UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE - UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Júlia Machado Menezes

Avaliação *in vivo* da toxicidade de um inseticida à base de imidacloprido através do modelo alternativo *Caenorhabditis elegans*

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Júlia Machado Menezes

Avaliação *in vivo* da toxicidade de um inseticida à base de imidacloprido através do modelo alternativo *Caenorhabditis elegans*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Profª Dra. Eliane Dallegrave
Coorientadora: Profª. Dra. Karine Rigon Zimmer

Porto Alegre
2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Catalogação na Publicação

Machado Menezes, Julia
Avaliação in vivo da toxicidade de um inseticida à base de imidacloprido através do modelo alternativo Caenorhabditis elegans / Julia Machado Menezes. -- 2023.
70 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2023.

Orientador(a): Eliane Dallegrave ; coorientador(a): Karine Rigon Zimmer.

1. Toxicologia. 2. Caenorhabditis elegans. 3. Agrotóxico. 4. Imidacloprido. 5. Neurotoxicidade. I. Título.

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

DEDICATÓRIA



Dedico este estudo à quem sempre me incentivou a estudar, me deu o apoio necessário nos momentos difíceis e é fonte infinita de amor e suporte. Dedico à minha mãe, maior inspiração da minha vida pessoal e acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, meus guias e mentores por guiarem meus passos todos os dias da minha vida e me permitirem encontrar tantas almas irmãs que me ensinam sobre amor, disciplina e força.

Agradeço de todo o coração à minha família que me entregou apoio, compreensão e carinho nessa caminhada científica. Essa dissertação e todo o conhecimento adquirido, não é somente meu, é nosso. Gratidão profundamente sentida por todos vocês, mãe, pai, vó, dindos, primos, Lucas e meus bichinhos. Ao Vô e ao Duda, que onde estiverem, possam sentir um poquinho da alegria dessa conquista.

Gratidão aos meus mestres e professores que não só ciência me ensinaram, mas também sobre como viver a vida com mais leveza. Ás minhas orientadoras Karine e Eliane, meu sincero carinho, admiração e gratidão por me guiarem com sabedoria e paciência ao longo dessa dissertação. Que eu possa reproduzir os ensinamentos de vocês na ciência e na minha vida pessoal.

Às minhas parceiras de laboratório, Belisa, Amanda e Ariane, gratidão infinita por me ajudarem a gerir minha energia caótica, pela companhia de 12 horas de trabalho por dia e pelo carinho e amizade que construímos. Espero levá-las junto comigo no coração e na vida.

Aos colegas do GBToxCe e à professora Daiana Ávila, gratidão pela parceria e pela receptividade. Foram 3 semanas de muitos aprendizados que levarei dentro do laboratório e para a vida.

Por fim, agradeço à UFCSPA e ao PPG Ciências da Saúde por me permitirem o privilégio da experiência de se fazer o que se ama. A vida é muito mais bonita quando colocamos amor e vibrações de energia positiva em tudo que fazemos.

Axé, Amém, Namastê!

EPÍGRAFE

“Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico: ele também é uma criança que enfrenta fenômenos naturais que o impressionam como se fossem contos de fadas.”
Marie Curie

RESUMO

O imidacloprido (IMI) é um inseticida amplamente utilizado, pertencente à classe dos neonicotinoides. Ele funciona como um agonista dos receptores nicotínicos de acetilcolina pós-sinápticos, resultando na superestimulação do sistema nervoso dos insetos e, por fim, levando à sua morte. Embora os neonicotinoides sejam considerados mais seletivos para insetos do que para mamíferos, sua toxicidade comprovada em organismos não-alvo, incluindo os seres humanos, continua a representar uma preocupação clínica significativa. Apesar de seu uso generalizado, o potencial neurotóxico do IMI permanece inconclusivo. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade colinérgica aguda de uma formulação comercial de IMI, Much 600 FS®, no nematoide não-alvo, *Caenorhabditis elegans*. Os vermes em estágio L1 foram expostos a concentrações de 2,4, 4,8, 7,2, 9,6 e 14,4 g/L de IMI, com avaliação subsequente por meio de testes de *endpoint*, incluindo avaliação da mortalidade, comportamento, desenvolvimento e reprodução. A exposição ao IMI resultou em mortalidade na concentração de 14,4 g/L e inibiu o desenvolvimento em todas as concentrações testadas. As avaliações comportamentais revelaram uma redução no batimento faríngeo e na locomoção (medida por ensaios de *swimming*). Além disso, a exposição ao IMI a 14,4 g/L resultou na diminuição da produção de ovos, que se correlacionou com um aumento nos eventos apoptóticos em células da linha germinativa quando comparado ao grupo controle veículo, juntamente com um declínio no ensaio do tamanho da ninhada (*brood size*). Danos neuronais colinérgicos foram observados nas três concentrações mais altas, demonstrando um padrão de toxicidade concentração dependente. Este estudo conclui que a formulação comercial do IMI, Much 600 FS®, apresenta toxicidade para *C. elegans* em todos os parâmetros avaliados, destacando seu potencial de afetar adversamente organismos não-alvo.

Palavras-chave: toxicidade; imidacloprido; neurônios colinérgicos; *C. elegans*.

