



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO-UFRPE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL - PPGBA

KETSIA SABRINA DO NASCIMENTO MARINHO

**Avaliação do efeito protetor da melatonina
exógena em neonatos nascidos de matrizes submetidas aos inseticidas
metomil e cipermetrina durante a prenhez**

RECIFE-PE

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO-UFRPE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL - PPGBA

KETSIA SABRINA DO NASCIMENTO MARINHO

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA MELATONINA
EXÓGENA EM NEONATOS NASCIDOS DE MATRIZES SUBMETIDAS AOS
INSETICIDAS METOMIL E CIPERMETRINA DURANTE A PRENHEZ

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de concentração em Morfofisiologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Valéria Wanderley Teixeira

Coorientadores:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Profa. Dra. Katharine Raquel Pereira dos Santos

RECIFE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M939

Marinho, Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho

Avaliação do efeito protetor da melatonina exógena em neonatos nascidos de matrizes submetidas aos inseticidas metomil e cipermetrina durante a prenhez / Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho Marinho. - 2020.
126 f. : il.

Orientadora: Valeria Wanderley Teixeira.

Coorientador: Alvaro Aguiar Coelho Teixeira Katharine Raquel Pereira dos Santos.

Inclui referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.

1. Fígado. 2. Ensaio Cometa. 3. Micronúcleo . 4. Imuno-Histoquímica. 5. Antioxidante. I. Teixeira, Valeria Wanderley, orient. II. Santos, Alvaro Aguiar Coelho Teixeira Katharine Raquel Pereira dos, coorient. III. Título

CDD 636.089

KETSIA SABRINA DO NASCIMENTO MARINHO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DA MELATONINA
EXÓGENA EM NEONATOS NASCIDOS DE MATRIZES SUBMETIDAS AOS
INSETICIDAS METOMIL E CIPERMETRINA DURANTE A PRENHEZ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de concentração em Morfofisiologia.

Aprovada em 16 de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Valéria Wanderley Teixeira– Presidente/Orientador -UFRPE

Profa. Dra. Katharine Raquel Pereira dos Santos (UFPE)

Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas (UFPE)

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (UFRPE)

Dra. Ismaela Maria Ferreira de Melo (UFRPE)

À minha querida e amada filha, Heloísa Nascimento, minha mãe Sueli Nascimento e, ao meu esposo Teone Pereira. Que sempre me acompanharam ao longo de toda trajetória e me apoiaram nos momentos difíceis. Obrigada por todo amor e dedicação. Amo-os incondicionalmente!

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus todo poderoso, por toda proteção e cuidado durante esse longo caminho. Por sempre se fazer presente em minha vida e ter enviado pessoas especiais, que me ajudaram ao longo dessa caminhada.

À minha amada mãe, Sueli Nascimento, não existem palavras suficientes para descrever toda a minha gratidão por ti. Uma mulher guerreira que fez todo o possível para que eu conseguisse chegar onde cheguei. Que sempre acreditou no meu potencial e me ofertou as melhores condições de educação, dentro de suas possibilidades. Sem sua ajuda eu não conseguiria chegar tão longe. Obrigada por cuidar tão bem da minha filha, Heloísa, quando eu não podia me fazer presente. Você foi a minha rede de apoio, o meu porto seguro. A você, minha eterna gratidão, mãe. Te amo incondicionalmente.

À minha querida e amada filha, Heloísa Nascimento, que me mostrou o quão forte eu posso ser. Você, minha filha, é a minha motivação diária. Essa jornada não foi fácil, filha, quantas vezes eu pensei que não daria conta, tantas vezes o teu abraço me acalmou nos momentos difíceis. Obrigada por ser meu porto seguro. Te amo incondicionalmente.

Ao esposo, Teone Pereira da Silva Filho, por me apoiar ao longo de todos esses anos de vida acadêmica. Obrigada por cada incentivo e palavra nos momentos de dificuldades. Você sempre me apoiou e incentivou e, mostrou que eu posso ir além das minhas limitações. Obrigada por ser sempre tão presente em minha vida. Te amo incondicionalmente, meu querido.

Aos meus avós maternos, Ana Antônia do Nascimento e Argemiro Nascimento (*in memoriam*). Sou grata por todo carinho, dedicação e cuidado com minha família. Amo vocês!

Agradeço aos meus sogros, Teone Pereira da Silva e Maria Moreira do Amaral e Silva, por cada incentivo, cuidado e, por sempre acreditarem em mim.

À minha grande amiga, irmã e comadre, Juliana Arandas, que nunca me desamparou ao longo de todos esses anos de amizade. Você é um dos meus grandes exemplos de mulher batalhadora, guerreira e de caráter. Sou tão grata à Deus por ter você em minha vida. Quantas vezes você me acalmou com suas palavras, me incentivou, buscou o melhor para mim. Eu serei eternamente grata a você, Juliana (Ju). Você é um verdadeiro anjo que Deus colocou em minha vida. Te amo, minha irmã.

À minha querida amiga, Eduarda Santana, por cada palavra de incentivo e cuidado. Sempre presente em minha vida, tornando o dia a dia mais leve com sua companhia e boas risadas. Obrigada por ser tão presente.

À minha orientadora, professora Dra. Valéria Wanderley Teixeira, que mesmo sem me conhecer, me acolheu e, forneceu a oportunidade de estudo. A senhora sempre se fez presente ao longo desses quatro anos de caminhada. Obrigada por acreditar no meu trabalho e fazer parte desse sonho de me tornar doutora, que agora se concretizou. Você contribuiu para que esse sonho se tornasse realidade. A você, o meu muitíssimo obrigada, professora. O seu apoio foi essencial durante essa trajetória. Agradeço imensamente todos os seus ensinamentos, oportunidade e confiança.

Ao meu coorientador, professor Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, pela confiança, oportunidade e apoio durante a construção deste trabalho. Agradeço imensamente pela oportunidade de estudo.

Ao professor, Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior, por todo apoio durante minha trajetória acadêmica, desde a graduação (2012) até o presente momento. Obrigada pela acolhida em seu laboratório. Seus ensinamentos foram essenciais durante o desenvolvimento do presente trabalho. Obrigada por ser tão solícito.

Minha eterna gratidão à Professora Dra. Katharine Raquel Pereira dos Santos, que já me acompanha nessa luta há cerca de 10 anos. Professora, não tenho palavras para agradecer o quanto a senhora já fez por mim. Obrigada pelos ensinamentos, paciência, incentivos, conversas e puxões de orelha, que foram essenciais para o meu crescimento profissional. Obrigada por sempre acreditar no meu trabalho, me acolher ao longo de todos esses anos, desde a graduação e, me ensinar valores humanos, que vão além de uma vida acadêmica. A senhora é um grande exemplo, que sempre levarei comigo, como pessoa e como profissional. Sou imensamente grata por ter tido a oportunidade de conhecê-la.

Ao professor, Dr. Cristiano Aparecido Chagas, pelos ensinamentos e oportunidade de realização dos estudos genotóxicos em seu laboratório. Todo o seu apoio foi primordial para o andamento desta tese. Obrigada por ser tão solícito e humano. Agradeço imensamente por toda ajuda, professor. O senhor é um grande exemplo de profissional, que levo para a minha vida acadêmica.

À Pós-doutoranda, Dra. Ismaela Maria Ferreira de Melo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Laboratório de Estudos Morfológicos em Vertebrados e

Invertebrados (LABEMOVI), por todos os ensinamentos e paciência nas análises imuno-histoquímicas.

Ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da UFRPE, em especial, aos que fazem parte do LABEMOVI, os colegas Érique Ricardo e Marina Baptista, pelo suporte durante as etapas das análises imuno-histoquímicas.

À Laís Santos por toda ajuda ofertada durante o doutorado, bem como nos experimentos da tese. Obrigada pelas conversas e boas risadas.

Agradeço imensamente ao meu querido amigo, Dr. Clovis Lapa, e sua querida esposa, Dra. Cibele Alves. Clovis, você foi como um irmão durante toda a minha trajetória na UFRPE. Não tenho palavras para te agradecer tudo o que você fez por mim. Obrigada por nunca me negar ajuda, por ser esse amigo tão prestativo e acolhedor. Levarei vocês em meu coração.

À minha querida amiga e companheira de laboratório, Dra. Ilka Duarte, que me auxiliou nas etapas dos experimentos. Muito obrigada por tudo que você fez por mim, por cada ensinamento e palavra de ajuda. Por me incentivar nos momentos de dificuldades. Você foi essencial para que eu conseguisse chegar até aqui. Sou muita grata por ter tido a oportunidade de aprender com você. Meu muitíssimo obrigada, minha amiga.

Ao meu querido amigo, Meykson Alexandre, pela ajuda e treinamento na realização dos testes genotóxicos. Sempre muito paciente e solícito nos seus ensinamentos. É um grande amigo, que levarei para toda a vida. Meu muitíssimo obrigada.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal (PPGBA): professores, secretária e demais funcionários. Em especial, a professora Dra. Tatiana Souza e professor Dr. Rinaldo Aparecido Mota, por serem tão solícitos e dispostos a ajudar. Muito obrigada!

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, em especial aos ingressos no período de 2016.1.

Agradeço aos colegas do laboratório de Biotecnologia e Fármacos, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em especial: Keila Tamires da Silva, Eduarda Gomes, Luciana Rodrigues, Erivaldo Alves e Jeanderson Marcelino.

À minha querida amiga, Fabricya Roberta da Silva, por todo companheirismo ao longo de toda minha vida acadêmica e pessoal. Obrigada por cada palavra de incentivo, minha amiga.

Ao meu querido e amado amigo, Dr. Nivaldo Bernardo de Lima Junior, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos ao longo desses quatro anos. Não tenho palavras para te agradecer todo carinho comigo e minha família. Você é um presente de Deus em minha vida. Seu companheirismo tornou essa caminhada bem mais leve. Não foi fácil, mas juntos, nós conseguimos o tão desejado título de doutor. Obrigada por me auxiliar e me estender sua mão amiga nos dias difíceis. Estaremos sempre juntos conquistando os maiores sonhos. Levarei você comigo para todo o sempre.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Centro Acadêmico de Vitória (CAV) pela oportunidade de realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro para realização desta pesquisa.

Por último, porém, não menos importante, agradeço a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

A todos(as), muito obrigada!

“Seja qual for o rumo que tomarmos, nosso destino está indissoluvelmente ligado à ciência”.

(Carl Sagan)

RESUMO

A crescente utilização de agrotóxicos nas plantações tem preocupado a população quanto aos seus efeitos na saúde humana. Metomil e cipermetrina são praguicidas muito utilizados na agricultura mundial. A exposição intrauterina a tais compostos pode causar danos graves a embriões e fetos, seja pela ação direta do composto ao atravessar a barreira placentária, seja por efeitos indiretos. O mecanismo de ação desses praguicidas parece estar relacionado com um desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante celular, causando aumento do estresse oxidativo e danos na molécula de DNA. Os danos celulares provocados pela exposição à praguicidas podem ser minimizados com a utilização de substâncias com potencial antioxidante, como a melatonina. A melatonina é um neuro-hormônio que estimula a ação de diversas enzimas com potencial antioxidante e suprime a atividade de enzimas pró-oxidantes, protegendo as células de danos oxidativos. Sendo assim, esse trabalho teve por objetivo avaliar o efeito protetor da melatonina exógena em ratas adultas e sua prole expostos ao metomil e cipermetrina durante a prenhez. Foram utilizadas trinta ratas adultas divididas em cinco grupos, a partir do primeiro dia de prenhez: Cn – controle negativo; Mth recebeu 0,02 mg/kg/dia de metomil; Cyp recebeu 0,05 mg/kg/dia de cipermetrina; MthMl recebeu 0,02 mg/kg/dia de metomil combinado com 10 mg/kg/dia de melatonina; CypMl recebeu 0,05 mg/kg/dia de cipermetrina combinado com 10 mg/kg/dia de melatonina. Após o nascimento, as matrizes e seus respectivos filhotes, de cada grupo experimental, foram anestesiados e submetidos às análises. Para avaliar a presença de danos genéticos e mutações, das matrizes foram coletadas amostras de sangue e fígado, da prole foram coletados também fragmentos de encéfalo. Todos os tecidos foram utilizados para o ensaio cometa; enquanto o sangue também foi usado para o teste do micronúcleo. De modo geral, cipermetrina e metomil induziram dano genético nas mães e na sua prole. Houve variações de danos de acordo com os testes utilizados e com os tecidos analisados. Após o tratamento com melatonina foi observado uma diminuição significativa nos danos genéticos induzidos pela cipermetrina nas matrizes e sua prole; no entanto, a administração da melatonina não foi eficiente contra os danos genéticos causados pelo metomil. Fragmentos do fígado das matrizes também foram utilizados para análises histomorfométricas e imunohistoquímicas (PCNA e IL-1 β). A análise histopatológica no fígado dos animais apresentou padrões de normalidade, sem a presença de infiltrados inflamatórios, áreas apoptóticas e necróticas. Entretanto, foram observados hepatócitos

hipertróficos e maior número de células hepáticas (hepatócitos). Houve um aumento na expressão do PCNA e da IL-1 β no fígado das matrizes dos grupos que receberam apenas os inseticidas, e uma redução significativa no fígado das ratas dos grupos que receberam melatonina. Os resultados da presente pesquisa sugerem que, a exposição gestacional aos inseticidas metomil e cipermetrina, mesmo que em doses consideradas seguras durante a gestação, é considerado prejudicial à saúde. Por sua vez, a melatonina parece ser um agente promissor contra a hepatotoxicidade relatada para o metomil e cipermetrina.

Palavras-chave: Fígado; Ensaio Cometa; Micronúcleo; Imuno-Histoquímica; Antioxidante.

ABSTRACT

The increasing use of pesticides in plantations has been worrying the population about their health human effects. Methomyl and cypermethrin are pesticides widely used in world agriculture. Intrauterine exposure to such compounds can cause serious damage to embryos and fetuses, either by direct action of the compound crossing the placental barrier or by indirect effects. The mechanism of action of these pesticides seems to be related to an imbalance in the cellular antioxidant defense system, causing increased oxidative stress and damage to DNA molecules. Cellular damage from exposure to pesticides can be minimized with the use of potentially antioxidant substances such as melatonin. Melatonin is a neurohormone that stimulates the action of several enzymes with antioxidant potential and suppresses the activity of pro-oxidant enzymes, protecting cells from oxidative damage. Thus, this study aimed to evaluate the protective effect of exogenous melatonin in adult rats and their offspring exposed to methomyl and cypermethrin during pregnancy. Thirty adult female rats were divided into five groups from the first day of pregnancy: Cn - negative control; Mth received 0.02 mg / kg / day of methomyl; Cyp received 0.05 mg / kg / day cypermethrin; MthML received 0.02 mg / kg / day of methomyl combined with 10 mg / kg / day of melatonin; CypML received 0.05 mg / kg / day cypermethrin combined with 10 mg / kg / day melatonin. After birth, the mothers and their respective puppies, from each experimental group, were anesthetized and subjected to analysis. To assess the presence of genetic damage and mutations, samples of blood and liver were collected from the matrices, and fragments of the brain were also collected from the offspring. All tissues were used for the comet assay; while blood was also used for testing the micronucleus. In general, cypermethrin and metomil induced genetic damage in mothers and their offspring. There were variations in damage according to the tests used and the tissues analyzed. After treatment with melatonin, a significant decrease in genetic damage induced by cypermethrin was observed in the sows and their offspring; however, the administration of melatonin was not effective against the genetic damage caused by methomyl. Liver fragments from the matrices were also used for histomorphometric and immunohistochemical analyzes (PCNA and IL-1 β). Histopathological analysis of the animals' liver showed normal patterns, without the presence of inflammatory infiltrates or apoptotic and necrotic areas. However, hypertrophic hepatocytes and larger liver cells (hepatocytes) were observed. There was an increase in the expression of PCNA and IL-

1 β in the liver of the mothers of the groups that received only the insecticides, and a significant reduction in the liver of the rats of the groups that received melatonin. The results of this research suggest that, the gestational exposure to the insecticides metomil and cypermethrin, even in doses considered safe during pregnancy, is considered harmful to health. In turn, melatonin appears to be a promising agent against the hepatotoxicity reported for methomyl and cypermethrin.

Keywords: Liver; Comet Assay; Micronucleus; Immunohistochemistry; Antioxidant.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS	xx
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxi
CAPÍTULO 1	23
1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 O uso de agrotóxicos no Brasil.....	26
2.2 Definição e classificação dos agrotóxicos	28
2.3 Agrotóxicos em estudo	31
2.3.1 Metomil.....	31
2.3.2 Cipermetrina	34
2.4 Toxicologia dos agrotóxicos em estudo.....	35
2.4.1 Efeitos do metomil sobre o desenvolvimento reprodutivo	38
2.4.2 Efeitos da cipermetrina sobre o desenvolvimento reprodutivo	41
2.5 Melatonina	43
2.5.1 Efeito protetor da melatonina contra agrotóxicos.....	45
2.6 Bioensaios utilizados na detecção de danos na molécula de DNA.....	47
2.6.1 Ensaio cometa ou eletroforese de gel em célula única	48
2.6.2 Teste do micronúcleo.....	50
3. OBJETIVOS	53
3.1. Geral.....	53
3.2. Específicos	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CAPÍTULO 2.....	72
AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO EFEITO PROTETOR DA MELATONINA EXÓGENA EM RATAS ADULTAS E SUA PROLE	

EXPOSTAS AOS INSETICIDAS METOMIL E CIPERMETRINA DURANTE A GRAVIDEZ	73
Resumo	73
Abstract.....	74
1. Introdução	75
2. Material e Métodos	77
2.1. Animais.....	77
2.2. Acasalamento e diagnóstico da prenhez	77
2.3. Grupos experimentais	77
2.4. Administração dos inseticidas	78
2.5. Administração da melatonina	78
2.6. Coleta dos materiais biológicos	78
2.7. Ensaio Cometa	79
2.8. Teste do Micronúcleo	80
2.9. Análise estatística	81
3. Resultados.....	81
4. Discussão	87
5. Conclusões.....	89
6. Agradecimentos	89
Referências.....	89
CAPÍTULO 3	94
EFEITO PROTETOR DA MELATONINA EXÓGENA NO FÍGADO DE RATAS PRENHES E SUA PROLE EXPOSTOS AOS INSETICIDAS METOMIL E CIPERMETRINA DURANTE A GESTAÇÃO.....	95
Resumo	95
Abstract.....	96
1. Introdução	97
2. Material e métodos.....	98
2.1. Animais.....	98
2.2. Acasalamento e diagnóstico da prenhez	99
2.3. Grupos experimentais	99
2.4. Administração dos inseticidas	99

2.5. Administração da melatonina	100
2.6. Análise Histomorfométrica.....	100
2.7. Imunohistoquímica (PCNA e IL-1 β).....	100
2.8. Análise estatística	101
3. Resultados.....	101
4. Discussão	108
5. Conclusão.....	110
Agradecimentos	111
Referências.....	111
Anexos	116

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

FIGURA 1:	Classificação toxicológica dos agrotóxicos com base na dose letal 50% (DL50). Adaptado de Peres; Moreira; Dubois (2003).	30
FIGURA 2:	Fórmula estrutural do Metomil. Adaptado de Aktar et al. (2011).	31
FIGURA 3:	Processo de interação e inibição entre o AChE e o Metomil. Adaptado de Patrick (2009).	32
FIGURA 4:	Vias metabólicas do metomil em mamíferos. Adaptado de FAO\WHO (1986).	33
FIGURA 5:	Fórmula estrutural da Cipermetrina. Adaptado de Dos Santos; Areas; Reyes (2007).	34
FIGURA 6:	Efeitos gerados em decorrência da exposição materna a agentes químicos. Adaptado de Lemonica et. al. (2008).	39
FIGURA 7:	Via metabólica da síntese de melatonina. Adaptado de Carpentieri et al. (2012).	44
FIGURA 8:	Classes de danos do ensaio cometa proveniente de linfócitos de acordo com a quantidade e tamanho de fragmentos de DNA. Dano 0 (sem dano), dano 1 (pouco dano evidenciado), dano 2 (dano moderado); dano 3 (dano moderado com material mais disperso), 4 (dano máximo). Adaptado de própria autoria, 2018.	49
FIGURA 9:	Eritrócito policromático micronucleado (seta vermelha). Adaptado de própria autoria, 2018.	50
FIGURA 10:	Diferente vias de drogas mutagênicas. (1) Agentes citotóxicos induzem uma fase de necrose precoce, (2) que evolui para uma	51

necrose. (3) Agentes genotóxicos induzem danos ao DNA durante a fase G0 a S, (5) e pode induzir a apoptose, (6) resultando na formação de corpos apoptóticos, durante a apoptose tardia ou, (4) resultando em danos cromossômicos, resultando em formação de micronúcleos através das quebras cromossômicas e/ou ruptura do aparato mitótico. (5 e 6) Células micronucleadas podem ser destinadas à apoptose. Adaptado de Araldi et al. (2015).

Capítulo II

- FIGURA 1:** Efeito da cipermetrina e metomil isolados e associados com a melatonina exógena no sangue e fígado de ratas prenhes. a) Damage index in blood by the comet assay; (b) damage frequency (in percentage) in blood by the comet assay; (c) damage index in liver; (d) damage frequency in liver; (e) frequency of micronuclei in polychromatic erythrocytes; Cn: negative control; Cyp: cypermethrin; CypMl: cypermethrin and melatonin; Mth: methomyl; MthMl: methomyl and melatonin. Numbers above points represent p values statistically significant (pair-to-pair T-test with Bonferroni's correction). Black stars represent means. 82
- FIGURA 2:** Efeito da exposição materna à cipermetrina e metomil isolados e associados à melatonina exógena no sangue, fígado e cérebro da prole de filhotes machos. a) Damage index in blood by the comet assay; b) damage frequency (in percentage) in blood by the comet assay; c) damage index in liver; d) damage frequency in liver; e) damage index in brain; f) damage frequency in brain; g) micronuclei frequency in polychromatic erythrocytes; Cn: negative control; Cyp: cypermethrin; CypMl: cypermethrin and melatonin; Mth: methomyl; MthMl: methomyl and melatonin. Numbers above points represent p 84

values statistically significant (pair-to-pair T-test with Bonferroni's correction). Black stars represent means.

- FIGURA 3** Efeito da exposição materna à cipermetrina e metomil isolados e associados à melatonina exógena no sangue, fígado e cérebro da prole de filhotes fêmeas. a) Damage index in blood by the comet assay; b) damage frequency (in percentage) in blood by the comet assay; c) damage index in liver; d) damage frequency in liver; e) damage index in brain; f) damage frequency in brain; g) micronuclei frequency in polychromatic erythrocytes; Cn: negative control; Cyp: cypermethrin; CypML: cypermethrin and melatonin; Mth: methomyl; MthML: methomyl and melatonin. Numbers above points represent p values statistically significant (pair-to-pair T-test with Bonferroni's correction). Black stars represent means
- 86

Capítulo III

- FIGURA 1** Fotomicrografia do fígado das ratas prenhes dos grupos experimentais. A) controle; B) Metomil; C) Cipermetrina; D) Metomil + Mel; E) Cipermetrina + Mel. Seta: Hepatócitos; Ponta de flecha: célula de Kupffer; Asterisco: capilares sinusoidais. Coloração em H&E. Aumento total em 400 x. Barra de escala = 100 µm.
- 103
- FIGURA 2** Imunohistoquímica para o IL-1 β no fígado das matrizes dos grupos experimentais. A) controle; B) Metomil; C) Cipermetrina; D) Metomil + Mel; E) Cipermetrina + Mel. Notar forte marcação em B e C, em relação aos demais grupos. F) Quantificação em pixels da
- 106

imunomarcção. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$).

107

FIGURA 3:

Imunohistoquímica para proliferação celular no fígado das matrizes dos grupos experimentais. A) controle; B) Metomil; C) Cipermetrina; D) Metomil + Mel; E) Cioermetrina + Mel. Notar forte marcação em B e C e moderada em D e E, em relação ao grupo controle. F) Quantificação em pixels da imunomarcção. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$).

LISTA DE TABELAS

Capítulo III

TABELA 1	Análise Histomorfométrica do fígado das matrizes expostas aos agrotóxicos metomil e cipermetrina durante o período gestacional.	104
-----------------	---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACH – Área células dos hepatócitos
AChE – Acetilcolinesterase
ANH – Área nuclear dos hepatócitos
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Cp – Cipermetrina
Cyp – Cipermetrina
CypMI – Cipermetrina e Melatonina
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
DDT – Dicloro-Difenil-Tricloroetano
ENC – Eritrócitos normocromáticos
EPC – Eritrócitos policromáticos
EPM – Eritrócitos policromáticos micronucleados
GABA – Ácido gama-aminobutírico
ID – Índice de dano
FD – Fator de dano
H.E. – Hematoxilina – Eosina
IDCe – Índice de danos no cérebro
IDFi – Índice de danos no fígado
IDSa – Índice de danos no sangue
IL-1 β – Interleucina 1 beta
Mt – Metomil
Mth – Metomil
MhtMI – Metomil e Melatonina
MT1– Receptor de melatonina tipo 1
MT2 – Receptor de melatonina tipo 2
MT3 – Receptor de melatonina tipo 3
NBF – Formalina a 10% neutra tamponada
NCK – Número de Kupffer
NH– Número de hepatócitos
NM– Número de megacariócitos

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão fosfato salino

PCNA – ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

PNDA – Programa Nacional de Defensivos Agrícolas

TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira tem se destacado consideravelmente nos últimos anos, e em consequência a este crescimento há uma maior utilização de quantidades de agrotóxicos para otimizar a produção agrícola. Desde o ano de 2008 o Brasil já liderava o ranking mundial no consumo de agrotóxicos. No entanto, o uso indiscriminado dos agrotóxicos representa um grave risco para a saúde humana e meio ambiente (SOARES; FREITAS; COUTINHO, 2005; VEIGA, 2012; FELEMA; RAIHER; FERREIRA, 2013; PELAEZ; DA SILVA; ARAÚJO, 2013; CARNEIRO et al., 2015).

O aumento da utilização de inseticidas agrícolas pode resultar em graves consequências para os indivíduos expostos favorecendo o surgimento de várias desordens: disfunções neurológicas, doenças neurodegenerativas, efeitos imunossupressores, doenças cardiovasculares, doenças hepáticas, tumores, aborto e falha na capacidade reprodutiva (CELIK et al., 2005; ; ASSAYED et al., 2010; HERNÁNDEZ, 2012; RACHID; IBRAHIM, 2013; HEIKAL, 2015; SINGH et al., 2015; KHATAB et al., 2016).

Diversos estudos demonstram que os inseticidas podem provocar malformações congênitas em fetos após exposição *in útero*, incluindo uma série de deformidades morfológicas externas e malformações viscerais (FARAG; ABDEL-ZAHER; OKAZY, 2006; MATSUMOTO et al., 2010; WICKERHAN et al., 2012; MOSBAH et al., 2016). Segundo Canturatti et al. (2008), os grupos de inseticidas que são amplamente utilizados na agricultura, como os carbamatos e piretróides, possuem características lipofílicas de solubilidade que facilitam a sua passagem pela barreira placentária, atingindo os tecidos fetais e favorecendo a sua exposição durante o período gestacional.

Dentre os carbamatos e piretróides mais utilizados na agricultura destacam-se o metomil e a cipermetrina, respectivamente. O metomil (S-methyl N-(methylcarbamoyloxy)thioacetimidate) tem sido usado com bastante frequência na produção agrícola devido a sua vida relativamente curta no meio ambiente e ação rápida sobre a praga alvo. Entretanto, a exposição inadequada ao metomil exerce ações tóxicas sobre o sistema nervoso, sendo um potente agente genotóxico capaz de induzir anomalias cromossômicas em células de mamíferos (ANDERSEN et al., 2002; TSAI et al., 2003; NUNES; JEANTRY; MARTY, 2004; KAUR; SANDHIR, 2006). O uso indiscriminado da cipermetrina ((RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-

3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate) também pode exercer nos vertebrados diversos efeitos tóxicos, acumulando-se na gordura corporal, pele, fígado, rins, glândulas adrenais, ovários, pulmões, sangue e coração (JAENSSON et al., 2007; HU et al., 2013; YEASMIN et al., 2014; PATEL et al., 2015; KANBUR et al., 2016).

Estudos revelam que a toxicidade de alguns inseticidas está relacionada à geração aumentada de radicais livres, os quais são responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo celular e danos no tecido hepático (EL-DEMERDASH et al., 2013; BHATTI et al., 2014; DJEFFAL et al., 2015). O nosso organismo produz uma variedade de substâncias antioxidantes que impede a produção aumentada desses radicais livres e ajuda proteger o organismo contra danos oxidativos induzidos por vários inseticidas. Estudos já demonstram que o estresse oxidativo provocado pela administração de alguns inseticidas podem ser reduzido pelo tratamento conjunto de substâncias com propriedades antioxidantes, a exemplo da melatonina (KARAOZ et al., 2002; BHATTI; SIDHU; BHATTI, 2011; BHATTI et al., 2014; DJEFFAL et al., 2015; IDRIS; AMBALI; SULEIMAN, 2017).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) um dos principais produtos de secreção da glândula pineal é considerada um antioxidante eficaz, capaz de neutralizar os radicais livres antes que esses desempenhem suas atividades (REITER et al., 2003; FERRAZO; LOÓPEZ-ORTEGA, 2008). Este papel antioxidante da melatonina é devido ao seu pequeno tamanho e lipofilicidade, pois a mesma é capaz de atravessar as barreiras biológicas facilmente, atingindo todos os compartimentos da célula (BOUTIN et al., 2005; ASGHARI et al., 2016).

Diante do exposto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o efeito protetor da melatonina exógena nas matrizes e seus neonatos submetidos aos inseticidas metomil e cipermetrina durante ao período gestacional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O uso de agrotóxicos no Brasil

A agricultura é uma das principais atividades econômicas do Brasil e nos últimos anos tem avançado expressivamente com uma maior área de produção. Em consequência a esse crescimento há também uma maior utilização de agrotóxicos com o intuito de assegurar a produtividade. Por volta do ano de 2008, o Brasil já havia ganhado o título de um dos países de maior consumo de agrotóxicos do mundo (ANVISA, 2006; MIRANDA et al., 2007; TAVELLA et al., 2011; SANTANA; MOURA; FERREIRA et al., 2013).

Os agrotóxicos foram desenvolvidos com o intuito de diminuir as perdas causadas pelo ataque de pragas às plantações agrícolas, constituindo um importante modelo de desenvolvimento econômico no País. No Brasil, a utilização de agrotóxicos se intensificou logo após a Segunda Guerra Mundial, com a incorporação de novos produtos químicos no mercado (D AMATO; TORRES; MALM, 2002; VEIGA, 2012). As primeiras indústrias de agrotóxicos datam de meados da década de 1940. O primeiro inseticida moderno a ser amplamente utilizado e estudado por volta do século XX foi o DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano), descoberto pelo cientista suíço Paul Müller em 1939, que ganhou o Prêmio Nobel de Medicina em 1948 (CORBETT; WRIGHT; BAILLE, 1984; ESPINOSA; THIEL, 1988).

O DDT foi inicialmente comercializado durante a segunda guerra mundial para o combate de mosquitos vetores da malária e da febre tifo. Posteriormente, foi difundido para a agropecuária devido ao seu baixo preço e especificidade a pragas alvo. Por volta do ano de 1945, a utilização do DDT se intensificou bastante em todo território brasileiro, porém o seu uso indiscriminado ao longo dos anos causou sérias consequências para o meio ambiente e saúde dos indivíduos expostos (ESPINOSA; THIEL, 1988; D AMATO; TORRES; MALM, 2002; SILVA; HOCHMAN, 2011). Em meados de 1960 houve uma grande demanda de DDT para otimização da agricultura e maior produção. Apesar das sérias consequências causadas à saúde humana e ao meio ambiente com a exposição ao DDT somente no ano de 2009 é que foi proibida a fabricação, a importação, a exportação, a manutenção em estoque, a comercialização e o seu uso em todo território brasileiro. Embora a sua comercialização já tivesse sido

proibida em vários países por volta da década de 1970 (ESPINOSA; THIEL, 1988; D AMATO; TORRES; MALM, 2002; BYARD et al., 2015; HARADA et al., 2016).

Em 1962, a pesquisadora Rachel Carson já havia alertado a população norte-americana quanto aos riscos inerentes à utilização do inseticida DDT. Rachel Carson lançou em 1962 o livro conhecido como *Silent Spring* (*Primavera Silenciosa*), que contribuiu para o banimento do pesticida DDT nos Estados Unidos, em 1972, porém, o seu uso no território brasileiro continuou bastante difundido e somente em 2009 ele foi completamente proibido em todo o território nacional. O famoso livro *Silent Spring* inspirou uma ampla preocupação quanto à saúde pública e poluição do ambiente natural, alertando para os perigos que a utilização inadequada do DDT e demais organoclorados poderia representar ao meio ambiente (MOURA, 2008; MOURA, 2015).

Entre as décadas de 1960-1970, o Brasil começou a adotar um “modelo” agrícola voltado para o rápido desenvolvimento econômico, tendo como meta produzir cada vez mais em um curto período de tempo (BALSAN, 2006). O Brasil utilizou tantos defensivos agrícolas, que no ano de 1975 foi instituída a criação do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA) pelo Ministério da Fazenda. Esse programa tinha por objetivo tornar o país autossuficiente na produção de defensivos agrícolas, já que a grande maioria dos produtos era obtida por meio da importação. O programa foi capaz de promover uma grande expansão das indústrias do ramo (PORTO; SOARES, 2012). De acordo com dados obtidos por Paschoal (1979), houve um grande investimento na produção de agrotóxicos entre os anos de 1975 e 1979, período do PNDA, nessa época o Brasil gastou em torno de US\$ 2 bilhões ao ano, enquanto que, antes da criação do PNDA eram gastos, em média, US\$ 300 milhões.

O aumento considerável no volume de agrotóxicos aplicados nas plantações agrícolas tem trazido uma série de transtornos relacionados à saúde humana e ao meio ambiente, que resultam no aparecimento de intoxicações de diferentes graus, atingindo agricultores, consumidores, e várias espécies de vegetais e animais (SOARES; FREITAS; COUTINHO, 2005; RIBAS; MATSUMURA, 2009). Estima-se que no ano de 2008 mais de 80% dos agricultores brasileiros utilizavam defensivos agrícolas para combater pragas e doenças relacionadas à produção, e com isso aumentar a produtividade, o que contribuiu para aumentar os riscos de intoxicações (PEDLOWSKI et al., 2012).

Somente na década de 80 que a legislação brasileira para o uso e controle de agrotóxicos começou a ser mais formalizada com a criação da Lei dos Agrotóxicos do Brasil. A lei nº 7.802/89, que rege o processo de registro de um produto agrotóxico, regulamentada pelo Decreto nº 4.074/02 foi reconhecida como um grande avanço do ponto de vista da proteção da saúde pública e do meio ambiente. A “Lei Federal dos Agrotóxicos” como ficou conhecida é considerado um referencial legal mais importante, ela só permite o registro de um novo produto de agrotóxico se esse for comprovadamente igual ou de menor toxicidade aos que já são registrados para o mesmo fim (BRASIL, 1989; GARCIA; BUSSACOS; FISHER, 2005). Atualmente, o uso de agrotóxicos em todo o território brasileiro, bem como o controle de sua concentração no meio ambiente é normatizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, popularmente conhecida como ANVISA, e pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (BRASIL, 2011; ANVISA, 2017; CONAMA, 2018).

