

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALESSANDRA GUIMARÃES VIEIRA

ESTUDO DO EFEITO ADIPOGÊNICO DOS AGROTÓXICOS BITERTANOL E ÓXIDO
DE FEMBUTATINA EM CULTURA DE CÉLULAS

BRASÍLIA
2022

ALESSANDRA GUIMARÃES VIEIRA

ESTUDO DO EFEITO ADIPOGÊNICO DOS AGROTÓXICOS BITERTANOL E ÓXIDO
DE FEMBUTATINA EM CULTURA DE CÉLULAS

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Faculdade
de Ciências da Saúde, Universidade de
Brasília, como requisito parcial à
obtenção do título de mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Prof. Dr. Francisco de
Assis Rocha Neves

Coorientador (a): Profa. Dra. Flora
Aparecida Milton

Brasília
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

(Obs.: esta catalogação é fornecida pela BCE/UnB – deve ser colocada exatamente como fornecida pelo bibliotecário)

Ficha catalográfica

Alessandra Guimarães Vieira

ESTUDO DO EFEITO ADIPOGÊNICO DOS AGROTÓXICOS BITERTANOL E ÓXIDO DE FEMBUTATINA EM CULTURA DE CÉLULAS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ____ de _____ de 2022.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Hudson Fernando Nunes Moura – Universidade de Brasília

Prof. Dr. José Roberto Pimenta de Godoy – Universidade de Brasília

Dr (a). Mariella Guimarães Lacerda – Ministério da Saúde

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves, pela oportunidade de trabalhar com você, pela orientação prestada e por todo conhecimento transmitido. Aqui lhe exprimo a minha gratidão.

À minha coorientadora Profa. Dra. Flora Aparecida Milton, obrigada por sua dedicação, que a fez, por muitas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar e me orientar. E principalmente, obrigada por ter depositado sua confiança em mim ao logo desses anos de trabalho, nada disso seria possível sem sua orientação.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Hudson Fernando Nunes Moura, Prof. Dr. José Roberto Pimenta de Godoy e Dra. Mariella Guimarães Lacerda, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

À minha mãe, Maria José, que fez inúmeros sacrifícios para que eu pudesse estar aqui. Agradeço o apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Por acreditar em mim e não medir esforços para a concretização dos meus sonhos.

Ao meu marido, Pedro Neto, pelo amor, companheirismo e apoio incondicional. Agradeço a enorme compreensão e encorajamento naqueles momentos cruciais desta jornada, contribuindo para chegar ao fim deste percurso.

E claro, à minha filha Júlia Moreira e irmã Maria Luiza, que amo incondicionalmente, espero compensá-las das horas de atenção que devo.

Às minhas amigas Kathlen Rodrigues e Aline Silva, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos. Sou grata por tudo.

Aos professores e técnicos do Laboratório de Farmacologia Molecular (Farmol), pelos ensinamentos e contribuições ao longo da minha formação, muito obrigada.

A todos os colegas do Farmol. Conviver com vocês ao longo desses anos foi sensacional. Agradeço por todos os momentos que passamos juntos.

RESUMO

GUIMARÃES-VIEIRA, Alessandra. Estudo do efeito adipogênico dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina em cultura de células. Brasília, 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2022.

O Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos. Muitos dos danos à saúde relacionados à exposição a essas substâncias ainda estão sob investigação. Trabalhos recentes evidenciam que alguns desses compostos podem atuar como obesogênicos ambientais, que são substâncias capazes de desregular o sistema endócrino, promover adipogênese e contribuir para o desenvolvimento da obesidade. Estudos preliminares e não publicados do grupo de pesquisa do qual faço parte, mostraram que os agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina promoveram acúmulo lipídico em pré-adipócitos 3T3-L1, sendo que o óxido de fembutatina ativou o PPAR γ . Considerando o uso intensivo de agrotóxicos no Brasil e os poucos estudos relacionados ao seu efeito desregulador endócrino, o presente estudo objetivou investigar outros mecanismos que podem estar relacionados ao efeito adipogênico promovido por essas substâncias, bem como avaliar seus possíveis efeitos sobre outros receptores nucleares. Para avaliar o efeito dos agrotóxicos sobre a atividade transcricional dos receptores nucleares GR α , PPAR α , PPAR β/δ , TR α , TR β e PXR, foi realizado o ensaio de transfecção e gene repórter da luciferase. Para tanto, células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo o DNA complementar do receptor nuclear e com os plasmídeos contendo seus respectivos elementos responsivos fusionados ao gene repórter da luciferase e tratadas por 24 horas com DMSO, com agonistas conhecidos dos receptores em estudo ou com concentrações crescentes dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina. Esse ensaio também foi realizado para avaliar se a cisteína 285, localizada no LBD do PPAR γ , é importante para a ativação desse receptor pelo óxido de fembutatina. Considerando que tanto o bitertanol quanto o óxido de fembutatina induziram acúmulo lipídico em células 3T3-L1, foi avaliado se esse efeito era dependente de PPAR γ . Para tanto, células 3T3-L1 foram tratadas durante 15 dias, na presença ou ausência do antagonista de PPAR γ T0070907, com veículo (DMSO), rosiglitazona ou concentrações dos agrotóxicos que promoveram acúmulo lipídico. No ensaio de transfecção e gene repórter, tanto o bitertanol quanto o óxido de fembutatina não apresentaram atividade agonista sobre os receptores avaliados. No ensaio utilizando o PPAR γ com a mutação C285S, observou-se que a substituição da cisteína pela serina, aboliu a atividade transcricional, sugerindo que esse aminoácido é essencial para o efeito agonista do óxido de fembutatina sobre o PPAR γ . No

ensaio de diferenciação, a presença do antagonista T0070907, reduziu de forma significativa o acúmulo lipídico induzido por ambos os agrotóxicos, indicando que esse efeito ocorre via PPAR γ . Os resultados desse trabalho podem contribuir para a melhor compreensão dos impactos que os agrotóxicos podem causar na saúde humana e de outros animais. Adicionalmente, podem fundamentar decisões governamentais relativas ao emprego desses compostos, bem como incentivar a busca por ativos eficientes, sem ou com menores impactos negativos. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor elucidar seus mecanismos de ação.

Palavras-chave: Agrotóxico, desregulador endócrino, adipogênese.

ABSTRACT

GUIMARÃES-VIEIRA, Alessandra. Study the adipogenic effects of the pesticides bitertanol and fembutatin oxide in cell culture. Brasília, 2021. Dissertation (Master in Pharmaceutical Sciences) - Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Brasília, 2022.

Brazil is one of the world's largest consumers of pesticides. Many health hazards related to exposure to these substances are still under investigation. Recent studies show that some of these compounds can act as environmental obesogens, which are substances capable of disrupting the endocrine system, promoting adipogenesis, and contributing to the development of obesity. Preliminary and unpublished studies by the research group I belong to showed that pesticides bitertanol and fembutatin oxide promoted lipid accumulation in 3T3-L1 preadipocytes and that fembutatin oxide activated PPAR γ . Considering the intensive use of pesticides in Brazil and the few studies related to their endocrine disrupting effects, the present study aimed to investigate other mechanisms associated with their adipogenic effects and evaluate their effects on other nuclear receptors. To evaluate the effect of pesticides on the transcriptional activity of the GR α , PPAR α , PPAR β/δ , TR α , TR β , and PXR nuclear receptors, was performed a transfection and luciferase reporter assay. HeLa cells were co-transfected with plasmids containing the complementary DNA of the nuclear receptor and the plasmids containing their respective responsive elements fused to the luciferase gene reporter and treated for 24 hours with DMSO, known agonists of the nuclear receptors in study or increasing concentrations of the pesticides bitertanol and fembutatin oxide. This assay was also performed to observe if cysteine 285, located in the LBD of PPAR γ , is essential for activating this receptor by fembutatin oxide. Since both bitertanol and fembutatina oxide induced lipid accumulation in 3T3-L1 cells, it was evaluated whether this effect was PPAR γ dependent. Therefore, 3T3-L1 cells were treated for 15 days, in the presence or absence of the antagonist the PPAR γ T0070907, with vehicle (DMSO), rosiglitazone, or concentrations of the pesticides that promoted lipid accumulation. In the transfection and gene reporter assay, bitertanol and fembutatin oxide did not show agonist activity on the evaluated receptors. In the assay using PPAR γ with the C285S mutation, it was observed that the substitution of cysteine for serine abolished transcriptional activity, suggesting that this amino acid is essential for the agonistic effect of fenbutatin oxide on PPAR γ . In the differentiation assay, the presence of the antagonist, T0070907, significantly reduced the lipid accumulation induced by both pesticides indicating that this effect occurs via PPAR γ . The results of this research contribute to a better understanding of pesticides' impacts on human and other animal health. Additionally, they can

support government decisions regarding these compounds' use and encourage the search for efficient assets with less negative impacts. However, further studies are needed to elucidate their mechanisms of action better.

Keywords: Pesticides; endocrine disruptors; adipogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de Classificação Toxicológica dos Agrotóxicos.....	20
Figura 2. Fórmula Estrutural do Bitertanol.....	22
Figura 3. Fórmula Estrutural do Óxido de Fembutatina.....	23
Figura 4. Estrutura geral dos receptores..	24
Figura 5. Classificação dos receptores nucleares..	26
Figura 6. Estrutura tridimensional do ligante endógeno ligado ao LBD do PPAR γ	30
Figura 7. Esquema do ensaio de diferenciação de adipócitos..	38
Figura 8. Efeito dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina sobre a atividade transcricional do GR α	40
Figura 9. Efeito dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina sobre a atividade transcricional do PPAR α	441
Figura 10. Efeito dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina sobre a atividade transcricional do PPAR β/δ	42
Figura 11. Efeito dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina sobre a atividade transcricional do TR α	42
Figura 12. Efeito dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina sobre a atividade transcricional do TR β	43
Figura 13. Efeito dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina sobre a atividade transcricional do PXR.....	44
Figura 14. Avaliação do efeito do agrotóxico óxido de fembutatina sobre o PPAR γ com a mutação C285S.....	45
Figura 15. Diferenciação das células 3T3-L1 na presença do antagonista de PPAR γ , T0070907..	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABESO	Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica
ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPA	Bisfenol A
BPS	Bisfenol S
CAR	Receptor androstano constitutivo
CCAAT	Proteínas ligantes ao amplificador
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019 (<i>Coronavirus disease 2019</i>)
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DBT	Dibutilestano
DDE	Diclorodifenildicloroetileno
DE	Desregulador endócrino
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ER	Receptor de estrógeno
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
GHS	Sistema de Classificação Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (<i>Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals</i>)
GRE	Elementos de resposta aos glicocorticoides
GR	Receptor de glicocorticoide
GRα	Receptor de glicocorticoide alfa
GRβ	Receptor de glicocorticoide beta
HepG2	Células de hepatocarcinoma humano
HNF4	Fator nuclear hepatocitário 4
hPXR	Receptor pregnano X humano
HSP	Proteínas do choque térmico
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

LBD	Domínio de ligação ao ligante
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salina (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PPAR	Receptores Ativados por Proliferados Peroxissomais
PPARα	Receptor ativado por proliferadores peroxissomais alfa
PPARβ/δ	Receptor ativado por proliferadores peroxissomais beta/delta
PPARγ	Receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama
PR	Receptor de progesterona
PVC	Policloreto de polivinila
PXR	Receptor pregnano X
RN	Receptores nucleares
ROR	Receptor órfão relacionado ao retinóide
RXRα	Receptor de retinóide X alfa
SARS-CoV2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>)
SF1	Fator esteroidogênico 1
SFB	Soro fetal bovino
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNB	Soro neonatal bovino
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
TBT	Tributilestanho
TR	Receptor tireoidiano
TRα	Receptor tireoidiano alfa
TRβ	Receptor tireoidiano beta
UE	União Europeia
VDR	Receptor de vitamina D

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	17
2.2 OBESÔGENICOS AMBIENTAIS	17
2.3 AGROTÓXICOS.....	18
2.4 BITERTANOL.....	22
2.5 ÓXIDO DE FEMBUTATINA.....	23
2.6 RECEPTORES NUCLEARES.....	23
2.7 CLASSIFICAÇÃO DOS RECEPTORES NUCLEARES.....	25
2.8 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAI (PPARS).....	27
2.9 PPAR α	27
2.10 PPAR β/δ	28
2.11 PPAR γ	29
2.12. RECEPTOR TIREOIDIANO (TR).....	30
2.12 RECEPTOR DE GLICOCORTICÓIDE (GR).....	31
2.13 RECEPTOR DE PREGNANOS X (PXR).....	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 GERAL	33
3.2 ESPECÍFICOS.....	33
4 METODOLOGIA.....	34
4.1 REAGENTES E MATERIAIS	34
4.2 ESCOLHA DOS AGROTÓXICOS	35
4.3 PREPARO DOS AGROTÓXICOS.....	35
4.4 CULTURA DE CÉLULAS	35
4.5 ENSAIO DE TRANSFECCÃO E GENE REPÓRTER	36
4.6 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DE ADIPÓCITOS COM ANTAGONISTA	37
4.7 COLORAÇÃO COM ÓLEO VERMELHO O.....	39
5 RESULTADOS.....	39
5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS AGROTÓXICOS SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DOS RECEPTORES NUCLEARES GR α , PPAR α , PPAR β/δ , TR α , TR β E PXR.....	39
5.1.1 GR α	39
5.1.2 PPAR α	40

5.1.3	PPAR β/δ	41
5.1.4	TR α	42
5.1.5	TR β	43
5.1.6	PXR.....	43
5.2	AValiação DO EFEITO DO AGROTÓXICO ÓXIDO DE FEMBUTATINA SOBRE O PPAR γ COM A MUTAÇÃO C285S.....	44
5.3	DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS 3T3-L1 NA PRESENÇA DO ANTAGONISTA DE PPAR γ , T00700907	45
6	DISCUSSÃO.....	47
7	CONCLUSÃO.....	50
	REFEÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, têm-se observado um aumento no interesse científico por um grupo de substâncias químicas presentes no meio ambiente, capazes de interferir no sistema endócrino de humanos e outros animais. Essas substâncias são denominadas desreguladores endócrinos (DEs) (1).

Os DEs são definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como substâncias químicas exógenas ou mistura de substâncias químicas presentes no ambiente, que são capazes de interferir no sistema endócrino e causar efeitos adversos à saúde de um organismo, sua descendência ou subpopulação (2). Segundo a União Europeia (UE), os desreguladores endócrinos podem agir diretamente em um órgão endócrino, alterando sua função, pode interagir com receptores hormonais ou ainda, alterar o metabolismo de um determinado hormônio (3).

Os DEs constituem um problema global e a exposição a eles pode ocorrer de diversas formas, seja pelo consumo de alimentos e água, por inalação e transferência placentária. Alguns exemplos de produtos que podem conter substâncias com efeito desregulador endócrino são os agrotóxicos, produtos de higiene pessoal como shampoos e condicionadores, recipientes plásticos e bicos de mamadeira. Esses artigos possuem em sua composição, além de substâncias com ação desreguladora endócrina conhecidas como os ftalatos, bisfenol A, fenol, chumbo, dezenas de outras com efeitos ainda não investigados (4).

Estudos comprovam a ligação entre a exposição aos desreguladores endócrinos e a manifestações de doenças como a obesidade, diabetes e até mesmo câncer (5).

O Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos. Muitos são os danos à saúde relacionados à exposição a essas substâncias. A exposição aguda pode causar problemas com irritação dos olhos e da pele, cefaleia, tontura e náuseas, enquanto a exposição crônica está relacionada a doenças como asma, diabetes e câncer (6).

Estudos recentes evidenciam que alguns agrotóxicos podem atuar como desreguladores endócrinos com efeito obesogênico. Substâncias com essa propriedade foram denominadas, em 2006, pelos pesquisadores Blumberg e Grun, como obesogênicos ambientais e definidos como produtos químicos, naturais ou sintéticos, que promovem a obesidade, seja aumentando o número de adipócitos ou o armazenamento de gordura em células já existentes (7,8).