ABSTRACT

Imidacloprid (IMI) is a widely used insecticide, belonging to the neonicotinoid class. It functions as an agonist of postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors, resulting in overstimulation of the insect nervous system and ultimately leading to their death. While neonicotinoids are considered more selective for insects than mammals, they remain of significant clinical concern due to their documented toxicity in non-target organisms, including humans. Despite its widespread use, the neurotoxic potential of IMI remains inconclusive. Therefore, the objective of this study was to assess the acute cholinergic toxicity of a commercial IMI formulation, Much 600 FS®, in the non-target nematode *Caenorhabditis elegans*. L1-stage worms were exposed to concentrations of 2.4, 4.8, 7.2, 9.6, and 14.4 g/L of IMI, with subsequent evaluation through *end-point* tests including mortality, behavior, development, and reproduction. Exposure to IMI resulted in mortality at 14.4 g/L concentration and inhibited development at all concentrations tested. Behavioral assessments revealed a reduction in pharyngeal pumping and locomotion (measured by swimming assays). Additionally, exposure to IMI at 14.4 g/L resulted in decreased egg production, which correlated with an increase in apoptotic events in germline cells when compared to control groups, alongside a decline in brood size assay. Cholinergic neuronal damage was observed at the three highest concentrations, demonstrating a concentration-dependent toxicity pattern. This study concludes that the commercial formulation of IMI, Much 600 FS®, exhibits toxicity to *C. elegans* across all evaluated parameters, highlighting its potential to adversely affect non-target organisms.

Keywords: toxicity; imidacloprid; neonicotinoid; cholinergic neurons; *C. elegans*.

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO.....10

Fig. 1. Estrutura química do imidacloprido.....13

Fig. 2. Anatomia e ciclo de vida de *C. elegans*.....17

Fig. 3. Esquema neuronal de hermafrodita adulto.....18

2. ARTIGO CIENTÍFICO.....25

Fig. 1. Sobrevivência.....35

Fig. 2A. Comprimento.....36

Fig. 2B. Área.....36

Fig. 3. Animais expostos a diferentes concentrações de imidacloprido.....37

Fig. 4. Batimento faríngeo.....38

Fig. 5. Morfologia potencialmente alterada das faringes.....39

Fig. 6A. Distância.....41

Fig. 6B. Velocidade.....41

Fig. 7. Quantidade de animais com morfologia neural alterada (LX929).....42

Fig. 8A. Morfologia intacta de comissuras neurais em cepa LX929.....43

Fig. 8B. Morfologia alterada de comissuras neurais em cepa LX929.....43

Fig. 8C. Comparação de morfologias em cepa LX929.....43

Fig. 9. Produção de ovos.....44

Fig. 10. Tamanho da ninhhada.....45

Fig. 11. Células apoptóticas em cepa MD701.....46

Fig. 12. Imagens comparativas da quantidade de corpos apotóticos.....47

Fig. 13. Crescimento de *E. coli* OP50 frente ao imidacloprido.....48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10

2. REFERENCIAL TEÓRICO 13

2.1 Inseticidas 13

2.2 Neonicotinoides 14

2.3 Toxicidade relacionada ao imidacloprido 14

2.4 *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo 15

3. REFERÊNCIAS 20

4. OBJETIVOS 24

4.1 Objetivo geral 24

4.2 Objetivos específicos 24

5. CONCLUSÃO 25

6. PERSPECTIVAS 53

1. INTRODUÇÃO

Durante a Guerra Fria o termo “Revolução Verde” foi criado. Ele consistia na difusão de tecnologias agrícolas que permitiriam um grande aumento da produção. Com o nome de “defensivos agrícolas”, em meados dos anos 60, os agrotóxicos, fertilizantes e as máquinas agrícolas chegavam ao Brasil trazendo a promessa da erradicação da fome no mundo. Estes foram aceitos rapidamente e somente nos anos seguintes o debate sobre os efeitos adversos dos agrotóxicos e das suas consequências sociais e ambientais foi trazido à tona (LUCCHESI, 2005; OCTAVIANO, 2010; DUTRA E SOUZA, 2017; SOUZA E LOGIODICE, 2018). Conforme Karunarathne et al., (2019) embora a Revolução Verde tenha desempenhado um papel crucial na mitigação da fome, ela também acabou introduzindo agrotóxicos altamente perigosos em comunidades rurais que não estavam equipadas para armazená-los ou utilizá-los com segurança, trazendo impactos negativos à essas comunidades como o autoenvenenamento por agrotóxico que se tornou um dos meios mais comuns de suícidio no mundo, revelando a importância de pesquisas e monitoramentos dos efeitos destes compostos na saúde humana.

Conforme a lei Nº 7.802, de 11 de julho de 1989, os agrotóxicos são:

> Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.
>
> Fonte: Diário Oficial da União.

Em 2017, o Brasil foi considerado um dos maiores produtores agropecuários do mundo e o segundo país que mais exporta esses produtos. Por sua vasta área de plantio, o Brasil também já foi descrito como o maior consumidor de agrotóxicos do planeta respondendo por 20% da utilização desses compostos no mundo (PIGNATI et al., 2017; LOPES E ALBUQUERQUE, 2018). Atualmente são utilizadas aproximadamente 2,5 milhões de toneladas de agrotóxicos no mundo onde o consumo do Brasil tem sido superior a 300 mil toneladas de produtos comerciais anualmente, concentrando-se nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste (SPADOTTO E GOMES, 2021). Entretanto, os efeitos adversos desses compostos sobre o homem e o meio

ambiente crescem proporcionalmente. Os agrotóxicos podem contaminar diversos biomas e interferir na flora e na fauna de ambientes terrestres e aquáticos. Alterações do ecossistema e da morfologia de animais e vegetais utilizados na alimentação da população, bem como da água consumida, podem interferir negativamente na saúde humana.

