonella*, impossibilitando a contagem de colônias revertentes. Fonte: do autor.

Tabela 14. Efeito da trifluralina sobre a mutagenicidade em *Salmonella typhimurium*.

Concentração	Média de revertentes por placa $\pm$ Desvio padrão							
	TA 98		TA 100		TA97		TA1535	
	Ausência de S9	Presença de S9	Ausência de S9	Presença de S9	Ausência de S9	Presença de S9	Ausência de S9	Presença de S9
Cont. negativo	33,8 $\pm$ 4,4	47,0 $\pm$ 6,9	207,8 $\pm$ 7,0	229,8 $\pm$ 24,6	168,0 $\pm$ 15,1	168,8 $\pm$ 9,9	10,0 $\pm$ 2,1	7,8 $\pm$ 1,8
0,01 μ g/placa	33,7 $\pm$ 3,1	54,3 $\pm$ 3,2	241,0 $\pm$ 7,8	261,5 $\pm$ 29,0	---	---	---	---
0,1 μ g/placa	38,7 $\pm$ 7,8	44,0 $\pm$ 13,1	221,0 $\pm$ 8,5	255,7 $\pm$ 4,7	---	---	---	---
1 μ g/placa	35,7 $\pm$ 7,2	48,3 $\pm$ 9,9	211,0 $\pm$ 9,2	250,0 $\pm$ 5,0	---	---	---	---
10 μ g/placa	33,3 $\pm$ 6,7	54,3 $\pm$ 6,7	218,0 $\pm$ 9,9	235,0 $\pm$ 19,1	181,7 $\pm$ 11,0	153,0 $\pm$ 24,0	10,0 $\pm$ 2,0	7,0 $\pm$ 4,0
100 μ g/placa	30,5 $\pm$ 9,2	44,7 $\pm$ 6,4	222,0 $\pm$ 6,2	255,3 $\pm$ 11,1	182,7 $\pm$ 13,6	202,7 $\pm$ 9,3	12,3 $\pm$ 4,7	13,0 $\pm$ 1,7
1000 μ g/placa	29,3 $\pm$ 6,4	41,3 $\pm$ 6,5	203,0 $\pm$ 16,5	254,3 $\pm$ 12,7	153,0 $\pm$ 15,6	167,3 $\pm$ 16,3	16,0 $\pm$ 5,0	10,3 $\pm$ 3,8
2500 μ g/placa	33,7 $\pm$ 0,6	---	199,3 $\pm$ 5,5	---	184,0 $\pm$ 23,5	---	8,0 $\pm$ 3,0	10,3 $\pm$ 2,1
5000 μ g/placa	39,0 $\pm$ 6,0	#	179,0 $\pm$ 1,0	224,0 $\pm$ 3,0	174,0 $\pm$ 5,0	202,3 $\pm$ 16,0	16,0 $\pm$ 0,0	13,3 $\pm$ 2,1*
Cont. positivo	540,0 $\pm$ 104,6*	3944 $\pm$ 33,9*	2216 $\pm$ 837,2*	3464 $\pm$ 169,7*	572,0 $\pm$ 24,0*	1944 $\pm$ 396,0*	982,5 $\pm$ 51,6*	1412 $\pm$ 198,0*

As bactérias foram expostas às concentrações de 0,01; 0,1; 1; 10; 100, 1000, 2500 e 5000 μ g/placa de trifluralina em DMSO por 66 h. Para o controle negativo, utilizou-se 100 μ L de DMSO. Os controles positivos usados na ausência de mistura S9 foi de 0,5 μ g / placa de óxido de 4-nitroquinolina para as linhagens TA98 e TA100, 5 μ g / placa de óxido de 4-nitroquinolina para TA97, e 5 μ g / placa de azida de sódio para TA1535. O controle positivo utilizado na presença de S9 foi de 2,5 μ g / placa de 2-aminoantraceno para todas as linhagens testadas. Os valores indicam a média do número de colônias revertentes +- o desvio padrão. n = 3. * = Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo, segundo o modelo de Bernstein ($p < 0,05$), do software Salanal. --- indica que o teste não foi realizado na concentração em questão. # indica que a concentração testada foi tóxica para a linhagem de *Salmonella*, impossibilitando a contagem de colônias revertentes. Fonte: do autor.

5 DISCUSSÃO

5.1 Proliferação, sobrevivência, e morte celular

Os herbicidas em estudo são considerados seletivos para algumas espécies de plantas, uma vez que o tebutiuron é inibidor da fotossíntese e a trifluralina é um inibidor da divisão celular. Porém, estes herbicidas podem atingir outros organismos e exercer efeitos tóxicos por mecanismos distintos daqueles de ação herbicida. Assim, utilizamos ensaios em células HepG2, derivadas de um hepatoblastoma humano e que mantêm várias características da célula hepática normal para verificar se estes herbicidas interferem com a homeostasia celular.

Inicialmente foram realizados os ensaios clonogênico e SRB, testes básicos para a análise proliferativa das células. Ambos os ensaios, realizados em células expostas ao tebutiuron, mostraram que esse herbicida não interfere significativamente na proliferação de HepG2 nas condições testadas.

No entanto, o ensaio clonogênico, juntamente com o SRB apontam uma atividade antiproliferativa significativa nas células expostas à trifluralina, bem evidente na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ do herbicida em todos os tempos de exposição testados. A atividade antiproliferativa pode ocorrer devido ao bloqueio da progressão do ciclo celular e/ou indução da morte celular por apoptose (BIRT et al., 2001). Por esse motivo, esses ensaios são muito utilizados em triagens, para se ter idéia da citotoxicidade ou não de um composto, porém, se utilizados isoladamente, não são capazes de identificar o mecanismo de citotoxicidade. Assim, a associação com outros testes é de extrema importância.

Desta forma, nossos resultados obtidos a partir do ensaio de viabilidade celular pelo corante MTT foram consistentes com os resultados anteriores, indicando ausência de efeito citotóxico ou citoestático do tebutiuron sobre as células HepG2 nas concentrações e tempos testados. A diminuição significativa da viabilidade induzida pela trifluralina nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ em 24, 48 e 72h, também corroboram para os dados observados com o ensaio com o corante SRB.

O MTT, porém, também é um teste de triagem, uma vez que avalia a atividade das desidrogenases mitocondriais, de vital importância para a produção de ATP e, consequentemente, viabilidade celular. No entanto, é possível que as células obtenham energia por fontes alternativas, como por exemplo a glicólise, o que

permitiria a manutenção da viabilidade celular mesmo com as desidrogenases comprometidas (VAN DERHEIDEN et al., 2009). Dessa forma, a associação dos testes clonogênico, SRB e MTT, é de extrema importância para os testes iniciais de citotoxicidade, promovendo assim uma avaliação mais abrangente do efeito das substâncias testadas.

Em nosso estudo, a análise desses três testes em conjunto sugere ausência de citotoxicidade pelo herbicida tebutiuram nas concentrações e tempos testados, e a ocorrência da diminuição da viabilidade, e/ou uma inibição do ciclo celular causados pelo herbicida trifluralina nas condições analisadas.