A obesidade é uma doença com etiologia multifatorial (9), que pode ser definida como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, que apresenta risco para a saúde (10). A obesidade é considerada um grande problema de saúde pública, pois é um importante fator de risco para o desenvolvimento de uma série de outras doenças como o diabetes tipo 2, doenças

cardiovasculares e osteoarticulares (11). Estudos recentes mostraram ainda, que ela é um fator de risco para complicações relacionadas à infecção pelo SARS-CoV2, agente etiológico da COVID-19 (*coronavirus disease 2019*), uma das principais preocupações globais da atualidade. Esses estudos evidenciaram que pacientes obesos apresentam maior risco de necessitar de hospitalização e apresentar como desfecho clínico, o óbito (12).

Segundo os dados mais recentes divulgados pela Federação Mundial de Obesidade, em 2020, mais de 2 bilhões de adultos estavam com sobrepeso, dos quais 650 milhões eram considerados obesos (13). De acordo com a Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica (ABESO), em 2019 a obesidade acometia 19,8% da população brasileira (14).

Um dos mecanismos conhecidos de acúmulo lipídico induzido pelos DEs é a ativação do receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama (PPAR γ) (15). O PPAR γ é membro da superfamília de receptores nucleares (16,17), sendo predominantemente expresso no tecido adiposo e considerado um regulador chave da adipogênese (18,19). Uma vez ativado por um ligante, ele forma um heterodímero com outro receptor nuclear, o receptor retinóide X alfa (RXR α) e se liga a sequências específicas do DNA presentes na região promotora dos seus genes alvo, regulando a sua expressão (20–22).

Entre os desreguladores endócrinos identificados até o momento que ativam o PPAR γ , estão o tributilestanho (TBT) e o dibutilestanho (DBT), utilizados como estabilizadores na fabricação do policloreto de polivinila (PVC) (23,24), os ftalatos, adicionados aos plásticos para conferir maleabilidade (25) e os análogos halogenados do bisfenol A, utilizados na fabricação de plásticos como os de mamadeira e revestimentos para latas de alimentos (26).

Resultados prévios do grupo de pesquisa do qual faço parte, mostraram que alguns agrotóxicos, incluindo o bitertanol e o óxido de fembutatina, são capazes de induzir acúmulo lipídico em células 3T3-L1 e que o óxido de fembutatina é agonista parcial do PPAR γ .

Considerando esses resultados, o presente estudo teve como objetivo investigar outros mecanismos que possam estar envolvidos no efeito adipogênico dessas substâncias, bem como avaliar seus possíveis efeitos sobre outros receptores nucleares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Estudos evidenciam que substâncias presentes no meio ambiente podem interferir no sistema endócrino de seres humanos e outros animais, afetando diretamente a saúde, crescimento e a reprodução (27,28). Elas foram denominadas pela OMS em 2002 como desreguladores endócrinos (DEs) e definidas como substâncias naturais ou sintéticas, que alteram a função do sistema endócrino e causam efeitos adversos à saúde de um organismo e também de seus descendentes (2).

Um dos mecanismos mais bem estudados de atuação dos desreguladores endócrinos é a ligação aos receptores nucleares. Devido à semelhança entre a estrutura química desses compostos e a dos hormônios naturais, eles podem interferir em diferentes processos fisiológicos, alterando a função celular e desencadeando respostas adversas (28–31).

Compostos naturais ou sintéticos podem atuar como DEs. Estrogênios naturais, genisteína, estrona e estriol são exemplos de substâncias naturais capazes de desregular o sistema endócrino. Como exemplos de compostos sintéticos, podem ser citados os utilizados na fabricação de plásticos, como o bisfenol A (BPA) e os ftalatos, chumbo, cádmio e produtos utilizados na fabricação de produtos como tinta para cabelos, protetor solar e produtos de limpeza. Estudos recentes apontam, que compostos utilizados na agricultura, como os agrotóxicos atrazina, clozolinato, iprodiona e vinclozolina, também possuem capacidade de desregular o sistema endócrino (28–30,32).

A exposição de humanos e outros animais aos DEs pode ocorrer por diversas formas, seja pelo contato direto ou de forma indireta, através da ingestão de alimentos ou água contaminados, contato com produtos industriais como embalagens plásticas ou produtos de beleza e higiene pessoal como esmalte, shampoo, protetor solar ou ainda por transferência da mãe para a prole, por via placentária ou amamentação (33).

A exposição aos desreguladores endócrinos pode provocar malefícios à saúde como câncer e obesidade (4,34,35).

2.2 OBESÔGENICOS AMBIENTAIS

Obesogênicos ambientais são moléculas (naturais, farmacêuticas ou xenobióticas) que regulam negativamente o metabolismo lipídico, promovendo adipogênese e obesidade, seja provocando aumento no número de adipócitos ou no armazenamento de gordura em células já existentes (8,36).

A OMS define obesidade como acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, que apresenta risco à saúde (11). Segundo dados da OMS, em 2019, mais de 1,9 bilhões de adultos estavam com sobrepeso e 650 milhões obesos, correspondendo a 13% da população mundial. No mesmo período, 61,7% dos brasileiros estavam com sobrepeso e 26,8% eram obesos (11,37).

Estudos têm mostrado que além dos fatores já conhecidos como dieta, sedentarismo e genética, os obesogênicos ambientais podem estar envolvidos no desenvolvimento da obesidade. A partir do estudo de Paula Baillie-Hamilton (2002), relacionando o aumento da produção de químicos orgânicos e a porcentagem de adultos com sobrepeso nos Estados Unidos de 1930 a 1990, vários estudos têm sido realizados, tanto em animais quanto em humanos (38).

Há alguns trabalhos mostrando os efeitos dos DEs sobre a adipogênese. O estudo conduzido por Masuno e colaboradores (2005), mostrou que o BPA acelerou a conversão de fibroblastos 3T3-L1 em adipócitos. Corroborando com esses achados, Alonso e colaboradores (2010) relataram que camundongos fêmeas tratados com BPA durante a gestação, apresentaram diminuição da tolerância à glicose, além de aumento nas concentrações séricas de insulina, leptina e triglicerídeos (39,40).

Estudos recentes têm mostrado que agrotóxicos também podem atuar como obesogênicos ambientais. Entretanto, os mecanismos de ação desses compostos ainda não estão bem elucidados.

Resultados ainda não publicados do grupo de pesquisa do qual faço parte, mostraram que os agrotóxicos abamectina, ametrina, bitertanol, carbosulfano e óxido de fembutatina, induziram acúmulo lipídico em células 3T3-L1. Além disso, o carbosulfano e o óxido de fembutatina promoveram aumento da atividade transcricional do PPAR γ em ensaios de transfecção e gene repórter, sugerindo que essas substâncias podem atuar como obesogênicos ambientais (41–43).

2.3 AGROTÓXICOS

De acordo com a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso em setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas nativas ou implantadas, como também ecossistemas, 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 (44).

A adoção dos termos agrotóxicos, pesticidas, biocidas, defensivos agrícolas e produtos fitossanitários têm sido causa de discussões frequentes há anos. Contudo, de acordo com o Decreto nº 6.913, de 23 de julho de 2009, o termo produto fitossanitário se refere aos agrotóxicos ou afins, contendo exclusivamente substâncias permitidas, em regulamento próprio, para uso na agricultura orgânica, de modo que para os demais produtos, a denominação oficial continua sendo agrotóxico (45).

O uso dos agrotóxicos se intensificou com a Revolução Verde, modelo agrícola baseado no uso intensivo de agrotóxicos e fertilizantes sintéticos com a finalidade de controlar doenças e aumentar a produtividade. Essa revolução teve início nos Estados Unidos e na Europa, na década de 50 e chegou a países em desenvolvimento como o Brasil entre 1960 e 1970 (46). Em decorrência desse processo, atualmente, nosso país é um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos (47).

Atualmente, no Brasil, o registro de um agrotóxico depende da avaliação de três órgãos do governo federal, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (45). Cada órgão é responsável por um tipo de avaliação dos pleitos de registros. A classificação toxicológica é realizada pela ANVISA, o MAPA é responsável pela avaliação da eficácia agrônômica e a periculosidade ambiental é de responsabilidade do IBAMA (48).

No *site* do MAPA, há 2.854 agrotóxicos registrados, sendo que somente no ano de 2021, houve 364 novos registros (49). De acordo com dados do IBAMA divulgados em 2020, o Brasil comprou 685.745,68 toneladas de ingredientes ativos, um aumento de 10,51% em relação ao ano anterior (50). De acordo com dados divulgados pela Campanha Permanente Contra os Agrotóxicos e Pela Vida em parceria com a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (Abrasco) divulgados em 2016, cada brasileiro tem ingerido cerca de 7,6 litros de agrotóxico ao ano (51).

A Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, de Agrotóxicos e Afins, estabelece que no Brasil é proibido o registro de agrotóxico para os quais não exista antídoto ou tratamento eficaz no país ou que possua características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas (44). Contudo, ao menos 37 agrotóxicos registrados no Brasil são proibidos na União Europeia e nos Estados Unidos devido à toxicidade. Entre esses compostos estão a atrazina, proibida na União Europeia pela associação com a doença de Parkinson e câncer e o glifosato, classificado pela OMS como potencialmente carcinogênico (52).

Os agrotóxicos podem ser classificados, de acordo com suas propriedades biológicas em fungicidas, herbicidas, inseticidas, nematocidas, moluscidas, rodenticidas, formicidas,

acaricidas e reguladores e inibidores de crescimento. Segundo o último relatório do IBAMA, em 2020, foram comercializadas 685.745,68 toneladas de produtos formulados no Brasil, sendo que os herbicidas representavam 60% desse total, os fungicidas 15% e os inseticidas 11% (50).

Em 2019, a Anvisa realizou a reclassificação toxicológica dos agrotóxicos autorizados no país e o Brasil passou a adotar os padrões do Sistema de Classificação Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – GHS*), já adotado pelos países da União Europeia, Estados Unidos e da Ásia (53).

O GHS ampliou de quatro para cinco as categorias da classificação toxicológica dos agrotóxicos, além de incluir o item “não classificado”, válido para produtos considerados de baixíssimo potencial de dano (Figura 1).

A classificação dos agrotóxicos é identificada nos rótulos por meio de faixas coloridas. A categoria 1, produtos extremamente tóxicos e a categoria 2, produtos altamente tóxicos recebem faixa vermelha, a categoria 3, produtos moderadamente tóxicos recebem faixa amarela, a categoria 4, produtos pouco tóxicos recebem faixa azul, categoria 5, produtos improváveis de causar dano agudo recebem faixa azul, e os produtos não classificados recebem faixa verde (53).

	CATEGORIA 1	CATEGORIA 2	CATEGORIA 3	CATEGORIA 4	CATEGORIA 5	NÃO CLASSIFICADO
	EXTREMAMENTE TÓXICO	ALTAMENTE TÓXICO	MODERAMENTE TÓXICO	POUCO TÓXICO	IMPROVÁVEL DE CAUSAR DANO AGUDO	NÃO CLASSIFICADO
PICTOGRAMA					Sem símbolo	Sem símbolo
PALAVRA DE ADVERTÊNCIA	PERIGO	PERIGO	PERIGO	CUIDADO	CUIDADO	Sem advertência
CLASSE DE PERIGO						
Oral	Fatal se ingerido	Fatal se ingerido	Tóxico se ingerido	Nocivo se ingerido	Pode ser perigoso se ingerido	-
Dérmica	Fatal em contato com a pele	Fatal em contato com a pele	Tóxico em contato com a pele	Nocivo em contato com a pele	Pode ser perigoso em contato com a pele	-
Inalatória	Fatal se inalado	Fatal se inalado	Tóxico se inalado	Nocivo se inalado	Pode ser perigoso se inalado	-
COR DA FAIXA	Vermelho	Vermelho	Amarelo	Azul	Azul	Verde
	PMS Red 199 C	PMS Red 199 C	PMS Yellow C	PMS Blue 293 C	PMS Blue 293 C	PMS Green 347 C

Figura 1. Modelo de classificação toxicológica dos agrotóxicos. Modelo classificação adotado pela Anvisa apresentando 5 categorias de classificação das substâncias, bem como pictogramas, palavra de advertência, classe de perigo e cor da faixa, que está relacionada ao nível de toxicidade. Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

A exposição aos agrotóxicos traz impactos à saúde da população em geral, sendo muitas vezes, fatal. A exposição pode ocorrer por ingestão, aspiração e/ou contato com a pele e os

efeitos dependem do tipo, quantidade de produto absorvido e do tempo de exposição. De acordo com o tempo e a intensidade da exposição, a intoxicação provocada pode ser classificada como aguda ou crônica (54).

A intoxicação aguda ocorre de forma leve, moderada ou grave, dependendo da quantidade de agrotóxico absorvida, do tempo de absorção e da toxicidade do produto. Os sintomas podem incluir cefaleia intensa, irritação na pele, desidratação, alergias, coriza, náuseas, vômitos, diarreia, cólicas abdominais, tontura intensa, fraqueza generalizada, dispneia, hipotensão, arritmias cardíacas, insuficiência respiratória, convulsões tremores e irritabilidade (55).

A intoxicação crônica se manifesta após repetidas exposições, na forma de doenças que atingem diferentes órgãos e sistemas como o fígado, rins, tireoide, além de estar relacionada a aborto, malformações, impotência sexual, problemas respiratórios graves e câncer (56).

Estudos mostram que os agrotóxicos, assim como outros desreguladores endócrinos conhecidos, possuem a capacidade de interferir na atividade transcricional de receptores nucleares. Kojima e colaboradores (2006) conduziram um estudo no qual avaliaram os efeitos de 200 agrotóxicos sobre seis tipos receptores nucleares, por meio de ensaios de transfecção e gene repórter. Do total de compostos estudados, 47 apresentaram atividade agonista sobre o ER α , 33 sobre o ER β , 3 sobre o PPAR α e 106 sobre o PXR (57).

Trabalhos do grupo de pesquisa do qual faço parte, evidenciam que alguns agrotóxicos possuem efeito adipogênico. O trabalho de conclusão de curso de Bittencourt (2021), demonstrou que o bitertanol promoveu acúmulo lipídico em células 3T3-L1 após 14 dias de tratamento (43). De forma semelhante, Rodrigues (2019), evidenciou o efeito adipogênico do óxido de fembutatina e da ametrina em células 3T3-L1 expostas a essas substâncias por 14 dias, além de mostrar que o óxido de fembutatina promoveu ativação do PPAR γ (42). Araújo (2019), estudou o efeito adipogênico dos agrotóxicos abamectina e carbosulfano e demonstrou que ambos promoveram acúmulo lipídico em células 3T3-L1 e que o carbosulfano aumentou a atividade transcricional do PPAR γ (41).

2.4 BITERTANOL

O bitertanol é um fungicida pertencente ao grupo químico dos triazóis e possui nome químico 3,3-Dimethyl-1-(4-phenylphenoxy)-1-(1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol. Tem como fórmula molecular C₂₀H₂₃N₃O₂, peso molecular 337,42 g/mol e se apresenta como um pó cristalino branco a amarelo fraco (58).

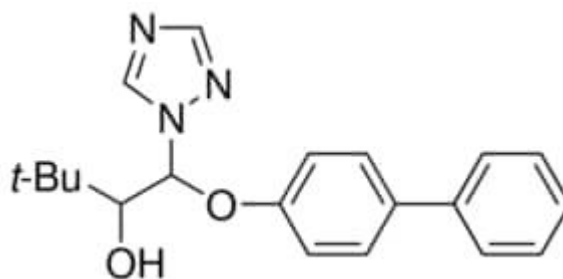


Figura 2. Fórmula Estrutural do Bitertanol. Fonte: Merck KgaA.

O bitertanol tem seu uso proibido na União Europeia desde 2017, após a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos retirar sua aprovação pela ausência de informações sobre essa substância ativa (59). No Brasil, o bitertanol teve sua monografia excluída em 18 de junho de 2019, pela ausência de produtos registrados com essa substância no país (60).

Sua classificação toxicológica, de acordo com as normas do GHS, é classe III, moderadamente tóxico. Em países onde seu uso é autorizado, ele é utilizado em culturas de amendoim, feijão, gladiolo, maçã e melão (60).

