



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JOSÉ RAFAEL ASSAD CAVALCANTE

**ANÁLISE DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS NA MUCOSA NASAL DE
CAMUNDONGOS PÓS EXPOSIÇÃO INALATÓRIA AGUDA AO HERBICIDA
ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO 2,4-D**

Presidente Prudente-SP

2023



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

JOSÉ RAFAEL ASSAD CAVALCANTE

**ANÁLISE DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS NA MUCOSA NASAL DE
CAMUNDONGOS PÓS EXPOSIÇÃO INALATÓRIA AGUDA AO HERBICIDA
ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO 2,4-D**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora:
Profa. Dra. Renata Calciolari Rossi

Presidente Prudente - SP

2023

Catálogo Internacional na Publicação (CIP)

618.1
C377a

Cavalcante, José Rafael Assad

Análise de marcadores inflamatórios na mucosa nasal de camundongos pós exposição inalatória aguda ao herbicida ácido diclorofenoxiacético 2,4-D \ José Rafael Assad Cavalcante; orientadora Renata Calciolari Rossi.-- Presidente Prudente, 2023.

30 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2023.

Bibliografia.

1. Herbicidas. 2. Ácido 2,4-diclorofenoxiacético. 3. Mucosa nasal. 4. Exposição por inalação. 5. Inflamação. 6. Citocinas. I. Rossi, Renata Calciolari, orient. II. Título.

JOSÉ RAFAEL ASSAD CAVALCANTE

**ANÁLISE DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS NA MUCOSA NASAL DE
CAMUNDONGOS PÓS EXPOSIÇÃO INALATÓRIA AGUDA AO HERBICIDA
ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO 2,4-D**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Ciências da Saúde.

Presidente Prudente, 24 de março de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata Calciolari Rossi
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Daniela Vanessa Moris
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Ana Karina Marques Salge
Universidade Federal de Goiás - UFG
Goiânia - GO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, que entendeu e suportou minha ausência, me apoiando incondicionalmente para que eu buscasse a realização de mais essa etapa da minha carreira profissional e acadêmica. Nada seria possível sem a presença, a compreensão e o apoio da minha família, pais e amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha Orientadora, Prof^a Dr^a Renata Calciolari Rossi, por ter me guiado seguramente neste desafio. Seu conhecimento e sua disponibilidade fizeram toda a diferença nesta caminhada. Nosso vínculo ultrapassou a seara acadêmica e adentrou no campo da amizade, que, de minha parte, perdurará por toda a vida.

Aos ilustríssimos professores componentes da Banca Examinadora, profissionais do mais alto nível, por seus sábios apontamentos que, tenho certeza, engrandecerão substancialmente esta dissertação. Ser avaliado por vocês é de uma responsabilidade e uma honra grandiosas.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Ciências da Saúde, que muito contribuíram para o meu desenvolvimento intelectual durante esta pós-graduação.

Aos funcionários da Secretaria, sempre em prontidão para auxiliar os alunos em suas constantes dúvidas e incertezas.

Por fim, agradeço de modo geral a todos aqueles que de alguma forma me auxiliaram nesta jornada.

RESUMO

Análise de marcadores inflamatórios na mucosa nasal de camundongos pós exposição inalatória aguda ao herbicida ácido diclorofenoxiacético 2,4-D

Para lidar com os estímulos agressivos do ambiente, todos os seres vivos possuem mecanismos adaptativos, com o fim de manter o equilíbrio homeostático. Um desses mecanismos é a resposta inflamatória, que pode ser identificada através de marcadores conhecidos como citocinas pró-inflamatórias. O objetivo da presente pesquisa é analisar se a exposição aguda inalatória ao herbicida 2,4-D causa reações inflamatórias na mucosa nasal de camundongos através da quantificação das citocinas: TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ . Para tanto, 4 grupos compostos por 20 camundongos Swiss adultos machos foram expostos a diferentes concentrações do herbicida citado (Grupo Salina e Grupos de baixa, média e alta concentração). Os animais de cada grupo foram subdivididos em 4 grupos e cada grupo exposto à nebulização por diferentes intervalos de tempo: 24, 48 e 72 horas. Após eutanasia, a mucosa nasal de cada camundongo foi coletada para análise imunohistoquímica. Para este procedimento, as lâminas (5 μ m) foram incubadas com os anticorpos para TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ , e então as imagens das lâminas foram capturadas por meio de microscópio óptico com câmera acoplada. Para a análise estatística dos dados foi considerada a presença de dois fatores: Tempo x Concentração. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando p foi menor que 5% ($p < 0,05$). Nossos resultados mostraram que o 2,4-D foi capaz de modificar o padrão de expressão de todas as citocinas analisadas, sugerindo, desta forma, que a exposição ao 2,4-D é capaz de alterar a imunologia das vias aéreas superiores, corroborando a hipótese da potencial patogenicidade do 2,4-D, uma vez que, um padrão de expressão de citocinas alterado pode gerar um ambiente propício ao surgimento de diversas patologias.

