

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

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA NEUROTOXICIDADE DE INSETICIDAS
NEONICOTINÓIDES**

KAROL FERREIRA HONATEL

Porto Alegre, 2022

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

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA NEUROTOXICIDADE DE INSETICIDAS
NEONICOTINÓIDES**

Dissertação apresentada por Karol Ferreira
Honatel para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo

Porto Alegre, 2022

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30/09/2022, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Aline Zimmer

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Mariana Appel Hort

Universidade Federal do Rio Grande (FURG)

Prof. Dr. Raphael Caio Tamborelli Garcia

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

CIP - Catalogação na Publicação

Honatel, Karol Ferreira
AVALIAÇÃO IN VITRO DA NEUROTOXICIDADE DE
INSETICIDAS NEONICOTINÓIDES / Karol Ferreira Honatel.
-- 2022.
133 f.
Orientador: Marcelo Dutra Arbo.

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

1. Agrotóxicos. 2. Neurotoxicidade. 3.
Neonicotinóides. 4. SH-SY5Y. I. Arbo, Marcelo Dutra,
orient. II. Título.

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

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo, no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com financiamento da CAPES/Proex e Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS – edital 05/2019). Karol Ferreira Honatel recebeu bolsa de mestrado do CNPq.

“Every question is a cry to understand the world.

There is no such thing as a dumb question.”

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por ter permitido que eu chegasse até aqui.

Agradeço ao Luis Fernando, que foi meu motivador quando eu mais precisei.

Agradeço à minha família, que sempre apoiou meus estudos.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo pela orientação durante esta etapa.

Aos integrantes do LATOX. Obrigada pelas risadas e pelos ensinamentos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e Faculdade de Farmácia por fornecerem a estrutura para realização deste trabalho.

Por fim, agradeço ao CNPq pelo fomento através da concessão da bolsa.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada na forma de encarte de publicação a ser submetida e dividida em seções da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Artigo científico submetido presente no Capítulo I, Artigo científico a ser submetido presente no Capítulo II, Discussão, Conclusão, Referências Bibliográficas e Anexos.

A Introdução apresenta o embasamento teórico que nos levou ao desenvolvimento desta proposta de trabalho. Os Materiais e Métodos, Resultados e as Referências específicas encontram-se nos corpos dos manuscritos, denominados Capítulo I e II.

A seção Discussão contém uma interpretação geral dos resultados obtidos.

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

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

A seção “Anexos” contém o comprovante de submissão do artigo.

RESUMO

Agrotóxicos são amplamente utilizados em atividades agropecuárias e em ambientes urbanos, levando ao aumento da exposição humana. Como o sistema nervoso é o alvo da maioria dos inseticidas, investigamos os efeitos da exposição a agrotóxicos nas habilidades de memória e aprendizagem. Foram revisados os artigos publicados na base de dados PubMed entre 2015 e 2021. N= 105 artigos foram incluídos (N= 91 estudos pré-clínicos e N= 14 estudos humanos). De forma geral, foram encontradas evidências de que a exposição a agrotóxicos pode estar associada ao comprometimento cognitivo. O imidacloprido e o tiametoxam são inseticidas neonicotinóides de primeira e segunda geração empregados em todo o mundo para proteção de cultivos. O modo de ação dos neonicotinóides ocorre através do agonismo dos receptores nicotínicos de acetilcolina pós-sinápticos (nAChRs). A exposição humana é elevada devido ao uso generalizado dos neonicotinóides e seu acúmulo sistêmico nos alimentos. Portanto, o último objetivo deste trabalho foi estudar a neurotoxicidade *in vitro* de formulações comerciais de imidacloprido (Much 600 FS® e Evidence 700 WG®) e tiametoxam (Actara 250 WG®) utilizando células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas. A citotoxicidade foi avaliada após 96 h de incubação através dos ensaios de redução do MTT e incorporação do VN. A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), o potencial de membrana mitocondrial, a expressão da proteína pró-apoptótica Bax e o modo de morte celular também foram avaliados. Em relação à citotoxicidade, os valores de EC50 encontrados foram 266,4, 653,2, 4175 mg/L para Much®, Actara® e Evidence®, respectivamente. Todos os inseticidas elevaram a produção de ERO e ERN, enquanto nenhuma alteração no potencial de membrana mitocondrial ou na expressão de Bax foi observada após 96 h de incubação. A investigação do modo de morte celular revelou um aumento de células apoptóticas precoces. Entre os produtos testados, Much® foi o mais citotóxico. No geral, os neonicotinóides mostraram-se potencialmente neurotóxicos, apoiando as preocupações sobre os riscos associados à exposição humana a esses inseticidas

Palavras-chave: Agrotóxicos; Neurotoxicidade; Citotoxicidade; Imidacloprido; Tiametoxam.

