



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

BRUNA FERREIRA TOLLSTADIUS

Carbendazim induz morte em células epiteliais alveolares: cultura celular submersa e em interface ar-líquido

**Goiânia
2019**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

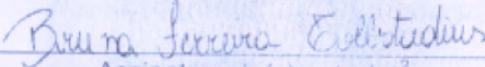
Nome completo do autor: Bruna Ferreira Tollstadius

Título do trabalho: **Carbendazim induz morte em células epiteliais alveolares: cultura celular submersa e em interface ar-líquido**

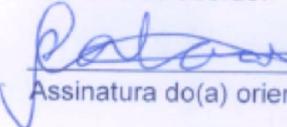
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Marize Campos Valadares
Prof. Dra. Adjunta de Toxicologia
Faculdade de Farmácia / UFG

Data: 31/01/2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

BRUNA FERREIRA TOLLSTADIUS

Carbendazim induz morte em células epiteliais alveolares: cultura celular submersa e em interface ar-líquido

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marize Campos Valadares.

**Goiânia
2019**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Tollstadius, Bruna Ferreira

Carbendazim induz morte em células epiteliais alveolares: cultura celular submersa e em interface ar-líquido [manuscrito] / Bruna Ferreira Tollstadius. - 2019.

60 f.: il.

Orientador: Profa. Dra Marize Campos Valadares.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Carbendazim. 2. Toxicidade inalatória. 3. Modelo epitelial alveolar 3D. 4. Exposição por nebulização. 5. Interface ar-líquido. I. Valadares, Dra Marize Campos, orient. II. Título.

CDU 615



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



ATA DE SEÇÃO DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE Bruna Ferreira Tollstadius. Na data de 21 de março de 2019, às 14:30 horas, na sala de reuniões da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os membros da Banca Examinadora: **Profa. Dra. Marize Campos Valadares (FF/UFG)**, **Prof. Dr. Manoel Francisco Biancardi (ICB/UFG)**, **Dr. Luís Antônio Dantas Silva (FF/UFG)** e **Profa. Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (FF/UFG)** como suplente. Sob a Presidência da Orientadora, em sessão pública, procedeu-se à avaliação da defesa da Dissertação intitulada: "**Carbendazim induz morte em células epiteliais alveolares: cultura celular submersa e em interface ar-líquido**", de autoria de **Bruna Ferreira Tollstadius**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFG, no nível de **Mestrado**. A sessão foi aberta pela presidente da Banca, **Profa. Dra. Marize Campos Valadares**, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida à **pós-graduanda** que, em 50 minutos, apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Mestrando, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Ao final, a banca reunida em separado procedeu à avaliação do trabalho. A **Dissertação** foi considerada aprovada pela Banca Examinadora, completando integralmente este requisito para fins de obtenção do título de MESTRE em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Goiás, em conformidade com o estabelecido pela Resolução nº 1477/2017, do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura da UFG (CEPEC/UFG), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/UFG. Para fins de publicação eletrônica, a **pós-graduanda** poderá efetuar as modificações eventualmente sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar à Secretaria do PPGCF, respeitando-se o prazo máximo de 30 dias após a data da Defesa. A conclusão do curso e a emissão do diploma dar-se-ão em conformidade com o estabelecido pela Resolução CEPEC nº 1477/2017. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 horas e 30 minutos, a presidência da banca encerrou esta sessão de defesa de Dissertação e, para constar eu, **Fernanda Maura Ferreira Bellato**, Secretária do PPGCF/UFG, lavrei a presente Ata que, depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, em duas vias de igual teor.

Parecer Detalhado da Banca Examinadora

Membro	Aprovado /Reprovado	Assinatura
Profa. Dra. Marize Campos Valadares (FF/UFG) - Presidente	Aprovado	
Prof. Dr. Manoel Francisco Biancardi (ICB/UFG)	Aprovado	
Dr. Luís Antônio Dantas Silva (FF/UFG)	Aprovado	
Prof. Dr. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (FF/UFG) - Suplente		
Parecer Final	Aprovado/Reprovado	

Alteração do título:

Bruna Ferreira Tollstadius



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha

Vice Coordenadora do Programa de Pós-Graduação

Profa. Dra. Marize Campos Valadares

Goiânia-GO
2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Bruna Ferreira Tollstadius

Orientador(a): Prof.^a Dra. Marize Campos Valadares

Prof.^a Dra. Marize Campos Valadares / Presidente

Professora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Prof. Dr. Manoel Francisco Biancardi / Membro Titular

Professor do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, ICB/UFG.

Dr. Luís Antônio Dantas da Silva / Membro Titular

Pós-Doutorando Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Prof.^a Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira / Membro Suplente

Professora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Data: 21/03/2019

*Aos meus pais, irmã e companheiro,
Por todo o tempo dedicado,
compreensão, força e amor.*

Primeiramente, agradeço à Deus por me guiar e me fornecer oportunidades para aprender cada dia mais, pelas pessoas maravilhosas em meu caminho, que sempre me acolheram e me ensinaram tanto.

Aos meus queridos pais Ivonete Ferreira da Mota e Sérgio Ferreira da Silva, por acreditarem em mim desde o começo. Por terem feito o inimaginável para me darem a melhor educação possível, e pelos valores que fazem de mim quem sou. À minha “irmãzinha” Heloísa Ferreira da Silva, que me faz ser mais forte todos os dias, e que motiva e inspira com um amor inabalável. Obrigada por me fazer querer ser melhor todos os dias.

Ao meu companheiro de vida, amigo e esposo Nino Tollstadius Armelin, pelo amor, apoio, superação e motivação. Obrigada pelo cuidado e também pelos aprendizados. Obrigada também por ter me mostrado que os desafios dessa vida podem ser vencidos quando temos amor e parceria.

À professora Dra. Marize Valadares por ter acreditado em mim. Obrigada por ter confiado este trabalho e por ter me conduzido por este belo caminho do conhecimento e da pesquisa. Sou profundamente grata por todos os conselhos e por todo o aprendizado. Seu trabalho inspira a incrível equipe que está contigo e o reconhecimento com os diversos prêmios recebidos e que ainda virão são reflexo disso.

Ao responsável técnico e amigo Artur Christian Garcia da Silva, por todo o empenho, solicitude e sempre prestativo a auxiliar no que for preciso. Às minhas queridas amigas desta jornada: Lara Prado, Laís Brito, Larissa Cleres e Thaís Marques. Obrigada por todo o apoio emocional e intelectual, por todos os bolos e almoços compartilhados, pela motivação, dicas, conselhos e conversas. Vocês tornaram essa caminhada mais alegre e divertida, levarei a amizade de vocês em meu coração. À Bruna Pedralli, por ter embarcado comigo nesta jornada. Desejo que seu futuro seja repleto de conquistas.

À toda a equipe do laboratório de Toxicologia In Vitro (Tox In), a harmonia e companheirismo deste grupo é notável. No final um grupo unido faz um laboratório mais forte. Obrigada também aos “vizinhos” do FARMATEC, pelas nossas tardes de risadas, lanches, conversas e cafés!

À “mãezona” Fernanda Bellato, secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo zelo, ajuda, conselhos, pela amizade e por todos os puxões de orelha!

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 – Fungicida Carbendazim.....	18
1.2 – Sistema respiratório	21
1.3 – Avaliação de Toxicidade Inalatória.....	25
1.3.1 – Avaliação da toxicidade inalatória <i>in vitro</i>	30
1.3.2 – Cenário Brasileiro	33
1.4 – Hipótese	36
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 – Objetivo Geral	37
2.2 – Objetivos Específicos.....	37
3 MÉTODOS	38
3.1 – Preparo da substância Carbendazim.....	38
3.1.1 – Dispersão do Carbendazim para testes em monocamada	38
3.1.2 – Dispersão do Carbendazim para nebulização na câmara de exposição com produção de aerossóis padronizados	38
3.2 – Cultivo Celular.....	38
3.3 – Determinação da citotoxicidade do Carbendazim frente as células A549.....	39
3.4 – Análises de Citometria de Fluxo	40
3.4.1 – Avaliação da Progressão do Ciclo Celular	40
3.4.2 – Avaliação de Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	41
3.4.3 – Avaliação da Atividade Mitocondrial.....	41
3.4.4 – Avaliação da expressão das Caspases 3/7, 8 e 9.....	41
3.5 – Obtenção dos modelos 3D	42
3.6 – Caracterização dos modelos epiteliais 3D	43
3.6.1 – Processamento das amostras para avaliação histológica.....	43
3.6.2 – Caracterização do modelo pelo perfil de expressão dos biomarcadores Pan- citoqueratina, Cd44, MUC-1, α -tubulina e E-caderina por imunofluorescência indireta	44
3.6.3 – Avaliação do perfil de expressão dos biomarcadores Caspase 3 ativa, α - tubulina e Nrf2 para avaliação do potencial efeito citotóxico por imunofluorescência indireta.....	46
3.7 – Determinação do fator de deposição da Câmara de Exposição	46
3.8 – Exposição dos modelos 3D a aerossóis de Carbendazim	47

3.9 – Avaliação do modelo alveolar epitelial 3D após exposição.....	48
3.9.1 – Avaliação da Viabilidade	48
3.9.2 – Avaliação da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	48
3.9.3 – Avaliação da Atividade Mitocondrial.....	48
3.10 – Análise Estatística	49
4 PUBLICAÇÕES.....	50
Artigo 1 – Carbendazim induces death in alveolar epithelium cells: a comparison between submerged an at the air-liquid interface cell culture	50
5 CONCLUSÕES	51
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
7 REFERÊNCIAS.....	53
8. ANEXOS	60
8.1 Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética.....	60

Título	Página
Figura 1: Representação da fórmula química do fungicida benzimidazólico Carbendazim.	18
Figura 2: Representação esquemática das divisões do sistema respiratório.	21
Figura 3: Representação esquemática de parte do septo interalveolar, próximo a pneumócito tipo II, realizando trocas gasosas.	24
Figura 4: Comparação da anatomia e fluxo de ar do trato respiratório superior de roedores e humanos.	29
Figura 5: Fotomicrografias dos modelos biomiméticos de pulmão comerciais <i>EpiAirway</i> (Mattek) e <i>MucilAir</i> (Epithelix).	32
Figura 6: Imagem da câmara de Exposição com produção de aerossóis padronizados (4 – 6 μm).	35
Figura 7: Representação da configuração inicial do sistema de cultivo para obtenção do modelo epitelial 3D biomimético.	42
Figura 8: Representação da configuração do sistema de exposição do modelo epitelial 3D biomimético a aerossóis de Carbendazim.	47

Título	Página
Tabela 1: Limite Máximo, Intervalo de Segurança e Ingestão Diária aceitável do fungicida carbendazim nas culturas específicas.	19
Tabela 2: Comparação das principais características das guias testes OCDEs para avaliação de toxicidade inalatória aguda.	28
Tabela 3: Características relevantes de modelos <i>in vitro</i> .	34
Tabela 4: Descrição dos anticorpos primários e secundários utilizados para caracterização dos tecidos biomiméticos reconstruídos por imunofluorescência indireta.	45

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Símbolo, sigla ou abreviatura	Significado
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
AGROFIT	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
IAL	Interface ar-líquido
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOP	<i>Adverse Outcome Pathway</i> - Via de efeito adverso
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> - Albumina bovina sérica
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa - Universidade Federal de Goiás
CI ₂₅	Concentração Inibitória de 25% do crescimento celular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	“Desoxyribonucleic acid” - Ácido desoxirribonucléico
ECHA	“European Chemicals Agency”
EDTA	“(Ethane-1,2-diylidinitrilo)tetraacetic acid”
EFSA	“European Food Safety Authority” - Autoridade Europeia de Segurança Alimentar
EPA	“Environmental Protection Agency” - Agência de Proteção Ambiental
FDA	“Food and Drug Administration” - Agência para Alimentos e Drogas
f_{dep}	Fator de deposição

ICCVAM “Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods” - Conselho Interagências para Coordenação da Validação de Métodos Alternativos

HAM-F12 Meio “Nutrient Mixture F-12 Ham”

LMR Limite máximo de resíduo

MBC “methyl N-(1H-benzimidazol-2-yl)carbamate”

Meio OCT “Optimal Cutting Temperature” - Temperatura ideal de corte

MTT Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MUC-1 “Mucine-1” - Mucina 1

Nrf2 “Nuclear factor erythroid 2-related factor 2” - Fator nuclear eritróide 2 - fator relacionado 2

OCDE “Organization for Economic Co-operation and Development” - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

RPM Rotações por minuto

PBS “Phosphate-Buffered Saline” - Tampão Fosfato Salino

RNAse Ribonuclease

ROS “Reactive Oxygen Species” - Espécies Reativas de Oxigênio

RPM Rotações por minuto

SVS Secretaria de Vigilância em Saúde

TGs “Test Guidelines” - Guias de Teste

UV/Vis Ultravioleta visível

V_{dep} Volume aerossol/líquido depositado na base da câmara de exposição (módulo base)

V_{neb} Volume do líquido nebulizado

Carbendazim induz morte em células epiteliais alveolares: cultura celular submersa e em interface ar-líquido

Tollstadius B.F.¹; Valadares M.C.¹

¹ Laboratório de Educação e Pesquisa em Toxicologia *In Vitro* (ToxIn), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.

RESUMO

Introdução: O fungicida Carbendazim é amplamente utilizado na agricultura e para a preservação de filmes e fibras. Está bem estabelecido que em mamíferos este fungicida promove mutagenicidade de células germinativas, carcinogenicidade, e toxicidade reprodutiva. Entretanto poucos dados estão disponíveis sobre os efeitos no sistema respiratório. **Objetivo:** Avaliar a toxicidade do Carbendazim frente às células alveolares A549 em monocamada, bem como sobre modelo epitelial alveolar reconstruído empregando-se estratégia de cultura em 3D. **Metodologia:** A citotoxicidade do Carbendazim foi avaliada através do método de redução do MTT. Para os estudos mecanísticos, também realizados em monocamada, tais células foram expostas ao fungicida (12,5µM) por 24 horas, analisadas por citometria de fluxo, sendo investigados a progressão celular, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e o potencial indutor de apoptose. Para a obtenção do modelo 3D, as células A549 foram cultivadas em insertos *transwell*, sobre matriz de colágeno tipo I, em interface ar-líquido por dois dias. O modelo 3D foi então caracterizado utilizando-se a técnica de imunofluorescência indireta, sendo avaliadas a expressão das proteínas citoqueratina, CD44, MUC-1, α-tubulina e E-caderina, as quais apresentaram padrão de expressão similar ao tecido alveolar humano. Uma vez caracterizado, este modelo foi exposto ao Carbendazim (12,5µM) na câmara de exposição com produção de aerossóis, sendo avaliadas a expressão de Nrf2, Caspase-3 clivada e α-tubulina por imunofluorescência indireta, bem como a atividade mitocondrial e geração de ROS. **Resultados e discussões:** Células em monocamada expostas ao Carbendazim mostraram retenção das células na fase G2/M, entretanto, nas demais investigações não foi observado alterações. Por outro lado, após exposição do modelo epitelial alveolar a aerossóis de Carbendazim, por meio da câmara de nebulização, o Carbendazim aumentou a expressão de Caspase-3 clivada, α-tubulina e ROS significativamente, observando-se ainda expressão positiva do fator de transcrição Nrf2. Além disso, houve redução na atividade mitocondrial. **Conclusões:** Os resultados indicam que o Carbendazim é citotóxico para as células alveolares pulmonares e que a forma de exposição e o modelo biológico de estudo impactam consideravelmente na resposta celular para avaliação *in vitro* do perfil de toxicidade inalatória, sendo observado alterações significativas no modelo alveolar 3D expostas ao Carbendazim.

