

KATHLEN DERUCI RODRIGUES

Investigação do potencial adipogênico dos agrotóxicos ametrina e carbosulfano
em cultura de células de mamíferos.

BRASÍLIA, 2022

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

KATHLEN DERUCI RODRIGUES

Investigação do potencial adipogênico dos agrotóxicos ametrina e carbosulfano
em cultura de células de mamíferos.

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Angélica Amorim Amato
Co-orientadora: Profa. Dra. Flora Aparecida Milton

BRASÍLIA
2022

KATHLEN DERUCI RODRIGUES

Investigação do potencial adipogênico dos agrotóxicos ametrina e carbosulfano
em cultura de células de mamíferos.

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Angélica Amorim Amato (Presidente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Flora Aparecida Milton (Coorientadora)
Universidade de Brasília

Prof. Dr. Amilcar Sabino Damazo
Universidade de Brasília

Dra. Cinthia Gabriel Meireles
Ministério da Saúde

Dr. Kaian Amorim Teles
Ministério da Saúde no Departamento de Ciências e Tecnologia

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai Carlos Henrique e ao meu irmão Carlos Henrique Junior por me apoiarem nessa nova fase da minha vida.

À minha mãe Eliane e aos meus avós Zenir e José (*in memoriam*) que, mesmo não estando presentes fisicamente, estão sempre comigo em pensamento. Eles me ensinaram a correr atrás dos meus sonhos e a nunca desistir.

À minha orientadora Profa. Dra. Angélica Amorim Amato e ao Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves pelos ensinamentos que me foram passados e pelo auxílio durante esses anos de mestrado.

À minha coorientadora Profa. Dra. Flora Aparecida Milton uma mulher forte, determinada, competente e sábia que conheci ainda na graduação e que segue sendo um dos meus exemplos de quem eu quero me tornar, tanto como profissional quanto como pessoa. Você me encorajou a realizar o mestrado e me ajudou desde o primeiro dia que cheguei em Brasília. Obrigada por compartilhar seus ensinamentos e por acreditar em mim.

À minha amigona Natália Montenegro, uma das primeiras pessoas que conheci quando cheguei em Brasília e que se tornou alguém muito especial para mim. Obrigada por todas as conversas, conselhos e risos que me proporcionou durante esses dois anos. Os dias sem você e seu repertório musical diferenciado não seriam os mesmos.

À Alessandra Guimarães e Aline Silva que se tornaram minhas grandes amigas. Obrigada por todos os momentos que compartilhamos, vocês fizeram muita diferença nos meus dias.

Por fim, agradeço aos técnicos do laboratório e aos demais professores pelos ensinamentos, contribuição e auxílio.

“O importante não é o que o destino faz para nós, mas o que fazemos dele.”
(Florence Nightingale)

RESUMO

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo. Trabalhos recentes mostram que essas substâncias podem atuar como desreguladores endócrinos, causando efeitos adversos no organismo, entre eles, a adipogênese, que pode levar ao ganho de peso e contribuir para o desenvolvimento da obesidade. Estudos recentes, não publicados, do grupo de pesquisa ao qual faço parte identificaram que os agrotóxicos ametrina e carbosulfano apresentam efeito adipogênico em células 3T3-L1 e o carbosulfano promove ativação do PPAR γ , regulador chave da adipogênese. Levando em consideração estes resultados e os poucos conhecimentos sobre o efeito desregulador endócrino dos agrotóxicos, estudos que investiguem esse tema são de extrema relevância. Esse trabalho objetivou investigar, em cultura de células de mamíferos, outros mecanismos que podem estar relacionados ao potencial adipogênico promovido pelos agrotóxicos ametrina e carbosulfano. Considerando os resultados obtidos anteriormente, foi realizado o ensaio de transfecção e gene repórter utilizando células HeLa para avaliar se a cisteína 285 era importante para a ativação do PPAR γ promovida pelo carbosulfano e para avaliar se os agrotóxicos promoveriam ativação do GR α , PPAR α e β , TR α e β e PXR. Para avaliar se o acúmulo lipídico promovido pelos agrotóxicos ocorria via PPAR γ , foi realizado o ensaio de diferenciação celular, durante 15 dias, com células 3T3-L1 tratadas com os agrotóxicos nas concentrações que promoveram acúmulo lipídico, na presença ou ausência de T0070907, antagonista específico de PPAR γ . Por fim, foi realizado ensaio de RT-qPCR para comparar a expressão de genes inflamatórios em células 3T3-L1 tratadas com ametrina ou com rosiglitazona, um agonista já conhecido de PPAR γ que tem propriedades anti-inflamatórias. Como resultados, a presença da mutação na cisteína 285 aboliu a atividade transcricional promovida pelo carbosulfano, sugerindo que a cisteína é essencial para sua ativação e que o carbosulfano pode mimetizar ligantes endógenos. Com relação aos receptores investigados, nenhum dos agrotóxicos promoveu ativação de GR α , PPAR α e β e TR α e β . Contudo, o carbosulfano promoveu ativação do PXR, podendo ser considerado seu agonista parcial. No ensaio de diferenciação celular com antagonista, observou-se que o co-tratamento reduziu o acúmulo lipídico promovido pelos agrotóxicos testados, sugerindo que esse

acúmulo ocorre via PPAR γ . Com relação a expressão de genes inflamatórios, a ametrina diminuiu a expressão dos mesmos, sendo que, em sua maior concentração, a diminuição foi semelhante a promovida pela rosiglitazona, mas vale ressaltar que foi necessária uma concentração maior de ametrina para promover esse feito. Os resultados desse trabalho permitem maior conhecimento sobre alguns agrotóxicos utilizados no Brasil, porém mais estudos são necessários para compreensão dos seus efeitos em organismos complexos.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos; Agrotóxicos; Receptores nucleares.

ABSTRACT

Brazil is one of the largest consumers of pesticides in the world. Recent studies show that these substances can act as endocrine disruptors, causing adverse effects in the body, including adipogenesis which can lead to weight gain and contribute to the development of obesity. Recent unpublished studies by the research group which I belong identified that the pesticides ametryn and carbosulfan have adipogenic effects on 3T3-L1 cells and that carbosulfan promotes PPAR γ activation, a key regulator of adipogenesis. Taking into consideration these results and the scarce knowledge about the endocrine disrupting effect of pesticides, studies that investigate this topic are extremely relevant. The aim of this work was to investigate, in mammalian cells culture, other mechanisms that may be related to the adipogenic potential promoted by the pesticides ametryn and carbosulfan. Considering the results previously obtained, a transfection and gene reporter assay using HeLa cells was carried out to evaluate if cysteine 285 was important for the activation of PPAR γ promoted by carbosulfan and also to evaluate if the pesticides would promote activation of GR α , PPAR α and β , TR α and β and PXR. To evaluate if the lipid accumulation promoted by the pesticides occurred via PPAR γ , a cell differentiation assay using 3T3-L1 cells was performed during 15 days. The cells were treated with the concentrations of the pesticides that promoted lipid accumulation, in the presence or absence of T0070907, a specific PPAR γ antagonist. A RT-qPCR was also performed to compare the expression of inflammatory genes in 3T3-L1 cells treated with ametryn or rosiglitazone, that is a well-known PPAR γ agonist with anti-inflammatory properties. As a result, the presence of the mutation in cysteine 285 abolished the transcriptional activity promoted by carbosulfan suggesting that the cysteine is essential for its activation and that carbosulfan can mimic endogenous ligands. Regarding the receptors investigated, none of the pesticides promoted activation of GR α , PPAR α and β and TR α and β . However, carbosulfan promoted PXR activation and can be considered its partial agonist. In the cell differentiation assay with the antagonist was observed that the co-treatment reduced the lipid accumulation promoted by the tested pesticides, suggesting that this accumulation occurs via PPAR γ . Regarding the expression of inflammatory genes, ametryn decreased their

expression and in its highest concentration, the decrease was similar to that promoted by rosiglitazone but it's worth mentioning that a higher concentration of ametryn was necessary to promote this effect. The results of this work allow greater knowledge about some pesticides used in Brazil but more studies are needed to understand their effects on complex organisms.

Keywords: Endocrine disruptors; Pesticides; Nuclear receptors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação toxicológica seguindo as normas estabelecidas pelo GHS.....	26
Figura 2. Total de agrotóxicos, componentes e afins registrados por ano..	27
Figura 3. Fórmula estrutural e 3D da Ametrina.....	28
Figura 4. Fórmula estrutural e 3D do Carbosulfano.....	31
Figura 5. Organização estrutural de um receptor nuclear.....	37
Figura 6. Efeito dos agrotóxicos sobre a atividade transcricional do GR...	54
Figura 7. Ensaio de transfecção e gene repórter com o GAL4-PPAR γ C285S.....	55
Figura 8. Efeito dos agrotóxicos sobre a atividade transcricional do PPAR α	56
Figura 9. Efeito dos agrotóxicos sobre a atividade transcricional do PPAR β	57
Figura 10. Efeito dos agrotóxicos sobre a atividade transcricional do TR β	58
Figura 11. Efeito dos agrotóxicos sobre a atividade transcricional do TR α	58
Figura 12. Efeito dos agrotóxicos sobre a atividade transcricional do PXR.....	59
Figura 13. Diferenciação celular na presença do antagonista T0070907...	60
Figura 14. Efeito da ametrina sobre a expressão de genes inflamatórios em células 3T3-L1.....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação quanto à avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental desenvolvida pelo Ibama nos anos 90.....	26
Quadro 2 – Resumo das principais características da ametrina.....	29
Quadro 3 – Resumo das principais características do carbosulfano.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AF-1	Função de ativação 1
AF-2	Função de ativação 2
AhR	Receptor aril-hidrocarboneto
ALT	Alanina aminotransferase
AMPK α	Proteína quinase ativada por AMP
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCAAT	Proteína ligante ao amplificador
CEBP/ α	Proteína alfa de ligação ao amplificador CCAAT
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DBT	Dibutilestanho
Dcn	Decorina
DE	Desregulador endócrino
DES	Dietilestilbestrol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
Fabp4	Proteína ligante de ácidos graxos tipo 4
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FN1	Fibronectina 1
FSII	Fotossistema II
Gapdh	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GHS	<i>Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals</i>
Glut4	Transportador de glicose 4
GR	Receptor de glicocorticoide
GREs	Elementos responsivos a glicocorticoides
hER α	Receptor de estrogênio alfa
hER β	Receptor de estrogênio beta
HETEs	Hidroxieicosatetraenóicos
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
IMC	Índice de massa corporal
LBD	Domínio de ligação ao ligante
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR1	Proteína de resistência a múltiplas drogas 1
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCoR	Correpressor do receptor nuclear
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCT90	Proteína de choque térmico 90
PL	Projeto de Lei
POPs	Poluentes orgânicos persistentes
PNR	Receptor nuclear específico da célula fotorreceptor
PPA	Potencial de Periculosidade Ambiental
PPARs	Receptores ativados por proliferadores peroxissomais
PPAR α	Receptor ativado por proliferadores peroxissomais alfa
PPAR β	Receptor ativado por proliferadores peroxissomais beta
PPAR γ	Receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama
PPRE	Elementos responsivos específicos de proliferadores peroxissomais
PVC	Policloreto de vinila
PXR	Receptor pregnano X
RAR	Receptor de ácido retinóico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNs	Receptores Nucleares
RXR α	Receptor retinóide X alfa
SFB	Soro fetal bovino
SNB	Soro neonatal bovino
SRC-1	Co-ativador 1 do receptor de esteroides
T ₃	Triiodotironina
T ₄	Tiroxina
TBT	Tributilestanho
TR α	Receptor do hormônio tireoidiano alfa
TR β	Receptor do hormônio tireoidiano beta
TRs	Receptores de hormônios tireoidianos
TREs	Elementos responsivos a hormônios tireoidianos
TSH	Hormônio tireoestimulante
TZDs	Tiazolidinadionas
Vcam1	Molécula 1 de adesão celular vascular
VDR	Receptor de vitamina D

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 AGROTÓXICOS	21
3.1.1 Conceito e Histórico	21
3.1.2 Estudos Sobre Toxicidade	22
3.1.3 Legislação, Classificação Toxicológica e de Risco Ambiental	25
3.1.4 Agrotóxicos Registrados No Brasil	27
3.1.4.1 Ametrina	28
3.1.4.1 Carbosulfano	30
3.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS	33
3.3 RECEPTORES NUCLEARES	36
3.3.1 Receptores Ativados Por Proliferadores Peroxissomais	39
3.3.1.1 PPAR α	39
3.3.1.2 PPAR β	40
3.3.1.3 PPAR γ	41
3.3.2 Receptor de Glicocorticoide	42
3.3.3 Receptor de Hormônios Tireoidianos	44
3.3.4 Receptor Pregnano X	46
4. MÉTODOS	47
4.1 REAGENTES E MATERIAIS	47
4.2 PREPARO DOS AGROTÓXICOS E CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS	48
4.3 ENSAIO DE TRANSFEÇÃO E GENE REPÓRTER	49
4.4 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR COM A PRESENÇA DE ANTAGONISTA	50
4.5 ENSAIO DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL	52
5. RESULTADOS	54
5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS AGROTÓXICOS SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO GR α	54
5.2 AVALIAÇÃO DA CISTEINA 285 NA ATIVAÇÃO DO PPAR γ PROMOVIDA PELO CARBOSULFANO	55
5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS AGROTÓXICOS SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DOS RECEPTORES NUCLEARES PPAR α , PPAR β , TR α , TR β E PXR	56

5.4 DIFERENCIAÇÃO CELULAR NA PRESENÇA DO ANTAGONISTA T0070907	59
5.5 EFEITO DA AMETRINA SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES INFLAMATÓRIOS EM CÉLULAS 3T3-L1	60
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE A – LISTA DE PRIMERS	85

1. INTRODUÇÃO

Agrotóxicos são substâncias químicas ou agentes biológicos usados no ambiente para matar, repelir ou controlar determinados tipos de plantas, fungos, roedores ou outros vetores que são considerados pragas (1). Ao longo dos anos, a nível mundial, seu uso vem aumentando progressivamente e, em 2019, superou 4 milhões de toneladas (2).

O uso de agrotóxicos na agricultura se intensificou no ano de 1950, nos Estados Unidos, com a Revolução Verde, que teve como objetivo modernizar a agricultura para aumentar a produção de alimentos (3). No Brasil, esse movimento ocorreu entre os anos 1950 e 1970 e, assim como nos Estados Unidos, intensificou o uso de agrotóxicos nas plantações (4). Como consequência dessa revolução, o Brasil, atualmente, é um dos maiores consumidores desses compostos a nível mundial, ficando atrás apenas da China e dos Estados Unidos (2).

O tema agrotóxico ganhou grande destaque no Brasil durante os últimos meses em função do Projeto de Lei (PL) nº 6.299/2002, aprovado pela Câmara de Deputados no dia 9 de fevereiro de 2022 e que está aguardando apreciação pelo Senado Federal. Esse projeto flexibiliza o registro de agrotóxicos no Brasil, alterando vários trechos da Lei nº 7.802/89, atualmente em vigência.

De acordo com a Lei nº 7.802/89, é proibido o registro de agrotóxicos que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, que provoquem distúrbios hormonais e danos ao sistema reprodutor e cujas características causem danos ao meio ambiente (5). Contudo, com o novo Projeto de Lei, fica proibido o registro de agrotóxicos que, “nas condições recomendadas de uso, apresentam risco inaceitável para os seres humanos ou para o meio ambiente”. Porém, a definição de risco inaceitável apresentada no PL é bastante ampla, sendo descrita como “nível de risco considerado insatisfatório por permanecer inseguro ao ser humano ou ao meio ambiente, mesmo com a implementação das medidas de gerenciamento dos riscos (6).

Além disso, na Lei nº 7.802/89, o registro dos agrotóxicos no Brasil depende de três órgãos que avaliam a classificação toxicológica, a periculosidade ambiental e a eficácia agronômica, sendo eles a Agência

Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), respectivamente (5). Contudo, com o intuito de acelerar o registro dos agrotóxicos, o novo PL propõe que todas as etapas de avaliação e autorização sejam realizadas pelo MAPA, restando à ANVISA um papel meramente consultivo (6).

Atualmente existem agrotóxicos registrados para uso no Brasil que foram proibidos ou banidos em outros países, dentre eles o clorotalonil e o carbendazim, proibidos na União Europeia em razão da carcinogenicidade e toxicidade para reprodução, respectivamente (7,8). Caso o Projeto de Lei nº 6.299/2002 entre em vigor, existe a possibilidade de que outros agrotóxicos proibidos em outros países por risco conhecido ou ausência de segurança confirmada, sejam liberados para uso no Brasil.

De acordo com um resumo publicado no *site* do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no ano de 2021, foram registrados no Brasil, 562 novos agrotóxicos, uma quantidade 14% maior que o ano de 2020, que apresentou 493 registros (9). Além disso, o boletim publicado anualmente pelo IBAMA, que apresenta as quantidades comercializadas de agrotóxicos, em toneladas, mostrou que, em 2020, a fabricação nacional foi de 502.848,47 toneladas de ingredientes ativos e a importação foi de 185.721,01 toneladas (10).

Estudos mostram que os agrotóxicos podem causar danos relacionados à exposição aguda e crônica, incluindo irritação na pele, nariz e olhos, problemas no desenvolvimento, alterações reprodutivas, câncer e aumento no risco de ocorrência de diabetes (11,12). Além disso, trabalhos recentes mostram que os agrotóxicos podem atuar como desreguladores endócrinos, definidos como substâncias ou misturas que alteram a função do sistema endócrino e causam efeitos adversos à saúde de um organismo, sua descendência ou subpopulação (13). Embora os mecanismos de ação dessas substâncias sejam bastante variados, elas possuem a capacidade de mimetizar hormônios naturais, podendo ter efeito sinérgico ou antagônico a eles (14).

Em estudo publicado por Kojima e colaboradores, onde foi feito *screening* de 200 agrotóxicos, observou-se que 29 dos compostos testados, entre eles, a ciflutrina e o metiocarbe, que são utilizados no Brasil, promoveram ativação dos

receptores de estrogênio alfa e beta (hER α e hER β) e 106 aumentaram a atividade do receptor pregnano X (PXR) (15).

Alguns desreguladores endócrinos são considerados obesogênicos ambientais, termo usado pela primeira vez em 2006 por Felix Grün e Bruce Blumberg, para se referir a produtos químicos de origem natural ou sintética que promovem a obesidade através do aumento do número de adipócitos ou do armazenamento de gordura em células já existentes (16).

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, que apresenta risco para a saúde (17). No último relatório liberado pela OMS, em 2016, mais de 1,9 bilhões de adultos, correspondendo a 39% da população mundial, estavam acima do peso e, destes, 650 milhões eram considerados obesos (18). De acordo com o atlas mundial de obesidade publicado em 2022 pela Federação Mundial de Obesidade (*World Obesity Federation*), estimasse que, até 2030, mais de 1 bilhão de homens e mulheres serão considerados obesos, o que são dados extremamente preocupantes (19).

A obesidade aumenta, significativamente, a predisposição a diversas doenças como hipertensão arterial sistêmica, acidente vascular encefálico, infarto do miocárdio, osteoartrite, Alzheimer, depressão, alguns tipos de neoplasias, esteatose hepática e diabetes e, devido a estes fatores, é considerada um grande problema de saúde pública mundial (20). Em 2017, a Federação Mundial de Obesidade declarou que a obesidade é uma doença crônica, recorrente e progressiva e que ações imediatas devem ser tomadas para prevenção e controle da sua epidemia global (21).