Na literatura, existem alguns estudos com fungicidas do grupo dos triazóis, mostrando que eles podem atuar como desreguladores endócrinos. No estudo do Kjaerstad e colaboradores (2010), foi evidenciado que em células humanas MCF-7 BUS, o epoxiconazol interfere na produção de hormônios masculinos e femininos (61). Taxvig e colaboradores (2007), realizaram um estudo para investigar os fungicidas tebuconazol e epoxiconazol, quanto aos efeitos tóxicos reprodutivos. Nesse estudo, foi demonstrado que a prole masculina de ratas expostas ao tebuconazol durante a gestação e lactação, apresentou características femininas (62).

Um estudo que investigou, em cultura de células, os efeitos do bitertanol sobre a atividade do receptor de andrógeno, por meio do ensaio de transfecção e gene repórter, constatou que esse composto pode causar desequilíbrio hormonal, seja por inibição da conversão da testosterona pela CYP3A4 ou pela interferência no seu receptor (63).

Até o momento, não há estudos sobre a ação do bitertanol sobre os receptores GR, (PPAR α , PPAR β/δ , TR α , TR β e PXR).

2.5 ÓXIDO DE FEMBUTATINA

O óxido de fembutatina é um acaricida, pertence ao grupo químico dos organoestânicos e possui nome químico tris(2-metil-2-fenilpropil)-tris(2-metil-2-fenilpropil)estaniioxistano. Tem como fórmula molecular C₆₀H₇₈OSn₂, peso molecular 1052,703 g/mol e se apresenta como um pó cristalino branco com odor suave (64).

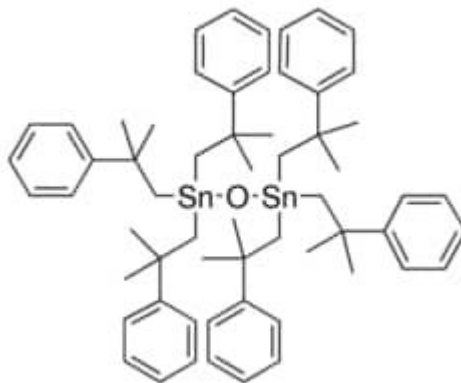


Figura 3. Fórmula Estrutural do Óxido de Fembutatina. Fonte: Merck KgaA

O óxido de fembutatina é classificado, de acordo com as normas do GHS, como classe I ou seja, extremamente tóxico. Ele é utilizado via aplicação foliar em culturas de citros como laranja, limão, tangerina e toranja, com intervalo de segurança de 14 dias entre uma aplicação e outra. Sua ingestão diária aceitável é de 0,03 mg/kg (56).

O óxido de fembutatina tem seu uso autorizado no Brasil (56), mas na União Europeia não é aprovado para uso desde 2011, após a publicação de estudos que mostraram seu potencial genotóxico e risco ao meio ambiente (59).

Existem vários estudos sobre o grupo dos organoestânicos, ao qual o óxido de fembutatina pertence, mostrando sua capacidade de interferir no funcionamento do sistema endócrino. Em 2006, um grupo de pesquisa mostrou que o óxido de fembutatina promoveu alteração espermatogênica, além de diminuir os níveis de testosterona e aumentar os níveis de FSH (hormônio folículo-estimulante) e LH (hormônio luteinizante) de camundongos Swiss (65).

Além disso, o estudo realizado por Sharan e colaboradores (2014), demonstrou que a exposição ao tributilestanho diminui a atividade dos TR α e TR β , em células HepG2 (66).

Até o momento, não há estudos sobre a ação do óxido de fembutatina sobre os receptores GR, PPAR α , PPAR β/δ , TR α , TR β e PXR.

2.6 RECEPTORES NUCLEARES

Os receptores nucleares (RN) compreendem uma superfamília de receptores proteicos, que desempenham papéis importantes na diferenciação e regulação celular, no metabolismo e na reprodução, uma vez que fornecem ligação direta entre as moléculas de sinalização e as respostas transcricionais (67).

Todos os RNs compartilham a mesma organização estrutural, formada por diferentes

regiões. De forma geral, eles são compostos por uma porção amino terminal (A/B), um domínio C, central, de interação com o DNA (DNA *binding domain* – DBD), uma região D, denominada dobradiça (*hinge*) e uma região (E), que possui o domínio de ligação ao ligante (*ligand binding domain* – LBD). Alguns RNs possuem ainda, um domínio (F), situado na região carboxiterminal, porém sua função ainda é desconhecida (15, 26). A Figura 4 ilustra a estrutura geral dos receptores nucleares.

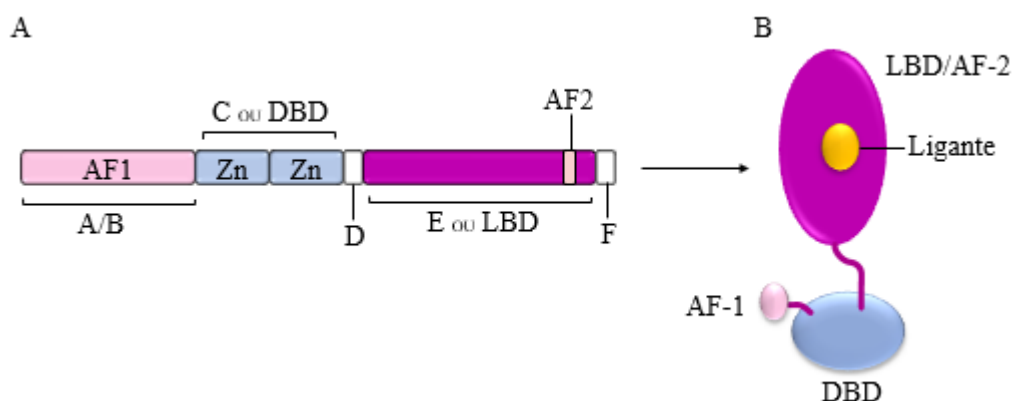


Figura 4. Estrutura geral dos receptores nucleares.(A) A maioria dos membros da superfamília dos receptores nucleares possui estrutura composta por um domínio amino terminal A/B, que possui a função de ativação 1 (*Activation Function1-AF1*), uma região central, C ou domínio de ligação ao DNA, formado por duas estruturas dominadas dedos de zinco, uma região carboxiterminal, E ou domínio de ligação do ligante (*Ligand Binding Domain –LBD*), que possui a função de ativação 2 (*Activation Function 2 - AF2*) e uma região D ou dobradiça, que conecta o DBD e o LBD. Alguns receptores nucleares possuem ainda um domínio F. (B) Esquema mostrando os domínios LBD E DBD. Adaptado de: ChoiJ-M, ALM. The Nuclear Receptor PPARs as ImportantRegulators of T-Cell Functions and Autoimmune Diseases. *Molecules and Cells*. p. 217-222, 2012.

O domínio amino terminal (A/B) é o domínio mais versátil em comprimento e sequência entre os RNs, podendo ter de 50 até mais de 500 aminoácidos (16). Sabe-se ainda que essa região possui ao menos um domínio de transativação independente de ligante, denominado função de ativação 1 (*Activation Function 1- AF-1*) e vários domínios de transativação autônomos (16,68,69).

O DBD (C) é um domínio pequeno, contendo aproximadamente 70 resíduos de aminoácidos, sendo o mais conservado entre os domínios dos RNs. Essa região possui dois segmentos estruturais conhecidos como “dedos de zinco”, duas α hélices e uma extensão carboxila. Em cada dedo de zinco existem quatro resíduos de cisteína que se ligam a uma molécula de zinco, permitindo a sua interação com o DNA. Uma de suas funções é identificar e viabilizar a ligação do receptor a regiões específicas do DNA localizadas nos promotores de

seus genes alvo, podendo também regular a capacidade de interação do receptor com outros membros da superfamília (67–71).

Na base do primeiro dedo de zinco encontra-se a chamada “P Box”, região constituída por três aminoácidos responsáveis pelo reconhecimento dos elementos responsivos específicos para cada receptor. Na base do segundo dedo de zinco, entre a primeira e segunda cisteínas, encontra-se uma sequência de cinco aminoácidos que formam a “D Box”, região fundamental para a dimerização do receptor. Os termos “P Box” e “D box” são referências às posições proximal e distal em que essas regiões estão localizadas (67,68,72,73).

A região menos conservada entre os RNs é o domínio D, que conecta os domínios DBD e LBD. Esse domínio é altamente flexível, age como uma dobradiça, conferindo versatilidade estrutural ao receptor, possibilitando sua dimerização com outros receptores nucleares e simultaneamente, a ligação ao DNA, além de possuir o sinal de localização nuclear (NSL) (67,73,74).

O LBD encontra-se na região carboxi-terminal ou domínio E, possui estrutura secundária formada por 12 α hélices, sendo a mais conservada entre os domínios dos RNs (74). Esse domínio é responsável pela interação do receptor com ligantes e com proteínas correguladoras, incluindo co-ativadores e correpressores transcricionais e pela homo e/ou heterodimerização entre os receptores (16). Além disso, o LBD é responsável pela Função de Ativação 2 (*Activation Function 2* - AF-2), uma interface de dimerização forte (74). Os compostos agonistas e antagonistas agem nesse domínio, ativando ou bloqueando a transcrição gênica (75,76).

Alguns RNs possuem ainda, na extremidade C-terminal, um domínio F. Existem poucos estudos sobre esse domínio, de modo que suas funções são pouco conhecidas (74,75).

2.7 CLASSIFICAÇÃO DOS RECEPTORES NUCLEARES

Foram identificados, até o momento, 48 genes em humanos que codificam diferente receptores nucleares, como os receptores para moléculas hidrofóbicas, incluindo os hormônios esteroides como os estrogênios, a progesterona e os androgênios e outras como a vitaminas D3, o ácido retinóico e os ácidos graxos (77).

Considerando a natureza dos seus ligantes e suas potenciais funções fisiológicas, os receptores nucleares podem ser classificados em três classes, os receptores endócrinos, os receptores órfãos adotados, classe na qual estão incluídos os receptores órfãos adotados “enigmáticos” e os receptores órfãos verdadeiros (16) (Figura 5).

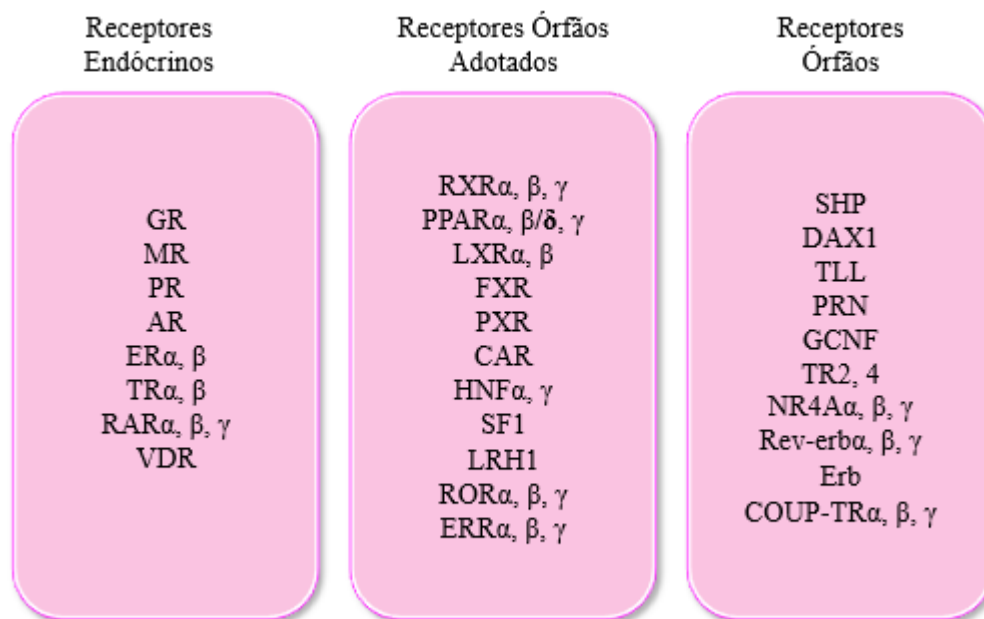


Figura 5. Classificação dos receptores nucleares. A superfamília dos receptores nucleares pode ser dividida em três classes, de acordo com a natureza dos seus ligantes e suas funções fisiológicas, os receptores endócrinos, os receptores órfãos adotados e os receptores órfãos.

Os membros da classe dos receptores endócrinos possuem alta afinidade por hormônios lipossolúveis e vitaminas e são essenciais para o controle homeostático do sistema endócrino. Esta classe inclui os receptores para hormônios esteroides, Receptor de Estrógeno (*Estrogen Receptor* - ER), Receptor de Glicocorticoide (*Glucocorticoid Receptor* – GR), Receptor de Progesterona (*Progesterone Receptor* - PR), Receptor de Ácido Retinóico (*Retinoic Acid Receptor* -RAR) e o Receptor de Vitamina D (*Vitamin D Receptor* -VDR). Os receptores esteroides atuam como homodímeros e o VDR e o RAR formam heterodímeros com o Receptor de Retinóide X (*Retinoid X Receptor* - RXR) (20).

A segunda classe é formada pelos receptores órfãos adotados, que recebem esse nome, por não possuírem, na ocasião da sua identificação, ligantes naturais conhecidos, sendo, portanto, considerados “órfãos”. Com a identificação de tais moléculas, eles passaram a ser denominados “adotados”. Em 1990, o RXR foi descrito como integrante desse grupo e posteriormente, foi identificado um derivado da vitamina A, o ácido 9-cis retinóico, como um ligante de alta afinidade por esse receptor. Essa identificação representou a primeira adoção de um receptor nuclear órfão, dando início à era da “endocrinologia reversa”, onde um receptor é usado para identificar seu ligante natural (16,78). A classe dos receptores órfãos adotados abrange receptores com baixa afinidade para lipídios dietéticos e xenobióticos, que funcionam como heterodímeros com o RXR, tais como o Receptor Pregnano X (*Pregnane X Receptor* -

PXR) e os Receptores Ativados por Proliferados Peroxissomais (*Peroxisome Proliferator-Activated receptor* - PPAR) (16).

Também pertencem à classe dos receptores órfãos adotados, os receptores órfãos adotados enigmático, para quais os ligantes foram identificados, porém a natureza da regulação dependente do ligante não foi totalmente estabelecida (16). Estão inclusos nesse grupo, o Fator Esteroidogênico 1 (*Steroidgenic Factor 1* -SF1), Receptor Androstano Constitutivo (*Constitutive Androstane* – CAR), Receptor Órfão Relacionado ao Retinoide (*Retinoid-Related Orphan Receptor* – ROR) e o Fator Nuclear Hepatocitário 4 (*Hepatocyte Nuclear Factor 4* – HNF4) (16).

A terceira classe é composta pelos “verdadeiros receptores órfãos”, cujo ligantes (naturais ou sintéticos), não foram identificados até o momento. Pertencem a esta classe receptores que, possivelmente, não são regulados por ligantes, mas pela disponibilidade de proteínas co-ativadoras, pela própria expressão do receptor ou por alguma modificação covalente (16).

2.8 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAI (PPARS)

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) são fatores de transcrição regulados por ligantes lipofílicos. Eles estão relacionados ao metabolismo glicolipídico e com o controle de processos inflamatórios e infecciosos (79). As ações dos PPARs são mediadas por três subtipos de receptores, expressos em diferentes tecidos e em momentos distintos do desenvolvimento. São eles o PPAR α (NR1C1), o PPAR β (também denominado PPAR δ) (NR1C2) e o PPAR γ (NR1C3) (79). Em relação ao tamanho dos receptores, o PPAR α apresenta 468 resíduos de aminoácidos em sua estrutura, o PPAR β/δ , 441, e o PPAR γ possui 479 resíduos de aminoácidos (77).

O nome receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR) é derivado do PPAR α , primeiro receptor PPAR descrito. Na década de 90, ele foi inicialmente identificado em roedores, como alvo molecular dos fibratos, que são drogas hipolipemiantes e de outros compostos que induzem a proliferação de peroxissomas em roedores (80).