Palavras-Chave: Carbendazim; Toxicidade Inalatória; Modelo Epitelial Alveolar 3D; Exposição por Nebulização; Interface Ar-líquido.

Agradecimentos: ToxIn, CAPES, CNPq e FINEP.

Carbendazim induces death in epithelial alveolar cells: submersed cell culture and air-liquid interface**Tollstadius B.F.¹; Valadares M.C.¹**

¹ Laboratory of Education and Research in *In vitro* Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

Introduction: The fungicide Carbendazim is widely used in agriculture and preservation of films and fibers. It's well established that in mammals it can promote germ cell mutagenicity, carcinogenicity, and reproductive toxicity. However, few data about the effects of this toxicant upon the respiratory system are available. **Objectives:** Evaluate Carbendazim toxicity upon A549 alveolar cells in monolayer, as well as on a reconstructed alveolar epithelial model using 3D culture strategy. **Methodology:** Carbendazim cytotoxicity upon A549 cells was assessed through MTT reduction method. For mechanistic studies, also performed on monolayer, cells were exposed to the fungicide (12.5µM) for 24 hours, analyzed by flow cytometry, being investigated for cell cycle progression, ROS generation, and apoptosis potential induction. For 3D model obtention, A549 cell were cultivated on transwell inserts, upon collagen type I matrix, on an air-liquid interface for two days. The 3D model was then characterized using indirect immunofluorescence, and evaluated for citokeratin, CD44, MUC-1, α-tubulin and E-cadherine expression, which showing a similar expression pattern to the human alveoli. After characterized, this model was exposed to Carbendazim (12.5µM) on the exposure chamber with aerosol production, and assessed for Nrf2, Cleaved Caspase-3 and α-tubuline expression by indirect immunofluorescence, as well as the mitochondrial activity and ROS generation. **Results e discussion:** Monolayer cells exposed to Carbendazim showed cell arrest at G2/M phase, however additional alterations were not observed on the investigation. Moreover, after exposure of the alveolar epithelial model to Carbendazim aerosol, through the nebulization chamber, Carbendazim increased cleaved caspase-3, α-tubuline and ROS expression significantly, and also, a positive Nrf2 transcription factor expression. Besides that, mitochondrial activity was also reduced. **Conclusions:** The results indicate that Carbendazim is cytotoxic for pulmonary alveolar cells and the exposure way combined to the biological model of study impacts considerably on the cell response for the *in vitro* evaluation of the inhalatory toxicity profile, being observed significant alterations on the 3D alveolar model exposed to Carbendazim.

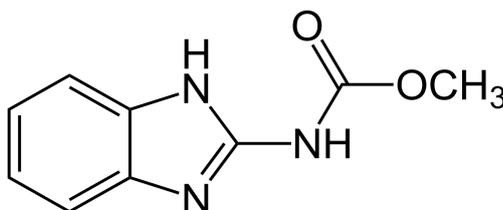
Keywords: Carbendazim; Inhalation Toxicity; Alveolar 3D epithelial model; Nebulization Exposure; Air-liquid interface

Acknowledgements: ToxIn, CAPES, CNPq e FINEP.

1.1 - Fungicida Carbendazim

O fungicida benzimidazólico methyl N-(1H-benzimidazol-2-yl)carbamate (MBC) (Figura 1), também conhecido comercialmente como Carbendazim, tem sido amplamente utilizado na agricultura. Este fungicida é utilizado principalmente em culturas de laranjas, cereais, trigo e outros (MAZELLIER *et al.*, 2002; MCCARROLL *et al.*, 2002), contra doenças fúngicas causadas por *Guignardia citricarpa* (pinta preta) e *Colletotrichum acutatum* (estrelinha), fungos comuns em lavouras de laranjas (KUPPER *et al.*, 2012). O mecanismo de ação antifúngica do Carbendazim se baseia na supressão do crescimento do fungo através da ligação a proteína celular tubulina, interrompendo a polimerização e impedindo a progressão do processo mitótico, impedindo assim a multiplicação celular (DAVIDSE; FLACH, 1977).

Figura 1: Representação da fórmula química do fungicida benzimidazólico Carbendazim.



Fonte: PubChem DATABASE.

No Brasil, o Carbendazim é aplicado em culturas de algodão (sementes), citros (folhas), feijão (sementes e folhas), soja (sementes e folhas), trigo (folhas) e em uma grande variedade de frutas e vegetais (AGROFIT, 2018). Este fungicida também é utilizado na preservação de filmes, fibras, couro, borracha, polímeros, construção, entre outros (ECHA, 2018; EFSA, 2015). Os limites máximos, Intervalo de Segurança e Ingestão Diária, aceitáveis do fungicida Carbendazim em culturas específicas estão apresentados na Tabela 1 e são descritos na base de dados do Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (AGROFIT) (AGROFIT website, 2018). Embora estes valores estejam bem estabelecidos, estudos apontam alimentos com valores superiores aos recomendados (NETO, 2014).

Tabela 1: Limite Máximo, Intervalo de Segurança e Ingestão Diária aceitável do fungicida carbendazim nas culturas específicas.

Cultura(s)	Limite Máximo de Resíduo mg/kg do Produto Comercial		Intervalo de Segurança (DIAS)	Ingestão Diária Aceitável (IDA) mg/kg Peso Corporal
	Nacional	Codex		
Algodão	0,1		(1)	0,02
Arroz	0,05	2		0,02
Citros	5		7	0,02
Feijão	2	0,5	14	0,02
Maçã	5		14	0,02
Milho	0,05			0,02
Soja	0,5	0,5	14	0,02
Trigo	0,1		35	0,02

Fonte: AGROFIT - website.

Segundo a Administração para Alimentos e Medicamentos (do inglês “Food and Drug Administration” - FDA), o consumo e/ou exposição ao fungicida está associado a um aumento no risco de tumores de fígado, tendo seu registro como fungicida na agricultura cancelado por mais de uma década (US EPA, 2011). Além disso, o Carbendazim também é proibido em diversos países da União Europeia (EU PESTICIDES DATABASE, 2018).

O Brasil está entre um dos maiores produtores de laranja e suco de laranja do mundo, exportando esses produtos para diversos países, inclusive para os Estados Unidos. No dia 10 de janeiro de 2012, o FDA suspendeu temporariamente as importações de suco de laranja brasileiro pelos Estados Unidos, segundo maior mercado importador do produto. De acordo com a Agência Americana de Proteção Ambiental (do inglês “Environmental Protection Agency” - EPA), resíduos do agrotóxico Carbendazim foram encontrados no suco de laranja brasileiro 35 µg/kg (ou ppb). Embora essa concentração seja inferior ao limite máximo de resíduos (LMR) estabelecido pela legislação brasileira e por países como o Canadá e Europa, desde 2009, a legislação americana não permite a presença de Carbendazim no suco de laranja comercializado (EPA, 2012).

Segundo as especificações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2007) e da EPA (U.S. EPA, 2005), o Carbendazim é um fungicida de classe

toxicológica III, considerado de toxicidade média. Em conformidade com a tabela de categorização toxicológica da EPA, esse fungicida é considerado como pertencente ao grupo C, classificado como possível carcinógeno em humanos (MCCARROLL *et al.*, 2002). Apesar destas classificações, existem mais de 35 registros de produtos comerciais contendo Carbendazim, na base de dados do Ministério da Agricultura (AGROFIT). As formulações contendo o fungicida possuem diferentes classificações toxicológicas variando de II - Alta Toxicidade à IV - Baixa Toxicidade (AGROFIT - website). A dificuldade de modelos disponíveis para avaliação da toxicidade inalatória e a falta de dados na literatura sobre os possíveis danos deste ao sistema pulmonar dificulta a classificação destes produtos comerciais, além da falta de harmonização entre as formas de avaliação e categorização do mesmo.

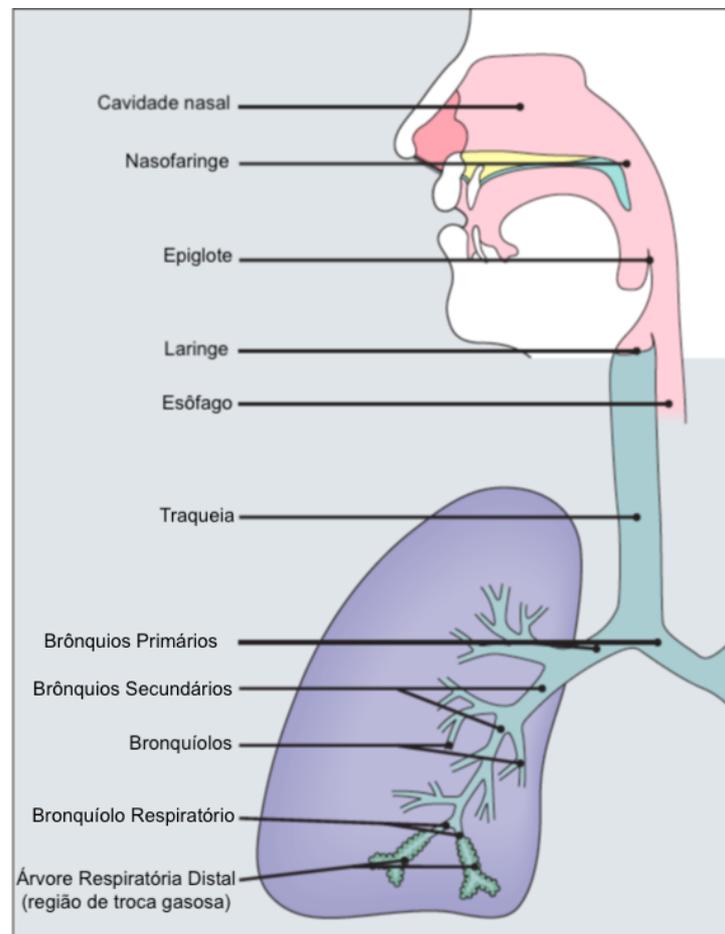
Estudos têm mostrado que o Carbendazim pode afetar vários aspectos do sistema reprodutivo, incluindo mutações de células germinativas, embriotoxicidade, ou teratogênese em hamsters, camundongos, ratos ou humanos (CARTER *et al.*, 1987; MANTOVANI *et al.*, 1998; AKBARSHA *et al.*, 2001; FARAG *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2015). Além disso, o Carbendazim é extremamente tóxico para peixes e outros organismos aquáticos (BOUDINA *et al.*, 2003; LUDWIKOWSKA *et al.*, 2013; PALANIKUMAR *et al.*, 2014). Devido a ocorrência do Carbendazim no meio ambiente e a potencial exposição através da dieta e inalação pelos trabalhadores, ainda há preocupações sobre os riscos à saúde humana/ambiental em geral causada por este fungicida, assim como uma necessidade de conhecer os seus mecanismos tóxicos (LESMES-FABIAN; BINDER, 2013). Entretanto, existem poucos estudos que elucidam os mecanismos de toxicidade, os órgãos alvos e, em particular, informações sobre a toxicidade do sistema respiratório.

Embora pouco se conheça sobre os efeitos deste composto sobre o sistema respiratório, esta é uma das mais importantes vias de exposição dos produtos contendo Carbendazim aos trabalhadores e moradores rurais considerando a forma de exposição. Atualmente, a investigação da toxicidade inalatória utiliza métodos *in vivo* em que a letalidade é o único parâmetro para a classificação e a rotulagem dos produtos (OCDE, 2018a, 2009a, 2009b), entretanto, este método não permite a investigação de mecanismos tóxicos causados por toxicantes diretamente sobre o sistema respiratório. Além disso, não há metodologias alternativas formalmente validadas e aceitas pelas agências regulatórias para avaliação da toxicidade pulmonar *in vitro*.

1.2 - Sistema respiratório

O sistema respiratório é formado por diferentes órgãos que em conjunto são responsáveis pelas trocas gasosas, o qual permite o transporte de O_2 pela corrente sanguínea para as células, e realiza a retirada do CO_2 produzido durante o metabolismo celular. Anatomicamente, esse sistema pode ser dividido em uma porção condutora, constituído pelas fossas nasais, faringe, laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos, e uma porção respiratória ou porção distal, formada pelos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e alvéolos, na qual cavidades contendo ar (sacos alveolares) estão em contato íntimo com os vasos capilares realizando as trocas gasosas (LOWE; ANDERSON, 2015). A representação das divisões do sistema pode ser observada na Figura 2.

Figura 2: Representação esquemática das divisões do sistema respiratório.



Fonte: Adaptado de LOWE; ANDERSON, 2015.