ABSTRACT

Pesticides are widely used in agricultural activities and in urban environments, leading to increased human exposure. As the nervous system is the target of most insecticides, we investigated the effects of exposure to pesticides on memory and learning abilities. Articles published in the PubMed database between 2015 and 2021 were reviewed. N= 105 articles were included (N= 91 preclinical and N= 14 human studies). In general, evidence was found that exposure to pesticides may be associated with cognitive impairment. Imidacloprid and thiamethoxam are first- and second-generation neonicotinoid insecticides employed worldwide for crop protection. Neonicotinoids mode of action occurs through the agonism of postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Human exposure is high due to the widespread use of neonicotinoids and their systemic accumulation in foods. Therefore, the last objective of this work was to study the *in vitro* neurotoxicity of commercial formulations of imidacloprid (Much 600 FS® and Evidence 700 WG®), and thiamethoxam (Actara 250 WG®) using the differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. Cytotoxicity was evaluated after 96 h incubation through the MTT reduction and NR uptake assays. Production of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species, mitochondrial membrane potential, the expression of the pro-apoptotic Bax protein and cell death mode were also evaluated. Regarding cytotoxicity, the EC50 values found were 266.4, 653.2, 4175 mg/L for Much®, Actara® and Evidence®, respectively. All insecticides increased ROS and RNS generation, while no change in mitochondrial membrane potential or Bax expression was observed after 96 h of incubation period. The investigation of the cell death mode revealed an increase in early apoptotic cells. Among the products tested, Much® was the most cytotoxic. Overall, neonicotinoids were shown to be potentially neurotoxic, supporting concerns about the risks associated with human exposure to these insecticides

Keyword: Pesticides; Neurotoxicity; Cytotoxicity; Imidacloprid; Thiamethoxam.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AR	Ácido retinóico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
IBAMA Renováveis	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
I.a.	Ingrediente ativo
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
VN	Vermelho neutro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS	25
Objetivo Geral	27
Objetivos específicos	27
CAPÍTULO I: ARTIGO	29
The impact of pesticide exposure on memory and learning: a review	
CAPÍTULO II: ARTIGO	91
Neurotoxicity evaluation of neonicotinoid insecticide formulations in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells	
DISCUSSÃO	117
CONCLUSÃO	123
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
ANEXOS	131
Carta de Confirmação da Submissão do Artigo	133

INTRODUÇÃO

Agrotóxicos são amplamente utilizados na agricultura para prevenir ou reduzir as perdas por pragas, melhorando assim o rendimento e a qualidade do produto (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011). Entretanto, o uso de grandes quantidades desses produtos químicos elevou as preocupações com a saúde humana e com o meio ambiente (RAKSANAM et al., 2012). Os agrotóxicos são desenvolvidos com o objetivo de atuar seletivamente nos organismos alvos, porém, quando são pouco seletivos, tornam-se tóxicos para espécies não alvo, incluindo humanos (STARKS et al., 2012).

Existem várias classes de agrotóxicos com diferentes mecanismos de ação, estando entre os mais representativos: (a) os organofosforados, que atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE), levando ao acúmulo de acetilcolina (ACh) nas sinapses; (b) os piretróides, que modificam a cinética de ativação e inativação dos canais de sódio sensíveis à voltagem, levando à hiperexcitabilidade; e (c) os neonicotinóides, que são agonistas do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) (ALOIZOU et al., 2020). Há uma preocupação crescente com o uso generalizado de agrotóxicos e seus potenciais impactos na saúde pública, principalmente em relação à exposição prolongada a substâncias neurotóxicas em concentrações inferiores às capazes de causar efeitos agudos. A exposição crônica ambiental e ocupacional a agrotóxicos tem sido associada ao comprometimento cognitivo (FRIEDMAN et al., 2020; RAMÍREZ-SANTANA et al., 2020a, 2020b). Uma vez que o sistema nervoso e algumas funções específicas do sistema nervoso podem ser alvo desses agrotóxicos (COLOSIO; TIRAMANI; MARONI, 2003), tivemos entre outros objetivos neste trabalho, realizar uma revisão da literatura sobre os efeitos da exposição a agrotóxicos sobre as funções cognitivas de aprendizagem e memória.