2.9 PPAR α

O PPAR α desempenha papel fundamental no metabolismo lipídico. Ele é expresso principalmente em tecidos envolvidos na oxidação de ácidos graxos como o hepático, cardíaco, muscular esquelético, adiposo marrom e renal, embora também seja encontrado em outros

locais, incluindo intestino, músculo liso e células que participam da resposta imunitária (81). O PPAR α funciona como um sensor nutricional que permite a adaptação das taxas de catabolismo dos ácidos graxos, lipogênese e síntese de cetonas em reposta à alimentação e ao jejum (82).

O PPAR α regula a expressão de enzimas catabólicas, proteínas de transportes e estruturais envolvidos na β -oxidação e transporte de ácidos graxos (23). Também exerce efeitos anti-inflamatórios e previne os efeitos pró-aterogênicos do acúmulo de colesterol em macrófagos (83). Em roedores, sua ativação está associada à redução da esteatose, inflamação e fibrose hepáticas (84). Em humanos com esteatose hepática, a expressão do PPAR α é reduzida, aumentando com mudanças no estilo de vida ou cirurgia bariátrica, o que é acompanhado de melhora no aspecto histológico do fígado (85). Sua expressão é regulada por hormônios de crescimento, insulina, estresse e outras condições fisiológicas como o jejum prolongado (86).

Os ligantes naturais do PPAR α são lipídeos endógenos e exógenos (87). Dentre os ligantes sintéticos estão os fibratos, uma classe de medicamentos utilizada para reduzir os níveis séricos de triglicérides (86,88). Após a descoberta da sua ativação pelos fibratos, foram identificados agonistas naturais que se ligam com baixa afinidade ao PPAR α , tais como ácidos graxos saturados e insaturados, incluindo o ácido palmítico, esteárico, oleico e araquidônico (89).

Apesar do PPAR α estar presente no tecido adiposo branco, mesmo que em menor quantidade quando comparado ao PPAR γ , estudos evidenciam que ele pode influenciar na função do tecido adiposo. Costet e colaboradores (1998) mostraram que camundongos deficientes em PPAR α ganham mais massa adiposa em comparação a animais selvagens. No estudo conduzido por eles, os camundongos receberam dieta com 4,5% de lipídeos e ao final de 240 dias, os animais deficientes em PPAR α apresentaram mais gordura corporal do que os animais selvagens, sendo cerca de 40% para fêmeas e 18,6% para machos quando comparados aos animais controle (90).

2.10 PPAR β/δ

O PPAR β/δ é o isotipo menos descrito entre os PPARs. Ele é encontrado em todo organismo, com importante expressão no músculo esquelético, tecido adiposo, pele e cérebro. O PPAR β/δ executa papel de extrema importância na adaptação metabólica de vários tecidos aos estímulos ambientais e tem sido implicado em outros processos fisiológicos, como o transporte reverso do colesterol. Sua ativação específica eleva os níveis de β -oxidação de ácidos graxos. Ele é ativado por ácidos graxos de cadeia longa, saturados e insaturados (89,91,92).

O estudo de Oliver e colaboradores (2001), mostrou que em macacos rhesus obesos com resistência à insulina, o tratamento com o agonista de PPAR β/δ GW501516, induziu aumento de HDL e diminuição dos triglicerídeos, além de diminuição nos níveis de LDL e insulina em jejum (93).

O estudo de Matsusue e colaboradores (2004), sugere que o PPAR β/δ também possa estar envolvido na diferenciação de adipócitos. Para investigar o papel específico do PPAR β/δ na diferenciação, foram utilizados adipócitos que não expressam PPAR β/δ . Como resultado, foi observada redução significativa na adipogênese (94).

2.11 PPAR γ

O PPAR γ é o isotipo mais estudado de PPAR. Foram identificadas duas isoformas deste receptor, o PPAR γ 1 e o PPAR γ 2. A isoforma PPAR γ 2 é predominantemente expressa no tecido adiposo (marrom e branco), enquanto a PPAR γ 1 tem expressão relativamente baixa em diferentes tipos de tecido como o cerebral, adiposo, intestinal e em macrófagos (95). O PPAR γ é considerado o regulador chave da adipogênese, além de desempenhar papel importante no metabolismo energético e homeostase da glicose (91,92,96). Sua participação na adipogênese é tão necessária e fundamental, que até mesmo em células não comprometidas com a linhagem adipocitária, sua expressão ectópica é capaz de induzir a diferenciação em adipócitos (19).

O primeiro ligante natural identificado do PPAR γ foi a 15-deoxi-prostaglandinaJ2 (15d-PGJ2), se liga a ele de maneira irreversível. Outras substâncias lipofílicas endógenas são agonistas do PPAR γ , entre elas os ácidos graxos polinsaturados e o ácido graxo derivado do ácido nitrolinoléico (97,98). A rosiglitazona, pioglitazona e a troglitazona, que são tiazolidinadionas, atuam como ligantes sintéticos de alta afinidade do PPAR γ (99–101).

Estudos apontam que o PPAR γ é alvo de compostos considerados desreguladores endócrinos como o tributilestanho (TBT) e o dibutilestanho (DBD) e os ftalatos, utilizados na fabricação de plásticos (24,25)

Um estudo de 2016, mostrou que a adipogênese induzida pelo bisfenol S (BPS) e bisfenol A (BPA) em pré-adipócitos murinos, ocorre através da ativação direta do PPAR γ . Nesse estudos, ambos induziram diferenciação, mas quando o antagonista de PPAR γ , GW9662, foi adicionado, houve inibição da diferenciação adipogênica (102).

O trabalho de Rodrigues (2019), evidenciou que o óxido de fembutatina promoveu ativação do PPAR γ e induziu adipogênese em células 3T3-L1 (42). Resultados semelhantes foram encontrados por Araújo (2019), que estudou o efeito adipogênico do agrotóxico carbosulfano e demonstrou que esse composto também é capaz de aumentar a atividade

transcricional do PPAR γ (41).

Há estudos mostrando que a interação dos ligantes naturais com o PPAR γ , ocorre por meio da ligação covalente com a cisteína 285, localizada na hélice 3 do LBD (Figura 6) e que a substituição dessa cisteína, pode abolir a ativação mediada por esses compostos (103–105). No estudo de Milton e colaboradores (2017), foi demonstrado que a ativação do PPAR γ promovida pelo dicloreto, dilaurato e maleato de DBT e pelo cloreto de TBT, foi abolida quando houve a substituição da cisteína por uma serina na posição 285 (24).

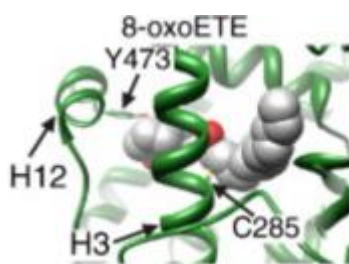


Figura 6. Estrutura tridimensional do ligante endógeno ligado ao LBD do PPAR γ . Ácido eicosatetraenoico (8-oxoicosa-5,9,11,14-tetraenoico acid – 8-oxoETE) ligado à cisteína 285 (apontado pela seta). Fonte: Waku T, Shiraki T, Oyama T, Fujimoto Y, Maebara K, Kamiya N, et al. Structural insight into PPAR γ activation through covalent modification with endogenous fatty acids. *Journal of Molecular Biology*. 2009;385(1):188-99.

2.12. RECEPTOR DO HORMÔNIO TIREOIDIANO (TR)

O receptor do hormônio tireoídiano (TR) está expresso sob duas isoformas, o TR α e o TR β . O TR β que está presente no fígado, rim e cérebro e o TR α é encontrado em quase todos os tecidos, especialmente no muscular esquelético, adiposo marrom e cerebral (106,107).

O tecido adiposo é um alvo importante para o TR, no qual ele afeta o metabolismo e o desenvolvimento ao regular a proliferação e diferenciação dos adipócitos. Como os tecidos adiposos branco e marrom expressam o TR α e TR β , eles são sensíveis à ação dos hormônios tireoídianos (108–110).

O TR possui como ligantes endógenos a triiodotironina (T3) e a tiroxina (T4), que exercem efeitos significativos na homeostase em mamíferos (111). Eles possuem influência sobre diversos processos fisiológicos como consumo de oxigênio, frequência cardíaca, metabolismo lipídico e resistência óssea, além de serem essenciais nas funções do sistema nervoso central críticas para a manutenção do estado mental e humor (112).

Na literatura há estudos que indicam a importância dos receptores tireoídianos na adipogênese. Em 2010, um grupo de pesquisa utilizou células 3T3-L1 com mutações nos genes que expressam o TR α e o TR β . Quando essas células mutadas foram tratadas com T3, foi

observada redução na adipogênese. Também se observou uma diferença na resposta entre as isoformas. Nas células contendo a mutação no TR α , a redução na adipogênese foi de 94% e nas células com a mutação no TR β , a redução foi 54% (113).

2.12 RECEPTOR DE GLICOCORTICÓIDE (GR)

O receptor de glicocorticoide (GR) é expresso principalmente no fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, e em praticamente todos os tipos de células, localizando-se predominantemente no citoplasma celular. Ele é encontrado em duas isoformas, o GR α , cuja ativação é dependente de ligantes (114,115) e o GR β , que não interage com agonistas de glicocorticoides conhecidos e funciona como um inibidor natural da atividade transcricional induzida pelo GR α (116,117).

Na ausência de ligante, o GR α encontra-se inativo no citoplasma, estabilizado por um complexo proteico denominado proteínas do choque térmico (*heat shock proteins* - HSP). Na presença de níveis elevados de glicocorticoides, o GR α sofre alterações conformacionais e se transloca para o núcleo, onde se liga aos elementos de resposta aos glicocorticoides (GREs), regulando a expressão dos seus genes alvo de forma positiva ou negativa (115).

O GR desempenha papel fundamental na regulação de diversos processos fisiológicos, incluindo a homeostase eletrolítica, modulação do sistema imune, da função cerebral, da pressão arterial, além de regular a proliferação e diferenciação celular, incluindo diferenciação de adipócitos (118).

Estudos evidenciam que um grande número de ligantes podem agir como agonistas de GR, como por exemplo metais, agrotóxicos, retardantes de chama e plastificantes (119).

Há estudos mostrando a ação de agrotóxicos sobre atividade transcricional do GR. No estudo de Sargis e colaboradores (2010), o fungicida tilifluanida, estimulou sua atividade transcricional (120).

2.13 RECEPTOR DE PREGNANOS X (PXR)

O receptor de pregnanos X (PXR) é encontrado com abundância no fígado e intestino, e com menor expressão no rim (121). Diferente dos outros receptores nucleares que interagem seletivamente com seus ligantes, a atividade transcricional desse receptor pode ser modulada por diversos compostos como antibióticos, antimicóticos, poluentes ambientais, entre outros (122,123).

O PXR exerce importante função na homeostase metabólica, regulando enzimas do citocromo P450 e contribuindo para a eliminação de endobióticos e xenobióticos. Além disso,

pesquisas recentes revelam que o PXR pode modular a inflamação, o metabolismo da glicose, a homeostase lipídica e a homeostase energética (123,124).

Zhou e colaboradores (2006), mostraram o que o PXR é capaz de ativar genes que facilitam a lipogênese. Nesse estudo, camundongos transgênicos que expressam o PXR humano (hPXR), foram tratados com rifampicina, agonista deste receptor e apresentaram aumento do acúmulo de lipídios no fígado (125).

Quanto aos agrotóxicos, um estudo de 2018 mostrou, por meio de ensaio de transfecção e gene repórter, que o composto cis-bifentrina possui atividade agonista sobre PXR,. Além disso, o tratamento com esse agrotóxico estimulou um aumento significativo no acúmulo lipídico em células de hepatocarcinoma humano (HepG2) (126).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar o efeito adipogênico dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina em cultura de células de mamíferos.

3.2 ESPECÍFICOS

Considerando que estudos anteriores do grupo de pesquisa do qual faço parte mostraram que os agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina promovem acúmulo lipídico em células 3T3-L1, o óxido de fembutatina ativa o PPAR γ e nenhum dos dois compostos ativa o RXR α , os objetivos específicos deste estudo foram:

- Avaliar, em células HeLa, se os agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina ativam o GR α , PPAR α , PPAR β/δ , TR α , TR β e PXR.
- Investigar, no caso do óxido de fembutatina, agonista de PPAR γ , se a cisteína 285 é importante para a ativação promovida por este agrotóxico;
- Investigar, em células 3T3-L1, se um antagonista de PPAR γ é capaz de inibir o acúmulo lipídico induzido pelo bitertanol e óxido de fembutatina;

4 METODOLOGIA

4.1 REAGENTES E MATERIAIS

As células HeLa e 3T3-L1 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células HeLa foram utilizadas nos ensaios de transfecção e gene repórter e as células 3T3-L1 foram utilizadas nos ensaios de diferenciação de adipócitos.

Os agrotóxicos bitertanol (número do produto 45349-250MG, lote BCBX0123) e óxido de fembutatina (número do produto 34342-250MG, lote BCBW1776) foram adquiridos da Merck Brasil.

O dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado para diluição dos compostos e como controle negativo nos ensaios, foi adquirido da VetecTM.

O óleo vermelho O, foi adquirido da Merck Brasil.

A rosiglitazona, utilizada como controle positivo nos ensaios de diferenciação de adipócitos e nos ensaios de transfecção e gene repórter, foi obtida da Cayman Chemical.

A dexametasona, agonista de GR, o WY14643, agonista de PPAR α , o GW0742, agonista do PPAR β/δ , a rifampicina, agonista de PXR e o T3, agonista de TR α e TR β , utilizados como controles positivos nos ensaios de transfecção e gene repórter, foram adquiridos da Merck Brasil.

A insulina, utilizada nos ensaios de diferenciação, foi adquirida da Merck Brasil.

O meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), o soro fetal bovino (SFB) e o soro neonatal bovino (SNB), foram adquiridos junto à empresa Gibco®.

O soro fetal bovino tratado com carvão ativado foi adquirido da Merck Brasil.

A *Lipofectamine*® 2000, utilizada no ensaio de transfecção e gene repórter, foi adquirida da Invitrogen.

O *Reporter Assay Kit*, utilizado no ensaio de transfecção e gene repórter, foi adquirido da Promega.

Os plasmídeos GR, LBD-PPAR α /DBD-GAL4, LBD-PPAR β /DBD-GAL4, LBD-TR α /DBD-GAL4, LBD-TR β /DBD-GAL4, LBD-PXR/DBD-GAL4 e seus respectivos elementos responsivos fusionados ao gene repórter da luciferase, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Paul Webb do *Methodist Research Institute* (Houston, EUA). O plasmídeo LBD-PPAR γ C285S/DBD-GAL4, contendo a substituição da serina por uma cisteína na posição 285, foi gentilmente cedido pela Dra. Flora Aparecida Milton. Todos os plasmídeos foram transformados e purificados no Laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília.

Todos os plasmídeos, exceto o GR são quimeras constituídos pelo LBD humano do respectivo receptor e o DBD de levedura (GAL). O uso desses plasmídeos é uma estratégia interessante para a avaliação dos efeitos de ligantes sobre a atividade transcricional de receptores, pois o fator de transcrição GAL é exclusivo de leveduras e portanto, não interage com receptores endógenos de células de mamíferos. Dessa forma é possível avaliar o efeito de compostos sobre o LBD isoladamente.

4.2 ESCOLHA DOS AGROTÓXICOS

Para a seleção dos agrotóxicos utilizados nesse estudo, foram realizadas pesquisas nas páginas do Ministério da Agricultura do Brasil e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, buscando a identificação de compostos autorizados para uso no país. Também foram estabelecidos como critérios, o emprego em culturas agrícolas diversificadas, bem como o pertencimento a grupos químicos e classes (herbicidas, acaricidas, fungicidas) distintas, possibilitando um estudo mais amplo.

Também foi verificado o uso nos EUA e UE e por meio de uma extensa revisão de literatura, foi confirmada a inexistência de pesquisas científicas que relacionassem o uso desses compostos com a adipogênese e possíveis efeitos sobre os receptores nucleares estudados.

Posteriormente, foi verificada a disponibilidade de aquisição na forma de princípio ativo em empresas com representantes no Brasil e, então, os agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina foram adquiridos.

4.3 PREPARO DOS AGROTÓXICOS

Para diluir os agrotóxicos foi utilizado o DMSO, devido à sua capacidade de se combinar com ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas, sem alterar sua configuração molecular.