Palavras-chave: herbicidas; ácido 2,4-diclorofenoxiacético; mucosa nasal; exposição por inalação; inflamação; citocinas.

ABSTRACT

Analysis of inflammatory markers in mouse nasal mucosa after acute inhalation exposure to the 2,4-D Dichlorophenoxyacetic acid herbicide

To deal with aggressive environmental stimuli, all living beings have adaptive mechanisms in order to maintain homeostatic balance. One of these mechanisms is the inflammatory response, which can be identified through markers known as pro-inflammatory cytokines. The aim of this research is to analyze whether acute inhalational exposure to the herbicide 2,4-D causes inflammatory reactions in the nasal mucosa of mice through the quantification of cytokines: TNF- α , IL-1, IL-6 and IFN- γ . For this purpose, 4 groups composed of 20 adult male Swiss mice were exposed to different concentrations of the afore mentioned herbicide (Saline Group and Low, Medium and High Concentration Groups). The animals in each group were subdivided into 4 groups and each group exposed to nebulization for different time intervals: 24, 48 and 72 hours. After euthanasia, the nasal mucosa of each mouse was collected for immunohistochemical analysis. For this procedure, the slides (5 μ m) were incubated with antibodies to TNF- α , IL-1, IL-6 and IFN- γ , and then the images of the slides were captured using an optical microscope with a camera attached. For the statistical analysis of the data, the presence of two factors was considered: Time x Concentration. Differences were considered statistically significant when p was less than 5% ($p < 0,05$). Our results showed that 2,4-D was capable of modifying the expression pattern of all analyzed cytokines, thus suggesting that exposure to 2,4-D is capable of altering the immunology of the upper airways, corroborating the hypothesis of the potential pathogenicity of 2,4-D, since an altered expression pattern of cytokines can generate an environment conducive to the emergence of several pathologies.

Keywords: herbicides; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; nasal mucosa; inhalation exposure; inflammation; cytokines.

LISTA DESIGLAS

GAC	Grupo Alta Concentração
GBC	Grupo Baixa Concentração
GC	Grupo Controle
GMC	Grupo Média Concentração
IFN	Interferon
IL	Interleucina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
2,4-D	Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de trabalho.....	15
Figura 2 - Expressão de TNF- α no epitélio nasal de camundongos expostos ao herbicida 2,4-D.....	16
Figura 3 - Expressão de IL-1 no epitélio nasal de camundongos expostos ao herbicida 2,4-D	17
Figura 4 - Expressão de IL-6 no epitélio nasal de camundongos expostos ao herbicida 2,4-D.....	17
Figura 5 - Expressão de IFN- γ no epitélio nasal de camundongos expostos ao herbicida 2,4-D.....	18

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
Materiais e métodos	14
Caracterização da amostra	14
Protocolo de exposição ao Herbicida 2,4-D	14
Coleta do material	15
Análise imunohistoquímica	15
Análise estatística	16
RESULTADOS	16
DISCUSSÃO	18
CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS	20
ANEXO A - Aprovação Ética	24
ANEXO B - Certificado de apresentação em evento	25
ANEXO C - Normas Environmental Science and Pollution Research	26

**ANÁLISE DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS NA MUCOSA NASAL DE CAMUNDONGOS
PÓS EXPOSIÇÃO INALATÓRIA AGUDA AO HERBICIDA ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO
2,4-D**

Analysis of inflammatory markers in mouse nasal mucosa after acute inhalation exposure to the 2,4-D
Dichlorophenoxyacetic acid herbicide

José Rafael Assad Cavalcante¹, Aline Dobrowolski Kovalski², Bruna Vellini Moreira³, Aline Raquel de Oliveira Moraes⁴, Antonio Rodrigues Neto⁵, Sanívia Aparecida de Lima Pereira⁶, Renata Margarida Etcheberere⁷, Debora Tavares de Resende e Silva⁸; Renata Calciolari Rossi⁹

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo.