Os neonicotinóides constituem uma classe relativamente nova de inseticidas, estão entre os mais utilizados no mercado global e são eficazes para uma variedade de usos agrícolas e urbanos (JESCHKE et al., 2011). Esses agentes químicos ganharam preferência sobre as demais classes, como organofosforados e carbamatos, devido à sua baixa toxicidade para organismos não-alvo, alta toxicidade para insetos, uso flexível e atividade sistêmica (GOULSON, 2013). O mecanismo de ação dos inseticidas neonicotinóides é baseado no agonismo de receptores nicotínicos de acetilcolina pós-sinápticos (nAChRs). Uma vez absorvidos por insetos, eles ligam-se irreversivelmente aos nAChRs; não podendo ser degradados pela

acetilcolinesterase (AChE), levam à estimulação nervosa, paralisia e morte. Em insetos, os nAChRs são frequentemente encontrados e possuem alta afinidade por neonicotinóides. No entanto, eles são amplamente expressos em vertebrados e invertebrados. Em humanos e outros mamíferos, os nAChRs são encontrados nos sistemas nervosos periférico e central (KLINGELHÖFER et al., 2022).

A estrutura do alcaloide (S)-nicotina, presente no extrato aquoso do tabaco que antigamente era utilizado como inseticida natural, serviu como base principal para o desenvolvimento dos neonicotinóides. Atualmente, sete compostos neonicotinóides estão disponíveis no mercado: imidacloprido, tiacloprido, tiametoxam, nitenpiram, acetamiprido, clotianidina e dinotefurano (JESCHKE et al., 2011). O imidacloprido e o tiametoxam são neonicotinóides de primeira e segunda geração, respectivamente. Imidacloprido foi o primeiro neonicotinóide a ser comercializado em 1991, pela Bayer CropScience. O tiametoxam, por sua vez, foi introduzido no mercado no ano de 1998 pela Syngenta (THOMPSON et al., 2020).

Neonicotinóides são amplamente utilizados na agricultura e ambientes urbanos, na proteção de culturas, gado e animais de estimação. Dentre os inseticidas, são atualmente a classe mais relevante e eficaz, possuindo registro para utilização em cerca de 140 cultivos em mais de 120 países (JESCHKE et al., 2011). No ano de 2020, o imidacloprido foi o nono ingrediente ativo (i.a.) mais comercializado no Brasil, registrando o total de vendas de 9.401,65 toneladas (IBAMA, 2021). O tiametoxam é o segundo neonicotinóide mais utilizado no país. No mesmo ano, um total de 3.411,09 toneladas do i.a. foram comercializadas (IBAMA, 2021).

O uso generalizado destes inseticidas eleva a exposição humana. Além disso, seu acúmulo sistêmico nos alimentos torna-se uma importante via de exposição. O perfil de segurança dos inseticidas neonicotinóides deve-se à sua especificidade para o subtipo de receptor nicotínico de acetilcolina presente nos insetos, somado à sua fraca penetração na barreira hematoencefálica (SHEETS et al., 2016). No entanto, já foi demonstrado a capacidade desses inseticidas em se depositar e causar alterações no cérebro de mamíferos (KATIC et al., 2021). Devido ao seu modo de ação sistêmico, sua onipresença e alta persistência, os neonicotinóides representam um risco para o meio ambiente, para a vida selvagem e a saúde humana (KLINGELHÖFER et al., 2022). Neste sentido, buscando contribuir para o avanço da compreensão do potencial neurotóxico dos inseticidas neonicotinóides para humanos, também tivemos como

objetivo neste trabalho avaliar a neurotoxicidade de formulações de inseticidas neonicotinóides em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos relacionados à neurotoxicidade dos inseticidas neonicotinóides Much 600 FS®, Evidence 700 WG® e Actara 250 WG®, através de modelo *in vitro*.

Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos inseticidas Much®, Evidence® e Actara® nas células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, diferenciadas para fenótipo dopaminérgico.
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, induzida pelos inseticidas Much®, Evidence® e Actara® nas células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, diferenciadas para fenótipo dopaminérgico.
- Avaliar o dano mitocondrial dos inseticidas Much®, Evidence® e Actara® nas células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, diferenciadas para fenótipo dopaminérgico.
- Investigar o modo de morte celular, como apoptose e/ou necrose, induzido pelos inseticidas Much®, Evidence® e Actara® em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, diferenciadas para fenótipo dopaminérgico.
- Investigar a alteração na expressão da proteína pró-apoptótica Bax, induzida pelos inseticidas Much®, Evidence® e Actara 250® em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, diferenciadas para fenótipo dopaminérgico.
- Realizar uma revisão de literatura narrativa acerca dos efeitos da exposição a agrotóxicos sobre as habilidades de aprendizagem e memória.