Estudos recentes mostram que a obesidade também pode contribuir para o aumento da morbidade e da mortalidade de pacientes com COVID-19, pois, pacientes obesos geralmente apresentam hipertensão arterial sistêmica, diabetes tipo 2, doença crônica pulmonar, entre outros. Esses trabalhos apontam que o índice de massa corporal elevado está correlacionado a casos que precisaram, mais frequentemente, de internação e ventilação mecânica e à maior probabilidade de óbito (22).

No que se refere aos desreguladores endócrinos e a indução de acúmulo lipídico, existe um mecanismo bem descrito que é a ativação do receptor ativado por proliferadores peroxissomais gama (PPAR γ) (23). O PPAR γ é membro de

uma superfamília de receptores nucleares, expresso, principalmente, no tecido adiposo e é um regulador chave da adipogênese, atuando também no metabolismo das lipoproteínas e na sensibilidade à insulina (24,25). Quando ativado por um ligante, forma um heterodímero com outro receptor nuclear, o receptor retinóide X alfa (RXR α) e então, se liga a sequências específicas do DNA presentes na região promotora de seus genes alvo, promovendo a regulação dos mesmos (26).

Até o momento, foram identificados alguns desreguladores endócrinos que ativam PPAR γ . Dentre eles, se encontram dois compostos considerados, também, como poluentes ambientais, o tributilestanho (TBT) e o dibutilestanho (DBT), que são utilizados como estabilizadores na fabricação do policloreto de polivinila (PVC) e catalisadores em processos industriais (27,28).

Com intuito de identificar outros compostos com potencial desregulador endócrino, o nosso grupo de pesquisa decidiu avaliar os agrotóxicos, que são substâncias muito utilizados e ainda pouco estudados nessa área. Para a escolha dos agrotóxicos a serem estudados, foram levados em consideração alguns critérios, sendo eles, possuir registro e ampla utilização no Brasil, além dos Estados Unidos e/ou União Europeia; estar disponível para aquisição em sua forma pura; pertencer a grupos químicos diferentes, possibilitando um estudo mais amplo e não possuir estudos relacionados à adipogênese. A partir desses critérios, foram selecionados alguns agrotóxicos para estudo, dentre eles a ametrina e o carbosulfano.

Resultados preliminares e ainda não publicados dos estudos realizados até o momento, mostram os agrotóxicos ametrina e carbosulfano como potenciais obesogênicos ambientais. O carbosulfano promoveu ativação parcial do PPAR γ em suas maiores concentrações testadas (10 e 100 μ M) em ensaios de transfecção e gene repórter, podendo ser considerado agonista parcial deste receptor. Além disso, a ametrina e o carbosulfano promovem acúmulo lipídico em células 3T3-L1, que são pré-adipócitos de camundongos. Também foram realizados ensaios utilizando estes compostos com o receptor retinóide X alfa (RXR α), porém nenhum dos dois promoveu sua ativação.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial adipogênico dos agrotóxicos ametrina e carbosulfano em cultura de células de mamíferos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Considerando que os agrotóxicos ametrina e carbosulfano promovem acúmulo lipídico em pré-adipócitos de camundongos 3T3-L1, que o carbosulfano ativa o PPAR γ e que nenhum desses compostos ativam o RXR α , os objetivos específicos deste trabalho são:

- Avaliar, em células HeLa, se os agrotóxicos ativam o receptor de glicocorticoide (GR α);
- Investigar se a cisteína 285 é importante para ativação do PPAR γ pelo carbosulfano;
- Avaliar, em células HeLa, se os agrotóxicos ativam outros receptores nucleares, incluindo o PPAR α , PPAR β , TR α , TR β e PXR;
- Avaliar, utilizando um antagonista específico, se o acúmulo lipídico promovido pelos agrotóxicos em células 3T3-L1, é dependente de PPAR γ ;
- Avaliar, em células 3T3-L1, o efeito da ametrina sobre a expressão dos genes inflamatórios Dcn, Fn1 e Vcam1.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 AGROTÓXICOS

3.1.1 Conceito e Histórico

Agrotóxicos são, por definição da Organização Mundial da Saúde, quaisquer substâncias utilizadas para matar, repelir ou controlar certos tipos de plantas e/ou animais considerados como pragas, sendo alguns também usados para controle de vetores de doenças (1). Contudo, devido à sua natureza, são potencialmente tóxicos para outros organismos, incluindo humanos e devem ser utilizados com cautela.

Dentre os agrotóxicos, encontram-se diferentes tipos, que são utilizados para eliminar espécies diversificadas de pragas que atingem as plantações. Os mais conhecidos são os herbicidas, utilizados para eliminar ervas daninhas e outros tipos de vegetação consideradas danosas ao plantio, os inseticidas, que ajudam no controle de uma ampla gama de insetos, os fungicidas, utilizados para prevenir o crescimento de fungos e os rodenticidas, que controlam possíveis infestações de roedores. Alguns outros tipos incluem os nematicidas, utilizados no combate a nematoides e os acaricidas, que combatem os ácaros (28).

O primeiro composto sintético a ser caracterizado como agrotóxico foi o dicloro-difenil-tricloroetano, mais conhecido como DDT. Embora sua síntese tenha ocorrido em 1874, sua ação como inseticida só foi descoberta em 1939 (29) e, a partir desse evento, inúmeros outros compostos como os carbamatos, as triazinas e os organofosforados foram desenvolvidos e seu uso foi se intensificado mundialmente.

Nos Estados Unidos, o movimento de modernização da agricultura através do uso de agrotóxicos para aumentar a produtividade de alimentos, teve início no ano de 1950 e ficou conhecido como Revolução Verde (3). No Brasil, esse movimento ocorreu entre os anos 1950 e 1970 e, assim como nos Estados Unidos, intensificou o uso de agrotóxicos nas plantações (4).

Só no ano de 2019, o Brasil consumiu 377 mil toneladas de agrotóxicos, os Estados Unidos 407 mil toneladas e a China 1,7 milhão de toneladas,

tornando esses países os três maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (2).

Para a agricultura, os agrotóxicos são de grande importância, pois têm como objetivo principal eliminar pragas indesejáveis, protegendo as plantações e contribuindo para o aumento da produção de alimentos. Contudo, isso requer o uso de quantidades enormes de diferentes tipos de substâncias químicas que apresentam variados graus de toxicidade e que, muitas vezes, ainda possuem efeito desconhecido tanto para o meio ambiente quanto para os seres vivos.

Em 1962, Rachel Carson publicou o livro *Primavera Silenciosa*, por meio do qual levou à tona, pela primeira vez desde o início da Revolução Verde, os perigos do uso extensivo dos agrotóxicos para o meio ambiente e para os seres humanos. Como consequência, foram promovidas grandes modificações na política do uso de agrotóxicos nos Estados Unidos, levando, inclusive, à proibição do uso do DDT, em 1972 (30,31). A partir disto, o debate sobre os benefícios e riscos dos agrotóxicos se intensificou, sendo uma pauta muito discutida na atualidade.

3.1.2 Estudos Sobre Toxicidade

Nos últimos anos, vários estudos têm corroborado para a afirmação de que os agrotóxicos podem ser extremamente danosos para o meio ambiente e para os animais e que a busca por alternativas mais seguras precisa ser encarada como uma emergência sanitária.

Um estudo realizado em 2013 por Beketov e colaboradores, investigou se a presença dos agrotóxicos afetaria a quantidade e a diversidade de espécies de invertebrados presentes em riachos. Foram avaliadas algumas regiões da Alemanha, França e Austrália e os resultados mostraram que a presença de agrotóxicos diminuiu a diversidade de espécies presentes nessas regiões em uma taxa de, aproximadamente, 42% (32). Além disso, uma análise do padrão de uso de agrotóxicos nos Estados Unidos publicada em 2013 por Mineau e Whiteside, apontou a letalidade de inseticidas utilizados de forma extensiva,

como fator responsável pela diminuição da presença de algumas espécies de aves em pastagens localizadas por todo território dos Estados Unidos (33).

Em 1994, na Flórida, Guillette e colaboradores avaliaram jacarés americanos (*Alligator mississippiensis*) que viviam em lagos contaminados com agrotóxicos e observaram que jacarés recém-nascidos e jovens apresentaram concentrações alteradas de hormônios como testosterona, estradiol 17- β e tiroxina no plasma e alteração na morfologia do ovário e testículos (34). Essas alterações nesses animais também foram observadas em outros estudos realizados nos anos de 1998 (35), 1999 (36) e 2000 (37).

Motta e colaboradores, em 2018, avaliaram se o glifosato, herbicida muito utilizado para o controle de ervas daninhas, poderia interferir na microbiota de animais que vivem perto de áreas agrícolas, em específico, animais polinizadores como as abelhas. Como resultado, eles observaram, em animais expostos a concentrações de glifosato documentadas no ambiente, uma redução das espécies de bactérias que promovem aumento de peso e reduzem a susceptibilidade à patógenos, o que poderia tornar as abelhas mais susceptíveis a patógenos oportunistas, bem como afetar sua efetividade como polinizadoras (38).

A exposição dos seres humanos a agrotóxicos pode causar uma série de doenças, sendo os principais afetados, agricultores e trabalhadores ocupacionais, devido à necessidade de manipular e aplicar esses compostos (39). Contudo, toda população também é susceptível às múltiplas formas de exposição aos agrotóxicos, sendo as principais pelo ar, água e alimentos contaminados. Pelo ar, destaca-se a contaminação por aerossóis com meia-vida maior e agrotóxicos transportados através da volatilização, pela água e pelos alimentos, através dos resíduos de agrotóxicos presentes nos mesmos (40).

A exposição aos agrotóxicos pode ser aguda ou crônica. A exposição aguda ocorre quando o indivíduo é exposto a altas quantidades do agrotóxico em um curto período, podendo causar irritação e erupções cutâneas, ardência nos olhos, nas mucosas nasal e oral, dificuldade para respirar, dor abdominal, náuseas, vômito, entre outros (41). Já a crônica se dá após exposições contínuas a pequenas quantidades dos agrotóxicos e os efeitos podem começar a aparecer meses ou anos após a exposição, podendo causar anormalidades reprodutivas

ou na produção de hormônios, problemas no desenvolvimento, neoplasias, entre outros (42).

Calvert e colaboradores monitoraram casos de intoxicação aguda por agrotóxicos em trabalhadores rurais nos Estados Unidos entre os anos de 1998 e 2005 e reportaram 3.271 casos nesse período. Desse total, 71% dos trabalhadores eram agricultores, sendo que 87% apresentaram sintomas leves de intoxicação, 12% sintomas de média gravidade e 0,6% sintomas graves. Os sintomas mais presentes incluíam dor de cabeça, náusea, irritação nos olhos, tontura, problemas respiratórios e dermatológicos (43).

Em um estudo de coorte realizado de 2002 a 2008 no Sri Lanka, foi relatado que 9.302 pacientes foram admitidos em hospitais após ingerirem, por vontade própria, algum agrotóxico. Desse total, 3.256 indivíduos relataram que o composto ingerido pertencia ao grupo dos organofosforados. A média de mortalidade apontada foi de 10,1%, sendo que, o dimetoato, a fentiona e o paraquat foram responsáveis por 47% dos óbitos (44).

Em 2007, Hoppin e colaboradores avaliaram fazendeiros do Iowa e Carolina do Norte, que utilizavam agrotóxicos nas plantações, e observaram uma relação positiva entre o uso de agrotóxicos e bronquite crônica. Um total de 654 fazendeiros reportaram histórico de bronquite crônica após 19 anos de idade e, a partir disto, foram significativamente associados 14 inseticidas e 4 herbicidas a este histórico. O agrotóxico que apresentou maior *odds ratio* quando relacionado à prevalência de bronquite crônica foi o heptacloro, um inseticida organoclorado(45).

Parrón e colaboradores realizaram um estudo de caso controle de base populacional no sul da Espanha com dados coletados de hospitais entre os anos 1998 e 2005 para avaliar o risco de câncer. Eles observaram que a prevalência de câncer de estômago, colorretal, fígado, pele, bexiga e encéfalo era significativamente maior nas áreas onde eram utilizados mais agrotóxicos. Além disso, quando avaliados por sexo, observou-se aumento significativo no risco de câncer na próstata, testículo, ovário e colo do útero nas regiões com maior exposição aos agrotóxicos (46).

3.1.3 Legislação, Classificação Toxicológica e de Risco Ambiental

Com o objetivo de orientar sobre os riscos relacionados ao uso dos agrotóxicos e seu descarte correto, no Brasil, é seguida a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº296/2019, que estabelece as informações obrigatórias que devem constar nos rótulos e bulas dessas substâncias. A RDC nº296/2019 adota as diretrizes de rotulagem do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (*Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* - GHS), elaborado pelas Nações Unidas em 2002, com a finalidade de padronizar a rotulagem e facilitar a comunicação das informações relativas, principalmente, aos riscos da exposição a estes produtos (47).

Nos rótulos devem estar presentes informações de cuidados relativos à saúde humana, como precauções de uso e recomendações gerais, primeiros socorros, antídotos e tratamentos, telefones em caso de emergência, além dos pictogramas recomendados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), palavras de advertência, frases de perigo, cor da faixa e sua classificação toxicológica do perigo (47).

A cor da faixa e classificação toxicológica seguem o padrão mostrado na Figura 1, onde os agrotóxicos são classificados em categorias que vão desde a categoria 1, extremamente tóxicos, até a categoria 5, improváveis de causar dano agudo. Também existe uma sexta categoria, a de compostos não classificados, onde se encontram produtos de baixíssimo risco como, por exemplo, agrotóxicos de origem biológica (48).

	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. Classificação toxicológica seguindo as normas estabelecidas pelo GHS. Fonte: Anvisa.

Além da classificação toxicológica, os agrotóxicos são classificados por seu Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA), avaliado pelo Ministério do Meio Ambiente. Para a determinação do PPA, são utilizados parâmetros como transporte, persistência, bioconcentração e ecotoxicidade a diversos organismos. Para avaliar cada parâmetro, são realizados estudos físico-químicos e ecotoxicológicos por laboratórios nacionais e internacionais que enviam os relatórios ao Ibama. Em posse desses documentos, o Ibama procede à avaliação e validação e, conforme tabela específica, realiza a classificação de cada composto (Tabela 1) (49).

Quadro 1 - Classificação quanto à avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental desenvolvida pelo Ibama nos anos 90. Fonte: Ibama(49)

Classe I	Produto ALTAMENTE PERIGOSO ao meio ambiente
Classe II	Produto MUITO PERIGOSO ao meio ambiente
Classe III	Produto PERIGOSO ao meio ambiente
Classe IV	Produto POUCO PERIGOSO ao meio ambiente

3.1.4 Agrotóxicos Registrados No Brasil

O Brasil encerrou o ano de 2021 com 562 agrotóxicos liberados, número 14% maior quando comparado ao ano de 2020, que teve 493 agrotóxicos registrados. O número de registros de agrotóxicos no Brasil vem aumentando significativamente desde 2016, com crescimento de 50% nos últimos 6 anos (Figura 2) (9). Nesse mesmo período, foram registrados 8 novos princípios ativos, entre os quais o ciclanilprole, um inseticida que se enquadra na categoria não classificado, de acordo com as normas do GHS, mas não é aprovado para uso na União Europeia pelo seu alto potencial de contaminação das águas subterrâneas e pela falta de estudos a respeito dos riscos que seus metabólitos podem trazer ao consumidor (50,51). Entre esses agrotóxicos registrados e liberados para uso no Brasil, encontram-se a ametrina e o carbosulfano.



Figura 2. Total de agrotóxicos, componentes e afins registrados por ano. Fonte: MAPA (9)

3.1.4.1 Ametrina

A ametrina é um herbicida e pertence ao grupo químico das triazinas, tem como nome químico N2-etil-N4-isopropil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2,4-diamina. Sua fórmula molecular é $C_9H_{17}N_5S$, seu peso molecular é de 227,33 g/mol e se apresenta na forma de pó branco (52).

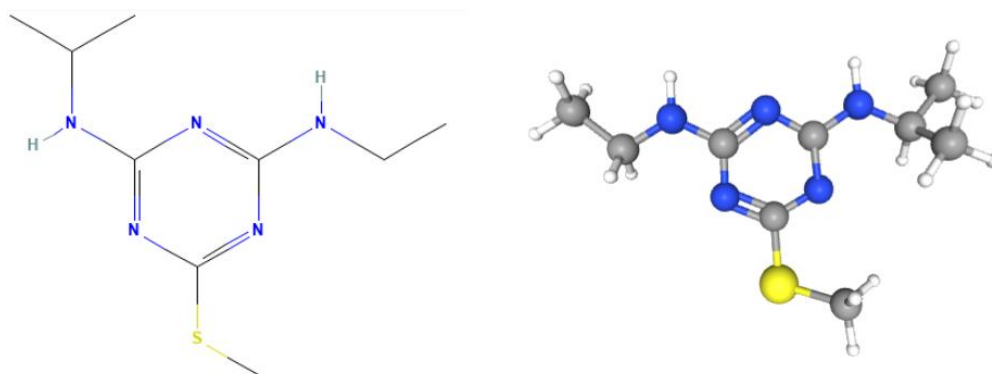


Figura 3. Fórmulas estrutural e 3D da Ametrina. Fonte: *National Center for Biotechnology Information* (52)

Os produtos que contêm ametrina em sua formulação são classificados como Classe III ou Categoria 3 de acordo com a classificação toxicológica do GHS, sendo considerados moderadamente tóxicos. Quanto ao seu PPA, são classificados como Classe II, ou seja, produtos muito perigosos ao meio ambiente (53). Vale ressaltar que esse agrotóxico não é aprovado para uso na União Europeia devido a sua toxicidade a ambiente aquático e por apresentar alta toxicidade aguda (54).

No quadro 2, podemos observar um resumo com as principais características da ametrina como seu grupo químico, sua fórmula química, sua classe, em quais culturas é utilizado, suas classificações toxicológicas e de potencial de periculosidade ambiental e os países onde seu uso ainda é permitido.

Quadro 2 – Resumo das principais características da ametrina.

Ametrina	
Grupo químico	Triazina
Fórmula química	C ₉ H ₁₇ N ₅ S
Classe	Herbicida
Cultura	Abacaxi, algodão, banana, café, cana-de-açúcar, citros, mandioca, milho e uva
Classificação Toxicológica	Categoria 3 – Moderadamente tóxico
Potencial de Periculosidade Ambiental	Classe II – Muito perigoso ao meio ambiente
Países cujo uso é permitido	Brasil, Estados Unidos e Austrália

No Brasil, a ametrina é utilizada nas culturas de cana-de-açúcar, abacaxi, algodão, banana, café, citros, mandioca, milho e uva e atua como herbicida seletivo de ação sistêmica, ou seja, elimina ervas daninhas e outras plantas consideradas intrusas, enquanto a cultura desejada permanece crescendo (55,56). Ela pertence ao grupo das triazinas e atua como inibidora do fotossistema II (FSII), interrompendo o fluxo de elétrons através da sua ligação à proteína D1 e, de maneira competitiva, impede a ligação da plastoquinona “QB” e a transferência de elétrons do FSII para o complexo Cyt b/f. Em resumo, ela promove redução da produção de energia pela planta, fazendo com que ela morra devido à formação de radicais livres (56).