2.2 Definição e classificação dos agrotóxicos

Os agrotóxicos são destinados a preservar a fauna e a flora de ataques e/ou danos ocasionados por outros seres vivos nocivos. Esses produtos englobam uma ampla gama de substâncias de origem química e/ou natural, que podem ser classificadas de acordo com a espécie alvo que controlam, com base na estrutura química das substâncias ativas, e efeitos relacionados à saúde humana e ao meio ambiente (BRASIL, 2002; BRAIBANTE; ZAPPE, 2012; BRAIBANTE; ZAPPE, 2012; CASSAL et al., 2014).

De acordo com a Lei 7.802/89 regulamentada pelo Decreto nº 4.074/02, em seu artigo 2º, inciso I, os agrotóxicos são definidos como sendo:

“Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos” (BRASIL, 2002).

É imprescindível conhecer a classificação dos diversos tipos de agrotóxicos existentes, quanto ao seu princípio ativo, modo de ação, alvo, toxicidade e o grupo

químico a que eles pertencem. Essa classificação é de extrema importância para o diagnóstico correto das intoxicações e para o tratamento específico. Estima-se que no Brasil exista uma ampla gama de princípios ativos em diversas formulações comerciais distintas (SANTOS; CÂMARA, 2002; MIRANDA et al., 2007; PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003; RIBEIRO et al., 2014). Os agrotóxicos apresentam uma constituição básica em sua formulação, a qual é composta pelo ingrediente ativo, termo usado para descrever os compostos responsáveis pela atividade biológica desejada, e por aditivos e diluentes (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012). Com base na sua finalidade de uso sobre os organismos-alvo, os agrotóxicos, podem ser classificados como: inseticidas, utilizados no controle de insetos; fungicidas, função de destruir ou inibir fungos; herbicidas, aplicado no combate às plantas invasoras; acaricidas, função de eliminar ácaros; nematicidas, empregado na destruição de nematoides; raticidas, utilizados no combate de ratos e outros roedores; dentre outros (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012; CASSAL et al., 2014).

Até o ano de 1989 a obtenção do registro de agrotóxicos no Brasil era feita apenas por meio de análises toxicológicas e com base na sua eficiência agrônoma. No entanto, logo após a regulamentação da Lei nº 7.802/89, pelo Decreto nº 4.074/02, começou a ser exigida uma avaliação e classificação do potencial de periculosidade ambiental (BRASIL, 2002; PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003). No Brasil, a classificação toxicológica dos agrotóxicos é classificada em classes distintas, que variam de I a IV, de acordo com os perigos que eles podem representar para a saúde humana, como: classe I - produtos extremamente tóxicos; classe II - produtos altamente tóxicos; classe III - produtos medianamente tóxicos; e a classe IV- produtos pouco tóxicos. Essa classificação toxicológica é baseada em estudos da DL50 (dosagem letal 50%), que é definida como a dose necessária de uma dada substância tóxica (como agrotóxico) para matar 50% de uma determinada quantidade de animais testados. Ressaltando ainda que, o rótulo das embalagens de agrotóxicos deve conter a classe toxicológica a qual ele pertença, sendo atualmente representada por uma faixa colorida equivalente a sua toxicidade (Figura 1) (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003; PASCHOARELLI; DOS SANTOS MENEZES, 2009; BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

Os agrotóxicos também podem ser avaliados quanto ao seu grau de toxicidade ambiental ou potencial de periculosidade ambiental (PPA), classificados em quatro classes: classe I - produtos altamente perigosos ao meio ambiente; classe II - produtos

muito perigosos ao meio ambiente; classe III - produtos perigosos ao meio ambiente e a classe IV- produtos pouco perigosos ao meio ambiente (PERES; MOREIRA; DUBOIS, 2003). De acordo com o Decreto nº 4.074/02, Artigo 7º, inciso II, é de responsabilidade do Ministério do Meio Ambiente realizar essa avaliação ambiental, estabelecendo suas classificações quanto ao potencial de periculosidade ambiental por meio do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Ainda com base neste decreto, compete ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Artigo 5º, inciso I, realizar a avaliação da eficácia agronômica dos agrotóxicos; e ao Ministério da Saúde, Artigo 6º, inciso I, executar a avaliação e classificação toxicológica (BRASIL, 2002; ARAGÃO, 2017).

Classe toxicológica	Toxicidade	DL50 (mg/Kg)	Faixa colorida
I	Extremamente tóxico	≤ 5	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50	Amarela
III	Mediamente tóxico	Entre 50 e 500	Azul
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5.000	Verde

Figura 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos com base na dose letal 50% (DL50). Adaptado de Peres; Moreira; Dubois (2003).

A classificação química dos agrotóxicos é realizada com base na composição química do seu princípio ativo e são divididos em orgânicos e inorgânicos. Os agrotóxicos orgânicos são aqueles que apresentam átomos de carbono em sua estrutura química, e que podem ser divididos em sintéticos (aqueles fabricados sinteticamente) ou naturais (obtidos da natureza). Já os agrotóxicos inorgânicos possuem em sua estrutura química a presença de compostos de vários elementos tóxicos, como os metais pesados: o arsênico, mercúrio, chumbo e cobre (CARAPETO, 1999; BRAIBANTE; ZAPPE, 2012). Existe uma ampla variedade de nomenclaturas com base na estrutura química dos agrotóxicos, a depender do tipo de praga-alvo que é empregado. A classificação química dos principais grupos de agrotóxicos são: Carbamatos, Organoclorados, Organofosforados, Piretróides, Ditiocarbomatos, Triazinas, Fenóis, entre outros (CARAPETO, 1999; BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

2.3 Agrotóxicos em estudo

2.3.1 Metomil

O metomil (Mt), S-metil-N-(metilcarbamoiloxi)tioacetimidato, de fórmula molecular $C_5H_{10}O_2N_2S$, pertencente ao grupo químico do Metilcarbamato de oxima (Carbamatos) (Figura 2). É altamente solúvel em água ($57,9 \text{ g L}^{-1}$) e pode facilmente causar contaminação das águas subterrâneas em áreas agrícolas, com uma meia vida que pode ultrapassar 50 semanas após a aplicação no ambiente (STRATHMANN; STONE, 2001; FARRÉ et al., 2002).

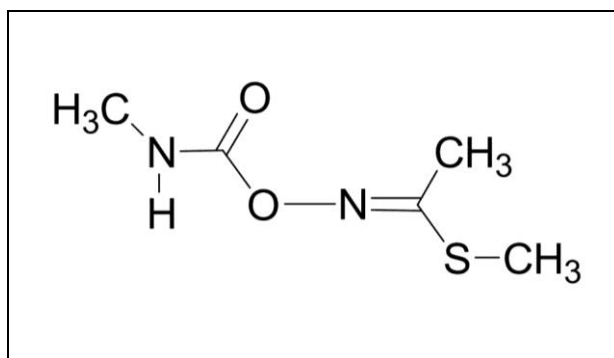


Figura 2. Fórmula estrutural do Metomil. Adaptado de Aktar et al. (2011).

Foi introduzido em 1966 pela Du Pont e atualmente é o ingrediente ativo de diversas formulações comerciais, como: Lannate®, Methomex® e Nudrin®. O seu uso como inseticida e acaricida é autorizado pela ANVISA e indicado principalmente na aplicação foliar das culturas de algodão, couve, brócolis, repolho, batata, milho, soja, trigo e tomate (HENAO; COREY, 1986; LU; HEE, 1998; MALATO et al., 2002; AKTAR et al., 2011; SCOY et al., 2013; ANVISA, 2018).

O Mt é classificado pela OMS (Organização Mundial da Saúde), EPA (Environmental Protection Agência, USA) e CE (Comissão Europeia) como um inseticida muito tóxico e perigoso de uso restrito ou classe I (extremamente tóxico) (VAN SCOY et al., 2013; ANVISA, 2018). A escolha de inseticidas que pertencem à classe química dos carbamatos, como é o caso do Mt, está relacionada à forte atividade biológica destas substâncias, considerando também o seu tempo de meia-vida relativamente curta no meio ambiente. (CHARPENTIER; FOURNIER, 2001). Apesar

das vantagens que esse inseticida apresenta o seu uso constante e incorreto pode resultar em serias consequências para a saúde humana. (NUNES; JEANTRY; MARTY, 2004).

O Mt atua como um inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE) presente em vertebrados e insetos, e desta maneira hidrolisa o neurotransmissor acetilcolina, o que causa perturbação na transmissão dos impulsos nervosos. Similar a outros carbamatos ele reage com as esterases e sofre hidrólises. Apesar da inibição da enzima AChE, a sua reativação é relativamente rápida e espontânea, dependendo da dose exposta. Inicialmente durante esse processo de inibição ocorre em primeiro momento um complexo reversível entre o carbamato e a AChE, seguido da reação irreversível de carbamilação da AChE, e, por fim, a decarbamilação por hidrólise, liberando assim a AChE original e o carbamato (Figura 3) (KUHR; DOROUGH, 1976 FARRE et al. 2002; NUNES, JEANTRY e MARTY, 2004; MANSOUR et al., 2009; JOKANOVIC, 2009; SHALABY; EL ZORBA; ZIADA, 2010; DIAS et al., 2015; ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

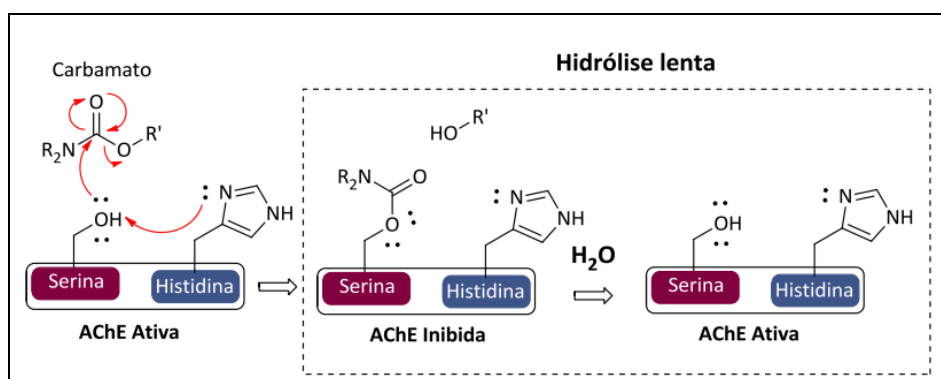


Figura 3. Processo de interação e inibição entre o AChE e o Metomil. Adaptado de Patrick (2009).

Apesar de não se acumular no organismo de maneira irreversível e possuir uma rápida distribuição nos tecidos e órgãos corpóreos, a sua contaminação pode ser feita tanto pela via de contato ou forma sistêmica. A metabolização do Mt se dar no fígado de maneira relativamente rápida através de três mecanismos básicos: hidrólise, oxidação e conjugação. O restante é excretado pelos rins e também pode ser eliminado pelas fezes (DUPONT, 2018). A biotransformação no organismo exposto pode ocorrer por três vias distintas. Na primeira via ocorre o deslocamento da porção de S-metil pela glutatona

resultando em transformações enzimáticas, que dará origem aos derivados do ácido mercaptúrico; A via dois acontece por meio da hidrólise da S-metil-N-hidoxitioacetimidato (um metabólito do Mt), que logo é convertido em dióxido de carbono; A terceira e última via envolve a isomerização do isômero syn-metomil para o isômero anti-metomil liberando acetonitrila. O ácido mercaptúrico é o principal resíduo liberado na urina, enquanto que a acetonitrila é o principal resíduo resultante do fígado e sangue (figura 4) (HUHTANEN; DOROUGH, 1976; FAO\WHO, 1986).

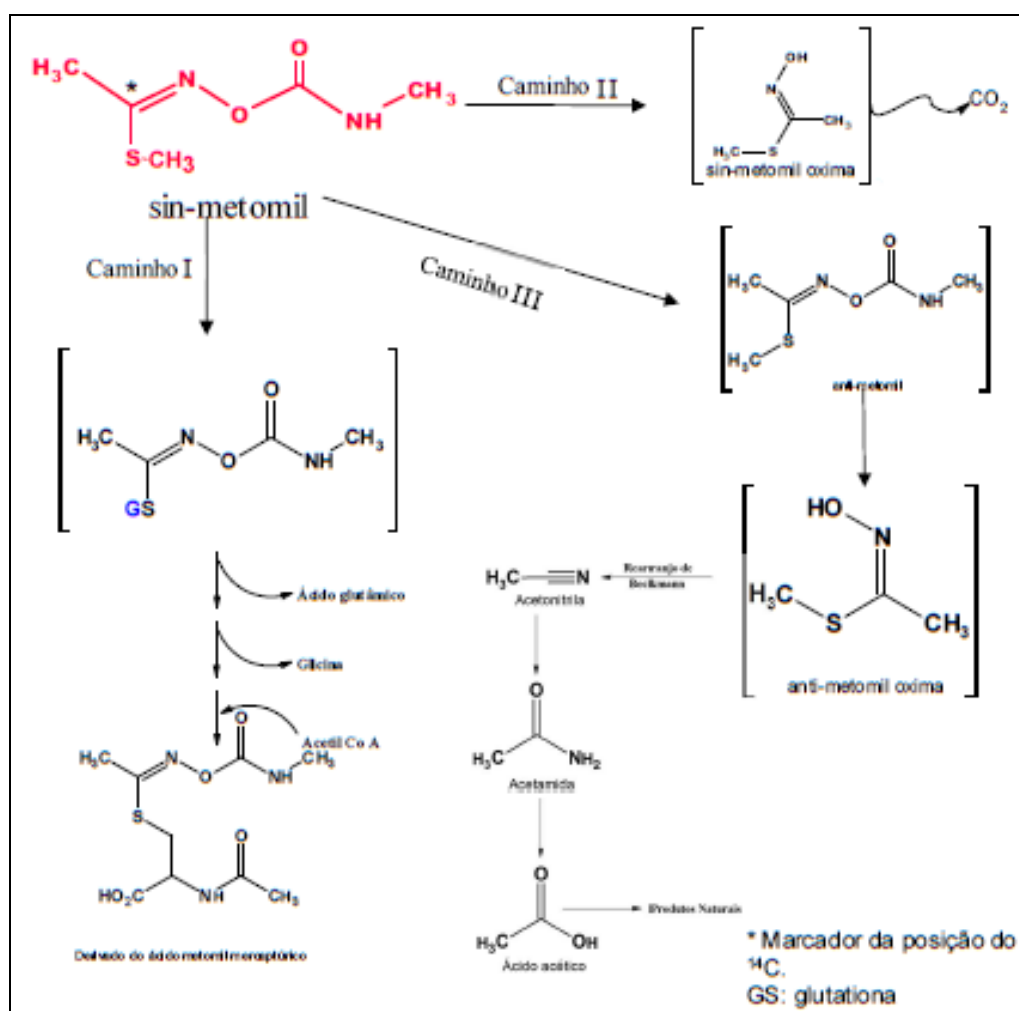


Figura 4. Vias metabólicas do metomil em mamíferos. Adaptado de FAO\WHO (1986).

2.3.2 Cipermetrina

A cipermetrina (Cp) [(RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate] (Figura 5), com a seguinte forma molecular: $C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$, é uma substância pertencente ao grupo dos piretróides sintéticos do tipo II, devido à ausência ou presença de um grupo ciano na porção fenoxibenzil. Pode ser isolada a partir de flores da espécie *Chrysanthemum cinerariaefolium* e outras espécies de plantas, sendo um derivado das piretrinas (DOS SANTOS; AREAS; REYES, 2007; JAENSSON et al., 2007).

A Cp é uma molécula do tipo α -cyano que contém três centros quirais (carbono 1 e 3 do ciclopropano e carbono α da porção álcool) e pode constituir-se de uma mistura racêmica composta por até oito isômeros: quatro denominados *Cis-Cipermetrina* e quatro denominados *Trans-Cipermetrina*. A toxicidade da mistura racêmica vai variar de acordo com a proporção *cis/trans* utilizada na formulação do inseticida. Os isômeros *cis* apresentam uma toxicidade bem mais elevada em relação aos isômeros *trans*, e por isso, formulações com maior teor de isômeros *Cis* são mais eficazes na agricultura (HUTSON et al., 1981; DOS SANTOS; AREAS; REYES, 2007).

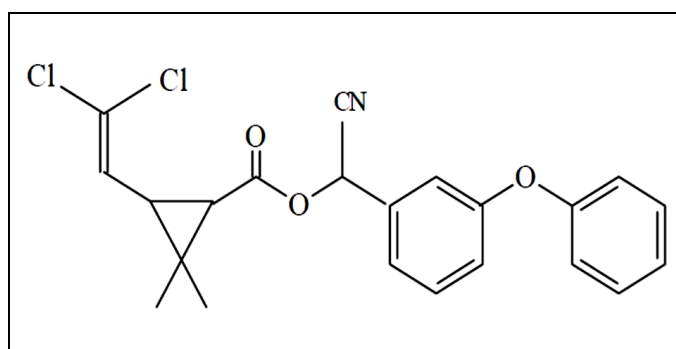


Figura 5. Fórmula estrutural da Cipermetrina. Adaptado de Dos Santos; Areas; Reyes (2007).

O uso dos piretróides sintéticos iniciou-se na década de 70 e desde então vem ganhando popularidade. É um inseticida bastante utilizado na agricultura e em saúde pública devido a ser bem eficaz no combate de pragas, e por apresentar uma persistência moderada no ambiente. Produtos que contém a Cp como princípio ativo são classificados como altamente tóxicos, tanto para o meio ambiente quanto para os

indivíduos expostos (classe II) (POLAT et al., 2002; COLLINS; CAPPELLO, 2005). A biotransformação da Cp ocorre rapidamente no organismo de mamíferos, principalmente no fígado. A reação inicial de desintoxicação é por meio da clivagem de ésteres hidrolíticos e vias oxidativas, através do sistema enzimático Citocromo P450. A biotransformação resulta na formação de cianidrinas, que se decompõem em cianetos e aldeídos, substâncias que podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (WIELGOMAS; KRECHNIAK, 2007).

O uso indiscriminado dos piretróides, a exemplo da Cp, pode ocasionar a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio, mediada por meio da peroxidação lipídica, e aumentar a concentração de cálcio citosólico (que ocorre devido ao efeito direto dos piretróides nos canais de cálcio) levando à citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade (KALE et al., 1999; IDRIS; AMBALI; AYO, 2012).

2.4 Toxicologia dos agrotóxicos em estudo

A intoxicação por agrotóxicos não é apenas um problema no Brasil, ela tem proporções mundiais. O uso indiscriminado dos agrotóxicos na agricultura podem determinar efeitos drásticos sobre a saúde humana, dependendo do tempo de exposição e do tipo de produto utilizado (NASRALA NETO; DE CASTRO LACAZ; ANTONIO PIGNATI, 2014; CARNEIRO, et al., 2015). De acordo Frank et al. (2004), sempre existiu pouco interesse em investigar as reais consequências do uso excessivo desses produtos para a saúde humana e sua segurança na agricultura. A grande importância se dava no desenvolvimento de novas tecnologias, para aumentar a produção agropecuária, sem considerar os seus impactos à saúde e à segurança dos indivíduos expostos.

Segundo a Toxicologia toda substância química pode ser considerada tóxica em certas condições de exposição, entretanto, para toda substância deve existir alguma condição de exposição, que seja considerada segura com relação à saúde humana (BARROS; DAVINO, 2008; LEMONICA et. al., 2008). Alguns casos de intoxicação humana causadas pelo Mt ainda não são amplamente estudados, embora já se tenha relatos de envenenamentos em algumas localidades agrícolas (TSATSAKIS et al. 2001; TSAI et al., 2003; MORIYA; HASHIMOTO, 2005; DA SILVA-FILHO et al., 2008; KINOSHITA et al., 2013).

As intoxicações ocasionadas pelo Mt, assim como por outros inseticidas, pode se dar por várias vias de transmissão, como pela via oral, através da ingestão de resíduos presentes nas frutas e verduras consumidas *in natura*; pela exposição dérmica; e/ou por inalação, durante a aplicação do produto no campo. Uma vez absorvidos pelo organismo ele é rapidamente distribuído por todos os tecidos e órgãos do corpo, atingindo elevadas concentrações no fígado e rins (TSATSAKIS et al., 2001; STOPPELLI; MAGALHÃES, 2005; ARAÚJO et al., 2007; KANBUR et al., 2016).

No Brasil existem vários relatos de intoxicações de pessoas logo após a exposição ao Mt. Tsatsakis et al. (2001) registraram um caso em que um homem de 60 anos de idade foi contaminado após a inalação e absorção transdérmica pela pulverização do inseticida. Os exames clínicos revelaram altas concentrações na corrente sanguínea logo após a exposição ($1,6 \text{ mg L}^{-1}$). Também existem diversos registros de pessoas intoxicadas entre os anos de 1992 a 2002 na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul (PIRES, CALDAS e RECENA, 2005).

Em 2008, no município de Sobral/CE/Brasil, foram relatados vários casos de intoxicação exógena em pessoas que consumiram tapiocas produzidas com fécula de mandioca contaminada pelo Mt. Os sintomas mais frequentes entre os intoxicados foram vômitos, sudorese, dor abdominal e diarreia (DA SILVA-FILHO et al., 2008). Geralmente, a taxa de mortalidade para os casos de envenenamento com carbamatos é relativamente baixa, mas, mortes decorrentes de intoxicações pelo Mt já foram relatadas. Um relato de caso de doença cardíaca e toxicidade foram evidenciados após exposição em curto prazo com o Mt, causando lesão miocárdica direta e disfunção cardíaca (SAIYED et al., 1992; TSATSAKIS et al., 1996; LEE et al., 2011; LEE et al 2015).

Mansour et al. (2009) observaram um aumento da atividade da AChE e maiores níveis de peroxidação lipídica, logo após a exposição de ratos machos ao Mt. Estes resultados evidenciam que tal exposição é capaz de induzir um aumento de radicais livres e danos oxidativos no organismo. Um aumento da atividade da AChE também foi encontrada por Zhao et al (2015). A exposição ao Mt pode causar danos renais, estresse oxidativo, perturbações no sistema de defesa antioxidante e alterações histopatológicas em rins, segundo o estudo de El-Demerdash et al. (2013). Tal exposição também pode ser capaz de aumentar significativamente a peroxidação lipídica nos rins dos animais, os níveis de ureia, ácido úrico e creatinina no soro (EL-DEMERDASH et al., 2013).

O Mt altera o sistema de defesa antioxidante enzimático celular, particularmente nas atividades das enzimas catalase, glutathione transferase e glutathione peroxidase (DJEFFAL et al., 2015). Estudos têm demonstrado que o Mt também apresenta um forte potencial genotóxico, capaz de causar danos na molécula de DNA, incluindo a presença de micronúcleos, aberrações cromossômicas e trocas de cromátides-irmãs. Além de induzir apoptose celular *in vitro* em concentrações subletais (PATEL et al., 2006; SINGH et al., 2011; MURANLI, 2013; GUANGGANG, et al., 2013).

Assim como o Mt, a exposição à Cp pode resultar diversas complicações no sintoma nervoso. As complicações no sistema nervoso surgem em decorrência das alterações nos canais de sódio das células, interferindo na abertura e no fechamento dos canais iônicos e interrompendo a transmissão do impulso nervoso. Efeito semelhante ao observado nas intoxicações por DDT. Em alguns casos extremos pode até levar à morte induzida por parada respiratória (SANTOS; AREAS; REIS, 2008; RIGHI; BERNARDI; PALERMO-NETO, 2008; KLAASSEN; WATKINS, 2009; BHATTI et al., 2014).

A Cp pode ser rapidamente absorvida pelo trato gastrointestinal logo após a sua administração pela via oral, dérmica, ou respiratória. Por ser um inseticida de natureza lipofílica, a Cp, já foi encontrada em vários tecidos e órgãos (SODERLUND et al., 2002; TIAN et al., 2008; CANTURATTI et al. 2008). Em concentrações relativamente elevadas pode agir sobre o complexo receptor inotrópico do ácido γ -aminobutírico (GABA), que é o principal neurotransmissor inibidor no cérebro de vertebrados. Este inseticida liga-se aos receptores do GABA e acaba bloqueando os canais de cloro, impedindo que o cloro entre no axônio e interrompa o impulso nervoso. A intoxicação por Cp também pode prolongar a abertura dos canais de sódio sensíveis à voltagem, causando alteração da propagação dos impulsos nervosos dos neurônios e induzindo à neurotoxicidade (ABALIS; ELDEFRAWI; ELDEFRAWI, 1986; GIRAY; GURBAY; HINCAL, 2001; MANNA et al., 2005; DAVIES et al., 2007; KUMAR SINGH et al., 2012).

Alterações genéticas e histopatológicas foram registradas no fígado e rins de animais expostos a 12mg/kg de peso corpóreo de Cp. As análises bioquímicas revelaram um aumento nos níveis séricos de albumina, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e perfil lipídico (SOLIMAN; ATTIA; ELLA, 2015). A Cp induziu peroxidação lipídica no fígado de animais expostos a uma

dose única de 170 mg/kg do inseticida. A exposição provocou um aumento expressivo nos níveis séricos de malondialdeído e uma diminuição dos níveis de glutathione (GIRAY; GURBAY; HINCAL, 2001). Os seus efeitos no fígado e rins também foram investigados através de parâmetros bioquímicos. A administração de 125 mg/kg aumentou os níveis de malondialdeído e glicose, diminuiu os níveis de triglicerídeos e atividade de enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (ERASLAN et al. 2008).

A Cp atravessa facilmente a barreira sangue-cérebro e entra na via nigro-estriatal. Em doses baixas e exposições de curto prazo o seu uso parece ser relativamente seguro. Ela rapidamente é eliminada pelo organismo, no entanto, o tratamento repetido e por períodos prolongados aumenta a sua concentração no cérebro, conduzindo a abertura prolongada dos canais iônicos e interferindo na transmissão dos impulsos nervosos (SINGH et al., 2011; SINGH et al., 2012). A sua exposição também pode produzir efeitos tóxicos em mamíferos com doses subletais. Nair et al. (2011) constataram alterações microscópicas e áreas necróticas: no cérebro, medula espinal, esôfago, estômago, intestino, fígado, rim, pulmões e coração de ratos machos submetidos a Cp.

2.4.1 Efeitos do metomil sobre o desenvolvimento reprodutivo

Somente a partir da segunda metade do século XX foi que se instalou uma preocupação crescente quanto ao efeito das substâncias químicas sobre os organismos em fase de desenvolvimento, embrião ou feto (SCHÜLER-FACCINI, 2002). Durante o período gestacional a maioria dos agentes químicos atravessa facilmente a barreira placentária e, dessa maneira, pode-se considerar que a exposição materna a agentes externos, entre esses os agentes químicos, como os agrotóxicos, pode resultar em efeitos drásticos sobre um organismo passivo, alvo secundário desses agentes, que é o organismo a se desenvolver (embrião e/ou feto) (Figura 6) (WEBSTER; FREEMAN, 2001; LEMONICA et. al., 2008). A exposição a estes agentes pode desencadear em diferentes respostas, que pode variar desde a um efeito anti-implantação, alterações funcionais e/ou morfológicas, retardo geral no desenvolvimento, malformações, e até mesmo levar a morte (WEBSTER; FREEMAN, 2001; LEMONICA et. al., 2008). Estas disfunções podem ser causadas pela ação direta do agente tóxico sobre o embrião e/ou

feto, ou até mesmo, através da ação sobre o organismo materno (HANSEN; YANKOWITZ, 2002; BERNARDI, 2003).

Os efeitos gerados na fase pré-natal podem levar a distúrbios irreversíveis, principalmente a exposição no período da organogênese, que é uma das fases mais suscetíveis ao aparecimento de anormalidades no desenvolvimento, pois as alterações são produzidas durante a formação e/ou diferenciação dos órgãos (LO; FRIENDMAN, 2002; BERNADI, 2003). Estudos que investigam os efeitos dos agrotóxicos em populações não diretamente vinculadas com a cadeia produtiva dessas substâncias são de extrema importância para compreender a interação com o organismo. O uso indiscriminado dos defensivos agrícolas é considerado na atualidade um grave problema de saúde pública (FARIA; FASSA; FACCHINI, 2007; DE REZENDE CHRISMAN et al., 2009; DE MM BOCCOLINI et al., 2013; KRAWCZYK et al., 2014; DA SILVA; DE MELLO; OTERO, 2016).

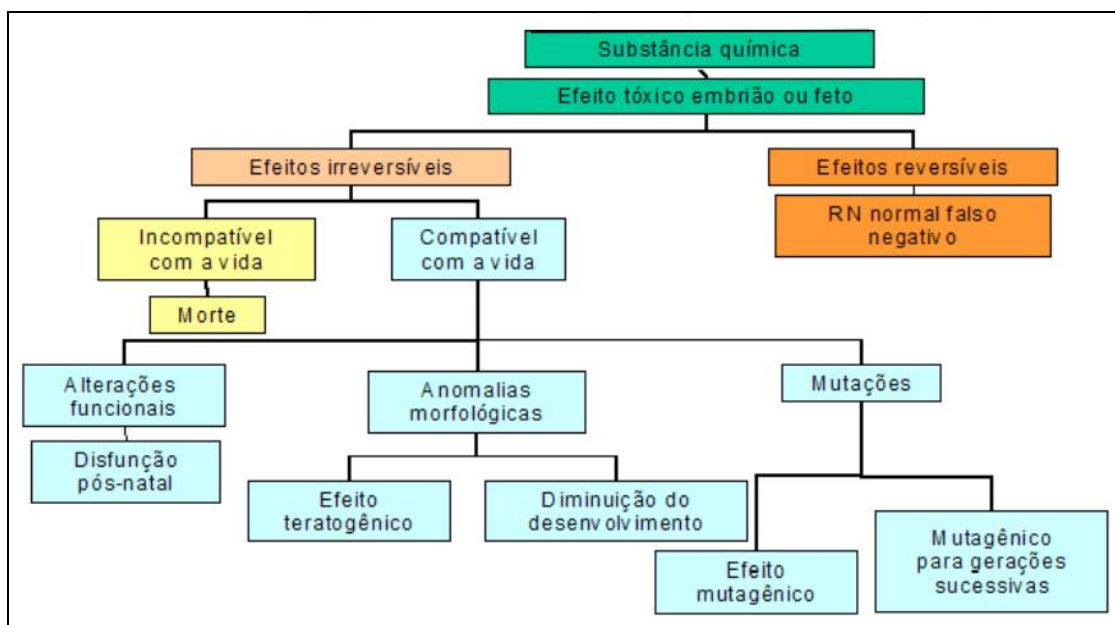


Figura 6. Efeitos gerados em decorrência da exposição materna a agentes químicos. Adaptado de Lemonica et. al. (2008).

Na década de 90, Hasan et al. (1990), já estudava os efeitos fetotóxicos da exposição ao Mt durante o período gestacional, em especial, no período da organogênese. A administração oral de 1,0 mg/kg e 5,0 mg/kg em ratas prenhes causou

reabsorção precoce nos fetos expostos e diminuição no peso médio da ninhada. A menor dose resultou em hiperplasia do coração e fígado, e alterações esqueléticas na prole. A administração prolongada deste inseticida, nestes níveis, durante 70 dias sucessivos, diminuiu o peso relativo dos testículos, vesículas seminais, glândulas prostáticas e viabilidade dos espermatozoides, o que pode resultar em perda na capacidade reprodutiva do animal.

A toxicidade induzida por Mtl em testículos de ratos machos causa drástica redução nos níveis séricos de testosterona, com diminuição na qualidade do espermatozoide e dano testicular. As anormalidades observadas foram em decorrência da parada incompleta da espermatogênese devido à diminuição do hormônio testosterona (SAKR et al., 2018). A administração de Mt em animais machos maduros sexualmente gera diminuição no índice de fertilidade, nos níveis de testosterona sérica, na motilidade e contagem espermática. O Mt pode aumentar expressivamente os níveis de genes responsáveis pela indução de apoptose (caspase-3, caspase-9, Tp53 e Bcl2) em células testiculares (HEIKAL, 2015).

A sua ação teratogênica foi observada em animais tratados com diferentes dosagens. Este estudo aponta o metomil como sendo um desregulador endócrino, que afeta o peso corporal e o ciclo estral dos animais. Além disso, sugere que o metomil tem efeito teratogênico/embriotóxico nos animais expostos durante o período da organogênese (TOLEDO et al., 2019). O efeito do Mt durante o desenvolvimento folicular ovariano e a fertilidade foram testados em modelo animal por Shanthalatha et al. (2012). A administração de 5mg/kg de formulação comercial Lannate®, durante 90 dias, resultou em uma diminuição significativa nos órgãos relacionados com a capacidade reprodutiva (ovários, útero e tubas uterinas). Os resultados também indicam que essa dosagem testada é suficiente para provocar a perda dos folículos ovarianos e causar infertilidade. O tratamento de 28 dias com diferentes doses de Mt é capaz de produzir toxicidade materna e embriotoxicidade, com redução significativa no número de sítios de implantações, número de fetos vivos por ninhada e, uma maior incidência de embriões mortos (MOKHTAR et al., 2013).

Ratas Wistar tratadas com o Mt de formulação Lannate® durante a gestação apresentaram diminuições significativas nos níveis de progesterona, tamanho da ninhada, índice de gestação, peso médio dos neonatos e peso relativo dos ovários. Exames histopatológicos da glândula suprarrenal e ovários revelaram alterações quanto

à estrutura e organização dos componentes celulares, com vacuolização das células da glândula suprarrenal, bem como alterações degenerativas com poucos folículos saudáveis e muitos folículos atrésicos em diferentes estágios de desenvolvimento nos ovários (RACHID; IBRAHIM, 2013). Parâmetros bioquímicos, histológicos e reprodutivos também foram estudados por Mosbah e colaboradores em 2016. O Mt aumentou significativamente o nível de colesterol, glicose, creatinina, ureia, AST e ALT, enquanto ocorreu uma redução no nível de proteínas totais. Os animais apresentaram um declínio no nível de progesterona, alterações no índice reprodutivo e um aumento no número de folículos atrésicos do ovário e do corpo lúteo degenerativo, comprovando a sua toxicidade reprodutiva (MOSBAH et al., 2016). Esses resultados demonstram que a exposição ao praguicida deve ser feita com precaução, especialmente, durante o desenvolvimento reprodutivo, pois, pode ocasionar efeitos deletérios no organismo exposto.

2.4.2 Efeitos da Cipermetrina sobre o desenvolvimento reprodutivo

A Cp também pode induzir uma variedade de efeitos neurotóxicos, imunotóxicos, genotóxicos, embriotóxicos e fetotóxicos, em vários sistemas experimentais já testados (GIRAY; GURBAY; HINCAL, 2001; SUMAN; NARAVANENI; JAMIL, 2005; CANTURATTI et al. 2008; MURANLI, 2013). A sua toxicidade reprodutiva também é uma grande preocupação, considerando que a espermatogênese humana pode ser vulnerável à exposição crônica de produtos químicos, mesmo que em baixíssimas concentrações (SHARMA; HUQ; SINGH et al., 2014). A exposição durante a puberdade interrompe a síntese de testosterona através da redução da proteína reguladora aguda da estereidogênese (StAR) nos testículos de ratos (WANG et al., 2010).