CAPÍTULO I: ARTIGO

The impact of pesticide exposure on memory and learning: a review

Submetido para publicação na revista Journal of Applied Toxicology

As seguintes páginas (30-90) foram excluídas desta versão parcial pois correspondem ao manuscrito submetido à revista Journal of Applied Toxicology. Trata-se de uma revisão narrativa acerca dos efeitos da exposição a agrotóxicos sobre as habilidades cognitivas de memória e aprendizagem.

CAPÍTULO II: ARTIGO

**Neurotoxicity evaluation of neonicotinoid insecticide formulations
in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells**

A ser submetido para publicação na revista NeuroToxicology

As seguintes páginas (92-115) foram excluídas desta versão parcial pois correspondem ao manuscrito que será submetido à revista NeuroToxicology. Este capítulo aborda o estudo que avaliou a neurotoxicidade de formulações neonicotinóides em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas. Neste estudo avaliamos a citotoxicidade dos inseticidas Actara®, Much® e Evidence®, bem como seu potencial em causar alterações na produção de espécies reativas, no potencial de membrana mitocondrial e na expressão da proteína BAX. Também investigamos o modo de morte celular por apoptose e/ou necrose.

DISCUSSÃO

Os agrotóxicos são amplamente utilizados, não somente nas práticas agrícolas, mas também em ambientes urbanos. Todas as pessoas são expostas a agrotóxicos, seja através da contaminação ambiental ou exposição ocupacional. A população em geral é exposta através de resíduos presentes no ar, água e alimentos. A exposição ocupacional ocorre principalmente na etapa de aplicação de agrotóxicos, envolvendo a exposição de misturas complexas de diferentes produtos (BOLOGNESI, 2003; DOMINGUES et al., 2004). Assim, a exposição a esses agentes químicos e os impactos que estes podem causar tornaram-se um relevante problema ambiental e de saúde pública. Conseqüentemente, é crescente o número de estudos que associam exposição a agrotóxicos com agravos à saúde, como intoxicações, problemas respiratórios, cardíacos (SOARES; ALMEIDA; MORO, 2003), cognitivos e transtornos neurodegenerativos (HAYDEN et al., 2010; KAMEL et al., 2003). Neste sentido, uma revisão narrativa foi realizada com o objetivo de conhecer os efeitos da exposição a agrotóxicos nas habilidades de memória e aprendizagem.

Foram incluídos 105 artigos na revisão, sendo 14 estudos epidemiológicos e 91 estudos pré-clínicos. Os prejuízos cognitivos decorrentes da exposição aguda e crônica aos inseticidas organofosforados, piretróides e neonicotinóides, além de herbicidas, fungicidas e misturas foram investigados em diversas espécies, incluindo mamíferos, insetos e peixes. Os impactos da exposição ambiental e ocupacional aos inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides nas habilidades de memória e aprendizagem também foram avaliados em diferentes populações. Estudos pré-clínicos e epidemiológicos demonstraram que a exposição a agrotóxicos com diferentes mecanismos de ação, pode contribuir para um pior desempenho cognitivo, especialmente nas áreas de aprendizagem e memória. Além disso, identificamos a partir da revisão a necessidade de mais estudos para investigar os mecanismos envolvidos na neurotoxicidade de inseticidas neonicotinóides e seu potencial em causar comprometimento cognitivo em mamíferos.

Os neonicotinóides são inseticidas versáteis, utilizados contra pragas agrícolas e de animais domésticos, como as pulgas (KIMURA-KURODA et al., 2012). Segundo dados do IBAMA (2021), do total de inseticidas comercializados no ano de 2020 (80.733,41 toneladas de i.a.) no Brasil, cerca de 19% correspondiam a neonicotinóides (16.111,87 toneladas de i.a.). O uso extensivo destes inseticidas aliado ao seu acúmulo sistêmico nos alimentos eleva a exposição humana. Estudos

epidemiológicos revelaram quantidades crescentes destes inseticidas em amostras de urina de adultos e crianças (UEYAMA et al., 2014; ZHANG et al., 2018), despertando o questionamento sobre o potencial dos neonicotinóides em afetar a saúde humana.

Imidacloprido e tiametoxam apresentam afinidades de ligação 565 e >20 vezes, respectivamente, maiores para receptores nAChRs de insetos em relação a espécies vertebradas, especialmente pelo nAChRs do subtipo $\alpha 4\beta 2$ (TOMIZAWA; CASIDA, 2005). Essa seletividade de ambos deve-se à natureza eletronegativa de sua porção nitroguanidina, que é um determinante chave no reconhecimento seletivo por um subsítio específico único em nAChRs de insetos (RODRIGUES et al., 2010). Apesar disso, evidências sugerem que os neonicotinóides afetam os nAChRs de mamíferos em maior extensão do que se acreditava anteriormente. Já foi demonstrado que, semelhante a nicotina, o imidacloprido causou excitação neural em células cerebelares de ratos neonatos mediada por nAChRs (KIMURA-KURODA et al., 2012). O tiametoxam, por sua vez, induziu a liberação de dopamina no corpo estriado de ratos via nAChRs (DE OLIVEIRA et al., 2010).