Em estudo realizado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*), a ametrina foi considerada moderadamente tóxica para animais invertebrados e marinhos sujeitos à exposição aguda e muito tóxica para a microalga *Pseudokirchneriella*

subcapitatum (57). Além disso, em estudo realizado por Queiroz e colaboradores, foi demonstrado que a ametrina tem potencial para alcançar o lençol freático, o que pode levar à contaminação de rios e lagos próximos aos locais de uso (58).

Santos e colaboradores, em 2015, realizaram estudos com ratos Wistar buscando esclarecer os mecanismos de toxicidade da ametrina. Como resultados, observaram que quando ocorre exposição crônica, a ametrina é hepatotóxica, pois promove estresse oxidativo e genotóxica, pois causa danos a eritrócitos presentes na medula óssea (59).

Em 2018, Lin e colaboradores realizaram um estudo para avaliar a toxicidade da ametrina em peixes zebra (*Danio rerio*) e observaram que esse composto promoveu má formação no estágio larval. Além disso, uma análise da ontologia gênica, mostrou que proteínas envolvidas na glicólise, transporte de lipídios, polimerização de proteínas e ligação de nucleotídeos, se encontravam mais presentes, enquanto proteínas relacionadas à fosforilação oxidativa e algumas proteínas ribossomais, estavam menos presentes nos embriões expostos à ametrina. Alterações nessas proteínas podem levar a anormalidades no desenvolvimento dos embriões (60).

3.1.4.1 Carbosulfano

O carbosulfano é um inseticida, nematicida e acaricida, pertencente ao grupo químico dos carbamatos, tem como nome químico 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il(dibutilaminotio)metilcarbamato. Sua fórmula química é $C_{20}H_{32}N_2O_3S$, seu peso molecular é 320,5 g/mol e se apresenta como líquido marrom viscoso (61).

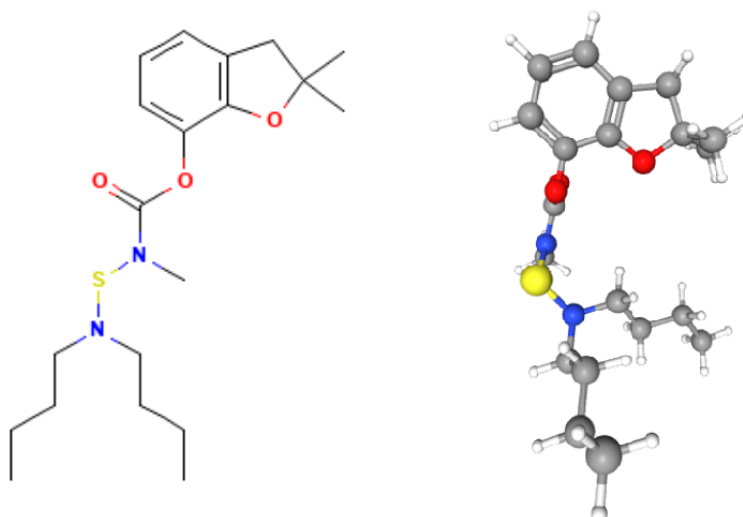


Figura 4. Fórmulas estrutural e 3D do Carbosulfano. Fonte: *National Center for Biotechnology Information* (61)

Produtos que contêm carbosulfano em sua formulação são classificados como Classe II ou Categoria 2, de acordo com a classificação toxicológica do GHS, sendo considerados altamente tóxicos. Quanto ao seu PPA, são classificados como Classe II, ou seja, produtos muito perigosos ao meio ambiente (62). O carbosulfano não é aprovado para uso na União Europeia em decorrência da sua toxicidade, presença de impurezas carcinogênicas e formação de metabólitos potencialmente genotóxicos. Além disso, há insuficiência de dados sobre seu potencial ecotóxico, considerando o risco de contaminação de águas subterrâneas (63). No Brasil, o carbosulfano é utilizado em culturas de algodão, cana-de-açúcar, eucalipto, milho e soja (62).

No quadro 3, podemos observar um resumo com as principais características do carbosulfano como seu grupo químico, sua fórmula química, sua classe, em quais culturas é utilizado, suas classificações toxicológicas e de potencial de periculosidade ambiental e os países onde seu uso ainda é permitido.

Quadro 3 - Resumo das principais características do carbosulfano.

Carbosulfano	
Grupo químico	Carbamato
Fórmula química	$C_{20}H_{32}N_2O_3S$
Classe	Acaricida/Inseticida/Nematicida
Cultura	Algodão, cana-de-açúcar, eucalipto, milho e soja
Classificação Toxicológica	Categoria 2 – Altamente tóxico
Potencial de Periculosidade Ambiental	Classe II – Muito perigoso ao meio ambiente
Países cujo uso é permitido	Brasil, Estados Unidos e Austrália

Agrotóxicos do grupo químico dos carbamatos são inibidores da acetilcolinesterase (AChE), ou seja, afetam o sistema nervoso por meio da quebra dessa enzima, promovendo acúmulo de acetilcolina nas sinapses e junções neuromusculares. A AChE catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A acetilcolina se liga ao grupo hidroxila do resíduo de serina 203 no centro ativo da AChE, gerando um intermediário que, ao ser quebrado, regenera uma enzima ativa, durante esse processo ocorre a hidrólise da acetilcolina(64). Os carbamatos promovem a carbamilação desse resíduo de serina, formando um intermediário carbamilo com a acetilcolinesterase, o que gera uma enzima mais estável e com menor taxa de hidrólise e de regeneração da enzima ativada. Esse também é um mecanismo de ação dos agrotóxicos do grupo dos organofosforados (64,65).

Giri e colaboradores, em 2002, realizaram um estudo utilizando camundongos albinos Swiss para avaliar o potencial genotóxico do carbosulfano. Como resultado, constataram que ele promoveu vários tipos de aberrações

cromossômicas estruturais, sendo mais frequentes as quebras e eliminações de cromátides, aumento no número de eritrócitos policromáticos micronucleados e anormalidades na cabeça dos espermatozoides (66).

Em estudo realizado por Banji e colaboradores, em 2014, ratos Wistar foram utilizados para avaliar as consequências da exposição ao carbosulfano nos estágios iniciais do desenvolvimento. Como resultados, foram evidenciadas alterações na função motora e maior ansiedade nos filhotes, além de prejuízo no crescimento. Também foram observados diminuição nos níveis da AChE e aumento de proteínas carboniladas e de um marcador de peroxidação lipídica, o malondialdeído (67).

Em 2015, Dhouib e colaboradores avaliaram o efeito da exposição subcrônica ao carbosulfano em ratos e observaram diminuição da atividade da acetilcolinesterase no plasma. No fígado, evidenciaram aumento da atividade da alanina aminotransferase (ALT), diminuição nos níveis de albumina e indução de peroxidação lipídica. Também observaram diminuição do número de linfócitos T CD8⁺ nos ratos tratados com este agrotóxico, sugerindo potencial imunossupressor (68).

3.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Desreguladores endócrinos (DEs) podem ser definidos como substâncias ou misturas exógenas que alteram as funções do sistema endócrino, podendo causar efeitos adversos à saúde de um organismo, seus descendentes ou subpopulações (13).

Originalmente, acreditava-se que os DEs exerciam suas funções principalmente através de receptores nucleares hormonais como os receptores de estrogênio, androgênio, progesterona e tireoidiano. Contudo, sabe-se, atualmente, que as vias de atuação dos DEs são muito mais amplas (69).

Eles podem atuar se ligando a diferentes tipos de receptores, sejam eles nucleares, de membrana, neurotransmissores como serotonina e dopamina, receptores considerados órfãos e podem agir, ainda, sobre uma série de outros mecanismos relacionados ao o sistema endócrino e reprodutivo (69).

Um desregulador endócrino tem a capacidade de mimetizar hormônios naturais como estrogênio e hormônios tireoidianos. Além disso, pode se ligar a um receptor presente em uma célula e impedir a ligação de hormônios endógenos, bloqueando sua interação com hormônios naturais (70).

Ao interferir no sistema endócrino, o desregulador endócrino pode promover diversos efeitos como alterações na fertilidade, quantidade de espermatozoides, anormalidades em órgãos sexuais, endometriose, alterações no sistema nervoso e no sistema imune, alguns tipos de câncer, problemas metabólicos como obesidade e diabetes, entre outros (69).

Desreguladores endócrinos podem ser classificados em duas categorias, naturais e sintéticos. Os DEs naturais são encontrados em diversos alimentos, tais como grãos, frutas e vegetais. Como exemplos, podem ser citados os fitoestrógenos como a genisteína e o coumestrol que são encontrados principalmente na soja e apresentam atividade estrogênica mais fraca que os estrogênios endógenos. Já os DEs sintéticos são substâncias encontradas no meio ambiente em decorrência a atividade humana, tais como bifenilas policloradas (PCBs) utilizadas em solventes e lubrificantes industriais, bisfenol A e ftalatos presentes em materiais plásticos, agrotóxicos, alguns agentes farmacêuticos como dietilestilbestrol (DES), entre outros (69).

A exposição aos desreguladores endócrinos pode ocorrer por diversas formas, tais como a inalação de gases ou partículas suspensas, o consumo de água e alimentos contaminados, o contato com o solo contaminado e através do contato direto com essas substâncias (71). Além disso, podem ser transferidos da mãe para o feto através da placenta ou da mãe para a criança através do leite materno, podendo acarretar alterações no desenvolvimento que, muitas vezes, não são notadas no início do desenvolvimento (70).

Alguns DEs possuem meia vida longa, demoram mais para serem metabolizados e permanecem no ambiente por um período prolongado, sendo denominados poluentes orgânicos persistentes (POPs). Essas substâncias, assim como outros desreguladores endócrinos, são lipofílicas e apresentam potencial de bioacumulação, ou seja, se movimentam ao longo das cadeias alimentares e podem acumular no tecido adiposo, de forma modo que o organismo fique exposto a elas por tempo prolongado (72,73).

Um dos primeiros compostos a ser considerado desregulador endócrino foi o dietilestilbestrol (DES), o primeiro estrogênio não esteroide que era prescrito para mulheres grávidas entre os anos 1940 a 1970 com intuito de reduzir complicações durante a gestação (74). Contudo, em 1971, um estudo realizado por Herbst e colaboradores mostrou aumento nos casos de adenocarcinoma vaginal em mulheres cujas mães haviam utilizado DES durante a gravidez (75). Outro estudo publicado em 2009, mostrou que a exposição pré-natal de homens ao DES aumentou o risco de câncer de próstata, infertilidade e anormalidades urogenitais (76).

Outro desregulador endócrino já bem estudado é o bisfenol A (BPA), utilizado na fabricação de embalagens plásticas para diversos tipos de alimentos. O BPA apresenta propriedades semelhantes à de alguns hormônios e pode se ligar aos receptores de estrogênio, androgênio e tireoide e pode aumentar o risco de câncer de próstata e mama (72,77).

Alguns agrotóxicos também possuem efeito desregulador endócrino. Swan e colaboradores, em 2003, mostraram que homens expostos a agrotóxicos como alacloro e atrazina apresentaram alterações hormonais, na morfologia e número de espermatozoides e no líquido seminal (78). Um estudo realizado por Cirillo e colaboradores, em 2021, avaliou os efeitos do DDT sobre netas de mulheres que foram expostas a esse agrotóxico. Eles mostraram que elas apresentaram mais chances de desenvolver obesidade e puberdade precoce, que está relacionada ao o risco aumentado de desenvolvimento de doenças graves como câncer de mama e doenças cardiometabólicas (79).

Alguns DEs podem ser classificados como obesogênicos ambientais, termo utilizado pela primeira vez em 2006 por Felix Grün e Bruce Blumberg para se referir a produtos químicos de origem natural ou sintética, que promovem a obesidade através do aumento do número de adipócitos ou do armazenamento de gordura em células já existentes (16).

O tributilestanho é um dos obesogênicos ambientais mais estudados. Um estudo realizado em 2010 por Li e colaboradores mostrou que o TBT tem a capacidade de induzir adipogênese e aumentar a expressão de genes adipogênicos como adiponectina e leptina de maneira dependente de PPAR γ (80). Em estudo realizado em 2006 por Grun e colaboradores, utilizando camundongos adultos tratados durante 24 horas com TBT, observou-se o

aumento na expressão de genes adipogênicos no tecido adiposo epididimal e no fígado (28).

3.3 RECEPTORES NUCLEARES

Receptores nucleares (RNs) são uma superfamília de fatores transcricionais que atuam em diversos processos fisiológicos, desde a regulação do metabolismo até a proliferação e morte celular. Até o momento, foram identificados, no genoma humano, 48 tipos de receptores nucleares (81,82).

Para regular a atividade transcricional, os receptores nucleares interagem com ligantes, e se ligam a sequências específicas de DNA, conhecidas como elementos responsivos aos receptores nucleares (83).

A maioria dos receptores nucleares é regulada de maneira endógena por ligantes lipofílicos, como esteroides, fosfolipídios e retinóides. Contudo, essa família de receptores também compreende membros para aos quais os ligantes ainda não foram identificados (84).

Com relação à estrutura, os RNs são constituídos por vários domínios funcionais, que podem executar sua função de maneira autônoma. Na região NH₂-terminal (A/B), encontra-se o domínio AF-1 (função de ativação 1), que apresenta função de ativação independente do ligante. Essa região também é o local onde os vários tipos de receptores se diferenciam entre si, sendo o domínio menos conservado, tanto em tamanho quanto em sequência de aminoácidos. Em seguida, encontra-se o domínio de ligação ao DNA (DBD) ou região C, região mais conservada entre os receptores, tendo como principal função, reconhecer e promover a ligação do receptor a regiões específicas do DNA, denominadas elementos responsivos aos hormônios, que estão localizadas nos promotores de seus genes alvo (83,85).

Os RNs também apresentam um domínio de ligação ao ligante (LBD) ou região E, que é multifuncional. Nesse domínio ocorre a interação com o ligante, a homodimerização ou heterodimerização do receptor e a associação com proteínas correguladoras. No LBD também se localiza o motivo AF-2 (função de

ativação 2) que, ao contrário do AF-1, é responsável pela ativação transcricional dependente do ligante (86).

Entre o DBD e o LBD se encontra o domínio D, também conhecido como dobradiça, por funcionar como uma articulação entre essas regiões, permitindo a rotação do DBD e a interação com diversas sequências do elemento responsivo (83). Alguns receptores apresentam um domínio terminal COOH ou região F, contudo sua função ainda é desconhecida (83).

Na Figura 5 podem ser observados todos os domínios descritos anteriormente, mostrando, assim, a organização estrutural de um receptor nuclear.

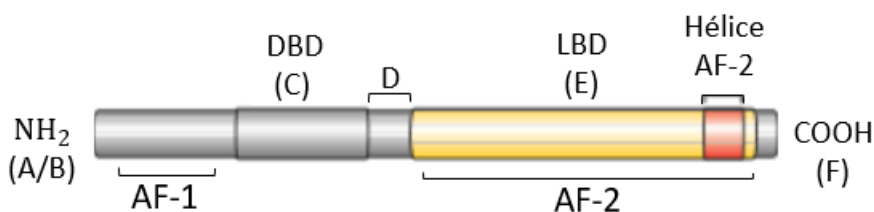


Figura 5. Organização estrutural de um receptor nuclear. Receptores nucleares apresentam dois domínios bem conservados, o domínio de ligação ao DNA (DBD) e o domínio de ligação ao ligante (LBD) que estão localizados na região C-terminal. A maioria dos receptores nucleares também apresenta domínios menos conservados como o N-terminal e o COOH. Eles também apresentam regiões importantes para a atividade transcricional, os domínios AF-1 e AF-2, localizados na região N-terminal e no domínio LBD, respectivamente. **Figura adaptada de:** Benoit et al. Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies. Trends in Cell Biology. 2004;14(7): 369-376 (87)

Muitos receptores nucleares apresentam papéis fundamentais no desenvolvimento de algumas doenças e, devido a isto, eles têm sido utilizados para o desenvolvimento de moléculas sintéticas que possam atuar mimetizando a ação de um ligante endógeno típico, os agonistas, ou que possam bloquear a ação dos ligantes endógenos, os antagonistas (87). Para a maioria dos receptores, os agonistas se ligam ao domínio LBD, promovendo uma mudança conformacional que leva ao recrutamento de proteínas coativadoras, resultando no aumento da transcrição do gene alvo. No caso de ligantes com efeito antagonista, sua ligação ao LBD impede que essa mudança conformacional aconteça, não ocorrendo o recrutamento das proteínas coativadoras e o estímulo à transcrição (88).

A superfamília de receptores é subdividida em três classes, de acordo com a natureza química dos ligantes, sendo elas a dos receptores endócrinos, dos receptores “órfãos adotados” e dos receptores “órfãos verdadeiros”.

A classe de receptores endócrinos engloba receptores com grande afinidade por hormônios lipossolúveis e vitaminas. Estão presentes nessa classe receptores essenciais para o controle da homeostase do sistema endócrino, incluindo os receptores para hormônios esteroides, receptores de hormônios tireoidianos (TRs), receptor de glicocorticoide (GR), receptores de ácido retinóico (RAR) e receptores de vitamina D (VDR) (89).

Os receptores “órfãos adotados”, são assim denominados porque, quando descobertos, não possuíam ligantes conhecidos, sendo considerados “órfãos”. Após a identificação de seus ligantes naturais, passaram a ser denominados órfãos adotados. Nessa classe estão os receptores com baixa afinidade por lipídeos dietéticos e xenobióticos que formam heterodímeros com RXR α , incluindo o receptor pregnano X (PXR) e os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs), que atuam na regulação da homeostase de lipídeos e carboidratos (89).

Os receptores órfãos verdadeiros constituem uma classe identificada através de análises comparativas das suas sequências de aminoácidos com as de membros conhecidos da superfamília de receptores nucleares. Considerando que seus ligantes naturais ou sintéticos ainda não foram descobertos, são denominados “órfãos verdadeiros” (90). Dentre os receptores nucleares dessa classe se encontram o receptor testicular, o receptor 4A e o receptor nuclear específico da célula fotorreceptor (PNR). Quanto à regulação da sua atividade, existe a possibilidade que seja através de sua própria expressão, modificações covalentes, disponibilidade de proteínas coativadoras ou pela combinação desses fatores. Apesar dos poucos conhecimentos sobre esses receptores, evidências genéticas apontam que eles podem estar envolvidos na regulação metabólica (89).

3.3.1 Receptores Ativados Por Proliferadores Peroxissomais

Os receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs) compreendem três isoformas, o PPAR α , PPAR β e o PPAR γ , que se diferem em sua distribuição tecidual, ligantes e papéis fisiológicos (91).

Esses receptores são fatores de transcrição dependentes de ligantes que regulam a expressão do gene alvo, ligando-se a elementos responsivos específicos de proliferadores peroxissomais (PPREs), presentes nos promotores dos seus genes alvo. Cada receptor se liga a seu PPRE como um heterodímero com o RXR α e, ao se ligar a um agonista, sofre uma mudança conformacional caracterizada pela formação de uma fenda de ligação e, então, ocorre o recrutamento de coativadores, como o SRC-1 (co-ativador 1 do receptor de esteroides) (91).