Estudos mostram que a Cp diminui significativamente a fertilidade, reduz o número de sítios de implantações e quantidade de fetos viáveis, além de causar alterações no ovário e no útero. Muito pouco se conhece sobre o mecanismo de toxicidade reprodutiva induzida por esse inseticida, no entanto, sabe-se que ele pode atuar sobre os diferentes órgãos do organismo (KHATAB et al., 2016). A exposição durante a gravidez pode afetar o estado metabólico materno e causar consequências no

desenvolvimento fetal. A administração de diferentes doses (21.25 mg/kg, 42.5 mg/kg, 65 mg/kg e 85 mg/kg) em 5% de óleo vegetal durante a gestação de ratas prenhes e seus descendentes foi avaliado por Madu, 2015. Os animais que receberam doses mais elevadas apresentaram sintomas atípicos, como a hipersalivação, irritabilidade, convulsão, dificuldade respiratória e até mesmo a morte. A administração também induziu uma diminuição no peso corporal, congestão vascular e hemorragia em diferentes órgãos.

A administração oral de baixas doses (1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg e 5 mg/kg) da Cp em ratas prenhes conduziu mudanças no complexo enzimático citocromo P 450, em regiões do cérebro. Essas alterações no complexo enzimático citocromo P 450 acaba afetando a biotransformação destas drogas no organismo, e sua consequente acumulação nos tecidos corpóreos (SINGH et al., 2015). Várias alterações metabólicas e redox levando a prejuízos fisiológicos maternos e a alterações metabólicas fetais ocorreu em decorrência do baixo consumo da Cp. Parâmetros bioquímicos plasmáticos, marcadores de lipídios do fígado e estresse oxidativo foram determinados em animais expostos a uma dieta contendo 0,02 mg/kg/dia do inseticida durante toda a gestação. A exposição induziu um aumento no peso corporal e nos níveis plasmáticos de glicose e lipídios, bem como nas atividades plasmáticas das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina nas ratas prenhes e seus recém-nascidos. Todos os animais provenientes da gestação apresentaram estresse celular oxidativo e alteração do estado oxidante-antioxidante (HOCINE et al., 2016).

A exposição pós-natal em descendentes de mães alimentadas com dieta padrão contendo Cp durante a gestação e lactação induz diversas alterações metabólicas e desequilíbrio no estado oxidante/antioxidante. Altos níveis de proteínas carbonílicas e malonaldeído, e baixos níveis de antioxidantes nos eritrócitos, fígado e rim são encontrados (GHORZI et al., 2017). Os efeitos da Cp no cérebro também já são conhecidos. A exposição uterina e lactacional a baixas doses do inseticida leva a defeitos de desenvolvimento neurológico em camundongos machos (LAUGERAY et al., 2017). A exposição pré-natal induz toxicidade no neurodesenvolvimento e defeitos na corticogênese, sendo capaz de reduzir a proliferação, maturação e diferenciação neuronal (GUO et al., 2018).

Os efeitos da exposição subcrônica da Cp no ovário e endométrio também foi investigado, bem como o envolvimento da apoptose na sua toxicidade. A Cp pode

suprimir o número de células foliculares e desencadear o afinamento do endométrio por meio da apoptose, causando um comprometimento na reprodução desses animais em estudo (WARDANI et al., 2019). Obinna e Agu (2019) investigou o efeito da Cp sobre os parâmetros reprodutivos na maturidade sexual de fêmeas expostas na fase perinatal. O seu efeito na geração F1 não causou danos no ciclo estral das ratas em estudo e também não apresentou alterações dos hormônios sexuais, exceto, pelo LH, o que pode ocasionar um efeito deletério da maturidade sexual em decorrência da exposição. Diversas outras pesquisas comprovam os efeitos indesejáveis da exposição à Cp em qualquer uma das fases do ciclo reprodutivo, atuando em diversos órgãos do organismo (ASSAYED et., 2010; SALLAM et al., 2015; ZHOU et al., 2018).

2.5 Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um neuro-hormônio produzido principalmente pela glândula pineal, além de outros órgãos em menores quantidades, como a retina, cérebro, fígado, testículos, ovários e trato gastrointestinal, por exemplo, e apresentam uma ação local importante nesses órgãos extra-pineal que são sintetizadas (REITER et al., 2003; CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005). Quimicamente, a melatonina é um hormônio que pertence ao grupo das indolaminas, a qual é sintetizada a partir de um aminoácido essencial encontrado em proteínas, o triptofano. Devido ao seu pequeno tamanho e caráter lipofílico esse hormônio pode facilmente atravessar as barreiras biológicas, atingindo todos os compartimentos da célula por meio do processo de difusão (BOUTIN et al., 2005; ASGHARI et al., 2016).

Uma das características mais singulares da melatonina é seu ritmo circadiano em vertebrados, com seu pico secretório à noite e níveis baixos durante o dia. Sua secreção está diretamente relacionada com vários processos biológicos, regulação do ciclo circadiano de claro/escuro (sono/vigília), regulação do sistema imunológico, regulação cardiovascular, regulação da reprodução, homeostasia corpórea. Além dessas funções já mencionadas, a melatonina, também apresenta efeitos antitumorais em diferentes tipos de neoplasias, apresentando-se como uma molécula de elevado poder antioxidante (REITER et al., 2003; SOARES et al., 2003; CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005;

GONZALEZ et al., 2008; BHATTI et al., 2011; HARDELAND et al., 2011; BHATTI et al., 2014).

A via metabólica da biossíntese da melatonina envolve uma cascata de eventos que se inicia com a captação do aminoácido triptofano na corrente sanguínea pelos pinealócitos, o qual é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela ação da enzima triptofano-5-hidroxilase. O 5-hidroxitriptofano é descarboxilado pela ação da enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HTPD) formando assim a serotonina. A serotonina é convertida à N-cetilserotonina (NAS) por meio da reação de acetilação da enzima N-acetiltransferase (NAT). Por fim, a enzima citosólica hidroxindol-O-metiltransferase (ASOMT) catalisa a reação de conversão da N-acetilserotonina, que finalmente dará origem à melatonina (Figura 7) (CARPENTIERI et al., 2012).

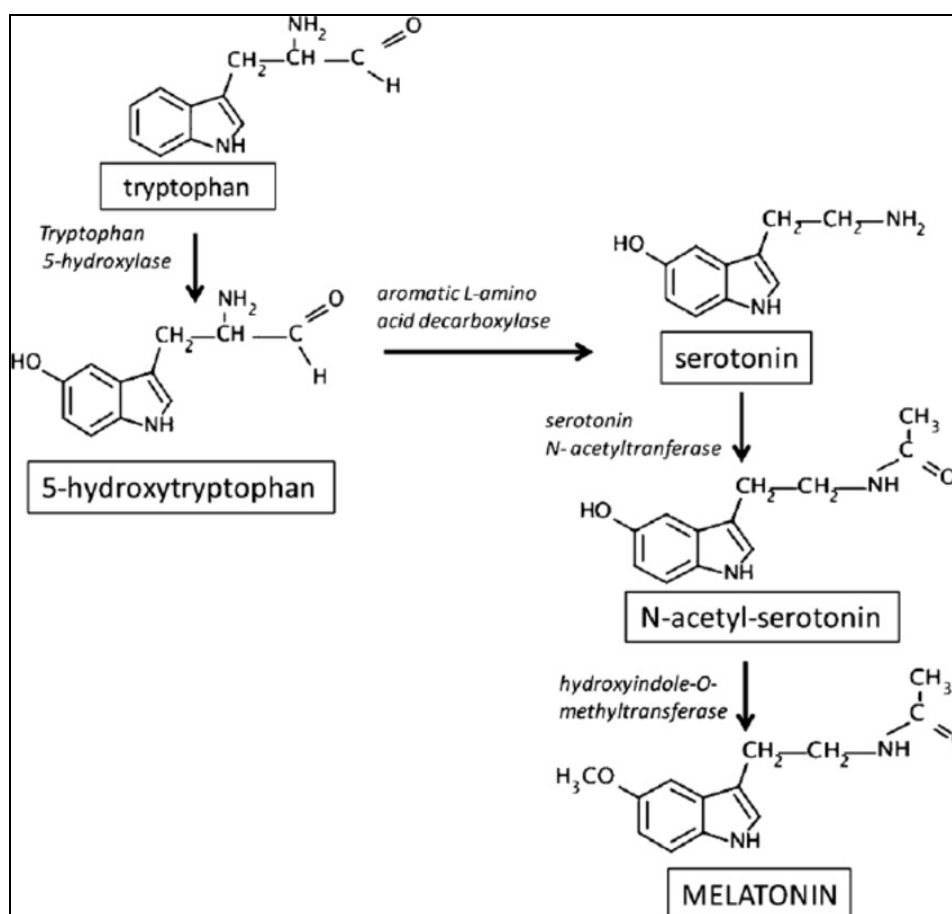


Figura 7. Via metabólica da síntese de melatonina. Adaptado de Carpentieri et al. (2012).

As duas principais vias de metabolização da melatonina ocorrem no fígado e cérebro, no entanto, a melatonina circulante é metabolizada principalmente no fígado, por meio de isoenzimas do sistema citocromo p450 (CYP1A1, CYP1A2 e possivelmente CYP2C19), através de uma via clássica de hidroxilação. As enzimas do sistema citocromo p450 são responsáveis por catalisar a formação de 6-hidroximelatonina, que sofre uma conjugação com o ácido glucurônico ou sulfato. Seu principal metabólito a ser excretado é o 6-sulfatoxi-melatonina. A excreção do 6-sulfatoxi-melatonina ocorre por meio da via renal. Sua vida média no organismo varia entre 30 e 60 minutos (CORDIOLI; GALLOIS; ISOLAN, 2015).

A melatonina pode alcançar facilmente diversos compartimentos celulares através da ação direta de mediadores específicos ou não. Existem três sítios de ligação para a melatonina no organismo, os receptores MT1, MT2 e MT3. Os receptores de alta afinidade MT1 e MT2 encontra-se presente em diversos órgãos e estão acoplados à proteína G. Estes receptores têm cerca de 350 e 362 aminoácidos de comprimento, respectivamente, com pesos moleculares calculados de 39kDA e 40kDA. O receptor MT3 pertence à família das enzimas quinona redutase 2. A família de receptores de melatonina ainda conta com um receptor órfão, o GPR50 (DUBOCOVICH et al., 2003; SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003; HADERLAND, 2013). Os tecidos dotados de receptores de melatonina funcionais MT1 e/ou MT2 totalmente caracterizados incluem, a retina, núcleo supraquiasmático, pars tuberalis, artérias cerebrais e periféricas, rim, fígado, coração, pâncreas, córtex adrenal, testículos, células imunes e demais órgãos. Essa produção extra pineal de melatonina por outros órgãos geralmente ocorre de forma não rítmica, sendo dependente de estímulos específicos, podendo atuar de maneira autócrina ou parácrina. Além da infinidade de locais em que a melatonina pode atuar, por ser uma molécula de natureza anfifílica, ela pode facilmente atravessar a membrana das células através de mecanismos de captação ativa ou não (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005; SALLINEN et al., 2005; HADERLAND, 2013).

2.5.1 Efeito protetor da melatonina contra agrotóxicos

A melatonina é considerada um potente eliminador de radicais livres devido a sua baixa toxicidade, boa biodisponibilidade em todos os órgãos do corpo, alta segurança no seu uso, e solubilidade desejável em fases orgânicas e aquosas. Estudos

têm confirmado que a melatonina é um agente promissor na minimização de lesões induzidas pelo uso de agrotóxicos (BHATTI; SIDHU; BHATTI, 2011; BHATT et al., 2014; DE ALMEIDA et al., 2016; ASGHARI et al., 2017). As altas concentrações de melatonina nas mitocôndrias é uma provável explicação para a sua capacidade de resistir ao estresse oxidativo e a apoptose celular. Há evidências confiáveis para sugerir que a melatonina deve ser classificada como um antioxidante de alvo mitocondrial (REITER et al., 2016).

O estresse oxidativo é o principal mecanismo através do qual os agrotóxicos exercem toxicidade nos indivíduos expostos. Acredita-se que o estresse celular ocorre quando os pesticidas induzem alterações no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, no sistema nervoso autônomo, nas citocinas e na ativação do eixo imunoneuroendócrino, gerando estresse oxidativo e levando ao comprometimento do metabolismo celular (ASGHARI et al., 2017). Bhatti, Sidhu e Bhatti (2011) confirmaram o efeito protetor de 10 mg/kg de melatonina exógena contra o estresse oxidativo induzido pela administração intraperitoneal de Atrazina (300 mg/kg) em eritrócitos de ratos, por um período de 21 dias.

Sarabia et al. (2011) avaliaram a capacidade espermática de ratos expostos a uma dose aguda do inseticida Diazinon, juntamente com uma administração prévia de melatonina (10 mg/kg), para investigar o seu papel antioxidante em células espermáticas. A administração de melatonina antes da exposição ao Diazinon evitou alterações dos parâmetros espermáticos analisados: contagem de espermatozoides, morfologia das células espermáticas e diminuição nos níveis de peroxidação lipídica.

O tratamento em conjunto de 25 mg/kg de Diazinon e melatonina reduziu o estresse oxidativo e o comportamento de ansiedade provocado pelo inseticida em questão. Os animais diminuíram os níveis de malondialdeído (MDA) e fator de necrose tumoral (TNF- α), e aumentou atividade da enzima glutathione peroxidase cerebral, corroborando para o seu papel antioxidante (AHMED; AHMED; EL-MORSY, 2011). Estudos comprovam que a coadministração com melatonina diminui os danos no sistema nervoso provocados por inseticidas. A melatonina foi capaz de reduzir a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, consequentemente, aumentam o estresse oxidativo levando à oxidação de lipídios e proteínas, dano a molécula de DNA e apoptose (GHAYOM et al., 2015).

Os efeitos antioxidantes da melatonina contra os danos provocados pela administração do inseticida metomil ainda não são bem esclarecidos na literatura. Popovska-Gorevsk et al (2017) apontam para um novo mecanismo de ação envolvendo alguns inseticidas pertencentes à classe química dos carbamatos e a melatonina. Esse mecanismo de ação pode provocar alterações do equilíbrio homeostático dos principais processos reguladores, como o mecanismo de defesa antioxidante, por meio da ligação direta dos inseticidas aos receptores de melatonina nas células. Alguns carbamatos, como são o caso do carbaril e carbofurano, apresentam uma alta afinidade aos receptores de membrana da melatonina (MT1 e MT2), com uma maior preferência ao receptor MT2, afetando a sinalização da melatonina na célula e dessa maneira reduzindo o seu efeito antioxidante (POPOVSKA-GOREVSK et al., 2017).

Já o efeito protetor da melatonina exógena contra a toxicidade induzida pela exposição à cipermetrina é relatado em alguns poucos estudos com modelos animais na fase adulta (BHATTI et al., 2014; IDRIS; AMBALI; AYO, 2012; IDRIS; AMBALI; SULEIMAN, 2017). Danos cerebrais provocados pela cipermetrina foram minimizados pelo tratamento conjunto com a melatonina por um período de 12 semanas (IDRIS; AMBALI; SULEIMAN, 2017). Bhatti et al. (2014) constataram o papel protetor da melatonina na dose de 10 mg/kg contra a hepatotoxicidade induzida pelo consumo de 25 mg/kg de cipermetrina. A coadministração da melatonina por meio da via oral durante quatro semanas foi capaz de reduzir os danos oxidativos no tecido hepático.

2.6 Bioensaios utilizados na detecção de danos na molécula de DNA

A homeostase de um sistema biológico pode ser perturbada pela exposição a substâncias mutagênicas, que afetam vários processos vitais, como a replicação do DNA e a transcrição gênica. Essas substâncias capazes de causar lesões no material genético são conhecidas como genotóxicas e podem ser potencialmente mutagênicas ou cancerígenas, especialmente aquelas que causam mutação genética contribuindo para o desenvolvimento de tumores (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006; GREIM; ALBERTINI, 2015).

No organismo existem diferentes mecanismos e estratégias para suportar ou até mesmo consertar os efeitos causados no material genético das células em decorrência da exposição à agentes mutagênicos. No entanto, quando os danos não são removidos

resultam no aparecimento de desordens no genoma, as mutações, que podem ser transmitidas através de várias gerações, causar apoptose e/ou necrose, ou até mesmo levar a morte celular (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006; GREIM; ALBERTINI, 2015). A utilização de bioensaios, como o ensaio cometa e teste do micronúcleo, para auxiliar na detecção de danos no material genético tem permitido o conhecimento de uma ampla gama de agentes químicos e/ou naturais com potencial genotóxico e mutagênico (BÜCKER; CARVALHO; ALVES-GOMES, 2006; BENEDETTI et al., 2013; GUANGGANG et al., 2013; GOLDONI et al., 2014; ZALATA et al., 2014; CARBAJAL-LÓPEZ et al., 2016; OKONKO; IKPEME; UDENSI, 2016; DE QUADROS et al., 2017).

2.6.1 Ensaio cometa ou eletroforese de gel em célula única

Durante a última década, o ensaio cometa vem se tornando uma ferramenta cada vez mais usada por investigadores interessados em áreas de pesquisa que variam de humano à biomonitoramento ambiental. O ensaio cometa ou também denominado de eletroforese em gel de célula única, é uma técnica relativamente rápida e de grande sensibilidade para medir a quebra de DNA em células individuais de mamíferos (MCKELVEY-MARTIN et al., 1993; TICE et al., 2000). Foi inicialmente realizado no ano de 1984 e posteriormente modificado por Singh e colaboradores em 1988. Ostling e Johanson (1984) foram os primeiros a desenvolver uma técnica de eletroforese de microgel para detectar danos no DNA ao nível de célula única. Em sua técnica, as células inseridas em agarose foram colocadas em uma lâmina de microscópio, e em seguida, as células foram lisadas por detergentes e sal elevado, e as moléculas de DNA submetidas a eletroforese sob condições neutras. Células com uma maior frequência de quebras de fita dupla de DNA apresentaram maior migração de DNA para o ânodo (MCKELVEY-MARTIN et al., 1993; TICE et al., 2000).

A nova proposta do ensaio cometa realizada por Singh e colaboradores no ano de 1988 foi em condições alcalinas, com um pH >13, para detectar os danos no DNA de células individuais. As células em estudo são inicialmente misturadas em gel de agarose sob uma lâmina de microscopia e lisadas com detergente e soluções salinas para a lise celular. Este procedimento permite a desespiralização do DNA e a liberação dos fragmentos por meio de soluções alcalinas. Posteriormente, as lâminas são submetidas à

eletroforese para migração dos fragmentos de DNA e detecção de danos ao material genético analisado com base no comprimento da cauda (Figura 8). Esta nova versão do ensaio permitiu um refinamento da técnica, com uma maior sensibilidade para a identificação dos agentes genotóxicos (MCKELVEY-MARTIN et al., 1993; TICE et al., 2000; HARTMANN et al., 2003).

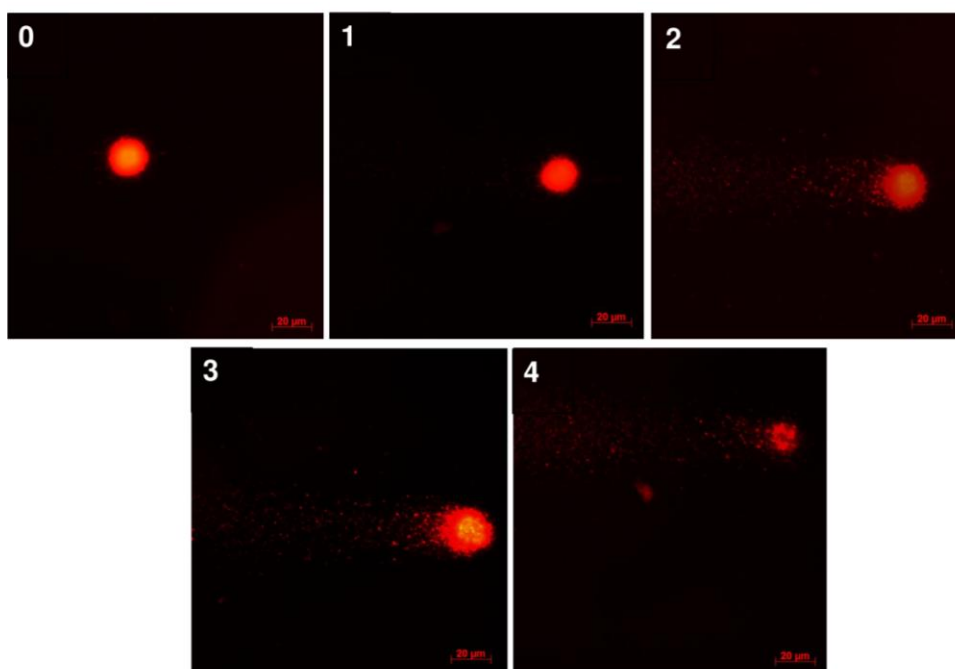


Figura 8. Classes de danos do ensaio cometa proveniente de linfócitos de acordo com a quantidade e tamanho de fragmentos de DNA. Dano 0 (sem dano); dano 1 (pouco dano evidenciado); dano 2 (dano moderado); dano 3 (dano moderado com material mais disperso); 4 (dano máximo). Adaptado de própria autoria, 2018.

Em Comparação com outros ensaios de genotoxicidade, a técnica apresenta diversas vantagens em relação a outros testes mutagênicos já testados, que incluem: maior sensibilidade para detectar baixos níveis de danos no DNA; exigência de pequenos números de células por amostra; baixo custo; maior facilidade de aplicação; e um período relativamente curto (alguns dias) necessário para a obtenção de resultados. Mesmo com o passar do tempo, esta técnica continua a ser útil em diversas áreas de pesquisa científica e monitoramento populacional (TICE et al., 2000; LEE; STEINERT, 2003). Diversos trabalhos na literatura já utilizam a técnica, tanto in vitro, quanto in vivo, em várias espécies de modelo animal: Peixes (GADHIA; PRAJAPATI; GADHIA,

2016), Ratos (DE SOUSA COELHO et al., 2018), Camundongos (MATSUYAMA; KITAMOTO; TOMIGAHARA, Y 2018), Drosophila (OLAKKARAN et al., 2018) e outros.

2.6.2 Teste do micronúcleo

Muitas substâncias apresentam capacidade mutagênica interferindo no processo de divisão celular. O teste do micronúcleo é um teste citogenético, que consiste na investigação de células previamente expostas a esses agentes mutagênicos, com a finalidade de detectar possíveis alterações cromossômicas. O princípio do teste é um aumento da frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleos na célula investigada (Figura 9). Preferencialmente, para a análise da frequência dos micronúcleos se utiliza células de mamíferos provenientes da medula óssea ou sangue periférico. O teste do micronúcleo, assim como o teste cometa, é considerado bastante confiável nos métodos citogenéticos (FLORES; YAMAGUCHI, 2009).

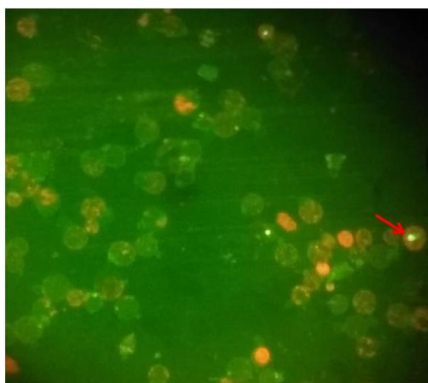


Figura 9. Eritrócito policromático micronucleado (seta vermelha). Adaptado de própria autoria, 2018.

O processo de formação de micronúcleos pode ser originado através dos efeitos clastogênicos e aneugênicos durante a divisão celular. Cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal da célula (aneugênese), ou até mesmo fragmentos de cromossomos acêntricos (clastogênese), podem permanecer no citoplasma da célula durante a divisão celular e ser envolvido por um envoltório nuclear, adquirindo características semelhantes às do núcleo principal, com exceção do seu tamanho menor, originando assim, o micronúcleo (ARALDI et al., 2015) (Figura 10).

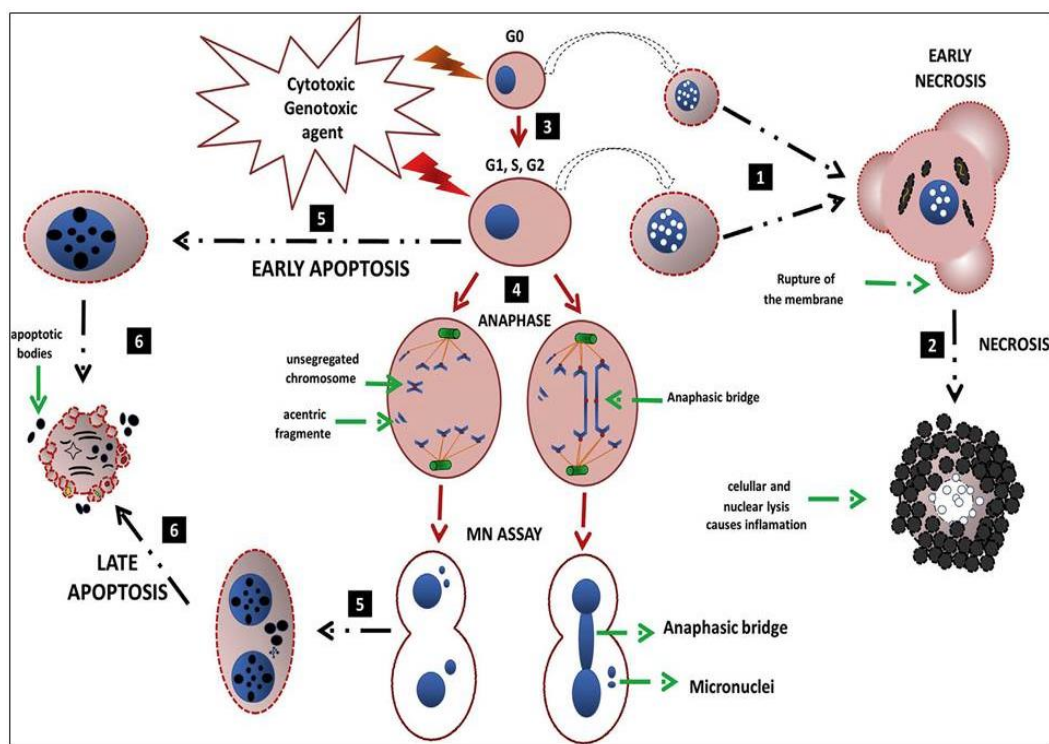


Figura 10. Diferentes vias de drogas mutagênicas. (1) Agentes citotóxicos induzem uma fase de necrose precoce, (2) que evolui para uma necrose. (3) Agentes genotóxicos induzem danos ao DNA durante a fase G0 a S, (5) e pode induzir a apoptose, (6) resultando na formação de corpos apoptóticos, durante a apoptose tardia ou, (4) resultando em danos cromossômicos, resultando em formação de micronúcleos através das quebras cromossômicas e/ou ruptura do aparato mitótico. (5 e 6) Células micronucleadas podem ser destinadas à apoptose. Adaptado de Araldi et al. (2015).

O termo micronúcleo foi introduzido em 1951 relacionado a fragmentos acêntricos expelidos do núcleo principal das células em estágios tardios da anáfase, sendo também conhecido como corpúsculos de Howell-Jolly. Somente no ano de 1970, Boller e Schmid, propuseram os micronúcleos como um teste de citogenética e empregaram em eritrócitos policromáticos de medula óssea e linfócitos. Quando comparados com outros testes aneugênicos e clastogênicos o teste do micronúcleo apresenta diversas vantagens em relação aos demais, pois incluem um baixo custo no procedimento realizado e rapidez nas análises (FLORES; YAMAGUCHI, 2009; ARALDI et al., 2015). Diversos trabalhos com agrotóxicos mostram a eficiência do teste na detecção de efeitos mutagênicos (PASTOR et al., 2003; KOCAMAN;

TOPAKTAŞ, 2010; DE CASTILHOS GHISI; DE OLIVEIRA; PRIOLI, 2016; DE SOUSA COELHO et al., 2018; ACOBSEN-PEREIRA et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o efeito protetor da melatonina exógena em neonatos nascidos de matrizes submetidas às formulações comerciais dos inseticidas metomil e cipermetrina com base na ingestão diária aceitável.

3.2. Específicos

- Avaliar os danos genotóxicos nas células do sangue e fígado das matrizes e, dos neonatos, bem como no cérebro dos neonatos, por meio do ensaio cometa.
- Verificar a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos no sangue periférico das matrizes e dos neonatos;
- Analisar alterações histopatológicas no fígado das matrizes;
- Analisar alterações nos hepatócitos e células de Kupffer através de métodos morfométricos.
- Quantificar a expressão a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e interleucina-1 (IL-1 β) no fígado das matrizes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALIS, I. M.; ELDEFRAWI, M. E.; ELDEFRAWI, A. T. Effects of insecticides on GABA-induced chloride influx into rat brain microsacs. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues**, v. 18, n. 1, p. 13-23, 1986.

AHMED, M. A.; AHMED, H. I.; EL-MORSY, E. M. Melatonin protects against diazinon-induced neurobehavioral changes in rats. **Neurochemical research**, v. 38, n. 10, p. 2227-2236, 2013.

AKTAR, M. W.; ALAM, S.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Degradation dynamics of an oxime carbamate insecticide (methomyl) in aqueous medium of varying pH under laboratory simulated condition. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 225, 2011.

ANDERSEN, H. R.; VINGGAARD, A. M.; RASMUSSEN, T. H. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 179, n. 1, p. 1-12, 2002.

ARAGÃO, C. W. S. A ausência de norma que regulamenta o uso de adjuvantes agrícolas no Brasil, em afronta ao princípio da precaução ambiental. **Revista Jus Navigandi, Teresina**, v. 22, n. 4986, 2017. Disponível em: <https://jus.com.br/artigos/55894>. Acesso em: 15/05/ 2018.

ARALDI, R. P.; DE MELO, T. C.; MENDES, T. B.; DE SÁ JÚNIOR, P. L.; NOZIMA, B. H. N.; ITO, E. T.; DE CASSIA STOCCO, R. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74-82, 2015.

ASGHARI, M. H.; MOLOUDIZARGARI, M.; BAHADAR, H.; ABDOLLAHI, M. A review of the protective effect of melatonin in pesticide-induced toxicity. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v.13, n. 5, p. 545-554, 2017.

ASSAYED, M. E.; KHALAF, A. A.; SALEM, H. A. Protective effects of garlic extract and vitamin C against in vivo cypermethrin-induced teratogenic effects in rat offspring. **Food and Chemical toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3153-3158, 2010.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 361-3, 2006.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Listas de ingredientes ativos com uso autorizado e banidos no Brasil**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/consulta-publicasobreavaliacaotoxicologi/219201?p_p_auth=SVg00k0T&inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp_p_auth%3DSVg00k0T%26p_p_id%3D101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_s

tate%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-3%26p_p_col_count%3D3. Acesso em: 13/03/2017.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice monográfico: M17 – Metomil - Anvisa.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/M17%2B%2BMetomil.pdf/35b28b22-55bc-4088-8c0e-946684ffcb98>. Acesso em: 20/05/2018.

ARAÚJO, A. J. D.; LIMA, J. S. D.; MOREIRA, J. C.; JACOB, S. D. C.; SOARES, M. D. O.; MONTEIRO, M. C. M.; NEVES, C. D. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p.115-130, 2007.

ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. D. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase-AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818-1834, 2016.

BALSAN, R. Impactos decorrentes da modernização da agricultura brasileira. In: Campo e território: **Revista de Geografia Agrária. Rio Grande**, v. 1, n. 2, p. 123-151, 2006.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. **Fundamentos de Toxicologia**. Editora Atheneu, ed. 3, p. 59-71, 2008.

BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Editora Guanabara Koogan, ed. 2, p. 566-574, 2003.

BENEDETTI, D.; NUNES, E.; SARMENTO, M.; PORTO, C.; DOS SANTOS, C. E. I.; DIAS, J. F.; DA SILVA, J. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 752, n. 1, p. 28-33, 2013.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340, 2006.

BHATTI, G. K.; SIDHU, I. P. S.; SAINI, N. K.; PUAR, S. K.; SINGH, G.; BHATTI, J. S. Ameliorative role of melatonin against cypermethrin induced hepatotoxicity and impaired antioxidant defense system in Wistar rats. **IOSR J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol**, v. 8, n. 1, p. 39-48, 2014.

BHATTI, J. S.; SIDHU, I. P. S.; BHATTI, G. K. Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 353, n. 1-2, p. 139-149, 2011.

BOUTIN, J. A.; AUDINOT, V.; FERRY, G.; DELAGRANGE, P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. **Trends in pharmacological sciences**, v. 26, n. 8, p. 412-419, 2005.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução CONAMA Nº 430 de 13 de maio de 2011. **Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357**, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Ministério do Meio Ambiente, DF, 13 maio 2011. Nº 92, de 16/05/2011, pág. 89. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>. Acesso em: 13/03/2017.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. **Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.** Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em: 14/03/2017.

BRASIL. Decreto nº 7.802, de 11 de julho de 1989. **Dispõe sobre a pesquisa, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.** Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm. Acesso em: 13/03/2017.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliation of mutagenicity and gentotoxicity in *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) exposed to benzene. **Acta amazonica**, v. 36, n. 3, p. 357-364, 2006.

BYARD, J. L.; PAULSEN, S. C.; TJEERDEMA, R. S.; CHIAVELLI, D. DDT, Chlordane, Toxaphene and PCB residues in newport bay and watershed: assessment of hazard to wildlife and human health. **In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 235, p. 49-168, 2015.

CANTARUTTI, T. F. P.; DE ARAÚJO, S. L.; ROSSI, S. C.; DALSENTER, P. R. Resíduos de Pesticidas em Alimentos. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 18, n. 1, p.9-16, 2008.

CARAPETO, C. **Poluição das águas**. Lisboa. Editora Universidade Aberta, p. 1-233, 1999.

CARBAJAL-LÓPEZ, Y.; GÓMEZ-ARROYO, S.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; CALDERÓN-SEGURA, M. E.; MARTÍNEZ-ARROYO, A. Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 3, p. 2513-2520, 2016.

CARNEIRO, F. F.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. D. S.; FRIEDRICH, K.; BURIGO, A. C. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro; Abrasco, p. 623, 2015.

CARPENTIERI, A.; DE BARBOZA, G. D.; ARECO, V.; LÓPEZ, M. P.; DE TALAMONI, N. T. New perspectives in melatonin uses. **Pharmacological research**, v. 65, n. 4, p. 437-444, 2012.

CASSAL, V. B.; DE AZEVEDO, L. F.; FERREIRA, R. P.; DA SILVA, D. G.; SIMÃO, R. S. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 437-445, 2014.

ÇELIK, A.; MAZMANCI, B.; ÇAMLICA, Y.; ÇÖMELEKOĞLU, Ü.; AŞKIN, A. Evaluation of cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow by gavage administration. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 61, n. 1, p. 128-133, 2005.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Conama adota novas regras para embalagem de agrotóxicos**. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2014/11/conama-adota-novas-regras-para-embalagem-de-agrotoxicos>. Acesso em: 14/05/2018.

CORBETT, J. R.; WRIGHT, K.; BAILLE, A. C. **The Biochemical Mode of Action of Pesticides**, ed. 2a, Academic Press: New York, 1984.

CHARPENTIER, A.; FOURNIER, D. Levels of total acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster* in relation to insecticide resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 70, n. 2, p. 100-107, 2001.

DE CASTILHOS GHISI, N.; DE OLIVEIRA, E. C.; & PRIOLI, A. J. Does exposure to glyphosate lead to an increase in the micronuclei frequency? A systematic and meta-analytic review. **Chemosphere**, v. 145, p. 42-54, 2016.

DE REZENDE CHRISMAN, J.; KOIFMAN, S.; DE NOVAES SARCINELLI, P.; MOREIRA, J. C.; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. Pesticide sales and adult male cancer mortality in Brazil. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 212, n. 3, p. 310-321, 2009.

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep medicine reviews**, v. 9, n. 1, p. 11-24, 2005.