Os nAChRs são canais catiônicos amplamente distribuídos tanto no sistema nervoso quanto em tecidos não neuronais. Eles desempenham uma variedade de papéis em diversas áreas do cérebro de mamíferos, incluindo não apenas a transmissão colinérgica, mas também a excitabilidade neural e a plasticidade sináptica. A sua abertura é controlada pelo neurotransmissor endógeno acetilcolina (ACh) ou por ligantes exógenos como a nicotina. Assim, esses canais estão envolvidos tanto em funções fisiológicas, incluindo a cognição e a atividade motora, quanto em condições patológicas como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e autismo (GOTTI; ZOLI; CLEMENTI, 2006).

Desta forma, avaliamos a neurotoxicidade de formulações comerciais de imidacloprido (Much 600 FS®, Evidence 700 WG®) e tiametoxam (Actara 250 WG®) em células SH-SY5Y diferenciadas. A linhagem de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y pode ser induzida a um fenótipo neuronal dopaminérgico maduro através de tratamentos com uma variedade de agentes (LOPEZ-SUAREZ et al., 2022). Neste trabalho, induzimos a diferenciação incubando as células SH-SY5Y na presença de ácido retinóico (AR) e 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) por 6 dias.

Os ensaios de redução de MTT e captação de vermelho neutro (VN) permitem a avaliação de disfunções celulares e foram usados para determinar o perfil de citotoxicidade dos neonicotinóides. Dentre os inseticidas testados, Much® (EC₅₀ 266,4 mg/L) foi o mais citotóxico para células SH-SY5Y, seguido de Actara® (EC₅₀ 653,2 mg/L), em ambos os testes de viabilidade. Much® e Evidence® são formulações inseticidas à base de imidacloprido, mas em células SH-SY5Y eles demonstraram um perfil citotóxico diferente, possivelmente devido aos ingredientes inertes de cada formulação. As formulações comerciais geralmente possuem diferentes ingredientes inertes em sua formulação, incluindo solventes, surfactantes, conservantes, antiespumantes e corantes. Esses ingredientes inertes podem aumentar a toxicidade das formulações para o sistema nervoso. Além disso, ingredientes inertes raramente são identificados no rótulo do produto (COX; SURGAN, 2006; MESNAGE; ANTONIOU, 2018). Desta forma, avaliações toxicológicas utilizando formulações comerciais tornam-se relevantes.

O mecanismo de ação de muitos agentes exógenos envolve a perturbação do equilíbrio entre espécies pró-oxidantes e mecanismos de defesa antioxidantes. Assim, o ensaio DCFH-DA foi utilizado para avaliar a geração de ERO e ERN em células SH-SY5Y após a exposição aos inseticidas neonicotinóides. Foi possível observar um aumento na geração de ERO e ERN em células SH-SY5Y após 96 h de exposição com Actara®, Much® e Evidence®. Quando os mecanismos celulares de defesa antioxidante forem insuficientes, o dano mediado por ERO pode induzir a morte celular apoptótica ou necrótica (FULDA et al., 2010). Investigamos o modo de morte celular corando as células SH-SY5Y com anexina V-FITC e PI. A incubação com os inseticidas Actara®, Much® e Evidence® elevou significativamente a frequência de células em estágio apoptótico inicial em comparação com o controle.

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) serve como um importante indicador da função mitocondrial. Além disso, as mitocôndrias são reguladoras da apoptose na via intrínseca (via apoptótica mediada pela mitocôndria). No ensaio TMRE, nenhuma mudança no $\Delta\Psi_m$ foi observada em células SH-SY5Y após incubação com inseticidas neonicotinóides. Também observamos que a exposição aos inseticidas neonicotinóides não afetou a expressão da proteína pró-apoptótica Bax em células SH-SY5Y diferenciadas. Bax é uma proteína pró-apoptótica que, sob

estimulação apoptótica, é translocada para a mitocôndria, regulando a formação de poros e levando à permeabilização da membrana externa mitocondrial, resultando na liberação de citocromo c, que leva à ativação de caspases e apoptose (GILLIES et al., 2015). Os resultados obtidos nos ensaios de potencial de membrana mitocondrial e expressão da proteína Bax, em conjunto, sugerem que a apoptose em células SH-SY5Y diferenciadas expostas aos neonicotinóides ocorre possivelmente através da via extrínseca.