A primeira clonagem de PPAR foi feita com o PPAR α e ocorreu durante a pesquisa por alvos moleculares de agentes de proliferação de peroxissomos hepáticos em roedores. Desde então, vários estudos foram realizados e conduziram à descoberta de uma grande variedade de ácidos graxos poliinsaturados e eicosanóides como ligantes fisiológicos dos PPARs (91,92).

3.3.1.1 PPAR α

O PPAR α atua como indutor de β -oxidação e transporte de ácidos graxos, sendo altamente expresso em tecidos como o adiposo marrom, hepático, muscular esquelético, renal e cardíaco (93). Também se encontra presente na parede vascular e em células espumosas humanas, onde exerce efeitos anti-inflamatórios e antiaterogênicos (94).

Esse receptor nuclear atua como sensor nutricional, permitindo a adaptação dos níveis de oxidação de ácidos graxos, lipogênese e síntese de corpos cetônicos em resposta à alimentação e jejum (95).

O PPAR α é ativado por uma ampla gama de ácidos graxos endógenos como ácido linoleico e ácido palmítico, eicosanóides como LTB₄ e os ácidos

hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) e por ligantes sintéticos como GW7647, WY14643 e fibratos como o bezafibrato e fenofibrato, que são utilizados no tratamento de dislipidemia (96).

Estudos mostram que, em roedores, a ativação do PPAR α está associada à redução da esteatose, inflamação e fibrose hepática (97). Já em humanos com esteatose hepática, a expressão de PPAR α é menor e aumenta após mudanças no estilo de vida ou cirurgia bariátrica, o que é acompanhado de melhora no aspecto histológico do fígado (98). Além disso, estudos *in vivo* também mostraram que a ativação do PPAR α por um agonista diminui os níveis de triglicerídeos, possivelmente por seu efeito sobre os ácidos graxos e o metabolismo de lipoproteínas (99).

Há trabalhos mostrando que alguns desreguladores endócrinos têm capacidade de promover a ativação de PPAR α , como alguns ftalatos e seus metabólitos e alguns agrotóxicos como o diclofope-metílico, piretrinas e imazalil (100,101).

3.3.1.2 PPAR β

O PPAR β é a isoforma menos estudada dentre os PPARs. Ele é expresso em adipócitos, no coração, na musculatura esquelética, no fígado e em macrófagos (102). No fígado é expresso, principalmente, nos hepatócitos e em células endoteliais, mas também se encontra em células de Kupffer, o que sugere que ele pode influenciar a atividade inflamatória e fibrose (103).

Estudos realizados por Hellemans e colaboradores, em 2003, indicam que a ativação de PPAR β também pode levar a um aumento na proliferação de células hepáticas estreladas e regular o metabolismo da vitamina A (104,105). Em geral, a ativação desse receptor está relacionada com a oxidação de ácidos graxos mitocondriais, gasto de energia e termogênese (89).

Entre os seus ligantes, encontram-se alguns ácidos graxos como ácido araquidônico e ácido linoleico, eicosanoides como a prostaciclina e ligantes sintéticos como GW501516 e GW0742 (96).

Um estudo utilizando animais obesos com resistência insulínica mostrou que, o tratamento com o agonista de PPAR β GW501516, promoveu grande aumento no HDL (lipoproteína de alta densidade) e diminuição nos triglicerídeos, LDL (lipoproteína de baixa densidade) e nos níveis de insulina em jejum (106).

Atualmente, estão sendo testados medicamentos para dislipidemia que envolvem a ativação de PPAR β com foco no seu potencial em aumentar o HDL (107). O MBX-8025, novo agonista desse receptor, foi avaliado em um estudo duplo-cego randomizado, que incluiu 181 homens e mulheres com sobrepeso e dislipidemia. Nesse estudo, os participantes receberam placebo, atorvastatina, medicamento indicado para diminuir colesterol total e LDL, MBX-8025 ou uma combinação de atorvastatina e MBX-8025. Eles observaram que os indivíduos tratados com MBX-8025 apresentaram resultado favorável no perfil lipídico e diminuição de enzimas do fígado, dentre elas a fosfatase alcalina (108).

3.3.1.3 PPAR γ

O PPAR γ é expresso, principalmente, no tecido adiposo, sendo o regulador chave da adipogênese e tem papel importante no processo de armazenamento de lipídeos (109). A ativação desse receptor, aumenta o número de adipócitos e promove a realocação e armazenamento de gordura no tecido adiposo, protegendo outros órgãos e tecidos periféricos da lipotoxicidade (110). Sua ativação nos adipócitos também garante que a secreção de adipocitocinas, como a adiponectina e leptina, seja balanceada. Essas adipocitocinas atuam como mediadores da ação da insulina em tecidos periféricos, mantendo a sensibilidade à insulina em todo o corpo (111).

O PPAR γ possui 4 subtipos de RNA mensageiro que se originam de promotores diferentes, sendo eles o - γ 1, expresso em uma ampla gama de tecidos que incluem o coração, rins e pâncreas, o - γ 2, expresso principalmente no tecido adiposo branco, o - γ 3, expresso no intestino grosso, tecido adiposo branco e em macrófagos e o - γ 4, expresso em células endoteliais (112). Contudo, apenas duas proteínas são sintetizadas devido ao uso de promotores diferentes e do *splicing* alternativo na extremidade 5' do gene. Os PPAR - γ 1, - γ 3

e $\gamma 4$ dão origem ao PPAR γ 1, expresso no tecido adiposo, retina, células hematopoiéticas, cólon e bexiga e o PPAR $\gamma 2$ origina o PPAR γ 2, altamente expresso nos tecidos adiposos branco e marrom (113).

De modo similar ao PPAR α , o PPAR γ é ativado por diversos ligantes naturais como ácido araquidônico, ácido docosa-hexaenóico, prostaglandinas e HETEs e ligantes sintéticos, entre os quais se destacam as tiazolidinadionas (TZDs) como a rosiglitazona e a pioglitazona, uma classe de medicamentos caracterizada por apresentar efeitos sensibilizadores de insulina (96,114). As TZDs promovem armazenamento de ácidos graxos no tecido adiposo, aumentando sua massa, enquanto poupa o músculo e o fígado (115). Contudo, esses medicamentos podem apresentar efeitos adversos como insuficiência cardíaca (116,117) e, devido a isso, apenas a pioglitazona continua sendo utilizada no tratamento de pacientes diabéticos (118).

Estudos mostram que ligantes de PPAR γ têm a capacidade de inibir a produção de TNF α , IL-1 β e IL-6 (119). A ativação desse receptor também inibe a atividade de fatores de transcrição pro-inflamatórios induzidos por citocinas como AP-1, NF- κ / β e STAT1 (120).

Alguns desreguladores endócrinos descritos na literatura promovem a ativação de PPAR γ . Dentre eles podem ser citados o TBT e o DBT, utilizados como estabilizadores na fabricação do policloreto de polivinila (PVC) (27,28), alguns análogos halogenados de bisfenol A, utilizados na fabricação de plásticos (121), e agrotóxicos como diazinon e o triflumizol (122,123).

3.3.2 Receptor de Glicocorticoide

O receptor de glicocorticoide (GR) está localizado no citoplasma ligado a chaperonas como a proteína de choque térmico 90 (PCT90), na ausência de glicocorticoides. Quando um ligante interage com este receptor, ocorre uma mudança conformacional, fazendo com que ele seja translocado para o núcleo, onde exercerá suas funções de transativação e transrepressão (124).

O GR regula a expressão dos seus genes alvo através da ligação direta aos elementos responsivos a glicocorticoides (GREs) ou através da interação com outros fatores de transcrição ligados ao DNA. Uma vez ligado ao GRE como

homodímero, o GR permite a montagem de complexos macromoleculares distintos, que incluem proteínas coativadoras, fatores de remodelação da cromatina e outros fatores que direta ou indiretamente, envolvem a maquinaria transcricional (125).

O GR reprime a resposta transcricional de sinais inflamatórios, sendo um componente essencial para a homeostase e um mecanismo primário por meio do qual seus agonistas naturais ou sintéticos exercem efeitos anti-inflamatórios. A regulação negativa da resposta inflamatória pode resultar da habilidade do GR de interferir, através da transrepressão, na atividade de outros fatores de transcrição dependentes de sinais, incluindo o NF- κ B e a AP-1 (126,127).

Os genes controlados pelo GR na transativação, estão envolvidos na regulação metabólica e promovem aumento dos níveis de glicose no sangue, gliconeogênese e mobilização de aminoácidos e ácidos graxos (128).

O GR possui duas isoformas, o GR α e GR β . O GR α se liga aos glicocorticoides e se transloca para o núcleo, recrutando corre reguladores para que possa exercer seus efeitos transcricionais. Já o GR β está presente constantemente no núcleo, atuando como inibidor natural do GR α e além disso, pode regular genes não regulados pelo GR α (124).

Com relação aos seus ligantes, o glicocorticoide natural é o cortisol, um hormônio derivado do colesterol secretado pela zona fasciculada das glândulas adrenais (129). A síntese e liberação dos glicocorticoides se dá através da dinâmica circadiana e regulação pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (129) e sua disponibilidade nos tecidos é regulada pela globulina ligadora do cortisol, que também pode ser denominada transcortina, e pela expressão local da enzima 11 β -hidroxisteróide desidrogenase (130). Como ligantes sintéticos, se encontram medicamentos que se assemelham aos glicocorticoides naturais como prednisona, dexametasona e budesonida que, diferente dos ligantes naturais, não se ligam às transcortinas (124).

Os glicocorticoides apresentam propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativas, pró-apoptóticas e antiangiogênicas e, devido a isso, são utilizados para o tratamento de diversas doenças como psoríase, asma e para prevenção de rejeição de órgãos transplantados (124,131,132).

Apesar dos benefícios, o uso de glicocorticoides também pode desencadear efeitos adversos. Alguns estudos mostram que baixos níveis de

glicocorticoides têm sido associados com transtornos psiquiátricos como transtorno de estresse pós-traumático (133) e altos níveis desses hormônios têm sido associados a casos de depressão (134).

O GR também possui papel na adipogênese, pois promove o aumento da expressão de proteínas ligantes ao amplificador (CCAAT), C/EBP- β e C/EBP- δ , que são importantes para ativação do PPAR γ (135).

Com relação aos desreguladores endócrinos, um estudo realizado por Sargis e colaboradores mostrou que 4 compostos promoveram ativação do GR, sendo eles o bisfenol A, o ftalato de diciclohexilo e dois agrotóxicos, a endrina e a tolifluanida. Esses compostos também promoveram acúmulo lipídico em células 3T3-L1(136).

3.3.3 Receptor de Hormônios Tireoidianos

O receptor de hormônios tireoidianos atua como regulador chave das funções da tireoide, controlando o tamanho e o número de tireócitos, além da síntese e secreção dos hormônios tireoidianos (137). Distúrbios nesse receptor podem levar a diversas doenças como hiper e hipotireoidismo e tumores na tireoide (138–140).

O TR se apresenta em duas isoformas, TR α e TR β , que são codificadas por dois genes, o THRA e o THRB, respectivamente. O THRA é transcrito como os mRNAs TR α_1 e TR α_2 . O TR α_1 é expresso em diversos tecidos, porém é mais abundante no sistema nervoso central, miocárdio, trato gastrointestinal e musculatura esquelética. O TR α_2 está presente em diversos tecidos como o cerebral, testicular e suas funções ainda são pouco conhecidas. O THRB é transcrito também como dois mRNAs, o TR β_1 , que é a isoforma expressa predominantemente no fígado e rins e o TR β_2 , que tem expressão limitada à retina e parte interna do ouvido (141).

Os hormônios tireoidianos T₃ (triiodotironina) e T₄ (tiroxina), alteram a expressão gênica se ligando ao TR que por sua vez, se liga a sequências regulatórias do DNA, os elementos responsivos aos hormônios tireoidianos

(TREs), preferencialmente, como heterodímeros com o RXR α , embora também possa se ligar a alguns TREs como homodímeros (142).

O TR pode atuar de maneira independente do ligante, o que pode alterar a taxa de transcrição dos genes dependendo se ele está ou não ligado ao T₃ (143). Na ausência de hormônios, o TR recruta um complexo de proteínas correpessoras, como o correpessor do receptor nuclear (NCoR) e a histona deacetilase, que reprimem a transcrição basal. A associação do TR a um ligante, promove a dissociação do complexo correpessor e uma mudança conformacional que leva ao recrutamento de proteínas co-ativadoras que medeiam a ativação transcricional (142).

O TR possui como ligantes naturais o T₃ e o T₄ e como sintéticos, foram desenvolvidos o GC-1 e o KB-141. Em estudos realizados em ratos com hipotireoidismo, observou-se que o GC-1 reduziu os níveis de colesterol e de hormônio tireoestimulante (TSH), sem modificar a frequência cardíaca (144). Outro estudo utilizou o KB-141 em ratos, mostrou resultado semelhante, com redução dos níveis de colesterol plasmático sem a taquicardia observada nos animais tratados com T₃ (145).

Na literatura, foram descritos alguns desreguladores endócrinos capazes de alterar a atividade transcricional do TR e a sinalização do hormônio tireoidiano. O bisfenol A pode atuar como antagonista do TR, impedindo sua ativação pelo T₃, suprimindo sua atividade transcricional de maneira dose-dependente (146). A bifenila policlorada interfere na sinalização do TR e perturba a diferenciação de oligodendrócitos (147). A exposição *in utero* a alguns agrotóxicos do grupo dos organoclorados pode alterar os níveis de hormônios tireoidianos, podendo prejudicar o desenvolvimento nos estágios iniciais da infância (148).

3.3.4 Receptor Pregnano X

O PXR é um receptor de ampla especificidade e desempenha papel fundamental nas diferentes fases do metabolismo de fármacos, xenobióticos e esteroides (149). Devido a isto, o PXR é altamente expresso no fígado e, em menores níveis, no intestino, sendo, ambos órgãos, sítios importantes para o metabolismo de produtos químicos (150). Contudo, ele também é expresso em diversos outros locais como cérebro, próstata, coração, estômago, ovário, medula óssea e apresenta elevada expressão em alguns tipos de cânceres como de mama, ovário, próstata e osteosarcoma (151).

Quando esse receptor é ativado, forma um heterodímeros com o RXR α , se liga a promotores específicos, promovendo a expressão de genes alvo como o do citocromo P450 3A4 (CYP3A4) e da proteína de resistência a múltiplas drogas 1 (MDR1) (152).

O PXR também é importante para a proteção de sistema endócrino contra os desreguladores endócrinos pois, ao identificar concentrações elevadas dessas substâncias, estimula vias de desintoxicação, resultando na diminuição da interação dos desreguladores endócrinos com outros receptores nucleares (152). Esse receptor também tem a capacidade de regular a homeostase da glicose e de lipídeos, diminuindo o risco de algumas doenças como esteatose hepática e de hiperglicemia (153).

O PXR tem a capacidade de interagir com diversos tipos de ligantes com diferenças estruturais significativas, dentre eles os esteroides endógenos como o ácido litocólico, alguns metabólitos do colesterol e diversos ligantes sintéticos como rifamicina, dexametasona, nicardipina, artemisinina e alguns antifúngicos como o clotrimazol (154,155).

Na literatura já foram reportados alguns desreguladores endócrinos com capacidade de ativar o PXR. Dentre eles podem ser citados o bisfenol A, que pode atuar como agonista desse receptor (156) e alguns agrotóxicos do grupo dos organoclorados como o clordano e o endosulfan, que promoveram ativação do PXR seguida da expressão do mRNA da CYP3A4 em hepatócitos (157).

4. MÉTODOS

4.1 REAGENTES E MATERIAIS

As células HeLa e 3T3-L1 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (158,159). As células HeLa foram utilizadas nos ensaios de transfecção e gene repórter e as células 3T3-L1, nos ensaios de diferenciação de adipócitos, incluindo os realizados para coloração e avaliação da expressão gênica por RT-qPCR.

O meio de cultura de células DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), o soro neonatal bovino e o soro fetal bovino foram obtidos da Gibco®.

O soro fetal bovino tratado com carvão foi adquirido da Merck S/A.

Os agrotóxicos ametrina (número do produto 45321, lote BCBT4165) e carbosulfano (número do produto 32005, lote BCBV2108) foram adquiridos da Merck S/A.

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

A rosiglitazona foi adquirida da Cayman Chemical e foi utilizada como controle positivo nas transfecções com PPAR γ nos ensaios de diferenciação de adipócitos.

Os controles positivos dexametasona, WY14643, GW0742, T3 e rifamicina, utilizados nos ensaios de transfecção e gene repórter, foram adquiridos da Merck S/A.

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.

A insulina, utilizada no ensaio de diferenciação celular, foi adquirida da Merck S/A.

O óleo vermelho O, utilizado na coloração das células 3T3-L1, foi adquirido da Merck S/A.

As sequências dos *primers* utilizados para amplificação dos transcritos gênicos foram obtidas do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e a síntese foi realizada pela IDT® (*Integrated DNA Technologies*).

O TRIzol e o *Amplification Grade DNase I*, utilizados no ensaio de PCR quantitativa em tempo real, foram obtidos da Merck S/A.

O *kit Power SYBR® Green RNA-to-CT 1- Step* utilizado no ensaio de PCR quantitativa em tempo real foi adquirido da *Applied Biosystems*.

4.2 PREPARO DOS AGROTÓXICOS E CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS

Os agrotóxicos foram diluídos em DMSO na maior concentração possível, considerando a solubilidade de cada composto nesse solvente.

Para ambos os compostos, a maior concentração solúvel foi de 100000µM e, a partir desta concentração, foram realizadas diluições seriadas (de 10 em 10 vezes) em DMSO até a concentração de 100µM.

Dessa forma, tanto a ametrina quando o carbosulfano foram diluídos nas concentrações de 100000µM a 100µM.

A definição das concentrações dos agrotóxicos a serem utilizadas nos ensaios, foi realizada a partir de resultados de viabilidade celular previamente conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa.

A citotoxicidade dos compostos nas células HeLa e 3T3-L1 foi determinada por meio da avaliação da atividade mitocondrial das células e, para tanto, utilizou-se o método colorimétrico com o reagente MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio).

Os resultados mostraram que nas células 3T3-L1, a ametrina não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações testadas. Já nas células HeLa, esse agrotóxico ultrapassou o limite pré-estabelecido de 30% de morte celular na concentração de 100µM, então esta concentração não foi utilizada nos demais ensaios. Já o carbosulfano, não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações, tanto para as células 3T3-L1 quanto para as HeLa e, portanto, todas as concentrações foram utilizadas para realizar os ensaios.

4.3 ENSAIO DE TRANSFEÇÃO E GENE REPÓRTER

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar o possível efeito dos agrotóxicos sobre a atividade transcricional dos receptores nucleares GR α , PPAR α , PPAR β , TR α , TR β e PXR e para avaliar se a cisteína 285, localizada no LBD do PPAR γ , é importante para a ativação deste receptor pelo carbosulfano. Alguns estudos mostram que essa cisteína é essencial para ligação de ligantes endógenos (160). Além disso, alguns ligantes sintéticos de PPAR γ , como, por exemplo, o GW9662, também têm capacidade de se ligar à mesma (161).

Sendo assim, aproximadamente 30.000 células HeLa foram semeadas em placas de 48 poços, em meio de cultura DMEM acrescido de soro fetal bovino (SFB) 10% e incubadas a 37°C com 5% CO₂.