Artigo formatado segundo as normas do periódico Environmental Science and Pollution Research (Qualis:A2)

RESUMO

Para lidar com os estímulos agressivos do ambiente, todos os seres vivos possuem mecanismos adaptativos, como fim de manter o equilíbrio homeostático, e um desses mecanismos é a resposta inflamatória, que pode ser identificada através de marcadores conhecidos como citocinas pró-inflamatórias. Para identificar os efeitos da exposição ao herbicida 2,4-D no ambiente e na saúde humana, o objetivo da presente pesquisa é analisar se a exposição aguda inalatória ao herbicida 2,4-D causa reações inflamatórias na mucosa nasal de camundongos através da dosagem das citocinas: TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ . 80 camundongos adultos machos Swiss foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de diferentes concentrações do herbicida (Grupo Salina e Grupos de baixa, média e alta concentração), ficando então cada grupo com 20 animais. Os animais de cada grupo foram expostos à nebulização por diferentes intervalos de tempo: 24, 48 e 72 horas, sendo que em cada um desses intervalos, foram expostos 5 animais de cada grupo das concentrações do herbicida. A exposição de camundongos ao 2,4-D foi realizada previamente em outro trabalho de pesquisa, aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA).

¹Mestrado em Ciências da Saúde – Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

²Graduação em Medicina – Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE – Presidente Prudente, SP, Brazil.

³Graduação em Medicina – Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE – Presidente Prudente, SP, Brazil.

⁴Graduação em Medicina – Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE – Presidente Prudente, SP, Brazil.

⁵Departamento de Patologia Especial – Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM – Uberaba, MG, Brazil.

⁶Departamento de Patologia Especial – Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM – Uberaba, MG, Brazil.

⁷Departamento de Enfermagem – Universidade Federal de Goiás – Goiânia, GO, Brazil.

⁸Faculdade de Medicina – Universidade Federal da Fronteira Sul – Chapecó, SC, Brazil.

⁹Programa de Pós-graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional – Presidente Prudente, SP, Brazil.

Autor correspondente. Email: renatacalciolari@terra.com.br

Após a eutanásia, a mucosa nasal de cada camundongo foi coletada para análise imunohistoquímica sob microscopia óptica. Para o procedimento de imunohistoquímica as lâminas (5 µm) foram incubadas com os anticorpos para TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ , e então as imagens das lâminas foram capturadas por meio de microscópio óptico com câmera acoplada. Para a análise estatística dos dados foi considerada a presença de dois fatores: Tempo x Concentração. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando p foi menor que 5% ($p < 0,05$).

Palavras-chave: Herbicidas. Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético. Exposição por Inalação. Epitélio Nasal. Inflamação. Citocinas.

INTRODUÇÃO

Aproximadamente 805 milhões de pessoas não têm alimento suficiente para uma vida saudável, e esse número tende a aumentar proporcionalmente ao crescimento da população mundial, tendo em vista as estimativas que indicam que, em 2050, a população do planeta Terra ultrapassará os 9,5 bilhões de pessoas (Saath e Fachinello 2018). Segundo a FAO, por volta de 828 milhões de pessoas passaram fome em 2021 (FAO, 2022). No Brasil, um inquérito realizado para apurar as condições de segurança alimentar do país durante a pandemia da Covid-19 constatou que em 2021 aproximadamente 15,5% da população brasileira, ou seja, mais de 33 milhões de pessoas, conviviam com a fome (Rede PENSSAN, 2022).

A maioria dos alimentos produzidos no mundo vem de alguns poucos países, majoritariamente concentrados na América Latina e na África Subsaariana, além de China e dos Estados Unidos, e estes últimos já não possuem mais território para expandir sua capacidade agrícola (Saath e Fachinello, 2018). A baixa disponibilidade de terras cultiváveis, somada às preocupações com o meio ambiente e o desenvolvimento sustentável, gera um clima de apreensão diante do aumento da população mundial. Uma saída para o dilema da conservação ambiental e a demanda por mais alimentos seria aumentar a produtividade, sem necessariamente expandir as áreas de cultivo.

O controle de pragas é essencial em qualquer cultura agrícola, especialmente em monoculturas e, desde 2009, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do planeta (Dellamatrice e Monteiro, 2014). Os relatórios de comercialização de agrotóxicos publicados pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA, 2016) apontam que os agrotóxicos que lideram o ranking de vendas no nosso país são os herbicidas Glifosato e Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético.