Usando células SH-SY5Y indiferenciadas, Şenyildiz et al. (2018) encontraram valores de IC₅₀ para imidacloprido (>4mM, >1g) e tiametoxam (3,24mM, ~945mg) após um período de exposição de 48h. As concentrações foram superiores as encontrados para as formulações utilizadas neste trabalho, demonstrando que a presença dos ingredientes inertes pode aumentar a citotoxicidade das formulações. Ainda, no trabalho de Skandrani et al. (2006) em células SH-SY5Y indiferenciadas tratadas por 72h, o IC₅₀ apareceu em menores concentrações do ingrediente ativo na formulação comercial Confidor® (782µM) em comparação com a molécula ativa imidacloprido (1565µM), indicando um efeito adverso adicional dos ingredientes inertes. Além disso, os autores mostraram que tanto o i.a. imidacloprido quanto a formulação comercial Confidor® induziram uma subexpressão de HSP27 antiapoptótica, diminuindo as capacidades antiapoptótica e a sobrevivência de células SH-SY5Y.

O acetamiprido (97% de pureza, 0,5 - 4mM), outro inseticida da classe dos neonicotinóides, induziu a geração de ERO e apoptose em células SH-SY5Y não diferenciadas (ÖZTAŞ et al., 2021). Em células HepG2, os mecanismos de toxicidade do imidacloprido também envolveram aumento de ROS e eventos apoptóticos (GUIMARÃES et al., 2022; SILVA et al., 2022). Em trabalho anterior do nosso grupo, também não foram encontradas alterações no potencial de membrana mitocondrial em células HepG2 após 48 h de incubação com Much®, mas a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, por outro lado, não foi afetada nesta linhagem celular (CONTE et al., 2022).

Em estudos *in vivo*, o imidacloprido induziu estresse oxidativo e dano neuronal no cérebro de ratos (KAPOOR et al., 2010; LONARE et al., 2014), além de deficiências neurocomportamentais. A exposição ao imidacloprido (1 mg/kg, por 60 dias) causou

menor atividade exploratória, déficit das funções sensório-motoras e depressão, possivelmente mediada pela depleção de neurotransmissores, incluindo serotonina e dopamina, dano oxidativo e alterações apoptóticas no tecido cerebral de ratos adultos (ABD-ELHAKIM; MOHAMMED; MOHAMED, 2018). Além disso, ratos tratados por via oral com Much® (15 mg/kg por 45 dias) apresentaram comportamento tipo-ansiosogênico (TONIETTO et al., 2022). O tiametoxam administrado em altas doses (50,100 mg/kg, por 7 dias) levou a um comportamento ansioso aumentado em ratos, o que pode estar correlacionado com a diminuição da atividade da acetilcolinesterase (RODRIGUES et al., 2010). A exposição ao imidacloprido e ao tiametoxam também tem sido associada a déficits cognitivos em outras espécies de vertebrados e invertebrados (KARA et al., 2015; STANLEY et al., 2015; HSIAO et al., 2016; IQBAL et al., 2019; LUDICKE; NIEH, 2020; MUSTARD ET AL., 2020; WU ET AL., 2020).

Os inseticidas são as principais defesas contra pragas de insetos em plantações, no gado e em animais de estimação. Eles são utilizados até mesmo no controle de vetores de doenças humanas. A maioria dos inseticidas, como os neonicotinóides, são neurotóxicos que agem rapidamente para interromper os danos às culturas e a transmissão de doenças (CASIDA; DURKIN, 2013). Apesar da maior seletividade dos neonicotinóides para insetos (TOMIZAWA; CASIDA, 2005), estudos recentes têm demonstrado o potencial neurotóxico para mamíferos, incluindo humanos.

Nosso estudo tem limitações, porém fornece uma visão do potencial neurotóxico de formulações comerciais contendo imidacloprido e tiametoxam como ingrediente ativo. Sistemas *in vitro* não apresentam toda a fisiologia e complexidade do estado *in vivo*, entretanto, células de origem humana são ferramentas úteis para triagem e identificação de mecanismos de toxicidade. Além disso, a linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y é uma das mais utilizadas na neurotoxicologia (LOPEZ-SUAREZ et al., 2022). A falta de informações sobre os ingredientes inertes das formulações também é uma limitação, já que eles podem contribuir para o aumento ou diminuição da toxicidade do produto. Ainda assim, devido à escassez de estudos com formulações comerciais, torna-se importante ressaltar a sua relevância uma vez que os produtos comercialmente disponíveis são formulações.