Após 24 horas, as células foram co-transfectadas, por poço, com 60ng do plasmídeo contendo o DNA complementar do receptor nuclear GR α e 240ng do plasmídeo GRE-LUC que possui seu elemento responsivo (GRE) fusionado ao gene repórter da luciferase ou com 60ng do plasmídeo contendo o DNA complementar do receptor quimérico constituído pelo LBD do PPAR α , PPAR β , TR α , TR β ou PXR fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4 e 240ng do plasmídeo contendo seu elemento responsivo fusionado ao gene repórter da luciferase (GAL4-LUC).

No caso do ensaio realizado com o PPAR γ contendo a mutação C285S, as células foram co-transfectadas com 60ng do plasmídeo contendo a sequência que codifica o receptor nuclear quimérico constituído pelo LBD do PPAR γ com a mutação, fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4 (LBD-PPAR γ C285S/DBD-GAL4) ou com 60ng do plasmídeo que codifica o receptor nuclear quimérico constituído pelo LBD do PPAR γ fusionado ao DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4 e com 240ng do plasmídeo contendo seu elemento responsivo fusionado ao gene repórter da luciferase (GAL4-LUC).

A transfecção foi realizada com 0,5 μ L, por poço, do reagente *Lipofectamine*TM 2000, conforme recomendações do fabricante e, posteriormente, as células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂.

Após 4 horas da co-transfecção com os plasmídeos, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino tratado com carvão, que remove moléculas não polares, mantendo apenas os nutrientes no soro. A seguir, foram adicionados os tratamentos, sendo eles veículo (DMSO – controle negativo), dexametasona 10 μ M (controle positivo, agonista de GR α), WY14643 100 μ M (controle positivo, agonista de PPAR α), GW0742 100 μ M (controle positivo, agonista de PPAR β), T3 0,1 μ M (controle positivo, agonista de TR α e β), rifamicina 10 μ M (controle positivo, agonista de PXR), rosiglitazona 10 μ M (controle positivo, agonista de PPAR γ) ou concentrações crescentes dos agrotóxicos ametrina (0,0001 a 10 μ M) ou carbosulfano (0,0001 a 100 μ M) e as células foram novamente incubadas a 37°C e 5% de CO₂.

Entre 20 e 24 horas após o tratamento, o meio de cultura foi removido e as células foram lisadas pela adição de 100 μ L de tampão de lise (100nM tris pH 7,6 e 0,2% de Triton 100X em quantidade suficiente para 100 mL de água destilada), seguida pela agitação em vórtex por, aproximadamente, 2 minutos. Após completa lise celular, 10 μ L do lisado de cada amostra foram utilizados para quantificação da atividade da luciferase, a partir da adição de 20 μ L seu substrato, luciferina (*Reporter Luciferase Assay Kit*), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação da luminosidade foi realizada em um luminômetro (*GloMax® 20/20 Luminometer - Promega®*) em unidades relativas de luz.

O efeito das diferentes concentrações dos ligantes sobre a atividade transcricional dos receptores foi avaliado utilizando a análise de variância (*one-way ANOVA*), seguido por comparações múltiplas feitas pelo teste de *Bonferroni* utilizando o programa *GrandPad Prism* versão 6 (*Dotmatics*). O critério de significância para todas as análises foi $p \leq 0,5$. Cada ensaio foi realizado em triplicata biológica e repetido, no mínimo, três vezes.

4.4 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR COM A PRESENÇA DE ANTAGONISTA

Resultados ainda não publicados do grupo de pesquisa do qual faço parte mostraram que a ametrina e o carbosulfano promovem acúmulo lipídico em células 3T3-L1 em suas maiores concentrações testadas. Com isso, para avaliar

se este acúmulo é dependente da ativação do PPAR γ , foi realizado o ensaio de diferenciação celular, utilizando o antagonista desse receptor, T0070907.

O T0070907 é um potente e seletivo antagonista de PPAR γ e tem a capacidade de se ligar a ele de forma irreversível, na cisteína 313, presente na hélice 3 do seu domínio de ligação ao ligante (LBD). Estudos também indicam que ele pode modular a interação do PPAR γ com cofatores de transcrição, alterando a conformação da hélice 12, impossibilitando a ligação de um agonista neste sítio (162).

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

Ao atingirem 100% de confluência, as células foram mantidas sob as mesmas condições mencionadas anteriormente para garantir que houve a parada de crescimento, um pré-requisito essencial para a diferenciação das células 3T3-L1(163).

Após este período, o meio de cultura foi substituído por DMEM acrescido de SFB a 10%, 100U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e do coquetel indutor de adipogênese, constituído de insulina a 1 μ g/mL e dexametasona a 0,5 μ M. Além disso, as células foram tratadas com controle negativo (veículo – DMSO), controle positivo (rosiglitazona 0,1 μ M e 1 μ M) ou com os agrotóxicos nas concentrações de 1, 10 e 100 μ M. O meio de cultura e os tratamentos foram renovados a cada 3 dias durante 15 dias e o antagonista T0070907 (1 μ M) foi adicionado a cada 12 horas até o final do experimento.

No 15º dia, as células foram fixadas e coradas com óleo vermelho O. Para isto, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com tampão fosfato salina (*Phosphate-Buffered Saline* – PBS) e fixadas com formaldeído a 4% por 40 minutos. Após este tempo, o formaldeído foi removido e os poços foram lavados com PBS e água destilada. A seguir, foram adicionados 2mL de isopropanol a 60% a cada poço e mantidos por 5 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas, durante 1 hora, com óleo vermelho O a 60% em água destilada, a partir de um estoque a 0,5% em isopropanol. A fotodocumentação

foi realizada registrando uma área de 9,5 cm², correspondendo à superfície total de um poço de uma placa de 6 poços.

Para avaliação dos resultados, os poços sem a presença do antagonista T0070907 foram comparados aos poços com a presença dele, com intuito de observar se o antagonista diminuiria o acúmulo lipídico promovido pelos agrotóxicos.

Cada ensaio foi repetido, no mínimo, duas vezes.

4.5 ENSAIO DE PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

A avaliação do efeito da ametrina sobre a expressão dos genes inflamatórios Dcn (decorina), Fn1 (fibronectina 1) e Vcam1 (molécula 1 de adesão celular vascular), foi feita através da extração do RNA total seguida pela síntese de cDNA por transcrição reversa (RT) e amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real/quantitativa (RT-qPCR).

Os genes avaliados apresentam funções relacionadas à obesidade e resistência à insulina. O Dcn está relacionado à diminuição da proliferação de adipócitos, afetando a expansão do tecido adiposo, o que pode ser fator determinante no desenvolvimento da resistência à insulina (164), o Vcam1 está envolvido na patogênese da obesidade e na integridade da parede vascular (165) e o Fn1, cuja proteína está presente em elevada concentração plasmática em indivíduos obesos (166).

Para realizar este ensaio, aproximadamente 48.000 células 3T3-L1 foram semeadas, por poço, em placas de 6 poços, em meio de cultura DMEM acrescido de SNB 10%, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina e mantidas a 37°C e 5% CO₂. O meio de cultura foi renovado a cada 3 dias até que as células atingissem 100% de confluência.

Ao atingirem 100% de confluência, as células foram mantidas por mais 3 dias sob as mesmas condições, para garantir que houve a parada de crescimento que, como mencionado anteriormente, é um passo essencial para a diferenciação celular.

Passados os 3 dias, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM acrescido de SFB a 10%, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e do coquetel indutor de adipogênese, constituído de insulina a 1µg/mL e dexametasona a 0,5µM. Além disso, as células foram tratadas com controle negativo (veículo – DMSO), controle positivo (rosiglitazona 0,1µM e 1µM) ou com concentrações de 0,1µM a 100µM do agrotóxico ametrina.

Para avaliar os genes inflamatórios, o meio de cultura e os tratamentos foram renovados a cada 3 dias e, no 15º dia, o RNA total foi coletado utilizando o reagente TRIzol, conforme as instruções do fabricante.

Em seguida, o RNA total foi isolado e tratado com DNase I (*Amplification Grade DNase I – Merck S/A*), seguindo as recomendações do fabricante, para remover possíveis contaminações com DNA genômico. Para determinar o grau de pureza das amostras e quantificar o RNA total, utilizou-se o espectrofotômetro *NanoVue Plus (GE Healthcare)*.

Após o tratamento com DNase, foi realizada, em uma única etapa, a transcrição reversa (RT) de 5ng de RNA total seguida pela amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) utilizando o *kit Power SYBR® Green RNA-to-CT 1- Step (Applied Biosystems)*. Todas as reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*.

Os valores dos Cts obtidos nas reações de RT-qPCR para todos os genes alvos foram normalizados em função do controle endógeno (*Gapdh*). A quantificação relativa da expressão dos genes foi feita utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$. A avaliação dos efeitos dos agrotóxicos sobre os genes em estudos, foi realizada pela comparação da sua expressão relativa nas células tratadas com os agrotóxicos e nas tratadas com o veículo.

Para a análise estatística utilizou-se a análise de variância (*one-way ANOVA*), seguido por comparações múltiplas feitas pelo teste de *Bonferroni* no programa *GrandPad Prism* versão 6. O critério de significância para todas as análises foi $p \leq 0,05$. Cada experimento foi realizado em triplicata biológica e repetido, no mínimo, três vezes.

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS AGROTÓXICOS SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO GR α

De acordo com resultados ainda não publicados, tanto a ametrina quanto o carbosulfano apresentaram potencial adipogênico em células 3T3-L1. Devido a isto, também foram testados, por meio de ensaio de transfecção e gene repórter, se estes agrotóxicos ativariam os receptores PPAR γ e RXR α e, como resultados, descobriu-se que o carbosulfano ativa o PPAR γ , mas nenhum dos dois agrotóxicos ativa o RXR α . Dessa forma, buscando elucidar o mecanismo pelos quais esses compostos induzem a adipogênese, investigou-se se eles poderiam agir por meio do receptor nuclear GR α .

No ensaio, como controle positivo, foi utilizada dexametasona a 10 μ M e para analisar o efeito dos agrotóxicos, foram utilizadas as concentrações 0,0001 a 10 μ M de ametrina ou 0,0001 a 100 μ M de carbosulfano.

Como é possível observar na Figura 6, a dexametasona promoveu ativação do receptor de 16,5 (Figura 6A) e 23 (Figura 6B) vezes, assim como esperado. Contudo, como mostram as Figuras 6A e 6B, a ametrina e o carbosulfano, respectivamente, não modificaram a atividade transcricional do GR α em nenhuma das concentrações utilizadas.

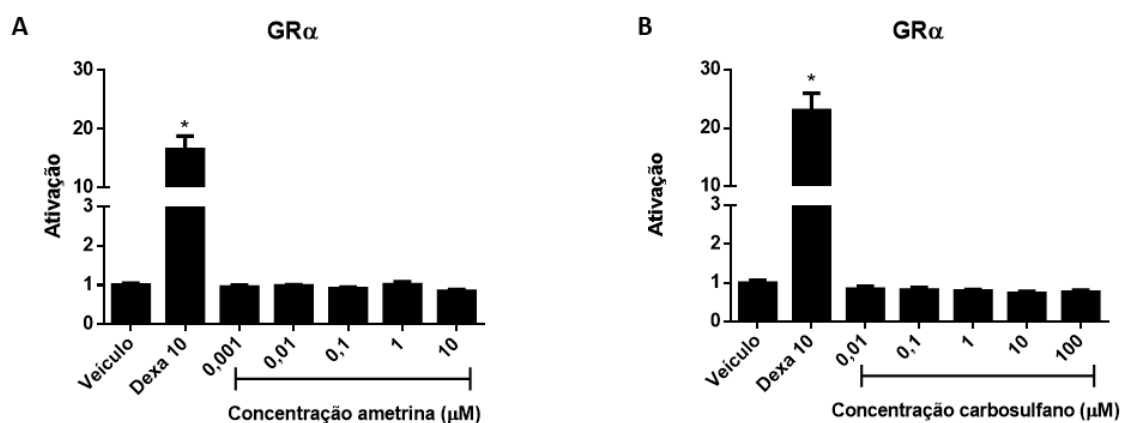


Figura 6. Efeito dos agrotóxicos sobre a atividade transcricional do GR. Células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do GR e seu elemento responsivo GRE-LUC e tratadas com veículo, dexametasona (Dexa) ou concentrações crescentes dos agrotóxicos ametrina (A) ou carbosulfano (B). Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média, da ativação dos ligantes comparada com a do veículo. A figura representa o resultado de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p \leq 0,5$.

5.2 AVALIAÇÃO DA CISTEÍNA 285 NA ATIVAÇÃO DO PPAR γ PROMOVIDA PELO CARBOSULFANO

Considerando que o carbosulfano promoveu ativação de PPAR γ , atuando como agonista parcial do mesmo, decidiu-se investigar se a cisteína 285 é importante para a atividade transcricional deste receptor induzida pelo carbosulfano.

Para isto, foi utilizado no ensaio de transfecção e gene repórter, um plasmídeo quimérico GAL4-PPAR γ onde houve a substituição da cisteína 285 por uma serina (C285S). No ensaio foram utilizados os cDNAs do PPAR γ (GAL4-PPAR γ), como controle positivo, ou do PPAR γ com a mutação (GAL4-PPAR γ C285S). As células foram tratadas com DMSO (controle negativo), rosiglitazona (10 μ M) ou carbosulfano nas concentrações de 1, 10 ou 100 μ M.

Como pode ser observado na Figura 7A, quando foi utilizado o plasmídeo com a mutação, a atividade transcricional do PPAR γ foi abolida na concentração de 100 μ M do carbosulfano, mostrando que a cisteína 285 é essencial para a ativação do PPAR γ por esse composto.

Na Figura 7B, podemos observar que a presença da mutação também aboliu a atividade transcricional da rosiglitazona, como era esperado.

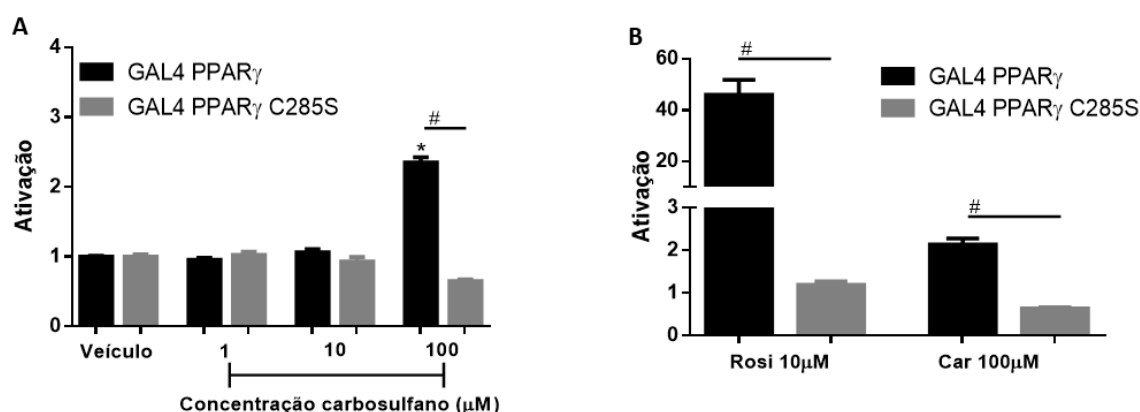


Figura 7. Ensaio de transfecção e gene repórter com o GAL4-PPAR γ C285S. Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do GAL4-PPAR γ ou o cDNA do GAL4-PPAR γ C285S, o elemento responsivo GAL4 fusionado ao gene repórter da luciferase e tratadas com veículo (controle negativo), rosiglitazona (controle positivo) ou concentrações crescentes do carbosulfano. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão da ativação dos ligantes comparada com a do veículo (DMSO). A figura representa os resultados de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p \leq 0,5$ (comparado ao veículo) e # $p \leq 0,5$ (comparado Gal4 PPAR γ versus Gal4 PPAR γ C285S)

5.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS AGROTÓXICOS SOBRE A ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DOS RECEPTORES NUCLEARES PPAR α , PPAR β , TR α , TR β E PXR

Resultados não publicados indicaram que o carbosulfano pode ser considerado agonista parcial do PPAR γ , diferente da ametrina, que não afeta a atividade transcricional deste receptor. Então, com intuito de avaliar se esses agrotóxicos teriam potencial de modificar a atividade transcricional dos outros membros da família dos PPARs e de outros receptores nucleares, foram realizados ensaios de transfecção e gene repórter com o PPAR α , PPAR β , TR α , TR β e o PXR. Como controle positivo para o PPAR α foi utilizado o WY14643 (100 μ M), para o PPAR β foi utilizado GW0742 (100 μ M), para os TRs - α e - β foi utilizado T3 (0,1 μ M), para o PXR, rifamicina (10 μ M) e para analisar o efeito dos agrotóxicos, foram utilizadas concentrações de 0,0001 a 10 μ M de ametrina ou 0,0001 a 100 μ M de carbosulfano.

Observando a Figura 8, pode-se verificar que o WY12643 aumentou em 11 (Figura 8A) e 19 (Figura 8B) vezes a atividade do receptor, como esperado. Nas Figuras 8A e 8B, pode-se observar que o tratamento com as concentrações crescentes da ametrina e do carbosulfano, respectivamente, não alteraram a atividade transcricional do PPAR α , similar ao que ocorreu com o GR α .

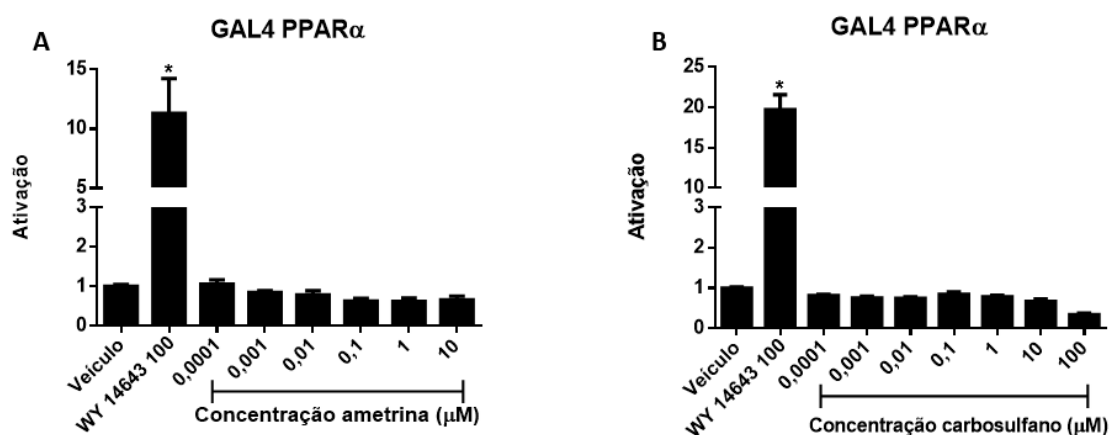


Figura 8. Efeito dos agrotóxicos sobre a atividade transcricional do PPAR α . Células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do GAL4-PPAR α e seu elemento responsivo GAL4- LUC e foram tratadas com veículo, WY 14643 ou concentrações crescentes dos agrotóxicos ametrina (A) ou carbosulfano (B). Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média, da ativação dos ligantes comparada com a do veículo. A figura representa o resultado de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p \leq 0,5$.