Sendo o 2,4-D um dos agrotóxicos mais utilizados no mundo todo desde a década de 1940, é crucial compreender se essa substância oferece riscos à saúde humana. A Agência Especializada em Câncer da OMS, a IARC, caracteriza o 2,4-D na categoria 2B, “possivelmente carcinogênico para humanos” (IARC, 2018; Loomis et al., 2015), classificação ratificada no Brasil pelo Instituto Nacional do Câncer–INCA (INCA, 2022), que o qualifica como “extremamente tóxico e possivelmente carcinogênico para humanos”.

O 2,4-D é um herbicida com atuação seletiva em dicotiledôneas e plantas de folha larga. É utilizado no Brasil para o combate a ervas daninhas em culturas de trigo, milho, soja, arroz irrigado e arroz sequeiro, aveia, sorgo, cana-de-açúcar, café e braquiária, dentre outras (Formulação comercial, 67,0% m/v, 2,4-D Nortox; Thomaz, 2018).

A forma mais usual de entrar em contato com o 2,4-D é pelas vias aéreas (Nishioka et al., 2001; Ganguli et al., 2014; Maillet et al., 2016) durante a aplicação do produto nas lavouras e até mesmo durante sua fabricação. A contaminação também pode ocorrer via dérmica ou por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados.

O 2,4-D é aplicado por pulverização, o que acarreta a formação de névoas contaminantes que inevitavelmente são inaladas pelos trabalhadores, além de serem levadas pelo vento para além da área de aplicação. Desta forma, é fundamental entender como ele afeta as vias aéreas, especialmente a cavidade nasal, pois elas constituem a “porta de entrada” das mais diversas substâncias, incluindo “poluentes antropogênicos” (Bhat et al., 2018; Harkema, 1991).

Resíduos do 2,4-D foram encontrados em alimentos, carpetes residenciais (Nishioka et al., 2001; Morgan et al., 2008) e na urina de adultos e crianças que não foram expostos ocupacionalmente ao 2,4-D (Morgan et al., 2008; Song et al., 2021; Jurewicz et al., 2012), demonstrando que toda a população está sujeita à contaminação por esse pesticida.

Diversos estudos sugerem associação entre a exposição a pesticidas à ocorrência de inúmeras patologias, tais como Doença de Parkinson e processos neurodegenerativos (Tanner et al., 2009), doenças do sistema respiratório, como alergias (Fukuyama et al., 2009) e asma (Maillet et al., 2016) e risco aumentado de alguns tipos de câncer, como fígado e mama (Heinrich Böll Stiftung, 2022).

A hipótese de que o 2,4-D seja um composto alérgeno ao trato respiratório foi testada por Fukuyama et al. (2009), que demonstraram que os camundongos tratados com 2,4-D apresentaram maiores níveis de liberação de citocinas e quimiocinas, incluindo IL-6 e TNF, subsequente à proliferação de eosinófilos, corroborando a hipótese levantada. Mello et al. (2018) também observaram aumento da concentração de mastócitos do epitélio nasal de camundongos submetidos à nebulização pelo 2,4-D. Ratos submetidos a diferentes concentrações do pesticida 2,4-D desenvolveram um importante processo inflamatório em suas mucosas orais, com presença de linfócitos e danos ao tecido epitelial, e os animais expostos à inalação do composto apresentaram maiores danos teciduais (Parizi et al., 2020).

Como resposta a estímulos agressivos, os seres vivos possuem mecanismos adaptativos para manter o equilíbrio homeostático. Um desses mecanismos é a resposta inflamatória, que age localmente no sentido de restringir as consequências e a extensão do dano tecidual. Tais mecanismos podem ser identificados por meio de marcadores inflamatórios, conhecidos como citocinas pró-inflamatórias (Maillet et al., 2016).

O Sistema Imunológico é uma complexa rede cuja função é proteger o corpo contra agentes externos e internos (Dhouib et al., 2016). Em resposta à alguma infecção ou lesão, o sistema imunológico reage gerando uma inflamação (Banks e Lein, 2012; Tizard, 2002), ativando e recrutando mecanismos protetores para a região afetada (Tizard, 2002). Uma das características desse estado inflamado é a liberação de citocinas pelos macrófagos (Banks e Lein, 2012). A resposta inflamatória aguda é mediada predominantemente por citocinas da família das Interleucinas, Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interferons. As citocinas IL-1 e IL-6, por exemplo, são protagonistas da resposta imune aguda (Tizard, 2002), constituindo uma frente de defesa contra a penetração de patógenos, sendo ainda essenciais na sinalização de lesão tecidual (Jones e Thomsen, 2012).