A concentração estoque foi de 10^{-2} M para bitertanol e 10^{-3} M para o óxido de fembutatina, pois essas foram as maiores concentrações em que esses compostos foram solúveis em DMSO.

A partir da solução estoque, foram então realizadas diluições seriadas de 10 em 10 vezes, em DMSO, até a concentração 10^{-10} M.

4.4 CULTURA DE CÉLULAS

Os pré-adipócitos 3T3-L1 e as células HeLa foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) acrescido de 10% de soro neonatal bovino (SNB), no caso das 3T3-L1, e no caso das HeLa, 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL

de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e acondicionadas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂.

4.5 ENSAIO DE TRANSFECCÃO E GENE REPÓRTER

O ensaio de transfecção e gene repórter permite mensurar a expressão de um gene de interesse ou a atividade de um promotor, por meio de sua ligação a um gene repórter.

Esse experimento consiste na introdução, em uma célula eucariota, de vetores contendo sequências que codificam o gene de interesse e um gene repórter. Uma vez que o gene repórter não é expresso nesta célula, a proteína codificada é facilmente medida como indicador da expressão do gene em estudo.

Um gene repórter amplamente utilizado é o da luciferase de vagalume. A luciferase catalisa a oxidação da luciferina, seu substrato, em um processo no qual a energia química é convertida em energia luminosa, que pode ser mensurada em um luminômetro.

Esse ensaio foi realizado com o intuito de investigar os efeitos dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina, sobre a atividade transcricional dos receptores nucleares GR, PPAR α , PPAR β/δ , TR α , TR β e PXR. Para isso, foram utilizados plasmídeos contendo sequências que codificam esses receptores nucleares e seus elementos responsivos fusionados ao gene repórter da luciferase.

Outro objetivo deste ensaio foi verificar se a cisteína 285, localizada no LBD do PPAR γ , é importante para a ativação deste receptor pelo agrotóxico óxido de fembutatina, que se mostrou seu agonista. Nesse caso, foi utilizado um plasmídeo contendo a sequência que codifica o receptor nuclear quimérico, constituído pelo LBD do PPAR γ com a mutação C285S, fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4, denominado LBD-PPAR γ C285S/DBD-GAL4.

Para o ensaio, foram semeadas cerca de 25.000 células HeLa, por poço, em placas de 48 poços, em meio de cultura DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino, seguida pela incubação a 37°C e 5% de CO₂.

No dia seguinte, a transfecção foi realizada utilizando o reagente *Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent*, seguindo as instruções do fabricante. Foram co-transfectados, por poço, 300ng de DNA plasmidial, sendo 60ng do plasmídeo contendo a sequência que codifica o receptor e 240ng do plasmídeo que contém seu elemento responsivo fusionado ao gene repórter da luciferase.

De 4 a 6 horas após a transfecção, o meio de cultura foi substituído por DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino tratado com carvão ativado e as células foram tratadas com veículo

(DMSO), rosiglitazona 10 μ M, dexametasona 10 μ M, WY14463 100 μ M, GW0742 100 μ M, rifampicina 10 μ M, T3 0,1 μ M ou com concentrações crescentes dos agrotóxicos bitertanol ou óxido de fembutatina.

Após 24 horas de tratamento, a atividade da luciferase foi mensurada utilizando o *Reporter Luciferase Assay Kit*, de acordo com as recomendações do fabricante. Para tal, as células foram lisadas com 100 μ l do tampão de lise e a cada 10 μ l de lisado de cada poço, foram adicionados 20 μ l de luciferina, substrato da luciferase. A luminescência resultante foi quantificada no luminômetro GloMax® 20/20 Luminometer da Promega®, em unidades relativas de luz. O cálculo da atividade transcricional dos receptores, representado pela atividade da luciferase, foi feito comparando-se os valores de unidades relativas de luz das amostras tratadas com os ligantes em estudo aos das amostras tratadas com veículo.

O teste estatístico utilizado foi a análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas no programa GraphPad Prism® versão 6.0c.

Cada experimento foi realizado em triplicada e repetido, no mínimo, três vezes.

4.6 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO DE ADIPÓCITOS COM ANTAGONISTA

O ensaio de diferenciação de adipócitos na presença do antagonista específico de PPAR γ , foi realizado com o objetivo de avaliar se o acúmulo lipídico promovido pelos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina nas células 3T3-L1, é dependente da ativação do PPAR γ .

Existem alguns tipos celulares que, quando submetidos a estímulos adequados, diferenciam-se em adipócitos. Para este experimento foi utilizado a linhagem celular 3T3-L1, uma subcepa da linhagem 3T3 do camundongo Swiss, comprometida com a diferenciação adipocitária. Considerando que experimentos prévios realizados pelo grupo de pesquisa do qual faço parte, mostraram que os agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina são capazes de induzir acúmulo lipídico em células 3T3-L1, o presente experimento foi conduzido com o objetivo de investigar se o antagonista do PPAR γ T0070907, poderia inferir nesse acúmulo.

O protocolo de diferenciação utilizado foi adaptado do Manual de manutenção e diferenciação das células 3T3-L1 da empresa ZenBio (Figura 6).

Nesse ensaio, cerca de 48.000 células 3T3-L1 foram semeadas em cada poço de placa de 6 poços, em meio de cultura DMEM acrescido de 10% de soro neonatal bovino (SNB), 100 U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina e mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. O meio foi renovado a cada 72 horas, até que as células atingissem 100% de confluência,

sendo esse considerado o dia -3 do experimento. Para garantir a parada do crescimento, necessária para a diferenciação celular, as células foram mantidas sobre as mesmas condições por mais 72 horas, sendo este considerado o dia 0 do ensaio.

No dia 0, foi realizada a substituição do meio de cultura DMEM com 10% de SNB pelo DMEM com 10% de SFB. Além disso, foi adicionado ao meio de cultura, o coquetel indutor de diferenciação contendo insulina 1µg/mL e dexametasona 0,5µM e o tratamento foi iniciado. As células foram tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona 0,1 µM, 1µM ou concentrações crescentes dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina. Para o agrotóxico bitertanol, as concentrações utilizadas variaram de 0,0001 a 10µM, enquanto para o agrotóxico óxido de fembutatina, as concentrações variaram de 0,0001 a 0,5µM.

Para avaliar o efeito do antagonista sobre o processo de diferenciação, 12 horas antes do início e a cada 12 horas durante todo o período de tratamento, o composto T0070907 na concentração de 1µM, foi adicionado ao meio de cultura.

No 15º de diferenciação, as células foram fixadas com formaldeído 4% e coradas com óleo vermelho O.

Cada ensaio com o antagonista T0070907 foi realizado, no mínimo, três vezes.

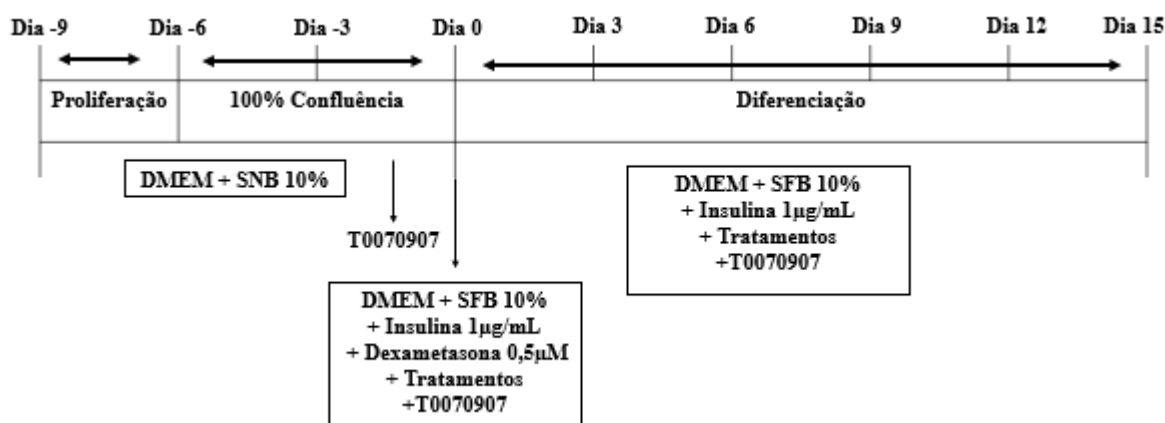


Figura 7. Esquema do ensaio de diferenciação de adipócitos. Células 3T3-L1 foram semeadas em placas de 6 poços e mantidas em meio de cultura DMEM acrescido de SNB 10% até atingirem 100% de confluência (Dia -3). Após, foram mantidas nas mesmas condições por mais três dias (Dia 0). No dia 0, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM acrescido de SFB 10%, insulina 1 µg/mL e dexametasona 0,5 µM e também se iniciou o tratamento com DMSO, rosiglitazona 0,1µM ou 1 µM ou concentrações crescentes dos agrotóxicos. Nesse dia também se iniciou o tratamento com o antagonista T0070907. Do dia 3 ao dia 15, a dexametasona deixou de fazer parte do coquetel adipogênico. No dia 15 as células foram fixadas e coradas com óleo vermelho O. Adaptado de: Cell Care Manual Maintenance and Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes to Adipocytes, ZenBio. Os experimentos foram realizados, no mínimo, três vezes.

4.7 COLORAÇÃO COM ÓLEO VERMELHO O

O óleo vermelho O é um corante com alta afinidade por lipídios. Por essa característica, ele foi utilizado para corar as células 3T3-L1, permitindo avaliar e comparar o grau de diferenciação induzido pelos tratamentos.

No 15° de diferenciação, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com 2 mL, por poço, de tampão fosfato salina (*Phosphate-Buffered Saline* – PBS) e fixadas com 2 mL, por poço, de formaldeído a 4% durante 40 minutos. A seguir, o formaldeído foi removido e cada poço foi lavado duas vezes com 2 mL de água destilada e duas vezes com 2 mL de PBS. Na sequência, as células foram encubadas com 2 mL, por poço, de isopropanol a 60%, por 5 minutos. Após a remoção do isopropanol, as células foram incubadas, durante 60 minutos, com óleo vermelho O a 60% em água destilada, a partir de um estoque a 0,5% em isopropanol. Após a incubação, o óleo foi removido e os poços foram lavados com água destilada, para remoção do excesso de corante. Após a secagem do óleo vermelho, a temperatura ambiente, foi realizada a fotodocumentação, registrando a superfície total de cada poço.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS AGROTÓXICOS SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DOS RECEPTORES NUCLEARES GR α , PPAR α , PPAR β/δ , TR α , TR β E PXR

5.1.1 GR α

Para avaliar o efeito dos agrotóxicos sobre o GR α , as células transfectadas foram tratadas por 24 horas, com DMSO (veículo), dexametasona 10 μ M (controle positivo) ou concentrações de 0,000001 a 0,1 μ M de bitertanol ou de 0,0001 a 0,5 μ M de óxido de fembutatina.

Como podemos observar na Figura 7, o óxido de fembutatina e o bitertanol não foram capazes de modificar a atividade transcricional do GR α nas concentrações utilizadas, em relação ao veículo. Conforme esperado, a dexametasona, agonista de GR α , induziu sua ativação 13,1 (7A) e 15,5 (7B) vezes.

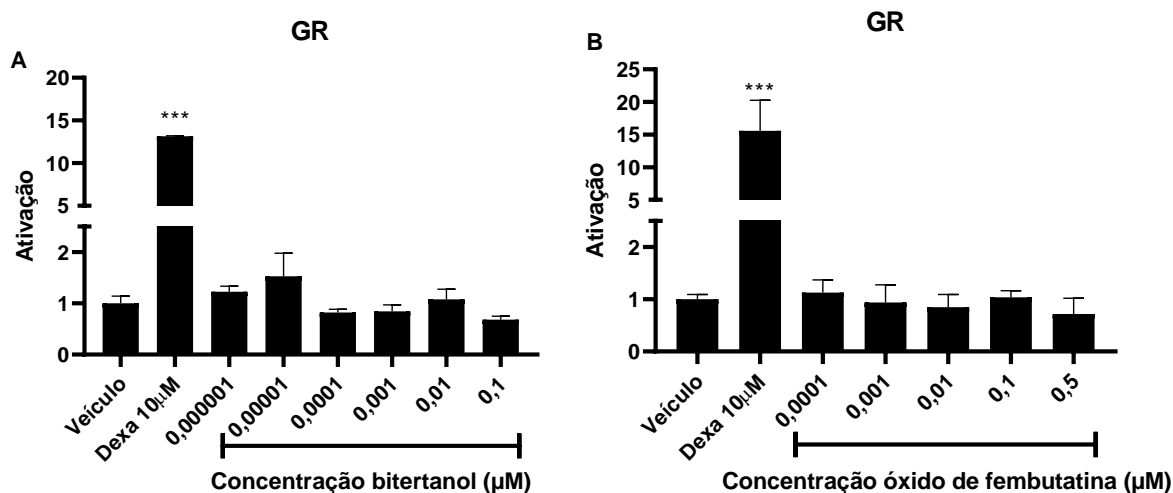


Figura 8. Efeito dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina sobre a atividade transcricional do GR α . Aproximadamente 25.000 células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do GR α e seu elemento responsivo fusionado ao gene repórter da luciferase e tratadas com veículo, dexametasona ou concentrações crescentes dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina. Após 24 horas, a atividade transcricional do GR α foi quantificada indiretamente pela mensuração da atividade da luciferase em luminômetro. Os experimentos foram realizados em triplicada e repetidos, no mínimo, três vezes. * $p < 0.05$.

5.1.2 PPAR α

Com intuito de avaliar o efeito dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina sobre a atividade transcricional do PPAR α , células HeLa foram tratadas com DMSO (controle negativo), WY14463 100μM (controle positivo) ou concentrações crescentes de 0,000001 a 0,1μM de bitertanol ou de 0,0001 a 0,5μM de óxido de fembutatina, durante 24 horas.

Como mostra a Figura 8, nenhum dos dois agrotóxicos foi capaz de modificar a atividade transcricional do PPAR α , nas concentrações utilizadas, em relação ao veículo. Conforme esperado, o WY14463, agonista de PPAR α , promoveu sua ativação 15,9 (8A) e 9,0 (8B) vezes.

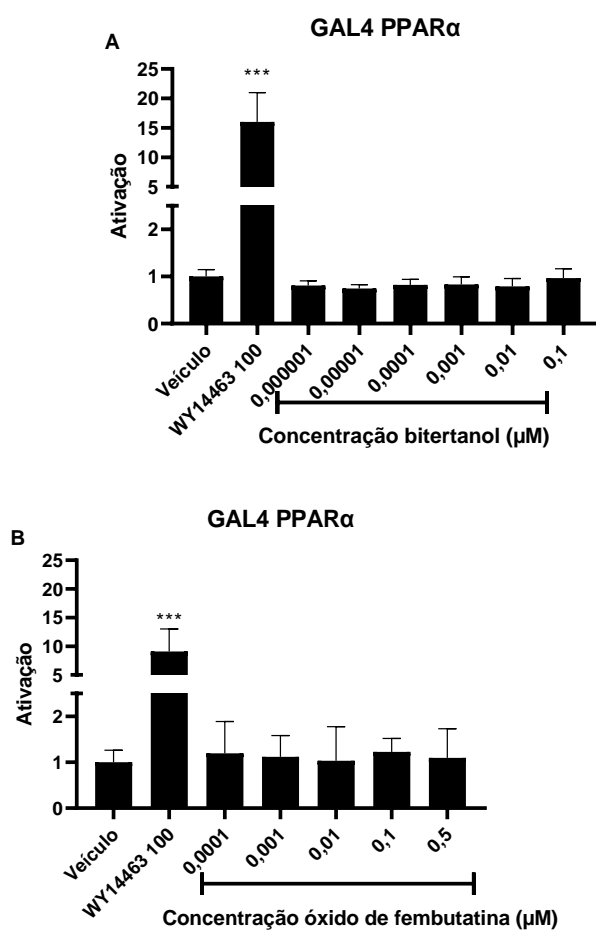


Figura 9. Efeito dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina sobre a atividade transcricional do PPAR α . Aproximadamente 25.000 células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do PPAR α e seu elemento responsivo fusionado ao gene repórter da luciferase e tratadas com veículo ou WY14463 ou concentrações crescentes dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina. Após 24 horas de tratamento, a atividade transcricional do PPAR α foi quantificada indiretamente pela mensuração da atividade da luciferase em luminômetro. Os experimentos foram realizados três vezes em triplicata. * $p < 0.05$.