De modo semelhante, observando a Figura 9, é possível verificar que o GW0742 promoveu ativação do PPAR β de 15 (Figura 9A) e 12 (Figura 9B) vezes, como esperado. Contudo o tratamento com os agrotóxicos ametrina (Figura 9A) e carbosulfano (Figura 9B) não promoveu ativação deste receptor.

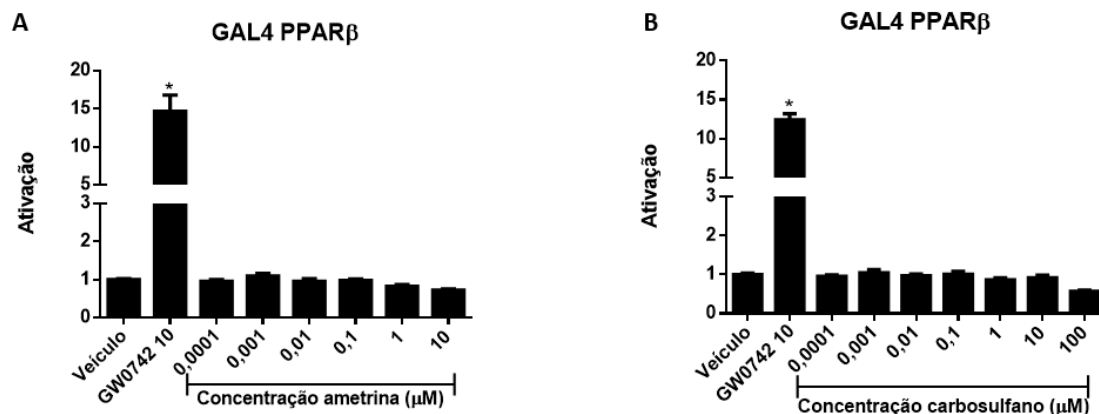


Figura 9. Efeito dos agrotóxicos sobre a atividade transcricional do PPAR β . Células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do GAL4-PPAR β e seu elemento responsivo GAL4- LUC e tratadas com veículo, GW0742 ou concentrações crescentes dos agrotóxicos ametrina (A) ou carbosulfano (B). Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média, da ativação dos ligantes comparada com a do veículo. A figura representa o resultado de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p \leq 0,5$.

Com relação ao TR α e TR β podemos constatar nas Figuras 10 e 11, que o T3 promoveu ativação dos receptores, assim como esperado, mas os agrotóxicos ametrina e carbosulfano também não promoveram ativação destes receptores, assim como ocorreu com os PPARs α e β .

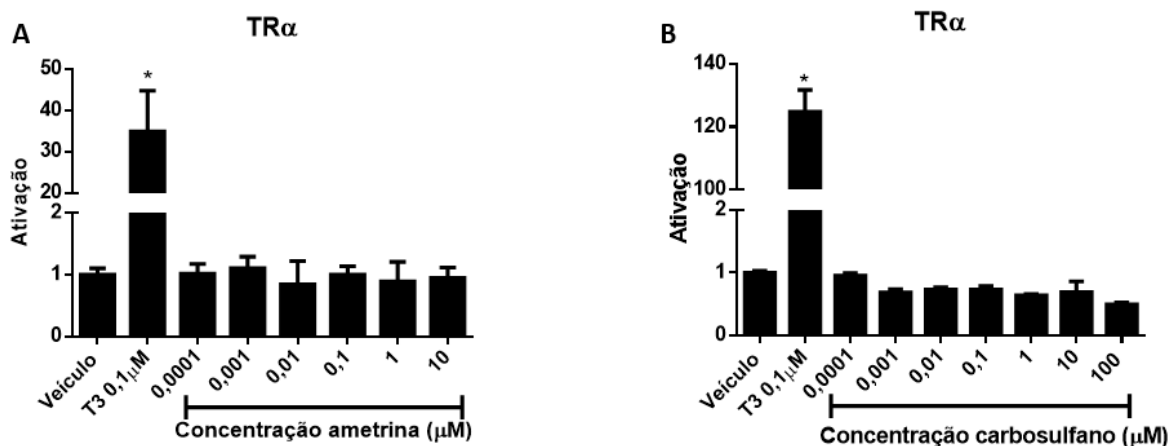


Figura 10. Efeito dos agrotóxicos sobre a atividade transcricional do TRα. Células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do GAL4-TRα e seu elemento responsivo GAL4-LUC e tratadas com veículo, T3 ou concentrações crescentes dos agrotóxicos ametrina (A) ou carbosulfano (B). Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média, da ativação dos ligantes comparada com a do veículo. A figura representa o resultado de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p \leq 0,5$.

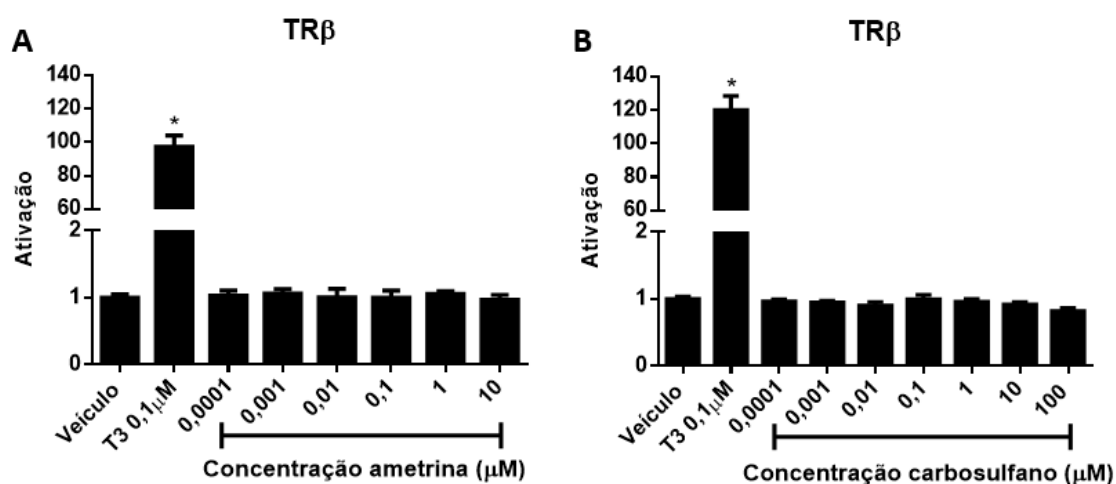


Figura 11. Efeito dos agrotóxicos sobre a atividade transcricional do TRβ. Células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do GAL4-TRβ e seu elemento responsivo GAL4-LUC e tratadas com veículo, T3 ou concentrações crescentes dos agrotóxicos ametrina (A) ou carbosulfano (B). Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média, da ativação dos ligantes comparada com a do veículo. A figura representa o resultado de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p \leq 0,5$.

No caso do PXR, pode-se observar na Figura 12, que a rifamicina induziu ativação de 7 vezes (Figura 12A) e 10 vezes (Figura 12B) em relação ao controle, como esperado. O carbosulfano (Figura 12B) também promoveu ativação de 2,8 vezes neste receptor, podendo ser considerado como seu agonista parcial. Já

no caso da ametrina (Figura 12A), pode-se observar que ela não promoveu ativação deste receptor, assim como ocorreu com todos os outros receptores investigados.

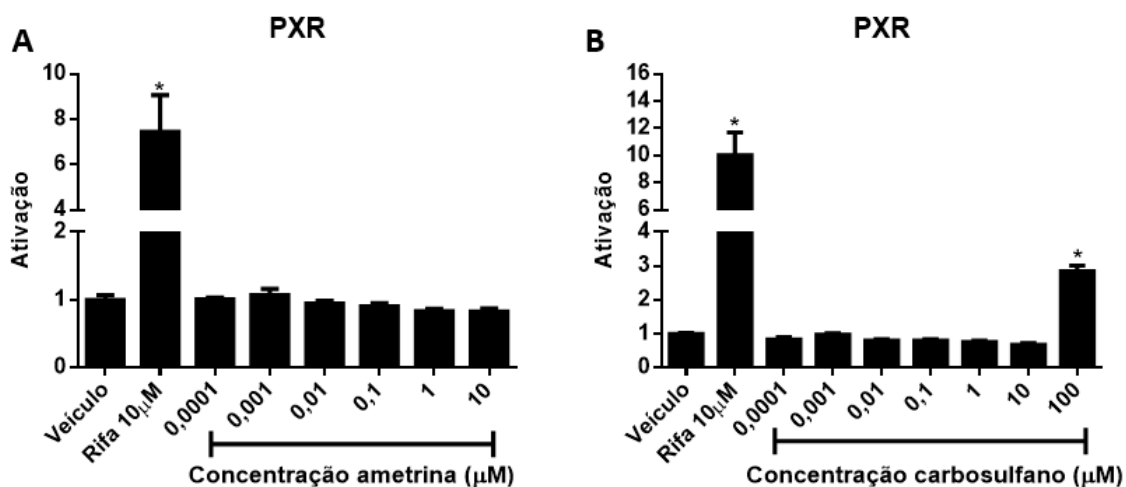


Figura 12. Efeito dos agrotóxicos sobre a atividade transcricional do PXR. Células HeLa foram co-transfectadas com os plasmídeos contendo o cDNA do GAL4-PXR e seu elemento responsivo GAL4-LUC e tratadas com veículo, rifamicina (Rifa) ou concentrações crescentes dos agrotóxicos ametrina (A) ou carbosulfano (B). Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média, da ativação dos ligantes comparada com a do veículo. A figura representa o resultado de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p \leq 0,5$.

5.4 DIFERENCIAÇÃO CELULAR NA PRESENÇA DO ANTAGONISTA T0070907

Resultados ainda não publicados do grupo de pesquisa do qual faço parte, mostraram que a ametrina e o carbosulfano promovem acúmulo lipídico em células 3T3-L1. Então, para avaliar se este acúmulo é mediado por PPAR γ , foi realizado o ensaio de diferenciação celular na presença ou ausência do antagonista específico de PPAR γ T0070907.

Como pode-se observar na Figura 13, ao comparar a coloração com óleo vermelho O nas células tratadas com o T0070907, nota-se que houve redução no acúmulo lipídico em relação às não tratadas, tanto naquelas que foram expostas à rosiglitazona (controle positivo), quanto nas que receberam os agrotóxicos ametrina e carbosulfano.

Esses resultados sugerem que o acúmulo lipídico promovido pela ametrina e pelo carbosulfano é mediado por PPAR γ .

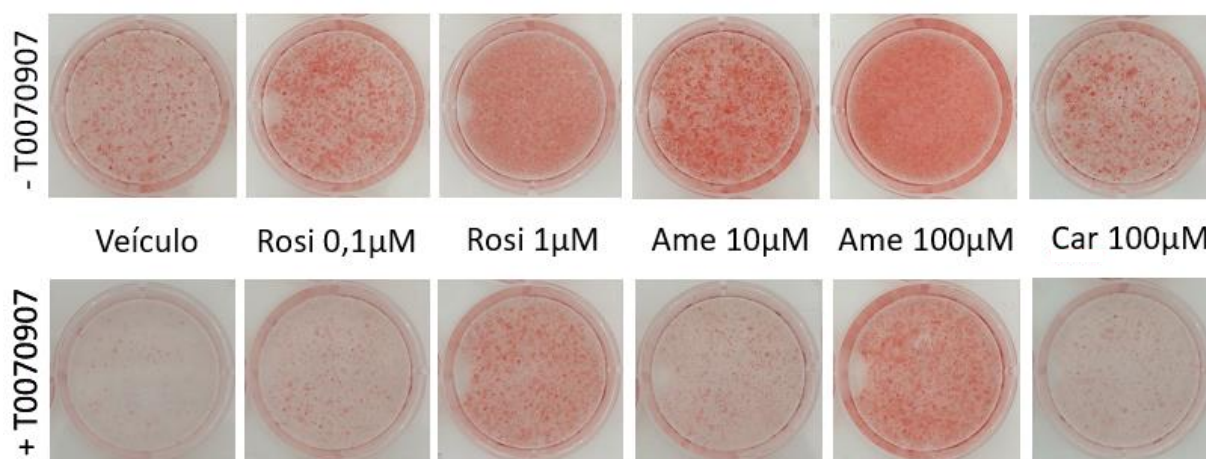


Figura 13. Diferenciação celular na presença do antagonista T0070907. Células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina e dexametasona e tratadas com Veículo (DMSO), rosiglitazona (Rosi 0,1 ou 1µM), ametrina (Ame 10 ou 100µM) ou carbosulfano (Car 100µM) na presença ou ausência de T0070907 1µM durante 15 dias. No 15º dia, foram fixadas, coradas com óleo vermelho O e fotodocumentadas. O experimento foi realizado duas vezes.

5.5 EFEITO DA AMETRINA SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES INFLAMATÓRIOS EM CÉLULAS 3T3-L1

Embora a ametrina não promova ativação do PPAR γ em ensaios de transfecção e gene repórter, este agrotóxico induz acúmulo lipídico notável em células 3T3-L1, podendo até ser comparado ao acúmulo promovido pela rosiglitazona, que é um agonista total muito conhecido de PPAR γ . Além disso, pode-se observar, no ensaio de diferenciação celular na presença do antagonista do PPAR γ T0070907, que este acúmulo diminui na presença deste composto. Diante do exposto, decidiu-se investigar se os efeitos da ametrina sobre genes inflamatórios, seriam semelhantes aos efeitos promovidos pela rosiglitazona.

Para realizar este ensaio, células 3T3-L1 foram diferenciadas em adipócitos maduros pela adição, a cada 3 dias, de meio de cultura contendo veículo, rosiglitazona ou concentrações crescentes de ametrina. No 15º dia, o RNA total foi coletado utilizando o reagente TRIzol, isolado e tratado com DNase I. Posteriormente foi realizada, em uma única etapa, a transcrição reversa (RT)

de 5ng de RNA total seguida pela amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

Na Figura 14, pode-se observar que a ametrina diminuiu a expressão dos genes inflamatórios DCN (Figura 14A), FN1 (Figura 14B) e Vcam1 (Figura 14C) de maneira dose-dependente. Além disso, nos genes DCN e Vcam1, na concentração de 100 μ M, a ametrina apresentou efeito semelhante ao promovido pela rosiglitazona, que é um agonista total de PPAR γ . Contudo, vale ressaltar que foi necessária uma concentração maior de ametrina para promover esse efeito.

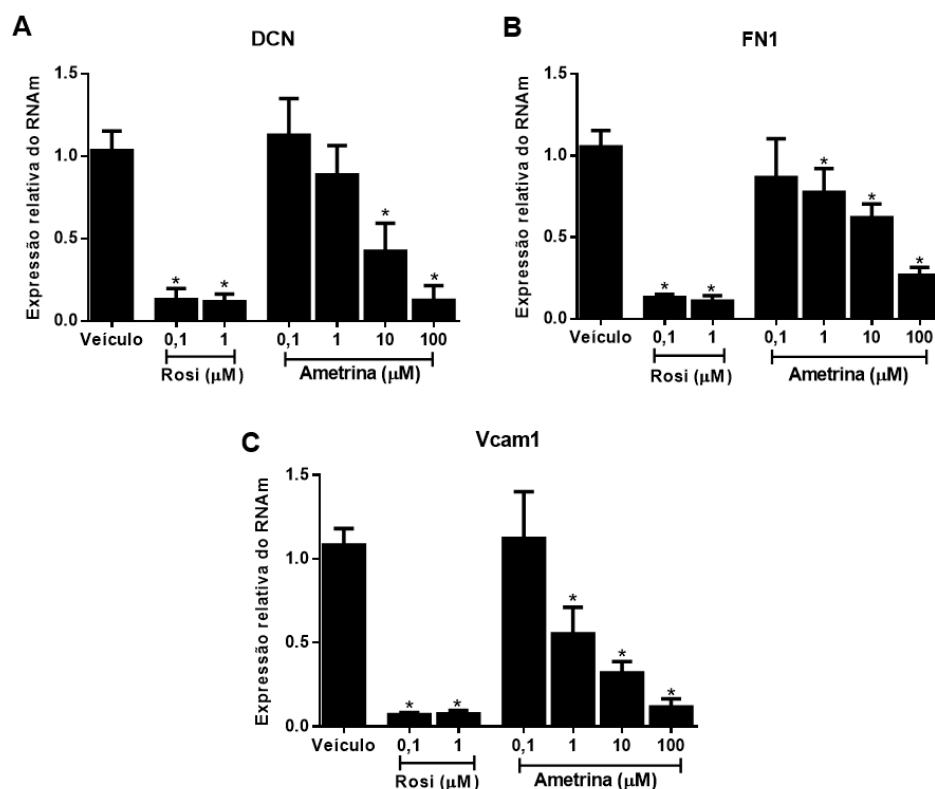


Figura 14. Efeito da ametrina sobre a expressão de genes inflamatórios em células 3T3-L1. Células 3T3-L1 foram induzidas a se diferenciar em adipócitos com insulina e dexametasona e tratadas com veículo (DMSO), rosiglitazona (Rosi) 0,1 ou 1 μ M ou ametrina 0,1 a 100 μ M por 15 dias. Em seguida foram coletadas para avaliação da expressão dos genes Dcn (A), Fn1 (B) e Vcam1 (C) por PCR quantitativa em tempo real. Dados expressos como média $\pm$ erro padrão dos níveis de transcritos das células tratadas com os ligantes em relação ao veículo (DMSO). A figura representa os resultados de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p \leq 0,01$ (comparado ao veículo).

6. DISCUSSÃO

O uso de agrotóxicos na agricultura cresce a cada ano. Atualmente, o Brasil é um dos maiores consumidores desses compostos a nível mundial, ficando atrás apenas da China e dos Estados Unidos (2). Esses dados são extremamente preocupantes visto o quão pouco se sabe sobre os agrotóxicos e como eles podem ser prejudiciais ao meio ambiente e aos animais, incluindo os seres humanos que, muitas vezes, estão em contato direto com essas substâncias.

Estudos ainda não publicados realizados pelo grupo de pesquisa do qual faço parte, mostraram o potencial desregulador endócrino que alguns agrotóxicos, entre eles ametrina e carbosulfano, amplamente utilizados no Brasil e em outros países, apresentam. O carbosulfano promoveu ativação parcial do PPAR γ em suas maiores concentrações testadas (10 e 100 μ M) em ensaios de transfecção e gene repórter, podendo ser considerado agonista parcial deste receptor. Além disso, a ametrina e o carbosulfano promovem acúmulo lipídico em células 3T3-L1.

Considerando esses resultados e o uso crescente dos agrotóxicos em todo o mundo, além dos poucos estudos encontrados na literatura sobre o possível envolvimento desses compostos na etiologia da obesidade, este trabalho buscou compreender de forma mais aprofundada o efeito adipogênico desses dois agrotóxicos, investigando outros possíveis mecanismos de atuação.

Como a ametrina não promoveu ativação do PPAR γ , mas induziu acúmulo lipídico em células 3T3-L1, decidiu-se avaliar se ela seria capaz de aumentar a atividade transcricional do receptor de glicocorticoide que, uma vez ativado, promove o aumento da expressão de proteínas ligantes ao amplificador (CCAAT), C/EBP- β e C/EBP- δ , que são importantes para ativação PPAR γ (135). Contudo, como resultado, a ametrina não promoveu ativação desse receptor. Esse ensaio também foi realizado para avaliar se o carbosulfano seria capaz de ativar GR α , mas, assim como a ametrina, ele não promoveu ativação deste receptor.