O epitélio do sistema respiratório, classificado como pseudoestratificado colunar, é formado pelo conjunto de células epiteliais ciliadas intercaladas com células caliciformes, que

revestem a porção condutora do sistema respiratório. Este epitélio é constituído por cinco tipos celulares: Célula Colunar Ciliada, com aproximadamente 300 cílios na superfície apical e alto número de mitocôndrias; Células Caliciformes, secretoras de muco composto de glicoproteínas, através de gotículas em sua porção apical; Células em escova ou *brush cells*, as quais possuem numerosos microvilos em sua porção apical; Células basais, células tronco pequenas e arredondadas apoiadas na lâmina basal, que por mitose se diferenciam nos outros tipos celulares do epitélio; e a Célula Granular, similares às células basais, porém contém grânulos de 100-300nm de diâmetro, pertencentes ao sistema neuroendócrino difuso. Este epitélio reveste todo o sistema desde a cavidade nasal até os brônquios, ocorrendo uma simplificação gradual à medida que o sistema se ramifica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A cavidade nasal, faringe e laringe, são a primeira passagem do ar, o qual é umedecido e filtrado através dos pelos nasais. Seguindo para a traqueia que se ramifica em dois brônquios principais, os quais entram no pulmão através do hilo, por onde também entram as artérias e saem os vasos linfáticos, revestidos por tecido conjuntivo denso. Os brônquios principais se ramificam, dividindo-se em três brônquios lobares no pulmão direito e dois no esquerdo, formando os lobos pulmonares. Os brônquios primários apresentam tecido similar a traqueia, em sua porção extrapulmonar, e à medida que se ramificam apresentam uma simplificação gradual, bem como a diminuição da altura do epitélio. Estes brônquios continuam se dividindo, formando os segmentares, e posteriormente formando estruturas cada vez menores, chamadas bronquíolos, os quais se ramificam penetrando os lóbulos pulmonares, formando os bronquíolos terminais, e bronquíolos respiratórios (LOWE; ANDERSON, 2015; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

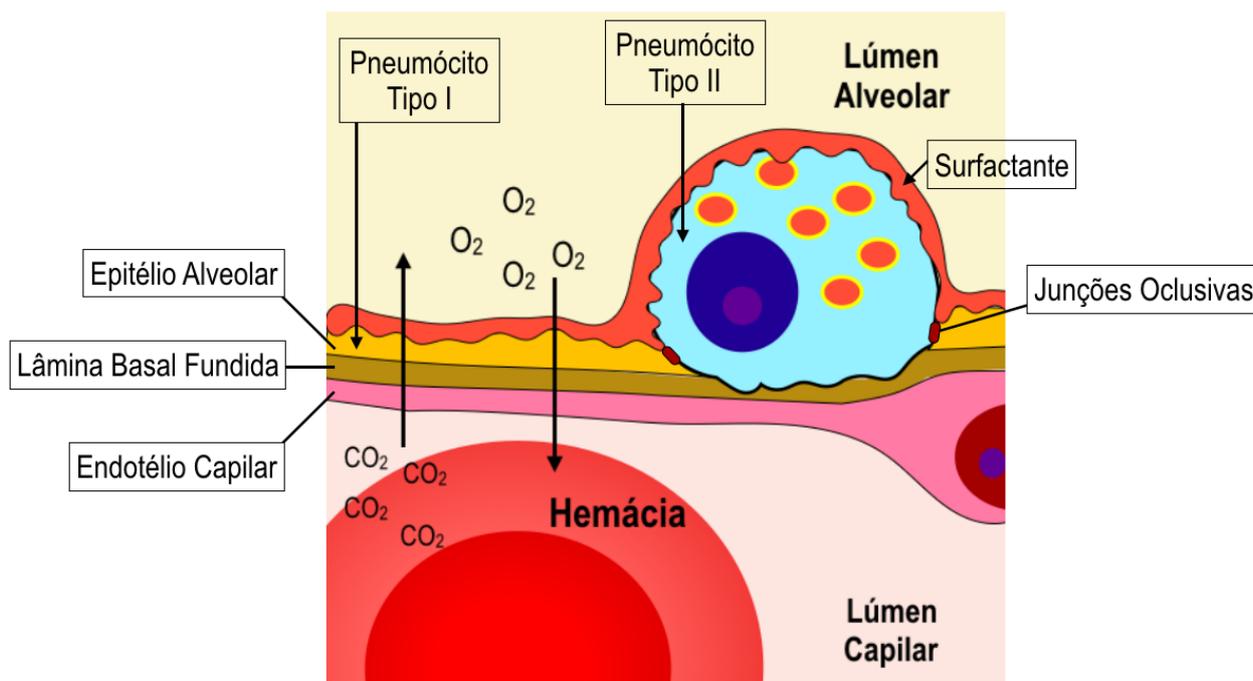
Ao final do bronquíolo terminal, estão os bronquíolos respiratórios, constituídos por expansões saculiformes com alvéolos, onde ocorrem as trocas gasosas. As áreas não ocupadas pelos alvéolos são revestidas por epitélio simples, variando de colunar baixo a cuboide, podendo apresentar cílios na porção inicial. Esse epitélio simples contém também células de Clara, que apresentam grânulos de secreção proteica, protegendo contra poluentes e inflamações. O músculo liso e as fibras elásticas formam uma camada mais delgada do que a do bronquíolo terminal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

À medida que a porção condutora do sistema respiratório adentra o parênquima pulmonar, mais alvéolos se formam nos bronquíolos, originando o chamado ducto alveolar. A contínua passagem de ar é assegurada pelo suporte estrutural, flexibilidade e extensibilidade, devido a formação da parede condutora, uma combinação de cartilagem, tecido conjuntivo e tecido muscular liso. Os alvéolos, por sua vez, consistem em micro-cavidades revestidas por

epitélio simples pavimentoso, os quais não apresentam parede provida de músculo liso. Além disso, fibras elásticas e reticulares constituem suporte para os ductos, alvéolos e capilares sanguíneos interalveolares, que se distendem durante a inspiração e se contraem na expiração, impedindo a distensão excessiva dessas estruturas e eventuais lesões (LOWE; ANDERSON, 2015).

Os alvéolos são compostos de uma camada epitelial fina, apoiada em tecido conjuntivo, no qual há uma rica rede de capilares sanguíneos, sendo comum a dois alvéolos adjacentes, originando o septo interalveolar. Este é formado por pneumócitos tipo I e tipo II, separadas pelo interstício de tecido conjuntivo com fibras reticulares e elásticas, substância fundamental e células do conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Os pneumócitos do tipo I são células pavimentosas, de pequena espessura facilitando a difusão do O₂ para o sangue, unidas por junções de oclusão, evitando a passagem de fluido extracelular para a luz do alvéolo. Os pneumócitos do tipo II são células cúbicas, contendo núcleo esférico e citoplasma rico em mitocôndrias, retículos endoplasmático liso e rugoso, que se localizam sobre a lâmina basal entre os pneumócitos tipo I, com os quais formam desmossomos e junções unitivas. São normalmente encontrados em grupos de duas a três células em regiões onde as paredes alveolares se unem. Possuem vesículas grandes de corpos esféricos lamelares com surfactante pulmonar, compostos de fosfolipídios, proteínas e glicosaminoglicanos, o qual é exocitado da célula através de corpos lamelares e recobre a superfície dos alvéolos, diminuindo a tensão superficial, o que facilita a expansão na inspiração e evita o colapso na expiração. Acredita-se que quando o epitélio é exposto a agentes tóxicos, sendo lesionado, estes pneumócitos podem aumentar em tamanho e número, recobrando a área lesionada, agindo como precursores de pneumócitos tipo I (LOWE; ANDERSON, 2015). Cada alvéolo possui cerca de 250µm em diâmetro quando inflado, com uma fina parede contendo capilares pulmonares, os quais constituem a barreira hematoalveolar (Figura 3).

Figura 3: Representação esquemática de parte do septo interalveolar, próximo a pneumócito tipo II, realizando trocas gasosas.



Fonte: A autora.

A proteção desse sistema é feita em grande parte pelos macrófagos, sentinelas especializadas que funcionam como linha primária de defesa contra patógenos inalados, participando de respostas inflamatórias a injúria tecidual e infecções. Estão localizados nos alvéolos, interstício, vias aéreas, pleura, e em algumas espécies, nos vasos. Em condições normais, estes trabalham para manutenção da homeostase no sistema, sendo suprimidos, a fim de limitar a reação exacerbada a estímulos inofensivos. Agentes tóxicos e patógenos podem superar esta regulação levando a ativação dos macrófagos e liberação de citocinas e mediadores. Entretanto, quando a liberação desses mediadores pela ativação dos macrófagos é excessiva ou incontrolada, podem contribuir para a patogênese de uma possível doença. A ativação e funcionamento dos macrófagos são regulados por diversos receptores envolvidos por citocinas e mediadores inflamatórios. São componentes altamente adaptativos do sistema imune inato, com as mudanças no microambiente o fenótipo e funções dessas células também mudam conferindo grande plasticidade. Macrófagos alveolares, ou células de poeira, são encontrados nos alvéolos pulmonares, próximos aos pneumócitos. Estas células são responsáveis pela remoção de partículas, como poeira e microrganismos, da superfície respiratória, sendo frequentemente encontrados com grânulos de material exógeno. Também estão envolvidos na fagocitose de células mortas, por necróticas e apoptóticas, resultantes do

próprio processo fisiológico do tecido, ou ainda, da exposição a agentes citotóxicos (GUYTON, 2007; LASKIN *et al.*, 2015).

Em geral, danos induzidos nestes tecidos por substâncias químicas estão relacionados ao desenvolvimento de diferentes doenças, desde doenças de caráter inflamatório ao câncer. Para se investigar o impacto da exposição a agentes químicos ao sistema respiratório são empregados diferentes modelos de investigação *in vitro* e *in vivo*.

1.3 – Avaliação de Toxicidade Inalatória

Conforme descrito acima, o sistema respiratório consiste em órgãos de alta eficiência em absorção de gases e substâncias voláteis devido sua alta superfície de contato, rico suprimento sanguíneo, e a fina membrana que separa o ar do sangue. A inalação é uma das rotas de exposição humana para diversos produtos como partículas, nanomateriais, gases e compostos químicos voláteis. Os pulmões são vias de entrada de compostos químicos ou partículas, que podem exercer o efeito localmente ou podem atingir a via sistêmica (TISSERAND; YOUNG, 2014).

Estudos epidemiológicos demonstram associação entre o número de poluentes aéreos e admissões hospitalares, incluindo doenças ou disfunções pulmonares, sendo um problema de saúde pública de grande relevância (SYDBOM *et al.*, 2001). Embora fatores genéticos e de suscetibilidade sejam importantes na incidência de doenças pulmonares, a grande maioria dos casos resultam de exposições ambientais, dietéticas ou ocupacionais a toxicantes (PLEIL, 2016). Estudos apontam que mais de 80% de todos os casos de câncer de pulmão são decorrentes do tabagismo (LATIMER, 2018). Dentre as desordens pulmonares induzidas por compostos tóxicos, a inflamação pulmonar tem sido uma das mais incidentes afetando a habilidade de defesa das células pulmonares. Outra doença relacionada, a asma, ocorre quando várias proteínas inaladas, agentes químicos, ou partículas aéreas sensibilizam o trato respiratório desencadeando sintomas clínicos, como por exemplo, a crise asmática. A grande vulnerabilidade desse sistema aos toxicantes se dá principalmente pela exposição extensa ao ambiente externo, assim como a todo o débito cardíaco. Dessa forma, os toxicantes podem entrar no trato respiratório pela inalação, afetando diretamente o tecido pulmonar ou por outras vias, como a dietética ou dérmica, atingindo os pulmões através da circulação sistêmica. A inalação é uma das principais vias de exposição às substâncias tóxicas sistêmicas que têm alvos extrapulmonares, um exemplo é o dissulfeto de carbono, quando inalado, causa efeitos neurológicos como a encefalopatia (NORDGREN TM & BAILEY, 2016).

Dentre os principais eventos adversos pulmonares induzidos por toxicantes estão doenças como a bronquite crônica, enfisema, bem como o câncer de pulmão (RODEN, CAMUS, 2018).

A Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (do inglês “Organization for Economic Co-operation and Development” - OCDE) define toxicidade inalatória aguda como a totalidade de efeitos causados por uma substância exposta por um período menor que 24 horas (normalmente de 4 a 6 horas) (OCDE, 2009c). A quantidade de substâncias tóxicas pulmonares conhecidas é grande, entretanto o potencial de toxicidade de inúmeras outras ainda não foram caracterizados. Sendo assim, o estudo da toxicidade pulmonar é um grande desafio pelo fato de muitos toxicantes estarem presentes no meio ambiente e em misturas variadas, mas sobretudo por falta de um modelo experimental adequado, bem como desfechos de toxicidade bem definidos.

A toxicidade inalatória aguda é avaliada tradicionalmente empregando-se roedores e diferentes sistemas de exposição, os quais podem ter o corpo todo exposto ou apenas a cavidade nasal por 4 horas de exposição, para identificar substâncias que podem causar toxicidade após uma exposição a curto prazo (OCDE 403, 2009a). As guias teste (TGs) adotados pela OCDE fornecem diretrizes para obtenção de dados inerentes ao potencial de toxicidade inalatória aguda quando tais estudos são requisitados por agências regulatórias. Estes guias são divididos em 3 tipos básicos de estudo: Estudo Piloto, o qual permite a avaliação do potencial tóxico da substância, que pode ser definido por dados obtidos na literatura ou conhecimento empírico pra definir as condições e doses do estudo principal. Geralmente o estudo é conduzido em fêmeas por ser considerado uma avaliação no sexo mais suscetível a exposição. Teste Limite, é utilizado quando a substância a ser avaliada é considerada como virtualmente não-tóxica, segundo o Sistema Harmonizado Globalizado (do inglês “Globally Harmonized System” - GHS), a concentração de gases, vapores, e aerossóis são de 20000 ppm, 20 mg/L, e 5 mg/L, respectivamente (ou a maior concentração possível) (GHS, 2007), a fim de investigar a maior dose tolerada. Caso seja obtido taxa de 50% de sobrevivida ou menos na concentração limite obtida, não são necessários testes adicionais. O Estudo Principal, três ou mais concentrações são testadas a fim de observar os desfechos, até encontrar a concentração ou faixa da concentração letal para 50% (OCDE, 2009c).