COLLINS, P.; CAPELLO, S. Cypermethrin toxicity to aquatic Life: Bioassays for the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 79–85, 2005.

CORDIOLI, A. V.; GALLOIS, C. B.; ISOLAN, L. **Psicofármacos: Consulta Rápida**. Artmed Editora, 2015.

DA SILVA, V. D. S. P.; DE MELLO, M. S. C.; OTERO, U. B. Exposure to pesticides and mental disorders in a rural population of Southern Brazil. **NeuroToxicology**, DOI:10.1016/j.neuro.2016.06.002, v. 56, p. 7-16, 2016.

DA SILVA FILHO, J.; AVELINO, A. M.; ALBUQUERQUE, I. M. A. N.; PINTO, V. D. P. T. INTOXICAÇÃO ALIMENTAR PROVOCADA POR CONSUMO DE TAPIOCAS CONTAMINADAS COM CARBAMATO EM SOBRAL, CEARÁ, BRASIL. **SANARE-Revista de Políticas Públicas**, v. 7, n. 1, p. 50-56, 2008.

D AMATO, C.; TORRES, J. P.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental-uma revisão. **Química Nova**, v. 25, n. (6/A), p. 995-1002, 2002.

DAVIES, T. G. E.; FIELD, L. M.; USHERWOOD, P. N. R.; WILLIAMSON, M. S. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. **IUBMB Life, London**, v. 59, n. 3, p. 151-162, 2007.

DE ALMEIDA, L. L.; TEIXEIRA, Á. A.; BEZERRA, N. S.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V. Efeito protetor da melatonina sobre intoxicações por herbicidas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 3, p. 174-180, 2016.

DE MM BOCCOLINI, P.; BOCCOLINI, C. S.; DE REZENDE CHRISMAN, J.; MARKOWITZ, S. B.; KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. Pesticide use and non-Hodgkin's lymphoma mortality in Brazil. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 216, n. 4, p. 461-466, 2013.

DE QUADROS, A. P. O.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A.; PERAZZO, F. F.; ROSA, P. C. P.; MAISTRO, E. L. Fruit extract of the medicinal plant *Crataegus oxyacantha* exerts genotoxic and mutagenic effects in cultured cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, p. 1-10, 2017.

DE SOUSA COELHO, I. D. D.; NETO, C. J. C. L.; DOS SANTOS SOUZA, T. G.; DA SILVA, M. A.; CHAGAS, C. A.; DOS SANTOS, K. R. P.; & TEIXEIRA, Á. A. C. Protective Effect Of Exogenous Melatonin In Rats And Their Offspring On The Genotoxic Response Induced By The Chronic Consumption Of Alcohol During Pregnancy. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 2018.

DIAS, E.; E COSTA, F. G.; MORAIS, S.; DE LOURDES PEREIRA, M. A. Review on the Assessment of the Potential Adverse Health Impacts of Carbamate Pesticides, **Topics in Public Health**, DOI: 10.5772/59613, 2015.

DJEFFAL, A.; MESSARAH, M.; BOUMENDJEL, A.; KADECHE, L.; FEKI, A. E. Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats. **Toxicology and industrial health**, v. 31, n. 1, p. 31-43, 2015.

DOS SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides—uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.

DUBOCOVICH, M. L.; RIVERA-BERMUDEZ, M. A.; GERDIN, M. J.; MASANA, M. I. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 8, p. d1093-108, 2003.

DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT 1 and MT 2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine**, v. 27, n. 2, 101-110, 2005.

DUPONT. **Lannate® BR – Bula- DuPont**. Disponível em: http://www.dupont.com.br/content/dam/dupont/products-and-services/crop-protection/documents/pt_br/LannateBR_Bula.pdf. Acesso em: 20/05/2018.

EL-DEMERDASH, F.; DEWER, Y.; ELMAZOU DY, R. H.; ATTIA, A. A. Kidney antioxidant status, biochemical parameters and histopathological changes induced by methomyl in CD-1 mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 6, p. 897-901, 2013.

ERASLAN, G.; KANBUR, M.; SILICI, S.; ALTINORDULU, S.; KARABACAK, M. Effects of cypermethrin on some biochemical changes in rats: the protective role of propolis. **Experimental animals**, v. 57, n. 5, p. 453-460, 2008.

ESPINOSA, G. J.; THIEL, R. Resíduos de insecticidas organoclorados en productos nacionales. **Revista médica de Panamá**, v. 13, n. 2, p. 111-4, 1988.

FAO, **Plant Production and Protection**. Paper 72/2, 1986.

FARAG, A. T.; KARKOUR, T. A. Z.; OKAZY, A. E. Embryotoxicity of oral administered chlorothalonil in mice. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 77, n. 2, p. 104-109, 2006.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. G.; FACCHINI, L. A. Intoxicação por agrotóxicos no Brasil: os sistemas oficiais de informação e desafios para realização de estudos epidemiológicos. **Ciência & Saúde Coletiva, Rio de Janeiro**, v. 12, n. 1, p. 25-38, 2007.

FARRÉ, M.; FERNANDEZ, J.; PAEZ, M.; GRANADA, L.; BARBA, L.; GUTIERREZ, H.; BARCELO, D. Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 373, n. 8, p. 704-709, 2002.

FELEMA, J.; RAIHER, A. P.; FERREIRA, C. R. Agropecuária Brasileira: desempenho regional e determinantes de produtividade. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 51, n. 3, p. 555-573, 2013.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2009.

FERRARO, S.M.; LÓPEZ-ORTEGA, A. Actividad antioxidante de la melatonina sobre el hígado graso inducido por etionina em ratones. **Archivos de Medicina Veterinaria**. v. 40, n.1, p. 51-57, 2008.

FRANK, A. L.; MCKNIGHT, R.; KIRKHORN, S. R.; GUNDERSON, P. Issues of agricultural safety and health Annual. **Review of Public Health**, v. 25, p. 25-45, 2004.

GADHIA, M.; PRAJAPATI, R.; GADHIA, P. Cypermethrin induced DNA damage in Labio Rohita assessed by comet assay. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 6, n. 6, p. 1113-1116, 2016.

GALINDO, F; PORTILHO, F. “O Peixe Morre pela Boca”: Como os Consumidores Entendem os Riscos dos Agrotóxicos e dos Transgênicos na Alimentação. **Sustentabilidade em Debate**, v. 6, n. 2, p. 73-87, 2015.

GARCIA, E. G.; BUSSACOS, M. A.; FISHER, F. M. Impacto da legislação no registro de agrotóxicos de maior toxicidade no Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 39, n. 5, p. 832-9. 2005.

GIRAY, B.; GÜRBAY, A.; HINCAL, F. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. **Toxicology letters**, v. 118, n. 3, p. 139-146, 2001.

GOLDONI, A., KLAUCK, C. R., DA SILVA, S. T., DA SILVA, M. D., ARDENGHI, P. G., & DA SILVA, L. B. DNA damage in Wistar rats exposed to dithiocarbamate pesticide mancozeb. **Folia biologica**, v. 60, n 4, p. 202, 2014.

GONZALEZ, A.; COS, S.; MARTINEZ-CAMPA, C.; ALONSO-GONZALEZ, C.; SANCHEZ-MATEOS, S.; MEDIIVILLA, M. D.; SANCHEZ-BACELO, E. J. Selective estrogen enzyme modulator actions of melatonin in human breast cancer cells. **Journal of pineal research**, v. 45, n. 1, p. 86-92, 2008.

GHORZI, H.; MERZOUK, H.; HOCINE, L.; MERZOUK, S. A. Long term biochemical changes in offspring of rats fed diet containing alpha-cypermethrin. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 142, p. 133-140, 2017.

GUANGGANG, X.; DIQIU, L.; JIANZHONG, Y.; JINGMIN, G.; HUIFENG, Z.; MINGAN, S.; LIMING, T. Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction. **Food and chemical toxicology**, v. 53, p. 352-358, 2013.

GHAYOMI, F.; NAVAEI-NIGJEH, M.; BAEERI, M.; REZVANFAR, M. A.; ABDOLLAHI, M. A mechanistic approach for modulation of chlorpyrifos-induced toxicity in human lymphocytes by melatonin, coenzyme Q10, and vinpocetine. **Human & experimental toxicology**, v. 35, n. 8, p. 839-850, 2016.

GREIM, H; ALBERTINI, R J. Cellular response to the genotoxic insult: the question of threshold for genotoxic carcinogens. **Toxicology Research**, v. 4, n. 1, p.36-45, 2015

GUO, J.; XU, J.; ZHANG, J.; AN, L. . Alteration of mice cerebral cortex development after prenatal exposure to cypermethrin and deltamethrin. **Toxicology letters**, v. n. 287, p. 1-9, 2018.

HARDELAND, R.; CARDINALI, D. P.; SRINIVASAN, V.; SPENCE, D. W.; BROWN, G. M.; PANDI-PERUMAL, S. R. Melatonin—A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 350-384, 2011.

HARDELAND, R. Chronobiology of melatonin beyond the feedback to the suprachiasmatic nucleus—consequences to melatonin dysfunction. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 3, p. 5817-5841, 2013.

HASAN, A. B.; EL-HADY, K. A.; EL-MENOUFY, A. F.; SOBBHY, H. M. Effect of methomyl on fetal development and male fertility in rats. **Bulletin of Animal Health and Production in Africa**, v. 38, n. 3, p. 229-232, 1990.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; TICE, R. R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HANSEN, W. F.; YANKIWITZ, Therapy for medical discords during pregnancy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 45, n. 1, p. 136-152, 2002.

HARADA, T.; TAKEDA, M.; KOJIMA, S.; TOMIYAMA, N. Toxicity and Carcinogenicity of Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). **Toxicological research**, v. 32, n. 1, p. 21, 2016.

HEIKAL, T. M. Antioxidant potentials of Origanum majorana leaves extract against reproductive toxicity and apoptosis-related gene expression resulted from methomyl exposure in male rat. **Planta Medica**, v. 81, n. 16, p. PM_13, 2015.

HENAO, H.; COREY, G. **Plaguicidas organofosforados y carbámicos**, (Vol. 2). ECO, 1986.

HERNÁNDEZ, A. F.; LACASAÑA, M.; GIL, F.; RODRÍGUEZ-BARRANCO, M.; PLA, A.; LÓPEZ-GUARNIDO, O. Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene–environment interaction perspective. **Toxicology**, v. 307, p. 95-102, 2013.

HOCINE, L.; MERZOUK, H.; MERZOUK, S. A.; GHORZI, H.; YOUNBI, M.; NARCE, M. The effects of alpha-cypermethrin exposure on biochemical and redox parameters in pregnant rats and their newborns. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 134, p. 49-54, 2016.

HU, J. X.; LI, Y. F.; LI, J.; PAN, C.; HE, Z.; DONG, H. Y.; XU, L. C. Toxic effects of cypermethrin on the male reproductive system: with emphasis on the androgen receptor. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 576-585, 2013.

HUHTANEN, K.; DOROUGH, H. W. Isomerization and Beckmann rearrangement reactions in the metabolism of methomyl in rats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 6, n. 6, p. 571-583, 1976.

HUTSON, DAVID H.; GAUGHAN, LORETTA C.; CASIDA, JOHN E. Metabolism of the cis-and trans-isomers of cypermethrin in mice. **Pest Management Science**, v. 12, n. 4, p. 385-398, 1981.

IDRIS, S. B.; AMBALI, S. F.; SULEIMAN, M. M. Ameliorative effects of melatonin on brain biochemical changes induced by subchronic co-administration of chlorpyrifos and cypermethrin in male Wistar rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2017.

IDRIS, S. B.; AMBALI, S. F.; AYO, J. O. Cytotoxicity of chlorpyrifos and cypermethrin: The ameliorative effects of antioxidants. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 99, p. 16461-16467, 2012

JACOBSEN-PEREIRA, C. H.; DOS SANTOS, C. R.; MARASLIS, F. T.; PIMENTEL, L.; FEIJÓ, A. J. L.; SILVA, C. I.; MALUF, S. W. Markers of genotoxicity and oxidative stress in farmers exposed to pesticides. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 148, p. 177-183, 2018.

JAENSSON, A.; SCOTT, A. P.; MOORE, A.; KYLIN, H.; OLSÉN, K. H. Effects of a pyrethroid pesticide on endocrine responses to female odours and reproductive behavior in male parr of brown trout (*Salmo trutta* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 81, n. 1, p. 1-9, 2007.

JOKANOVIC M. Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides, **Toxicology Letters**, v. 190, n. 2, p. 107-115, 2009.

KALE, M.; RATHORE, N.; JOHN, S.; BHATNAGAR, D. Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. **Toxicology letters**, v. 105, n. 3, p. 197-205, 1999.

KANBUR, M.; SILIĞ, Y.; ERASLAN, G.; KARABACAK, M.; SARICA, Z. S.; ŞAHİN, S. The toxic effect of cypermethrin, amitraz and combinations of cypermethrin-amitraz in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 6, p. 5232-5242, 2016.

KARAMIAN, A., SHOKRZADEH, M., & AHMADI, A. The potential chemoprotective effects of melatonin against genotoxicity induced by diazinon in human peripheral blood lymphocytes. **Toxicology and industrial health**, v. 32, n. 2, p. 360-366, 2016.

KARAOZ, E.; GULTEKIN, F.; AKDOĞAN, M.; ONCU, M.; GOKCIMEN, A. Protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on lung toxicity induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 54, n. 2, p. 97-108, 2002.

KAUR, M.; SANDHIR, R. Comparative effects of acute and chronic carbofuran exposure on oxidative stress and drug-metabolizing enzymes in liver. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 29, n. 4, p. 415-421, 2006.

KHATAB, A. E.; HASHEM, N. M.; EL-KODARY, L. M.; LOTFY, F. M.; HASSAN, G. A. Evaluation of the Effects of Cypermethrin on Female Reproductive Function by Using Rabbit Model and of the Protective Role of Chinese Propolis. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 29, n. 10, p. 762-766, 2016.

KINOSHITA, H.; TANAKA, N.; JAMAL, M.; KUMIHASHI, M.; OKUZONO, R.; TSUTSUI, K.; AMENO, K. Application of energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDX) in a case methomyl ingestion. **Forensic Science International**, v. 227, n. 1, p. 103-105, 2013.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)**. AMGH Editora, 2009.

KOCAMAN, A. Y.; TOPAKTAŞ, M. Genotoxic effects of a particular mixture of acetamiprid and α -cypermethrin on chromosome aberration, sister chromatid exchange, and micronucleus formation in human peripheral blood lymphocytes. **Environmental Toxicology: An International Journal**, v. 25, n. 2, p. 157-168, 2010.

KRAWCZYK, N.; MEYER, A.; FONSECA, M.; LIMA, J. Suicide mortality among agricultural workers in a region with intensive tobacco farming and use of pesticides in Brazil. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 56, n. 9, p. 993-1000, 2014.

KUHR, R. J.; DOROUGH, H. W. **Carbamate insecticides: chemistry, biochemistry and toxicology**, CRC Press, Boca Raton, 1976.

KUMAR SINGH, A.; NATH TIWARI, M.; PRAKASH, O.; PRATAP SINGH, M. A current review of cypermethrin-induced neurotoxicity and nigrostriatal

dopaminergic neurodegeneration. **Current neuropharmacology**, v. 10, n. 1, p. 64-71, 2012.

LAUGERAY, A.; HERZINE, A.; PERCHE, O.; RICHARD, O.; MONTECOT-DUBOURG, C.; MENUET, A.; MORTAUD, S. In utero and lactational exposure to low-doses of the pyrethroid insecticide cypermethrin leads to neurodevelopmental defects in male mice—An ethological and transcriptomic study. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0184475, 2017.

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

LEE, B. K.; JEUNG, K. W.; LEE, H. Y.; JUNG, Y. H. Mortality rate and pattern following carbamate methomyl poisoning. Comparison with organophosphate poisoning of comparable toxicity. **Clinical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 828-833, 2011.

LEE, D. K.; CHO, N. H.; KIM, O. H.; GO, J.; KIM, T. H.; CHA, K. C.; CHA, Y. S. Evaluation of cardiac function using transthoracic echocardiography in patients with myocardial injury secondary to methomyl poisoning. **Cardiovascular toxicology**, v. 15, n. 3, p. 269-275, 2015.

LEMONICA, I. P.; OGA, S.; CAMARGO, M. M. A AND BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 3 ed., p. 59-71, 2008.

LO, W. Y.; FRIEDMAN, M. Teratogenicity of recently induced medication in human pregnancy. **Obstetrics e Gynecology**, v. 100, n. 3, p. 464-473, 2002.

LU, X.; HEE, S. S. Q. Permeation of methomyl in Lannate L™ through nitrile gloves. **Journal of hazardous materials**, v. 59, n. 2, p. 279-285, 1998.

MCKELVEY-MARTIN, V. J.; GREEN, M. H. L.; SCHMEZER, P.; POOL-ZOBEL, B. L.; DE MEO, M. P.; COLLINS, A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 288, n. 1, p. 47-63, 1993.

MADU, E. P. Teratogenic and embryotoxic effects of orally administered cypermethrin in pregnant albino rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 7, n. 7, p. 60-67, 2015.

MALATO, S.; BLANCO, J.; CÁCERES, J.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; AGÜERA, A.; RODRIGUEZ, A. Photocatalytic treatment of water-soluble pesticides by photo-Fenton and TiO₂ using solar energy. **Catalysis Today**, v. 76, n. 2, p. 209-220, 2002.

MANNA, S.; BHATTACHARYYA, D.; MANDAL, T. K.; DEY, S. Neuropharmacological effects of alfa-cypermethrin in rats. **Journal of Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 18, 2005.

MANSOUR, S. A.; MOSSA, A-TH.; HEIKAL, T. M. Effects of methomyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat erythrocytes: In vitro studies. **Toxicology & Industrial Health**, v. 25, n. 8, p. 557–563, 2009.

MATSUMOTO, M.; FUJII, S.; HIROSE, A.; EMA, M. Prenatal developmental toxicity of gavage or feeding doses of 2-sec-butyl-4,6- dinitrophenol in rats. **Reproductive Toxicology**, v. 29, n. 3, p. 292-297, 2010.

MATSUYAMA, R.; KITAMOTO, S.; TOMIGAHARA, Y. Lack of genotoxic potential of permethrin in mice evaluated by the comet assay and micronucleus test. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 92-102, 2018.

MIRANDA, A. C. D.; MOREIRA, J. C.; CARVALHO, R. D.; PERES, F. Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Revista ciências & saúde coletiva**, v. 12, n. 1, p. 7-14, 2007.

MOKHTAR, H. I.; ABDEL-LATIF, H. A.; ELMAZOU DY, R. H.; ABDELWAHAB, W. M.; SAAD, M. I. Effect of methomyl on fertility, embryotoxicity and physiological parameters in female rats. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 12, p. 109-119, 2013.

MORAGAS, W. M.; DE OLIVEIRA SCHNEIDER, M. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia**, v. 4, n. 10, p. 26-40, 2003.

MORIYA F.; HASHIMOTO, Y. A fatal poisoning caused by methomyl and nicotine. **Forensic science international**, v. 149, n. 2, p. 167-170, 2005.

MOSBAH, R.; MOKRANI, N.; MOSBAHI, I.; ROUABHI, S.; MANTOVANI, A. Effect of methomyl on the biochemical and reproductive parameters in pregnancy rats: the protective role of Pistacia Lentiscus oil. **Endocrine Abstracts**, DOI:10.1530/endoabs, 2016.

MOURA, R. M. Rachel Carson e os agrotóxicos, 45 anos após Primavera Silenciosa. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, vols. 5 e 6, p.44-52, 2008-2009.

MOURA, R. M. A questão agrotóxico em debate. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, vols. 11/12, p.23-30, 2014/2015

MURANLI, F. D. G. Genotoxic and cytotoxic evaluation of pyrethroid insecticides λ -cyhalothrin and α -cypermethrin on human blood lymphocyte culture. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 90, n. 3, p. 357-363, 2013.

NAIR, R. R.; ABRAHAM, M. J.; LALITHAKUNJAMMA, C. R.; NAIR, N. D.; ARAVINDAKSHAN, C. M. A pathomorphological study of the sublethal toxicity of cypermethrin in Sprague Dawley rats. **International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases**, v. 1, n. 2, p. 179, 2011.

NASRALA NETO, E., DE CASTRO LACAZ, F. A., & ANTONIO PIGNATI, W. Vigilância em saúde e agronegócio: os impactos dos agrotóxicos na saúde e no ambiente. Perigo à vista!. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 12, p. 4709-4718, 2014.

NUNES, G. S.; JEANTRY, G.; MARTY, J. L. Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides comparative study. **Analytica Chimica Acta**, v. 523, n. 1, p. 107-115, 2004.

OBINNA, V. C.; AGU, G. O. Beta cypermethrin exposure and perinatal reproductive development of female f1 generation of albino rats. **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 80,n. 1, p. 44, 2019.

OKONKO, L. E.; IKPEME, E. V.; UDENSI, O. U. Genotoxic Effect of Chlorpyrifos and Cypermethrin in Albino Rats. **Research Journal of Mutagenesis**, v. 6, n. 1, p. 31, 2016.

OMURTAG, G. Z.; TOZAN, A.; ŞEHIRLI, A. Ö.; & ŞENER, G. Melatonin protects against endosulfan-induced oxidative tissue damage in rats. **Journal of pineal research**, v. 44, n. 4, p. 432-438, 2008.

PASCHOARELLI, L. C.; DOS SANTOS MENEZES, M. Design e ergonomia: aspectos tecnológicos. In: **Rótulos de embalagem de agrotóxico: uma abordagem ergonômica**. SciELO-Editora UNESP, 2009.

PASCHOAL, A. **Pragas, praguicidas e a crise ambiente – Problemas e soluções**. Rio de Janeiro, FGV, 102p, 1979.

PASTOR, S.; CREUS, A.; PARRÓN, T.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; SIFFEL, C.; PIPERAKIS, S.; MARCOS, R. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. **Mutagenesis**, v. 18, n. 3, p. 249-258, 2003.

PATEL, J. M.; JOSHI, D. V.; PATEL, B. J.; BHADANIYA, A. R.; KALARIA, V. A. Clinicopathological studies on alpha-cypermethrin induced toxicity in wistar rats (*Rattus norvegicus*). **Indian Journal of Veterinary Pathology**, v. 39, n. 1, p. 36-40, 2015.

PATEL, S.; PANDEY, A. K.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D.; DHAWAN, A. Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: Evidence from the comet assay. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental**, v. 607, n. 2, p.176-183, 2006.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**, 4a. ed.; Oxford University Press, cap. 22, 2009.

PEDLOWSKI, M. A.; CANELA, M. C.; TERRA, M. A. C.; FARIA, R. M. R. Modes of

pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment. **Crop Protection**, v. 31, n.1, p. 113–118, 2012.

PELAEZ, V., DA SILVA, L. R., & ARAÚJO, E. B. Regulation of pesticides: a comparative analysis. **Science and Public Policy**, v. 40, n. 5, p. 644-656, 2013.

PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. *É veneno ou é remédio. Agrotóxicos, saúde e ambiente. Fiocruz, Rio de Janeiro*, p. 21-41, 2003.

PIRES, D. X.; CALDAS, E. D.; RECENA, M. C. P. Intoxicações provocadas por agrotóxicos de uso agrícola na microrregião de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil, no Período de 1992 a 2002. **Caderno de Saúde Pública**, v. 21, n. 3, p. 804-14, 2005

POLAT, H.; ERKOÇ, F. U.; VIRAN, R.; KOÇAK, O. Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. **Chemosphere**, v. 49, n.1, p. 39-44, 2002.

POPOVSKA-GOREVSKI, M.; DUBOCOVICH, M. L.; RAJNARAYANAN, R. V. Carbamate Insecticides Target Human Melatonin Receptors. **Chemical research in toxicology**, v. 30, n. 2, p. 574, 2017.

PORTO, M. F; SOARES, W. L. Development model, pesticides, and health: a panorama of the Brazilian agricultural reality and proposals for an innovative research agenda. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 37, n. 125, p. 17-31, 2012.

RACHID, M.; MOKHTAR, I. Y. Vitamin E protects against methomyl-induced reproductive toxicity in pregnant female rats. **Endocrine**, DOI:10.1530/endoabs, v. 32, p. 501, 2013.

REITER, R.J.; DUN-XIAN. T.; JUAN, C.M.; ROSA, M.S.; JOSEFA, L.; ZBIGNIEW, C. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 4, p. 1129-1146, 2003.

REITER, R. J; MAYO, J. C; BRONZEADO, D. X; SAINZ, R. M; ALATORRE-JIMENEZ, M; QIN, L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of pineal research**, v. 61, n. 3, p. 253-278, 2016.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre impacto sobre a saúde e a saúde e a saúde e meio ambiente meio ambiente. **Revista Liberato. Novo Hamburgo**, v. 10, n.14, p. 149-158, 2009.

RIBEIRO, E. P.; DE LIMA, M. S.; NÓBREGA, R. S.; DE OLIVEIRA MOTA FILHO, F. Segurança e saúde do aplicador de agrotóxicos: agricultores do município de São Joaquim do Monte-PE. **Revista de Geografia (Recife)**,v. 31, n. 1, p. 39-57, 2014.

RIGHI, D. A.; BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Toxicologia dos praguicidas organoclorados e piretróides. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. Toxicologia aplicada à medicina veterinária. **Barueri: Manole**, p. 117-189, 2008.

SAIYED, H. N.; SADHU, H. G.; BHATNAGAR, V. K.; DEWAN, A.; VENKAIAH, K.; KASHYAP, S. K. Cardiac toxicity following short-term exposure to methomyl in spraymen and rabbits. **Human & experimental toxicology**, v. 11, n. 2, p. 93-97, 1992.

SAKR, S.; HASSANIEN, H.; BESTER, M. J.; ARBI, S.; SOBHY, A.; EL NEGRIS, H.; STEENKAMP, V. Beneficial effects of folic acid on the kidneys and testes of adult albino rats after exposure to methomyl. **Toxicology Research**, v. 7, n. 3, p. 480-491, 2018.

SALLINEN, P.; SAARELA, S.; ILVES, M.; VAKKURI, O.; LEPPÄLUOTO, J. The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor mRNA in several rat tissues. **Life sciences**, v. 76, n. 10, p. 1123-1134, 2005.

SALLAM, M. A.; AHMAD, M.; AHMAD, I.; GUL, S. T.; IDREES, M.; BASHIR, M. I.; ZUBAIR, M. Toxic effects of cypermethrin on the reproductive functions of female rabbits and their amelioration with vitamin E and selenium. **Pak Vet J**, v. 35, n. 2, p. 193-196, 2015.

SHALABY, M. A.; EL ZORBA, H. Y.; ZIADA, R. M. (Reproductive toxicity of methomyl insecticide in male rats and protective effect of folic acid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3221-3226, 2010.

SANTANA, V. S.; MOURA, M. C. P.; FERREIRA, F. Mortalidade por intoxicação ocupacional relacionada a agrotóxicos, 2000-2009, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 3, p. 598-606, 2013.

SANTOS, T. C.; CÂMARA, J. B. D. **GEO Brasil 2002: perspectivas do meio ambiente no Brasil**. Edições Ibama, 2002.

SANTOS, M. D.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides uma visão geral. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2008.

SARABIA, L.; ESPINOZA-NAVARRO, O.; MAURER, I.; PONCE, C.; BUSTOS-OBREGÓN, E. Protective effect of melatonin on damage in the sperm parameters of mice exposed to diazinon. **Int J Morphol**, v. 29, n. 4, p. 1241-1247, 2011.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacological reviews**, v. 55, n. 2, p. 325-395, 2003.

SCHULER-FACCINI, L.; SCHULER-FACCINI, L.; LEITE, J. C. L.; SANSEERINO, M. T. V.; PERES, R. M. Avaliação de teratógenos na população brasileira. **Ciências Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 65-71, 2002.

SHALABY, M. A.; EL ZORBA, H. Y.; ZIADA, R. M. Reproductive toxicity of methomyl insecticide in male rats and protective effect of folic acid. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3221-3226, 2010.

SHANTHALATHA, A.; MADHURANATH, B. N.; YAJURVEDI, H. N. Effect of methomyl formulation, a carbamate pesticide on ovarian follicular development and fertility in albino mice. **Journal of Environmental Biology**, v. 33, n. 1, p. 33, 2012.

SHARMA, P.; HUQ, A. U.; SINGH, R. Cypermethrin-induced reproductive toxicity in the rat is prevented by resveratrol. **Journal of human reproductive sciences**, v. 7, n. 2, p. 99, 2014.

STRATHMANN, T. J.; STONE, A. T. Reduction of the carbamate pesticides oxamyl and methomyl by dissolved FeII and CuI. **Environmental science & technology**, v. 35, n. 12, p. 2461-2469, 2001.

SILVA, R. D.; HOCHMAN, G. A method called Pinotti: medicated salt, malaria, and international health (1952-1960). **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 18, n. 2, p. 519-544, 2011.

SINGH, P.; LATA, P.; PATEL, S.; PANDEY, A. K.; JAIN, S. K.; SHANKER, R.; DHAWAN, A. Expression profiling of toxicity pathway genes by real-time PCR array in cypermethrin-exposed mouse brain. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 21, n. 3, p. 193-199, 2011.

SINGH, A. K.; TIWARI, M. N.; DIXIT, A.; UPADHYAY, G.; PATEL, D. K.; SINGH, D.; SINGH, M. P. Nigrostriatal proteomics of cypermethrin-induced dopaminergic neurodegeneration microglial activation dependent and independent regulations. **Toxicological Sciences**, v. 122, n. 2, p. 526-538, 2011.

SINGH, A.; MUDAWAL, A.; SHUKLA, R. K.; YADAV, S.; KHANNA, V. K.; SETHUMADHAVAN, R.; PARMAR, D. Effect of gestational exposure of cypermethrin on postnatal development of brain cytochrome P450 2D1 and 3A1 and neurotransmitter receptors. **Molecular neurobiology**, v. 52, n. 1, p. 741-756, 2015.

SOARES, W. L.; FREITAS, E. A. V.; COUTINHO, J. A. G. Trabalho rural e saúde: intoxicações por agrotóxicos no município de Teresópolis RJ, **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 43, n. 4, p. 685-701, 2005.

SOARES, J. R. J. M.; SIMÕES, R. S.; SIMÕES, M. J.; BARACAT, E. C. Aspectos moleculares dos receptores de melatonina e sua ação na reprodução. **Femina**, v. 31, n. 6, p. 495-500, 2003.

SODERLUND, D. M.; CLARK, J. M.; SHEETS, L. P.; MULLIN, L. S.; PICCIRILLO, V. J.; SARGENT, D.; WEINER, M. L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, n. 1, p. 3-59, 2002.

SOLIMAN, M. M.,; ATTIA, H. F.; EL-ELLA, G. A. A. Genetic and histopathological alterations induced by cypermethrin in rat kidney and liver: Protection by sesame oil. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 508-520, 2015.

G. SUMAN, R.; NARAVANENI, K.; JAMIL, In vitro cytogenetic studies of cypermethrin on human lymphocytes. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 44, n. 3, p. 233, 2006.

STOPPELLI, I. M. B. S.; MAGALHÃES, C. P. Saúde e Segurança Alimentar: a questão dos agrotóxicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 10, n. supl, p. 91-100, 2005.

TSATSAKIS, A. M.; TSAKALOF, A. K.; SIATITSAS, Y.; MICHALODIMITRAKIS, E. N. Acute poisoning with carbamate pesticides: The Cretan experience. Science and Justice. **Science & Justice**, v. 36, n. 1, p. 35-39, 1996.

TSATSAKIS, A. M.; BERTSIAS, G. K.; MAMMAS, I. N.; STIAKAKIS, I.; GEORGOPOULOS, D. B. Acute fatal poisoning by methomyl caused by inhalation and transdermal absorption. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 66, n. 4, p. 415-420, 2001.

TAVELLA, L. B.; SILVA, Í. N.; DE OLIVEIRA FONTES, L.; DIAS, J. R. M.; DE LIMA SILVA, M. I. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semi-Árido, Santa Cecília**, v. 7, n. 2, p. 06-12, 2011.

TIAN, Y. T.; LIU, Z. W.; YAO, Y.; ZHANG, T.; YANG, Z. Effects of alpha and theta-cypermethrin insecticide on transient outward potassium current in rat hippocampal CA3 neurons. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 90, n. 1, p. 1-7, 2008.

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

TOLEDO, J. M.; et al. Estrous Cycle and Early Pregnancy of White Mice Exposed to Methomyl. **Pollution**, v. 5, n. 2, p. 279-286, 2019.

TSAI, M. J.; WU, S. N.; CHENG, H. A.; WANG, S. H.; CHIANG, H. T. An outbreak of food-borne illness due to methomyl contamination. **Journal of Toxicology Clinical Toxicology**, v. 41, n. 7, p. 969-973, 2003.

VAN SCOY, A. R.; YUE, M.; DENG, X.; TJEERDEMA, R. S. Environmental fate and toxicology of methomyl. In: **Reviews of environmental contamination and toxicology**. Springer New York, v. 222, p. 93-109, 2013.

VEIGA, M. M. Pesticides: economic efficiency and social and environmental injustice. **Ciencia & saude coletiva**, v. 12, n. 1, p. 145-152, 2007.

WANG, H.; WANG, Q.; ZHAO, X. F.; LIU, P.; MENG, X. H.; YU, T.; XU, D. X. Cypermethrin exposure during puberty disrupts testosterone synthesis via downregulating StAR in mouse testes. **Archives of toxicology**, v. 84, n. 1, p. 53-61, 2010.

WARDANI, N. E. K.; et al. Cypermethrin triggers apoptosis, depletes granulosa cells, and induces endometrium thinning in female rats. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 8, n. 4, p. 14, 2019.

WEBSTER, W. S.; FREEMAN, J. A. Is this drug safe in pregnancy? **Reproductive toxicology**, v.15, n. 6, p. 619-629, 2001.

WICKERHAM, E. L.; LOZOFF, B.; SHAO, J.; KACIROTI, N.; XIA, Y.; MEEKER, J. D. Reduced birth weight in relation to pesticide mixtures detected in cord blood of full-term infants. **Environment international**, v. 47, p. 80-85, 2012.

WIELGOMAS, B.; KRECHNIAK, J. Effect of alpha-cypermethrin and chlorpyrifos in a 28-day study on free radical parameters and cholinesterase activity in Wistar rats. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 16, n. 1, p. 91, 2007.

YEASMIN, A. M.; WALIULLAH, T. M.; ALAM, M. A.; RAHMAN, A. S. M. S. Cytotoxic effect of cypermethrin and its synergist PBO on *Alphitobius diaperinus* (panzer)(coleoptera: tenebrionidae) for biological security of stored grains and cereals. **journal Biotechnology Biosafe**, v. 2, n. 5, p. 131-140, 2014.

ZALATA, A.; ELHANBLY, S.; ABDALLA, H.; SERRIA, M. S.; AZIZ, A.; EL-DAKROOY, S. A.; MOSTAFA, T. In vitro study of cypermethrin on human spermatozoa and the possible protective role of vitamins C and E. **Andrologia**, v. 46, n. 10, p. 1141-1147, 2014.

ZHAO, F.; LI, T.; ZHANG, C.; XU, Y.; XU, H.; SHI, N. [Effects of methomyl on acetylcholinesterase in erythrocyte membrane and various brain areas]. **Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi= Zhonghua laodong weisheng zhiyebing zazhi= Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases**, v. 33, n. 6, p. 417-421, 2015.

ZHOU, Y. J.; WANG, X. D.; XIAO, S.; YU, D. E.; WANG, L. Q.; WANG, J. H.; ZHU, H. Q. Exposure to beta-cypermethrin impairs the reproductive function of female mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 385-394, 2018.