Desse modo, pessoas expostas aos agrotóxicos podem sofrer intoxicações e desenvolver diversas alterações fisiológicas, tais como dano celular e de DNA, câncer em diversos órgãos, óbitos fetais, malformações congênitas, perda auditiva e alterações hormonais e neurológicas (LOPES E ALBUQUERQUE, 2018). De Souza et al., (2011) relatam que indivíduos em contato com agrotóxicos apresentaram 2,5 vezes mais chances de apresentar alterações neurológicas do que indivíduos sem exposição. As sequelas podem ser tanto sensitivas quanto motoras, além de deficiências cognitivas transitórias ou permanentes.

Os agrotóxicos podem ser utilizados para diferentes fins: herbicida (para o controle de ervas daninhas), fungicida (para o controle de fungos), inseticida (para o controle de insetos), rodenticidas (para o controle de roedores), entre outras aplicações. Os inseticidas são de grande relevância na agricultura onde representam quase 30% da quantidade de agrotóxicos utilizados no mundo, e na medicina veterinária (SHARMA et al, 2019). Na saúde pública e em locais domésticos, os inseticidas são utilizados para o controle de vetores como baratas e mosquitos, os quais apresentam na sua composição ingredientes ativos que podem estar envolvidos nas alterações neurológicas manifestadas por usuários (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ, 2018).

O uso contínuo de agrotóxicos tem sido associado ao desenvolvimento de resistência de insetos alvo e não alvo a esses compostos, incluindo o *Aedes aegypti* (vetor da dengue) (ZOH et al., 2021; PU E CHUNG, 2024). Além disso, Tago et al., (2015) relatou que os fertilizantes e os inseticidas têm efeito seletivo sobre as populações bacterianas no solo, onde aplicações repetidas de um inseticida podem aumentar populações bacterianas que metabolizam o inseticida levando a resistência do mesmo, o que estimula o desenvolvimento de novos agrotóxicos com ingredientes ativos cada vez mais potentes. Inseticidas, como o Imidacloprido, um neonicotinóide que atua de forma neurotóxica no sistema nervoso de insetos, não se degradam por não sofrerem a ação da acetilcolinesterase, estimulando impulsos nervosos contínuos e causando uma superexcitação do sistema nervoso desses animais, levando à morte

por paralisia e desorientação diversos insetos não alvo, como as abelhas que são polinizadoras ambientais e promovem o equilibrio de diversos ecossistemas (GALLO et al, 2002). Neste cenário, a redução das populações de abelhas em várias regiões do planeta tem gerado muitas especulações e é frequentemente associada, pelo menos em parte, ao uso de inseticidas neonicotinoides (GODFRAY et al, 2014).

Com isso, bioensaios toxicológicos para avaliação dos inseticidas são de extrema importância e o modelo alternativo *in vivo Caenorhabditis elegans* tem sido amplamente utilizado como um aliado para predição dos efeitos dos inseticidas à saúde humana, assim como para elucidação de seus mecanismos de ação.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Inseticidas

Os inseticidas são conhecidos pelo mundo como defensivos agrícolas que atuam no controle e prevenção de insetos e pragas nas lavouras. Dentre os inseticidas mais utilizados, encontram-se ingredientes ativos das classes de organofosforados, organoclorados, piretroides, carbamatos, fenilpirazois e neonicotinóides (VIEIRA, 2003; DA COSTA, 2015). O 1-(6-chloro-3- pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine (Fig. 1), mais conhecido como imidacloprido, é um dos grandes representantes dos inseticidas da classe neonicotinóides sendo amplamente utilizado no Brasil e no mundo.

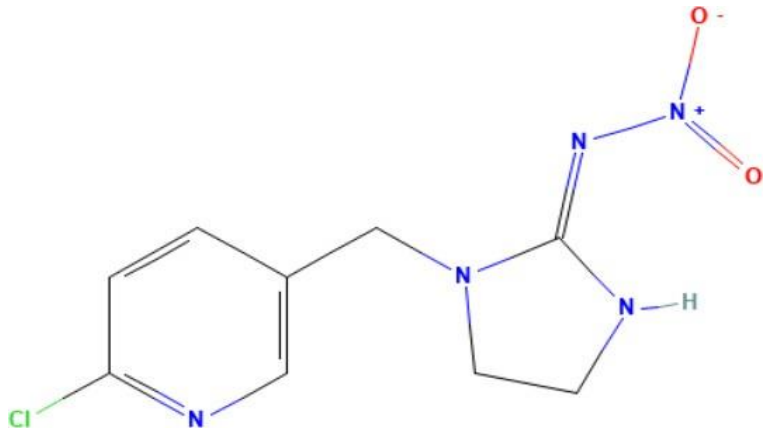

Figura 1: Estrutura química do imidacloprido.
Fonte:PubChem (2023).

2.2. Neonicotinóides

Os neonicotinóides são inseticidas derivados da nicotina e encontrados em maior parte em água doce tanto na superfície quanto no sedimento, onde podem sofrer acumulação (YI et al., 2019). Estes, atuam como agonistas dos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) se ligando a estes receptores (PHUA et al., 2009). A ligação dos neonicotinóides aos nAChRs é irreversível, levando ao aumento da entrada de Na+ e a saída de K+, e induz uma superestimulação levando a paralisia e morte do inseto (GOULSON, 2013; NUGNES et al, 2023). Os neonicotinoides diferem da nicotina pois contém uma porção eletronegativa. Ela consiste de um farmacóforo de nitroimina, cianoimina ou nitrometileno que se liga seletivamente a aminoácidos específicos presentes nos ligantes de nAChRs de insetos. Embora sejam mais seletivos para insetos do que humanos, quando comparados a agrotóxicos como organofosforados, metilcarbamatos e organoclorados, ainda são de extrema relevância clínica pela sua utilização em larga escala no Brasil e no mundo, considerando seus efeitos tóxicos já relatados em vertebrados e organismos não-alvo como peixes e abelhas (TOMIZAWA E CASIDA, 2005; HENRY et al, 2012; CROSBY et al., 2015).