Os guias testes fornecidos pela OCDE para Toxicidade Inalatória são: a OCDE TG 403 (OCD, 2009a) o qual avalia a toxicidade aguda por via inalatória, em dois tipos de protocolo: Protocolo Tradicional, no qual o tempo de exposição é fixo, sendo geralmente de 4 horas, ou o Protocolo de Avaliação de Contração por Tempo (C x T), o qual avalia os efeitos da mesma concentração em diferentes tempos de exposição. O protocolo de Concentração por Tempo é

indicado para determinação da cinética das concentrações letais, sendo avaliado 5 tempos diferentes de exposição para cada concentração de estudo. A concentração inicial pode ser definida por um estudo limite considerando os padrões regulatórios, como o GHS ou por determinação do diretor do estudo. A OCDE TG 436 (OCDE, 2009b) recomenda a utilização de menor número de animais, 6 animais do sexo mais suscetível, ou 3 animais de cada sexo, reduzindo o número de animais comparado ao número geral da TG 403, usando procedimentos de exposição por 4 horas para concentrações fixas. A letalidade também é utilizada como desfecho neste guia. O terceiro guia, OCDE TG 433 (OCDE, 2018a) é um refinamento que utiliza concentrações fixas usadas na OCDE TG 436, mas substitui a letalidade como único desfecho a ser avaliado, sendo inserida a observação de sinais clínicos evidentes de toxicidade. Além disso, diminui o número de animais por concentração para 5 animais por grupo. Toxicidade evidente é definida como sinais claros de toxicidade que indicam que a exposição a uma concentração maior do que a exposta anterior irá causar toxicidade grave ou morte na maior parte dos animais, como por exemplo respiração irregular ou tremores (SEWELL *et al.*, 2015). Além destas, a OCDE também preconiza guias teste OCDE TG 412 (OCDE, 2018b) para avaliação de toxicidade subaguda e OCDE TG 413 (OCDE, 2018c) para avaliação da toxicidade inalatória sub-crônica, estas não serão abordadas diretamente uma vez que o foco principal do trabalho é a avaliação dos potenciais efeitos agudos ocasionados. As principais características das OCDEs para toxicidade inalatória aguda estão sumarizadas na Tabela 2.

Tabela 2: Comparação das principais características das guias testes OCDEs para avaliação de toxicidade inalatória aguda.

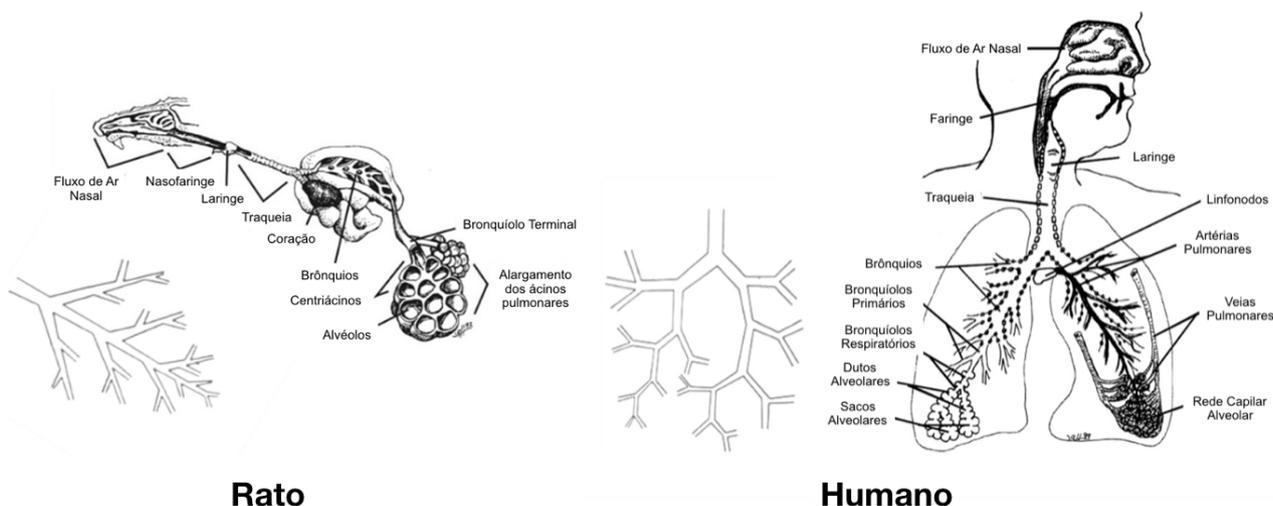
	TG 403 revisada (2009)		TG 436 (2009)	TG 433 (2017)
	Tradicional LC ₅₀	Estudo C x t		
Desfecho analisado	Letalidade Peso Corporal Análise patológica do órgão alvo (macro e micro)		Letalidade Peso Corporal Análise patológica do órgão alvo (macro e micro)	Letalidade ou Toxicidade Evidente Peso Corporal Análise patológica (macro e micro)
Forma de Exposição	Somente Nasal ou Corpo Inteiro	Somente Nasal	Somente Nasal ou Corpo Inteiro	Somente Nasal ou Corpo Inteiro
Tempo de Exposição	Variável (4 horas)	5 durações de exposição por concentração	4h	4h
Concentração Testada	Teste limite: 1 Principal: < 3 Variável - definida pelo supervisor do estudo.	Teste Limite: 1 Principal: 4-5 Variável - definida pelo supervisor do estudo.	1 ou mais • Gases: 100, 500, 2500, 20000 ppm • Vapores: 0.5, 2.0, 10.0, 20.0 mg/L • Aerossóis: 0.05, 0.5, 1.0, 5.0 mg/L	1 ou mais • Gases: 100, 500, 2500, 20000 ppm • Vapores: 0.5, 2.0, 10.0, 20.0 mg/L • Poeira e misturas (aerossóis): 0.05, 0.5, 1.0, 5.0 mg/L
Tempo de Observação	pele menos 14 dias			
Número de animais/concentração				
Estudo Piloto	3/sexo ou 3 sexo mais suscetível	3/sexo/concentração	Não é utilizado	Não é utilizado
Estudo Principal	5/sexo ou 5 sexo mais suscetível	1 ou 2/sexo/CxT *5 durações/concentração	3/sexo 6 sexo mais suscetível	5 fêmeas ou 5 sexo mais suscetível
Teste Limite	3/sexo ou 5 sexo mais suscetível	1 ou 2 /sexo/CxT	3/sexo 6 sexo mais suscetível	5 fêmeas ou 5 sexo mais suscetível

Fonte: Adaptado de OCDE, 2009c.

Apesar dos modelos que empregam roedores serem os únicos aceitos do ponto de vista regulatório para a realização de tais avaliações, vale ressaltar que existem várias diferenças críticas entre o trato respiratório humano e de roedores, que podem afetar a exatidão com a qual tais testes predizem a resposta humana a uma exposição ao toxicante

avaliado (PARENT, 2015). Estas diferenças incluem (1) fisiologia respiratória: roedores respiram obrigatoriamente pelo nariz, enquanto humanos são oronasais, dessa forma ocorre menor filtração do ar, o que aumenta a taxa de partículas que passam para o sistema respiratório, bem como a taxa de ventilação e a taxa metabólica (NIINIMAA *et al.*, 1981) (Figura 4); (2) anatomia: considerando a arquitetura da árvore brônquica, roedores apresentam predominantemente sistema monopodial de ramificação, não possuem bronquíolos respiratórios, e além disso, apresentam composição celular diferente do sistema humano, como por exemplo, menor porcentagem de macrófagos e maior porcentagem de pneumócitos do tipo I (CRAPO *et al.*, 1983; MERCER *et al.*, 1994); (3) bioquímica: composição e capacidade de bioconversão enzimática, a atividade do citocromo P450 para uma variedade de substratos, é metabolizado com menor eficiência em microsossomos da mucosa nasal humana quando comparado a roedores, além disso enzimas da fase II como S-transferase glutationa parece ter menor atividade em roedores (PARENT, 2015; CLIPPINGER *et al.*, 2018a).

Figura 4: Comparação da anatomia e fluxo de ar do trato respiratório superior de roedores e humanos.



Fonte: Adaptado de CLIPPINGER *et al.*, 2018a.

Técnicas de exposição empregadas devem ser consideradas quanto a efetividade de resposta, considerando também o bem-estar animal. Exposições de cabeça/nariz minimizam a exposição ou captação por rotas não-inalatórias e permite testar individualmente os animais, utilizando altas concentrações, entretanto os animais devem ser contidos durante todo o período de exposição, que é fixada para 4 horas não considerando o tempo de estabilização. A exposição de corpo inteiro, fornece a vantagem de remover o animal sob estresse com maior facilidade, entretanto, a exposição por outras rotas além da inalatória também ocorrem, o que

afeta os resultados obtidos (OCDE Guia Teste - No. 19, 2000). Considerando esses fatores, além das diferenças anatômicas mencionadas, existem particularidades na composição celular do parênquima pulmonar entre espécies, não permitindo uma representação fidedigna de exposição (CRAPO *et al.*, 1983).

Outro aspecto muito importante é que para se definir se uma substância é tóxica para os pulmões, o desfecho analisado em estudos convencionais é o de letalidade, porém uma substância pode ser tóxica, desencadear doenças pulmonares como asma, doenças obstrutivas ou ainda câncer, e ser de baixo potencial de letalidade aguda. Este aspecto dificulta a comparação de dados de toxicidade obtidos utilizando células e tecidos com os dados obtidos utilizando modelos animais, que por si já são diferentes, mas ainda apresentam um desfecho muito distinto. Conforme mencionado anteriormente, a investigação de toxicidade atual utiliza modelos *in vivo* onde a letalidade é o único parâmetro para classificação e rotulagem dos produtos (OCDE 433, OCDE 403, OCDE 436) o que não permite a investigação de mecanismos de toxicidade dos toxicantes no sistema respiratório.

A fim de explorar abordagens com maior potencial preditivo para a resposta humana, pesquisas recentes têm focado no desenvolvimento e aplicação de métodos *in vitro* e *in silico* que possam ser utilizados para testes em abordagens que facilitem a compreensão mecanística dos efeitos tóxicos de materiais inalados (LOIZOU *et al.*, 2008, FRÖHLICH; SALAR-BEHZADI, 2014). Para fomentar a discussão e criar dados que subsidiem o desenvolvimento de novas abordagens para a avaliação de toxicidade inalatória, foi promovido o encontro *Webinar* pelo Conselho Interagências para Coordenação da Validação de Métodos Alternativos - ICCVAM (do inglês "Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods" - ICCVAM) em 2016, no qual mais de 40 cientistas de agências regulatórias internacionais, academia, organizações não governamentais e indústrias, buscaram desenvolver recomendações para novas abordagens para testes em toxicologia inalatória. Neste evento foi estabelecido quatro ações principais: (1) desenvolver um banco de dados sobre toxicidade sistêmica existente; (2) preparar uma revisão sobre o estado-da-ciência sobre mecanismos e disponibilidade de modelos *in vitro/in silico* para toxicidade inalatória aguda; (3) identificar e otimizar abordagens *in silico*; e (4) desenvolver uma "árvore de decisão"/ estratégia de testes e conduzir estudos prova de conceito *in silico* e *in vitro* (CLIPPINGER *et al.*, 2018a).

1.3.1 - Avaliação da toxicidade inalatória *in vitro*

A toxicologia do século XXI tem caminhado no sentido de diminuir, ou em um cenário ideal, substituir o uso de animais para avaliação de toxicidade, bem como avaliar as vias dos

efeitos adversos, ao invés de apenas avaliar os desfechos, ou apenas a letalidade da substância. Nesse sentido, o conceito de Vias de Efeito Adversos (do inglês “Adverse Outcome Pathway” - AOP) tem sido amplamente utilizado para toxicologia, no qual um evento molecular inicial, seguido de uma cascata de eventos que vão desde eventos celulares, teciduais até desencadearem um efeito adverso ao nível biológico (ANKLEY *et al.*, 2010; VILLENEUVE *et al.*, 2014). A identificação e mensuração destas vias possibilita o estudo de efeitos potenciais no trato respiratório pós-inalação de forma eficiente, uma vez que eventos chaves essenciais para a progressão de uma ou mais perturbações biológicas que possam ocasionar efeitos adversos podem ser identificados antes do efeito de letalidade. AOPs podem ser construídos através de dados *in vivo*, *in vitro*, *in chemico* e *in silico* já publicados na literatura, auxiliando na identificação de potenciais alvos para desenvolver estratégias em testes não-animais (WITTWEHR *et al.*, 2017).

Até o presente momento, existem protocolos já descritos na literatura para toxicidade inalatória, entretanto, agências reguladoras ainda não os incorporaram para análises de toxicidade em seus guias de teste. A partir da identificação da melhor estratégia a ser analisada, testes *in vitro* podem ser realizados a fim de identificar os eventos chave, aumentando assim a capacidade preditiva e análise geral das substâncias estudadas (CLIPPINGER *et al.*, 2018b).

Dentre os modelos de investigação, estão os modelos *ex vivos*, cortes de pulmão *ex vivo* de precisão que podem ser produzidos de uma variedade de espécies, incluindo humanos, fornecendo a vantagem de manter a micro organização espacial dos tecidos presentes no pulmão, incluindo os relacionados à resposta imune, como macrófagos, células dendríticas, e a comunicação intercelular (FISHER *et al.*, 1994). Estes cortes podem ser obtidos de doadores saudáveis ou portadores de patologias específicas e podem ainda ser mantidos em cultivo em interface ar-líquido (IAL) por semanas. Entretanto, a variabilidade na obtenção dos tecidos, variabilidade da espessura, dentre outros fatores impactam na funcionalidade comparativa (LIN *et al.*, 2012).

Modelos *in vitro* também foram desenvolvidos a fim de estudar os efeitos de substâncias sobre o sistema respiratório. Sistemas de teste *in vitro* podem ser desenvolvidos variando em complexidade, como modelos de cultivo submersos em meio de cultura oriundos de mono ou co-cultivo celular, ou até mesmo sistemas de maior complexidade que mimetizam o trato respiratório adotando a interface ar-líquido (IAL) como sistema de cultivo (CLIPPINGER *et al.*, 2018a). Modelos celulares que se baseiam no cultivo submerso podem apresentar algumas limitações devido à interferência do meio de cultura no fenótipo epitelial normal das

células, precipitação do toxicante, sedimentação e agregação das partículas além de agir como uma barreira de difusão para os gases (AUFDERHEIDE, 2005; RACH *et al.*, 2014). Além disso, a interface com o ar também exerce função de diferenciação das células, portanto, modelos baseados na IAL têm sido desenvolvidos e utilizados para melhor representação do sistema pulmonar.

Modelos tridimensionais organotípicos que utilizam células primárias humanas e cultivados em IAL permitem a mimetização dos aspectos biológicos *in vivo*, tais como a função de barreira (funcionalidade das junções intercelulares), produção de muco, funções ciliares, podendo ser utilizados para avaliações agudas e exposições repetidas de longa duração (MATHIS *et al.*, 2013; NEILSON *et al.*, 2015; ESSAIDI-LAZIOSI *et al.*, 2017). Comercialmente, existem alguns modelos tridimensionais disponíveis para estudo da toxicidade inalatória, constituídos de tipos celulares específicos. Estes modelos são: MucilAir™ ou SmallAir™ (Epithelix), disponíveis como tecido nasal, traqueal e brônquico, saudáveis ou com patologias, como: asma, rinite, fumantes e doença pulmonar crônica obstrutiva; EpiAirway™ (MatTek Corporation), modelo mucociliar 3D e também como co-cultura, disponíveis em tecido traqueal/brônquico, indicado para estudos inflamatórios e de fibrose, representados na Figura 5. Porém, estes modelos não estão comercialmente disponíveis no Brasil por razões alfandegárias, legais e burocráticas.