Similarmente ao nosso achado, Hartnett et al (2013) avaliaram os efeitos do metolachlor em HepG2. Este herbicida é um tiocarbamato pertencente ao grupo químico das cloroacetanilidas, e à semelhança da trifluralina, tem seu modo de ação herbicida na inibição da divisão celular. Hartnett et al (2013) observaram inibição do crescimento das células após a exposição de 50 ppm de metolachlor por 72h, semelhante aos resultados encontrados na trifluralina. Estudos feitos com outros herbicidas, como o realizado por Gasnier et al (2009), expuseram HepG2 à várias formulações de glifosato, herbicida derivado da glicina, capaz de inibir a síntese de aminoácidos como modo de ação herbicida. Neste trabalho, os autores observaram uma toxicidade a partir de 1% observada no teste com MTT, e um rápido decréscimo na viabilidade nas demais formulações testadas, após 24 horas de exposição. Tais estudos demonstram que esses efeitos em organismos não alvo não representam uma característica exclusiva dos herbicidas que agem pela inibição da divisão celular.

Após a realização dos testes de triagem, é importante que ensaios mais específicos sejam feitos para que o mecanismo de ação tóxica seja melhor compreendido. O ensaio de análise do ciclo celular por citometria de fluxo mostrou que o tebutiuram não interferiu significativamente no ciclo de HepG2 expostas às concentrações testadas, em 24, 48 e 72h, confirmando nossos achados anteriores. Porém, o teste indicou que HepG2 expostas a 100 µmol/L de trifluralina por 24, 48, e 72 h apresentaram uma maior população de células na fase S. Essa diferença foi estatisticamente significativa e sugere um bloqueio nesta fase do ciclo celular.

O ponto de checagem intra-S é ativado por danos encontrados durante essa fase ou por danos não reparados em G1 / S, e o ponto de verificação conduz a um bloqueio na replicação do DNA (SANCAR et al., 2004).

Similarmente ao nosso trabalho, Powell et al (2011) analisaram HepG2 expostas ao herbicida atrazina, um herbicida do grupo químico das triazinas e com modo de ação semelhante ao tebutiuron, inibindo o fotossistema II da fotossíntese e contrário ao observado por nós, os autores observaram inibição do crescimento das células HepG2 expostas durante 72h a 625 ppb de atrazina, e a análise do ciclo celular apontou que estas mesmas células expostas a 100, 300 e 500 ppb do herbicida por 48 h se acumularam na fase S.

Os resultados encontrados por Powell et al (2011), em estudos com o atrazina, se assemelham aos resultados encontrados no presente trabalho com a trifluralina, porém diferem dos resultados com o tebutiuron, cujo modo de ação é semelhante ao da atrazina. Tal fato evidencia a importância do estudo de diferentes herbicidas, que mesmo com modo de ação herbicida idênticos, podem apresentar diferentes efeitos citotóxicos. É possível que essa variação dos efeitos seja em decorrência das diferenças entre as estruturas químicas das moléculas, uma vez que a estrutura de um composto, que pode ser chamado de ligante, está relacionada com sua interação com o receptor biológico (ARROIO et al., 2010).

Além de indicar se houve bloqueio em alguma fase, o ensaio do ciclo celular também pode apontar ocorrência de apoptose. Isso é possível por meio da detecção de células em Sub-G0, que indica fragmentação de DNA. No presente trabalho, este teste mostrou ausência de diferença estatística de populações de células em apoptose entre o controle negativo e células expostas ao tebutiuron, indicando que o herbicida não provoca esse tipo de morte celular nas condições testadas, confirmando novamente os resultados dos experimentos iniciais. Porém, o teste apontou uma maior população de células em SubG0 em HepG2 expostas à 100 µmol/L de trifluralina por 72h. Essa diferença foi estatisticamente significativa e indica ocorrência de apoptose.

O ensaio do ciclo celular indicou, portanto, que o menor número de células observado em HepG2 expostas à trifluralina é devido tanto a um bloqueio no ciclo celular na fase S, quanto à ocorrência de apoptose. No entanto, é importante observar que o teste do Ciclo Celular não é específico para detectar apoptose, e por essa razão os testes de Anexina V e de Condensação e fragmentação nuclear também foram realizados, por se tratarem de técnicas clássicas na detecção deste processo de morte celular

Novamente tivemos a confirmação de que o tebutiuron nas concentrações e tempos testados, não interfere com a homeostasia das células em cultura que

acarretaria em uma diminuição da viabilidade celular. No entanto, a trifluralina, na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$, apresentou porcentagem significativa das células marcadas pela anexina tanto em 48 h quanto em 72 h de exposição, confirmando a indução do processo apoptótico, sugerido pela existência de células em sub-G0 observadas no ensaio de ciclo celular em 72h. Outra informação importante que obtivemos nesta análise, foi a ocorrência de morte celular também por necrose, já que houve uma significativa marcação de células com PI após 72 h de exposição à trifluralina 100 $\mu\text{mol/L}$.

Para buscar maiores evidências quanto a ocorrência de necrose, foi realizado o teste de liberação da enzima LDH, que ocorre apenas quando há um aumento da permeabilidade da membrana celular, aspecto característico da morte celular por necrose. Novamente, tivemos a confirmação da ausência de efeitos significativos do herbicida tebutiuron neste modelo experimental, porém uma maior liberação da enzima LDH ocorreu na mesma concentração e tempo de exposição em que houve a marcação por PI apenas. Essa diferença foi significativa estatisticamente e corrobora ocorrência de necrose por exposição à trifluralina 100 $\mu\text{mol/L}$ (33,52 mg/L) por 72 h.

Estudos já mostraram que, em resposta a um dado estímulo a morte, existe muitas vezes uma relação entre apoptose e necrose. Muitos insultos podem induzir apoptose em doses mais baixas, e necrose em doses mais elevadas. Pode haver também características de apoptose e de necrose coexistindo em uma mesma célula. E por fim, células apoptóticas não fagocitadas podem vir a apresentar características necróticas devido à perda de energia celular e integridade da membrana plasmática, processo chamado de apoptose secundária (MAJNU; JORIS 1995).

Na literatura encontram-se estudos de toxicidade de outros praguicidas, utilizando-se do método da liberação de LDH. Os praguicidas bromoxynil e ioxynil, pertencentes ao grupo químico das nitrilas com modo de ação na inibição do fotossistema II da fotossíntese, na concentração de 100 mg/L, apresentaram um efeito citotóxico significativo às células HepG2 (LOVECKA et al., 2015), semelhantemente à trifluralina, e diferentemente do tebutiuron no presente estudo, herbicida que também possui modo de ação pela inibição do fotossistema II.

O ensaio de condensação / fragmentação nuclear com o corante Hoechst 33342, que permite analisar as características morfológicas das células, podendo evidenciar apoptose, também foi realizado e os resultados indicaram estatisticamente que o tebutiuron não causa apoptose nas concentrações até 100 $\mu\text{mol/L}$ nos tempos

de exposição testados. No entanto, os resultados confirmaram estatisticamente a citotoxicidade do herbicida trifluralina por apoptose na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ em 24 e 48h, corroborando com os demais testes de morte celular.

Vale lembrar que o ensaio de condensação / fragmentação nuclear foi apresentado apenas em 24 e 48h, diferentemente dos demais testes de morte celular, que apresentam análise também em 72 h de exposição. Tal fato ocorreu devido as células expostas por 72 h apresentarem uma morfologia muito destoante dos outros tempos de exposição, com características de alta deterioração, o que inviabilizou a contagem das células e análise dos resultados. É possível que isso seja em decorrência de morte celular por necrose observada no ensaio com anexina V e PI em 72h.