5.1.3 PPAR β/δ

Para investigar o efeito dos agrotóxicos sobre a atividade transcricional do PPAR β/δ , as células HeLa foram tratadas com DMSO, GW0742 100 μM (controle positivo) ou concentrações crescentes de bitertanol de 0,000001 a 0,1 μM ou óxido de fembutatina de 0,0001 a 0,5 μM , durante 24 horas.

Como mostra a Figura 9, a atividade transcricional do PPAR β/δ , não foi modificada por nenhum dos agrotóxicos em estudo, nas concentrações utilizadas, em relação ao veículo. Conforme esperado, o GW0742, agonista de PPAR β/δ , promoveu ativação 14,2 (9A) e 11,3 (9B) vezes.

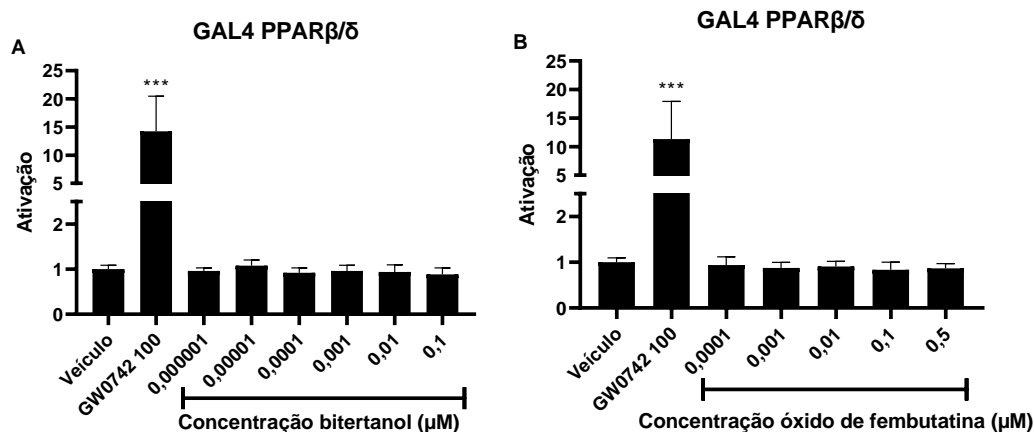


Figura 10. Efeito dos agrotóxicos bitertanol e óxido de febutatina sobre a atividade transcricional do PPARβ/δ. Aproximadamente 25.000 células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do PPARβ/δ e seu elemento responsivo fusionado ao gene repórter da luciferase e tratadas com veículo, GW0742 ou concentrações crescentes dos agrotóxicos bitertanol e óxido de febutatina. Após 24 horas, a atividade transcricional do PPARβ/δ foi quantificada indiretamente pela mensuração da atividade da luciferase em luminômetro. Os experimentos foram realizados três vezes em triplicata. * $p < 0.05$

5.1.4 TRα

Para avaliar o efeito dos agrotóxicos sobre a atividade de transcrição do TRα, as células HeLa foram tratadas com DMSO (controle negativo), T3 0,1μM (controle positivo) ou concentrações crescentes de bitertanol de 0,000001 a 0,1 μM ou óxido de febutatina de 0,0001 a 0,5μM, durante 24 horas.

Como mostra a Figura 10, nenhum dos agrotóxicos em estudo foi capaz de modificar a atividade transcricional do TRα, nas concentrações utilizadas, em relação ao veículo. Conforme esperado o T3, agonista de TRα, promoveu ativação de 45,2 (10A) e 29,8 (10B) vezes.

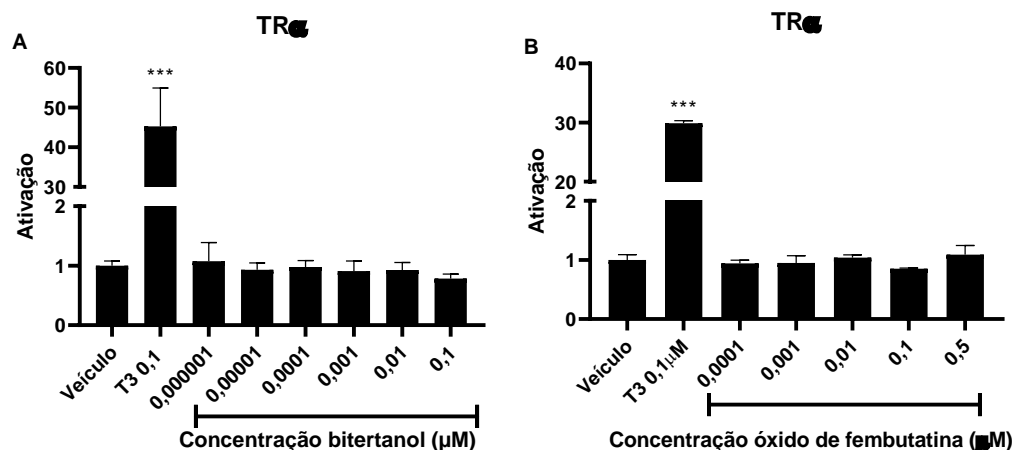


Figura 11. Efeito dos agrotóxicos bitertanol e óxido de febutatina sobre a atividade transcricional do TRα. Aproximadamente 25.000 células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do TRα e seu elemento responsivo fusionado ao gene repórter da luciferase e tratadas com veículo, T3 ou concentrações crescentes dos agrotóxicos bitertanol e óxido de febutatina. Após 24 horas, a atividade transcricional do TRα foi quantificada indiretamente pela mensuração da atividade da luciferase em luminômetro. Os experimentos foram realizados três vezes em triplicata. * $p < 0.05$.

5.1.5 TR β

Objetivando investigar o efeito dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina sobre o TR β , as células HeLa foram tratadas com DMSO (controle negativo), T3 0,1 μ M (controle positivo) ou concentrações crescentes de bitertanol de 0,000001 a 0,1 μ M ou óxido de fembutatina de 0,0001 a 0,5 μ M, durante 24 horas.

Como mostra a Figura 11, nenhum dos agrotóxicos em estudo modificou a atividade transcricional do TR β nas concentrações utilizadas, em relação ao veículo. Como era esperado, o T3, agonista de TR β , promoveu ativação de 173,1 (11A) e 259,9 (11B) vezes.

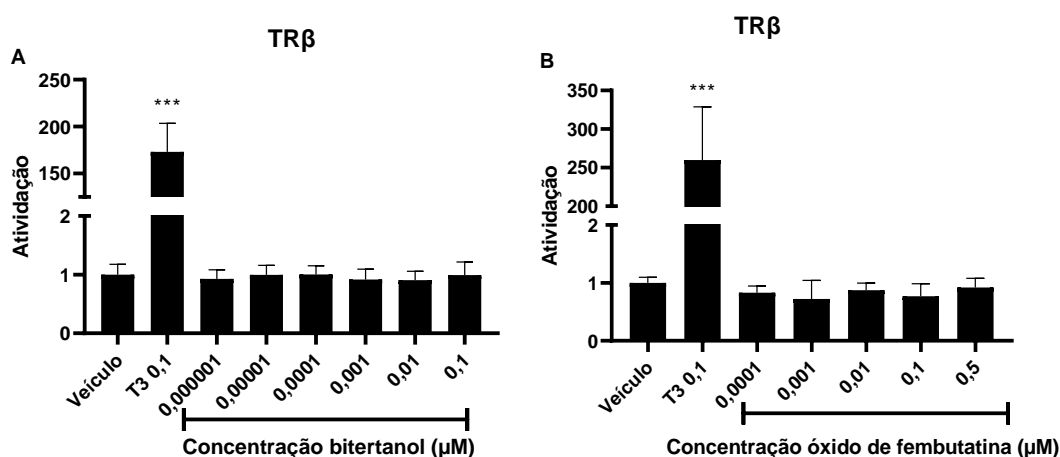


Figura 12. Efeito dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina sobre a atividade transcricional do TR β . Aproximadamente 25.000 células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do TR β e seu elemento responsivo fusionado ao gene repórter da luciferase e tratadas com DMSO, T3 ou concentrações crescentes dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina. Após 24 horas, a atividade transcricional do TR β foi quantificada indiretamente pela mensuração da atividade da luciferase em luminômetro. Os experimentos foram realizados três vezes em triplicata. * $p < 0.05$

5.1.6 PXR

Para avaliar o efeito dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina sobre a atividade transcricional do PXR, células HeLa foram tratadas com DMSO (controle negativo), rifampicina 10 μ M (controle positivo) ou concentrações crescentes de bitertanol de 0,000001 a 0,1 μ M ou óxido de fembutatina de 0,0001 a 0,5 μ M, durante 24 horas.

Como mostra a Figura 12, nenhum dos agrotóxicos modificou a atividade transcricional do PXR nas concentrações utilizadas, em relação ao veículo. Assim como nos outros receptores testados, conforme esperado, o agonista do receptor, no caso a rifampicina, agonista de PXR, promoveu ativação de 4,5 (12A) e 7,9 (12B) vezes.

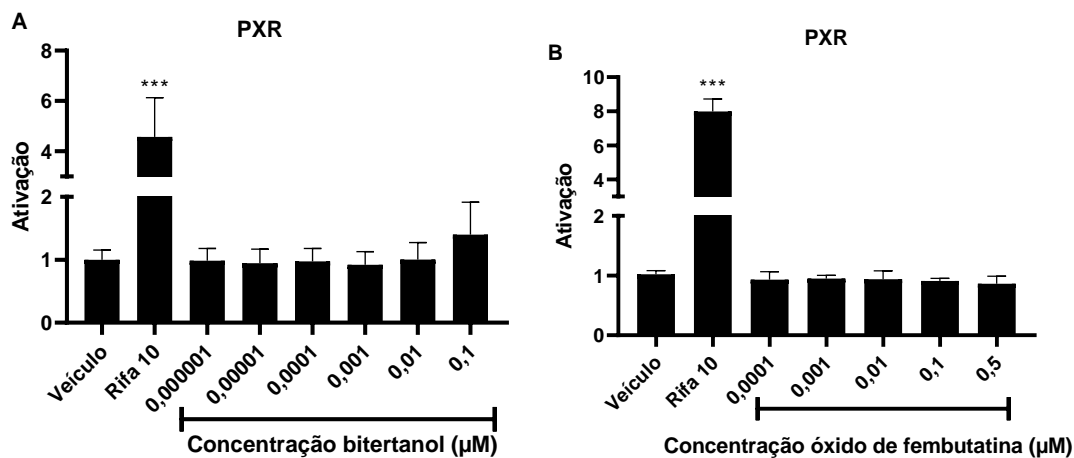


Figura 13. Efeito dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina sobre a atividade transcricional do PXR. Aproximadamente 25.000 células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do PXR e seu elemento responsivo fusionado ao gene repórter da luciferase e tratadas com DMSO, rifampicina ou concentrações crescentes dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina. Após 24 horas, a atividade transcricional do PXR foi quantificada indiretamente pela mensuração da atividade da luciferase em luminômetro. Os experimentos foram realizados três vezes em triplicata. * $p < 0.05$.

5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÓXIDO DE FEMBUTATINA SOBRE O PPAR γ COM A MUTAÇÃO C285S

Para avaliar se a cisteína 285, presente no LBD do PPAR γ , é necessária para a ativação desse receptor pelo óxido de fembutatina, as células HeLa foram transfectadas com o plasmídeo selvagem GAL4-PPAR γ ou com o plasmídeo GAL4-PPAR γ C285S, com a substituição da cisteína por uma serina na posição 285. Também foi transfectado o elemento responsivo fusionado ao gene repórter da luciferase.

Após transfectadas, as células foram tratadas com DMSO (controle negativo), rosiglitazona 10 µM (controle positivo) ou óxido de fembutatina, nas concentrações de 0,01 a 0,5µM, durante 24 horas.

Como podemos observar na Figura 13, a substituição da cisteína pela serina na posição 285 no LBD, aboliu a atividade transcricional do PPAR γ induzida pelo óxido de fembutatina na concentração de 0,5 µM. Esse resultado mostra que a cisteína 285 é fundamental para a ativação do PPAR γ por esse agrotóxico.

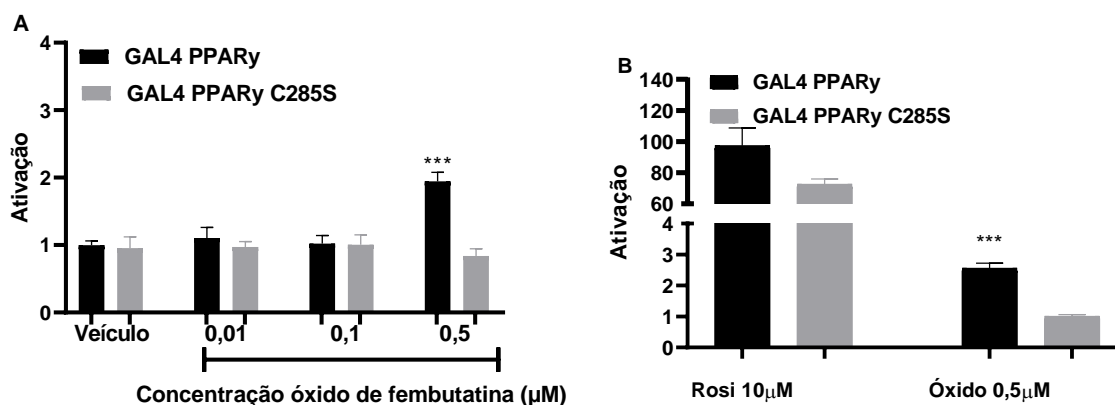


Figura 14. Avaliação do efeito do agrotóxico óxido de fembutatina sobre o PPAR γ C285S. Aproximadamente 25.000 células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do PPAR γ com a mutação C285S ou com o plasmídeo selvagem PPAR γ e seu elemento responsivo fusionado ao gene repórter da luciferase e tratadas com veículo, rosiglitazona ou concentrações crescentes do agrotóxico óxido de fembutatina. Após 24 horas, a atividade transcricional do PPAR γ foi quantificada indiretamente pela mensuração da atividade da luciferase em luminômetro. A figura representa os resultados dos três experimentos independentes realizados em triplicata. Figura A, *** $p < 0.05$ comparado ao veículo e Figura B, *** $p < 0.05$ comparando GAL4 PPAR γ e GAL4 PPAR γ C285S.

5.3 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS 3T3-L1 NA PRESENÇA DO ANTAGONISTA DE PPAR γ , T00700907

Considerando resultados prévios mostrando que os agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina promovem acúmulo lipídico nas células 3T3-L1, decidiu-se avaliar se esse efeito é dependente da ativação do PPAR γ . Para isso, durante todo período de diferenciação, as células foram tratadas com T0070907 na concentração de 1 μ M, a cada 12 horas.

Como mostra a Figura 14, a exposição ao antagonista reduziu o acúmulo de lipídeos induzido por ambos os agrotóxicos, bitertanol e óxido de fembutatina, após 15 dias de tratamento. Resultados semelhantes também foram observados nas células tratadas com rosiglitazona, agonista total de PPAR γ nas concentrações de 0,1 μ M ou 1 μ M.

Este resultado sugere que o efeito adipogênico dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina é dependente da ativação de PPAR γ .