Figura 5: Fotomicrografias dos modelos biomiméticos do sistema respiratório comerciais *EpiAirway* (MatTek) e *MucilAir* (Epithelix).



Fonte: MatTek website e Epithelix website.

Para o desenvolvimento de modelos de investigação *in vitro*, células transformadas como a linhagem A549 - células epiteliais alveolares humanas de carcinoma, têm sido amplamente utilizadas para investigação de toxicidade pulmonar (Kooter *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2013; Okubo *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2018). Bem como, para desenvolvimento de modelos 3D para investigação de mecanismos de toxicidade (Herzog *et al.*, 2013; Okubo *et al.*, 2015).

A linhagem A549 preserva características dos pneumócitos tipo II, como corpos multilamelares e a síntese de quantidades relativamente alta de lecitina desnaturada, o que as tornam interessantes para investigação de toxicidade pulmonar. O uso de tais linhagens apresenta vantagens como custo-benefício, fácil utilização, fornecimento ilimitado e população de células pura, permitindo uma amostra consistente e resultados reprodutíveis (Kooter *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2013; Okubo *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2018).

O epitélio alveolar é de difícil reprodução, uma vez que este é constituído de apenas uma camada celular. Portanto, o desenvolvimento de modelos que permitam a observação dos efeitos das substâncias apresenta modelos com células estratificadas 3D, nas quais podem ser realizadas exposições de toxicantes, sem destruir totalmente o tecido, permitindo a observação dos possíveis efeitos da substância em estudo.

Dentre os modelos de avaliação de toxicidade inalatória, além das culturas de células em modelos 2D e 3D, existem dispositivos que fornecem uma plataforma de avaliação e predição de respostas fisiológicas no tecido pulmonar humano à exposição. Estes modelos, conhecidos como *lung on a chip*, são criados em dispositivos poliméricos micro fabricados, que consistem em múltiplas camadas de câmaras para cultivo celular a fim de mimetizar a arquitetura das vias traqueo-brônquicas e alveolares, bem como fornecem estímulos mecânicos encontrados no tecido original (HUH *et al.*, 2010; ESCH *et al.*, 2015). Além disso, os chips fornecem mecanismos para reproduzir o microambiente pulmonar com reparação cíclica e fluxo hemodinâmico (CLIPPINGER *et al.*, 2018a).

1.3.2 - Cenário Brasileiro

Apesar da variabilidade de modelos biomiméticos disponíveis comercialmente para a comunidade científica e empresas privadas, devido a questões burocráticas e alfandegárias, tais modelos estão indisponíveis para obtenção e utilização no território brasileiro. Portanto, mostra-se necessário o desenvolvimento e a padronização de tecnologias que possibilitem a utilização desses modelos biomiméticos para pesquisas e também para agências reguladoras em âmbito nacional.

Embora modelos de exposição baseados em monocamada tenham sido extensivamente utilizados para esta finalidade, o cultivo em interface ar-líquido tem se provado um importante aspecto para simulação da exposição pulmonar *in vitro*, e portanto, é uma característica importante a ser considerada no processo de desenvolvimento de novos modelos (MATHIS *et al.*, 2013; CARSON *et al.*, 2014; KREFT *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2014). Os

modelos alternativos disponíveis para avaliação de toxicidade inalatória estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3: Características relevantes de modelos *in vitro*.

	MucilAir™ (Epithelix)	SmallAir™ (Epithelix)	Epi Airway™ (MatTek)	Lung-on-a-chip	Cortes <i>ex vivo</i>
Células Humanas	✓	✓	✓	✓	✓
Cultivo em Interface Ar-Líquido	✓	✓	✓	✓	✓
Batimento ciliar e Produção de muco	✓	✓	✓	✓	✓
Liberção de citocinas e quimiocinas	✓	✓	✓	✓	✓
Atividade Metabólica	✓	✓	✓	✓	✓
Estudos a longo-prazo	✓	✓	✓	✓	✓
Mimetiza respiração cíclica e aspectos hemodinâmicos	✗	✗	✗	✓	✗
Distribuição comercial no Brasil	✗	✗	✗	✗	-*

*Não se aplica.

O sistema de cultivo celular utilizado em avaliações da toxicidade pulmonar *in vitro* devem mimetizar dois aspectos extremamente importantes: o microambiente do sistema respiratório, e o modo de exposição da substância/material deve ser adequado para representar a distribuição pulmonar do toxicante. A exposição de substâncias testes diretamente no meio de cultura de células submersas não representa o método mais eficiente e fidedigno para esta finalidade, uma vez que a interação do material teste com o sistema de cultura pode ocasionar, por exemplo, a precipitação da substância teste, ligação à proteínas, e, conseqüentemente, afetar a resposta celular (ENDES *et al.*, 2014; LENZ *et al.*, 2014). Com base nestes fatores, alguns sistemas de exposição para estudos *in vitro* promovem a nebulização de substância de formas diferentes, promovendo uma deposição adequada de aerossóis em células cultivadas na interface ar-líquido, apresentando-se como um método interessante para exposição de culturas celulares ou tecidos *ex vivo* a toxicantes pulmonares.

O sistema da câmara de exposição com geração de aerossóis (Figura 6) é um modelo recentemente desenvolvido para avaliar exposições *in vitro* a toxicantes em uma interface ar-

líquido, podendo se aproximar de um modelo de exposição inalatória com relevância para a exposição humana. Esse sistema estabelece uma configuração que melhor representa a exposição humana a substâncias que podem ser volatilizadas ou particuladas e, desta forma serem inaladas, facilitando a extrapolação de dados de toxicidade obtidos *in vitro* para *in vivo*. Nesse modelo, as células entram em contato direto com aerossóis/partículas gerados por contaminantes líquidos ou suspensões, em concentrações controladas, que se depositam de forma uniforme, sem atrito, sobre a cultura celular em uma interface ar-líquido, mimetizando a exposição humana a compostos voláteis/particulados (WEBER *et al.*, 2013).



Figura 6: Imagem da câmara de Exposição com produção de aerossóis padronizados (4 – 6 μm).

Fonte: Vitrocell System

Outra vantagem desse modelo é a possibilidade de associá-lo a sistemas *in vitro* de cultivo celular 3D, o que irá permitir uma exposição por um tempo prolongado, possibilitando um cenário que represente tanto a exposição ocupacional repetida, quanto a aguda. Assim, a associação desse sistema com culturas celulares em 3D pode ser uma ferramenta promissora para a avaliação de mecanismos de toxicidade induzidos por compostos voláteis/particulados (LIU *et al.*, 2013). Dados da literatura, mostram que o sistema de exposição com geração de aerossóis representa um modelo *in vitro* valioso para rastrear e avaliar mecanismos de toxicidade ao DNA de células expostas a toxicantes voláteis/particulados, por meio da utilização do ensaio do cometa (WEBER *et al.*, 2013) ou ainda, investigações no campo da epigenética, como metilação global do DNA.

1.4 Hipótese

Diante do exposto, neste trabalho, dada a limitação dos modelos *in vivo*, desenvolvemos um modelo de células alveolares 3D e utilizamos uma câmara de exposição com geração de aerossóis para mimetizar a toxicidade inalatória *in vitro* o mais próximo ao que acontece em humanos. Este modelo 3D e a forma de exposição em aerossóis foi empregado para avaliar os possíveis efeitos tóxicos do Carbendazim sobre o sistema pulmonar.

2.1 - Objetivo Geral

O objetivo central do presente trabalho foi investigar os efeitos da exposição direta do fungicida em células pulmonares cultivadas em monocamada, bem como a exposição dos aerossóis de Carbendazim à um modelo epitelial 3D em interface ar-líquido. Além disto, foram investigados os potenciais mecanismos de toxicidade do Carbendazim, sendo comparado o desempenho de ambos os sistemas de cultivo e exposição: células cultivadas em monocamada submersas e expostas ao Carbendazim, e ao modelo alveolar epitelial 3D exposto ao fungicida nebulizado na câmara de exposição com geração de aerossóis, para avaliação dos mesmos.

2.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial citotóxico do Carbendazim frente às células pulmonares A549 cultivadas em monocamada, pelo teste de conversão do reagente MTT;
- Avaliar a progressão do Ciclo Celular, geração de ROS, atividade mitocondrial e atividade das Caspases das células A549 cultivadas em monocamada após exposição ao Carbendazim;
- Desenvolver um modelo epitelial 3D alveolar, utilizando células A549 cultivadas em interface ar-líquido, para observação dos possíveis efeitos do fungicida;
- Realizar a caracterização morfológica do modelo 3D, bem como avaliar a expressão de biomarcadores epiteliais por este modelo;
- Avaliar o potencial efeito citotóxico através dos testes de MTT e expressão da Caspase-3, além da geração de ROS e avaliação da atividade mitocondrial, bem como as alterações teciduais, avaliando o perfil de expressão da proteína α -tubulina e do fator nuclear Nrf2, decorrentes da exposição ao Carbendazim sobre o modelo epitelial 3D, por meio de nebulização diretamente sobre as células em interface ar-líquido.

3.1 - Preparo da substância Carbendazim

3.1.1 - Dispersão do Carbendazim para testes em monocamada

A substância Carbendazim 97% padrão-analítico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi dispersa em DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na concentração inicial de 1046,4 μ M. A dispersão foi agitada no vortex por 10 segundos, colocada em banho ultrassom à 37°C por 20 minutos, agitada novamente no vortex por 10 segundos. Posteriormente, a dispersão foi diluída em meio *Nutrient Mixture F-12 Ham* (HAM-F12) no momento dos testes, de modo a se obter as concentrações de interesse. Nesse caso, o veículo (DMSO 0,5% - para citotoxicidade, e 0,02% - para os demais experimentos) foi utilizado como controle negativo dos experimentos.

3.1.2 - Dispersão do Carbendazim para nebulização na câmara de exposição com produção de aerossóis padronizados

A substância Carbendazim na concentração de 4,2 μ M (1mg/ml), 97% padrão-analítico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi dispersa em Tampão fosfato salino (PBS). A dispersão foi agitada no vortex por 10 segundos, colocada em banho ultrassom à 37°C por 20 minutos, agitada novamente no vortex por 10 segundos. A dispersão foi nebulizada e na câmara de exposição e produzido aerossóis padronizados de 4 à 6 μ m.

3.2 - Cultivo Celular

As células epiteliais de carcinoma pulmonar alveolar humano A549 foram obtidos do “Banco de Células do Rio de Janeiro” (BCRJ) (Rio de Janeiro, RJ, BRASIL), e mantidos em meio HAM-F12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 2mM de L-Glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco, Waltham, MA, EUA), permanecendo em estufas de cultivo celular a 37°C, atmosfera de 5% de CO₂ e umidade controlada.

Para a realização do subcultivo da linhagem, confluência celular de 80-90% foi utilizada. O meio presente nos frascos de cultivo foi descartado e as células lavadas com

10 mL de PBS, sendo posteriormente incubadas com 1 mL de solução de Tripsina/EDTA TripLE Express (Gibco, Waltham, MA, EUA) por 2 – 5 minutos para desagregação químico-enzimática. Após esse período, a neutralização foi realizada com 5 mL de meio completo e as células transferidas para tubos cônicos, e centrifugadas a 1000 rotações por minuto (RPM) por 5 minutos. Para se realizar a contagem e monitorar a viabilidade das células, o pellet obtido foi ressuspenso em 1 mL de meio e, posteriormente, 10 μ L da suspensão celular obtida foi misturada com 10 μ L de solução de azul de tripano a 0,2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), para a realização da contagem das células em contador automático TC20TM (BioRad, Hercules, CA, EUA), sendo utilizadas quando a viabilidade foi maior que 90%.

3.3 - Determinação da citotoxicidade do Carbendazim frente as células A549

A avaliação da citotoxicidade do Carbendazim foi realizada através do método de redução do sal [brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT), pela redução mitocondrial do sal de tetrazólio pela enzima succinato desidrogenase, convertido em formazan pelas células metabolicamente ativas e pode ser quantificado por espectrofotometria UV/Vis.

As células A549 foram removidas dos frascos de cultivo, centrifugadas e contadas conforme descrito na seção 3.2. Após a contagem, uma suspensão celular foi preparada na concentração de 4×10^4 células/mL e foram distribuídos 100 μ L da mesma em placas de 96 poços (4×10^3 células/poço), exceto nas extremidades da placa, nas quais foram adicionados 100 μ L de meio HAM-F12, a fim de não haver ressecamento nos poços com células. Após o plaqueamento, as células foram incubadas overnight em estufa de cultivo para adesão, sendo em seguida expostas a diferentes concentrações do composto Carbendazim (1.046,4 μ M, 523,2 μ M, 261,6 μ M, 130,8 μ M, 65,4 μ M, 32,7 μ M, 16,35 μ M e 8,17 μ M) por 24 horas, utilizando a maior concentração possível a ser dispersa em 0,5% DMSO.

Depois de expostas, as células foram lavadas duas vezes com 150 μ L de PBS/poço, sendo incubadas com 100 μ L/poço de meio HAM-F12 contendo MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) à 0,5 mg/mL por 3 horas em estufa de cultivo celular. Em seguida, o meio presente nos poços foi removido por inversão e os cristais de formazan formados foram solubilizados em 100 μ L de DMSO, sob agitação de 30 RPM por 20 minutos, o qual foi

utilizado como branco. A absorbância do conteúdo dos poços foi determinada em espectrofotômetro de placas (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 560 nm. Após a determinação da absorbância, a viabilidade celular foi calculada em relação ao controle negativo (células não expostas) empregando-se a Equação 1.

Equação 1: Cálculo da viabilidade celular da linhagem A549 após exposição às diferentes concentrações das substâncias-teste.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(\text{Média da absorbância correspondente a cada concentração} - \text{Branco correspondente a cada concentração}) \times 100}{(\text{Média da absorbância do controle negativo} - \text{Branco correspondente ao controle negativo})}$$

3.4 - Análises de Citometria de Fluxo

Os efeitos do Carbendazim nas células A549 cultivadas em monocamada foram avaliadas por citometria de fluxo. Para tal, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços na concentração de 2×10^5 células por poço, suplementadas com 10% de SFB, e incubadas por 24 horas para aderência na placa. Então, foram expostas à Concentração Inibitória do Carbendazim de 25% (CI₂₅), que corresponde a 12,5µM, em 1ml/poço por 24 horas, uma vez que para avaliação de efeito, é necessário obter células viáveis. Tais análises foram realizadas em triplicata e para cada parâmetro avaliado, 10000 eventos foram adquiridos em Citômetro de Fluxo (BD FACSCANTO II, BD Biosciences, NJ, EUA).