CONCLUSÃO

- Os inseticidas Much 600 FS®, Evidence 700 WG® e Actara 250 WG® reduziram a viabilidade de células SH-SY5Y diferenciadas, após 96 h de incubação.
- Much 600 FS® foi o produto mais potente na indução de citotoxicidade em células SH-SY5Y diferenciadas.
- Os inseticidas Much 600 FS®, Evidence 700 WG® e Actara 250 WG® elevaram a geração de ERO e ERN em células SH-SY5Y diferenciadas, após 96 h de incubação.
- Em células SH-SY5Y diferenciadas, a incubação com os inseticidas Much 600 FS®, Evidence 700 WG® e Actara 250 WG® por 96 h elevou a frequência de células apoptóticas.
- A exposição a agrotóxicos pode estar associada ao comprometimento de funções cognitivas, como a aprendizagem e a memória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ELHAKIM, Y. M.; MOHAMMED, H. H.; MOHAMED, W. A. M. Imidacloprid Impacts on Neurobehavioral Performance, Oxidative Stress, and Apoptotic Events in the Brain of Adolescent and Adult Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 51, p. 13513–13524, 2018.
- ARBO, M. D. et al. In vitro neurotoxicity evaluation of piperazine designer drugs in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 1, p. 121–130, 2016.
- BANFALVI, G. Methods to detect apoptotic cell death. **Apoptosis**, v. 22, n. 2, p. 306–323, 2017.
- BARBOSA, D. J. et al. Ecstasy-induced toxicity in SH-SY5Y differentiated cells: Role of hyperthermia and metabolites. **Archives of Toxicology**, v. 88, n. 2, p. 515–531, 2014a.
- BARBOSA, D. J. et al. The mixture of “ecstasy” and its metabolites is toxic to human SH-SY5Y differentiated cells at in vivo relevant concentrations. **Archives of Toxicology**, v. 88, n. 2, p. 455–473, 2014b.
- BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring studies. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 251–272, 2003.
- CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 99–117, 2013.
- COLOSIO, C.; TIRAMANI, M.; MARONI, M. Neurobehavioral effects of pesticides: State of the art. **NeuroToxicology**, v. 24, n. 4–5, p. 577–591, 2003.
- CONTE, F. M. et al. Toxicity of pesticides widely applied on soybean cultivation: Synergistic effects of fipronil, glyphosate and imidacloprid in HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 84, n. June, 2022.
- COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1803–1806, 2006.
- DE OLIVEIRA, I. M. et al. Effects of the neonicotinoids thiametoxam and clothianidin on in vivo dopamine release in rat striatum. **Toxicology Letters**, v. 192, n. 3, p. 294–297, 2010.
- DOMINGUES, M. R. et al. Agrotóxicos: Risco à Saúde do Trabalhador Rural. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 25, n. 1, p. 45, 2004.
- FRIEDMAN, E. et al. Residential proximity to greenhouse agriculture and neurobehavioral performance in Ecuadorian children. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 223, n. 1, p. 220–227, 2020.
- FULDA, S. et al. Cellular stress responses: Cell survival and cell death. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, 2010.
- GILLIES, L. A. et al. Visual and functional demonstration of growing Bax-induced pores in mitochondrial outer membranes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 26, n. 2, p. 339–349, 2015.

GOTTI, C.; ZOLI, M.; CLEMENTI, F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 9, p. 482–491, 2006.

GUIMARÃES, A. R. D. J. S. et al. Effects of imidacloprid on viability and increase of reactive oxygen and nitrogen species in HepG2 cell line. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 32, n. 3, p. 204–212, 2022.

HAYDEN, K. M. et al. Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: The Cache County Study. **Neurology**, v. 74, n. 19, p. 1524–1530, 2010.

HSIAO, C. J. et al. Imidacloprid toxicity impairs spatial memory of echolocation bats through neural apoptosis in hippocampal CA1 and medial entorhinal cortex areas. **NeuroReport**, v. 27, n. 6, p. 462–468, 2016.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Agrotóxicos. Painel de Informações sobre a Comercialização de Agrotóxicos e Afins no Brasil – série histórica 2009 – 2020. **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>.

IQBAL, J.; ALQARNI, A. S.; RAWEH, H. S. A. Effect of Sub-lethal Doses of Imidacloprid on Learning and Memory Formation of Indigenous Arabian Bee (*Apis mellifera jemenitica* Ruttner) Adult Foragers. **Neotropical Entomology**, v. 48, n. 3, p. 373–380, 2019.

KAMEL, F. et al. Neurobehavioral performance and work experience in Florida farmworkers. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 14, p. 1765–1772, 2003.

KAPOOR, U. et al. Effect of imidacloprid on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in female rats to derive its no observed effect level (NOEL). **Journal of Toxicological Sciences**, v. 35, n. 4, p. 577–581, 2010.