CAPÍTULO II

Avaliação genotóxica e mutagênica do efeito protetor da melatonina exógena em ratas adultas e sua prole expostas aos inseticidas metomil e cipermetrina durante a gravidez

Artigo submetido e publicado na revista
**Mutation Research - Genetic Toxicology and
Environmental Mutagenesis**



AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO EFEITO PROTETOR DA MELATONINA EXÓGENA EM RATAS ADULTAS E SUA PROLE EXPOSTAS AOS INSETICIDAS METOMIL E CIPERMETRINA DURANTE A GRAVIDEZ

Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho^{a,*}; Clovis José Cavalcanti Lapa Neto^a; Ilka Dayane Duarte de Sousa Coelho^a; Meykson Alexandre da Silva^b; Maria Eduarda Gomes Melo^b; Katharine Raquel Pereira dos Santos^b; Cristiano Aparecido Chagas^b; Álvaro Aguiar Coelho Teixeira^a; Valéria Wanderley Teixeira^a

^aDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife - PE, Brasil

^bLaboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil

***Autor para correspondência:**

Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho (K.S.N. Marinho), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil, CEP: 52171-900. Telefone: +55 81 98873-1091.

E-mail: ketsia.nascimento@ufrpe.br

RESUMO

Mulheres grávidas podem se expor a praguicidas de modo ocupacional ou incidental, o que tem sido apontado como possível causa de problemas na saúde de recém-nascidos. Cipermetrina e metomil são inseticidas cujos compostos ativos e metabólitos podem causar danos à saúde de mulheres grávidas e do concepto. Ambos contribuem com o aumento da concentração de agentes oxidantes que danificam o DNA, causando mutações. Tais mutações podem levar a problemas no desenvolvimento do feto e na

saúde de recém-nascidos. Assim, o uso de substâncias antioxidantes como a melatonina poderia servir de proteção contra danos genéticos, diminuindo os problemas causados pelos inseticidas. Aqui, avaliamos o efeito protetor da melatonina exógena em ratas adultas e sua prole expostas ao metomil e à cipermetrina durante o período gestacional. Trinta ratas adultas foram divididas em cinco grupos a partir do primeiro dia de prenhez: Cn – controle negativo; Mth recebeu 0,02 mg/kg/dia de metomil; Cyp recebeu 0,05 mg/kg/dia de cipermetrina; MthMl recebeu 0,02 mg/kg/dia de metomil combinado com 10 mg/kg/dia de melatonina; CypMl recebeu 0,05 mg/kg/dia de cipermetrina combinado com 10 mg/kg/dia de melatonina. Das mães foram coletadas amostras de sangue e fígado; da prole foram coletados também fragmentos de encéfalo. Todos os tecidos foram utilizados para o ensaio cometa; enquanto o sangue também foi usado para o teste do micronúcleo. Os resultados demonstram que cipermetrina e metomil induzem danos genéticos significativos nos tecidos das mães e da prole. O tratamento com melatonina diminuiu significativamente os danos genéticos induzidos pela cipermetrina nas mães e nos filhotes; entretanto, não foi eficiente contra os danos genéticos causados pelo metomil. Assim, a melatonina pode ser considerada um agente promissor para a diminuição dos efeitos genotóxicos induzidos pela cipermetrina, mas parece ineficiente em relação aos efeitos genotóxicos provocados pelo metomil, provavelmente por diferenças no metabolismo de cada praguicida.

Palavras-chave: carbamatos; piretroides; antimutagenese; exposição intrauterina

ABSTRACT

Exposure of pregnant women to pesticides in an occupational or incidental manner has been pointed out as a possible cause of health problems in newborns. Cypermethrin and methomyl are insecticides whose active compounds and metabolites can cause harm to the health of pregnant women and their offspring. Both contribute to increases in the concentrations of oxidizing agents that damage DNA, causing mutations. Thus, the use of antioxidant substances, such as melatonin, could serve as protection against genetic damage, reducing the problems caused by insecticides. Here, we evaluated the protective effect of exogenous melatonin in adult rats and their offspring exposed to methomyl and cypermethrin during the gestational period. Thirty adult rats were divided into five groups from the first day of pregnancy: NC - negative control, Mth

received 0.02 mg/kg/day of methomyl, Cyp received 0.05 mg/kg/day cypermethrin, MthMl received 0.02 mg/kg/day methomyl combined with 10 mg/kg/day melatonin, and CypMl received 0.05 mg/kg/day cypermethrin combined with 10 mg/kg/day melatonin. Blood and liver samples were collected from the dams; blood, liver, and brain samples were collected from the offspring. All tissues were used for comet assay; blood was used for micronucleus test. Our results demonstrate that cypermethrin and methomyl induce significant genetic damage in the tissues of dams and offspring. Treatment with melatonin significantly reduced cypermethrin-induced genetic damage in dams and pups; however, melatonin was not effective against the genetic damage caused by methomyl. Thus, melatonin may be considered a promising agent for the reduction of genotoxic effects induced by cypermethrin but appears to be inefficient against the genotoxic effects caused by methomyl, probably due to differences in the metabolism of each pesticide.

Keywords: Carbamates; Pyrethroids; Antimutagenesis; Intrauterine exposure

1. Introdução

Na última década o Brasil se tornou o maior consumidor de praguicidas no mundo com crescimento de cerca de 190% no período. Apesar de contribuir com o aperfeiçoamento da produção agrícola, praguicidas causam transtornos à saúde das pessoas e das populações, além de desequilíbrios na biota [1, 2]. Dentre os danos à saúde, câncer, desordens neurológicas, desregulação endócrina e danos no sistema reprodutivo são comumente relacionados à exposição a praguicidas [2, 3]. Além disso, a exposição intrauterina a tais compostos pode causar danos graves a embriões e fetos, seja pela ação direta do composto ao atravessar a barreira placentária, seja por efeitos indiretos como a produção intensa de radicais livres como consequência do metabolismo desses compostos [4, 5].

Metomil e cipermetrina são inseticidas muito utilizados na agricultura mundial. O metomil é um carbamato cujo efeito nos organismos-alvo acontece principalmente por inibição da acetilcolinesterase, mas que tem sido reportado também como inibidor de enzimas como a superoxide dismutase e a glutathione S-transferase, importantes na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) [6]. Esse inseticida é considerado

bastante tóxico, sobretudo porque é convertido a acetonitrila e finalmente a cianeto pelos sistemas de detoxificação microssomal, principalmente no fígado [7]. Por sua vez, a cipermetrina (um piretroide) é considerada pouco tóxica e, em insetos e mamíferos, causa hiperexcitação nervosa, disparando despolarizações persistentes ou repetitivas ao interferir em GABA-gated chloride channels, nicotinic ACh receptors, and intercellular gap junctions [8]. Além disso, a cipermetrina também interfere na ação de enzimas dos sistemas antioxidantes, como a glutathione-S-transferase, a aspartato aminotransferase e a fosfatase alcalina [9]. Assim, tanto a cipermetrina quanto o metomil parecem apresentar ações que interferem nos sistemas celulares antioxidantes, causando aumento do estresse oxidativo e danos celulares como peroxidação lipídica e danos nas moléculas de DNA [6, 10, 11, 12]. No entanto, o estresse oxidativo e suas consequências podem ser diminuídas pela ação de substâncias antioxidantes naturais ou sintéticas.

A Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) tem sido reportada como um poderoso antioxidante natural. Trata-se de um neuro-hormônio, produzido principalmente pela glândula pineal, capaz de penetrar em todos os compartimentos celulares. Apresenta efeito antioxidante direto porque reage com ROS e os elimina, e tem um efeito indireto porque estimula enzimas antioxidantes [13, 14, 15]. O efeito protetor da melatonina tem sido amplamente estudado, inclusive frente a efeitos tóxicos de praguicidas [16, 17, 18, 19, 20]. Mais especificamente, efeitos genotóxicos induzidos por agentes que estimulam o estresse oxidativo também parecem ser diminuídos pela ação da melatonina [21]

Assim, o estresse oxidativo e o consequente dano genético podem explicar os achados que demonstram defeitos congênitos em fetos e recém-nascidos de mães expostas a piretroides ou carbamatos. Nesse contexto, agentes antioxidantes como a melatonina poderiam reduzir o risco de problemas anatômicos ou fisiológicos causados pela exposição intrauterina a tais inseticidas. Tanto os danos genéticos como a ação protetora de compostos antígenotóxicos podem ser avaliados por testes amplamente utilizados como o ensaio cometa e o teste do micronúcleo em sangue periférico. O teste de micronúcleos consiste na análise da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (PCE) no sangue de animais expostos experimentalmente a agentes cuja genotoxicidade se quer analisar. O teste é sensível a agentes clastogênicos e aneugênicos e é recomendado por agências reguladoras e muito usado em estudos desse tipo [22]. O

ensaio cometa é muito sensível e é usado para detecção de quebras duplas, sítios ácali-labeis e ligações cruzadas; o sistema de reparo de DNA em geral age nesses danos, mas reparos errôneos podem levar a mutações estabelecidas; portanto, quanto mais danos uma dada substância induzir, maior a probabilidade de mutações no DNA. Aqui, nós usamos o ensaio cometa e o teste do micronúcleo para avaliar, em ratas e sua prole, os danos genéticos causados por cipermetrina e metomil, além de avaliar o efeito protetor da melatonina exógena frente aos efeitos genotóxicos dos praguicidas.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

O presente estudo utilizou 30 ratas albinas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 90 dias de idade, virgens, pesando aproximadamente 230 ± 30 g, provenientes do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os animais foram mantidos em caixas adequadas de polipropileno com ambiente climatizado à temperatura controlada de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, expostas à luz por um fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro, com alimentação e água *ad libitum*. As ratas foram acasaladas e divididas aleatoriamente nos grupos experimentais. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE (CEUA – UFRPE), com licença de número 109/2016.

2.2. Acasalamento e diagnóstico da prenhez

Para o acasalamento, as fêmeas foram colocadas para acasalar na proporção de um macho para cada duas fêmeas, no início da noite (18:00h). No dia seguinte, no período da manhã (06h), foram realizados exames colpocitológicos para a confirmação do acasalamento e diagnóstico da prenhez. Para a confirmação do acasalamento foi considerado a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal ao exame microscópico. As primeiras 24 horas após a confirmação do acasalamento foram consideradas como primeiro dia de prenhez.

2.3. Grupos experimentais

Após a confirmação do acasalamento, as fêmeas foram distribuídas em cinco grupos, contendo seis animais cada: Cn – Ratas prenhes que receberam apenas água destilada; Mth – Ratas prenhes que receberam apenas metomil na concentração de 0,02 mg/kg/dia; Cyp – Ratas prenhes que receberam apenas cipermetrina na concentração de 0,05 mg/kg/dia; MthMl – Ratas prenhes que receberam 0,02 mg/kg/dia de metomil combinado com 10 mg/kg/dia de melatonina; CypMl – Ratas prenhes que receberam 0,05 mg/kg/dia de cipermetrina combinado com 10 mg/kg/dia de melatonina.

2.4. Administração dos inseticidas

Os tratamentos de todas as ratas prenhes foram realizados diariamente, durante todo o período gestacional (uma dose por dia durante aproximadamente 21 dias), por gavagem intragástrica. As matrizes dos grupos Mth, Cyp, MthMl e CypMl receberam as doses dos inseticidas metomil (Lannate BR® DuPont, 215 g/L) e cipermetrina (Cyprin 250 CE® Nufarm, 250 g/L) de acordo com a IDA (ingestão diária aceitável) recomendados pelo Comitê Conjunto FAO/OMS [23,24].

2.5. Administração da melatonina

O tratamento com melatonina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foi realizado diariamente nas ratas dos grupos MthMl e CypMl durante os 21 dias de gestação. Para administração, a melatonina foi dissolvida na água de beber dos animais em tratamento e as garrafas de água foram envolvidas com papel alumínio para proteção contra a luz [25].

2.6. Coleta dos materiais biológicos

Após o nascimento, no primeiro dia de vida, as matrizes e 12 filhotes (seis machos e seis fêmeas) de cada grupo experimental foram anestesiados com hidrocloreto de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular. O sangue e fígado das matrizes, bem como o sangue, fígado e cérebro dos neonatos foram coletados para avaliação da frequência de danos no DNA através do ensaio cometa. O sangue coletado também foi utilizado para avaliação de mutações no DNA por meio do teste do micronúcleo. Para utilização das células sanguíneas, 1 mL de sangue foi coletado por punção cardíaca e diluído em PBS (tampão fosfato salino). Partes do fígado e do cérebro foram coletadas e mergulhadas em tampão de suspensão celular

frio. Posteriormente, esses pedaços foram fragmentados em 1 mm de diâmetro, utilizando-se tesoura de aço inoxidável adequada. Em seguida, agitados delicadamente e adicionado a um novo tampão. As amostras foram novamente picotadas até que o tampão se tornasse turvo e translúcido, indicando que grande parte das células hepáticas e nervosas foi desprendida. Aproximadamente 1 mL da suspensão celular coletada foi acondicionada em microtubos e levados a geladeira até o momento do preparo das lâminas para o ensaio cometa.

2.7. Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Tice et al. [26] Primeiro, 15 µl da suspensão de células (sangue, fígado e cérebro) foram adicionados a 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão previamente aquecida e mantida a temperatura de 37°C [27]. As amostras foram depositadas em duas lâminas de vidro previamente preparadas com agarose padrão. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas e levadas à temperatura de 4°C por 10 minutos para solidificação da agarose com as células.

Após a solidificação, as lamínulas foram removidas e as lâminas colocadas em cubas contendo uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1% Triton X-100, 10% DMSO, com pH 10) e mantidas em geladeira por 48 horas. Após a etapa de lise celular, as amostras foram transferidas para uma cuba horizontal contendo solução de tampão alcalino gelado (1M NaOH e 200 mM sal dissódico EDTA, pH 13) e mantidas em descanso por cerca de 20 minutos, para desnaturação do DNA. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à eletroforese durante 20 minutos, com corrente de ± 300 mA e diferença de potencial de 32 V.

Logo após a corrida eletroforética, as lâminas permaneceram durante 15 minutos em tampão de neutralização (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5) e depois foram fixadas por 5 minutos em álcool etílico absoluto. Para a revelação do dano no DNA, as lâminas foram coradas com 30 µL de solução de brometo de etídio (0,0002%, p/v) e cobertas com lamínulas. Todas as etapas descritas anteriormente foram realizadas sob a luz vermelha.

A análise dos possíveis danos ao DNA foi realizada em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager, M2), com ampliação de 400X, utilizando-se o filtro Alexa Fluor 546. Foram examinadas um total de 100 nucleoides por animal. Para cada nucleóide analisado, os danos no DNA foram classificados em cinco classes distintas de

acordo com o dano observado: 0 = sem dano visível; 1 = dano mínimo; 2 = dano médio; 3 = dano médio com cauda mais longa; 4 = dano máximo).

Os resultados foram expressos em índice de dano (ID) e frequência de danos (FD%). O valor obtido para cada indivíduo pode variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4), denominado de (ID) por animal, calculado da seguinte maneira:

$$ID\ total = 0\ (n^{\circ}\ classe\ 0) + 1\ (n^{\circ}\ classe\ 1) + 2\ (n^{\circ}\ classe\ 2) + 3\ (n^{\circ}\ classe\ 3) + 4\ (n^{\circ}\ classe\ 4)$$

A frequência de danos (FD%) foi determinada de acordo com a porcentagem de todos os nucleoides com algum dano (classe 1 até classe 4) em relação ao total de nucleoides contabilizados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total), seguindo a seguinte fórmula:

$$FD = [(n^{\circ}\ total - n^{\circ}\ classe\ 0) \times 100] / n^{\circ}\ total$$

A viabilidade celular foi medida em cada lâmina preparada pela proporção de nucleoides altamente danificados (em forma de ouriço) sobre o total de 100 nucleoides contabilizados. Sempre que o número de nucleoides em forma de ouriço for maior do que 20% dos do total de nucleoides, a amostra é descartada (COLLINS et al., 2008).

2.8. Teste do Micronúcleo

A mutagenicidade do metomil e cipermetrina também foi analisada por meio do teste do micronúcleo em sangue periférico. 5 µL do sangue de cada animal foi coletado e posto em três lâminas histológicas, previamente preparadas com o corante laranja de acridina. Em seguida, as lâminas foram cobertas com uma lamínula, a fim de espalhar uniformemente o material biológico [28].

A análise do material foi realizada utilizando o microscópio de fluorescência Zeiss-Imager M2, com objetiva de 40X, com filtro Alexa Fluor 488. Foram avaliadas a proporção de eritrócitos policromáticos (EPC) e a frequência de micronúcleos presentes em tais células. A proporção de eritrócitos policromáticos em relação aos eritrócitos totais foi estabelecida pela fórmula: $EPC/(EPC+ENC)$, em que ENC significa

eritrócitos normocromáticos. Para a determinação da frequência de micronúcleos, foram contabilizados 2.000 eritrócitos policromáticas por amostra, incluindo dentro desse total, a presença de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPM) (OECD,2016).

2.9. Análise estatística

Os resultados obtidos no ensaio cometa e teste do micronúcleo em cada um dos grupos experimentais foram comparados pelo Teste Kruskal-Wallis com análise *a posteriori* utilizando-se a estratégia de fazer testes t par-a-par com correção de Bonferroni. Os grupos foram comparados entre si pelo teste de Wilcoxon para se verificar a eficiência dos testes. Foram considerados estatisticamente significativos os valores de $P < 0,05$.

3. Resultados

De modo geral, cipermetrina e metomil induziram dano genético nos três grupos estudados: mães, filhotes machos e filhotes fêmeas. Houve alguma variação de acordo com os testes utilizados e com os tecidos analisados. A melatonina foi mais eficiente em diminuir os danos genéticos induzidos pela cipermetrina; seu efeito protetor foi menor ou inexistente quando os danos foram causados pelo metomil.

Nas mães ambos os praguicidas induziram aumento estatisticamente significativo de micronúcleos e dos parâmetros do ensaio cometa (DI and DF) no sangue e no fígado dos animais. Por sua vez, o tratamento com melatonina exógena (10 mg/kg/dia) foi efetivo em diminuir os danos genéticos causados pela cipermetrina, mas apenas o teste do micronúcleo demonstrou ação protetora da melatonina contra o metomil. (FIGURA 1). A frequência de micronúcleos, o ID e o FD no sangue e no fígado do grupo CypMl foram estatisticamente menores ($p < 0,01$) do que no grupo Cyp; de fato, todos os parâmetros no grupo CypMl caíram aos níveis vistos no grupo Cn, com exceção do ID no fígado; neste caso, o grupo CypMl apresentou ID no fígado estatisticamente maior do que aquele visto no grupo Cn. No grupo tratado com melatonina e metomil (MthMl), apenas a frequência de micronúcleos diminuiu significativamente ($p = 0,017$) em relação ao grupo tratado apenas com metomil (Mth). Ainda assim, os valores ficaram maiores do que aqueles vistos no grupo Cn ($p = 0,011$).

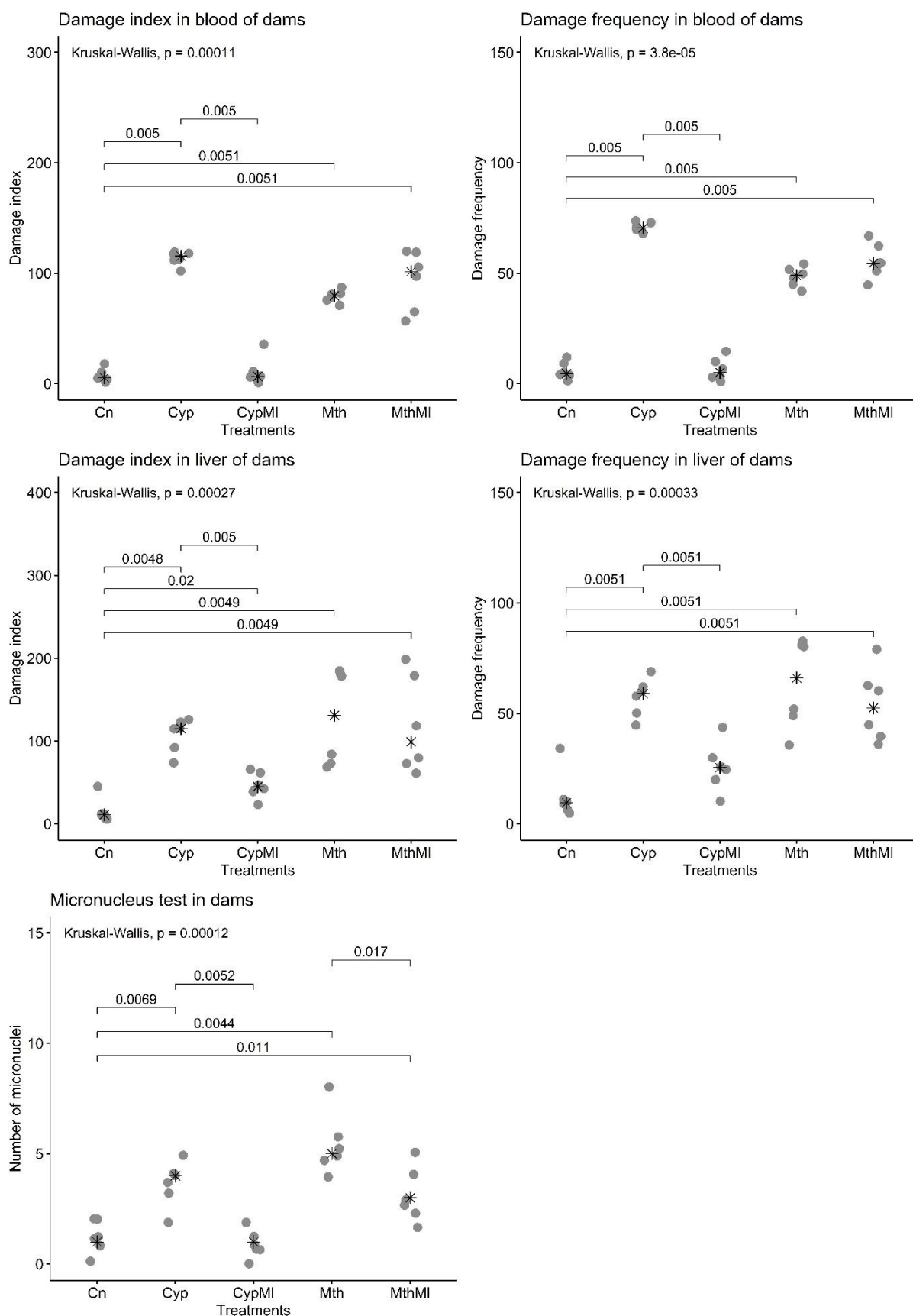


Figura 1: Efeito da cipermetrina e metomil isolados e associados com a melatonina exógena no sangue e fígado de ratas prenhes. a) Damage index in blood by the comet

assay; (b) damage frequency (in percentage) in blood by the comet assay; (c) damage index in liver; (d) damage frequency in liver; (e) frequency of micronuclei in polychromatic erythrocytes; Cn: negative control; Cyp: cypermethrin; CypMl: cypermethrin and melatonin; Mth: methomyl; MthMl: methomyl and melatonin. Numbers above points represent p values statistically significant (pair-to-pair T-test with Bonferroni's correction). Black stars represent means.

A exposição materna tanto à cipermetrina quanto ao metomil causou danos genéticos também nos filhotes machos. Ambos os praguicidas induziram aumento significativo ($p < 0,05$) na frequência de micronúcleos e nos parâmetros do ensaio cometa no sangue, fígado e cérebro dos filhotes. Por sua vez, a melatonina foi eficiente em diminuir os efeitos genotóxicos da cipermetrina nos três tecidos analisados (FIGURA 2). A frequência de micronúcleos, ID e FD no fígado e no cérebro foram menores no grupo CypMl do que no grupo Cyp ($p < 0,05$); além disso, nesses casos não houve diferença entre o grupo CypMl e o grupo Cn. Também houve diminuição significativa no ID e FD no sangue do grupo CypMl quando comparado com o grupo Cyp, mas nesse caso CypMl continuou apresentando mais danos genéticos do que o grupo Cn ($p < 0,05$). A melatonina não diminuiu danos genéticos induzidos pelo metomil; nenhum dos parâmetros de genotoxicidade foi menor no grupo MthMl do que no grupo Mth em qualquer dos tecidos analisados.

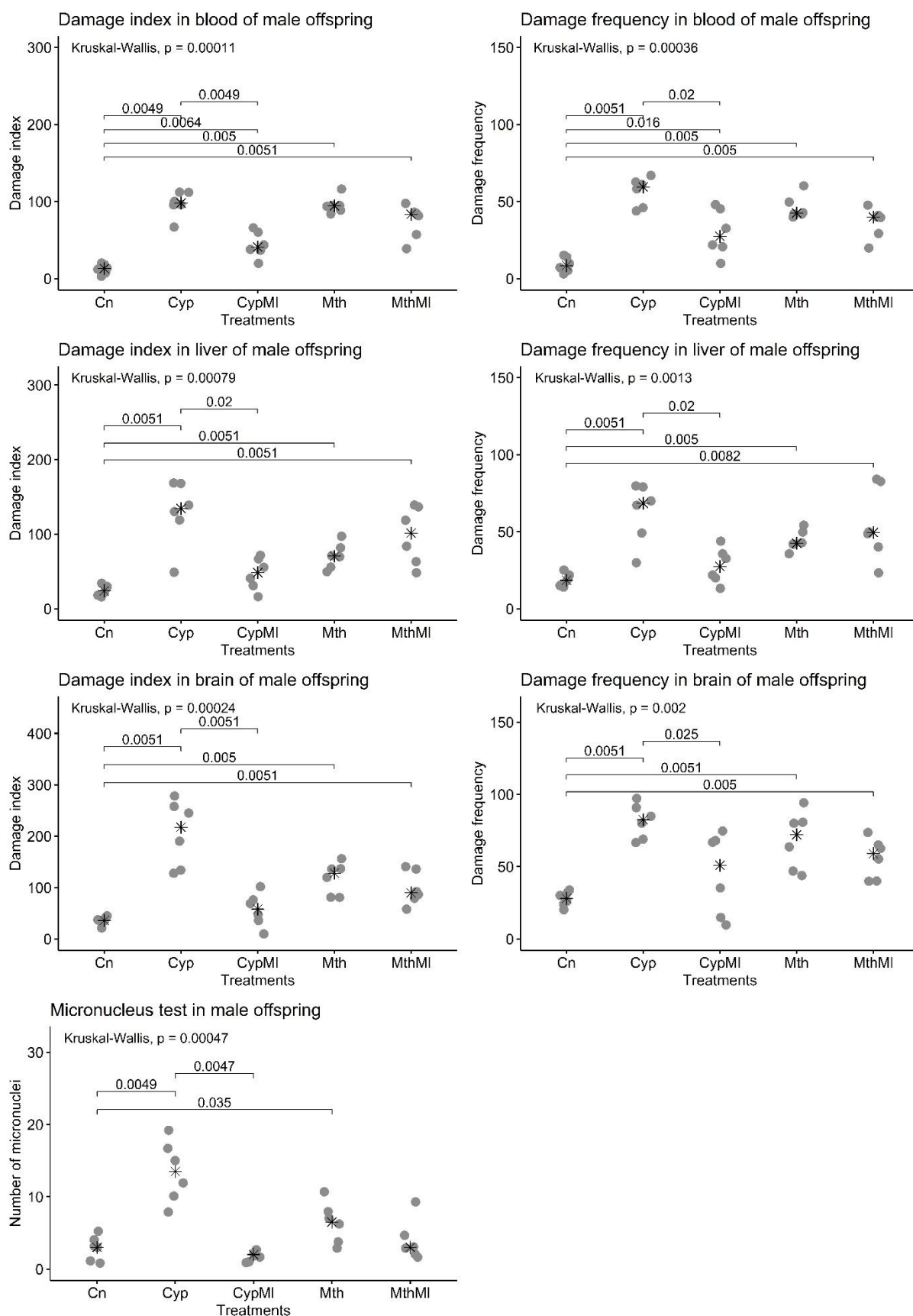


Figura 2: Efeito da exposição materna à cipermetrina e metomil isolados e associados à melatonina exógena no sangue, fígado e cérebro da prole de filhotes machos. a) Damage

index in blood by the comet assay; b) damage frequency (in percentage) in blood by the comet assay; c) damage index in liver; d) damage frequency in liver; e) damage index in brain; f) damage frequency in brain; g) micronuclei frequency in polychromatic erythrocytes; Cn: negative control; Cyp: cypermethrin; CypMl: cypermethrin and melatonin; Mth: methomyl; MthMl: methomyl and melatonin. Numbers above points represent p values statistically significant (pair-to-pair T-test with Bonferroni's correction). Black stars represent means.

A prole de fêmeas também foi afetada pela exposição materna à cipermetrina e ao metomil, com aumento dos parâmetros de genotoxicidade (FIGURA 3). O tratamento com cipermetrina nas mães induziu aumento significativo na frequência de micronúcleos no sangue do grupo Cyp ($p = 0,035$); nesse grupo, ID e FD no sangue, fígado e cérebro também foram significativamente maiores do que no grupo NC ($p < 0,01$). Por sua vez, o metomil induziu aumento na frequência de micronúcleos e aumento dos parâmetros ID e FD no sangue e no cérebro da prole de fêmeas ($p < 0,01$), mas não no fígado desses animais. Assim como nas *dams* e nos filhotes machos, a melatonina diminuiu os danos genéticos causados pela cipermetrina. O grupo de filhotes fêmeas CypMl apresentou redução significativa, quando comparada com o grupo Cyp, em todos os parâmetros (Mn, ID e FD) nos três tecidos analisados. Os valores de ID e FD no sangue continuaram significativamente maiores do que os valores vistos no grupo Cn. No entanto, o grupo CypMl apresentou valores de Mn, ID e FD no fígado e no cérebro que não eram significativamente diferentes do grupo Cn. Novamente, a melatonina não foi eficiente em diminuir os danos genéticos causados pelo metomil; assim como nos filhotes machos, o grupo que recebeu metomil e melatonina não apresentou redução significativa em nenhum dos ensaios (ou qualquer dos tecidos) comparado ao grupo que recebeu apenas metomil. Inclusive, no fígado houve aumento significativo do ID no grupo tratado com metomil e melatonina quando comparado com o grupo que recebeu apenas metomil.

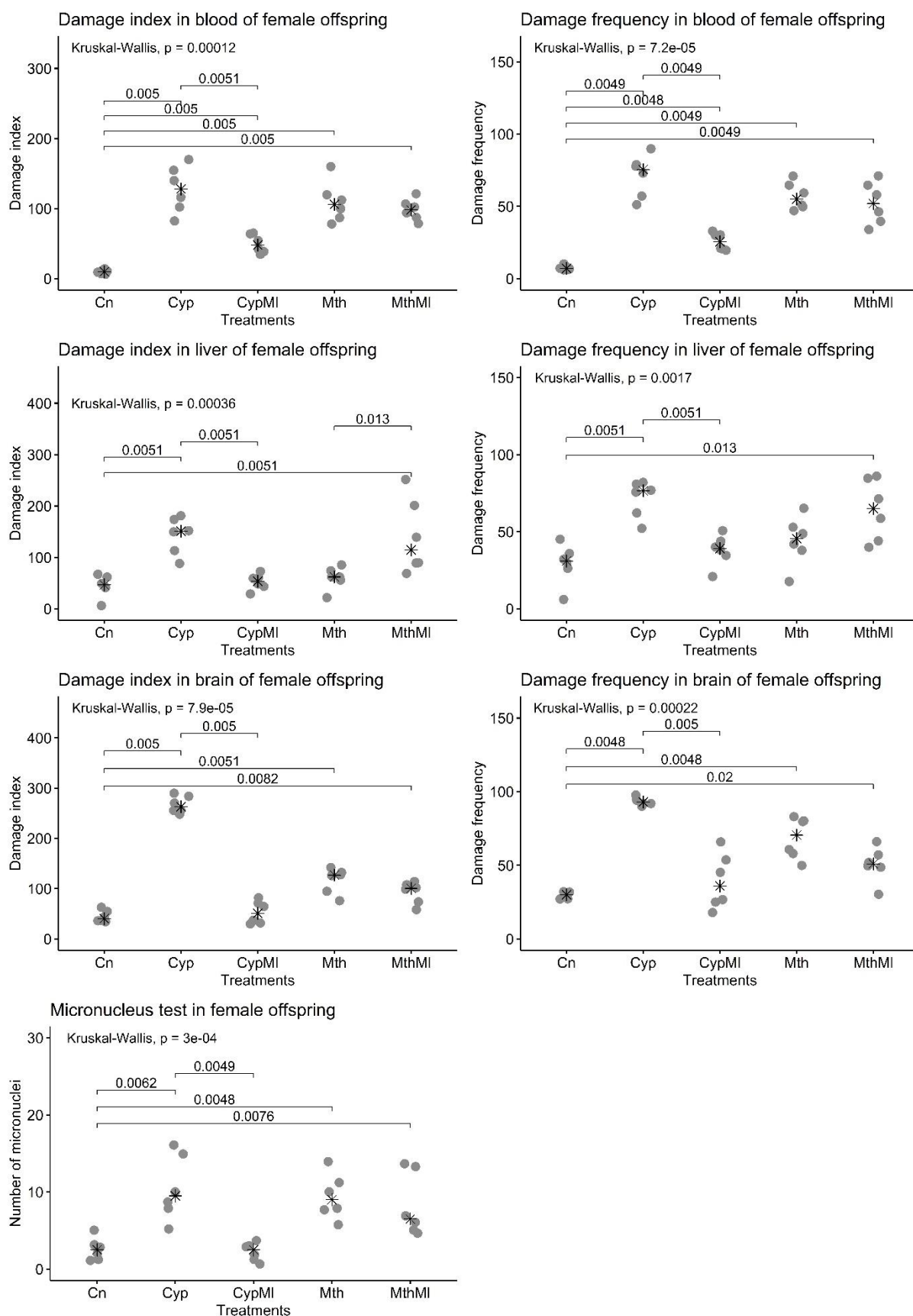


Figura 3: Efeito da exposição materna à cipermetrina e metomil isolados e associados à melatonina exógena no sangue, fígado e cérebro da prole de filhotes fêmeas. a) Damage

index in blood by the comet assay; b) damage frequency (in percentage) in blood by the comet assay; c) damage index in liver; d) damage frequency in liver; e) damage index in brain; f) damage frequency in brain; g) micronuclei frequency in polychromatic erythrocytes; Cn: negative control; Cyp: cypermethrin; CypMl: cypermethrin and melatonin; Mth: methomyl; MthMl: methomyl and melatonin. Numbers above points represent p values statistically significant (pair-to-pair T-test with Bonferroni's correction). Black stars represent means.

4. Discussão

Nossos resultados demonstram que os praguicidas metomil e cipermetrina induzem danos na molécula de DNA em fêmeas expostas e na sua prole. Os danos genéticos causados pela cipermetrina e metomil têm sido demonstradas na literatura em modelos *in vivo* e *in vitro* [30, 31, 32], mas a ação genotóxica na prole de fêmeas expostas a doses consideradas seguras desses praguicidas ainda não havia sido demonstrada. Essa genotoxicidade, associada a outras atividades tóxicas, podem explicar achados que demonstram que tais praguicidas têm efeitos tóxicos em embriões [11, 33]. Ambos os praguicidas induziram dano genético em todos os tecidos analisados nos três grupos, com exceção do fígado das filhotes fêmeas que foi mais resistente à ação do metomil, sem danos genéticos estaticamente diferentes do grupo controle. As doses testadas aqui são consideradas seguras pelo comitê conjunto da FAO/OMS sobre Resíduos de Pesticidas (JMPR), uma vez que representam a IDA. No entanto, documentos do JMPR para ambos os pesticidas descrevem testes e doses administradas diferentes daquelas descritas aqui [23, 24], o que pode explicar as diferenças nos resultados. Além disso, documentos do JMPR descrevem resultados positivos quando o ensaio cometa foi usado para avaliação da cipermetrina [34].