3.4.1 - Avaliação da Progressão do Ciclo Celular

As células foram transferidas para tubos de citometria, lavadas com PBS e centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e o pellet ressuspenso em 1 mL de etanol 70% gelado (*ice-cold*) e incubados *overnight* à 4°C. Após a fixação, os tubos foram centrifugados a 1500 RPM por 5 minutos e o etanol foi desprezado, e as células foram lavadas com 2 mL de PBS gelado e centrifugadas (1500 RPM por 5 minutos). As células foram marcadas com 200 µL de solução de RNase (200µg/mL) e Iodeto de Propídeo (50µg/mL), incubadas por 1 hora, em temperatura

ambiente ao abrigo da luz, e analisados em citômetro de fluxo (BD FACSCANTO II, BD Biosciences, NJ, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle negativo.

3.4.2 - Avaliação de geração de ROS

Para avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio, após 24 horas de exposição ao Carbendazim à 12,5 μ M (CI₂₅), as células foram incubadas com 5 μ M do reagente CellROX[®] Deep Red (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), por 30 minutos à 37°C. As células foram então lavadas 3 vezes com 2mL de PBS na placa. Então, foram desagregadas com tripsina, transferidas para tubos de citometria e centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram novamente lavadas com 2 mL de PBS, centrifugadas e ressuspensas em 200 μ L de PBS para análise em citometria de fluxo.

3.4.3 - Avaliação da Atividade Mitocondrial

Para análise da atividade mitocondrial, após a exposição ao Carbendazim (CI₂₅), as células A549 foram incubadas com o reagente MitoTracker (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) na concentração final de 25nM, por 30 minutos à 37°C, e então, foram lavadas com 2mL de PBS por 3 vezes na placa. Posteriormente, as células foram desagregadas com tripsina, transferidas para tubos de citometria e centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram novamente lavadas com 2 mL de PBS, centrifugadas e ressuspensas em 200 μ L de PBS para análise em citômetro de fluxo.

3.4.4 - Avaliação da expressão das Caspases 3/7, 8 e 9

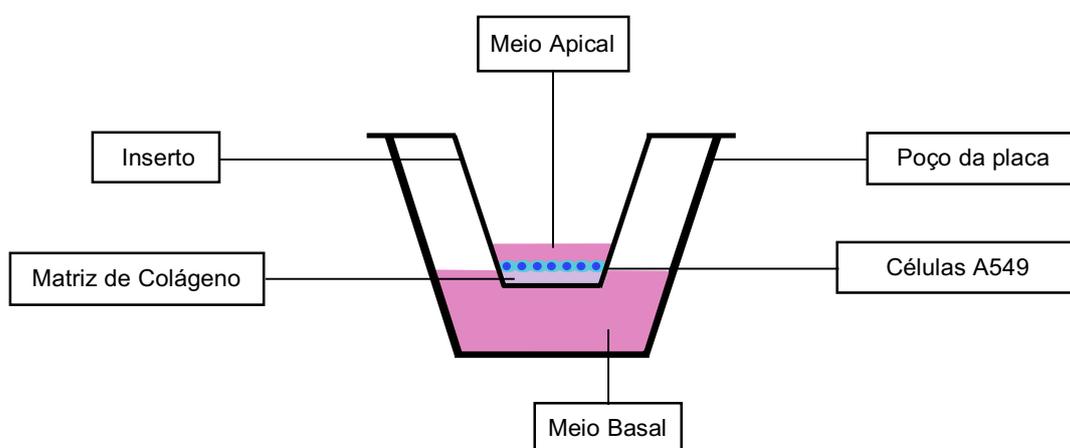
A avaliação foi realizada utilizando o Kit CaspaTag[™] (Millipore – Burlington, MA, EUA), para avaliação da atividade das Caspases 3/7, 8 e 9 de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, após a exposição ao Carbendazim (CI₂₅), as células foram incubadas com 10 μ L do reagente FLICA, correspondente a cada caspase avaliada, à 37°C por 1 hora, e os tubos foram agitados a cada 20 minutos durante o período de incubação. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 1500 RPM por 5 minutos para a remoção

do excesso de reagente. As células foram lavadas 2 vezes com 2mL de PBS, e ressuspensas neste tampão para análise em citômetro de fluxo.

3.5 - Obtenção dos modelos 3D

Para obtenção dos modelos de epitélio alveolar, uma matriz de Colágeno Tipo I (BD Biosciences, NJ, EUA) foi realizada em insertos *transwell* com poros de 0,4 μ m de diâmetro (Falcon, Tewksbury, MA, EUA). Colágeno tipo I foi misturado com NaOH 1M, meio DMEM 10X concentrado e água. 200 μ l da mistura foi adicionada ao inserto *transwell* e incubado à 37°C por 15 minutos, então o gel foi lavado duas vezes com 100 μ l de PBS. As células A549 foram plaqueadas (5x10⁵ células por inserto) e deixadas por 5 horas para adesão a matriz, quando o meio apical foi cuidadosamente descartado, criando uma interface ar-líquido (Figura 7). O meio do compartimento basal no sistema de cultura continha meio HAM-F12, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de Penicilina/Estreptomicina, permanecendo em estufa de cultivo celular a 37°C, atmosfera de 5% de CO₂ e umidade controlada. O dia do plaqueamento foi considerado como Dia 0, e foi analisado até o Dia 4. Para as avaliações do Carbendazim sobre o epitélio alveolar 3D, as exposições foram realizadas no Dia 2, os modelos foram então colocados novamente em placas de 24 poços com meio basal, incubadas por 24 horas, e analisados no Dia 3.

Figura 7: Representação da configuração inicial do sistema de cultivo para obtenção do modelo epitelial 3D biomimético.



Fonte: Adaptado de Silva 2018.

3.6 - Caracterização dos modelos epiteliais 3D

3.6.1 - *Processamento das amostras para avaliação histológica*

Os modelos reconstruídos 3D foram cultivados até o Dia 2, fixados em solução de paraformaldeído a 4% (pH 7,4), em seguida foram desidratados, diafanizados e incluídos em Paraplast (Leica Microsystems, Bannockburn, EUA), conforme a sequência descrita a seguir:

- Desidratação
- Etanol 30% - 30 minutos
- Etanol 50% I - 30 minutos
- Etanol 50% II - 30 minutos
- Etanol 60% I - 30 minutos
- Etanol 60% II - 30 minutos
- Etanol 70% - 30 minutos
- Etanol 80% - 30 minutos
- Etanol 95% - 30 minutos
- Etanol Absoluto I – 30 minutos
- Etanol Absoluto II – 30 minutos
- Etanol Absoluto III – 30 minutos
- Diafanização
- Xilol I – 30 minutos
- Xilol II – 30 minutos
- Impregnação
- Paraplast I – 30 minutos a 60°C
- Paraplast II – 30 minutos a 60°C
- Paraplast III – 30 minutos a 60°C
- Inclusão
- Paraplast – 60°C

Uma vez incluídos, foram obtidos cortes de 5µm de espessura dos tecidos os quais foram transferidos para lâminas de microscopia e corados com Hematoxilina/Eosina para avaliação da organização estrutural dos mesmos. A avaliação, assim como a foto documentação foram realizadas em microscópio ótico (DM 2000, Leica Microsystems, Bannockburn, EUA).

3.6.2 – Caracterização do modelo pelo perfil de expressão dos biomarcadores Pan-citoqueratina, Cd44, MUC-1, α -tubulina e E-caderina por imunofluorescência indireta:

Seguindo o protocolo descrito por Castro (2006), a expressão dos biomarcadores alveolares foram avaliados por imunofluorescência indireta. As análises foram realizadas em paralelo nos tecidos reconstruídos e em bloco histológico de tecido alveolar humano, fornecido pela Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Goiás - UFG, autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG (CEP/UFG nº 3.154.088, para comparação do perfil de expressão proteico). Os anticorpos empregados, bem como as diluições de trabalho utilizadas estão descritos na Tabela 4.

Os tecidos foram desparafinizados em três banhos de xilol e posteriormente hidratados em concentrações graduais decrescentes de álcool etílico (100, 95, 80, 70 e 50% - 5 minutos cada), sendo por fim incubadas com PBS por 10 minutos. Depois de hidratados, os cortes foram submetidos ao processo de recuperação antigênica, sendo incubados em tampão-citrato (10mM) por 30 minutos em banho-maria a 96°C. Em seguida, as lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente, lavadas duas vezes com PBS, e então incubadas por 1 hora com a solução de bloqueio - PBS acrescido de 1% de soro-albumina bovina (BSA) e 0,1% de Tween 20. Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas *overnight* em câmara úmida a 4°C com os anticorpos primários correspondentes a cada proteína avaliada nas concentrações descritas na Tabela 4, lavadas quatro vezes com PBS e incubadas por 1 hora com os anticorpos secundários específicos para cada espécie utilizada. Os anticorpos utilizados foram preparados na solução de bloqueio diluída 10 vezes (BSA 0,1% e Tween 20 0,01%).

Tabela 4: Descrição dos anticorpos primários e secundários utilizados para caracterização dos tecidos biomiméticos reconstruídos por imunofluorescência indireta.

Anticorpos Primários			
Descrição	Espécie	Diluição utilizada	Fabricante
Monoclonal Anti-CD44	Camundongo	1:200	Millipore
Monoclonal Anti - Pan-citoqueratina	Camundongo	1:100	Invitrogen
Monoclonal Anti - α -tubulina	Coelho	1:100	Invitrogen
Monoclonal Anti-MUC1	Camundongo	1:100	Invitrogen
Monoclonal Anti-Active Caspase 3	Coelho	1:100	Cell Signaling Technology
Monoclonal E-caderina	Coelho	1:100	Invitrogen
Monoclonal Anti-Nrf2	Coelho (já conjugado)	1:100	Abcam
Anticorpos Secundários			
Descrição	Espécie	Diluição utilizada	Fabricante
Monoclonal Goat Anti-rabbit AlexaFluor 532	Cabra	1:500	Invitrogen
Monoclonal Goat Anti-mouse AlexaFluor 488	Cabra	1:500	Invitrogen

Para marcação nuclear foi utilizado o corante Hoescht a 5ng/mL, incubando-os a temperatura ambiente por 5 minutos. Por fim, as lâminas foram lavadas adicionalmente por 4 vezes e montadas com meio de montagem para microscopia de fluorescência (90% de Glicerol acrescido de 10% de PBS). A avaliação e obtenção das imagens foram realizadas em microscópio de fluorescência (DMI 4000 B, Leica Microsystems, Bannockburn, EUA) acoplado ao software LAS-AF, filtro A4 (cor azul), filtro N21 (cor vermelha) e filtro L5 (cor verde).

3.6.3 – Avaliação do perfil de expressão dos biomarcadores Caspase 3 ativa, α -tubulina e Nrf2 para avaliação do potencial efeito citotóxico por imunofluorescência indireta:

Conforme descrito no item 3.6.2, o perfil de expressão dos biomarcadores Caspase 3 Ativa, α -tubulina e Nrf2 foram avaliados quanto ao potencial citotóxico do fungicida Carbendazim, seguindo o protocolo descrito. Para Caspase 3 Ativa e α -tubulina, as imagens foram processadas no software Image J, quantificadas quanto a intensidade de luz, e representadas em porcentagem em relação ao controle.

3.7 - Determinação do fator de deposição da câmara de exposição com produção de aerossóis padronizados

Idealmente, todos os líquidos nebulizados chegam à base da câmara de exposição com produção de aerossóis, onde as células estão depositadas. A fração líquida realmente depositada se refere ao fator de deposição o qual é dado por:

$$f_{dep} = V_{dep}/V_{neb}$$

onde V_{neb} representa o volume do líquido nebulizado e V_{dep} refere ao volume aerossol/líquido depositado na base da câmara de exposição (módulo base). Uma vez que o fator de deposição é conhecido, a concentração do aerossol entregue a célula pode ser calculada.

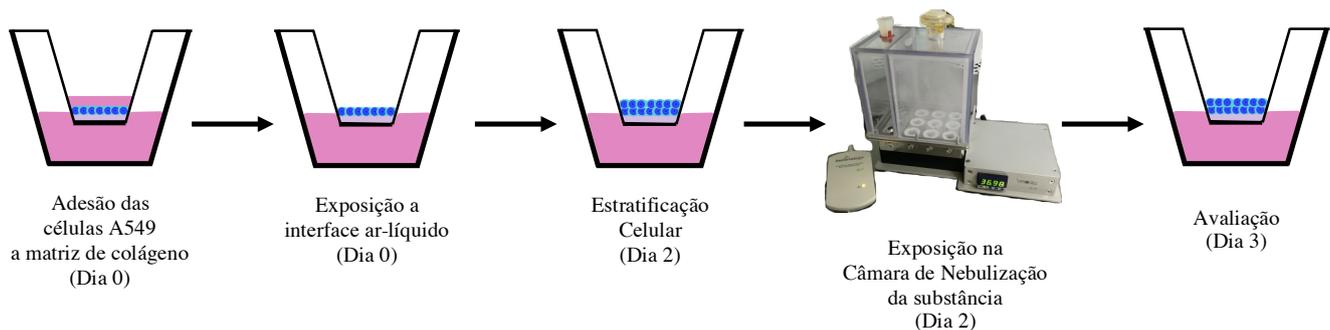
A câmara e o sistema de nebulização foram limpos, preparados e aquecido até atingir 37°C de acordo com as instruções do fabricante. A cada poço foi adicionado aproximadamente 3mL de água destilada filtrada, de modo que não tocasse na base do inserto *transwell*. A cada inserto foi adicionado 300 μ L de PBS. Uma solução estoque de fluoresceína a 15 μ g/mL foi preparada e diluída para realização da curva de concentração (0.3750 μ g/mL, 0.1875 μ g/mL, 0.0938 μ g/mL, 0.0469 μ g/mL, 0.0234 μ g/mL, branco PBS). O sistema de nebulização foi então montado, e 200 μ L da solução de fluoresceína (15 μ g/mL) foi nebulizada. O tempo de nebulização foi registrado, e a nuvem formada se depositou durante 10 minutos até que a caixa superior fosse retirada. Uma alíquota de 200 μ L foi coletada de cada inserto, tomando cuidado para coletar apenas a porção depositada no fundo do inserto, e diluída em 200 μ L de PBS em tubo. Logo em seguida, 70 μ L da solução foi colocado em um poço em placa de 96 poços para leitura de fluorescência com excitação/emissão: 483/525 nm; largura da banda 10 nm, em fluorímetro PerkinElmer

JANUS ELISA. Cada amostra, correspondente a determinado poço, foi lida 4 vezes para cada nebulização. Foram realizadas, pelo menos, 3 nebulizações para determinação do fator de deposição para cada poço do sistema de nebulização. Os dados obtidos de fluorescência foram então analisados utilizando tabela fornecida pelo fabricante para determinação do fator de deposição. Endes *et al.* (2014) e Lenz *et al.* (2014) demonstraram tal validação em seus trabalhos.