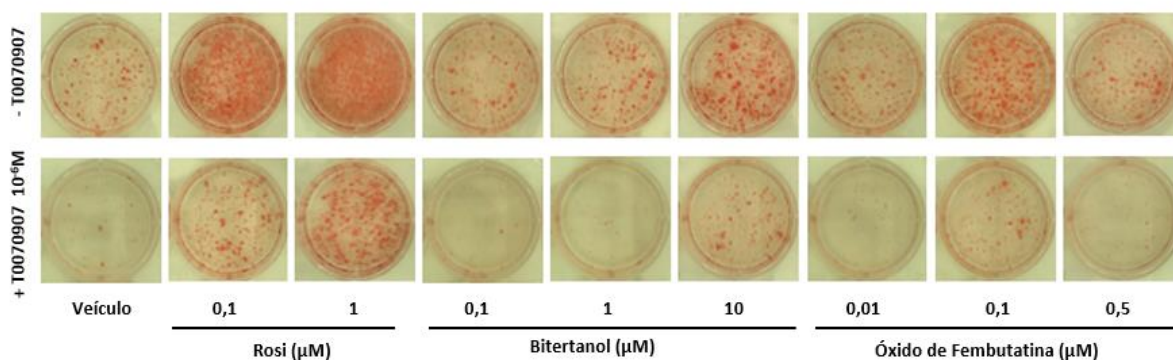


Figura 15. Diferenciação das células 3T3-L1 na presença do antagonista de PPAR γ T0070907. Células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina e dexametasona e tratadas com veículo, rosiglitazona 0,1 μ M ou 1 μ M ou diferentes concentrações dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina na presença ou na ausência de T0070907 1 μ M. As células diferenciadas por 15 dias foram fixadas, coradas com óleo vermelho O e fotodocumentadas. O experimento foi realizado três vezes.

6 DISCUSSÃO

Resultados prévios do grupo de pesquisa do qual faço parte mostraram que os agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina possuem efeito adipogênico em cultura de células de mamíferos. Em ensaios de transfecção e gene repórter, o óxido de fembutatina promoveu ativação parcial do PPAR γ , podendo ser considerado agonista parcial deste receptor. Por outro lado, nem o óxido de fembutatina ou o bitertanol ativaram o RXR α . Ensaios de diferenciação evidenciaram que o bitertanol e o óxido de fembutatina promoveram acúmulo lipídico em células 3T3-L1, possuindo, portanto, efeito adipogênico.

Buscando dar continuidade ao estudo destes dois agrotóxicos, no presente trabalho foram investigados alguns mecanismos que podem estar envolvidos no efeito adipogênico dessas substâncias, além de avaliar seus possíveis efeitos sobre outros membros da superfamília de receptores nucleares.

Considerando que o óxido de fembutatina ativou o PPAR γ e que ele e o bitertanol não ativaram o RXR α , foram investigados seus possíveis efeitos sobre os outros isotipos de PPAR, além dos receptores nucleares GR, TR α , TR β e PXR. Os resultados dos experimentos mostram que o bitertanol e o óxido de fembutatina não foram capazes de promover ativação desses receptores.

Embora não tenha sido observado efeito ativador do óxido de fembutatina e do bitertanol sobre os receptores nucleares investigados, na literatura há estudos mostrando que os agrotóxicos têm a capacidade de interferir com a atividade transcricional dos receptores nucleares.

Em 2016, Zhang e colaboradores, realizaram um estudo com 34 agrotóxicos sobre atividade transcricional do GR, utilizando ensaios de transfecção e gene repórter. Assim como no presente estudo, nenhum dos compostos estudados foi capaz de promover ativação do GR (128).

O estudo de Kanayama e colaboradores (2004), mostrou que o trifenilestanho e tributilestanho promoveram a ativação do PPAR γ e do RXR α (129). Em 2011, Kojima e colaboradores, analisou a ação de 200 agrotóxicos sobre a atividade transcricional do PXR, usando ensaios *in vitro* de transfecção e gene repórter. Foi comparado a atividade agonista dos agrotóxicos sobre o PXR humano e PXR de camundongo e constataram que dos 200 compostos, 106 ativaram o PXR humano e 93 o de camundongo. Assim como no presente estudo, o bitertanol também não ativou o PXR (130).

O estudo de Takeuchi e colaboradores (2006) também analisou os efeitos de 200

agrotóxicos sobre a atividade transcricional do PPAR α e os resultados mostraram efeito agonista de apenas dois compostos. Um dos agrotóxicos avaliados foi o bitertanol que, assim como no presente estudo, também não apresentou atividade sobre o PPAR α (57).

Um estudo realizado por Li e colaboradores (2019), investigou os efeitos de dois agrotóxicos do grupo dos organoestânicos, o hidróxido de fentina e o óxido de fembutatina, sobre o TR β , utilizando ensaio de transfecção e gene repórter. O hidróxido de fentina estimulou fracamente a atividade transcricional de TR β , mas assim como no presente estudo, o óxido de fembutatina não apresentou atividade sobre esse receptor (131).

Não foram encontrados na literatura outros trabalhos avaliando a ação dos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina sobre o PPAR β/δ e o TR α .

Considerando que o óxido de fembutatina promoveu ativação do PPAR γ , decidiu-se investigar se a cisteína 285, é importante para a atividade transcricional deste receptor induzida pelo óxido de fembutatina. Para tanto, foi utilizado um plasmídeo que expressa a mutação C285S, ou seja, apresenta substituição da cisteína 285 por uma serina. Os resultados mostraram que a presença da mutação diminuiu consideravelmente a atividade transcricional induzida pelo óxido de fembutatina, sugerindo que a cisteína 285 é importante para a ativação do PPAR γ promovida por esse composto. A cisteína 285 é crítica para a ativação do PPAR γ por ligantes endógenos (132). Dessa forma, os resultados do presente estudo sugerem que, ao entrar no organismo, o óxido de fembutatina se comporta como ligantes endógenos ao interagir com o LBD do PPAR γ .

Resultados semelhantes foram descritos no estudo de Milton e colaboradores (2017), que mostraram que a ativação do PPAR γ pelos organoestânicos cloreto de tributilestanho, diacetato, dicloreto, dilaurato e maleato dibutilestanho, também é abolida na presença da mutação C285S (24).

No ensaio com o antagonista de PPAR γ T0070907, sua presença reduziu significativamente o acúmulo de lipídeos induzido pelos agrotóxicos bitertanol e óxido de fembutatina, sugerindo que os efeitos desses compostos são dependentes da ativação desse receptor. Entretanto, foi observada uma menor capacidade deste antagonista em inibir a adipogênese induzida pela rosiglitazona. Essa insuficiência do antagonista pode ter relação com a concentração utilizada, que foi de 1 μ M, entretanto, outros fatores devem ser levados em consideração.

O antagonista T0070907 se liga covalentemente ao PPAR γ e possui uma afinidade de 1nM, já rosiglitazona, possui afinidade de 4nM (133,134). Portanto, o esperado era que esse antagonista bloqueasse completamente o acúmulo lipídico promovido pela rosiglitazona,

diferente do que foi observado. Uma possível explicação para a redução apenas parcial do acúmulo lipídico, é a existência de um sítio de ligação alternativo no PPAR γ , que não é bloqueado pelo T0070907 (135).

Os resultados deste trabalho sugerem que tanto o bitertanol quanto o óxido de fembutatina, possuem efeito adipogênico, embora o mecanismo de ação do bitertanol não tenha sido encontrado.

Os resultados desse trabalho podem contribuir para a melhor compreensão dos impactos que esses compostos podem causar na saúde humana e de outros animais. Adicionalmente, eles podem auxiliar a fundamentar decisões governamentais relativas ao emprego desses compostos, bem como incentivar a busca por ativos eficientes, sem ou com menores impactos negativos. Entretanto, mais estudos são necessários para melhor elucidar seus mecanismos de ação.

7 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que o bitertanol e óxido de fembutatina não apresentam atividade agonista sobre os receptores do GR α , PPAR α , PPAR β , TR α , TR β e PXR e que a cisteína 285, é essencial para a ativação do PPAR γ pelo óxido de fembutatina. Adicionalmente, foi possível concluir que o acúmulo lipídico promovido pelo bitertanol e óxido de fembutatina em células 3T3-L1, é dependente da ativação do PPAR γ .

REFERÊNCIAS

1. Grün F, Blumberg B. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2007;8(2):161–71.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global assessment on the state of the science of endocrine disruptors [Homepage na Internet]. [acesso em 2022 mai 25]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67357>
3. European Commission. Reports - Endocrine disruptors - Environment - European Commission [Homepage na Internet]. [acesso em 27 Mai 2022]. Disponível em: https://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/documents/reports_en.htm
4. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev*. 2009; 30(4):293–342.
5. Pontelli RCN, Nunes AA, de Oliveira SVWB. Impacto na saúde humana de disruptores endócrinos presentes em corpos hídricos: existe associação com a obesidade? *Cien Saude Colet*. 2016; 21(3):753–66.
6. Kim K, Kabir E, environment SJ-S of the total, 2017 undefined. Exposure to pesticides and the associated human health effects. Elsevier, 575 p. 525-535. 2017
7. Grün F, Blumberg B. Environmental Obesogens: Organotins and Endocrine Disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology*. 2006;147(6):s50-s5.
8. Janesick A, Blumberg B. Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev*. 2011 Mar;93(1):34–50.
9. M GS. OUP Academic. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. 1 Mar. 1998 [acesso em: 29 mai 2022]; Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/67/3/563S/4666077>
10. WHO | World Health Organization [Homepage na Internet]. Obesity and overweight; [acesso em: 27 jun 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
11. WHO | World Health Organization [Homepage na Internet]. Obesity; [acesso em: 21 jun 2022]. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1
12. Petrilli CM, et al. Factors associated with hospitalization and critical illness among 4,103 patients with COVID-19 disease in New York City. medrxiv, 2020.

13. World Obesity Federation [Homepage na Internet]. [acesso em: 11 agosto 2022]. Disponível em: <https://www.worldobesity.org/>
14. Abeso. Mapa da Obesidade; [Homepage na Internet]. [acesso em: 29 maio 2022]. Disponível em: <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>.
15. Delfosse V, Maire A, Balaguer P, Bourguet W. A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds. *Act Pharmacol Scand*. 2015;36(1):34-50.
16. Robinson-Rechavi M, Garcia HE, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *Journal of Cell Science*. 2003; 116(4):585–6.
17. Evans RM. The Nuclear Receptor Superfamily: A Rosetta Stone for Physiology. *Molecular Endocrinology*. 2005; 19(6):1429-38.
18. Chawla A, Schwarz E J, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology*. 1994;135(2):798-800.
19. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994;79(7):1147-56.
20. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism*. *Endocrine Reviews*. 1999; 20(5):649-88.
21. Juge-Aubry C, Pernin A, Favez T, Burger AG, Wahli W, Meier CA, Desvergne B. DNA Binding Properties of Peroxisome Proliferator-activated Receptor Subtypes on Various Natural Peroxisome Proliferator Response Elements. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272(40):25252-9.
22. Krey G, Keller H, Mahfoudi A, Medin J, Ozato K, Dreyer C, Wahli W. Xenopus peroxisome proliferator activated receptors: Genomic organization, response element recognition, heterodimer formation with retinoid X receptor and activation by fatty acids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1993; 47(1-6):65-73.
23. Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Cubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B. Endocrine-Disrupting Organotin Compounds Are Potent Inducers of Adipogenesis in Vertebrates. *Molecular Endocrinology*. 2006;20(9):2141-55.
24. Milton FA, Lacerda MG, Sinoti SBP, Mesquita PG, Prakasan D, Coelho MS, de Lima CL, Martini AG, Pazzino GT, Borin MD, Amato AA, Neves FD. Dibutyltin

- Compounds Effects on PPAR γ /RXR α Activity, Adipogenesis, and Inflammation in Mammalians Cells. *Frontiers in Pharmacology*. 2017;8.
25. Bility M, et al. Activation of Mouse and Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) by Phthalate Monoesters. *Toxicological Sciences*. 2004;82(1):170-82.
 26. Riu A, Grimaldi M, le Maire A, Bey G, Phillips K, Boulahtouf A, Perdu E, Zalko D, Bourguet W, Balaguer P. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Is a Target for Halogenated Analogs of Bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*. 2011;119(9):1227-32.
 27. Monneret C. What is an endocrine disruptor?. *Comptes Rendus Biologies*. 2017. 340(9-10):403–5.
 28. USEPA E. US EPA. Endocrine Disruption | US EPA. [Homepage na Internet]. [acesso em: 27 maio 2022]. Disponível em: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption>
 29. Waissmann W. Health surveillance and endocrine disruptors. *Cadernos de Saúde Pública*. 2002;18(2):511-7.
 30. Gültekin I, Ince NH. Synthetic endocrine disruptors in the environment and water remediation by advanced oxidation processes. *Journal of Environmental Management*. 2007; 85(4):816-32.
 31. Silva PC. Efeitos do bisfenol a sobre o sistema endócrino-principais alterações nos exames laboratoriais da função reprodutiva e da tireóide-. *appuffbr*. 2018
 32. Lacerda M. Efeito dos organoestânicos sobre a atividade transcricional de receptores nucleares, adipogênese e inflamação em células de mamíferos. Brasília. Tese Doutorado - Universidade de Brasília, 2016.
 33. Alves C. C, et al. Desreguladores Endócrinos: Informação para o Pediatra. 2021.
 34. De Coster S, van Larebeke N. Endocrine-Disrupting Chemicals: Associated Disorders and Mechanisms of Action. *Journal of Environmental and Public Health*. 2012:1-52.
 35. Giwercman A, Carlsen E, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for Increasing Incidence of Abnormalities of the Human Testis: A Review. *Environmental Health Perspectives*. 1993;101:65.
 36. Grün F, Blumberg B. Environmental Obesogens: Organotins and Endocrine Disruption via Nuclear Receptor Signaling. *Endocrinology*. 2006; 147(6):s50—s55.
 37. IBGE. Agência de Notícias - IBGE. Um em cada quatro adultos do país estava obeso em 2019; Atenção Primária foi bem avaliada | Agência de Notícias; [Homepage na Internet], [acesso em 28 jun 2022]. Disponível em:

- <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/29204-um-em-cada-quatro-adultos-do-pais-estava-obeso-em-2019>.
38. Baillie-Hamilton PF. Chemical Toxins: A Hypothesis to Explain the Global Obesity Epidemic. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2002;8(2):185-92.
 39. Masuno H, Iwanami J, Kidani T, Sakayama K, Honda K. Bisphenol A accelerates terminal differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Toxicol Sci*. 2005 Apr;84(2):319–27.
 40. Alonso-Magdalena P, Vieira E, Soriano S, Menes L, Burks D, Quesada I, Nadal A. Bisphenol A Exposure during Pregnancy Disrupts Glucose Homeostasis in Mothers and Adult Male Offspring. *Environmental Health Perspectives*. 2010;118(9):1243-50.
 41. Peres B, Araujo. Investigação do potencial adipogênico dos agrotóxicos abamectina e carbosulfano. Nova Friburgo. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Biomedicina] - Universidade federal Fluminense; 2019.
 42. Rodrigues K. Investigação do potencial adipogênico dos agrotóxicos ametrina e óxido de fembutatina. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Biomedicina] - Universidade federal Fluminense; 2019.
 43. Bittencourt. M B. Estudo do efeito adipogênico dos agrotóxicos acefato e bitertanol em cultura de células de mamíferos. Trabalho de Conclusão de Curso [Graduação em Biomedicina] - Universidade federal Fluminense ; 2021;
 44. Ministério do Meio Ambiente. Agrotóxicos [Homepage na Internet]. [acesso em 27 de maio 2022]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm
 45. ANVISA. Manual de Procedimentos para Registro de Agrotóxicos [Internet]. Brasília; 2012. 68 p. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>
 46. Franco C. A (des) construção da agenda política de controle dos agrotóxicos no Brasil. 2016.
 47. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Agro 2017: : resultados preliminares mostram queda de 2,0% no número de estabelecimentos e alta de 5% na área total. *Estatísticas Econômicas*. 2018. [Homepage na Internet] [acesso em 27 Mai 2022] Disponível em: <https://censoagro2017.ibge.gov.br/>
 48. ANVISA. Regularização de Produtos - Agrotóxicos. Regularização de Produtos - Agrotóxicos. 2022 [Homepage na Internet] [acesso em 27 Mai 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br>