Na literatura, estudos mostram que agrotóxicos têm a capacidade de interferir na atividade de transcrição de receptores nucleares. Um estudo realizado por Takeuchi e colaboradores, em 2006, avaliou o efeito de 200

agrotóxicos sobre a atividade transcricional do PPAR α , PPAR γ e RXR α . Dos 200 compostos testados, três promoveram ativação do PPAR α , diclofope-metílico, piretrinas e imazalil. Com relação ao PPAR γ , três agrotóxicos apresentaram uma fraca atividade agonista sobre ele, o diclofeniã, as piretrinas e o triflumizol. Com relação ao RXR α , nenhum dos agrotóxicos promoveu sua ativação (101).

Esse mesmo grupo também avaliou o efeito desses 200 agrotóxicos sobre a atividade transcricional do PXR e do receptor aril-hidrocarboneto (AhR). Como resultados, encontraram que 106 agrotóxicos ativaram o PXR, sendo o piributicarbe, o pretilacloro, o piperofos e o butamifos seus mais potentes ativadores. Do total, 11 agrotóxicos ativaram o AhR, sendo os herbicidas propanil, diuron e linuron, os compostos que apresentaram maior atividade agonista (174,175).

Considerando a possibilidade dos agrotóxicos ametrina e carbosulfano também atuarem sobre outros receptores nucleares, foram realizados ensaios de transfecção e gene repórter com intuito de avaliar seus possíveis efeitos sobre o PPAR α , PPAR β , TR α , TR β e PXR. Como resultado, observou-se a ametrina e o carbosulfano não promoveram ativação dos receptores nucleares PPAR α , PPAR β , TR α e TR β . A ametrina também ativou o PXR. Contudo, o carbosulfano, na concentração de 100 μ M, a maior testada, aumentou sua atividade transcricional em 2,8 vezes, podendo ser considerado agonista parcial desse receptor.

Estudos mostraram que o PXR tem capacidade de afetar a homeostase de lipídeos e a sua ativação também foi associada ao aumento da expressão do PPAR γ (176).

Considerando que o carbosulfano promoveu ativação do PPAR γ , decidiu-se investigar se a cisteína 285 é importante para a regulação da sua atividade transcricional por este agrotóxico. Para tanto, foi utilizado um plasmídeo que expressa a mutação C385S, ou seja, apresenta substituição da cisteína 285 por uma serina. Vale ressaltar que essa cisteína é essencial para a ativação do PPAR γ por ligantes endógenos, como a prostaglandina J2 (160).

Como resultado, observou-se que a presença da mutação aboliu a atividade transcricional promovida pelo carbosulfano, sugerindo que a cisteína 285 é essencial para a ativação do PPAR γ promovida por ele. Esse resultado é interessante, pois sugere que, ao entrar no organismo, o carbosulfano pode

mimetizar ligantes endógenos e induzir a atividade transcricional do PPAR γ . Alguns estudos com outros desreguladores endócrinos como o cloreto de TBT e alguns DBTs também mostraram que a cisteína 285 é essencial para a ativação do PPAR γ promovida pelos mesmos (27,177).

Visto que a ametrina e o carbosulfano promoveram acúmulo lipídico em células 3T3-L1 e que o acúmulo lipídico promovido pela ametrina foi de grande intensidade, podendo até ser comparado ao promovido pela rosiglitazona, decidiu-se avaliar se esse efeito ocorre via PPAR γ , utilizando um antagonista específico do mesmo, o T0070907.

Os resultados mostraram que a presença do T0070907, reduziu consideravelmente o acúmulo lipídico induzido tanto pela ametrina quanto pelo carbosulfano, sugerindo que esse acúmulo é dependente PPAR γ . Entretanto, foi observada uma menor capacidade deste antagonista em inibir a adipogênese induzida tanto pela rosiglitazona, como pela maior concentração utilizada da ametrina.

Esta insuficiência do T0070907 na inibição do efeito adipogênico promovido pela rosiglitazona foi relatada previamente por Kirchner e colaboradores, que o atribuíram à concentração de rosiglitazona utilizada, que foi dez vezes maior que a concentração do T0070907 (178). Contudo, no presente estudo, este efeito foi observado, mesmo quando utilizada a mesma concentração de rosiglitazona e do antagonista, no caso 1 μ M. No que se refere a ametrina e ao carbosulfano, essa comparação não foi possível, pois o efeito adipogênico de ambos só é observado com concentrações maiores que 1 μ M (10 e 100 μ M de ametrina e 100 μ M de carbosulfano). Nesse caso, a insuficiência do antagonista pode ter relação com a concentração, mas, outros fatores também devem ser considerados.

O T0070907 consegue se ligar de forma covalente ao PPAR γ e possui uma afinidade mais alta por este receptor que a rosiglitazona, que é um agonista potente do mesmo (162), portanto, o esperado era que este antagonista bloqueasse completamente o acúmulo lipídico promovido pela rosiglitazona, mas isso pode não ter ocorrido por causa da existência de um sítio alternativo do PPAR γ que não é bloqueado por antagonistas.

Um estudo de Hughes e colaboradores mostrou que o sítio alternativo presente no PPAR γ não é bloqueado pela ligação covalente do antagonista

T0070907 (179), portanto, como a rosiglitazona e o carbosulfano atuam como agonistas deste receptor, possivelmente esses compostos se liguem nesse sítio e, por isso, não houve o bloqueio completo do acúmulo lipídico. Porém, o antagonista também não bloqueou completamente o acúmulo lipídico promovido pela ametrina mas, vale ressaltar que ela não promove ativação do PPAR γ o que torna seu mecanismo de ação com relação ao seu potencial adipogênico ainda desconhecido, sendo necessários mais estudos para avaliar por qual via essa substância atua.

O PPAR γ é o principal regulador da adipogênese e sua ativação também está relacionada a efeitos anti-inflamatórios (180). Embora a ametrina não exerça efeito sobre a atividade transcricional do PPAR γ , RXR α ou GR, que são receptores nucleares relacionados à adipogênese, ela induz acúmulo lipídico, semelhante à rosiglitazona e a outros agonistas de PPAR γ . Dessa forma, considerando a relação entre obesidade e o processo inflamatório e que a ametrina promove intenso acúmulo lipídico em células 3T3-L1, mas ainda não se sabe qual seu mecanismo de ação, resolveu-se avaliar o efeito da ametrina sobre a expressão de genes inflamatórios e comparar a rosiglitazona que é um agonista bem descrito de PPAR γ e que apresenta propriedades anti-inflamatórias.

O modelo de estudo e a técnica escolhidos para essa avaliação foram a diferenciação de células 3T3-L1 e a análise dos transcritos gênicos por transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase em tempo real/quantitativa (RT-qPCR), respectivamente. Os genes inflamatórios estudados foram o Dcn, relacionado à diminuição da proliferação de adipócitos e da expansão do tecido adiposo, que podem ser determinantes no desenvolvimento da resistência à insulina (164); o Vcam1, envolvido na patogênese da obesidade e na integridade da parede vascular (165); e o Fn1, cuja proteína está presente em elevada concentração plasmática em indivíduos obesos (166).

Os resultados mostraram que, nesse modelo celular, a ametrina diminuiu a expressão dos genes Dcn, Vcam1 e Fn1 de maneira dose dependente, sendo que, na concentração de 100 μ M, apresentou efeito semelhante ao promovido pela rosiglitazona. Contudo, vale ressaltar que a concentração da ametrina onde

pode-se observar esse comportamento é 100 vezes maior que a concentração da rosiglitazona.

Na literatura, Milton e colaboradores mostraram que, de forma semelhante ao que ocorreu com a ametrina, alguns DBTs também diminuíram a expressão desses genes inflamatórios (27).

Assim como foi avaliada a expressão dos genes inflamatórios em células 3T3-L1 tratadas com ametrina, também seria interessante avaliar, tanto para células tratadas com ametrina quanto com carbosulfano, a expressão de genes essenciais para que as células adquiram o fenótipo de adipócitos maduros. Dentre eles, podem ser citados genes que codificam proteínas como Glut4 (transportador de glicose 4), relacionada à captação de glicose em resposta a níveis elevados de insulina (181); adiponectina, reguladora chave da sensibilidade à insulina e amplamente secretada por adipócitos (182) e Fabp4 (proteína ligante de ácidos graxos tipo 4), que transporta lipídeos e atua como chaperona de ácidos graxos (183).

Existem estudos que mostram outras vias relacionadas com a adipogênese. Sun e colaboradores conduziram um estudo em que o fipronil, inseticida do grupo dos pirazóis, promoveu acúmulo lipídico em células 3T3-L1 e mostrou que ele reduziu a ativação do AMPK α , um regulador da produção de energia e do metabolismo lipídico nas células, além de promover aumento da expressão de C/EBP α e PPAR γ (184). De forma semelhante, Yuan e colaboradores mostraram que o clorraniliprole, um inseticida do grupo das antranilamidas, também promoveu acúmulo lipídico em células 3T3-L1 através da inibição da ativação do AMPK α (185).

Outra proteína que poderia ser estudada é a proteína alfa de ligação ao amplificador CCAAT (C/EBP α), que também é importante no processo da adipogênese. Smith e colaboradores investigaram o diazinon, inseticida do grupo dos organofosforados, e mostraram que esse composto induziu acúmulo lipídico em células 3T3-L1 e aumentou a expressão de PPAR γ , bem como de C/EBP α (186).

Os resultados obtidos no presente estudo permitem um maior conhecimento sobre alguns dos agrotóxicos amplamente utilizados no Brasil e em outros locais do mundo. Além disso, este estudo poderá servir como auxílio para realização de mais pesquisas relacionadas aos agrotóxicos. Contudo, ainda

são necessários mais estudos, tanto *ex vivo* quanto *in vivo*, para melhor elucidar seus mecanismos de ação e se os efeitos observados nesse trabalho, em cultura de células, se reproduzem em organismos mais complexos como roedores e humanos.

7. CONCLUSÃO

Nesse trabalho, pode-se observar que a cisteína 285 é essencial para a ativação do PPAR γ promovida pelo carbosulfano e que o carbosulfano também atua como agonista parcial de PXR. Com relação ao acúmulo lipídico promovido pelos agrotóxicos ametrina e carbosulfano em células 3T3-L1, os resultados mostraram que esse acúmulo é dependente de PPAR γ . Além disso, apesar de ainda não sabermos ao certo por qual via a ametrina atua promovendo esse acúmulo, observou-se que ela promoveu diminuição de genes inflamatórios, de modo semelhante à rosiglitazona, um agonista conhecido de PPAR γ .

Com base nesses resultados, pode-se concluir que os objetivos propostos foram alcançados e foram obtidos resultados relevantes que poderão contribuir para estudos futuros e até mesmo para a regulamentação de uso desses agrotóxicos.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Chemical safety: Pesticides [Internet]. 2020 [acesso em 29 mar 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/chemical-safety-pesticides>.
2. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Pesticides Use [Internet]. 2019 [acesso em 20 mar 2022]. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>
3. Gollin D, Hansen CW, Wingender AM. Two blades of grass: The impact of the green revolution. *Journal of Political Economy*. 2021;129(8):2344–84.
4. FRANCO CDAR, Pelaez V. A (des) construção da agenda política de controle dos agrotóxicos no Brasil. *Ambiente & Sociedade*. 2016;19:213–30.
5. Brasil. Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989. Lei dos agrotóxicos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. 11 jul 1989
6. Brasil. Projeto de Lei No 6.299, DE 2002. [acesso em 23 mar 2022]. Disponível em: https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra?codteor=1654426
7. European Union Law. COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2019/677. *Official Journal of the European Union*. 2019;62:15–7.
8. European Union Law. COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2015/408. *Official Journal of the European Union*. 2015;58:18–22.
9. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Registros até janeiro 2022 - Resumo [acesso em 20 mar 2022]. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/arquivos/copy_of_RegistrosConcedidos20052020.xlsx/@download/file/copy_of_RegistrosConcedidos20052020.xlsx
10. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. *Boletim 2020* [acesso em 20 mar 2022]. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>
11. Abubakar Y, Tijjani H, Egbuna C, Adetunji CO, Kala S, Kryeziu TL, et al. Pesticides, history, and classification. In: *Natural remedies for pest, disease and weed control*. Elsevier; 2020. p. 29–42.

12. Kim KH, Kabir E, Jahan SA. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the total environment*. 2017;575:525–35.
13. World Health Organization. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. International Program on Chemical Safety. 2002.
14. Gerunova LK, Bardina EG, Gerunov T v, Sechkina I v. Pesticides as endocrine disruptors and neurotoxicants. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing; 2019. p. 052049.
15. Kojima H, Takeuchi S, Nagai T. Endocrine-disrupting potential of pesticides via nuclear receptors and aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Health science*. 2010;56(4):374–86.
16. Grün F, Blumberg B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology*. 2006;147(6):s50–5.
17. World Health Organization. Obesity [acesso em 21 mar 2022]. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1
18. World Health Organization. Obesity and Overweight [acesso em 21 mar 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/obesity-and-overweig>
19. Lobstein T, Brinsden H, Neveux M. *World Obesity Atlas 2022*. World Obesity Federation; 2022.
20. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(5):288–98.
21. Bray GA, Kim KK, Wilding JPH, Federation WO. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. *Obesity reviews*. 2017;18(7):715–23.
22. Albashir AAD. The potential impacts of obesity on COVID-19. *Clinical medicine*. 2020;20(4):e109.
23. Delfosse V, Maire A le, Balaguer P, Bourguet W. A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds. *Acta Pharmacol Sin*. 2015;36(1):88–101.
24. Janani C, Kumari BDR. PPAR gamma gene—a review. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2015;9(1):46–50.
25. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPAR γ . *Cell*. 2005;123(6):993–9.
26. Juge-Aubry C, Pernin A, Favez T, Burger AG, Wahli W, Meier CA, et al. 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.
27. Milton FA, Lacerda MG, Sinoti SBP, Mesquita PG, Prakasan D, Coelho MS, et al. Dibutyltin compounds effects on PPAR γ /RXR α activity, adipogenesis, and inflammation in mammals cells. *Front Pharmacol*. 2017;8:507.
 28. Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Cubacha R, et al. Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Molecular endocrinology*. 2006;20(9):2141–55.
 29. World Health Organization. DDT and its derivatives. Geneva. 1979;9.
 30. Carson R. Silent spring. Houghton Mifflin Harcourt; 2002.
 31. Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int J Environ Res Public Health*. 2011;8(6):2265–303.
 32. Beketov MA, Kefford BJ, Schäfer RB, Liess M. Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(27):11039–43.
 33. Mineau P, Whiteside M. Pesticide acute toxicity is a better correlate of US grassland bird declines than agricultural intensification. *PLoS One*. 2013;8(2):e57457.
 34. Guillette LJ, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect*. 1994;102(8):680–8.
 35. Crain, D. Andrew, et al. Sex-steroid and thyroid hormone concentrations in juvenile alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated and reference lakes in Florida, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 1998;17.3:446-452
 36. Guillette LJ, Woodward AR, Crain DA, Pickford DB, Rooney AA, Percival HF. Plasma Steroid Concentrations and Male Phallus Size in Juvenile Alligators from Seven Florida Lakes. *Gen Comp Endocrinol*. 1999 Dec 1;116(3):356–72.
 37. Pickford D, et al. Phallus size and plasma dihydrotestosterone concentrations in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated and reference populations. *J Herpetol*. 2000;34:233–9.
 38. Motta EVS, Raymann K, Moran NA. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(41):10305–10.

39. McCauley LA, Anger WK, Keifer M, Langley R, Robson MG, Rohlman D. Studying health outcomes in farmworker populations exposed to pesticides. *Environ Health Perspect.* 2006;114(6):953–60.
40. Sharma A, Shukla A, Attri K, Kumar M, Kumar P, Suttee A, et al. Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020;201:110812.
41. Thundiyil JG, Stober J, Besbelli N, Pronczuk J. Acute pesticide poisoning: a proposed classification tool. *Bull World Health Organ.* 2008;86:205–9.
42. Alavanja MCR, Hoppin JA, Kamel F. Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annu Rev Public Health.* 2004;25:155–97.
43. Calvert GM, Karnik J, Mehler L, Beckman J, Morrissey B, Sievert J, et al. Acute pesticide poisoning among agricultural workers in the United States, 1998–2005. *Am J Ind Med.* 2008;51(12):883–98.
44. Dawson AH, Eddleston M, Senarathna L, Mohamed F, Gawarammana I, Bowe SJ, et al. Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: a prospective cohort study. *PLoS Med.* 2010;7(10):e1000357.
45. Hoppin JA, Valcin M, Henneberger PK, Kullman GJ, Umbach DM, London SJ, et al. Pesticide use and chronic bronchitis among farmers in the Agricultural Health Study. *Am J Ind Med.* 2007;50(12):969–79.
46. Parrón T, Requena M, Hernández AF, Alarcón R. Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems. *Toxicol Lett.* 2014;230(2):157–65.
47. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 296, DE 29 DE JULHO DE 2019. 2019.
48. GLOBALLY HARMONIZED SYSTEM OF CLASSIFICATION AND LABELLING OF CHEMICALS (GHS) Fifth revised edition UNITED NATIONS New York and Geneva, 2013 Copyright@United Nations 2013. All rights reserved.
49. Ministério do Meio Ambiente. Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) de Agrotóxicos e Afins. 2018 [acesso em 11 abril 2022]. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/bpl/182-quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/1156-ppa#sistemadeclassificacao>
50. (EFSA) EFSA. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance cyclaniliprole. *EFSA Journal.* 2016;14(4):4452.
51. Jean-Claude JUNCKER. Commission Implementing Regulation (EU) 2017/357 of 28 February 2017 concerning the non-approval of the active substance cyclaniliprole, in accordance with Regulation (EC) No

- 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. Official Journal of the European Union. 2017;60:4–5.
52. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 13263, Ametryn. 2022 [acesso em 11 abril 2022]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ametryn>
 53. Secretaria de Defesa Agropecuária. ATO Nº 34, DE 16 DE MAIO DE 2019. Diário Oficial da União. 2019;96:12.
 54. European Commission. EU Pesticides Database Active Substance Ametryn. 2009 [acesso em 11 abril 2022]. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/activesubstances/?event=as.details&as_id=329
 55. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. A11 – Ametrina. 2021.
 56. Roman ES. Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação. Berthier; 2007.
 57. United States Environmental Protection Agency. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Ametryn. 2005 [acesso em 11 abril 2022]. Disponível em: https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/ametryn_red.pdf
 58. De Queiroz VT, Azevedo MM, da Silva Quadros IP, Costa AV, do Amaral AA, Juvanol RS, et al. Environmental risk assessment for sustainable pesticide use in coffee production. J Contam Hydrol. 2018;219:18–27.
 59. Santos T, Cancian G, Neodini DNR, Mano DRS, Capucho C, Predes FS, et al. Toxicological evaluation of ametryn effects in Wistar rats. Experimental and Toxicologic Pathology. 2015;67(10):525–32.
 60. Lin H, Hsu L, Chien C, Chen S. Proteomic analysis of ametryn toxicity in zebrafish embryos. Environ Toxicol. 2018;33(5):579–86.
 61. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 41384, Carbosulfan. 2022 [acesso em 11 abril 2022]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Carbosulfan>
 62. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. C26 – Carbosulfano. 2020.
 63. European Commission. Review report for the active substance carbosulfan finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 24 November 2006 in support of a decision concerning the non-inclusion of carbosulfan in Annex I of Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance [Internet]. 2007 [acesso em 11 abril 2022]. Disponível em:

<https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/active-substances/?event=as.download&selectedID=1043>

64. Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect.* 1990;87:245–54.
65. Kwong TC. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther Drug Monit.* 2002;24(1):144–9.
66. Giri S, Giri A, Sharma GD, Prasad SB. Mutagenic effects of carbosulfan, a carbamate pesticide. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.* 2002;519(1–2):75–82.
67. Banji D, Banji OJF, Ragini M, Annamalai AR. Carbosulfan exposure during embryonic period can cause developmental disability in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014;38(1):230–8.
68. Dhouib IEB, Lasram MM, Annabi A, Gharbi N, El-Fazaa S. A comparative study on toxicity induced by carbosulfan and malathion in Wistar rat liver and spleen. *Pestic Biochem Physiol.* 2015;124:21–8.
69. Diamanti-Kandarakis, E., et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews.* 2009;30(4):293-342.
70. Monneret C. What is an endocrine disruptor? *C R Biol.* 2017 Sep 1;340(9–10):403–5.
71. Beszterda, M., & Frański, R. Endocrine disruptor compounds in environment: As a danger for children health. *Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism.* 2018;24(2), 88-95.
72. Ercan O, Tarcin G. Overview on Endocrine disruptors in food and their effects on infant's health. *Global Pediatrics.* 2022 Dec 1;2:100019.
73. Yilm Yilmaz, B., Terekeci, H., Sandal, S., & Kelestimur, F. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Reviews in endocrine and metabolic disorders.* 2020;21(1), 127-147.
74. Smith, O. W., & Gabbe, S. G. (1999). Diethylstilbestrol in the prevention and treatment of complications of pregnancy. 1948. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 1999;181(6), 1570-1571.
75. Herbst, Arthur L., Howard Ulfelder, and David G. Poskanzer. Adenocarcinoma of the vagina. *Problems of Birth Defects.* Springer, Dordrecht. 1971;217-220.
76. Palmer, Julie R., et al. Urogenital abnormalities in men exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. *Environmental Health.* 2009;8(1):1-6.