No ensaio Anexina V / PI, tanto na análise do tebutiurum quanto na análise da trifluralina, é possível observar que em 24 e 48 h de incubação a quantidade de células do Controle negativo que apresentam marcação positiva para o PI (Quadrante 1) é em torno de 3 à 4%. Em 72 h de incubação, essa quantidade é em torno de 5 à 7 %. Apesar de não ter sido realizada análise estatística comparando esses valores entre diferentes tempos de exposição, tais valores sugerem que mesmo células não expostas às substâncias teste, após 72 h de exposição, apresentam maior incidência de células necróticas (PI positivas) do que células incubadas por 24 ou 48 h, o que explica as características de deterioração em células expostas à 72 h no ensaio de condensação / fragmentação nuclear.

Para não interferir na concentração das substâncias testadas, as células incubadas por até 72 h não são submetidas à troca de meio de cultura, e, portanto, não é feita a reposição de nutrientes conforme estes vão sendo consumidos pelas células. Além disso, com a proliferação celular, que ocorre de forma exponencial, a confluência das células presentes nas placas aumenta, e consequentemente o espaço de crescimento das células diminui. Essa restrição de espaço e de nutrientes pode interferir nas células. No entanto, é importante ressaltar que essa condição não interferiu nos resultados com os demais ensaios em 72 h, uma vez que todos foram comparados com o Controle negativo. No ensaio de Anexina V / PI, por exemplo, no teste com o tebutiurum, células expostas à mais alta concentração testada não diferiu estatisticamente do controle negativo quanto à marcação de PI (respectivamente 6,78 % e 5,12 % de células PI+), já no teste com a trifluralina, células expostas à 100 $\mu\text{mol/L}$ apresentaram o dobro de células PI+ do que o controle negativo (respectivamente

14,99 % e 7,23 % de células PI+), apresentando diferença estatística e indicando indução de necrose pelo herbicida nessa concentração.

Por meio dos testes de triagem e dos testes mais específicos realizados, foi então demonstrada a ocorrência de morte celular por necrose, em 72h, e por apoptose, a partir de 24 h segundo o teste de condensação / fragmentação nuclear. Sabendo que a apoptose pode ser desencadeada pelas vias intrínseca e extrínseca, sendo a intrínseca desencadeada pela mitocôndria (GREEN; KROMER, 1998) e ainda que diferentes praguicidas podem induzir dano mitocondrial (GASSNER et al., 1997), realizamos a análise do potencial de membrana mitocondrial após exposição aos herbicidas tebutiuron e trifluralina. O tebutiuron, nas condições testadas, novamente não afetou o parâmetro analisado, enquanto que as células expostas à trifluralina nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{mol/L}$ (que correspondem à 16,76 e 33,52 mg/L) induziram diminuição do potencial de membrana mitocondrial nos três tempos de exposição.

Uma interferência no potencial de membrana mitocondrial pode estar associada à morte celular (GRIVICICH, 2007), e o presente trabalho aponta que o herbicida trifluralina provoca tanto uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial quanto morte celular por apoptose e necrose.

Tuschl e Schwab (2003) estudaram o efeito do ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), em HepG2. Este herbicida é pertencente ao grupo químico do ácido fenoxicarboxílico e tem como modo de ação herbicida a capacidade de mimetizar a auxina. No trabalho de Tuschl e Schwab, foi detectada apoptose no ensaio de ciclo celular e Anexina V, acompanhada de ruptura no potencial de membrana mitocondrial, efeito também evidenciado no presente trabalho, causado pela trifluralina. Os autores sugeriram que o 2,4 D exerce efeito citotóxico por indução de apoptose via efeito direto no potencial de membrana mitocondrial.

Ainda, Wang et al (2013), analisaram os efeitos do Irgarol, pertencente ao grupo das triazinas com modo de ação no fotossistema II, como o tebutiuron. Neste estudo, células HepG2 foram expostas à 0,04 - 40 mg/L de Irgarol 1051. Os resultados mostraram diminuição na viabilidade celular e resultado positivo para anexina V, sendo apontada morte celular por apoptose na concentração de 4 mg/L . O estudo de Wang et al (2013), também mostrou aumento de ERO e diminuição no potencial de membrana mitocondrial, e concluiu que o Irgarol induz apoptose em HepG2 por meio de estresse oxidativo e disfunção mitocondrial. Os resultados encontrados no

presente trabalho mostraram semelhantes efeitos causados pela trifluralina. Porém, em relação ao tebutiurum, herbicida semelhante ao Irgarol quanto ao modo de ação, os resultados deste trabalho mostram que, diferentemente do Irgarol nos estudos de Wang et al, o tebutiurum não interferiu na morte celular, ERO ou potencial de membrana mitocondrial. Tal fato reforça mais uma vez a importância de testes com diferentes herbicidas, já que até mesmo aqueles com o mesmo modo de ação herbicida, podem apresentar diferentes efeitos citotóxicos em outros organismos.

5.2 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um importante fator para o início da apoptose (AMENGUAL et al., 2011). Uma das principais fontes de radicais livres em nosso organismo, a qual em situações de desequilíbrio com o sistema antioxidante pode induzir ao estresse oxidativo é a mitocôndria. Além disso, o estresse oxidativo pode induzir danos à própria organela e assim levar por exemplo à diminuição do potencial de membrana mitocondrial (FARISS et al., 2005), como já observado na exposição das células HepG2 à trifluralina e também relatado por Wang et al (2013) para o Irgarol.

Assim no presente trabalho, o acúmulo de espécies reativas, por meio do uso da sonda CM-H₂DCFDA, nos permitiu observar que o tebutiurum não afetou significativamente as células quanto a produção dessas espécies em nenhuma das concentrações e tempos testados. Já a trifluralina, na concentração de 100 µmol/L, foi capaz de aumentar significativamente a quantidade de espécies reativas nas células após 24 e 48 h de exposição. Após 72h, no entanto, houve uma diminuição de espécies reativas, o que pode ter ocorrido devido menor número de células nesse tempo de exposição em decorrência de bloqueio no ciclo celular e / ou morte celular pronunciada, como observado nos testes realizados anteriormente.

No ensaio com SRB, células expostas à trifluralina por 72 h apresentaram redução do número de células de 49% em comparação ao controle negativo, mostrando uma acentuada diferença. Além disso, a ocorrência de necrose, além da apoptose, observada em 72 h, também pode ter influenciado no resultado de espécies reativas, uma vez que ocorre rompimento celular e rompimento das organelas na morte celular por necrose, impedindo a análise da molécula DCF (proveniente da sonda CM-H₂DCFDA) no interior das células.

Uma vez realizado o ensaio base para detecção de acúmulo de espécies reativas, realizou-se o qRT-PCR para análise do gene NQO1 e o Ensaio Repórter, ambos para avaliação dos efeitos dos herbicidas na expressão de genes de resposta ao estresse celular. Para realização desses ensaios, a análise de todas as concentrações de cada herbicida e em todos os tempos de exposição não foi viável, por isso algumas concentrações foram selecionadas com base nos ensaios anteriores. Além disso, o teste foi realizado apenas com o tempo de 24 h de exposição.

Espécies reativas são relacionadas a várias vias de sinalização celular, incluindo a via Keap1 / Nrf2-ARE (YIN et al., 2013). Uma vez que esta via é ativada, ocorre um aumento na transcrição de genes antioxidantes, tais como o NQO1. Os resultados com exposição de 24 horas mostraram que as células expostas tanto ao tebutiuron na concentração testada de 100 $\mu\text{mol/L}$, quanto à trifluralina nas concentrações testadas, de 5 a 100 $\mu\text{mol/L}$, apresentaram uma expressão de NQO1 estatisticamente semelhante ao controle negativo. Tal resultado indica que não há maior transcrição de NQO1 nas células expostas aos herbicidas.