49. Ministério da Agricultura. [Homepage na Internet]. Relatório Consolidado de Produtos Formulados. 2021. [acesso em 27 Mai 2022]. Disponível em:
<https://indicadores.agricultura.gov.br/agrofit/index.htm>
50. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA). [Homepage na Internet] Relatórios de comercialização de agrotóxicos. 2021. [acesso em 27 Mai 2022]. Disponível em:
<http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>
51. Fiocruz. [Homepage na Internet]. Afinal, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxico do mundo? | CEE Fiocruz. 2021 [acesso em 27 Mai 2022]. Disponível em:
<https://cee.fiocruz.br/?q=node/1002>
52. Moraes, Fracalossi R. Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. 2019 [acesso em 27 Mai 2022]; Disponível em:
<https://www.econstor.eu/handle/10419/211457>
53. BRASIL. Resolução RDC N° 294, DE 29 DE JULHO DE 2019. Aprova o “Sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira, e dá outras providências. Brasília: ANVISA; 2019. [acesso em 27 Mai 2022]. Disponível em:<https://www legisweb.com.br/legislacao/?id=381153>
54. Intoxicação Aguda por Agrotóxicos | Secretaria da Saúde [Homepage na Internet]. [acesso em 27 Mai 2022]. Disponível em:
<https://www.saude.pr.gov.br/Pagina/Intoxicacao-Aguda-por-Agrotoxicos>
55. Klaassen CD. Casarett and Doull’s toxicology: the basic science of poisons. 8th ed. Journal of the American College of nutricion. New york. 2013; 21(3):289-90
56. ANVISA. [Homepage na Internet]. Monografias autorizadas. 2022 [acesso em 27 Mai 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas-por-letra>.
57. Takeuchi S, Matsuda T, Kobayashi S, Takahashi T, Kojima H. In vitro screening of 200 pesticides for agonistic activity via mouse peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and PPAR γ and quantitative analysis of in vivo induction pathway. Toxicology and Applied Pharmacology. 2006; 217(3):235-44.
58. National Center for Biotechnology Information. Bitertanol | C₂₀H₂₃N₃O₂ - PubChem. [citado em 27 Mai 2022]. Disponível em:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bitertanol>

59. União Europeia. REGULAMENTO (UE) 2017/693 DA COMISSÃO de 7 de abril de 2017 que altera os anexos II, III e V do Regulamento (CE) n.o 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho no que se refere aos limites máximos de resíduos de bitertanol, clormequato e tebufenpirade. Bruxelas; 2017.
60. ANVISA. RDC no 1.967 de 18 de Julho de 2019. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 jul. 2019. Seção 1, p. 64 [Homepage na Internet]. 2019 [acesso em 27 Mai 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-excluidas-por-letra>
61. Kjærstad MB, Taxvig C, Nellemann C, Vinggaard AM, Andersen HR. Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. *Reproductive Toxicology*. 2010;30(4):573-82.
62. Taxvig C, Hass U, Axelstad M, Dalgaard M, Boberg J, Andeasen HR, Vinggaard AM. Endocrine-Disrupting Activities In Vivo of the Fungicides Tebuconazole and Epoxiconazole. *Toxicological Sciences*. 2007;100(2):464-73.
63. Lv X, Pan L, Wang J, Lu L, Yan W, Zhu Y, Xu Y, Guo M, Zhuang S. Effects of triazole fungicides on androgenic disruption and CYP3A4 enzyme activity. *Environmental Pollution*. 2017;222:504-12.
64. National Center for Biotechnology Information. PubChem. [Homepage na Internet]. Fenbutatin oxide | C₆₀H₇₈O₅Sn₂ - PubChem . [acesso em 27 Mai 2022]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fenbutatin-oxide>
65. Reddy PS, Pushpalatha T, Reddy PS. Reduction of spermatogenesis and steroidogenesis in mice after fentin and fenbutatin administration. *Toxicology Letters*. 2006;166(1):53-9.
66. Sharan S, Nikhil K, Roy P. Disruption of thyroid hormone functions by low dose exposure of tributyltin: An in vitro and in vivo approach. *General and Comparative Endocrinology*. 2014;206:155-65.
67. Aranda A, Pascual A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiological Reviews*. 2001;81(3):1269-304.
68. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacological Reviews*. 2006; 58(4):685-704.
69. Helsen C, Claessens F. Looking at nuclear receptors from a new angle. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014;382(1):97-106.
70. Laudet V. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an

- ancestral orphan receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*. 1997. 19(3):207-26.
71. Renaud JP, Moras D. Structural studies on nuclear receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57(12):1748–69.
 72. Zilliacus J, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Wright AP. Evolution of distinct DNA-binding specificities within the nuclear receptor family of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994; 91(10):4175-9.
 73. Olefsky JM. Nuclear Receptor Minireview Series. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(40):36863–4.
 74. Dias S. Estudos estruturais dos receptores nucleares humanos para os hormônios tireoidianos Isoforma $\beta 1$ (hTR $\beta 1$) e para o ácido retinóico 9-cis Isoforma a (hRXRa). 2007.
 75. Ribeiro RCJ, Kushner PJ, Baxter JD. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med*. 1995;46:443–53.
 76. Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG. Nuclear receptor coactivators. *Current Opinion in Cell Biology*. 1997; 9(2):222-32.
 77. Evans RM. PPARs and the complex journey to obesity. *The Keio Journal of Medicine*. 2004;53(2):53-8.
 78. Sonoda J, Pei L, Evans RM. Nuclear receptors: Decoding metabolic disease. *FEBS Letters*. 2007;582(1):2-9.
 79. Burns K, Vandenheuvell J. Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2007; 1771(8):952-60.
 80. Rizzo G, Fiorucci S. PPARs and other nuclear receptors in inflammation. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006;6(4):421-7.
 81. Lefebvre P. Sorting out the roles of PPAR in energy metabolism and vascular homeostasis. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(3):571-80.
 82. Peeters A, Baes M. Role of PPAR in Hepatic Carbohydrate Metabolism. *PPAR Research*. 2010:1-12.
 83. Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, Rigou G, Delataille P, Millatt LJ, Baron M, Lucas A, Tailleux A, Hum DW, Ratziu V, Cariou B, Hanf R. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2013;58(6):1941-52.
 84. Francque S, Verrijken A, Caron S, Prawitt J, Paumelle R, Derudas B, Lefebvre P,

- Taskinen MR, Van Hul W, Mertens I, Hubens G, Van Marck E, Michielsens P, Van Gaal L, Staels B. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*. 2015; 63(1):164-73.
85. Bougarne N, Weyers B, Desmet SJ, Deckers J, Ray DW, Staels B, De Bosscher K. Molecular Actions of PPAR α in Lipid Metabolism and Inflammation. *Endocrine Reviews*. 2018;39(5):760-802.
 86. Ferri N, Corsini A, Sirtori C, Ruscica M. PPAR- α agonists are still on the rise: an update on clinical and experimental findings. *Expert Opin Investig Drugs*. 2017, 4;26(5):593–602.
 87. Kersten S, Stienstra R. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie* . 2017;136:75-84.
 88. Ghonem NS, Assis DN, Boyer JL. Fibrates and cholestasis. *Hepatology*. 2015;62(2):635-43.
 89. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002;53:409–35.
 90. Costet P, Legendre C, Moré J, Edgar A, Galtier P, Pineau T. Peroxisome Proliferator-activated Receptor α -Isoform Deficiency Leads to Progressive Dyslipidemia with Sexually Dimorphic Obesity and Steatosis. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(45):29577-85.
 91. Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β , and - γ in the adult rat. *Endocrinology*. 1996; 137(1):354-66.
 92. Holst D, Luquet S, Nogueira V, Kristiansen K, Leverve X, Grimaldi PA. Nutritional regulation and role of peroxisome proliferator-activated receptor δ in fatty acid catabolism in skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2003; 1633(1):43-50.
 93. Oliver WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor α agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001 Apr 17;98(9):5306–11.
 94. Matsusue K, Peters JM, Gonzalez FJ. PPAR β/δ potentiates PPAR γ -stimulated adipocyte differentiation. *The FASEB Journal*. 2004; 18(12):1477-9.
 95. Berger J, Grimaldi P, Lazar MA, Michalik L, Auwerx J, Berger JP, et al. International

- Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. 2006
96. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metabolism*. 2006;4(4):263-73.
 97. Botta M, Audano M, Sahebkar A, Sirtori C, Mitro N, Ruscica M. PPAR Agonists and Metabolic Syndrome: An Established Role? *International Journal of Molecular Science*. 2018; 19(4):1197.
 98. Dubuquoy L, Rousseaux C, Thuru X, Gut LP-B. Undefined. PPAR γ as a new therapeutic target in inflammatory bowel diseases. 2006.
 99. Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. 1998; 47(4):507-14.
 100. Rosen ED, Spiegelman BM. PPAR γ : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. *Journal of Biological Chemistr*. 2001; 276(41):37731-4.
 101. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An Antidiabetic Thiazolidinedione Is a High Affinity Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ). *Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270(22):12953-6.
 102. Ahmed S, Atlas E. Bisphenol S- and bisphenol A-induced adipogenesis of murine preadipocytes occurs through direct peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *Int J Obes* 2016 4010 [Internet]. 2016 May 13 [cited 2022 Jul 7];40(10):1566–73. Available from: <https://www.nature.com/articles/ijo201695>
 103. Waku T, Shiraki T, Oyama T, Morikawa K. Atomic structure of mutant PPAR γ LBD complexed with 15d-PGJ2 : Novel modulation mechanism of PPAR γ /RXR α function by covalently bound ligands. *FEBS Letters*. 2008; 583(2):320-4.
 104. Waku T, Shiraki T, Oyama T, Fujimoto Y, Maebara K, Kamiya N, Jingami H, Morikawa K. Structural Insight into PPAR γ Activation Through Covalent Modification with Endogenous Fatty Acids. *Journal of Molecular Biolog*. 2009; 385(1):188-99.
 105. Shiraki T, Kamiya N, Shiki S, Kodama TS, Kakizuka A, Jingami H. α,β -Unsaturated Ketone Is a Core Moiety of Natural Ligands for Covalent Binding to Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ . *Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(14):14145-53
 106. Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Flamant F, Legrand C, Savatier P, Laudet V, Samarut J. Identification of Transcripts Initiated from an Internal Promoter in the c-erbA α Locus That Encode Inhibitors of Retinoic Acid Receptor- α and Triiodothyronine

- Receptor Activities. *Molecular Endocrinology*. 1997; 11(9):1278-90.
107. Lazar MA. Thyroid Hormone Receptors: Multiple Forms, Multiple Possibilities*. *Endocrine Reviews*. 1993; 14(2):184-93.
 108. Yen PM. Physiological and molecular basis of Thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1097–142.
 109. Hernández A, Obregón MJ. Presence and mRNA expression of T3 receptors in differentiating rat brown adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1996; 121(1):37-46.
 110. Bianco AC, Silva JE. Cold exposure rapidly induces virtual saturation of brown adipose tissue nuclear T3 receptors. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 1988; 255(4):E496—E503.
 111. Ye L, Li Y-L, Mellström K, Mellin C, Bladh L-G, Koehler K, et al. Thyroid Receptor Ligands. 1. Agonist Ligands Selective for the Thyroid Receptor β 1. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2003;46(9):1580–8.
 112. Malm J, Färnegårdh M, Grover GJ, Ladenson PW. Thyroid hormone antagonists: potential medical applications and structure activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*. 2009;16(25):3258–66.
 113. Mishra A, Zhu XG, Ge K, Cheng SY. Adipogenesis is differentially impaired by thyroid hormone receptor mutant isoforms. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2010; 44(4):247-55.
 114. Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. The human glucocorticoid receptor: Molecular basis of biologic function. *Steroids*. 2010; 75(1):1-12.
 115. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2016;42(1):15–31.
 116. Oakley RH, Jewell CM, Yudt MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA. The Dominant Negative Activity of the Human Glucocorticoid Receptor β Isoform. *Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274(39):27857-66.
 117. Nicolaides N, Chrousos G.. Glucocorticoid receptor. 2020.
 118. Odermatt A, Gumy C, Atanasov AG, Dzykanchuk AA. Disruption of glucocorticoid action by environmental chemicals: Potential mechanisms and relevance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2006; 102(1-5):222-31.
 119. Zhang J, Yang Y, Liu W, Schlenk D, Liu J. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and corticosteroid homeostasis are potential targets for endocrine-disrupting

- chemicals. *Environment International*. 2019; 133:105133.
120. Sargis RM, Johnson DN, Choudhury RA, Brady MJ. Environmental Endocrine Disruptors Promote Adipogenesis in the 3T3-L1 Cell Line through Glucocorticoid Receptor Activation. *Obesity*. 2010; 18(7):1283-8.
 121. Pavsek P. Pregnane X Receptor (PXR)-Mediated Gene Repression and Cross-Talk of PXR with Other Nuclear Receptors via Coactivator Interactions. *Frontiers in Pharmacology*. 2016, 7.
 122. Zhang B, Xie W, Krasowski MD. PXR: A xenobiotic receptor of diverse function implicated in pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*. 2008 Nov;9(11):1695–709.
 123. Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM. The Nuclear Pregnane X Receptor: A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism. *Endocrine Reviews*. 2002; 23(5):687-702.
 124. Wei Y, Tang C, Sant V, Li S, Poloyac SM, Xie W. A Molecular Aspect in the Regulation of Drug Metabolism: Does PXR-Induced Enzyme Expression Always Lead to Functional Changes in Drug Metabolism? *Current Pharmacology Reports*. 2016;2(4):187-92.
 125. Zhou J, Zhai Y, Mu Y, Gong H, Uppal H, Toma D, Ren S, Evans RM, Xie W. A Novel Pregnane X Receptor-mediated and Sterol Regulatory Element-binding Protein-independent Lipogenic Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2006; 281(21):15013-20.
 126. Xiang D, Chu T, Li M, Wang Q, Zhu G. Effects of pyrethroid pesticide cis-bifenthrin on lipogenesis in hepatic cell line. *Chemosphere*. 2018,1;201:840–9.
 127. Lind PM, Lind L. Endocrine-disrupting chemicals and risk of diabetes: an evidence-based review. *Diabetologia*. 2018; 61(7):1495–502.
 128. 1. Zhang J, Zhang J, Liu R, Gan J, Liu J, Liu W. Endocrine-Disrupting Effects of Pesticides through Interference with Human Glucocorticoid Receptor. *Environmental Science & Technology*. 2016; 50(1):435–43.
 129. Kanayama T, Kobayashi N, Mamiya S, Nakanishi T, Nishikawa JI. Organotin Compounds Promote Adipocyte Differentiation as Agonists of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ /Retinoid X Receptor Pathway. *Molecular Pharmacol*. 2004; 67(3):766-74.
 130. Kojima H, Sata F, Takeuchi S, Sueyoshi T, Nagai T. Comparative study of human and mouse pregnane X receptor agonistic activity in 200 pesticides using in vitro reporter gene assays. *Toxicology*. 2011, 280(3):77-87.
 131. Li S, Qiao K, Jiang Y, Wu Q, Coffin S, Gui W, Zhu G. Disruptive effects of two

- organotin pesticides on the thyroid signaling pathway in *Xenopus laevis* during metamorphosis. *Science of The Total Environment*. 2019; 697:134140.
132. Waku T, Shiraki T, Oyama T, Fujimoto Y, Maebara K, Kamiya N, Jingami H, Morikawa K. Structural Insight into PPAR γ Activation Through Covalent Modification with Endogenous Fatty Acids. *Journal of Molecular Biology*. 2009; 385(1):188-99.
133. Lee G, Elwood F, McNally J, Weiszmann J, Lindstrom M, Amaral K, Nakamura M, Miao S, Cao P, Learned RM, Chen JL, Li Y. T0070907, a Selective Ligand for Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ , Functions as an Antagonist of Biochemical and Cellular Activities. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(22):19649-57.
134. Puhl AC, Milton FA, Cvorov A, Sieglaff DH, Campos JCL, Bernardes A, et al. Mechanisms of Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ Regulation by Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs. *Nuclear Receptor Signaling*. 2015;13(1):nrs.13004.
135. Heidari Z, Chrisman IM, Nemetchek MD, Novick SJ, Blayo AL, Patton T, Mendes DE, Diaz P, Kamenecka TM, Griffin PR, Hughes TS. Definition of functionally and structurally distinct repressive states in the nuclear receptor PPAR γ . *Nature Communications*. 2019; 10(1).