2.3. Toxicidade relacionada ao imidacloprido

O imidacloprido foi introduzido na década de 1990 e atualmente é um dos agrotóxicos mais utilizados no planeta. Ele se destaca não apenas pela sua ampla utilização, mas por ser um inseticida potente e de ação sistêmica. O Imidacloprido é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal, por contato, com distribuição rápida e uniforme entre os tecidos das plantas representando ser um possível agente causador de danos severos em organismos não-alvo (HENRY et al., 2012).

Foi observado que roedores, quando expostos ao Imidacloprido, apresentaram um comportamento característico tipo ansiedade e alterações dos parâmetros hematológicos, incluindo um decréscimo de hemoglobina corpuscular média e concentração de hemoglobina corpuscular média (TONIETTO et al., 2022). Bizerrra (2018) afirma que por meio de testes com hepatócitos e mitocôndrias, foi verificado que o Imidacloprido pode gerar metabólitos de biotransformação mais tóxicos do que o próprio agrotóxico. Em peixes zebra, a exposição precoce ao imidacloprido leva a efeitos persistentes na função neurocomportamental dos animais (CROSBY et al., 2015). Em anfíbios expostos ao inseticida observou-se que o Imidacloprido tem

capacidade de ultrapassar a barreira hemato-encefálica levando a acumulação do agrotóxico no cérebro desses animais (CAMPBELL et al., 2022). Em lagartos, o Imidacloprido levou a uma desregulação endócrina e toxicidade nas gônadas destes animais. Quando expostos, foi verificado que em machos e fêmeas houve uma diminuição significativa de testosterona e estradiol, respectivamente, quantificados em plasma (YANG et al, 2020). Em abelhas, a ação deste agrotóxico gera uma síndrome caracterizada pelo abandono das colmeias, levando países como Alemanha e Itália a proibirem a sua utilização (HENRY et al., 2012).

Através de revisão sistemática de estudos com análises de urina, cabelo, sangue, leite materno, saliva e amostras de dente, Zhang e Lu (2022) concluíram que os metabólitos provenientes dos neonicotinoides exibiram níveis mais elevados do que seus compostos originais. Em humanos, exposições a inseticidas a base de imidacloprido já foram associados a hepatotoxicidade. Zhang et al. (2022) relataram sobre os efeitos da associação entre os neonicotinoides e seus metabólitos com câncer hepático, em humanos. Os achados revelaram que o olefin-imidacloprido foi o metabólito de neonicotinoides mais abundantemente presente em pacientes saudáveis e com câncer de fígado, em um hospital do sul da China.

Por meio da análise da concentração de resíduos de inseticidas neonicotinoides em alimentos da Nova Zelândia e Massachusetts, Chen et al. (2014) detectaram presença de imidacloprido em todas as amostras analisadas, superando os níveis máximos permitidos, apontando o grande potencial de exposição e possível indução de toxicidade deste agrotóxico, por sua persistente presença em alimentos, água e solo, sendo potencialmente um promotor de doenças em humanos.

2.4. *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo

Devido a necessidade da redução de animais utilizados em pesquisas, um modelo alternativo *in vivo* se destaca na avaliação toxicológica de substâncias químicas, o nematoide *Caenorhabditis elegans*. Esse modelo segue o princípio dos 3Rs de Russel e Burch (1959) que consiste em *Reduction, Refinement e Replacement* com o intuito de promover a diminuição do uso de animais em pesquisas (KIRK, 2018). Interessantemente, *C. elegans* possui cerca de 70% de homologia aos genes humanos, sendo o primeiro organismo multicelular a ter seu genoma completamente sequenciado (GONZALES-MORAGAS et al., 2015)

Descrito pela primeira vez em 1900, pelo biólogo francês Émile Maupas, como um

nematoide de vida livre que se alimenta de fungos e bactérias presentes no solo e em frutas em decomposição, tornou-se um modelo experimental caracterizado por Sydney Brenner a partir de 1966. Este nematoide tem sido utilizado principalmente em estudos genéticos, com o término da descrição de seu genoma em 1998. Em 2002, Brenner e colaboradores receberam o Prêmio Nobel pelas descobertas acerca da regulação genética do desenvolvimento de órgãos e programação de morte celular utilizando *C. elegans* (BRENNER, 1973; HUNT, 2017).

Existem diversos fatores que contribuem para *C. elegans* ser reconhecido como um organismo vantajoso para pesquisa. Entre eles, destacam-se o fácil manuseio devido ao pequeno tamanho dos animais (quando adultos, medem cerca de 1mm), permitindo a manutenção em placas de Petri, a 20°C com *Escherichia coli* OP50 como fonte de alimento, baixo custo e fácil cultivo. O modelo possui duas formas sexuais, os machos e os hermafroditas autofecundantes, sendo estes últimos os mais utilizados em laboratório. Os animais são capazes de produzir aproximadamente 300 descendentes por hermafrodita e apresentam um ciclo de vida curto, de aproximadamente 3 dias.

Os nematoides são anatomicamente simples, possuindo faringe, intestino, gônadas e ânus. Quando hermafroditas dispõem de útero, espermatecas e vulva e quando machos apresentam uma cloaca com dois espículos e raios sensores na cauda. Possuem um sistema nervoso amplo regulador dos sistemas reprodutor, excretor, muscular e alimentar. Ainda, o verme apresenta uma cutícula resistente e transparente que permite a visualização de suas estruturas (ALTUN E HALL, 2009) (Fig 2. A).