3.8 - Exposição dos modelos 3D a aerossóis de Carbendazim

Uma vez determinado o fator de deposição da câmara de exposição e nebulização, foi realizado a dispersão da substância conforme descrito no item 3.1.2. O aparelho foi colocado em fluxo de cultivo a fim de manter a esterilidade dos modelos durante a exposição. Após os procedimentos iniciais recomendados, foi adicionado 3mL de meio no poço basal do equipamento e a base foi estabilizada à 37°C. 200µl de Carbendazim à 15,62mM (1mg/ml) disperso em PBS foi nebulizado 3 vezes, de forma que cada tecido reconstruído recebesse a concentração final de 12,5µM de Carbendazim, de acordo com o fator de deposição estimado, permitindo 5 minutos para deposição total da nuvem formada para cada nebulização. O tempo de nebulização foi de acordo com os padrões estabelecidos pelo fabricante, com geração de aerossóis de 4 - 6µm (através do nebulizador). Como controle positivo, foi utilizado o Paraformaldeído 4% (0,003% no inserto). Após a exposição, os tecidos foram recolocados na placa com novo meio basal completo e incubados na estufa de cultivo a 37°C por 24 horas. A Figura 8 esquematiza o processo de exposição.

Figura 8: Representação da configuração do sistema de exposição do modelo epitelial 3D biomimético a aerossóis de Carbendazim.



Fonte: A autora.

3.9 - Avaliação do modelo alveolar epitelial 3D após Exposição

3.9.1 - Avaliação da Viabilidade

Após exposição dos modelos ao Carbendazim, o tecido foi incubado com 600µL/poço de HAM F12 contendo solução de MTT à 0,5 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na porção basal, por 3 horas em estufa de cultivo celular. Em seguida, os tecidos foram removidos do inserto e os cristais de formazan formados foram extraídos em 1 mL de isopropanol, mediante agitação de 30 RPM por 3 horas. Alíquotas foram transferidas para placas de 96 poços em triplicata, e a absorbância do conteúdo dos poços foi determinada em espectrofotômetro de placas (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) no comprimento de onda de 560 nm. Após a determinação da absorbância, a viabilidade celular foi calculada em relação ao controle negativo (células expostas a PBS) empregando-se a Equação 1.

3.9.2 - Avaliação da geração de ROS

Após exposição, os tecidos foram retirados do inserto e incubados com solução do corante DCFH-DA à 50µM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em meio HAM-F12 em estufa de cultivo por 1 hora. Os tecidos foram então lavados três vezes, com 2mL de PBS sob agitação durante 5 minutos em cada lavagem. Os tecidos foram transferidos para moldes contendo meio OCT Tissue-Tek (Sakura, Radnor, PA, EUA) e congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente os tecidos foram crio seccionados em cortes de 5µm, transferidos para lâminas de microscopia e avaliados em microscópio de fluorescência (DMI 4000 B, Leica Microsystems, Bannockburn, EUA) acoplado ao software LAS-AF, filtro L5 (cor verde).

3.9.3 - Avaliação da Atividade Mitocondrial

Para avaliação da atividade mitocondrial, os tecidos foram retirados do inserto e incubados com solução do corante MitoTracker à 200nM em meio HAM-F12 em estufa de cultivo por 1 hora. Os tecidos foram então lavados 3 vezes, com 2mL de PBS sob agitação durante 5 minutos em cada lavagem. Os tecidos foram transferidos para moldes contendo meio OCT e congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente os tecidos foram crio seccionados em cortes de 5µm, transferidos para lâminas de microscopia e avaliados em microscópio de fluorescência (DMI 4000 B, Leica Microsystems, Bannockburn, EUA) acoplado ao software LAS-AF, filtro N21 (cor vermelha).

3.10 – Análise estatística

Os resultados foram expressos como valor de média \pm desvio padrão dos valores obtidos nas diferentes réplicas dos experimentos executados. Considerando os ensaios de citotoxicidade, o valor de CI_{25} foram determinados por meio de regressão não linear. Para os experimentos relacionados ao perfil pulmonar e à determinação da viabilidade tecidual, os valores foram comparados utilizando-se o teste One-Way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey para a determinação de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados. Tal condição foi verificada quando o valor de “ p ” mostrou-se inferior a 0,05, considerando um intervalo de confiança de 95%. Todas as análises supracitadas foram executadas utilizando-se o software Graphpad Prism 8.0.

Artigo 1 – Carbendazim induces death in alveolar epithelium cells: A comparison between submerged and at the air-liquid interface cell culture

Autores: Bruna Ferreira Tollstadius^a, Artur Christian Garcia da Silva^a, Bruna Cristiane Oliveira Pedralli^a, Marize Campos Valadares^{a*}

^a Laboratory of Education and Research *in vitro* Toxicology, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

Revista: Toxicology *In Vitro*

Situação: Publicado

NCBI Resources How To

PubMed.gov
US National Library of Medicine
National Institutes of Health

PubMed Advanced

Format: Abstract Send to

[Toxicol In Vitro](#), 2019 Aug;58:78-85. doi: 10.1016/j.tiv.2019.03.004. Epub 2019 Mar 6.

Carbendazim induces death in alveolar epithelial cells: A comparison between submerged and at the air-liquid interface cell culture.

[Tollstadius BF](#)¹, [Silva ACGD](#)¹, [Pedralli BCO](#)¹, [Valadares MC](#)².

Author information

- Laboratory of Education and Research in In vitro Toxicology - ToxIn, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil.
- Laboratory of Education and Research in In vitro Toxicology - ToxIn, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil. Electronic address: marizecv@ufg.br.

Abstract

The fungicide Carbendazim is widely used in agriculture and preservation of films and fibers. In mammals, it can promote germ cell mutagenicity, carcinogenicity, and reproductive toxicity. However, few data about the effects of this toxicant upon the respiratory system are available. In this work, we evaluated Carbendazim toxicity upon A549 alveolar cells both in monolayer and upon air-liquid interface cell system. Monolayer cell exposed to non-cytotoxic concentrations of this fungicide showed cell arrest at G2/M phase, and did not show additional alterations. On the other hand, alveolar 3D reconstructed epithelial model (air-liquid interface cell system) was characterized and exposed to IC₂₅ of Carbendazim using the Vitrocell® Cloud 12 chamber. Expression of Active Caspase-3, α -tubulin and ROS was significantly increased after such exposure. Mitochondrial activity was also reduced after exposed to Carbendazim. The obtained results indicate that besides the environmental and reproductive toxicity concerns regarding Carbendazim exposure, pulmonary toxicity must be considered for this fungicide. In addition, we observed that the way of exposure impacts considerably on the cell response for in vitro assessment of chemicals inhalation toxicity profile.

Copyright © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

KEYWORDS: Air-liquid interface; Alveolar 3D epithelial model; Carbendazim; Inhalation toxicity; Nebulization exposure

Neste trabalho, foi possível avaliar o potencial efeito tóxico inalatório do fungicida Carbendazim a partir do desenvolvimento de um modelo epitelial 3D de células alveolares A549 em interface de cultivo ar-líquido, e em cultivo em monocamada, sendo possível concluir:

- O Carbendazim apresentou potencial citotóxico para células alveolares, sendo o IC25 determinado na concentração de 12,5 μ M.
- O fungicida modulou o ciclo celular das células A549 em monocamada, aumentando a população celular das células tratadas na fase G2/M.
- Foi desenvolvido um modelo epitelial 3D de células alveolares A549, cultivado em interface ar-líquido, o qual apresentou padrão de expressão dos biomarcadores CD44, E-caderina, α -tubulina, Pan-citoqueratina e MUC 1 similar ao alveolar humano.
- Para os testes realizados no modelo epitelial 3D de células alveolares A549, foi possível concluir que o Carbendazim aumenta a geração de ROS, ativa a via das Caspases, além de diminuir a atividade mitocondrial, o que não pôde ser observado para o modelo em monocamada.

A avaliação de toxicidade inalatória depende fortemente de condições de exposição e modelos biológicos que simulem as condições fisiológicas. O modelo utilizado, combinado ao método de exposição do composto em estudo, mostrou diferenças na exposição a culturas submersas em meio de cultivo e na interface ar-líquido. Outro aspecto, foram as diferenças nos dados obtidos com o modelo em monocamada e em 3D. Apesar da escassez de dados sobre os potenciais efeitos tóxicos do fungicida Carbendazim no sistema pulmonar, foi possível concluir, neste estudo, que o composto promove alterações neste sistema, além dos efeitos tóxicos a outros sistemas já reportados. Ademais, o trabalho foi um passo importante na construção de modelos *in vitro* para a avaliação de toxicidade inalatória, um desfecho importante na toxicologia regulatória, mandatório para vários produtos como os agrotóxicos, fragrâncias, dentre outros e que atualmente são avaliados por modelos majoritariamente em animais.

AGROFIT - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acessado em dezembro 2018

AKBARSHA, M.A., KADALMANI, B., GIRIJA, R., FARIDHA, A., HAMID, K.S. **Spermatotoxic effect of carbendazim**. Indian Journal of Experimental Biology. 39, 921–924, 2001.

ANKLEY, G.T., BENNETT, R.S., ERICKSON, R.J., HOFF, D.J., HORNUNG, M.W., JOHNSON, R.D., MOUNT, D.R., NICHOLS, J.W., RUSSOM, C.L., SCHMIEDER, P.K. AND SERRRANO, J.A. **Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment**. Environmental Toxicology and Chemistry, 29(3), pp.730-741, 2010.

AUFDERHEIDE, M. **Direct exposure methods for testing native atmospheres**. Experimental and Toxicologic Pathology, 57, pp.213-226, 2005.

BOUDINA, A., EMMELIN, C., BAALIOUAMER, A., GRENIER-LOUSTALOT, M.F., CHOVELON, J.M. **Photochemical behaviour of carbendazim in aqueous solution**. Chemosphere, 50 (5), 649–655, 2003.

CARSON, J.L., BRIGHTON, L.E., JASPERS, I. **Phenotypic Modification of Human Airway Epithelial Cells in Air–Liquid Interface Culture Induced by Exposure to the Tobacco-Specific Nitrosamine 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)**, Ultrastructural Pathology, 39:2, 104-109, 2015.

CARTER, S.D., HESS, R.A., LASKEY, J.W. **The fungicide methyl 2-benzimidazole carbamate causes infertility in male Sprague-Dawley rats**. Biology of Reproduction 37, 709–717, 1987.

CASTRO, E. G. **Efeito da deleção genética do receptor da angiotensina - 1-7, mas, na morfologia e expressão de proteínas da matriz extracelular em corações de camundongos adultos e neonatais**. 2006. 73 F. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2006.

CLIPPINGER, A.J., ALLEN, D., JARABEK, A.M., CORVARO, M., GAÇA, M., GEHEN, S., HOTCHKISS, J.A., PATLEWICZ, G., MELBOURNE, J., HINDERLITER, P. AND YOON, M. **Alternative approaches for acute inhalation toxicity testing to address global regulatory and non-regulatory data requirements: an international workshop report**. Toxicology in Vitro, 48, pp.53-70, 2018a.

CLIPPINGER, A.J., ALLEN, D., BEHRING, H., BÉRUBÉ, K.A., BOLGER, M.B., CASEY, W., DELORME, M., GAÇA, M., GEHEN, S.C., GLOVER, K., HAYDEN, P. **Pathway-based predictive approaches for non-animal assessment of acute inhalation toxicity**. Toxicology in Vitro, 52, pp.131-145, 2018b.

CRAPO, J.D., YOUNG, S.L., FRAM, E.K., PINKERTON, K.E., BARRY, B.E., CRAPO, R.O. **Morphometric characteristics of cells in the alveolar region of mammalian lungs.** American Review of Respiratory Disease, 128(2P2), pp.S42-S46, 1983.

DAVIDSE, L.C., FLACH, W. **Differential binding of methyl benzimidazol-2-YI carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*.** Journal of Cell Biology. 72, 174–193, 1977.

ENDES, C., SCHMID, O., KINNEAR, C., MUELLER, S., CAMARERO-ESPINOSA, S., VANHECKE, D., FOSTER, E.J., PETRI-FINK, A., ROTHEN-RUTISHAUSER, B., WEDER, C., CLIFT, M.J. **An in vitro testing strategy towards mimicking the inhalation of high aspect ratio nanoparticles.** Particle and fibre toxicology, 11(1), 40, 2014.

ESCH, E.W., BAHINSKI, A., HUH, D. **Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery.** Nature reviews Drug discovery, 14(4), p.248, 2015.

ESSAIDI-LAZIOSI, M., BRITO, F., BENAOUZIA, S., ROYSTON, L., CAGNO, V., FERNANDES-ROCHA, M., PIUZ, I., ZDOBNOV, E., HUANG, S., CONSTANT, S., BOLDI, M.O. **Propagation of respiratory viruses in human airway epithelia reveals persistent virus-specific signatures.** Journal of Allergy and Clinical Immunology, 141(6), pp.2074-2084, 2018.

EU PESTICIDES DATABASE. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1080>
Acessado em Dezembro de 2018.

EUROPEAN CHEMICALS AGENCY - ECHA. **Harmonised classification - Annex VI of Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP Regulation).** 2018.

<https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.031.108> (Accessed 28 November 2018)

EUROPEAN CHEMICALS AGENCY - ECHA. **Harmonised classification - Annex VI of Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP Regulation).** 2008.

<https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/cl-inventory-database/-/discli/details/122327Access> (Accessed 28 November 2018).

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA. **Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for thiophanate-methyl and carbendazim according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005.** EFSA Journal, 12(12), 3919, 2014.

EPA (Environmental Protection Agency). **Pesticides: Topical & Chemical Fact Sheets. Risk Assessment for Safety of Orange Juice Containing Fungicide Carbendazim, 2012.** Disponível em:

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.230.1236&rep=rep1&type=pdf>
Acesso em 13 Março de 2019.