77. Maffini M v., Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Endocrine disruptors and reproductive health: The case of bisphenol-A. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Jul 25;254–255:179–86.
78. Swan, Shanna H., et al. Semen quality in relation to biomarkers of pesticide exposure. *Environmental health perspectives*. 2003;111(12):1478-1484.
79. Cirillo, Piera M., et al. Grandmaternal perinatal serum ddt in relation to granddaughter early menarche and adult obesity: three generations in the 74 child health and development studies cohort. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2021;30(8):1480-1488.
80. Li X, Ycaza J, Blumberg B. The environmental obesogen tributyltin chloride acts via peroxisome proliferator activated receptor gamma to induce adipogenesis in murine 3T3-L1 preadipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011 Oct 1;127(1–2):9–15.
81. Laudet V, Gronemeyer H. *The nuclear receptor factsbook*. Gulf Professional Publishing; 2002.
82. Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *TRENDS in Genetics*. 2001;17(10):554–6.
83. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1269–304.
84. Xu EH, Lambert MH. Structural insights into regulation of nuclear receptors by ligands. *Nucl Recept Signal*. 2003;1(1):nrs-01004.
85. McEwan, Iain J. Nuclear receptors: one big family. *The Nuclear Receptor Superfamily*. 2009:3-18
86. Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, et al. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol*. 1996;3(1):87–94.
87. Benoit G, Malewicz M, Perlmann T. Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies. *Trends Cell Biol*. 2004;14(7):369–76.
88. Burris TP, Solt LA, Wang Y, Crumbley C, Banerjee S, Griffett K, et al. Nuclear receptors and their selective pharmacologic modulators. *Pharmacol Rev*. 2013;65(2):710–78.
89. Sonoda J, Pei L, Evans RM. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett*. 2008;582(1):2–9.

90. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* (1979). 2001;294(5548):1866–70.
91. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002;53(1):409–35.
92. Castrillo A, Tontonoz P. Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:455–80.
93. Escher P, Braissant O, Basu-Modak S, Michalik L, Wahli W, Desvergne B. Rat PPARs: quantitative analysis in adult rat tissues and regulation in fasting and refeeding. *Endocrinology*. 2001;142(10):4195–202.
94. Li AC, Palinski W. Peroxisome proliferator-activated receptors: how their effects on macrophages can lead to the development of a new drug therapy against atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:1–39.
95. Hashimoto T, Cook WS, Qi C, Yeldandi A v, Reddy JK, Rao MS. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor α -inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(37):28918–28.
96. Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther*. 2006;110(3):371–85.
97. Staels B, Rubenstrunk A, Noel B, Rigou G, Delataille P, Millatt LJ, et al. Hepatoprotective effects of the dual peroxisome proliferator-activated receptor α /delta agonist, GFT505, in rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2013;58(6):1941–52.
98. Francque S, Verrijken A, Caron S, Prawitt J, Paumelle R, Derudas B, et al. PPAR α gene expression correlates with severity and histological treatment response in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2015;63(1):164–73.
99. Shah A, Rader DJ, Millar JS. The effect of PPAR- α agonism on apolipoprotein metabolism in humans. *Atherosclerosis*. 2010;210(1):35–40.
100. Lapinskas PJ, Brown S, Leesnitzer LM, Blanchard S, Swanson C, Cattley RC, et al. Role of PPAR α in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology*. 2005;207(1):149–63.
101. 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. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;217(3):235–44.
102. Gross B, Staels B. PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type-2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007;21(4):687–710.
 103. Hoekstra M, Kruijt JK, van Eck M, van Berkel TJC. Specific gene expression of ATP-binding cassette transporters and nuclear hormone receptors in rat liver parenchymal, endothelial, and Kupffer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(28):25448–53.
 104. Hellemans K, Rombouts K, Quartier E, Dittié AS, Knorr A, Michalik L, et al. PPAR β regulates vitamin A metabolism-related gene expression in hepatic stellate cells undergoing activation. *J Lipid Res*. 2003;44(2):280–95.
 105. Hellemans K, Michalik L, Dittie A, Knorr A, Rombouts K, de Jong J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- β signaling contributes to enhanced proliferation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 2003;124(1):184–201.
 106. Oliver WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2001;98(9):5306–11.
 107. Fürnsinn C, Willson TM, Brunmair B. Peroxisome proliferator-activated receptor- δ , a regulator of oxidative capacity, fuel switching and cholesterol transport. *Diabetologia*. 2007;50(1):8–17.
 108. Bays HE, Schwartz S, Littlejohn III T, Kerzner B, Krauss RM, Karpf DB, et al. MBX-8025, a novel peroxisome proliferator receptor- δ agonist: lipid and other metabolic effects in dyslipidemic overweight patients treated with and without atorvastatin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(9):2889–97.
 109. Beaven SW, Tontonoz P. Nuclear receptors in lipid metabolism: targeting the heart of dyslipidemia. *Annu Rev Med*. 2006;57:313–29.
 110. Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, et al. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet*. 2007;3(4):e64.
 111. Kintscher U, Law RE. PPAR γ -mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle. *American journal of physiology-endocrinology and metabolism*. 2005;288(2):E287–91.

112. Tyagi S, Gupta P, Saini AS, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res.* 2011;2(4):236.
113. Zieleniak A, Wójcik M, Woźniak LA. Structure and physiological functions of the human peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2008;56(5):331–45.
114. 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.
115. Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones. *New England Journal of Medicine.* 2004;351(11):1106–18.
116. Ziyadeh N, McAfee AT, Koro C, Landon J, Chan KA. The thiazolidinediones rosiglitazone and pioglitazone and the risk of coronary heart disease: a retrospective cohort study using a US health insurance database. *Clin Ther.* 2009;31(11):2665–77.
117. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *New England Journal of Medicine.* 2007;356(24):2457–71.
118. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Actos® (pioglitazona): informações sobre a segurança do medicamento. 2010 [acesso em 21 abril 2022]. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p_p_id=101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&_101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2_groupId=33868&_101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2_urlTitle=actos-pioglitazona-informacoes-sobre-a-seguranca-do-medicamento-&_101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2_assetEntryId=2923683&_101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2_type=conteudo
119. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 1998;391(6662):82–6.
120. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 1998;391(6662):79–82.
121. Riu A, Grimaldi M, le Maire A, Bey G, Phillips K, Boulahtouf A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ is a target for halogenated analogs of bisphenol A. *Environ Health Perspect.* 2011;119(9):1227–32.
122. Smith A, Yu X, Yin L. Diazinon exposure activated transcriptional factors CCAAT-enhancer-binding proteins α (C/EBP α) and peroxisome

- proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and induced adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Pestic Biochem Physiol.* 2018;150:48–58.
123. Li X, Pham HT, Janesick AS, Blumberg B. Triflumizole is an obesogen in mice that acts through peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ). *Environ Health Perspect.* 2012;120(12):1720–6.
 124. Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(9):518–30.
 125. Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev.* 1996;17(3):245–61.
 126. Reichardt HM, Tuckermann JP, Göttlicher M, Vujic M, Weih F, Angel P, et al. Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 2001;20(24):7168–73.
 127. Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1994;91(2):752–6.
 128. Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax.* 2000;55(7):603–13.
 129. Lightman SL, Conway-Campbell BL. The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nat Rev Neurosci.* 2010;11(10):710–8.
 130. Clark AR, Belvisi MG. Maps and legends: the quest for dissociated ligands of the glucocorticoid receptor. *Pharmacol Ther.* 2012;134(1):54–67.
 131. Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, et al. The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmun Rev.* 2011;10(6):305–10.
 132. Goldminz AM, Au SC, Kim N, Gottlieb AB, Lizzul PF. NF- κ B: an essential transcription factor in psoriasis. *J Dermatol Sci.* 2013;69(2):89–94.
 133. Heim C, Ehler U, Hellhammer DH. The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology.* 2000;25(1):1–35.
 134. Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, Pariante CM. The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology.* 2011;36(3):415–25.

135. Queiroz JCF de, Alonso-Vale MIC, Curi R, Lima FB. Control of adipogenesis by fatty acids. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2009;53:582–94.
136. 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.
137. Gershengorn MC, Neumann S. Update in TSH receptor agonists and antagonists. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(12):4287–92.
138. Rapoport B, McLachlan SM. The thyrotropin receptor in Graves' disease. *Thyroid*. 2007;17(10):911–22.
139. Refetoff S. Resistance to thyrotropin. *J Endocrinol Invest*. 2003;26(8):770–9.
140. Haymart MR, Repplinger DJ, Levenson GE, Elson DF, Sippel RS, Jaume JC, et al. Higher serum thyroid stimulating hormone level in thyroid nodule patients is associated with greater risks of differentiated thyroid cancer and advanced tumor stage. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(3):809–14.
141. Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev*. 1993;14(2):184–93.
142. Horlein AJ, Heinzel T, Rosenfeld MG. Gene regulation by thyroid hormone receptors. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 1996;3(5):412–6.
143. Ortiga-Carvalho TM, Sidhaye AR, Wondisford FE. Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(10):582–91.
144. Trost SU, Swanson E, Gloss B, Wang-Iverson DB, Zhang H, Volodarsky T, et al. The thyroid hormone receptor- β -selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology*. 2000;141(9):3057–64.
145. Grover GJ, Mellström K, Ye L, Malm J, Li YL, Bladh LG, et al. Selective thyroid hormone receptor- β activation: a strategy for reduction of weight, cholesterol, and lipoprotein (a) with reduced cardiovascular liability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(17):10067–72.
146. Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, et al. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(11):5185–90.
147. Fritsche E, Cline JE, Nguyen NH, Scanlan TS, Abel J. Polychlorinated biphenyls disturb differentiation of normal human neural progenitor cells:

- clue for involvement of thyroid hormone receptors. *Environ Health Perspect.* 2005;113(7):871–6.
148. Luo D, Pu Y, Tian H, Wu W, Sun X, Zhou T, et al. Association of in utero exposure to organochlorine pesticides with thyroid hormone levels in cord blood of newborns. *Environmental Pollution.* 2017;231:78–86.
 149. Orans J, Teotico DG, Redinbo MR. The nuclear xenobiotic receptor pregnane X receptor: recent insights and new challenges. *Molecular endocrinology.* 2005;19(12):2891–900.
 150. Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol.* 2003;65(1):261–311.
 151. Chen T. Overcoming drug resistance by regulating nuclear receptors. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(13):1257–64.
 152. Toporova L, Balaguer P. Nuclear receptors are important targets of environmental disrupting compounds. *Mol Cell Endocrinol.* 2019;15:110665.
 153. Hakkola J, Rysä J, Hukkanen J. Regulation of hepatic energy metabolism by the nuclear receptor PXR. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms.* 2016;1859(9):1072–82.
 154. Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, et al. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2001;98(6):3369–74.
 155. Chang TKH, Waxman DJ. Synthetic drugs and natural products as modulators of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR). *Drug Metab Rev.* 2006;38(1–2):51–73.
 156. Kojima H, Takeuchi S, Sanoh S, Okuda K, Kitamura S, Uramaru N, et al. Profiling of bisphenol A and eight of its analogues on transcriptional activity via human nuclear receptors. *Toxicology.* 2019;413:48–55.
 157. Coumoul X, Diry M, Barouki R. PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(10):1513–9.
 158. HeLa | APABCAM [Internet]. [acesso em 30 agosto 2022]. Disponível em: <https://bcrj.org.br/celula/0100>
 159. 3T3-L1 | APABCAM [Internet]. [acesso em 30 agosto 2022]. Disponível em: <https://bcrj.org.br/celula/0019>
 160. 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. *J Mol Biol.* 2009;385(1):188–99.

161. Leesnitzer, L. M., Parks, D. J., Bledsoe, R. K., Cobb, J. E., Collins, J. L., Consler, T. G., ... & Blanchard, S. G. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry*. 2002;41(21), 6640-6650.
162. Lee G, Elwood F, McNally J, Weiszmann J, Lindstrom M, Amaral K, et al. 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.
163. Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol*. 1963;17(2):299–313.
164. Ward M, Ajuwon KM. Regulation of pre-adipocyte proliferation and apoptosis by the small leucine-rich proteoglycans, biglycan and decorin. *Cell Prolif*. 2011;44(4):343–51.
165. Vieira RAL, de Freitas RN, Volp ACP. Adhesion molecules and chemokines: relation to anthropometric, body composition, biochemical and dietary variables. *Nutr Hosp*. 2014;30(2):223–36.
166. ANDERSEN T, DEJGAARD A, ASTRUP A, GLUUD C. Increased plasma fibronectin concentrations in obesity: normalization during weight loss. *Acta Med Scand*. 1987;222(3):275–9.
167. Dawson AH, Eddleston M, Senarathna L, Mohamed F, Gawarammana I, Bowe SJ, et al. Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: a prospective cohort study. *PLoS Med*. 2010;7(10):e1000357.
168. Koutros S, Silverman DT, Alavanja MCR, Andreotti G, Lerro CC, Heltshe S, et al. Occupational exposure to pesticides and bladder cancer risk. *Int J Epidemiol*. 2016;45(3):792–805.
169. Band PR, Abanto Z, Bert J, Lang B, Fang R, Gallagher RP, et al. Prostate cancer risk and exposure to pesticides in British Columbia farmers. *Prostate*. 2011;71(2):168–83.
170. Hou L, Lee WJ, Rusiecki J, Hoppin JA, Blair A, Bonner MR, et al. Pendimethalin exposure and cancer incidence among pesticide applicators. *Epidemiology*. 2006;17(3):302.
171. Dennis LK, Lynch CF, Sandler DP, Alavanja MCR. Pesticide use and cutaneous melanoma in pesticide applicators in the agricultural health study. *Environ Health Perspect*. 2010;118(6):812–7.
172. Mahajan R, Blair A, Lynch CF, Schroeder P, Hoppin JA, Sandler DP, et al. Fonofos exposure and cancer incidence in the agricultural health study. *Environ Health Perspect*. 2006;114(12):1838–42.

173. Fareed M, Pathak MK, Bihari V, Kamal R, Srivastava AK, Kesavachandran CN. Adverse respiratory health and hematological alterations among agricultural workers occupationally exposed to organophosphate pesticides: a cross-sectional study in North India. *PLoS One*. 2013;8(7):e69755.
174. 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.
175. Takeuchi S, Iida M, Yabushita H, Matsuda T, Kojima H. In vitro screening for aryl hydrocarbon receptor agonistic activity in 200 pesticides using a highly sensitive reporter cell line, DR-EcoScreen cells, and in vivo mouse liver cytochrome P450-1A induction by propanil, diuron and linuron. *Chemosphere*. 2008;74(1):155–65.
176. Zhou J, Zhai Y, Mu Y, Gong H, Uppal H, Toma D, et al. A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(21):15013–20.
177. Harada S, Hiromori Y, Nakamura S, Kawahara K, Fukakusa S, Maruno T, et al. Structural basis for PPAR γ transactivation by endocrine-disrupting organotin compounds. *Sci Rep*. 2015;5(1):1–7.
178. Kirchner S, Kieu T, Chow C, Casey S, Blumberg B. Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. *Molecular endocrinology*. 2010;24(3):526–39.
179. Hughes TS, Giri PK, de Vera IMS, Marciano DP, Kuruvilla DS, Shin Y, et al. An alternate binding site for PPAR γ ligands. *Nature Communications*. 2014;5(1):1–13.
180. Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2007;1771(8):926–35.
181. Wu Z, Xie Y, Morrison RF, Bucher NL, Farmer SR. PPAR γ induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBP α during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J Clin Invest*. 1998;101(1):22–32.
182. Sharma M, McClung JA, Abraham NG. Adiponectin: A mediator of obesity, insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. In: *Translational Research in Coronary Artery Disease*. Elsevier; 2016. p. 33–42.
183. Garin-Shkolnik T, Rudich A, Hotamisligil GS, Rubinstein M. FABP4 attenuates PPAR γ and adipogenesis and is inversely correlated with PPAR γ in adipose tissues. *Diabetes*. 2014;63(3):900–11.

184. Sun Q, Qi W, Yang JJ, Yoon KS, Clark JM, Park Y. Fipronil promotes adipogenesis via AMPK α -mediated pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Food and chemical toxicology*. 2016;92:217–23.
185. Yuan L, Lin J, Peng Y, Gao R, Sun Q. Chlorantraniliprole induces adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes via the AMPK α pathway but not the ER stress pathway. *Food Chem*. 2020;311:125953.
186. Smith A, Yu X, Yin L. Diazinon exposure activated transcriptional factors CCAAT-enhancer-binding proteins α (C/EBP α) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and induced adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Pestic Biochem Physiol*. 2018;150:48–58.

APÊNDICE A – LISTA DE PRIMERS

Gene	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (3'5')
Gapdh	AAA GGG CTC ATG ACC ACA GTC	CAG GGA TGA TGT TCT GGG CA
DCN	TCA CAG AAG CGG TAA CGA GC	TCA TGT ATT TTC ACG ACC TTC TGA
FN1	CTG CGC TCC ATT CCA CCT TA	GGT CGT ACA CCC AGC TTG AA
Vcam1	ATG TCA ACG TTG CCC CCA A	GCT GTC TGC TCC ACA GGA TT