Seu desenvolvimento embrionário leva em média 12 horas, passando pelos estágios de fertilização, proliferação, gastrulação, morfogênese, alongamento, aceleração e eclosão (onde ocorre o rompimento da casca do ovo e a larva L1 começa o desenvolvimento pós embrionário (HALL et al., 2017). Após eclodidos e na presença de alimento, os animais passam por quatro estágios larvais pós embrionários (L1, L2, L3 e L4), até chegar a fase adulta (ALTUN E HALL, 2009) (Fig 2. B). Na ausência de alimento ou em outras condições de estresse, as larvas de *C. elegans* entram em uma forma mais resistente passando do estágio L2 para a forma de Dauer, uma variante de desenvolvimento interrompido, onde os animais apresentam orifícios orais fechados por um tampão interno e as faringes constritas (sem bombeamento) até que haja presença de alimento novamente ou cesse o fator estressor presente (HU, 2007).

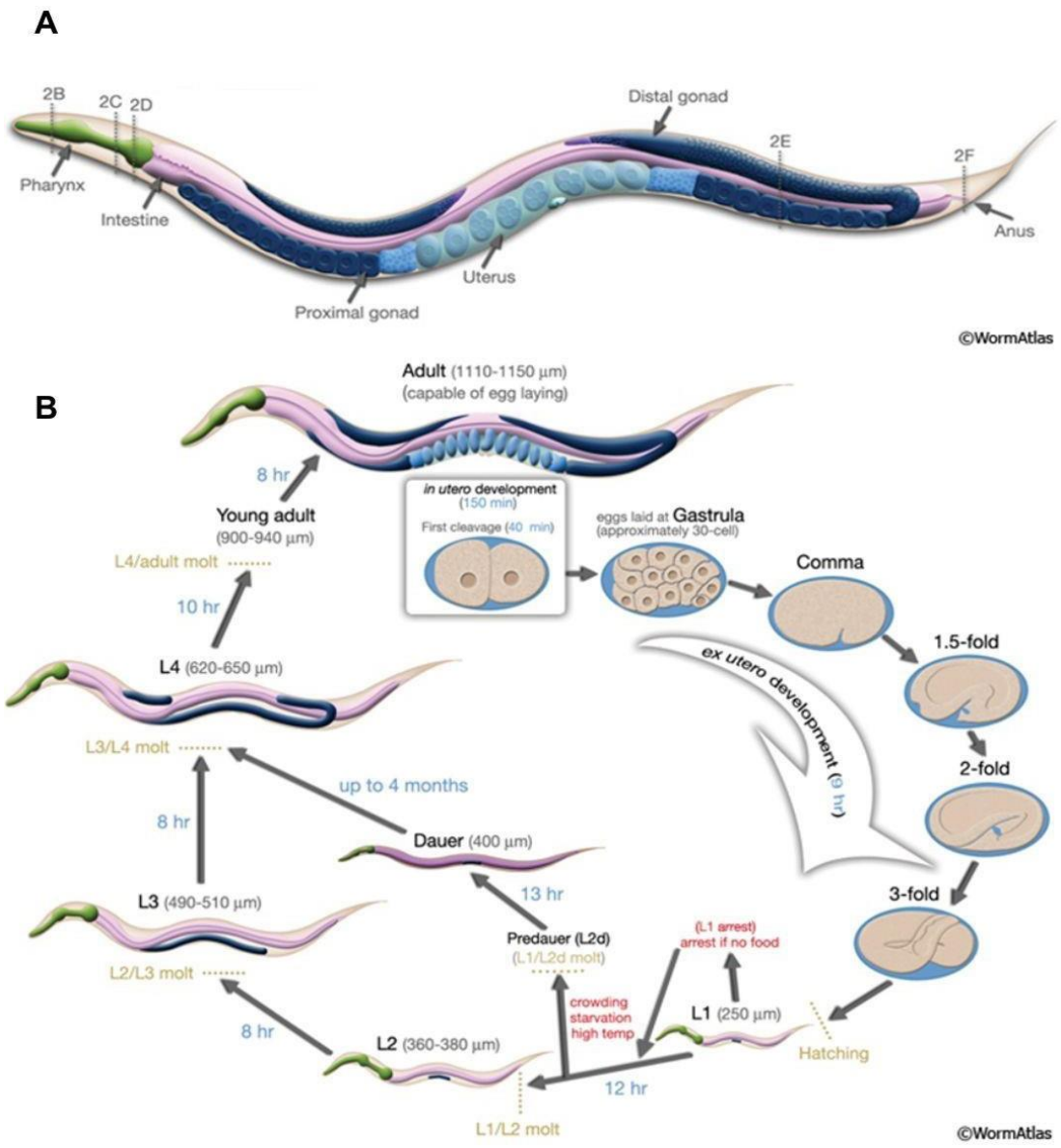

Figura 2: A) Anatomia de hermafroditas de *C. elegans* e B) Ciclo de vida dos vermes. Fonte: Adaptada do WormAtlas (ALTUN E HALL, 2009).

Os hermafroditas desenvolvidos até a fase adulta possuem 959 células somáticas enquanto os machos adultos possuem 1.031 células. Um terço (302) das células de *C. elegans* hermafroditas representam neurônios (Fig. 3), os quais são agrupados em quatro categorias principais de acordo com os seus circuitos: neurônios motores, sensoriais, interneurônios e neurônios polimodais (ALTUN E HALL, 2011). Dos 302 neurônios presentes em *C. elegans*, 20 estão localizados na faringe, possuindo seu próprio sistema nervoso e os 282 neurônios restantes se dividem entre a cabeça, faringe, cordão nervoso ventral e corpo e a cauda (LOER e RAND, 2010).