EPITHELIX corporation. MucilAir™: A unique 3D Human Airway Epithelia reconstituted in vitro. <http://www.epithelix.com/products/mucilair> Acesso em 31 de Março de 2019.

FARAG, A., EBRAHIM, H., ELMAZOU DY, R., KADOUS, E. **Developmental toxicity of fungicide carbendazim in female mice.** Birth Defects Research (Part B): Developmental and Reproductive Toxicology, 92, 122–130, 2011.

FISHER, R.L., SMITH, M.S., HASAL, S.J., HASAL, K.S., GANDOLFI, A.J., BRENDEL, K. **The use of human lung slices in toxicology.** Human & experimental toxicology, 13(7), pp.466-471, 1994.

FRÖHLICH, E., SALAR-BEHZADI, S. **Toxicological assessment of inhaled nanoparticles: role of in vivo, ex vivo, in vitro, and in silico studies.** International journal of molecular sciences, 15(3), pp.4795-4822, 2014.

GUYTON, Arthur C. **Physiology of the respiratory system.** Textbook of Medical Physiology 11: Chapter 33, 431-433, 2007.

HUH, D., MATTHEWS, B.D., MAMMOTO, A., MONTOYA-ZAVALA, M., HSIN, H.Y., INGBER, D.E. **Reconstituting organ-level lung functions on a chip.** Science, 328(5986), pp.1662-1668, 2010.

JIANG, J., WU, S., WANG, Y., AN, X., CAI, L., ZHAO, X., WU, C. **Carbendazim has the potential to induce oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption during zebrafish larvae development.** Toxicology in Vitro, 29(7), 1473-1481, 2015.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 17, p. 334-351, 2013.

KREFT, M.E., JERMAN, U.D., LASIČ, E., RIŽNER, T.L., HEVIR-KENE, N., PETERNEL, L. AND KRISTAN, K. **The characterization of the human nasal epithelial cell line RPMI 2650 under different culture conditions and their optimization for an appropriate in vitro nasal model.** Pharmaceutical research, 32(2), 665-679, 2015.

KUPPER, K. C., CORRÊA, F. E., DE AZEVEDO, F. A., DA SILVA, A. C. **Bacillus subtilis to biological control of postbloom fruit drop caused by Colletotrichum acutatum under field conditions.** Scientia Horticulturae. 134, 139-143. 2012.

LAKIN, D.L., MALAVIYA R., LASKIN, J.D. **Pulmonary macrophages.** PARENT, R.A. (Ed.), Comparative Biology of the Normal Lung, Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, Amsterdam; Boston, Pages 629-649, 2015.

LATIMER, K.M. **Lung Cancer: Clinical Presentation and Diagnosis.** FP essentials, 464, pp.23-26, 2018.

LENZ, A.G., STOEGER, T., CEI, D., SCHMIDMEIR, M., SEMREN, N., BURGSTALLER, G., LENTNER, B., EICKELBERG, O., MEINERS, S., SCHMID, O. **Efficient bioactive delivery of aerosolized drugs to human pulmonary epithelial cells cultured in air-liquid interface conditions.** American journal of respiratory cell and molecular biology, 51(4), 526-535, 2014.

LESMES-FABIAN, C., & BINDER, C. R. **Pesticide flow analysis to assess human exposure in greenhouse flower production in Colombia.** International Journal of Environmental Research and Public Health, 10(4), 1168-85, 2013.

LIN, J.C.J., ROY, J.P., VERREAULT, J., TALBOT, S., CÔTÉ, F., COUTURE, R., MORIN, A. **An ex vivo approach to the differential parenchymal responses induced by cigarette whole smoke and its vapor phase.** Toxicology, 293(1-3), pp.125-131, 2012.

LOIZOU, G., SPENDIFF, M., BARTON, H.A., BESSEMS, J., BOIS, F.Y., D'YVOIRE, M.B., BUIST, H., CLEWELL III, H.J., MEEK, B., GUNDERT-REMY, U., GOERLITZ, G. **Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: the first steps.** Regulatory toxicology and pharmacology, 50(3), pp.400-411, 2008.

LOWE, J. S.; ANDERSON, P. G. **Stevens & Lowe's Human Histology.** Philadelphia: Elsevier, Mosby, cap. 10, p. 166-184, 2015.

LUDWIKOWSKA, A., BOJARSKI, B., SOCHA, M., LUTNICKA, H., TRZECIAK, K.B. **The effect of carbendazim on embryonic Prussian carp (*Carassius gibelio*) development and hatching.** Archives of Polish Fisheries, 21(4), 367-371, 2013.

MANTOVANI, A., MARANGHI, F., RICCIARDI, C., MACRÌ, C., STAZI, A.V., ATTIAS, L., ZAPPONI, G.A. **Developmental toxicity of carbendazim: comparison of no-observed-adverse-effect level and benchmark dose approach.** Food and Chemical Toxicology, 36(1), 37-45, 1998.

MATTEK corporation. Tissue model Epithelix.

<https://www.mattek.com/products/epiairway/> Acesso em 31 de Março de 2019.

MATHIS, C., POUSSIN, C., WEISENSEE, D., GEBEL, S., HENGSTERMANN, A., SEWER, A., BELCASTRO, V., XIANG, Y., ANSARI, S., WAGNER, S., HOENG, J. **Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to cigarette smoke at the air-liquid interface resemble bronchial epithelium from human smokers.** American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 304(7), pp.L489-L503, 2013.

MAZELLIER, P.; LEROY, E.; LEGUBE, B. **Photochemical behavior of the fungicide carbendazim in dilute aqueous solution.** Journal of Photochemistry and Photobiology. A, 153, p. 221-227. 2002

MCCARROLL, N. E., PROTZEL, A., IOANNOU, Y., STACK, H. F., JACKSON, M. A., WATERS, M. D., & DEARFIELD, K. L. **A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals: III. Mutagenicity and carcinogenicity of benomyl and carbendazim.** Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 512(1), 1-35. 2002.

MERCER, R.R., RUSSELL, M.L., CRAPO, J.D. **Alveolar septal structure in different species.** Journal of Applied Physiology, 77(3), pp.1060-1066, 1994.

NEILSON, L., MANKUS, C., THORNE, D., JACKSON, G., DEBAY, J., MEREDITH, C. **Development of an in vitro cytotoxicity model for aerosol exposure using 3D reconstructed human airway tissue; application for assessment of e-cigarette aerosol.** Toxicology in Vitro, 29(7), pp.1952-1962, 2015.

NETO, M. P. **Resíduos de carbendazim em laranja e néctar de laranja: validação de método e monitoramento em Minas Gerais** 2014. 109 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

NIINIMAA, V.P.S.R.J., COLE, P., SHEPHARD, R.J. **Oronasal distribution of respiratory airflow.** Respiration physiology, 43(1), pp.69-75, 1981.

NORDGREN, T.M., BAILEY, K.L. **Pulmonary health effects of agriculture.** Current opinion in pulmonary medicine, 22(2), p.144, 2016.

RACH, J., BUDDE, J., MÖHLE, N., AUFDERHEIDE, M. **Direct exposure at the air-liquid interface: evaluation of an in vitro approach for simulating inhalation of airborne substances.** Journal of Applied Toxicology, 34(5), pp.506-515, 2014.

ORGANIZAÇÃO PARA COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO - OCDE, **Test No. 433: Acute Inhalation Toxicity: Fixed Concentration Procedure,** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2018a.

ORGANIZAÇÃO PARA COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO - OCDE, **Test No. 412: Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study,** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2018b.

ORGANIZAÇÃO PARA COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO - OCDE, **Test No. 413: Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study,** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2018c.

ORGANIZAÇÃO PARA COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO - OCDE, **Test No. 403: Acute Inhalation Toxicity,** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2009a.

ORGANIZAÇÃO PARA COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO - OCDE, **Test No. 436: Acute Inhalation Toxicity – Acute Toxic Class Method,** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2009b.

ORGANIZAÇÃO PARA COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO - OCDE, **Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39,** ENV/JM/MONO(2009) 28.

[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2009\)28/rev1&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2009)28/rev1&doclanguage=en) . 2009c.

ORGANIZAÇÃO PARA COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO - OCDE, **Guidance Document No. 19 on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation.** Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. Paris. 2000.

PALANIKUMAR, L., KUMARAGURU, A.K., RAMAKRITINAN, C.M., ANAND, M. **Toxicity, biochemical and clastogenic response of chlorpyrifos and carbendazim in milkfish *Chanos chanos*.** International Journal of Environmental Science and Technology, 11(3),765-774, 2014.

PARENT, R.A. **Comparative Biology of the Normal Lung.** Academic Press, New York. 2015.

PLEIL, J.D. **Breath biomarkers in toxicology.** Archives of toxicology, 90(11), 2669-2682, 2016.

POLK, W.W., SHARMA, M., SAYES, C.M., HOTCHKISS, J.A., CLIPPINGER, A.J. **Aerosol generation and characterization of multi-walled carbon nanotubes exposed to cells cultured at the air-liquid interface.** Particle and fibre toxicology, 13(1), 20, 2015.

PUBCHEM DATABASE. National Center for Biotechnology Information. Carbendazim, CID=25429, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25429> (acesso em 29 Março 2019)

RODEN, A. C., CAMUS, P. **Introgenic pulmonary lesions.** Seminars in diagnostic pathology. 35(4), 260-271, 2018.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS) – Ministério da Saúde. **Perfil da morbimortalidade por doenças respiratórias crônicas no Brasil, 2003 a 2013.** Boletim Epidemiológico. Volume 47, N° 19, 2016.

SEWELL, F., RAGAN, I., MARCZYLO, T., ANDERSON, B., BRAUN, A., CASEY, W., DENNISON, N., GRIFFITHS, D., GUEST, R., HOLMES, T., VAN HUYGEVOORT, T. **A global initiative to refine acute inhalation studies through the use of ‘evident toxicity’ as an endpoint: Towards adoption of the fixed concentration procedure.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, 73(3), pp.770-779, 2015.

SILVA, A.C.G.D. **Desenvolvimento de modelo biomimético de córnea para avaliação da toxicidade ocular de produtos farmacêuticos: perfil inflamatório, caracterização e aplicabilidade.** 2018. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiânia, Goiânia, GO, 2018.

SYDBOM, A., BLOMBERG, A., PARNIA, S., STENFORS, N., SANDSTROM, T., DAHLEN, S.E. **Health effects of diesel exhaust emissions.** The European Respiratory Journal 17 (4), 733–746, 2001.

TISSERAND, R., YOUNG, R. Chapter 6. The Respiratory System. **Essential Oil Safety (Second Edition)** A Guide for Health Care Professionals, p. 99-110, 2014.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). Benomyl RED facts; Cancellation Order. US-EPA Federal Register File. 2011. <http://www.epa.gov/EPA-PEST/2001/August/Day-08/p19572.htm> (Accessed 02 November 2018).

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA), Office of Pesticide Programs, Health Effects Division, Science Information Management Branch. “Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential” Annual Cancer Report 2017. 2017. http://npic.orst.edu/chemicals_evaluated.pdf (Accessed 17 November 2018).

United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. UN (2007). Disponível em: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html. Acessado 13 de Março de 2019.

VILLENEUVE, D.L., CRUMP, D., GARCIA-REYERO, N., HECKER, M., HUTCHINSON, T.H., LALONE, C.A., LANDESMANN, B., LETTIERI, T., MUNN, S., NEPELSKA, M., OTTINGER, M.A. **Adverse outcome pathway (AOP) development I: strategies and principles.** Toxicological Sciences, 142(2), pp.312-320, 2014.

WEBER, S.; HEBESTREIT, M.; WILMS, T.; CONROY, L.L.; RODRIGO, G. **Comet assay and air-liquid interface exposure system: a new combination to evaluate genotoxic effects of cigarette whole smoke in human lung cell lines.** *Toxicology In Vitro*, 27 (6), p.1987-1991, 2013.

WITTWEHR, C., ALADJOV, H., ANKLEY, G., BYRNE, H.J., DE KNECHT, J., HEINZLE, E., KLAMBAUER, G., LANDESMANN, B., LUIJTEN, M., MACKAY, C., MAXWELL, G. **How adverse outcome pathways can aid the development and use of computational prediction models for regulatory toxicology.** *Toxicological Sciences*, 155(2), pp.326-336, 2017.

XU, W., JANOCHA, A.J., LEAHY, R.A., KLATTE, R., DUDZINSKI, D., MAVRAKIS, L.A., COMHAIR, S.A., LAUER, M.E., COTTON, C.U., ERZURUM, S.C. **A novel method for pulmonary research: Assessment of bioenergetic function at the air-liquid interface.** *Redox biology*, 2, 513-519, 2014.

ZHOU, J., XIONG, K., YANG, Y., YE, X., LIU, J.; LI, F. **Deleterious effects of benomyl and carbendazim on human placental trophoblast cells.** *Reproductive Toxicology*, 51, 64-71, 2015.

8.1 Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Modelos alveolares epiteliais 3D biomiméticos para a investigação da toxicidade inalatória de substâncias tóxicas

Pesquisador: Marize campos Valadares

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 06067719.4.0000.5083

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia Universidade Federal de Goiás

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP
FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS - FINEP
CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.154.088

Apresentação do Projeto:

Trata-se o presente estudo de avaliação do potencial de toxicidade inalatória de substâncias. Existem métodos de que vêm sendo empregados com êxito pela comunidade científica sendo que, dentre eles, os modelos alveolares epiteliais pulmonares que se assemelham significativamente ao que ocorre nas avaliações in vivo. Entretanto, apesar de facilmente comercializados e adquiridos no território internacional, esses modelos não são passíveis de aquisição no Brasil, por conta de questões burocráticas e alfandegárias, fazendo-se necessário o desenvolvimento dos mesmos no país.

Os pesquisadores têm como hipótese que “Modelos epiteliais alveolares 3D in vitro, cultivados em interface ar-líquido e expostos através da aerossolização dos toxicantes, podem mimetizar de forma fidedigna, a exposição humana em situação real”. E assim, será desenvolvido um modelo epitelial alveolar 3D, e será avaliado o padrão de resposta mediante exposição de substâncias teste.

Os blocos histológicos de alvéolo e brônquio humano para a comparação com o modelo 3D in vitro serão fornecidos pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFG.

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação - Agência UFG de Inovação, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2
Bairro: Campus Samambaia, UFG **CEP:** 74.690-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpi.ufg@gmail.com