KARA, M. et al. Insecticide imidacloprid influences cognitive functions and alters learning performance and related gene expression in a rat model. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 96, n. 5, p. 332–337, 2015.

KIMURA-KURODA, J. et al. Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats. **PLoS one**, v. 7, n. 2, 2012.

LONARE, M. et al. Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: A protective effect of curcumin. **Neurochemistry International**, v. 78, p. 122–129, 2014.

LOPEZ-SUAREZ, L. et al. The SH-SY5Y human neuroblastoma cell line, a relevant in vitro cell model for investigating neurotoxicology in human: Focus on organic pollutants. **NeuroToxicology**, v. 92, n. February, p. 131–155, 2022.

LUDICKE, J. C.; NIEH, J. C. Thiamethoxam impairs honey bee visual learning, alters decision times, and increases abnormal behaviors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 193, n. February, p. 110367, 2020.

LY, J. D. et al. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. **Apoptosis**, v. 3, n. 2, p. 35–40, 2004.

MESNAGE, R.; ANTONIOU, M. N. Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides. **Frontiers in Public Health**, v. 5, n. January, p. 1–8, 2018.

MUSTARD, J. A. et al. Honeybees fail to discriminate floral scents in a complex learning task after consuming a neonicotinoid pesticide. **Journal of Experimental Biology**, v. 223, n. 4, 2020.

ÖZTAŞ, E. et al. Cellular stress pathways are linked to acetamiprid-induced apoptosis in sh-sy5y neural cells. **Biology**, v. 10, n. 9, p. 1–17, 2021.

PUTCHA, G. V. et al. Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis: Lessons from the analysis of mutant mice. **Journal of Cell Biology**, v. 157, n. 3, p. 441–453, 2002.

RAMÍREZ-SANTANA, M. et al. Association between cholinesterase's inhibition and cognitive impairment: A basis for prevention policies of environmental pollution by organophosphate and carbamate pesticides in Chile. **Environmental Research**, v. 186, n. April, p. 109539, 2020a.

RAMÍREZ-SANTANA, M. et al. Reduced neurobehavioral functioning in agricultural workers and rural inhabitants exposed to pesticides in northern Chile and its association with blood biomarkers inhibition. **Environmental Health: A Global Access Science Source**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2020b

RODRIGUES, K. J. A. et al. Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 1, p. 101–107, 2010.

ŞENYILDIZ, M.; KILINC, A.; OZDEN, S. Investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of widely used neonicotinoid insecticides in HepG2 and SH-SY5Y cells. **Toxicology and Industrial Health**, v. 34, n. 6, p. 375–383, 2018.

SILVA, A. M. et al. Molecular Physicochemical Properties of Selected Pesticides as Predictive Factors for Oxidative Stress and Apoptosis-Dependent Cell Death in Caco-2 and HepG2 Cells. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 15, 2022.

SHEETS, L. P. et al. A critical review of neonicotinoid insecticides for developmental neurotoxicity. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 153–190, 2016.

SKANDRANI, D. et al. Effect of selected insecticides on growth rate and stress protein expression in cultured human A549 and SH-SY5Y cells. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 8, p. 1378–1386, 2006.

SOARES, W.; ALMEIDA, R.M.V.R.; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 4, p. 1117–1127, 2003.

STANLEY, D. A.; SMITH, K. E.; RAINE, N. E. Bumblebee learning and memory is impaired by chronic exposure to a neonicotinoid pesticide. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–10, 2015.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 2005.

TONIETTO, B. D. et al. Imidacloprid-based commercial pesticide causes behavioral, biochemical, and hematological impairments in Wistar rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 94, n. June, 2022.

UEYAMA, J. et al. Biological monitoring method for urinary neonicotinoid insecticides using LC-MS/MS and its application to Japanese adults. **Journal of Occupational Health**, v. 56, n. 6, p. 461–468, 2014.

WU, C. H. et al. Effects of imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, on the echolocation system of insectivorous bats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 163, n. October, p. 94–101, 2020.

ZHANG, Q. et al. Simultaneous determination of nine neonicotinoids in human urine using isotope-dilution ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Environmental Pollution**, v. 240, p. 647–652, 2018.

ANEXO I

Carta de Confirmação da Submissão do Artigo

Submission Confirmation

Submitted to

Journal of Applied Toxicology

Manuscript ID

JAT-22-0389

Title

THE IMPACT OF PESTICIDE EXPOSURE ON MEMORY AND LEARNING: A REVIEW

Authors

Honatel, Karol

Arbo, Bruno

Da Silva Júnior, Flavio

Garcia, Solange

Arbo, Marcelo

Date Submitted

18-Aug-2022