Conforme Nass & Blakely (2003), o sistema nervoso de *C. elegans* contém 21

neuropeptídeos e alguns neurotransmissores equivalentes aos de mamíferos como glutamato, ácido gama-butírico (GABA), serotonina (5-HT), dopamina e a acetilconlina (usado para sinalização por mais de 90% das células nervosas em *C. elegans*, tornando-se o neurotranismissor mais amplamente utilizado) onde as comunicações neuronais contam com cerca de 6.400 sinapses químicas, 1.500 junções neuromusculares e 900 junções comunicantes (ALTUN E HALL, 2011; PEREIRA et al., 2015).

Entre os neurônios, 160 são colinérgicos, o que torna o modelo adequado para estudos de elucidação de efeitos tóxicos provenientes da exposição a neonicotinóides como o Imidacloprido. Os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) estão localizados ao longo de toda a parede muscular do corpo de *C. elegans,* e são responsáveis por controlar uma sequência de funções fisiológicas do verme como: batimento faríngeo, postura de ovos, aprendizagem, contração muscular e locomoção (RAND, 2007; LOER e RAND, 2010).

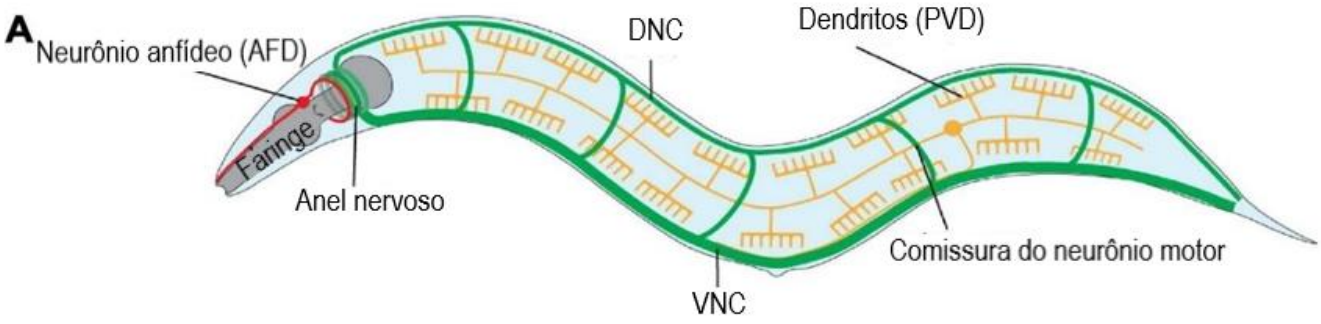

Figura 3: Esquema do sistema neuronal de um hermafrodita adulto (visão lateral) com representação dos cordões nervosos dorsais e ventrais (DNC, VNC em verde), comissuras motoras circunferenciais, neurônios anfídeos AFD (termossensorial e CO_2 sensorial) em vermelho e neurônios sensoriais PVD (nociceptivo polimodal para mecanosensação e termossensação) multi dendríticos em amarelo. Fonte: Adaptado de GODINI et al. (2022).

Mudanças morfológicas na anatomia, fisiologia e sistema nervoso dos vermes podem ser analisadas e visualizadas por meio de uma ampla gama de cepas transgênicas e *knockout* de *C. elegans* que expressam proteínas fluorescentes, como a proteína verde fluorescente (do inglês *Green Fluorescent Protein*), ou promovem deleção e superexpressão de um gene de interesse (STIERNAGLE, 2006; HUNT,

2017). *C. elegans* é amplamente utilizado para estudos toxicológicos com o objetivo de elucidar os efeitos de compostos químicos, como os inseticidas, e avaliar a segurança e eficácia de compostos para o tratamento de intoxicações e doenças relacionadas aos agrotóxicos, atuando como um organismo modelo preditivo de saúde humana (MEYER E WILLIAMS, 2014; JI et al., 2022; MOYA et al., 2022).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTUN, Z. F.; HALL, D. H**. Introduction to *C. elegans* anatomy**. In: *WormAtlas*. 2009. DOI: 10.3908/wormatlas.1.1. Disponível em: <http://www.wormatlas.org/ver1/handbook/anatomyintro/anatomyintro.htm>. Acesso em: 26 abr. 2022.
2. ALTUN, Z. .; HALL, D. **Nervous System-General Description**. In *WormAtlas*. doi:10.3908/wormatlas.1.18 Disponível em: <https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/nervous/mainframe.htm>. Acesso em: 18 jul. 2021.
3. BIZERRA, P. F. V. **Imidacloprido No Fígado De Rato**. Dissertação (Ciência e Tecnologia Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas *UNESP*, p.82 2018.
4. BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a regulamentação e fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 11 jul. 1989. Disponível em: https://legislacao.presidencia.gov.br/atos/?tipo=LEI&numero=7802&ano=1989&ato=501MTR61EeFpWT452. Acesso em: 30 mar. 2023.
5. BRENNER, S. **Nature's gift to science** (Nobel lecture). *ChemBioChem*, v. 4, n. 8, p. 683–687, 1973.
6. CAMPBELL, K. S. et al. **Detection of imidacloprid and metabolites in Northern Leopard frog (Rana pipiens) brains**. *Science of the Total Environment*, v. 813, p. 152424, 2022.
7. CHEN, M. et al. **Quantitative analysis of neonicotinoid insecticide residues in foods: Implication for dietary exposures**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 26, p. 6082–6090, 2014.
8. CROSBY, E. B. et al. **Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish.** *Neurotoxicology and Teratology*, v. 49, p. 81–90, 2015.
9. DA COSTA, L. M. **Avaliação dos efeitos associados dos inseticidas fipronil e imidacloprido sobre a mortalidade da abelha nativa Melipona scutellaris (LATREILLE, 1811)**. *CNR-ISTI technical report*, v. 3, n. 2, p. 356–369, 2015.
10. DE SOUZA, A. et al. **Evaluation of the impact of exposure to pesticides on the health of the rural population: Vale do Taquari**, State of Rio Grande do Sul (Brazil). Ciencia & saude coletiva, v. 16, n. 8, p. 3519–28, 2011.
11. DUTRA, R. M. S.; SOUZA, M. M. O. DE. **Cerrado, Revolução Verde e a Evolução No Consumo De Agrotóxicos**. Sociedade & Natureza, v. 29, n. 3, p. 469–484, 2017.
12. GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. 2002 Disponível em: <https://ocondedemontecristo.files.wordpress.com/2013/07/livro-entomologia-agrc3adcola-_jonathans.pdf>. Acesso em: 7 jun. 2022.
13. GODFRAY, H. C. J. et al. **A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators**. *Proceedings*