Assim, é importante entender a dinâmica dos processos de resposta inflamatória, pois um estado inflamatório está associado a gênese de diversas doenças, incluindo o câncer, uma vez que algumas citocinas inflamatórias podem influenciar na gênese e progressão de tumores (Balkwill e Mantovani, 2001). Diante do exposto, o objetivo deste estudo é investigar como o herbicida 2,4-D afeta o epitélio nasal do modelo animal (camundongo) por meio

da resposta inflamatória, quantificando as citocinas TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ . Os dados experimentais obtidos e analisados neste trabalho pioneiro serão de grande valia para compreender as consequências para a saúde imunológica de um dos pesticidas mais utilizados no mundo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização da Amostra

Foram utilizados 80 camundongos Swiss adultos machos (30 – 45 g), fornecidos pelo Biotério Central da Unoeste e alojados no Biotério Experimental da mesma Universidade. Durante o experimento, os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (30 cm x 16 cm x 19 cm) com cama de maravalha, mantidos na mesma sala sob temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e condições de iluminação (fotoperíodo de 12L e 12D, em que L corresponde ao período de luz e D ao período escuro). Este trabalho foi submetido ao comitê de ética para uso de animais (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste) sob o protocolo 5386 e foi realizado de acordo com o guia para o cuidado e uso de animais de laboratório do Instituto Nacional de Saúde (USA). Limitação: este estudo não apresentou limitações, tendo em vista a dose utilizada, baseando-se em 50% da dose letal máxima; assim, não houve óbito de animais para inviabilizar a realização deste estudo.

Protocolo de exposição ao herbicida 2,4-D

O protocolo de exposição contou com duas caixas (32 x 24 x 32 cm), cada uma ligada a um nebulizador ultrassônico da marca Pulmosonic Star®. As concentrações do herbicida foram administradas após diluição em 10 ml de solução salina a 0,9%. Todos os grupos foram expostos por um tempo aproximado de 15 minutos, por 3 dias (72 horas).

Os camundongos receberam dieta padrão para animais de laboratório (Suprab® Alisul, Brazil) e água *ad libitum* e foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais, contendo 20 animais por grupo, de acordo com Mello et al. (2018):

- Grupo Controle (GC): N=20. Expostos à nebulização de solução salina (NaCl) a 0,9%;
- Grupo Baixa Concentração (GBC): N=20. Expostos à nebulização de solução de 2,4-D, contendo $3,71 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha), o que equivale a $187,17 \text{ mg/m}^3$ (Mello et al., 2018; Parizi et al., 2020);
- Grupo Média Concentração (GMC): N=20. Expostos à nebulização de solução de 2,4-D, contendo $6,19 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha), o que equivale a $312,28 \text{ mg/m}^3$;
- Grupo Alta Concentração (GAC): N=20. Expostos à nebulização de solução de 2,4-D, contendo $9,28 \times 10^{-3}$ gramas de ingrediente ativo por hectare (g.i.a/ha), o que equivale a $467,93 \text{ mg/m}^3$ (Mello et al., 2018; Parizi et al., 2020).

As diferentes concentrações do herbicida para cada grupo foram calculadas de acordo com a recomendação do fabricante para o uso agrícola do 2,4-D® (Formulação comercial, 67,0% m/v, Nortox, Paraná, Brasil) e adaptado ao tamanho da caixa de exposição.

Os animais de todos os grupos foram expostos à nebulização por diferentes intervalos de tempo: 24, 48 e 72 horas. Na primeira exposição, todos os 80 camundongos foram submetidos à nebulização com a concentração preconizada para cada grupo. Após 24 horas, 20 animais, sendo cinco de cada grupo, foram eutanasiados com

anestesia intraperitoneal (100 mg/Kg de tiopental sódico) para a coleta do material. Após 48 horas, outros 20 animais que já receberam a segunda nebulização também foram eutanasiados, então após 72 horas, outros 20 animais receberam a terceira nebulização, e finalmente, após 8 dias, os últimos 20 animais, que também já receberam as três nebulizações, foram eutanasiados (Mello et al., 2018).