Os danos genéticos causados pelos praguicidas, tanto nas mães quanto na prole, podem ser resultado de estresse oxidativo. Não está claro se os compostos geram ROS, mas Mokhtar et al. [33] sugerem que o metomil pode induzir aumento de radicais livres e aumentar o estresse oxidativo ao perturbar a ação da catalase, da superoxidodismutase e da glutathionaperoxidase. Por sua vez, a cipermetrina também desequilibra enzimas dos sistemas antioxidativos, dentre elas, a glutathione-S-transferase, a aspartato aminotransferase e a fosfatase alcalina [9].

Essas alterações no sistema de defesa antioxidante levam a um aumento nas concentrações de ROS, favorecendo danos no DNA, inclusive com dano no genoma fetal durante a gravidez. No caso da prole, os resultados podem ser explicados pela capacidade dos praguicidas passarem pela barreira placentária e desequilibrarem os sistemas celulares antioxidantes diretamente nos embriões e fetos. Mas também é provável que o aumento de ROS nas mães e especificamente na placenta [35] tenha um efeito direto na molécula de DNA das células dos conceitos, causando rupturas e mutações como vistas no sangue, fígado e células nervosas da prole.

Danos causados por ROS podem ser diminuídos pela ação de substâncias antioxidantes sintéticas ou naturais. A molécula de melatonina tem sido considerada um potente eliminador de radicais livres de oxigênio e de nitrogênio, incluindo hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen, nitric oxide and peroxyxynitrite anion. A molécula apresenta sítios reativos na porção indol que interagem com radicais livres, além de cadeias laterais metoxi e amida que contribuem para sua capacidade antioxidante [36]. Além disso, sua relativa lipofilia permite que atravesse membranas e chegue a diferentes compartimentos celulares, além de atingir diferentes tecidos no organismo [37]. Tais características têm sido associadas a efeitos antígeno-tóxicos da melatonina em diferentes tecidos [21]. Outros estudos têm demonstrado que a melatonina é um agente promissor na minimização de efeitos tóxicos induzidos por praguicidas [19,38, 39, 40].

Nossos resultados demonstram que a melatonina exógena pode proteger o genoma da ação indireta de praguicidas como a cipermetrina. A melatonina diminuiu danos genéticos induzidos pela cipermetrina no sangue e fígado das matrizes e no sangue, fígado e cérebro da prole. Segundo Bhatti et al. [17] a melatonina reduz danos hepáticos causados pela cipermetrina, enquanto Banke et al. [39] demonstraram que a melatonina pode reverter danos no tecido nervoso causados por peroxidação lipídica induzida pela cipermetrina. O aumento de ROS causado pela cipermetrina pode ter sido suplantado pela ação dos sistemas celulares antioxidantes associados à ação antioxidante da melatonina. No entanto, a administração de melatonina não foi eficiente contra os efeitos genotóxicos do metomil. O metabolismo do metomil pode explicar esses achados; o composto é convertido em acetoneitrila que, por sua vez, é convertida a cianeto pelos sistemas de detoxificação microsomal, principalmente no fígado [7]. O cianeto interfere na cadeia transportadora de elétrons e, em última instância, leva à

queda na síntese de ATP. Tal queda acaba levando a célula a diminuir a síntese de proteínas [41], dentre elas, aquelas enzimas que são sintetizadas *de novo* como resposta ao estresse oxidativo. Assim, nossa hipótese é de que os mecanismos de toxicidade do metomil acabam suplantando a ação da melatonina, mas são necessários mais estudos para se testar tal hipótese.

5. Conclusões

Nossos resultados demonstram que, mesmo em doses consideradas seguras, metomil e cipermetrina podem induzir danos genéticos em mães e na sua prole quando as matrizes são expostas diariamente a tais praguicidas durante a prenhes. Os efeitos genotóxicos de ambos os inseticidas parecem ser o resultado do aumento da concentração de radicais livres, causado pela interferência dos compostos e de seus metabólitos com enzimas que normalmente promovem a eliminação de agentes oxidantes. A melatonina diminuiu os efeitos genotóxicos da cipermetrina, mas não os do metomil. Pelo menos para a cipermetrina, a melatonina pode ser eficaz na proteção das células, não apenas dos efeitos genotóxicos, mas também de outros efeitos associados à produção de radicais livres. A exposição de mulheres grávidas a esse inseticida não é incomum, sobretudo nos países em desenvolvimento. Tal exposição gera riscos grandes à saúde da mãe e do feto e, conquanto ainda não se possa eliminar o uso de praguicidas na agricultura, terapias protetoras poderiam contribuir com a diminuição dos efeitos à saúde de mães e fetos expostos a substâncias como a cipermetrina.

6. Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

- [1] R.M. Rigotto, D.P. Vasconcelos, M.M. Rocha, Pesticide use in Brazil and problems for public health, *Cad Saúde Pública*. 30 (2014) 1360-1362, <https://doi.org/10.1590/0102-311XPE020714>.

- [2] G. Bapayeva, S. Kulbayeva, A. Zhumadilova, Effect of pesticides on human health, *J Clin Med Kaz.* 3 (2017) 128-132, <https://doi.org/10.23950/1812-2892-JCMK-00494>.
- [3] K.H. Kim, E. Kabir, S.A. Jahan, Exposure to pesticides and the associated human health effects, *Sci Total Environ.* 575 (2017) 525-535, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>.
- [4] M.E. Ueker, V.M. Silva, G.P. Moi, W.A. Pignati, I.E. Mattos, A.M.C. Silva, Parenteral exposure to pesticides and occurrence of congenital malformations: hospital-based case-control study, *BMC pediatrics.* 16 (2016) 125, <https://doi.org/10.1186/s12887-016-0667-x>.
- [5] C. Kalliora, C. Mamoulakis, E. Vasilopoulos, G.A. Stamatiades, L. Kalafati, R. Barouni, A. Tsatsakis, Association of pesticide exposure with human congenital abnormalities, *Toxicol Appl Pharmacol.* 346 (2018) 58-75 <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.03.025>.
- [6] S.A. Mansour, A.T.H. Mossa, T.M. Heikal, Effects of methomyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat erythrocytes: in vitro studies, *Toxicol Ind Health.* 25 (2009) 557-563, <https://doi.org/10.1177/0748233709349829>.
- [7] WHO, *Environ Health Criteria, Methomyl.* 178 (1996) 52.
- [8] R. C. Gupta, J.W. Crissman, *Agricultural Chemicals*, in: W.M. Haschek, C.G. Rousseaux, M.A. Wallig (Eds.), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*, third ed., Academic Press, 2013.
- [9] F.M. El-Demerdash, M.I. Yousef, K.S. I-Salhen, Protective effects of isoflavone on some biochemical parameters affected by cypermethrin in male rabbits, *J. Environ. Sci. Health C, Part B.* 38 (2003) 365-378, <https://doi.org/10.1081/PFC-120019902>.
- [10] A. Djeflal, M. Messarah, A. Boumendjel, L. Kadeche, A.E. Feki, Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats, *Toxicol Ind Health.* 31 (2015) 31-43, <https://doi.org/10.1177/0748233712468020>.
- [11] H. Ghorzi, H. Merzouk, L. Hocine, S A. Merzouk, Long term biochemical changes in offspring of rats fed diet containing alpha-cypermethrin, *Pestic Biochem Physiol.* 142 (2017) 133-140, <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.05.010>.
- [12] J.K. Bhardwaj, M. Mittal, P. Saraf, P. Kumari, Pesticides induced oxidative stress and female infertility: a review, *Toxin Rev.* (2018) 1-13, <https://doi.org/10.1080/15569543.2018.1474926>.
- [13] R.J. Reiter, D.X. Tan, A. Galano, Melatonin: exceeding expectations, *Physiology.* 29 (2014) 325-333, <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2014>.

- [14] D.X. Tan, L.C. Manchester, E. Esteban-Zubero, Z. Zhou, R.J. Reiter, Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism, *Molecules*. 20 (2015) 18886-18906, <https://doi.org/10.3390/molecules201018886>.
- [15] R.J. Reiter, J.C. Mayo, D.X. Tan, R.M. Sainz, M. Alatorre-Jimenez, L. Qin, Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers, *J Pineal Res*. 61 (2016) 253-278, <https://doi.org/10.1111/jpi.12360>.
- [16] J.S. Bhatti, I.P.S. Sidhu, G.K. Bhatti, Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes, *Mol Cell Biochem*. 353 (2011) 139-149, <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0780-y>.
- [17] G.K. Bhatti, I.P.S. Sidhu, N.K. Saini, S.K. Puar, G. Singh, J.S. Bhatti, Ameliorative role of melatonin against cypermethrin induced hepatotoxicity and impaired antioxidant defense system in Wistar rats, *IOSR J. Environ Sci Toxicol Food Technol*. 8 (2014) 39-48.
- [18] F. Ghayomi, M. Navaei-Nigjeh, M. Baeeri, M.A. Rezvanfar, M Abdollahi, A mechanistic approach for modulation of chlorpyrifos-induced toxicity in human lymphocytes by melatonin, coenzyme Q10, and vinpocetine, *Hum Exp Toxicol*. 35 (2016) 839-850, <https://doi.org/10.1177/0960327115607945>.
- [19] M.H. Asghari, M. Moloudizargari, H. Bahadar, M. Abdollahi, A review of the protective effect of melatonin in pesticide-induced toxicity, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 13 (2017) 545-554, <https://doi.org/10.1080/17425255.2016.1214712>.
- [20] S.B. Idris, S.F. Ambali, M.M. Suleiman, Ameliorative effects of melatonin on brain biochemical changes induced by subchronic co-administration of chlorpyrifos and cypermethrin in male Wistar rats, *J Toxicol Environ Health Sci*. 9 (2017) 1-6, <https://doi.org/10.5897/JTEHS2016.0377>.
- [21] I.D.D. de Sousa Coelho, C.J.C.L. Neto, T.G. dos Santos Souza, M.A. da Silva, C.A. Chagas, K.R.P. dos Santos, V.W. Teixeira, Á.A.C. Teixeira, Protective effect of exogenous melatonin in rats and their offspring on the genotoxic response induced by the chronic consumption of alcohol during pregnancy, *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagens*. 832 (2018) 52-60, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.06.018>.
- [22] R.P. Araldi, T.C. De Melo, T.B. Mendes, P.L. De Sá Júnior, B.H.N. Nozima, E.T. Ito, R. De Cassia Stocco, Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review, *Biomed Pharmacother*. 72 (2015) 74-82, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.004>.
- [23] WHO, Environmental Health Criteria, Cypermethrin. 82 (1989).

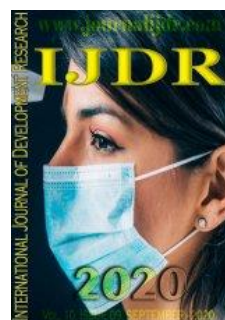
- [24] FAO/WHO, Methomyl Pesticide residues in food 2001 Toxicological evaluations. <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr08.htm>, 2001 (accessed 01 February 2019).
- [25] A. Agil, R.J. Reiter, A. Jiménez-Aranda, R. Ibán-Arias, M. Navarro-Alarcón, J.A. Marchal, A. Adem, G. Fernández-Vázquez, Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in Young Zucker diabetic fatty rats, *J. Pineal Res.* 54 (2013) 381-388, <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12012>.
- [26] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206-221, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J).
- [27] A.R. Collins, A.A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C.C. Smith, R. Stetina, The comet assay: topical issues, *Mutagenesis.* 23 (2008) 143-151, <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gem051>.
- [28] M. Hayashi, T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni, M. Ishidate Jr, The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutat Res.* 245 (1990) 245-249, [http://dx.doi.org/10.1016/0165-7992\(90\)90153-B](http://dx.doi.org/10.1016/0165-7992(90)90153-B).
- [29] OECD. Test Guideline 474. Mammalian erythrocyte micronucleus test, 2016. In: OECD Guideline for the testing of chemicals, Section 4: Health Effects, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264264762-en>.
- [30] P. Singh, P. Lata, S. Patel, A.K. Pandey, S.K. Jain, R. Shanker, A. Dhawan, Expression profiling of toxicity pathway genes by real-time PCR array in cypermethrin-exposed mouse brain, *Toxicol Mech Methods.* 21 (2011) 193-199, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.011>
- [31] F.D.G. Muranli, Genotoxic and cytotoxic evaluation of pyrethroid insecticides λ -cyhalothrin and α -cypermethrin on human blood lymphocyte culture, *Bull Environ Contam Toxicol.* 90 (2013) 357-363, <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0909-z>.
- [32] R. Valencia-Quintana, S. Gómez-Arroyo, J. Sánchez-Alarcón, M. Milić, J.L.G. Olivares, S.M. Waliszewski, M.E. alderón-Segura, Assessment of genotoxicity of Lannate-90® and its plant and animal metabolites in human lymphocyte cultures, *Arh Hig Rada Toksikol.* 67 (2016) 116-125, <https://doi.org/10.1515/aiht-2016-67-2763>.
- [33] H.I. Mokhtar, H.A. Abdel-Latif, R.H. Elmazoudy, W.M. Abdelwahab, M.I. Saad, Effect of methomyl on fertility, embryotoxicity and physiological parameters in female rats, *Journal of J Appl Pharm Sci.* 3 (2013) 109-119, <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.31220>.

- [34] I. Mukhopadhyay, D.K. Chowdhuri, M. Bajpayee, A. Dhawan, Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay, *Mutagenesis*.19 (2004) 85-90, <https://doi.org/10.1093/mutage/geh007>.
- [35] S. Gupta, A. Agarwal, J. Banerjee, J.G. Alvarez, The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review, *Obstet Gynecol Surv.* 62 (2007) 335-347, <https://doi.org/10.1097/01.ogx.0000261644.89300.df>.
- [36] D.X. Tan, R.J. Reiter, L.C. Manchester, M. Yan, M. El-Sawi, R. M. Sainz, J.C. Mayo, R. Kohen, M.C. Allegra, R. Hardelan, *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2 (2002) <https://doi.org/10.2174/1568026023394443>.
- [37] J.J. García, L. Lopez-Pingarrón, P. Almeida-Souza, A. Tres, P. Escudero, F.A. Garcia- Gil, D.X. Tan, R.J. Reiter, J.M. Ramirez, M. Bernal-Perez, Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review, *J. Pineal Res.* 56 (2014) 225-237, <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12128>.
- [38] A. Karamian, M. Shokrzadeh, A. Ahmadi, The potential chemoprotective effects of melatonin against genotoxicity induced by diazinon in human peripheral blood lymphocytes, *Toxicol Ind Health.* 32 (2013) 360-366, <https://doi.org/10.1177/0748233713500824>.
- [39] I.S. Banke, A.S. Folorunsho, B. Mohammed, S.M. Musa, O. Charles, A.J. Olusegun, Effects of melatonin on changes in cognitive performances and brain malondialdehyde concentration induced by sub-chronic co-administration of chlorpyrifos and cypermethrin in male Wistar rats, *Asian Pac J Trop Biomed.* 4 (2014) 318-323, <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C55>.
- [40] L.L.D. Almeida, Á.A. Teixeira, N.S. Bezerra, V. Wanderley-Teixeira, Protective effect of melatonin on poisoning by herbicides, *Pesqui Vet Bras.* 36 (2016) 174-180, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2016000300005>.
- [41] W.W. Wheaton, N.S. Chandel, Hypoxia regulates cellular metabolism, *Am J Physiol Cell Physiol.* 300 (2010) C385-93, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00485.2010>.

CAPÍTULO III

**Efeito hepatoprotetor da melatonina exógena em ratas adultas
expostas aos inseticidas metomil e cipermetrina durante a prenhez**

Artigo aceito para publicação na revista
International Journal of Development Research



**EFEITO HEPATOPROTETOR DA MELATONINA EXÓGENA EM RATAS
ADULTAS EXPOSTAS AOS INSETICIDAS METOMIL E CIPERMETRINA
DURANTE A PRENHEZ**

Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho^{a,*}; Ismaela Maria Ferreira de Melo^a; Jeanderson
Marcelino da Silva^b; Katharine Raquel Pereira dos Santos^b; Francisco Carlos Amanajás
de Aguiar Júnior^b; Yuri Mateus Lima de Albuquerque^a; Álvaro Aguiar Coelho
Teixeira^a; Valéria Wanderley Teixeira^a

^aDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco
(UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife - PE, Brasil

^bLaboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal
de Pernambuco (UFPE), Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo
Antão - PE, Brasil

***Autor para correspondência:**

Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho (K.S.N. Marinho), Rua Dom Manoel de
Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil, CEP: 52171-900. Telefone: +55 81
98873-1091.

E-mail: Ketsiamarinho@gmail.com

RESUMO

Este estudo avaliou o efeito hepatoprotetor da melatonina exógena em ratas adultas prenhez expostas ao metomil e à cipermetrina. 30 ratas adultas foram divididas nos grupos: C – controle; metomil que recebeu 0,02 mg/kg/dia; Cipermetrina que recebeu 0,05 mg/kg/dia; metomil + mel que recebeu 0,02 mg/kg/dia de metomil e 10 mg/kg/dia de melatonina; cipermetrina + mel que recebeu 0,05 mg/kg/dia de cipermetrina e 10 mg/kg/dia de melatonina. Ao final da gestação o fígado foi removido para análises

histomorfométricas e imunohistoquímicas (PCNA e IL-1 β). A análise histopatológica demonstrou padrões de normalidade no fígado, sem a presença de infiltrados inflamatórios ou áreas apoptóticas e necróticas. Porém, foi observado hepatócitos hipertróficos e menor número de células (hepatócitos), como também elevação nos níveis de IL-1 β e PCNA. Por sua vez, a melatonina parece ser um agente promissor contra a hepatotoxicidade relatada para tais inseticidas.

Palavras-chave: carbamatos; piretroides; fígado, histomorfometria, imunohistoquímica, prenhez; antioxidante.

ABSTRACT

This study evaluated the hepatoprotective effect of exogenous melatonin in pregnant adult rats exposed to methomyl and cypermethrin. 30 adult rats were divided into groups: C - control; methomyl that received 0.02 mg/kg/day; Cypermethrin that received 0.05 mg/kg/day; methomyl + melatonin that received 0.02 mg/kg/day of methomyl and 10 mg/kg/day of melatonin; cypermethrin + melatonin that received 0.05 mg/kg/day of cypermethrin and 10 mg/kg/day of melatonin. At the end of pregnancy, the liver was removed for histomorphometric and immunohistochemical analyzes (PCNA and IL-1 β). Histopathological analysis showed normal patterns in the liver, without the presence of inflammatory infiltrates or apoptotic and necrotic areas. However, hypertrophic hepatocytes and a greater number of cells (hepatocytes) were observed, as well as increased levels of IL-1 β and PCNA in the liver of the rats that received insecticides. These effects were prevented by melatonin. Thus, melatonin appears to be a promising agent against the hepatotoxicity reported for such insecticides.

Keywords: pesticides, histomorphometry, immunohistochemistry, pregnancy; antioxidant.

1. Introdução

Nas últimas décadas o Brasil se tornou um dos países que mais consome agrotóxicos no mundo. Esse crescimento na utilização de defensivos agrícolas está relacionado à alta produtividade por ter a agricultura como uma das principais atividades econômicas do país (ANVISA, 2016). No entanto, o uso excessivo de agrotóxicos pode levar a sérios riscos à saúde humana e a destruição da biodiversidade (MAHMOOD et al., 2016; GURGEL et al., 2017). Uma variedade de danos à saúde pode ocorrer em razão da exposição: disfunções neurológicas, problemas endócrinos, câncer e doenças hepáticas (SINGH et al., 2015; LANDRIGAN, 2018; YADAV; SANKHLA; KUMAR, 2019).

Outro ponto crítico com a utilização de agrotóxicos é sua exposição durante o período gestacional. A exposição de mulheres grávidas a essas substâncias químicas não é algo incomum e podem ocorrer de modo ocupacional ou acidental (WHYATT et al., 2005; LANDRIGAN et al., 2018). Tal exposição pode desencadear em diferentes respostas no organismo e representa um grande risco para a saúde materna (UEKER et al., 2016; KALLIORA et al., 2018). Embora estudos em humanos sobre os efeitos de agrotóxicos durante a gravidez sejam limitados, dados experimentais em animais relatam diversas alterações metabólicas no organismo materno (MOKHTAR et al., 2013; SINGH et al., 2015; ZHOU et al., 2018).

Os agrotóxicos metomil e cipermetrina são largamente utilizados na agricultura mundial. A escolha dessas substâncias químicas deve-se ao fato da sua forte atividade biológica, porém, são compostos considerados tóxicos e de uso perigoso (CHARPENTIER; FOURNIER, 2001). O metomil é um carbamato que, causa perturbação na transmissão do impulso nervoso nos organismos-alvo por inibição da enzima acetilcolinesterase (VAN SCOY et al., 2013; ANVISA, 2018). Já a cipermetrina pertence à classe química dos piretróides, cujo efeito está relacionado com alterações na propagação do impulso nervoso ao interferir nos receptores GABA (ABALIS; ELDEFRAWI; ELDEFRAWI, 1986).

Tanto o metomil quanto a cipermetrina são reportados na literatura como substâncias hepatotóxicas com efeitos deletérios no fígado (SOLIMAN; ATTIA; ELLA, 2015; PATIL et al., 2016). Podem afetar o metabolismo celular e o sistema de permeabilidade e desintoxicação do fígado, alterando a atividade de enzimas antioxidantes, importantes na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (EL-

DEMERDASH et al., 2013; SANKAR, 2017). A hepatotoxicidade do metomil e cipermetrina está intimamente relacionada ao seu metabolismo. Ambos são metabolizados no fígado e isso pode levar a danos e inflamação hepática (WHO, 1996; ABDOL; SAYED, 2019). A metabolização do metomil ocorre principalmente no fígado de maneira relativamente rápida gerando resíduos de acetonitrila que, por sua vez, é convertida a cianeto pelos sistemas de detoxificação microsomal, o qual é bastante tóxico para o organismo (WHO, 1996). Por sua vez, a cipermetrina também resulta na formação de cianetos, que podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo (WIELGOMAS; KRECHNIK, 2007).

O estresse oxidativo provenientes da ação de agrotóxicos pode ser combatido pela ação de substâncias de natureza antioxidante (DJEFFAL et al., 2015; GHAYOM et al., 2016; IDRIS; AMBALI; SULEIMAN, 2017). A Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um neuro-hormônio produzido principalmente na glândula pineal e que apresenta propriedades antioxidantes. O seu efeito protetor estimula a ação de diversas enzimas com potencial antioxidante e suprime a atividade de enzimas pró-oxidantes, protegendo as células de danos oxidativos. (REITER et al., 2014; TAN et al. 2015; REITER et al., 2016). Estudos têm sugerido o tratamento com melatonina na prevenção contra os efeitos causados pela exposição aos agrotóxicos (BHATTI et al., 2011; BHATTI et al. 2014; ASGHARI et al., 2017; IDRIS; AMBALI; SULEIMAN, 2017; MARINHO et al., 2019).

No entanto, pouco se sabe a respeito do efeito hepatoprotetor da melatonina exógena no fígado de ratas prenhes expostas aos agrotóxicos metomil e cipermetrina durante a prenhez. Diante dessas informações, o presente estudo teve por objetivo avaliar a ação da melatonina exógena, por meio de análises morfológicas e imuno-histoquímicas, no fígado de ratas adultas prenhes expostas aos agrotóxicos metomil e cipermetrina.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Foram utilizadas 30 ratas albinas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 90 dias de idade, virgens, pesando aproximadamente 230 ± 30 g, provenientes do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal

Rural de Pernambuco (UFRPE). Os animais foram mantidos em caixas adequadas de polipropileno com ambiente climatizado à temperatura controlada de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, expostas a um fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro, com alimentação e água *ad libitum*. As ratas foram acasaladas e divididas aleatoriamente nos grupos experimentais. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE (CEUA – UFRPE), com licença de número 109/2016.

2.2. Acasalamento e diagnóstico da prenhez

Para o acasalamento, sempre no início da noite (18:00h), as ratas foram colocadas para acasalar na proporção de um macho para cada duas fêmeas. No dia seguinte, pela manhã (6h), foram realizados exames colpocitológicos para a confirmação do acasalamento e diagnóstico da prenhez. Após a confirmação do acasalamento, com a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal ao exame microscópico, as primeiras 24 horas foram consideradas como primeiro dia de prenhez.

2.3. Grupos experimentais

Após a confirmação do acasalamento as ratas foram distribuídas aleatoriamente em cinco grupos, contendo seis animais cada: Controle – Ratas prenhes que receberam água destilada; Metomil – Ratas prenhes que receberam metomil na concentração de 0,02 mg/kg/dia; Cipermetrina – Ratas prenhes que receberam cipermetrina na concentração de 0,05 mg/kg/dia; Metomil + Mel – Ratas prenhes que receberam 0,02 mg/kg/dia de metomil combinado com 10 mg/kg/dia de melatonina; Cipermetrina + Mel – Ratas prenhes que receberam 0,05 mg/kg/dia de cipermetrina combinado com 10 mg/kg/dia de melatonina.

2.4. Administração dos inseticidas

As matrizes dos grupos Metomil, Cipermetrina, Metomil + Mel e Cipermetrina + Mel receberam as doses dos inseticidas metomil (Lannate BR[®] DuPont, 215 g/L) e cipermetrina (Cyprin 250 CE[®] Nufarm, 250 g/L) diluídos em água, de acordo com a IDA (ingestão diária aceitável), recomendados pelo Comitê Conjunto FAO/OMS (WHO, 1989; FAO/WHO, 2001). A administração foi realizada por meio de gavagem intragástrica durante todo o período gestacional.

2.5. Administração da melatonina

Os grupos Metomil + Mel e Cipermetrina + Mel receberam 10 mg/kg/dia de melatonina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) durante toda a prenhez. Para administração, a melatonina foi dissolvida na água de beber dos animais em tratamento no período da noite (18h) e retirada no dia seguinte (06h). As garrafas de água foram envolvidas com papel alumínio para proteção contra a luz durante todo o tratamento (AGIL et al., 2013).

2.6. Análise Histomorfométrica

Após o período de gestação as matrizes foram anestesiadas com os anestésicos Cetamina (80 mg/kg) e Xilazina (8 mg/kg) associada ao Tiopental (100 mg/kg) por injeção intramuscular e retirado o fígado para análises. Os fígados coletados foram imersos em formol tamponado a 10%, permanecendo por 24 horas. Posteriormente, esses materiais foram processados seguindo a técnica histológica de rotina e incluídos em parafina. Os blocos obtidos foram cortados à espessura de 4 μm e posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação histomorfométrica. As lâminas histológicas confeccionadas foram fotografadas através do programa Motic® Imagens Plus 2.0, com uma câmera digital acoplada ao microscópio óptico (Olympus BH-2, Japan) e conectada ao computador. Foi utilizada uma lâmina por animal, sendo obtidas 20 fotomicrografias/campos por lâmina, em aumento total de 400X. As fotomicrografias obtidas foram submetidas às devidas mensurações utilizando o software *ImageJ* versão 1.44 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

As seguintes mensurações foram consideradas por animal: número de hepatócitos (NH), número de células de Kupffer (NCK), área celular dos hepatócitos (ACH) e área nuclear dos hepatócitos (ANH). Um total de 50 hepatócitos foi utilizado por animal para a mensuração da ACH e ANH. As medidas das áreas foram mensuradas em micrômetros (μm^2) (MARINHO et al., 2017).

2.7 Imunohistoquímica (PCNA e IL-1 β)

Para avaliar a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e interleucina-1 (IL-1 β), inicialmente, as lâminas com cortes de 4 μm foram desparafinizadas e reidratadas em xilol e alcoóis, respectivamente. A recuperação

antigênica foi realizada através de uma solução tampão de citrato (pH 8,0) a alta temperatura no micro-ondas por 5 minutos. A peroxidase endógena foi inibida por uma solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol. A reação inespecífica antígeno-anticorpo foi bloqueada pela incubação das lâminas em tampão fosfato-salino (PBS) e albumina de soro bovino a 5% (BSA) por 1 hora. Foram utilizados os anticorpos PCNA (sc-56) e o anti-IL-1 β (sc-32294), ambos da Santa Cruz Biotechnology, diluídos na proporção de 1:100 e 1:50, respectivamente. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS / 1% de BSA. Os cortes foram incubados com os respectivos anticorpos, no *overnight*, e posteriormente incubados com streptavidina-peroxidase, sendo revelados com substrato cromógeno 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) e contra-corados com Hematoxilina de Harris.

As imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo Sony acoplada ao microscópio OLYMPUS BX-50. A quantificação do IL-1 β foi realizada no aplicativo GIMP 2.0 por meio do histograma RGB (vermelho-verde-azul), que se baseia na intensidade da luminescência em que os tons de pixel da imagem variam de 0 a 255, e o tom 0 representa a (menos luminescência), enquanto o tom 255 representa a branco absoluto (maior luminescência) (LEE et al., 2001; OBERHOLZER et al., 1996). Para o PCNA, a contagem das células foi realizada usando um retículo WEIBEL de 25 pontos, em uma ocular de 10x. Foram utilizadas três lâminas por grupo, sendo analisados quatro campos/lâmina. Em cada campo, 300 células foram contadas e transformadas em porcentagem de células marcadas (WEIBEL 1963).

2.8. Análise estatística

Os valores obtidos com as devidas mensurações foram avaliados estatisticamente através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($p>0,05$).

3. Resultados

3.1. Análise Histomorfométrica

A análise microanatômica no tecido hepático dos animais dos grupos experimentais estava dentro dos padrões de normalidade, sem a presença de infiltrados inflamatórios ou áreas apoptóticas e necróticas no fígado. O tecido hepático apresentou-se com cordões de hepatócitos anastomosados e dispostos ao redor dos lóbulos hepáticos no

parênquima (Figura 1B, C, D e E). Entre os cordões hepáticos também foi possível observar os capilares sinusóides com a presença de células endoteliais e células de kupffer preservadas (Fig. 1E). Não foi possível a visualização do espaço de Disse, que separa os hepatócitos dos sinusóides, no qual estão presentes as células de Ito. Também foram visualizados limites bem definidos das estruturas que compõem o espaço porta.

De acordo com a análise morfométrica dos grupos analisados tanto o metomil quanto a cipermetrina induziram nas matrizes um aumento significativo no número de hepatócitos (NH) e na área celular desses hepatócitos (ACH) ($p < 0,001$). Em relação a área nuclear dos hepatócitos (ANH) foi observado uma diminuição de área nos mesmos animais em estudo ($p < 0,001$). A contagem de células de Kupffer não apresentou alterações no número total de células por animal em todos os grupos experimentais analisados. Por sua vez, o tratamento com melatonina exógena (10 mg/kg/dia) foi capaz de diminuir as alterações morfométricas encontradas no número de hepatócitos (NH), na área nuclear desses hepatócitos (ANH) ($p < 0,001$) e na sua área celular (ACH) ($p < 0,04$) nos animais expostos ao metomil e cipermetrina (Tabela 1).

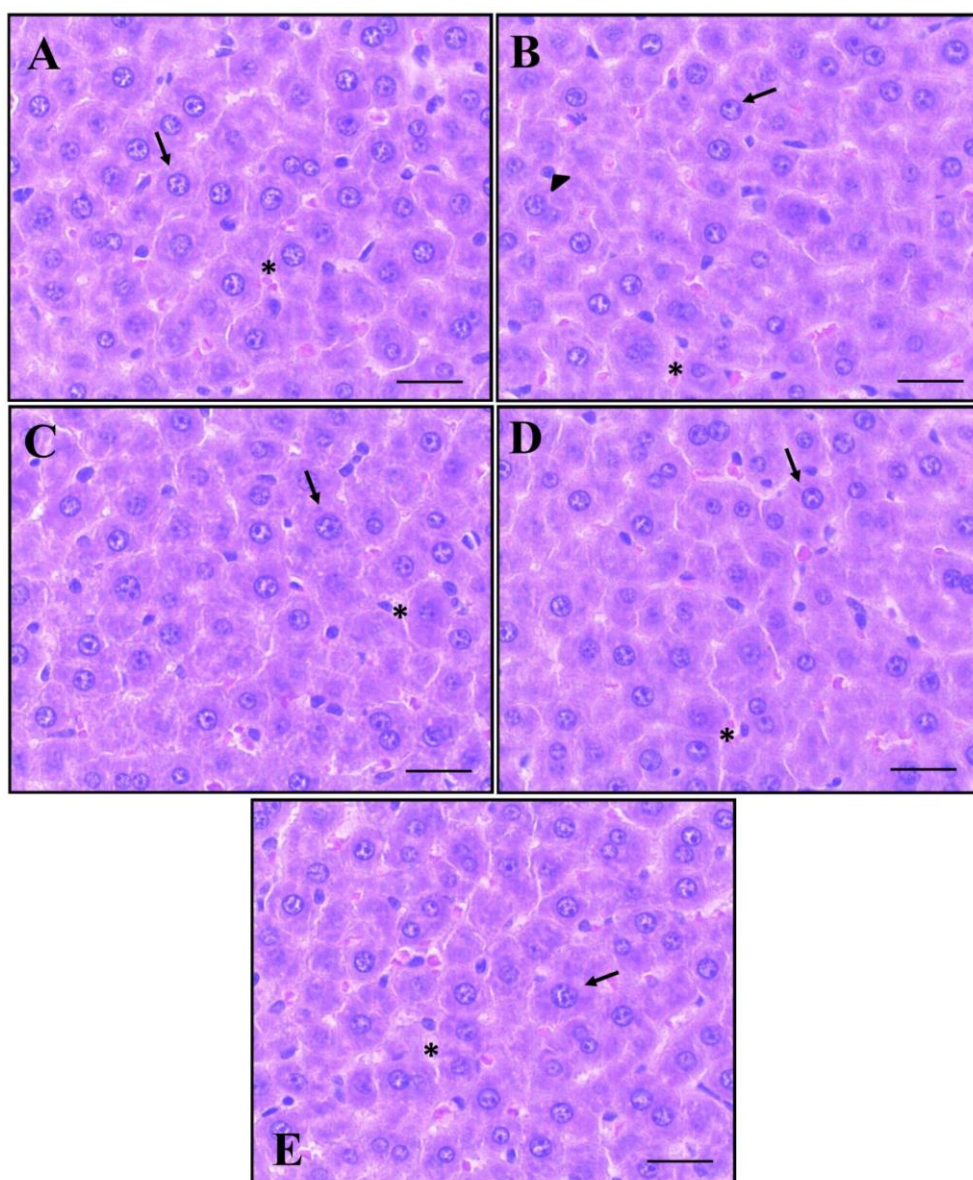


Figura 1: Fotomicrografia do fígado das ratas prenhes dos grupos experimentais. A) controle; B) Metomil; C) Cipermetrina; D) Metomil + Mel; E) Cipermetrina + Mel. Seta: Hepatócitos; Ponta de flecha: célula de Kupffer; Asterisco: capilares sinusoidais. Coloração em H&E. Aumento total em 400 x. Barra de escala = 100 μ m.

Tabela 1: Análise morfométrica do fígado das matrizes expostas aos agrotóxicos metomil e cipermetrina durante o período gestacional.