of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 281, n. 1786, 2014.

14. GODINI, R.; FALLAHI, H.; POCOCK, R. **The regulatory landscape of neurite development in *Caenorhabditis elegans***. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 15, n. August, p. 1–22, 2022.

15. GONZALEZ-MORAGAS, L.; ROIG, A.; LAROMAINE, A. ***C. elegans* as a tool for in vivo nanoparticle assessment**. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 219, p. 10–26, 2015.

16. GOULSON, D. A**n overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides**. *Journal of Applied Ecology*, v. 50, n. 4, p. 977–987, 2013.

17. HALL, D.H., HERDON, L.A. and ALTUN, Z. **Introduction to *C. elegans* Embryo Anatomy**. In *WormAtlas***.** doi:10.3908/wormatlas.4.1. Disponível em: <https://www.wormatlas.org/embryo/introduction/EIntroframeset.html>. Acesso em: 15 abr. 2023.

18. HENRY, M. et al. **A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees**. *Science*, v. 336, n. 6079, p. 348–350, 2012.

19. HU, P. J. “Dauer.” ***WormBook : the online review of C. elegans biology***. In: *WormBook*. 2007, doi:10.1895/wormbook.1.144.1. Disponível em: <http://www.wormbook.org/chapters/www_dauer/dauer.html>. Acesso em: 8 dez. 2022.

20. HUNT, P. R. **The *C. elegans* model in toxicity testing**. *Journal of Applied Toxicology*, v. 37, n. 1, p. 50–59, 2017.

21. JI, P. et al. ***C. elegans* as an in vivo model system for the phenotypic drug discovery for treating paraquat poisoning**. *PeerJ,* v. 10, p. 1–16, 2022.

22. KARUNARATHNE, A. et al. **How many premature deaths from pesticide suicide have occurred since the agricultural Green Revolution?** *Clinical Toxicology*, v. 58, n. 4, p. 227–232, 2020.

23. KIRK, R. G. W. **Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research**. *Science Technology and Human Values*, v. 43, n. 4, p. 622–648, 2018.

24. LOER, CM; RAND, JB. T**he Evidence for Classical Neurotransmitter in *Caenorhabditis elegans* Neurons.** In: *WormAtlas.* 2022, doi:10.3909/wormatlas.5.200. Disponível em: < https://www.wormatlas.org/neurotransmitterstable.htm> Acesso em: 21 dez. 2022.

25. LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE. **Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática**. Saúde em Debate, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018.

26. LUCCHESI, G. **Agrotóxicos - Construção da legislação**. Consultoria Legislativa, 2005. Disponível em: <https://bd.camara.leg.br/bd/items/c1948092-e9d5-43e4-afea-f407ecc74ee8/full>. Acesso em: 02 fev 2023.

27. MEYER, D.; WILLIAMS, P. L. **Toxicity testing of neurotoxic pesticides in**

Caenorhabditis elegans. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, v. 17, n. 5, p. 284–306, 2014.

28. MOYA, A. et al. **Reproductive toxicity by exposure to low concentrations of pesticides in *Caenorhabditis elegans***. *Toxicology*, v. 475, n. June, p. 153229, 2022.

29. NASS, R.; BLAKELY, R. D. **The *Caenorhabditis elegans* Dopaminergic System: Opportunities for Insights into Dopamine Transport and Neurodegeneration**. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 43, p. 521–544, 2003.

30. NUGNES, Roberta et al. **Imidacloprid: Comparative toxicity, DNA damage, ROS production and risk assessment for aquatic non-target organisms**. **E***nvironmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, v. 316, Pt. 2, p. 120682, 2023. DOI: 10.1016/j.envpol.2022.120682.

31. OCTAVIANO, C. **Muito além da tecnologia: Os impactos da Revolução Verde**. *ComCiência*, v. 1, n. 120, p. 1–3, 2010.

32. PEREIRA, Laura et al. **A cellular and regulatory map of the cholinergic nervous system of *C. elegans*.** *eLife*, v. 4, e12432, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.7554/eLife.12432. Acesso em: 30 mar. 2025.

33. PIGNATI, W. A. et al. **Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: Uma ferramenta para a vigilância em saúde**. Ciencia e Saude Coletiva, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, 2017.