Para confirmar este resultado, prosseguimos na análise da ativação da sequência ARE em HepG2 expostas a trifluralina e tebutiuron 10 e 100 $\mu\text{mol/L}$ pelo Ensaio Repórter. O tempo de exposição estudado foi de 24 h. Os dados e suas análises estatísticas mostraram que nenhum dos herbicidas, nas condições testadas, ativaram a sequência, dado que é consistente com os resultados de qRT-PCR, indicando que não houve ativação da via Keap1 / Nrf2-ARE.

No entanto, os ensaios de análise da ativação da via Keap1 / Nrf2-ARE não corroboram o ensaio base de análise de espécies reativas por meio da sonda CM-H₂DCFDA, uma vez que este último demonstrou maior produção de espécies reativas em células expostas à 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina. É possível que ocorra um aumento das espécies reativas sem que ocorra ativação da sequência ARE, e consequentemente sem que ocorra uma resposta antioxidante pela via Keap1 / Nrf2-ARE, que protegeria as células do estresse oxidativo. Essa ausência de resposta antioxidante, analisada no tempo de 24 h, pode ter levado as células expostas à 100 $\mu\text{mol/L}$ de trifluralina por 24 h à morte celular, como observado por meio ensaio de condensação / fragmentação nuclear.

Outra possibilidade é de que ocorra ativação da via Keap1 / Nrf2-ARE em tempos de exposição não analisados, como 48 ou 72 h. O ensaio de Anexina V / PI, por exemplo, detectou células Anexina positivas (A+) e PI positivas (PI+) apenas após

exposições de 48 e 72h. É possível, portanto, que em 24 h a célula ainda não tenha iniciado a resposta antioxidante por meio do aumento da transcrição de genes antioxidantes. Além disso, é possível ainda, que uma ativação da via Keap1 / Nrf2-ARE tenha ocorrido em um tempo inferior à 24h de exposição, e não pôde ser detectada em 24 h, e que a produção de espécies reativas tenha superado à defesa antioxidante, levando as células à morte celular em 24 h.

Existem ainda outros sistemas de defesa antioxidante além daqueles relacionados à via Keap1 / Nrf2-ARE. Um deles é a atividade *scavenger* de radicais livres, exercida, por exemplo, pelos antioxidantes não enzimáticos como a Glutathione reduzida (GSH). Pode também ocorrer um aumento na atividade de enzimas antioxidantes presentes na célula, sem que ocorra um aumento na transcrição de genes que originam essas enzimas. Um outro exemplo de defesa antioxidante é a ativação da sirtruína-1 (SIRT- 1), uma deacetilase de histona dependente de NAD⁺, que induz um aumento na atividade transcricional das proteínas *Forkhead Box* (FOXO3), as quais regulam a expressão de genes antioxidantes, como os da catalase (CAT) e SOD (SÉFORA-SOUSA; ANGELIS-PEREIRA, 2013). Portanto, apesar dos ensaios qPCR e Ensaio Repórter não terem evidenciado ativação da via antioxidante Keap1/Nrf2-ARE no presente estudo, é possível que outras vias de defesa atuem em resposta a um aumento de ERONs, observado em células expostas à 100 µmol/L de trifluralina.

Em relação à dados da literatura, estudos com o 2,4 D, mostraram que este herbicida pode induzir estresse oxidativo em hepatócitos (PALMEIRA et al., 1994). Os autores sugeriram que o 2,4 D pode reduzir os níveis de ATP, GSH, e NADH, e concomitantemente, aumentar os níveis de AMP, NAD, LDH e GSSG em hepatócitos de ratos. Segundo Palmeira, este herbicida, nas concentrações de 1 a 10 µmol/L, pode induzir morte celular pelo decréscimo da razão GSH / GSSG, e induzindo peroxidação lipídica.

O paraquate é um herbicida amplamente utilizado do grupo químico dos bipyridílios que possui modo de ação herbicida inibindo o fotossistema I da fotossíntese, e para o qual foi demonstrado por He et al (2012) que pode induzir estresse oxidativo e resposta fibrogênica no pulmão, e que o fator de transcrição Nrf2 está envolvido no controle da produção de ERONs nas células expostas ao paraquate, diferentemente do presente trabalho, que mostrou que nem a trifluralina nem o tebutiuron ativam a via desse fator de transcrição em 24 h, apesar de mostrar maior

ocorrência de espécies reativas em células expostas à 100 $\mu\text{mol/L}$ da trifluralina por 24 e 48h.

5.3 Genotoxicidade e mutagenicidade

As espécies reativas podem induzir danos ao DNA, provocando quebras de fita dupla e simples, modificações de bases e formação de ligações cruzadas de DNA. A célula pode responder a esses danos promovendo reparo, ativando um ponto de checagem no ciclo celular, alterando a transcrição de determinados genes, ou entrando em apoptose. Caso a célula não responda ao dano, poderá haver instabilidade genômica, podendo levar à carcinogênese (SANCAR et al., 2004).

No presente trabalho, em relação à genotoxicidade, os resultados do ensaio cometa, juntamente com a análise estatística, não indicou dano celular provocado por nenhum dos herbicidas testados, mesmo na mais alta concentração, de 100 $\mu\text{mol/L}$ (que corresponde à 22,83 mg/L para o tebutiuron e 33,52 mg/L para a trifluralina). A versão alcalina do teste, que foi utilizada em nosso trabalho, é capaz de detectar danos como quebras de fita simples, duplas e sítios álcali-lábeis (SINGH et al., 1988).

O teste do micronúcleo também não apontou diferença estatisticamente significativa da frequência dessas formações nas células expostas aos herbicidas trifluralina e tebutiuron nas condições testadas em relação ao controle negativo, o que indica ausência de mutagenicidade por quebra ou perda cromossômica.

Ainda em relação à mutagenicidade, o teste *Salmonella*/microsoma com as linhagens TA 98, TA100, TA97a e TA1535, que avalia ocorrência de mutações pontuais como deslocamento do quadro de leitura (frameshift) ou substituição de pares de bases, também não indicou lesão por exposição a nenhum dos herbicidas nas concentrações testadas. Apesar de ter sido observada diferença estatisticamente significativa em bactérias da linhagem TA1535 com ativação metabólica expostas à 5000 $\mu\text{g/placa}$ tanto do tebutiuron quanto da trifluralina, essa diferença não tem sentido biológico, uma vez que a potência mutagênica (explicada nos resultados) é muito baixa. Assim, os resultados foram considerados negativos.

Há poucos estudos na literatura que analisam os efeitos genotóxicos do tebutiuron em organismos não-alvo. Franco Bernardes et al. (2014) não encontraram diferenças na frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares no peixe *O. niloticus* expostas a tebutiuron. No entanto, esses autores mostraram que peixes

pequenos expostos a 125 mg / L de tebutiuron apresentaram danos evidenciados pelo teste do cometa, o que indica genotoxicidade do herbicida. Em um estudo envolvendo o herbicida atrazina e eritrócitos do peixe *Channa punctatus*, Nwani et al. (2011) demonstraram que animais expostos ao herbicida apresentaram maior frequência de micronúcleos e danos ao DNA no ensaio cometa. Estas descobertas apontam para a genotoxicidade do atrazina.

Em geral, estes estudos mostraram que herbicidas seletivos que atuam no fotossistema II da fotossíntese podem causar danos em organismos não-alvo, apesar de diferirem dos resultados do presente trabalho, que não evidenciou genotoxicidade e / ou mutagenicidade do tebutiuron.