	Grupos				
	Controle	Metomil	Cipermetrina	Metomil + Mel	Cipermetrina + Mel
NH	42,24 ± 6,37 ^a	59,20 ± 6,62 ^b	59,10 ± 12,88 ^b	40,20 ± 6,94 ^a	43,98 ± 6,70 ^a
ACH	333,26 ± 68,64 ^a	358,51 ± 90,84 ^b	349,88 ± 87,75 ^b	341,11 ± 72,07 ^a	334,08 ± 71,56 ^a
ANH	56,20 ± 9,39 ^a	52,46 ± 10,91 ^b	49,32 ± 9,32 ^b	59,53 ± 8,89 ^a	57,35 ± 8,49 ^a
NCK	16,90 ± 4,33 ^a	16,74 ± 4,01 ^a	17,10 ± 5,39 ^a	17,30 ± 4,47 ^a	17,24 ± 4,99 ^a

(NH) Número de hepatócitos, (ACH) área citoplasmática dos hepatócitos, (ANH) área do núcleo dos hepatócitos e (NCK) número de células de Kupffer. Os valores de ACH e ANH são expressos em μm^2 . Os dados estão expressões em média ± desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($p < 0,05$).

3.2. Análise da imunohistoquímica das ratas prenhes

A imunohistoquímica para o IL- 1β revelou fraca marcação no fígado das matrizes do grupo controle (Fig. 2A). Porém, foi observada uma forte marcação no fígado das matrizes independente do inseticida administrado (Fig. 2B e C). Já no tratamento com melatonina, verificaram-se apenas poucas áreas com imunomarcação (Fig. 2D e E). A quantificação mostrou redução significativa dessa citocina no fígado das matrizes dos grupos que receberam melatonina (Fig. 2F).

Houve fraca marcação para o PCNA no fígado das matrizes do grupo controle (Fig. 3A). Em contrapartida, a marcação do PCNA foi fortemente expressada no fígado das matrizes dos grupos que receberam apenas os inseticidas (Fig. 3B e C). O tratamento com melatonina promoveu uma marcação moderada (Fig. 3D e E). A contagem de células PCNA positivas revelou aumento significativo no fígado das

matrizes que receberam metonil e cipermetrina, e redução significativa no fígado das ratas dos grupos que receberam melatonina, sem, no entanto, atingir valores similares aos observados no grupo controle (Fig. 3F).

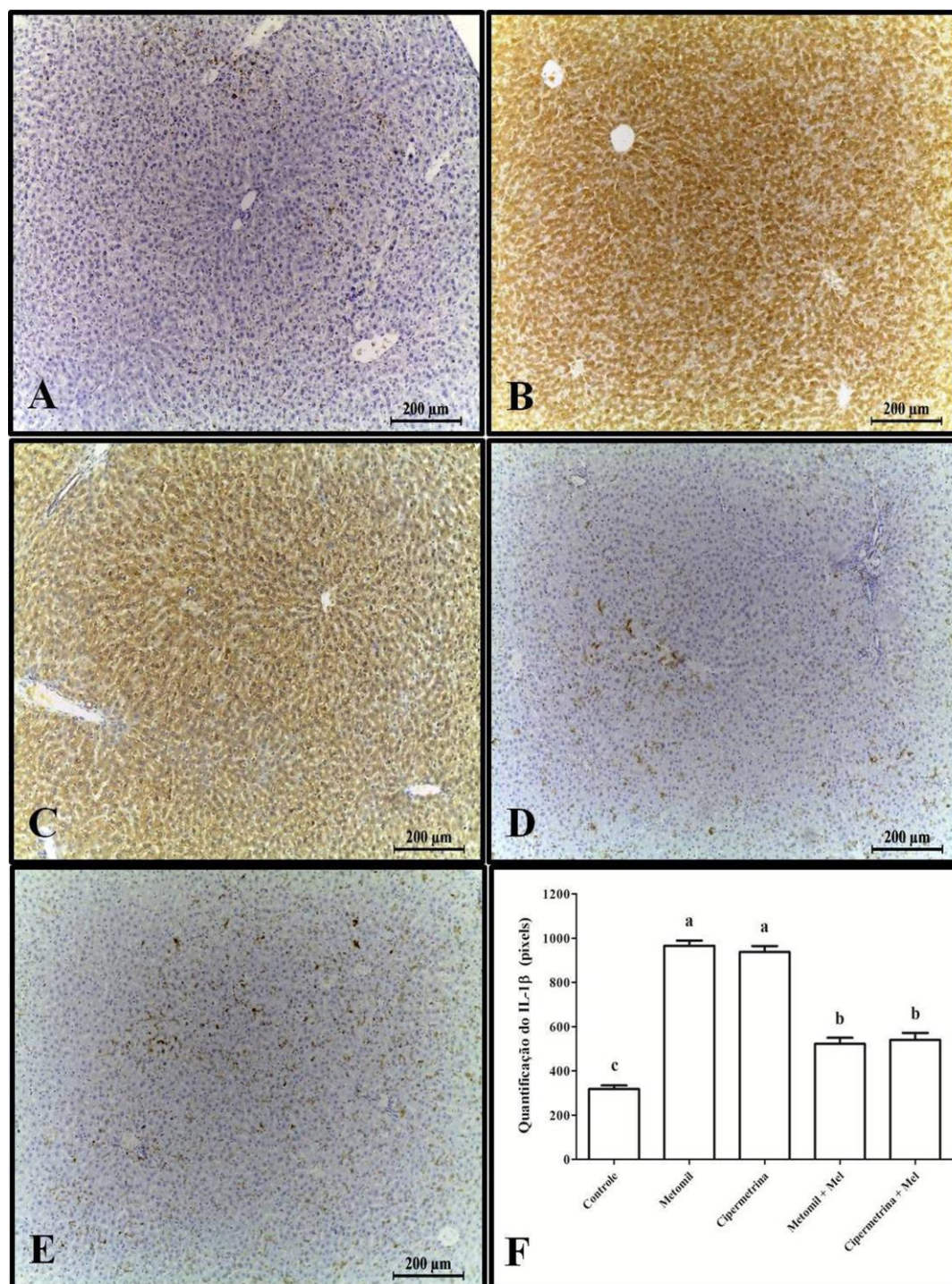


Figura 2. Imunohistoquímica para o IL-1 β no fígado das matrizes dos grupos experimentais. A) controle; B) Metomil; C) Cipermetrina; D) Metomil + Mel; E) Cipermetrina + Mel. Notar forte marcação em B e C, em relação aos demais grupos. F) Quantificação em pixels da imunomarcação. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$).

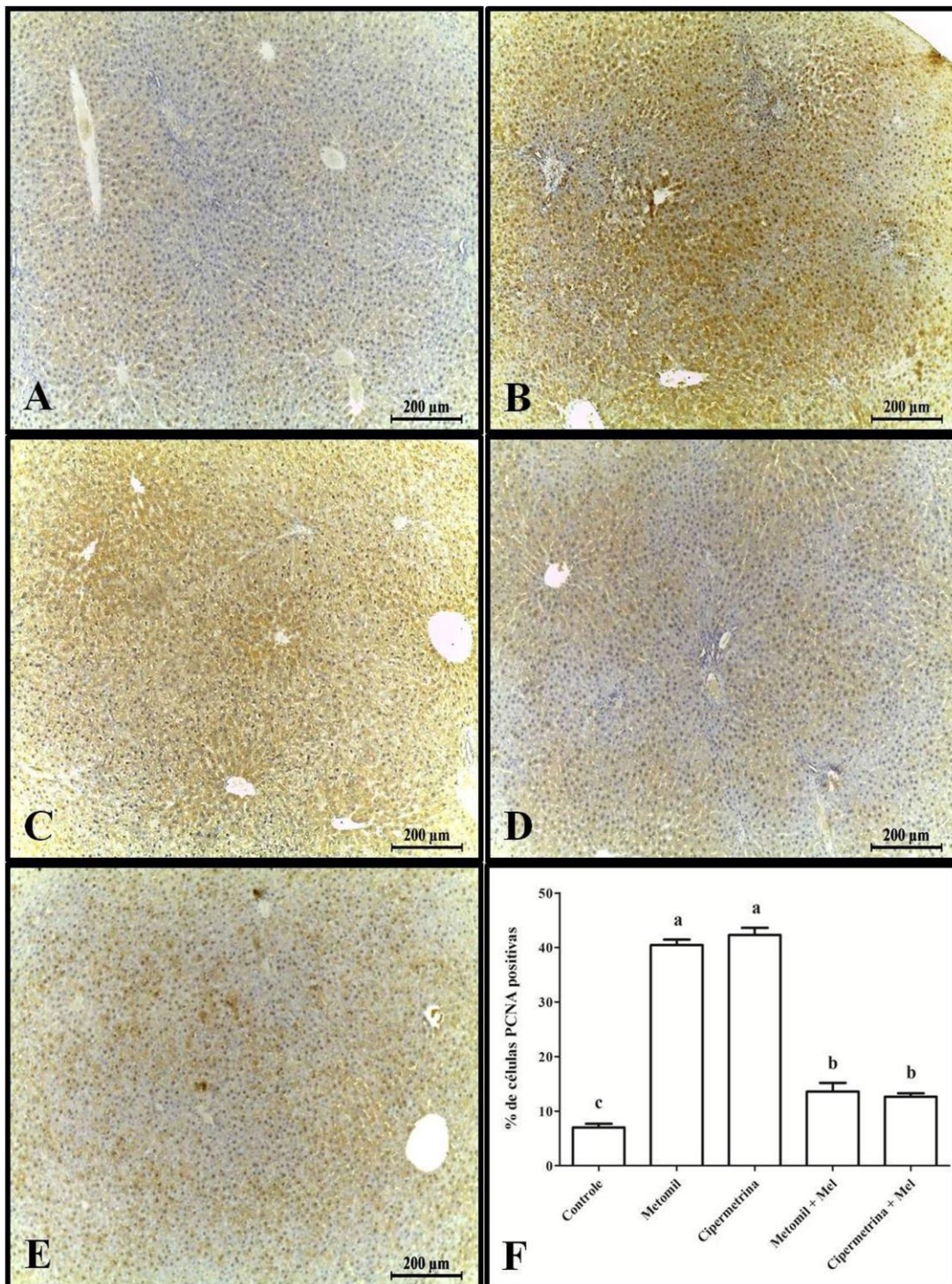


Figura 3. Imunohistoquímica para proliferação celular no fígado das matrizes dos grupos experimentais. A) controle; B) Metomil; C) Cipermetrina; D) Metomil + Mel; E) Cioermetrina + Mel. Notar forte marcação em B e C e moderada em D e F, em relação ao grupo controle. F) Quantificação em pixels da imunomarcação. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Mann Whitney ($p < 0,05$).

4. Discussão

Nossos resultados demonstram que tanto o metomil quanto a cipermetrina induziram alterações em quase todos os parâmetros considerados para o fígado neste estudo. Algumas pesquisas evidenciam os efeitos da exposição ao metomil e cipermetrina durante a gestação, que afeta o estado metabólico materno e causa comprometimento de diversos órgãos, sendo o fígado um dos órgãos mais afetados (MOKHTAR et al., 2013; KHATAB et al., 2016; MARINHO et al., 2019). No entanto, a ação hepatotóxica desses agrotóxicos em ratas prenhes expostas a doses consideradas seguras ainda não havia sido demonstrada na literatura. O fígado por desempenhar um papel essencial na metabolização e desintoxicação dessas substâncias químicas no organismo é o principal alvo da ação dos agrotóxicos (MOSSA et al., 2015). Diversos danos no tecido hepático como, degeneração vacuolar, aumento dos capilares sinusóides, infiltrados linfocitários e degeneração dos cordões hepáticos são relatados para o metomil e cipermetrina (EL-DEMERDASH et al., 2012; SOLIMAN; ATTIA; ELLA, 2015; MANSOUR et al., 2018). Porém, esses achados são em doses superiores as administradas nesse estudo, o que explicaria a ausência desses danos histopatológicos em nossos resultados.

Maulood et al. (2017) evidencia que a exposição ao metomil pode causar hipertrofia nos hepatócitos por aumento do estresse oxidativo via mecanismo de radicais livres. Efeito semelhante é descrito para a cipermetrina (ABDUL-HAMID et al., 2017). A administração do metomil e cipermetrina em nosso estudo apresentou resultados semelhantes aos descritos anteriormente, com aumento da área citoplasmática dos hepatócitos (hipertrofia celular), que pode ser uma consequência do aumento de radicais livres. Essa hepatotoxicidade reportada para o metomil e cipermetrina está intimamente relacionada ao seu metabolismo, que acontece principalmente no fígado. A metabolização do metomil ocorre de maneira relativamente rápida e gera resíduos de acetonitrila, que é bastante tóxico para o organismo (WHO, 1996). Por sua vez, a cipermetrina resulta na formação de cianetos, que podem induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e perturbar o sistema de desintoxicação no fígado (WIELGOMAS; KRECHNIAK, 2007; GREWAL et al., 2009; CHANI e JASIM, 2016). De acordo com El-demerdash et al. (2014) e Sankar et al. (2012), o aumento de espécies reativas de oxigênio é apontado como um dos possíveis mecanismos que contribuem para o aparecimento de alterações no tecido hepático após a exposição a esses agrotóxicos.

O aumento do estresse oxidativo também induz respostas inflamatórias por ativação de fatores de transcrição sensíveis ao redox, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B), aumentando a síntese de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para o aparecimento de processos inflamatórios no fígado (FORRESTER et al., 2018). Em nosso estudo, esses fatores de transcrição poderiam ter sido ativados pelo aumento do estresse oxidativo, induzidos pelo metomil e cipermetrina, produzindo assim os níveis elevados de IL-1 β observado. O estresse oxidativo nos hepatócitos é um desencadeante para a secreção da IL-1 β pelas células de Kupffer que, por sua vez, podem gerar uma resposta inflamatória, favorecendo o surgimento da inflamação hepática (ABDOU E DISSE, 2019; BARBIER et al., 2019). Abdou e Sayed (2019) relatam que a cipermetrina aumenta os danos inflamatórios no fígado com elevação nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), resultados que são semelhantes ao deste estudo.

A exposição à agrotóxicos estimulam a síntese de DNA e aumentam a expressão do PCNA em diferentes células (NISHI, HUNDAL, 2013; VENTURA et al., 2016). A exposição ao metomil e a cipermetrina pode induzir o aumento da proliferação celular nos hepatócitos, como foi observado em nosso estudo com o aumento do número de hepatócitos na análise morfométrica e aumento do PCNA. O aumento da proliferação celular no fígado após a exposição aos agrotóxicos, segundo Randi et al. (2003), está relacionado à indução da transcrição de genes específicos, como os proto-oncogenes (fos, myc e jun) e a jusante das vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK). Os proto-oncogenes apresentam um papel importante na regulação de eventos que levam a proliferação e diferenciação em células normais (Randi et al., 2003). Giribaldi et al. (2012) afirma que, esse aumento da proliferação celular em resposta a ação dos agrotóxicos pode aumentar o risco de mutações dentro das células-alvo.

Alguns estudos evidenciam que danos hepáticos ocasionados pela exposição aos agrotóxicos podem ser diminuídos pela ação de substâncias antioxidantes naturais ou sintéticas (BUYUKOKUROGLU et al., 2008; BHATTI et al., 2014; ALMEIDA et al., 2016; ASGHARI et al., 2017). A molécula de melatonina é considerada como um poderoso antioxidante natural, capaz de penetrar em todos os compartimentos celulares, que ajuda o organismo na eliminação de radicais livres e produção de enzimas com potencial antioxidante (REITER et al., 2016). Os radicais livres conhecidos por serem

eliminados pela melatonina incluem, o radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e ânion peroxinitrito, que contribuem para a resposta inflamatória e destruição tecidual associada. (REITER et al., 2000). De acordo com Ghayom et al. (2016), a melatonina é capaz de reduzir a geração de espécies reativas de oxigênio geradas pela exposição à praguicidas que, conseqüentemente, aumentam o estresse oxidativo levando à oxidação de lipídios e proteínas, ocasionando danos a molécula de DNA e a célula.

Os nossos resultados evidenciam uma melhora no fígado dos animais após o tratamento com a molécula de melatonina, demonstrando a sua capacidade em diminuir as alterações hepáticas ocasionadas pela exposição aos inseticidas metomil e cipermetrina. Bhatti et al. (2014) afirmam que a hepatotoxicidade induzida pela cipermetrina pode ser revertida com a administração de melatonina exógena. Ainda de acordo com Bhatti et al. (2014), a administração da melatonina exógena protege a integridade estrutural da membrana dos hepatócitos, assim como a atividade de importantes enzimas dos sistemas de detoxificação microsomal.

Em relação a redução da expressão da citocina IL-1 β em nosso estudo, de acordo com Moloudizargari et al. (2019), a molécula de melatonina é importante por auxiliar na regulação dos processos inflamatórios, principalmente, através da regulação do status redox celular e da via do fator nuclear- κ B (NF- κ B), e desta forma, diminui a expressão de citocinas pró-inflamatórias, a exemplo da IL-1 β . No que diz respeito a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) no tecido hepático, a melatonina pode ter promovido a diminuição da proliferação celular através da regulação das vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK), a exemplo da via de sinalização ERK (RANDI et al., 2003; LIANG et al., 2009; BONOMINI et al., 2018). Devido a sua ação nos mecanismos celulares que incluem a regulação das vias de ativação do NF- κ B e regulação da proliferação celular, a molécula de melatonina é considerada uma substância promissora com potencial hepatoprotetor, atuando por meio de diferentes mecanismos para combater o aumento do estresse oxidativo (ZHANG et al., 2017; BONOMINI et al., 2018; REITER ET AL., 2020).

Conclusão

Nossos resultados sugerem que, a administração dos inseticidas metomil e cipermetrina durante a gestação, mesmo em doses consideradas seguras para utilização, mostrou-se ser hepatotóxico. A hepatotoxicidade de ambos inseticidas está intimamente

relacionada a metabolização desses praguicidas no fígado e a interferência no sistema de desintoxicação microssomal, causado pelo aumento da concentração de radicais livres no organismo. A molécula de melatonina parece ser um agente promissor contra a hepatotoxicidade relatada para os inseticidas metomil e cipermetrina durante a prenhez. Tal exposição durante a gestação representa risco para a saúde materna e, conseqüentemente, para o feto, no entanto, como o uso dessas substâncias na agricultura ainda não pode ser eliminada, a utilização de alternativas terapêuticas se torna uma possibilidade para minimizar os possíveis efeitos no fígado decorrentes dessa exposição.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

Abalis, I. M.; Eldefrawi, M. E.; Eldefrawi, A. T. (1986) Effects of insecticides on GABA-induced chloride influx into rat brain microsacs. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, v. 18, n. 1, p. 13-23.

Abdou, R. H., & Sayed, N. (2019) Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Nano-Selenium against Cypermethrin-Induced Liver Toxicity. *CellBio*, v. 8, n. 04, p. 53.

Alharbi, F. K. (2018) Effect of Methomyl on Fetal Development in Female Rats. *Egypt. J. Chem. Environ. Health*, v. 4, n. 1, p. 32- 42.

Almeida, L. L. D., Teixeira, Á. A., Bezerra, N. S., & Wanderley-Teixeira, V. (2016) Protective effect of melatonin on poisoning by herbicides. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, n. 3, p. 174-180.

Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice monográfico: M17 – Metomil - Anvisa. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/M17%2B%2BMetomil.pdf/35b28b22-55bc-4088-8c0e-946684ffcb98>. Acesso em: 20/05/2018.

Asghari, M. H., Moloudizargari, M., Bahadar, H., Abdollahi, M. (2017) A review of the protective effect of melatonin in pesticide-induced toxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, v.13, n. 5, p. 545-554.

Barbier, L., Ferhat, M., Salamé, E., Robin, A., Herbelin, A., Gombert, J. M., Barbarin, A. (2019) Interleukin-1 family cytokines: keystones in liver inflammatory diseases. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 2014.

Bonomini, F., Borsani, E., Favero, G., Rodella, LF, & Rezzani, R. (2018) A suplementação dietética de melatonina pode ser uma abordagem preventiva / terapêutica promissora para uma variedade de doenças hepáticas. *Nutrients*, v. 10, n. 9, p. 1135.

Buyukokuroglu, Mehmet Emin et al. (2008) Antioxidative role of melatonin in organophosphate toxicity in rats. *Cell biology and toxicology*, v. 24, n. 2, p. 151-158.

Chani, J. M., Jasim, N. Z. (2016) Hepatoprotective effect of *matricaria chamomilla* hot aqueous extract against methomyl 90%-induced hepatotoxicity in mice. *Al-Kufa University Journal for Biology*, v. 8, n. 2, p. 185-195.

El-Demerdash, F., ATTIA, A. A., Elmazoudy, R. H. (2012) Biochemical and histopathological changes induced by different time intervals of methomyl treatment in mice liver. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 47, n.12, p. 1948-1954.

Elser, B. A., Kayali, K., Dhakal, R., O'Hare, B., Wang, K., Lehmler, H. J., Stevens, H. E. (2020) A exposição materna combinada à cipermetrina e ao estresse afeta os resultados do cérebro embrionário e da placenta em camundongos. *Ciências Toxicológicas*. doi: 10.1093 / toxsci / kfaa040.

Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., & Griendling, K. K. (2018) Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation research*, v. 122, n. 6, p. 877-902.

Ghayomi, F., Navaei-nigjeh, M., Baeeri, M., Rezvanfar, M. A., Abdollahi, M. (2016) A mechanistic approach for modulation of chlorpyrifos-induced toxicity in

human lymphocytes by melatonin, coenzyme Q10, and vinpocetine. *Human & experimental toxicology*, v. 35, n. 8, p. 839-850.

Giribaldi, L., Chiappini, F., Pontillo, C., Randi, A. S., de Pisarev, D. L. K., Alvarez, L. (2011) Hexachlorobenzene induces deregulation of cellular growth in rat liver. *Toxicology*, v. 289, n. 1, p. 19-27.

Grewal, G., Verma, P. K., Dhar, V. J., Srivastava, A. K. (2009) Toxicity of subacute oral administration of cypermethrin in rats with special reference to histopathological changes. *International Journal of Green Pharmacy (Medknow Publications & Media Pvt. Ltd.)*, v. 3, n. 4.

Lee, E. S., Kim, J. H., Im, S.; Lee, K. B., Sohn, S., Kang, W. H. (2001) Application of computerized image analysis in pigmentary skin diseases. *Int. J. Dermatol*, v. 40, p. 45-9.

Liang, R., Nickkholgh, A., Hoffmann, K., Kern, M., Schneider, H., Sobirey, M., Schemmer, P. (2009) Melatonin protects from hepatic reperfusion injury through inhibition of IKK and JNK pathways and modification of cell proliferation. *Journal of pineal research*, v. 46, n. 1, p. 8-14.

Mansour, S. A., Ali, A. R., & Mohamd, R. I. (2018) Ameliorating effect of green tea, sage, and their mixture against methomyl-induced physiological, biochemical, and histopathological alterations in male rats. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, v. 17, n. 3, p. 223.

Maulood, K. A., Shekha, G. A. (2017) Study of Effect of Methomyl on Some Hematological, Biochemical Parameters and Histological Changes in Male Albino Rats. *Diyala Journal For Pure Science*, v. 1, n.2-part 2, p. 235-253.

Marinho, K. S. N., Neto, C. J. C. L., de Sousa Coelho, I. D. D., da Silva, M. A., Melo, M. E. G., Dos Santos, K. R. P., Teixeira, A. A. C., Teixeira, V. W. (2019) Evaluation of the protective effect on exogenous melatonin in adult rats and their offspring exposed to insecticides methomyl and cypermethrin during pregnancy. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 848, p. 503107.

Moloudizargari, M., Moradkhani, F., Asghari, N., Fallah, M., Asghari, M. H., Moghadamnia, A. A., & Abdollahi, M. (2019) NLRP inflammasome as a key role player in the pathogenesis of environmental toxicants. *Life sciences*, v. 231, p. 116585.

Mossa, A. T. H., Heikal, T. M., Belaiba, M., Raoelison, E. G., Ferhout, H., Bouajila, J. (2018) Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Cedrellopsis grevei* on cypermethrin induced oxidative stress and liver damage in male mice. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 15, n. 1, p. 251.

Nishi, K., Hundal, S. S. (2013) Chlorpyrifos induced toxicity in reproductive organs of female Wistar rats. *Food and chemical toxicology*, v. 62, p. 732-738.

Oberholzer, M., Ostreicher, M., Christen, H., Bruhlmann, M. (1996) Methods in quantitative image analysis. *Histochem. Cell. Biol.*, v. 105, p. 333-355.

Patil, J. A., Patil, A. J., Govindwar, S. P., Sontakke, A. V. (2016) Proteção de lesão hepática por vitamina C, E e GSH após toxicidade por metomil em ratos. *J. Pharm. Chem. Biol. Sei* , v. 3, n. 4, p. 506-517.

Randi, A.S., Hernández, S., Alvarez, L., Sánchez, M., Schwarcz, M., Kleiman de Pisarev, D.L. (2003) Hexachlorobenzene induced early changes in Ornithine decarboxylase and Protein Tyrosine Kinase activities, polyamines and c-Myc, c-Fos and c-Jun proto-oncogenes in rat liver. *Toxicol. Sci*, v. 76, p. 291–298.

Reiter, R. J., Calvo, J. R., Karbownik, M., Qi, W., & Tan, D. X. (2000) Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 917, n. 1, p. 376-386.

Reiter, R. J., Sharma, R., Rosales-Corral, S. A., Coto-Montes, A., Boga, J. A., & Vriend, J. (2000) Advances in Characterizing Recently-Identified Molecular Actions of Melatonin: Clinical Implications. In *Approaching Complex Diseases* (pp. 301-341). Springer, Cham.

Reiter, R. J., Mayo, J. C., Bronzeado, D. X., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M., Qin, L. (2016) Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *Journal of pineal research*, v. 61, n. 3, p. 253-278.

Sankar, P., Telang, A.G., Manimaran, A. (2012) Protective effect of curcumin on cypermethrin-induced oxidative stress in Wistar rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 64, n. 5, p. 487-493.

Soliman, M. M., Attia, H. F., El-Ella, G. A. A. (2015) Genetic and histopathological alterations induced by cypermethrin in rat kidney and liver: Protection by sesame oil. *International journal of immunopathology and pharmacology*, v. 28, n. 4, p. 508-520.

Slade, D. (2018) Maneuvers on PCNA rings during DNA replication and repair. *Genes*, v. 9, n. 8, p. 416.

Van Scoy, A. R., Yue, M., Deng, X., Tjeerdema, R. S. (2013) Environmental fate and toxicology of methomyl. In: *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer New York, v. 222, p. 93-109.

Ventura, C., Nieto, M. R. R., Bourguignon, N., Lux-Lantos, V., Rodriguez, H., Cao, G., Núñez, M. (2016) Pesticide chlorpyrifos acts as an endocrine disruptor in adult rats causing changes in mammary gland and hormonal balance. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, v. 156, p. 1-9.

Weibel E. R. (1963) Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest.* v. 12, p. 131-155.

Zhang, J. J, Meng, X., Li, Y., Zhou, Y., Xu, D. P, Li, S., Li, H. B. (2017) Effects of melatonin on liver damage and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 4, 673.

ANEXOS



Evaluation of the protective effect on exogenous melatonin in adult rats and their offspring exposed to insecticides methomyl and cypermethrin during pregnancy

Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho^{a,*}, Clovis José Cavalcanti Lapa Neto^a,
Ilka Dayane Duarte de Sousa Coelho^a, Meykson Alexandre da Silva^b,
Maria Eduarda Gomes Melo^b, Katharine Raquel Pereira dos Santos^b, Cristiano Aparecido Chagas^b,
Álvaro Aguiar Coelho Teixeira^a, Valéria Wanderley Teixeira^a

^a Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s / n, 52171-900, Recife, PE, Brazil

^b Laboratory of Biotechnology and Pharmaceuticals, Academic Center of Vitória, Federal University of Pernambuco (UFPE), Rua Alto do Reservatório, s / n, Bela Vista, 55608-680, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Carbamates
Pyrethroids
Antimutagenesis
Intrauterine exposure

ABSTRACT

Pregnant women may be exposed to pesticides in an occupational or incidental way, which has been pointed out as a possible cause of problems in the health of newborns. Cypermethrin and methomyl are insecticides whose active compounds and metabolites can cause harm to the health of pregnant women and the concept. Both increase the concentration of oxidizing agents that damage DNA, causing mutations. Thus, the use of antioxidant substances such as melatonin could serve as protection against genetic damage, reducing the problems caused by insecticides. Here, we evaluated the protective effect of exogenous melatonin in adult rats and their offspring exposed to methomyl and cypermethrin during the gestational period. Thirty adult rats were divided into five groups from the first day of pregnancy: NC - negative control; Mth received 0.02 mg / kg / day of methomyl; Cyp received 0.05 mg / kg / day cypermethrin; MthMl received 0.02 mg / kg / day methomyl combined with 10 mg / kg / day melatonin; CypMl received 0.05 mg / kg / day cypermethrin combined with 10 mg / kg / day melatonin. Blood and liver samples were collected from the dams; blood, liver, and brain samples were also collected from the offspring. All tissues were analysed in the comet assay; while blood was also used for the micronucleus test. The results demonstrate that cypermethrin and methomyl induce significant genetic damage in the tissues of dams and offspring. Treatment with melatonin reduced Cyp-induced genetic damage in dams and pups; but was not effective against DNA damage caused by methomyl. Thus, melatonin may be considered a promising agent for the reduction of genotoxic effects induced by cypermethrin, but appears to be inefficient against the genotoxic effects caused by methomyl, probably due to differences in the metabolism of each pesticide.

1. Introduction

In the last decade Brazil has become the largest consumer of pesticides worldwide with growth of about 190 % in the period. Despite contributing to the improvement of agricultural production, pesticides cause adverse health effects, as well as imbalances of ecosystems [1,2]. Cancer, neurological disorders, endocrine disruption and damage to the reproductive system are related to exposure to specific pesticides [2,3]. In addition, intrauterine exposure to certain compounds can cause damage in embryos and fetuses, either directly due to crossing the placental barrier, or indirectly via production of free radicals as a

consequence of the metabolism of these compounds [5].

Methomyl and cypermethrin are widely used insecticides in world agriculture. Methomyl is a carbamate whose effect on target organisms is due to inhibition of acetylcholinesterase, but it is also an inhibitor of enzymes such as superoxide dismutase and glutathione S-transferase, which catalyze the elimination of reactive oxygen species (ROS) [6]. This insecticide is highly toxic, due to conversion to acetonitrile and finally to cyanide by microsomal detoxification systems, mainly in the liver [7]. Cypermethrin (a pyrethroid) is considered to be non-toxic and causes nervous hyperexcitation in insects and mammals, triggering persistent or repetitive depolarizations by interfering with GABA-gated

* Corresponding author.

E-mail address: Ketsiamarinho@gmail.com (K.S.N. Marinho).

<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.503107>

Received 13 February 2019; Received in revised form 7 October 2019; Accepted 11 October 2019

Available online 19 October 2019

1383-5718/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

chloride channels, nicotinic ACh receptors, and intercellular gap junctions [8]. Cypermethrin interferes also with the enzymes of the antioxidant systems, such as glutathione-S-transferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase [9]. Both pesticides appear to interfere with cellular antioxidant systems, causing oxidative stress and cellular damage such as lipid peroxidation and oxidative DNA damage [6,10–12].

Oxidative stress and its consequences can be diminished by the numerous of natural or synthetic antioxidant substances. Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is a powerful natural antioxidant. It is a neurohormone, produced mainly by the pineal gland. This neurohormone causes not only a direct antioxidant effects (due to reaction with ROS), but also has a indirect effects via stimulation of antioxidant enzymes [13–15]. The protective effect of melatonin has been widely studied, including those preventing toxic effects of pesticides [16–20]. More specifically, genotoxic effects induced by agents that stimulate oxidative stress also appear to be diminished by the action of melatonin [21].

Oxidative stress and consequent genetic damage may account for the findings that demonstrate congenital defects in fetuses and newborns of dams which are exposed to pyrethroids or carbamates. Antioxidant agents such as melatonin could reduce the risk of anatomical or physiological problems caused by intrauterine exposure to such insecticides. Both genetic damage and the protective action of antigenotoxic compounds can be assessed by comet assays and peripheral blood micronucleus (MN) tests. The MN test detects clastogenic and aneugenic agents and is widely used [22]. The comet assay detects double-strand breaks, and alkali-labile sites. We used both approaches to evaluate genetic damage caused by cypermethrin and methomyl in rats and their offspring; in addition, we studied the protective effects of melatonin against these pesticides.

2. Material and methods

2.1. Animals

We used 30 female Albino wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*), with 90 days old, virgins, weighing 230 ± 30 g. The animals were obtained from the Department of Morphology and Animal Physiology of the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE). The animals were kept in suitable polypropylene boxes at 22 ± 1 °C, under a photoperiod of 12 h light / 12 h dark, with feed and water *ad libitum*. Animals were mated and randomly divided into several experimental groups. The experimental protocol was submitted and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of UFRPE (license number 109/2016).

2.2. Mating and diagnosis of pregnancy

For mating, animals were placed in cages (two females and one male per cage) in the early evening. On the next morning (12 h latter), colpocytological examinations were performed to confirm the mating and diagnosis of pregnancy by presence of spermatozoa in vaginal smears. Twenty-four hours after confirmation of mating were designated as the first day of pregnancy.

2.3. Experimental groups

After confirmation of the mating, the females were allocated into five groups ($n = 6/\text{group}$): NC - Pregnant rats receiving only water; Mth - Pregnant rats receiving methomyl at a concentration of 0.02 mg / kg / day; Cyp - Pregnant rats receiving cypermethrin (concentration of 0.05 mg / kg / day); MthMl - Pregnant rats receiving 0.02 mg / kg / day methomyl and melatonin (10 mg / kg / day); CypMl - Pregnant rats receiving 0.05 mg / kg / day cypermethrin combined with melatonin (10 mg / kg / day).

2.4. Administration of insecticides

The treatments of the rats were performed daily, throughout the gestational period (one dose per day for approximately 21 days), by gavage. Dams of the Mth, Cyp, MthMl and CypMl groups received methomyl (Lannate BR® DuPont, 215 g/L) and cypermethrin (Cyprtrin 250 CE® Nufarm, 250 g/L) diluted in distilled water, so that the dose was that described above, and according to the IDA (daily acceptable intake) recommended by the Joint FAO / WHO [23,24] Committee.

2.5. Administration of melatonin

MthMl and CypMl groups were also treated with melatonin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) during the pregnancy period (approximately 21 days). Melatonin was dissolved in drinking water and the water; the bottles were wrapped with aluminum foil to avoid incidence of light [25].

2.6. Collection of biological materials

After birth, (on the first day), the dams and 12 pups (six males and six females) of each experimental group were anesthetized with intramuscular injection of ketamine hydrochloride (80 mg / kg) and xylazine (6 mg / kg). Blood and livers of the dams, as well as blood, livers and brains of the neonates were collected to evaluate DNA damage by the comet assay. Blood was also used to perform the MN tests. For both assays, 1.0 mL of blood was collected by cardiac puncture and diluted in 1.0 mL PBS. Parts of the livers and brains were collected and immersed in cold Sorensen buffer. Subsequently, they were cut in pieces (1 mm in diameter), and the particles were stirred and transferred to new buffer. The samples were again punctured until the buffer became cloudy and translucent, indicating that liver and nerve cells were detached. Approximately 1.0 mL of this cell suspension was placed in microtubes and refrigerated until the preparation of the slides for the comet assay.