34. PU, J.; CHUNG, H. New and emerging mechanisms of insecticide resistance. **Current Opinion in Insect Science**, v. 63, n. June, p. 22–26, 2024.

35. RAND, J. B. **Acetylcholine**. Disponível em: <http://www.wormbook.org/chapters/www_acetylcholine/acetylcholine.html>. Acesso em: 7 maio. 2023.

36. SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ. **Intoxicações agudas por Agrotóxicos**. Disponível em: <https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-04/intoxicacoesagudasagrotoxicos2018.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2022.

37. SHARMA, A. et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 11, p. 1–16, 2019.

38. SOUZA, A. C. DE; LOGIODICE, R. A. C. Roteiro de Atuação Agrotóxicos. **Mpssp**, p. 32, 2018.

39. STIERNAGLE, T. **Maintenance of C. elegans**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19649/>. Acesso em: 17 jul. 2023.

40. SPADOTTO, C.A; GOMES, M.A.F. **Agrotóxicos no Brasil**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agricultura-e-meio-ambiente/qualidade/dinamica/agrotoxicos-no-brasil>. Acesso em: 1 mar. 2023.

41. TAGO, K. et al. **Insecticide applications to soil contribute to the development of Burkholderia mediating insecticide resistance in stinkbugs**. *Molecular Ecology*, v. 24, n. 14, p. 3766–3778, 2015.

42. TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. **Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of selective action**. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 45, p. 247–268, 2005.

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

44. PHUA, D.H. et al. **Neonicotinoid insecticides: An emerging cause of acute pesticide poisoning**. *Clinical Toxicology*, v. 47, n. 4, p. 336–341, 2009.

45. VIEIRA, E. . **A influência do efeito matriz na determinação dos pesticidas organoclorados e organofosforados em amostras de manga**. 2003. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, University of São Paulo, São Paulo, 2003. doi:10.11606/D.46.2018.tde-28022018-122057. Acesso em: 2025-03-30.

46. YANG, L. et al. **Enrichment of imidacloprid and its metabolites in lizards and its toxic effects on gonads**. *Environmental Pollution*, v. 258, p. 113748, 2020.

47. YI, X. et al. **Occurrence and distribution of neonicotinoid insecticides in surface water and sediment of the Guangzhou section of the Pearl River, South China**. *Environmental Pollution*, v. 251, p. 892–900, 2019.

48. ZHANG, D.; LU, S. **Human exposure to neonicotinoids and the associated health risks: A review**. *Environment International*, v. 163, n. January, p. 107201, 2022.

49. ZHANG, H. et al. **Exposure to neonicotinoid insecticides and their characteristic metabolites: Association with human liver cancer**. *Environmental Research*, v. 208, n. May, p. 2018–2023, 2022.

50. ZOH, M. G. et al. **Molecular bases of P450-mediated resistance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the mosquito *Ae. aegypti***. *Aquatic Toxicology*, v. 236, n. February, 2021.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Avaliar os efeitos neurotóxicos, comportamentais e morfofisiológicos da exposição a um agrotóxico à base de imidacloprido (Much 600 FS®) em *Caenorhabditis elegans*.

4.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito da exposição ao imidacloprido em *C. elegans* por meio da mortalidade dos animais, determinando o valor de CL_{50};
- Avaliar o crescimento de *Escherichia coli* OP50, fonte padrão de alimento dos animais, quando exposta ao imidacloprido;
- Avaliar os efeitos neurotóxicos da exposição ao imidacloprido em *C. elegans* por meio das cepas N2 Bristol (cepa selvagem) e LX929 (vsls48 [unc-17::gfp]);
- Avaliar os parâmetros comportamentais, reprodutivos, e de desenvolvimento em *C. elegans* quando expostos ao imidacloprido por meio das cepas N2 Bristol (cepa selvagem) e MD701 (bcls39 [lim-7p::ced-1::gfp þ lin-15(þ)]) V.

5. CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que a formulação comercial de Imidacloprid, Much 600 FS®, induz alterações significativas em vários parâmetros comportamentais, fisiológicos e neuronais em *Caenorhabditis elegans*. Especificamente, a exposição ao IMI causou danos neuronais colinérgicos, ao mesmo tempo em que interrompeu o desenvolvimento de vermes, seu comportamento alimentar, locomoção e reprodução, destacando o potencial neurotóxico do inseticida e seus efeitos fisiológicos. Os efeitos observados, particularmente na alimentação e reprodução, precisam de mais estudos para elucidar os mecanismos subjacentes, especialmente à luz do uso generalizado de IMI globalmente. Além disso, o papel dos adjuvantes na composição do IMI requer mais investigação para avaliar completamente sua contribuição para a toxicidade encontrada neste estudo. Em conclusão, nossas descobertas sugerem que o IMI é um agente tóxico para organismos não-alvo, como *C. elegans*, que serve como um modelo importante para prever potenciais riscos à saúde humana associados à exposição a pesticidas.

6. PERSPECTIVAS

Como perspectivas para este estudo, sugerimos avaliações posteriores acerca dos efeitos de estresse oxidativo relacionados à exposição dos animais ao Imidacloprido. Sugerimos ainda, avaliações comportamentais acerca do padrão analítico do Imidacloprido, afim de inferir se há discrepância de efeitos entre padrão analítico e formulação comercial. Por fim, sugere-se estudos adicionais a respeito do Imidacloprido e associações à outros inseticidas excessivamente utilizados no Brasil e no mundo objetivando uma visão mais ampla acerca dos efeitos da relação entre inseticidas na saúde humana e no meio ambiente.