A trifluralina age diretamente nos microtúbulos das plantas, promovendo dano celular que culmina na divisão celular descontrolada com consequentes alterações cromossômicas e células poliplóides, um fenômeno que tem sido bem caracterizado em cebola (*Allium cepa*) (FERNANDES et al., 2007; 2009). Fernandes e colaboradores (2007) apresentaram evidências de que o excesso de material genético de células poliplóides é eliminado do núcleo na forma de micronúcleos.

Publicações antigas citam que a trifluralina provoca efeitos adversos apenas em microtúbulos de plantas, e que este herbicida não afeta tubulinas de fungos ou de animais vertebrados (ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 1989; KONEN; ÇAVAS, 2008). Pilinskaia (1967) estudou a exposição de culturas de linfócitos humanos (*in vitro*) e células da medula óssea de rato (*in vivo*) à trifluralina (ingrediente ativo quimicamente puro e 25% de concentrado de emulsão) e aos seus oito metabolitos. Esse autor mostrou que trifluralina em si não induziu aberrações cromossômicas em modelos *in vitro* ou *in vivo*, mas alguns de seus derivados apresentaram atividade clastogênica moderada ou fraca.

Publicações posteriores demonstraram que a trifluralina pode afetar negativamente muitos outros organismos, e não apenas plantas, embora os resultados têm sido conflitantes (KONEN; ÇAVAS, 2008). Ribas et al. (1995) testaram a genotoxicidade dos herbicidas alachlor, atrazina, hidrazida maleica, paraquate e trifluralina em linfócitos do sangue periférico humano por meio do ensaio cometa. O comprimento da cauda do cometa de nucleóides que foram expostos aos herbicidas aumentou, indicando genotoxicidade desses herbicidas. Em outro trabalho, Ribas et al. (1996) avaliaram os efeitos da trifluralina em linfócitos de sangue humano periférico cultivados por meio dos testes de troca de cromátides irmãs, aberrações

cromossômicas, e micronúcleo. Os autores observaram que a trifluralina aumentou a frequência de trocas de cromátides irmãs, mas não mostrou efeitos genotóxicos nos testes de aberrações cromossômicas e micronúcleo. Gebel et al. (1997) relataram que o tratamento com trifluralina (99,5% de pureza) a 1400 mg / kg de peso corporal aumentou a frequência de micronúcleos em células de medula óssea de ratos fêmeas.

Estudos mais recentes realizados nos últimos 10 anos continuaram a avaliar a genotoxicidade da trifluralina. Konen e Çavas (2008) utilizaram o teste de micronúcleos para avaliar a genotoxicidade do herbicida trifluralina e de sua formulação comercial Treflan a 1, 5 e 10 µg / L nos peixes *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo). Ambos Treflan e trifluralina aumentaram significativamente a frequência de micronúcleo nos eritrócitos periféricos dos peixes.

No presente estudo, os resultados dos ensaios cometa e micronúcleo indicaram que a trifluralina, nas concentrações de 1 a 100 µmol/L, não apresentou potencial genotóxico e / ou mutagênico em HepG2.

Quanto as análises com *Salmonella typhimurium*, estudos anteriores testaram o potencial mutagênico da trifluralina nas linhagens TA98, TA100, TA1535, TA1537 e TA1538. As concentrações testadas do herbicida variaram de 25 a 400 µg / placa nas análises sem S9, e de 50-800 µg/placa nas análises com ativação metabólica. Estes ensaios mostraram resultados uniformemente negativos, sem mutações reversas observadas em qualquer uma das linhagens de *S. typhimurium* avaliadas (GARRIOT et al., 1991). No presente trabalho, foram analisadas concentrações de trifluralina variando de 0,01-1000 µg/placa em ambos os testes (sem e com ativação metabólica) nas linhagens de *S. typhimurium* TA98 e TA100. O presente estudo corrobora com os resultados de Garriot et al. (1991), indicando ausência de mutagenicidade analisada pelo teste de Ames.

Diferentemente do esperado, os resultados do presente trabalho mostraram que o tebutiuram e a trifluralina não possuem potencial genotóxico ou mutagênico, como revelado por testes de genotoxicidade e mutagenicidade realizados em células HepG2 e em linhagens de *S. typhimurium*.

Analisando conjuntamente os parâmetros de morte celular, estresse oxidativo e mutagenicidade, os resultados apontaram ausência de potencial citotóxico do tebutiuram, porém citotoxicidade causada pela trifluralina. As análises indicaram que esta toxicidade pode ser devido a indução de estresse oxidativo, que por sua vez pode

ter levado a parada do ciclo celular na fase S, e posteriormente à morte celular, apesar de não ter sido detectados nenhum efeito genotóxico ou mutagênico nas células.

Uma vez que ambos os herbicidas têm ampla aplicação na agricultura, os resultados aqui relatados adicionam informações importantes sobre o impacto desses herbicidas em organismos não-alvo.

6 CONCLUSÕES

Com base nos objetivos do trabalho, e nos resultados obtidos, o presente trabalho permitiu concluir que:

- O tebutiurum, nas condições testadas, não é citotóxico nem genotóxico ou mutagênico em testes com as células HepG2 e linhagens da bactéria *S. typhimurium*, o que mostra que esse herbicida tem alta seletividade para seu organismo alvo, não interferindo com a homeostasia das células HepG2 e não alterando o material genético de linhagens de *S. typhimurium*;
- A trifluralina, apesar de não apresentar genotoxicidade/mutagenicidade nos testes realizados dentro das condições testadas, e corroborados por dados da literatura, é um herbicida citotóxico para HepG2, induzindo bloqueio do ciclo celular na fase S, e morte celular por apoptose e necrose em algumas das condições testadas. Esta indução de morte celular pode estar relacionada à alteração no potencial de membrana mitocondrial e produção de espécies reativas, embora a trifluralina não provoque a ativação da via de resposta antioxidante Keap1/Nrf2-ARE segundo os parâmetros analisados. O potencial citotóxico da trifluralina indica que o herbicida não é altamente específico para o organismo alvo;
- A realização de testes para avaliar os efeitos de herbicidas em organismos não alvo é de extrema importância, uma vez que são substâncias amplamente utilizadas, e cada formulação pode agir de um modo diferente em cada concentração nos organismos testados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVEZ, E.A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (Orgs). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. V. 2. Rio de Janeiro. EPSJV; IOC, 2010.

ADAPTAR a. Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. COMBINE 500 SC. Bula de agrotóxico. Disponível em: http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/COMBINE_500_SC.pdf . Acesso em: 25 fev 2016.

ADAPTAR b. Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. TRIFLURALINA NORTOX GOLD. Bula de agrotóxico. Disponível em: http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Herbicidas/TRIFLURALINA_NORTOX_GOLD.pdf . Acesso em 25 fev 2016.

ADEN, D. P.; FOGEL, A.; PLOTKIN, S.; DAMJANOV, I.; KNOWLES, B. B. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. **Nature**, v.282, p. 615-616, 1979.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5ª ed. Artmed Editora, 2009.

ALMEIDA, E. A.; BAINY, A. C. D.; DAFRE, A. L.; GOMES, O. F.; MEDEIROS, M. H.; DI MASCIO, P. Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel *Perna perna* exposed to air and re-submersed. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 318, p. 21–30, 2005.

AMENGUAL, J.; LOBO, G.P.; GOLCZAK, M.; LI, H.N.; KLIMOVA, T.; HOPPEL, C.L.; WYSS, A.; PALCZEWSKI, K.; VON LINTIG, J. A mitochondrial enzyme degrades carotenoids and protects against oxidative stress. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 3, p. 948-959, 2011.