2.7. Comet assay

Comet assay was performed according to the protocol established by Tice et al. [26]. Fifteen μL of the cell suspension (blood, liver and brain) were added to 100 μL of low melting point agarose preheated and maintained at 37 °C [27]. The mix were transferred to two slides coated with standard agarose. The slides were then covered with coverslips and brought to 4 °C for 10 min to solidify the mixture of agarose and cells.

Next, the coverslips were removed; the slides were placed in vats containing the lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM TRIS, 1 % Triton X-100, 10 % DMSO, pH 10), and kept at 4 °C for 48 h. After the cell lysis, the samples were transferred to a horizontal vessel containing alkaline buffer solution (1 M NaOH and 200 mM EDTA disodium salt, pH 13, 4 °C) for 20 min to cause DNA denaturation. Subsequently, the slides were electrophoresed with a current of ± 300 mA, and a potential difference of 32 V for 20 min.

Shortly after the electrophoretic run, the slides were left for 15 min in neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) and then fixed for 5 min in absolute ethyl alcohol. The slides were stained with 30 μL of ethidium bromide solution (0.0002 %, w/v) and covered with coverslips. All steps described above were performed under the red light.

DNA damage analysis was performed in a fluorescence microscope (Zeiss-Imager, M2), with 400X of magnification, using the Alexa Fluor 546 filter. Per animal one hundred nucleoids were evaluated. For each nucleoid analyzed, DNA damage was classified into five classes according to the observed damage: 0 = no visible damage; 1 = minimum damage; 2 = average damage; 3 = mean damage with longer tail; 4 = maximum damage).

The results were expressed in damage index (DI) and frequency of damage (FD). The value obtained for each animal can range from 0

(fully intact: 100 cells x 0) to 400 (maximum damage: 100 cells x 4), termed DI, and calculated as follows:

$$DI = 0 \times (\text{comets class } 0) + 1 \times (\text{comets class } 1) + 2 \times (\text{comets class } 2) + 3 \times (\text{comets class } 3) + 4 \times (\text{comets class } 4)$$

FD is determined according to the percentage of all nucleoids with some damage (class 1 to class 4) in relation to the total number of nucleoids counted, as follows:

$$FD = [(\text{total count of comets} - \text{class } 0 \text{ count of comets}) \times 100] / \text{total count of comets}$$

2.8. Micronucleus test

The effects of methomyl and cypermethrin was also analyzed in MN test with peripheral blood [28]. The mixture blood/PBS from each animal was used to prepare three slides per animal. 5 µl of the mix was transferred to histological slides covered with acridine orange. The slides were then covered with a coverslip.

To determine the MN frequency, 2000 polychromatic erythrocytes were analysed to verify the presence of micronucleus [29]. We also analysed the ratio of polychromatic erythrocytes (PCE) to the total of erythrocytes as a parameter of cytotoxicity. Slides were analysed using a Zeiss-Imager M2 fluorescence microscope with a 40X objective with Alexa Fluor 488 filter.

2.9. Statistical analysis

The results of the comet assay and MN test obtained with the different experimental groups were compared by the Kruskal-Wallis test with *posteriori* analysis using t-tests with Bonferroni corrections. When values of $p < 0.05$, the differences between the groups were considered statistically significant.

3. Results

Cypermethrin and methomyl induced genetic damage in the all three groups (dams, male pups and female pups). We found some variations according to the tests used and the tissues analyzed. Melatonin was more effective in decreasing cypermethrin-induced genetic damage; its protective effect was minor or non-existent when the damages were caused by methomyl.

In the dams, both pesticides induced a statistically significant increase in the MN frequencies and in comet assay parameters (DI and FD) in blood and liver cells. Treatment with exogenous melatonin (10 mg / kg / day) was effective in reducing genetic damage caused by cypermethrin, but only the micronucleus test demonstrated protective action of melatonin against methomyl. (Fig. 1). The frequency of MN, the DI and the FD in blood and liver cells of the CypM1 group were statistically lower ($p < 0.01$) than those in the Cyp group. All parameters in the CypM1 group decreased to levels seen in the control group, with the exception of the DI in the liver cells. In this case, the CypM1 group had a statistically larger DI in liver cells than that seen in the control group. In the group treated with melatonin and methomyl (MthMl), only the frequency of MN decreased ($p = 0.017$). Nevertheless, the values were higher than those seen in the untreated animals ($p = 0.011$).

Maternal exposure to cypermethrin and methomyl caused clear genetic damage in the male offspring as well. Both pesticides induced an increase ($p < 0.05$) of the MN frequencies and in the comet assay parameters in cells of blood, liver and brain of the male pups. Melatonin decreased the genotoxic effects of cypermethrin in the three tissues (Fig. 2). The frequency of MN in blood, and DI and FD in liver and brain cells were lower in the CypM1 group than in the Cyp group ($p < 0.05$); we found no differences between the CypM1 group and the controls. We

found also a decrease in DI and FD values in the blood cells of the CypM1 group compared to the Cyp group; Melatonin did not decrease methomyl-induced genetic damage; none of the genotoxicity parameters were lower in the MthMl group than that in the Mth group, in any of the tissues analyzed.

The female offspring was also affected by maternal exposure to cypermethrin and methomyl, with increasing in genotoxicity parameters (Fig. 3). Cypermethrin treatment of dams induced increase in the frequencies of MN in blood of the Cyp group ($p = 0.035$); in this group, DI and FD in blood, liver and brain cells were also higher than in the NC group ($p < 0.01$). Methomyl induced increase in MN frequencies and increase in DI and FD in blood and brain cells of the female offspring ($p < 0.01$) but not in the liver cells of these animals. As with dams and male offspring, melatonin has reduced the genetic damage caused by cypermethrin. The CypM1 female pup group presented a reduction, when compared to the Cyp group, in all genotoxicity parameters in the three tissues analyzed. The DI and FD values in blood cells remained significantly higher than the values seen in the NC group. However, the MN frequency, DI and FD in liver and brain cells of the CypM1 were not different from the control group. Again, melatonin did not decrease extent of the genetic damage caused by methomyl. Actually, there was a significant increase of the DI in the liver cells of the group treated with methomyl and melatonin when compared to the group that received only methomyl.

4. Discussion

Our results demonstrate that the pesticides methomyl and cypermethrin induce DNA damage in female rats and also in their offspring. Genetic damage caused by cypermethrin and methomyl has been reported in the literature in *in vivo* and *in vitro* experiments [30–32], but the genotoxic action in the offspring of females exposed to doses considered safe has not yet been demonstrated. This genotoxicity, associated with other toxic activities, may explain findings that demonstrate such pesticides have toxic effects on embryos [11,33]. In the present study, both pesticides induced genetic damage in all tissues analyzed in the three groups, except in the liver of female pups that were resistant to methomyl, and showed no statistical difference compare to the control group. The doses which were tested are considered safe by Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR) once they represent ADI. However, conclusions of JMPR for both pesticides are based on the results of other experimental models [23,24], which may explain the differences in results. Also, documents of JMPR describe positive results when comet assay was used for evaluation of cypermethrin [34].

Genetic damage caused by pesticides, in dams and in the offspring, may be the result of oxidative stress. Mokhtar et al. [33] suggested that methomyl induces oxidative stress by inhibiting catalase, superoxydodismutase and glutathione peroxidase. Cypermethrin also was reported to interfere with enzymes of the antioxidant system, among them, glutathione-S-transferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase [9]. These alterations of antioxidant defense system may lead to increased ROS concentrations, which cause DNA damages, including in the genome of fetal cells during the pregnancy. In the offspring, the results may be explained by the ability of the pesticides to cross the placental barrier and affect antioxidant cellular systems directly in the embryos and fetuses. But it is also likely that the increase of ROS in the dams and specifically in placenta [35] have a direct effect on the DNA molecule of the concepts cells, causing breaks and mutations as seen in blood, liver and nerve cells of the offspring.

Damage caused by ROS can be reduced by the many synthetic and natural antioxidants. The melatonin molecule is a potent scavenger of free radicals of oxygen and nitrogen, including hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen, nitric oxide and peroxyxynitrite anion. The molecule exhibits reactive sites which bind free radicals, and presents methoxy and amide side chains that contribute to its antioxidant capacity [36]. Moreover, its lipophilicity allows it to cross membranes

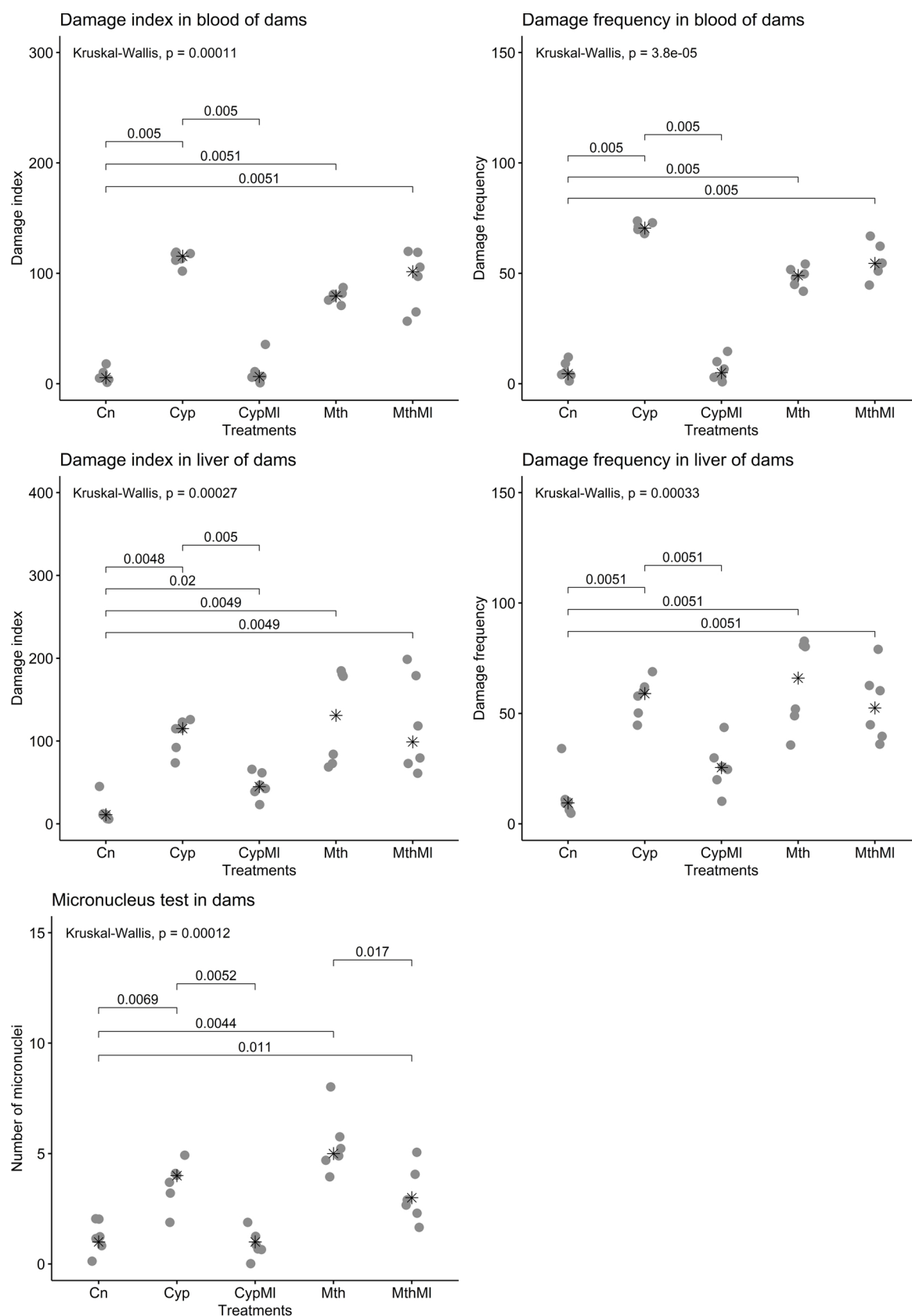


Fig. 1. Effect of cypermethrin and methomyl isolated and associated with exogenous melatonin in the blood and liver of pregnant rats. a) Damage index (DI) in blood by the comet assay; (b) damage frequency (DF) (in percent) in blood by the comet assay; (c) DI in liver; (d) DF in liver; (e) frequency of MN in polychromatic erythrocytes; NC: negative control; Cyp: cypermethrin; CypMI: cypermethrin and melatonin; Mth: methomyl; MthMI: methomyl and melatonin. Numbers above points represent p values statistically significant (pair-to-pair t -test with Bonferroni's correction). Black stars represent means.

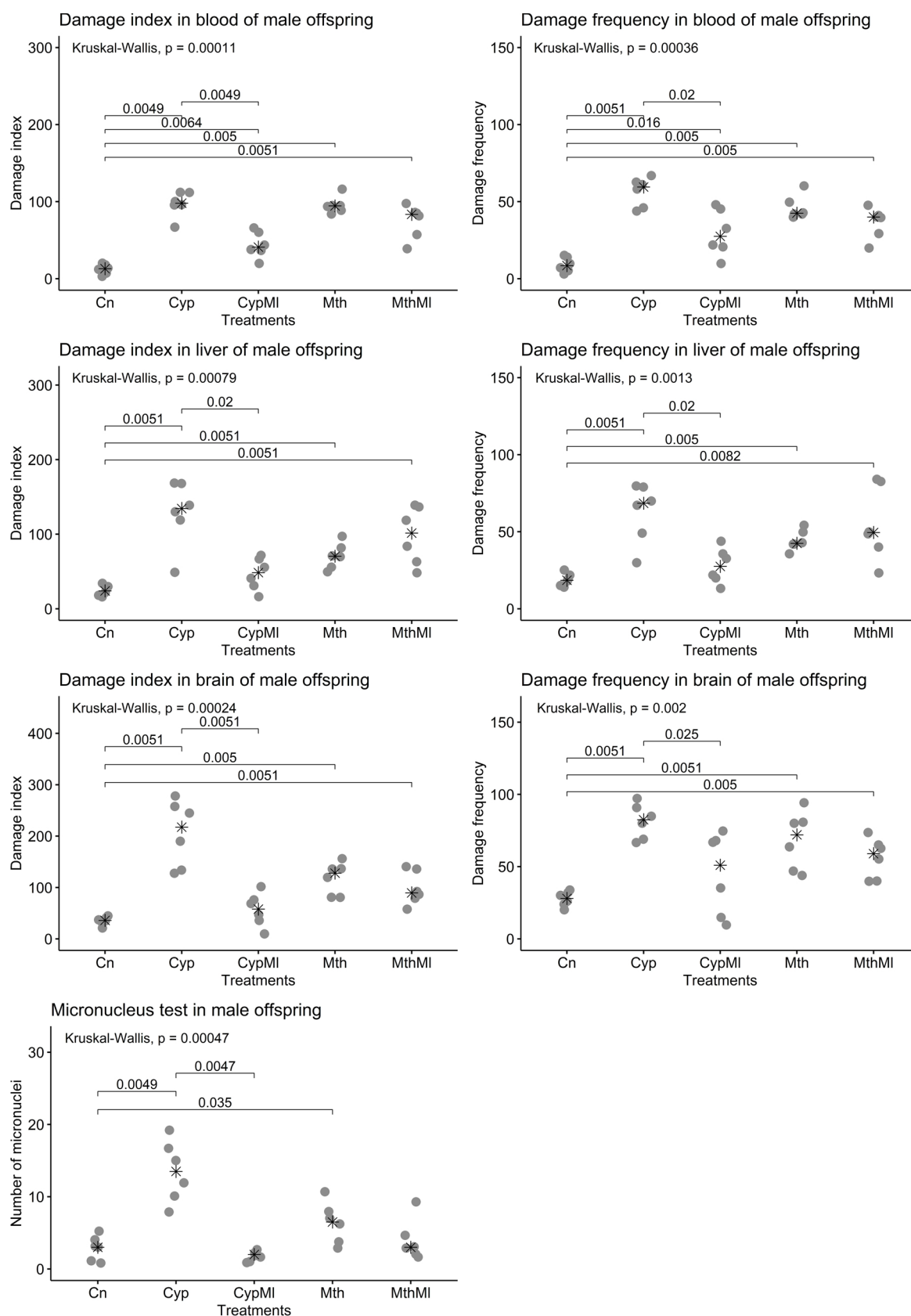


Fig. 2. Effect of maternal exposure to cypermethrin and methomyl isolated and associated with exogenous melatonin treatment in the blood, livers and brains of male offspring. a) Damage index in blood (comet assays); b) damage frequency (in percentage) in blood by the comet assay; c) damage index in liver; d) damage frequency in liver; e) damage index in brain; f) damage frequency in brain; g) micronuclei frequency in polychromatic erythrocytes; NC: negative control; Cyp: cypermethrin; CypMI: cypermethrin + melatonin; Mth: methomyl; MthMI: methomyl + melatonin. Numbers above points represent p values statistically significant (pair-to-pair t-test with Bonferroni's correction). Black stars represent means.

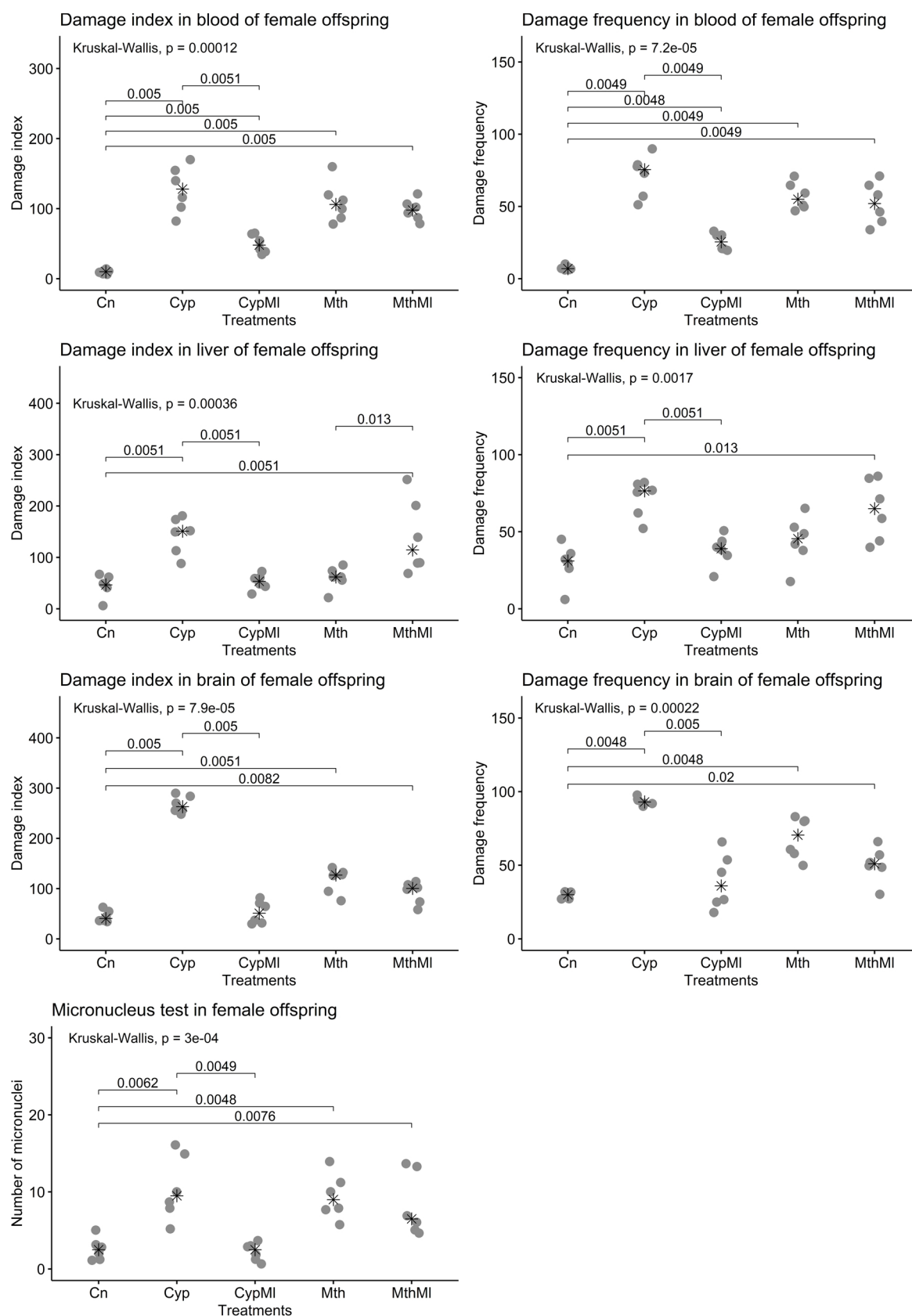


Fig. 3. Effect of maternal exposure to cypermethrin and methomyl isolated and associated with exogenous melatonin in the blood, liver and brain of female offspring. a) Damage index (DI) in blood by the comet assay; b) damage frequency (DF) (in percentage) in blood by the comet assay; c) DI in liver; d) DF in liver; e) DI in brain; f) DF in brain; g) MN frequency in polychromatic erythrocytes; NC: negative control; Cyp: cypermethrin; CypMI: cypermethrin and melatonin; Mth: methomyl; MthMI: methomyl and melatonin. Numbers above points represent p values statistically significant (pair-to-pair *t*-test with Bonferroni's correction). Black stars represent means.

and reach different cell compartments [37]. Such characteristics have been associated with antigenotoxic effects of melatonin on different tissues [21]. Also, several earlier studies have shown that melatonin reduces the toxic effects induced by other pesticides [19,38–40].

Our results demonstrate that melatonin may protect the DNA against pesticides such as cypermethrin. Melatonin decreased cypermethrin-induced genetic damage in blood and liver cells of the dams and in blood, liver and brain cells of the offspring. According to Bhatti et al. [17] melatonin reduces liver damage caused by cypermethrin, while Banke et al. [39] demonstrated that melatonin can reverse nerve tissue damage caused by cypermethrin-induced lipid peroxidation. However, the administration of melatonin was not effective against the genotoxic effects of methomyl. Methomyl metabolism may explain these findings; the compound is converted to acetonitrile, which is converted to cyanide by microsomal detoxification systems, mainly in the liver [7]. Cyanide interferes with the electron transport chain and, ultimately, leads to decreased ATP synthesis. This may lead to reduced synthesis of proteins [41], among them, those enzymes that are synthesized *de novo* in response to oxidative stress. Thus, our hypothesis is that the methomyl toxicity mechanisms end up supplanting the action of melatonin, but further studies are needed to test this hypothesis.

Our results demonstrate that even at safe doses, methomyl and cypermethrin may induce genetic damage in dams and their offspring when dams are exposed daily to these pesticides during pregnancy. Melatonin decreased the genotoxic effects of cypermethrin, but not those of methomyl. At least for cypermethrin, melatonin may be effective in protecting cells not only from genotoxic effects, but also from other effects associated with the production of free radicals. Exposure of pregnant women to this insecticide is not uncommon, especially in developing countries. Such exposure poses great risks to the health of the mother and the fetus. While the use of pesticides cannot be eliminated in agriculture, more studies about potential protective therapies could contribute to reducing health effects in dams and fetuses exposed to substances such as cypermethrin.

Acknowledgement

This study was supported by the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES).

References

- [1] R.M. Rigotto, D.P. Vasconcelos, M.M. Rocha, Pesticide use in Brazil and problems for public health, *Cad Saúde Pública*. 30 (2014) 1360–1362, <https://doi.org/10.1590/0102-311XPE020714>.
- [2] G. Bapayeva, S. Kulbayeva, A. Zhumadilova, Effect of pesticides on human health, *J Clin Med Kaz*. 3 (2017) 128–132, <https://doi.org/10.23950/1812-2892-JCMK-00494>.
- [3] K.H. Kim, E. Kabir, S.A. Jahan, Exposure to pesticides and the associated human health effects, *Sci. Total Environ*. 575 (2017) 525–535, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>.
- [4] C. Kalliora, C. Mamoulakis, E. Vasilopoulos, G.A. Stamatiades, L. Kalafati, R. Barouni, A. Tsatsakis, Association of pesticide exposure with human congenital abnormalities, *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 346 (2018) 58–75, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.03.025>.
- [5] S.A. Mansour, A.T.H. Mossa, T.M. Heikal, Effects of methomyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat erythrocytes: in vitro studies, *Toxicol. Ind. Health* 25 (2009) 557–563, <https://doi.org/10.1177/0748233709349829>.
- [6] WHO, *Environ Health Criteria, Methomyl Vol. 178* (1996), p. 52.
- [7] R.C. Gupta, J.W. Crissman, *Agricultural chemicals*, in: W.M. Haschek, C.G. Rousseaux, M.A. Wallig (Eds.), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*, 3rd ed., Academic Press, 2013.
- [8] F.M. El-Demerdash, M.I. Yousef, K.S. I-Salhen, Protective effects of isoflavone on some biochemical parameters affected by cypermethrin in male rabbits, *J. Environ. Sci. Health C, Part B*. 38 (2003) 365–378, <https://doi.org/10.1081/PFC-120019902>.
- [9] A. Djeflal, M. Messarah, A. Boumendjel, L. Kadeche, A.E. Feki, Protective effects of vitamin C and selenium supplementation on methomyl-induced tissue oxidative stress in adult rats, *Toxicol. Ind. Health* 31 (2015) 31–43, <https://doi.org/10.1177/0748233712468020>.
- [10] H. Ghorzi, H. Merzouk, L. Hocine, S.A. Merzouk, Long term biochemical changes in offspring of rats fed diet containing alpha-cypermethrin, *Pestic. Biochem. Physiol.* 142 (2017) 133–140, <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.05.010>.
- [11] J.K. Bhardwaj, M. Mittal, P. Saraf, P. Kumari, Pesticides induced oxidative stress and female infertility: a review, *Toxin Rev.* (2018) 1–13, <https://doi.org/10.1080/15569543.2018.1474926>.
- [12] R.J. Reiter, D.X. Tan, A. Galano, Melatonin: exceeding expectations, *Physiology* 29 (2014) 325–333, <https://doi.org/10.1152/physiol.00011.2014>.
- [13] D.X. Tan, L.C. Manchester, E. Esteban-Zubero, Z. Zhou, R.J. Reiter, Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism, *Molecules*. 20 (2015) 18886–18906, <https://doi.org/10.3390/molecules201018886>.
- [14] R.J. Reiter, J.C. Mayo, D.X. Tan, R.M. Sainz, M. Alatorre-Jimenez, L. Qin, Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers, *J. Pineal Res.* 61 (2016) 253–278, <https://doi.org/10.1111/jpi.12360>.
- [15] J.S. Bhatti, I.P.S. Sidhu, G.K. Bhatti, Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes, *Mol. Cell. Biochem.* 353 (2011) 139–149, <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0780-y>.
- [16] G.K. Bhatti, I.P.S. Sidhu, N.K. Saini, S.K. Puar, G. Singh, J.S. Bhatti, Ameliorative role of melatonin against cypermethrin induced hepatotoxicity and impaired antioxidant defense system in Wistar rats, *IOSR J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol.* 8 (2014) 39–48.
- [17] F. Ghayomi, M. Navaei-Nigjeh, M. Baeeri, M.A. Rezvanfar, M. Abdollahi, A mechanistic approach for modulation of chlorpyrifos-induced toxicity in human lymphocytes by melatonin, coenzyme Q10, and vinpocetine, *Hum. Exp. Toxicol.* 35 (2016) 839–850, <https://doi.org/10.1177/0960327115607945>.
- [18] M.H. Asghari, M. Moloudizargari, H. Bahadar, M. Abdollahi, A review of the protective effect of melatonin in pesticide-induced toxicity, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 13 (2017) 545–554, <https://doi.org/10.1080/17425255.2016.1214712>.
- [19] S.B. Idris, S.F. Ambali, M.M. Suleiman, Ameliorative effects of melatonin on brain biochemical changes induced by subchronic co-administration of chlorpyrifos and cypermethrin in male Wistar rats, *J. Toxicol. Environ. Health Sci.* 9 (2017) 1–6, <https://doi.org/10.5897/JTEHS2016.0377>.
- [20] I.D.D. de Sousa Coelho, C.J.C.L. Neto, T.G. dos Santos Souza, M.A. da Silva, C.A. Chagas, K.R.P. dos Santos, V.W. Teixeira, Á.A.C. Teixeira, Protective effect of exogenous melatonin in rats and their offspring on the genotoxic response induced by the chronic consumption of alcohol during pregnancy, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagens*. 832 (2018) 52–60, <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.06.018>.
- [21] R.P. Araldi, T.C. De Melo, T.B. Mendes, P.L. De Sá Júnior, B.H.N. Nozima, E.T. Ito, R. De Cassia Stocco, Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review, *Biomed. Pharmacother.* 72 (2015) 74–82, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.004>.
- [22] WHO, *Environmental Health Criteria, Cypermethrin Vol. 82* (1989).
- [23] FAO/WHO, *Methomyl Pesticide Residues in Food 2001 Toxicological Evaluations*, <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2001pr08.htm>, (2001) (accessed 01 February 2019).
- [24] A. Agil, R.J. Reiter, A. Jiménez-Aranda, R. Ibán-Arias, M. Navarro-Alarcón, J.A. Marchal, A. Adem, G. Fernández-Vázquez, Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in Young Zucker diabetic fatty rats, *J. Pineal Res.* 54 (2013) 381–388, <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12012>.
- [25] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J).
- [26] A.R. Collins, A.A. Osoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C.C. Smith, R. Stetina, The comet assay: topical issues, *Mutagenesis* 23 (2008) 143–151, <https://doi.org/10.1093/mutage/gem051>.
- [27] M. Hayashi, T. Morita, Y. Kodama, T. Sofuni, M. Ishidate Jr., The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, *Mutat. Res.* 245 (1990) 245–249, [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(90\)90153-B](https://doi.org/10.1016/0165-7992(90)90153-B).
- [28] OECD, Test guideline 474. Mammalian erythrocyte micronucleus test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects, (2016), <https://doi.org/10.1787/9789264264762-en>.
- [29] P. Singh, P. Lata, S. Patel, A.K. Pandey, S.K. Jain, R. Shanker, A. Dhawan, Expression profiling of toxicity pathway genes by real-time PCR array in cypermethrin-exposed mouse brain, *Toxicol. Mech. Methods* 21 (2011) 193–199, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.011>.
- [30] F.D.G. Muranli, Genotoxic and cytotoxic evaluation of pyrethroid insecticides λ-cyhalothrin and α-cypermethrin on human blood lymphocyte culture, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90 (2013) 357–363, <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0909-z>.
- [31] R. Valencia-Quintana, S. Gómez-Arroyo, J. Sánchez-Alarcón, M. Milić, J.L.G. Olivares, S.M. Waliszewski, M.E. Alderón-Segura, Assessment of genotoxicity of Lannate-90° and its plant and animal metabolites in human lymphocyte cultures, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 67 (2016) 116–125, <https://doi.org/10.1515/aiht-2016-67-2763>.
- [32] H.I. Mokhtar, H.A. Abdel-Latif, R.H. Elmazoudy, W.M. Abdelwahab, M.I. Saad, Effect of methomyl on fertility, embryotoxicity and physiological parameters in female rats, *J. Appl. Pharm. Sci.* 3 (2013) 109–119, <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.31220>.
- [33] I. Mukhopadhyay, D.K. Chowdhuri, M. Bajpayee, A. Dhawan, Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay, *Mutagenesis* 19 (2004) 85–90, <https://doi.org/10.1093/mutage/geh007>.
- [34] S. Gupta, A. Agarwal, J. Banerjee, J.G. Alvarez, The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review, *Obstet. Gynecol. Surv.* 62 (2007) 335–347, <https://doi.org/10.1097/01.ogx.0000261644>.

- 89300.df.
- [36] D.X. Tan, R.J. Reiter, L.C. Manchester, M. Yan, M. El-Sawi, R.M. Sainz, J.C. Mayo, R. Kohen, M.C. Allegra, R. Hardelan, Current Topics in Medicinal Chemistry Vol. 2 (2002) <https://doi.org/10.1568026023394443> 10.2174/1568026023394443.
- [37] J.J. García, L. Lopez-Pingarrón, P. Almeida-Souza, A. Tres, P. Escudero, F.A. Garcia-Gil, D.X. Tan, R.J. Reiter, J.M. Ramirez, M. Bernal-Perez, Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review, J. Pineal Res. 56 (2014) 225–237 <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12128>.
- [38] A. Karamian, M. Shokrzadeh, A. Ahmadi, The potential chemoprotective effects of melatonin against genotoxicity induced by diazinon in human peripheral blood lymphocytes, Toxicol. Ind. Health 32 (2013) 360–366, <https://doi.org/10.1177/0748233713500824>.
- [39] I.S. Banke, A.S. Folorunsho, B. Mohammed, S.M. Musa, O. Charles, A.J. Olusegun, Effects of melatonin on changes in cognitive performances and brain malondialdehyde concentration induced by sub-chronic co-administration of chlorpyrifos and cypermethrin in male Wistar rats, Asian Pac. J. Trop. Biomed. 4 (2014) 318–323, <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C55>.
- [40] L.L.D. Almeida, Á.A. Teixeira, N.S. Bezerra, V. Wanderley-Teixeira, Protective effect of melatonin on poisoning by herbicides, Pesqui. Vet. Bras. 36 (2016) 174–180, <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000300005>.
- [41] W.W. Wheaton, N.S. Chandel, Hypoxia regulates cellular metabolism, Am. J. Physiol., Cell Physiol. 300 (2010) C385–93, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00485.2010>.

Further reading

- [4] M.E. Ueker, V.M. Silva, G.P. Moi, W.A. Pignati, I.E. Mattos, A.M.C. Silva, Parenteral exposure to pesticides and occurrence of congenital malformations: hospital-based case-control study, BMC Pediatr. 16 (2016) 125, <https://doi.org/10.1186/s12887-016-0667-x>.

DECLARAÇÃO DE ACEITE

A Atena Editora, especializada na publicação de livros e coletâneas de artigos científicos em todas as áreas do conhecimento, com sede na cidade de Ponta Grossa-PR, declara que após avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta editora, o artigo intitulado "EFEITOS DOS INSETICIDAS METOMIL E CIPERMETRINA SOBRE O SISTEMA REPRODUTOR E A AÇÃO PROTETORA DA MELATONINA" de autoria de "KETSIA SABRINA DO NASCIMENTO MARINHO, ISMAELA MARIA FERREIRA DE MELO, VALÉRIA WANDERLEY TEIXEIRA, ÁLVARO AGUIAR COELHO TEIXEIRA, KATHARINE RAQUEL PEREIRA DOS SANTOS, CRISTIANO APARECIDO CHAGAS, ILKA DAYANE DUARTE DE SOUSA COELHO, CLOVIS JOSÉ CAVALCANTI LAPA NETO, LAÍS CAROLINE DA SILVA SANTOS", foi aprovado e encontra-se no prelo para publicação no livro eletrônico "Desenvolvimento sustentável, interdisciplinaridade e Ciências Ambientais" a ser divulgado em abril de 2021.

Agradeço a escolha pela Atena Editora como meio de transmitir ao público científico e acadêmico o trabalho e parabeno os autores pelo aceite de publicação.

Reitero protestos de mais elevada estima e consideração.

PONTA GROSSA, 30 de dezembro de 2020.

Prof.^a Dr.^a Antonella Carvalho de Oliveira
Editora Chefe
ATENA EDITORA

PREFIXO EDITORIAL DOI 10.22533

PREFIXO EDITORIAL ISBN 93243

Certificado digitalmente por Atena Edição de Livros