AMES, B. N.; WHITFIELD, H. J. Frameshift mutagenesis in Salmonella. In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 221-225, 1966.

AMES, B. N.; LEE, F. D.; DURSTON, W. E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 3, p. 782-786, 1973 a.

AMES, B. N.; DURSTON, W. E.; YAMASAKI, E.; LEE, F. D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 8, p. 2281-2285, 1973 b.

AMES, B.N.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/ mammalian-microsome mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 31, n. 6, p. 347-363, 1975.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), Relatório de Atividades de 2011 e 2012, Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013.

ADEN, D. P.; VOGEL, A.; PLOTKIN, S.; DAMJANOV, I.; KNOWLES, B. B. Controlled synthesis of HBs Ag in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line, **Nature**, 282: 615–616. 1979.

ANTHONY, R. G.; HUSSEY, P. J. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule 125ollusca125ton. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 3, p. 112-116, 1999.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p. 121-135, 1995.

ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694-699, 2010.

BARATA, C.; VARO, I.; NAVARRO, J. C.; ARUN, S.; PORTE, C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 2, p. 175-186, 2005.

BARR, D. B.; NEEDHAM, L. L. Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review. **Journal of Chromatography B**, v. 778, n. 1, p. 5-29, 2002.

BENITEZ, F. J.; REAL, F. J.; ACERO, J. L.; GARCIA, C. Photochemical oxidation processes for the elimination of phenyl-urea herbicides in waters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 138, n. 2, p. 278-287, 2006.

BENSON, D.A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J.; SAYERS, E.W. **GenBank. Nucleic Acids Res.** 41, D36–D42 (Database issue).2013.

BERTHIAUME, J. M.; WALLACE, K. B. Persistent alterations to the gene expression profile of the heart subsequent to chronic doxorubicin treatment. **Cardiovascular toxicology**, v. 7, n. 3, p. 178-191, 2007.

BIRT D.F., HENDRICH S., WANG W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 90, n. 2, p. 157-177, 2001

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 2, p. 231-239, 2005.

BRASIL. Lei nº 802, 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 12 de julho de 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm. Acesso em: 16 jul. 2015.

BRAYLAN, R. C.; BENSON, N. A.; NOURSE, V.; KRUTH, H. S. Correlated analysis of cellular DNA, membrane antigens and light scatter of human lymphoid cells. **Cytometry**, v. 2, n. 5, p. 337-343, 1982.

CARREL, A. On the permanent life of tissues outside of the organism. **The Journal of experimental medicine**, v. 15, n. 5, p. 516-528, 1912.

ÇAVAS, T. C.; KONEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, v. 22, n. 4, p. 263-268, 2007.

CERDEIRA, A. L.; DESOUSA, M. D.; QUEIROZ, S. C.; FERRACINI, V. L.; BOLONHEZI, D.; GOMES, M. A.; ROSA, M. A.; BALDERRAMA, O.; RAMPAZZO,

P.;QUEIROZ, R. H. C.; NETO, C. F.; MATALLO, M. B. Leaching and half-life of the herbicide tebuthiuron on a recharge area of Guarany aquifer in sugarcane fields in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 42, n. 6, p. 635-639, 2007.

CHANG, S. S.; STRITZKE, J. F. Sorption, movement, and dissipation of tebuthiuron in soils. **Weed Science**, p. 184-187, 1977.

COLLINS, A.R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principle, Applications and Limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, p.249-261, 2004.

CRISMAN, H. A.; STEINKAMP, J. A. Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. **The Journal of cell biology**, v. 59, n. 3, p. 766-771, 1973.

DAVID, J. A. O. **Estudo de Mytella 127ollusca (127ollusca, bivalvia) como indicadora de efeitos genotóxicos e citotóxicos no estuário de santos, SP.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências do campus de Rio Claro. 2007.

DEUBER, R. Botânica das plantas daninhas. In: Deuber, R.(Ed.), **Ciência das plantas daninhas**. FUNEP, Inc., Jaboticabal. p. 31–73. 1992.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; TALALAY, P. NAD (P) H: quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1), a multifunctional antioxidant enzyme and exceptionally versatile cytoprotector. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n. 1, p. 116-123, 2010.

EBERT, E.; LEIST, K. H.; HACK, R.; EHLING, G. Toxicology and hazard potential of trifluralin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 30, n. 12, p. 1031-1044, 1992.

ENZOLIFESCIENCES. Disponível em: <http://www.enzolifesciences.com/browse/cell-death-apoptosis-autophagy/apoptosis-detection-tools/>. Acesso em: 11/12/2015.

FARISS, M. W., CHAN, C. B., PATEL, M., VAN HOUTEN, B., ORRENIUS, S. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. **Mol. Interv.** v. 5, p. 94-111, 2005.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent –Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1680-1686, 2009.

FRANCO-BERNARDES, M. F.; MASCHIO, L. R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ALMEIDA, E. A. Biochemical and genotoxic effects of a commercial formulation of the herbicide tebuthiuron in *Oreochromis niloticus* of different sizes. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 9, n.1, p. 59-67, 2014.

FRANCO-BERNARDES, M. F.; PAZIN, M.; PEREIRA, L. C.; DORTA, D. J. **Impact of Pesticides on Environmental and Human Health In: Toxicology Studies - Cells, Drugs and Environment**.1 ed : InTech, p. 195-233, 2015.

FRANKEN, N. A. P.; RODERMOND, H. M.; STAP, J.; HAVEMAN, J.; BREE, C. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

FRESHNEY, R. I. **Animal Cell Culture: A Practical Approach**, Second Edition, Oxford University Press, New York. 1994.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, Fifth Edition, John Wiley & Sons, Inc. 2005.

FULDA, S.; GORMAN, A. M.; HORI, O.; SAMALI, A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. **International journal of cell biology**, v. 2010, 2010.

GARRIOTT, M. L.; ADAMS, E. R.; PROBST, G. S.; EMMERSON, J. L.; OBERLY, T. J.; KINDIG, D. E.; NEAL, S. B.; BEWSEY, J.; REXROAT, M. A. Genotoxicity studies on the preemergence herbicide trifluralin. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 260, n. 2, p. 187-193, 1991.

GASNIER, C.; DUMONT, C.; BENACHOUR, N.; CLAIR, E.; MARIE-CHRISTINE CHAGNON, M. C.; SERALINI, G.E. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. **Toxicology**, v. 262, n. 3, p. 184-191, 2009.

GASSNER, B.; WUTHRICH, A.; SCHOLTYSIK, G.; SOLIOZ, M. The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 281, n. 2, p. 855-860, Maio 1997.

GEBEL, T.; KEVEKORDES, S.; PAV, K.; EDENHARDER, R.; DUNKELBERG, H. In vivo genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test. **Archives of toxicology**, v. 71, n. 3, p. 193-197, 1997.

GEY, G.O.; BANG, F. B.; GEY, M. K. Responses of a variety of normal and malignant cells to continuous cultivation, and some practical applications of these responses to problems in the biology of disease. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 58, n. 7, p. 976-999, 1954.

GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. **Trends in cell biology**, v. 8, n. 7, p. 267-271, 1998.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canos: Ulbra, 2003. pp.173-200.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. Mutações gênicas. In: **Genética moderna**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose, **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GROVER, R.; WOLT, J. D.; CESSNA, A. J.; SCHIEFER, H. B. Environmental fate of trifluralin. In: **Reviews of environmental contamination and toxicology**. Springer New York, 1997. p. 1-64.

GUPTA, P. K. Toxicity of herbicides. In: GUPTA, R. C. (Ed) **Veterinary toxicology: Basic and clinic principles**. USA: Elsevier. 567-586. 2007.

HAIL JR, N.; CARTER, B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11, n. 6, p. 889-904, 2006.

HARRISON, R. G.; Greenman, M. J.; Mall, F. P.; Jackson, C. M. Observations of the living developing nerve fiber. **The Anatomical Record**, v. 1, n. 5, p. 116-128, 1907.

HARTNETT, S.; MUSAH, S.; DHANWADA, K.R. Cellular effects of metolachlor exposure on human liver (HepG2) cells. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 1258-1266, 2013.

HE, X.; WANG, L.; SZKLARZ, G.; BI, Y.; MA, Q. Resveratrol Inhibits Paraquat-Induced Oxidative Stress and Fibrogenic Response by Activating the Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 Pathway. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 342, n. 1, p. 81-90, 2012.

HESS, F. D. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**. v. 48, n. 2, p. 160-170, 2000.

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 277, n. 2, p. 91-138, 1992.

ISRAELS, L. G.; ISRAELS, E. D. Apoptosis. **The Oncologist**. 4:332-339. 1999.

IYER, V. N.; SZYBALSKI, W. Two simple methods for the detection of chemical mutagens. **Applied microbiology**, v. 6, n. 1, p. 23, 1958.

KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H.; THEOBALD, N. A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 498, n. 1, p. 67-77, 2001.

JARVIS, A. S.; HONEYCUTT, M. E.; MCFARLAND, V. A.; BULICH, A. A.; BOUNDS, H. C. A comparison of the Ames assay and Mutatox in assessing the mutagenic potential of contaminated dredged sediment. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 33, n. 2, p. 193-200. 1996.

KIECHLER, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, n. 1, p. 27-45, 2002.

KLING, P. G.; OLSSON, P. Involvement of differential metallothionein expression in free radical sensitivity of RTG-2 and CHSE-214 cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 11, p. 1628-1637, 2000.

KNASMULLER, S.; PARZEFALL, W.; SANYAL, R.; ECKER, S.; SCHWAB, C.; UHL, M.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; WILLIAMSON, G.; HIETSCH, G.; LANGER, T.; DARROUD, F.; NATARAJAN, A.T. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research**, v. 402, n. 1, p. 185-202, 1998.

KNASMULLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W.W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B. J. Use of human-derived

liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxics; current state of knowledge. **Toxicology**, v. 198, n. 1, p. 315-328, 2004.

KNOWLES, B. B.; HOWE, C. C.; ADEN, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen, **Science**, v. 209, n. 4455, p. 497-499, 1980.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAMA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gel electrophoresis. **MMS Comm**, v. 3, p. 103-115, 1995.

KONEN, S.; ÇAVAS, T. Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation treflan using the piscine micronucleus test. environmental and molecular mutagenesis. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 49, n. 6, p. 434-438, 2008.

KRUSE, N. D.; VIDAL, R. A.; BAUMAN, T. T.; TREZZI, M. M. Sinergismo potencial entre herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 569-575. 2001.

KROEMER, G.; REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. **Nature Medicine**, v. 6, n. 5, 2000.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 544, n. 1, p. 43-64, 2003.

LEISER, S. F.; MILLER, R. A. Nrf2 signaling, a mechanism for cellular stress resistance in long-lived mice. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 3, p. 871-884, 2010.

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, n. 8, p. 656-666, 2001.

LOEFFLER, M.; KREMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Experimental Cellular Research**, v. 256, n. 1, p. 19-26, 2000.

LOVECKA, P., THIMOVA, M., GRZNAROVA, P., LIPOV, J., KNEJZLIK, Z., STIBOROVA, H., RUMIL, T. Study of Cytotoxic Effects of Benzonitrile Pesticides. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 144, n. 3, p. 283-289, 2006.

MA, Q.; HE, X. Molecular basis of electrophilic and oxidative defense: promises and perils of Nrf2. **Pharmacological reviews**, v. 64, n. 4, p. 1055-1081, 2012.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American journal of pathology**, v. 146, n. 1, p. 3, 1995.

MALLING, H. V. Dimethylnitrosamine: formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 13, n. 4, p. 425-429, 1971.

MARON, D.; KATZENELLENBOGEN, J.; AMES, B. N. (1981). Compatibility of organic solvents with the Salmonella/microsome test. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 88, n. 4, p. 343-350. 1981.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, n. 3, p. 173-215, 1983.

MATES, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, n. 1, p. 83-104, 2000.

MATSUMOTO, S. T. **Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP**. 2004. 216 f. Tese (Doutorado em Genética), Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2004.

McCAFFREY, T.; AGARWAL, L.; WEKSLER, B. A rapid fluorimetric DNA assay for the measurement of cell density and proliferation in vitro. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 24, n. 3, p. 247-252, 1988.

MOCHIZUKI, T.; RUGE, Y.; ZHAO, S.; TSUKAMOTO, E.; HOSOKAWA, M.; STRAUSS, H. W.; BLANKENBERG, F. G.; TAIT, J.F.; TAMAKI, N. Detection of

apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with 99m Tcannexin V. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 44, n. 1, p. 92-97, 2003.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29-60, 2000.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

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.

NEGRISOLI, E.; VELINI, E. D.; TOFOLI, G. R.; CAVENAGHI, A. L.; MARTINS, D.; MORELLI, J. L. ; COSTA, A.G.F. Selectivity of pre-emergence herbicides to sugarcane treated with nematicides. **Planta Daninha**, v. 22, n. 4, p. 567-575, 2004.

NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. **Trends in biochemical sciences**, v. 22, n. 8, p. 299-306, 1997.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001

NORDGREN, K. S.; WALLACE, K. B. Keap1 redox-dependent regulation of doxorubicin-induced oxidative stress response in cardiac myoblasts. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 274, n. 1, p. 107-116, 2014.

NORRIS, R. F.; KOGAN, M. Ecology of interactions between weeds and arthropods. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 50, p. 479-503, 2005.

NORTOX S/A. Ficha de emergência. Bula de agrotóxico. Disponível em: http://www.nortox.com.br/files/produtos/ficha-emergencial/042559000000_23092015.pdf . Acesso em 25 fev 2016.

NWANI, C. D.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; KUMAR, P.; LAKRA, W. S. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel

electrophoresis. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 314-322, 2011.

O'BRIEN, N. M.; WOODS, J. A.; AHERNE, S. A.; O'CALLAGHAN, Y. C. Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, n. 2, p. 22-26, 2000.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development, (1997). **Guideline for the testing of chemicals**. Bacterial Reverse Mutation Test. July 471, 1997. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948418.pdf>

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiation Research**, v. 122, n. 1, p. 86-94, 1990.

OSTLING, O. e JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

OLIVEIRA JUNIOR, R.S. Seletividade de herbicidas para culturas e plantas daninhas. In: OLIVEIRA JUNIOR, R.S.;CONSTATIN, J. (Coord.). **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Agropecuária. 291-314. 2001.

PALMEIRA, C. M.; MORENO, A. J.; MADEIRA, V. M. C. Interactions of herbicides 2, 4-D and dinoseb with liver mitochondrial bioenergetics. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 127, n. 1, p. 50-57, 1994.

PEC, M. K.; AGUIRRE, A.; MOSER-THEIR, K.; FERNANDEZ, J. J.; SOUTO, M. L.; DORTA, J.; DIAZ-GONZALEZ, F.; VILLAR, J. Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothysiferol. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 9, p. 1451-1461, 2003.

PEREIRA, L. C.; SOUZA, A. O.; FRANCO-BERNARDES, M. F.; PAZIN, M.; TASSO, M. J.; PEREIRA, P. H.; DORTA, D. J. A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 18, p. 13800-13823, 2015.

PILINSKAIA, M. A. Evaluation of the cytogenetic effect of the herbicide treflan and of a number of its metabolites on mammalian somatic cells. **TSitologija i genetika**, v. 21, n. 2, p. 131-135, 1986.

POWELL, E. R.; FALDLADDIN, N.; APRIL, A. D.; PELZER, D.; SCHRUNK, D. E.; DHANWADA, K. R. Atrazine exposure leads to altered growth of HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 3, p. 644-651, 2011.

PROBST, G. W.; TOMASZ GOLAB, R. J.; HERBERG, F. J.; HOLZER, S. J.; PARKA, C. V. D. S.; TEPE, J. B. Fate of trifluralin in soils and plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 592-599, 1967.

PUBCHEM (Open Chemistry database). Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em 03 fev 2016.

RIBAS, G.; FRENZILLI, G., BARALE, R.; MARCOS, R. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 344, n. 1, p. 41-54, 1995.

RIBAS, G., SURRALLÉS, J., CARBONELL, E., XAMENA, N., CREUS, A. A.; MARCOS, R. Genotoxic evaluation of the herbicide trifluralin on human lymphocytes exposed in vitro. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 371, n. 1, p. 15-21, 1996.

RIBEIRO, L.R., MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K. (Orgs.). **Mutagênese ambiental**, Canoas: Ulbra, p. 21-28, 2003

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1360-1362, 2014.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de Herbicidas**, 5ª ed. Londrina: IAPAR, p.592. 2005.

ROSS, D.; KEPA, J. K.; WINSKI, S. L.; BEALL, H. D.; ANWAR, A.; SIEGEL, D. NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. **Chemico-biological interactions**, v. 129, n. 1, p. 77-97, 2000.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, The Agrochemicals Handbook, Cambridge: Dialog Information Services, File 306, 1989.

STEGEMAN, J.J; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental

contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGET, R.J. 1992.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste de micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Orgs.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 201-220. 2003.

SANCAR, A.; LINDSEY-BOLTZ, L. A.; ÜNSAL-KAÇMAZ, K.; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annual review of biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 39-85, 2004.

SÉFORA-SOUSA, M.; ANGELIS-PEREIRA, M. C. Mecanismos moleculares de ação anti-inflamatória e antioxidante de polifenóis de uvas e vinho tinto na aterosclerose. **Rev. bras. plantas med**, v.15, n.4, p. 617-626. 2013.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R. e SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SKEHAN, P. et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SONG, Y. M.; SONG, S. O.; JUNG, Y. K.; KANG, E. S.; CHA, B. S.; LEE, H. C.; LEE, B. W. Dimethyl sulfoxide reduces hepatocellular lipid accumulation through autophagy induction. **Autophagy**, v. 8, n.7, p.1085-1097. 2012.

SZYBALSKI, W. Special microbiological systems: 2. Observations on chemical mutagenesis in microorganisms. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 76, n. 3, p. 475-489, 1958.

TICE, R. The Single Cell/ Comet Assay: A Microgel Eletroforetic Technique for the Detection of DNA Damage and Repair in Individual Cell. In: PHILLIPS, D. H.; VENNIT, S.(Eds.). **Environmental Mutagenesis**. Bios Scientific Publishers Ltd. Oxford, UK. p. 315- 339. 1995

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, H. Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221. 2000.

THIAGARAJAN, P.; TAIT, J. F. Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets: evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 29, p. 17420-17423, 1990.

TUSCHL, H.; SCHWAB, C. Cytotoxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 385-393, 2003.

TYURINA, Y. Y.; KAWAI, K.; TYURIN, V. A.; LIU, S. X.; KAGAN, V. E.; FABISIAK, J. P. The plasma membrane is the site of selective phosphatidylserine oxidation during apoptosis: role of cytochrome C. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 6, n. 2, p. 209-225, 2004.

UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A.; Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. São Carlos: Rima, p.327-344. 2003.

URANI, C.; MELCHIORETTO, P.; FABBRI, M.; BOWE, G.; MASERATI, E.; GRIBALDO, L. Cadmium impairs p53 activity in HepG2 cells. **ISRN toxicology**, v. 2014, 2014.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029-1033, 2009.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

VAN GENDEREN, H. O.; KENIS, H.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; REUTELINGSPERGER, C. P. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 6, p. 953-963, 2008.

VARGAS, V.M.F.; MOTTA, V.E.P.; HENRIQUES, J.A.P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 319, n. 1, p. 31-45, 1993.

VAUGHN, K. C.; LEHNEN, L. P. Mitotic disrupter herbicides. **Weed Science**, v. 39, p. 450 – 467, 1991.

VERHOVEN, B.; SCHLEGEL, R. A.; WILLIAMSON, P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 5, p. 1597-1601, 1995.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B: colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112-1116, 2006.

VOMHOF-DEKREY, Emilie E.; PICKLO, Matthew J. The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 10, p. 1201-1206, 2012.

WALUM, E.; STENBERG, K. e JENSSEN, D. **Understanding Cell Toxicology**, Ellis Horwood, London. 1990.

WANG, C. J.; LIU, Z. Q. Foliar uptake of pesticides - Present status and future challenge. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, n. 1, p. 1-8, 2007.

WANG, L.; LIANG, B.; LI, L.; LIU, W. Induction of HepG2 cell apoptosis by Irgarol 1051 through mitochondrial dysfunction and oxidative stresses. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 6, p. 1771-1779, 2013.

WOLFS, J. L. N.; COMFURIUS, P.; RASMUSSEN, J. T.; KEUREN, J. F. W.; LINDHOUT, T.; ZWAAL, R. F. A.; BEVERS, E. M. Activated scramblase and inhibited aminophospholipid translocase cause phosphatidylserine exposure in a distinct platelet fraction. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 62, n. 13, p. 1514-1525, 2005.

WU, Y.; TIBREWAL, N.; BIRGE, R. B. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. **Trends in cell biology**, v. 16, n. 4, p. 189-197, 2006.

YAN, S.; SUBRAMANIAN, S. B.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y.; ZHANG, T. C. Emerging Contaminants of Environmental Concern: Source, Transport, Fate, and Treatment. **Practice periodical of hazardous, toxic, and radioactive waste management**, v. 14, n. 1, p. 2-20, 2009.

YIN, J.; REN, W.; WU, X.; YANG, G.; WANG, J.; LI, T.; DING, J.; CAI, L.; SU, D. Oxidative stress-mediated signaling pathways: A review. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 11, n. 2, p. 132-9, 2013.

ZACHARIA, J. T.; KISHIMBA, M. A.; MASAHICO, H. Biota uptake of pesticides by selected plant species; the case study of Kilombero sugarcane plantations in Morogoro Region, Tanzania. **Pesticide Biochemistry and Physiology, Pesticide biochemistry and physiology**, v. 97, n. 1, p. 71-75, 2010.

ZEIGER, E.; RISKO, K. J.; MARGOLIN, B. H. Strategies to reduce the cost of mutagenicity screening with the Salmonella assay. **Environmental mutagenesis**, v. 7, n. 6, p. 901-911, 1985.

ZONG, W.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes & development**, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2006.