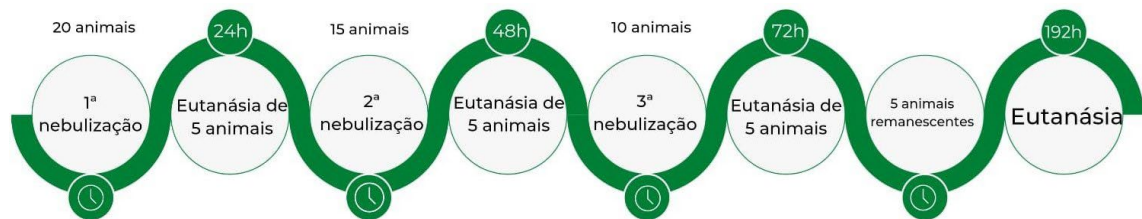


Fig. 1 Fluxograma de trabalho. A imagem representa o delineamento experimental deste estudo, sendo utilizado o mesmo protocolo de exposição para todos os grupos de animais.

Coleta do Material

Após a eutanásia, todo o focinho do camundongo foi retirado. Posteriormente, foram realizados cortes transversais para a análise da mucosa nasal em sua totalidade através de análise imunohistoquímica sob microscopia óptica. O tecido foi fixado em formaldeído a 10% durante 24 horas, e as peças foram incorporadas em cera de parafina e seccionadas a 5 μ m (10 cortes seriados no plano sagital).

Análise Imunohistoquímica

Para o procedimento de imunohistoquímica, as lâminas (5 μ m) foram incubadas com os anticorpos para TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ , seguindo as indicações do fabricante (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA). Os anticorpos, sua origem e os protocolos usados são mostrados na Tabela 1. Lâminas com a mesma numeração foram submetidas ao mesmo procedimento sem os anticorpos primários (controle negativo).

A análise imunohistoquímica foi realizada por meio do método avidina-biotina conjugada à peroxidase (Goat ABC staining system, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA), como descrito por Ferro (2014). Brevemente, as lâminas foram desparafinizadas e reidratadas em xilol e alcoóis em alta temperatura em microondas por 5 minutos, por meio de uma solução de 1m M de EDTA em tampão citrato (pH 8,0). A peroxidase endógena foi inibida por uma solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol. A reação antígeno-anticorpo inespecífica foi bloqueada pela incubação das lâminas em soro de equino - PBS e albumina sérica equina (HSA) 5-10%, por 60 minutos. Todos os anticorpos ou controles negativos foram diluídos em PBS/HSA 1% por 60 minutos.

Subsequentemente, todas as lâminas foram tratadas com o kit comercial do anticorpo secundário (Goat ABC staining system) por 30 minutos, seguido do complexo avidina-biotina peroxidase por mais 30 minutos. A reação antígeno-anticorpo foi observada por meio de um precipitado marrom após aplicação de 3,3 diaminobenzidina por 4 minutos e contracoloração com hematoxilina (30s). Em seguida, as lâminas foram então reidratadas, diafanizadas e montadas para observação em microscopia de luz. Posteriormente à análise imunohistoquímica, foram capturadas as imagens em microscópio com câmera acoplada (Leica ICC50 HD).

Análise Estatística

Para análise de normalidade, foi utilizado o teste estatístico ShapiroWilk disponível no programa R (versão 3.2.3). Para análise estatística dos dados, foi considerada a presença de dois fatores: tempo x concentração. Nesse sentido, foi utilizado o teste estatístico de análise de variância de dois fatores (Two-way Anova), disponível no programa estatístico Graphpad Prism (Versão 5.0). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando p foi menor que 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Na comparação do tempo de exposição entre os grupos controle baixa, média e alta concentração do herbicida, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos.

Com relação à expressão de TNF- α , foram verificadas menores concentrações entre os grupos de baixa, média e alta concentração, em comparação ao controle em 24 horas de exposição ($p < 0,05$). Em 72 horas de exposição, houve um aumento significativo da expressão de TNF- α no grupo de baixa concentração ($p < 0,05$). Em 192 horas, houve um aumento significativo na expressão de TNF- α nos grupos baixa e média concentração, comparados ao controle ($p < 0,05$). Ademais, não houve diferenças significativas no parâmetro de 48 horas entre os grupos (Figura 1).

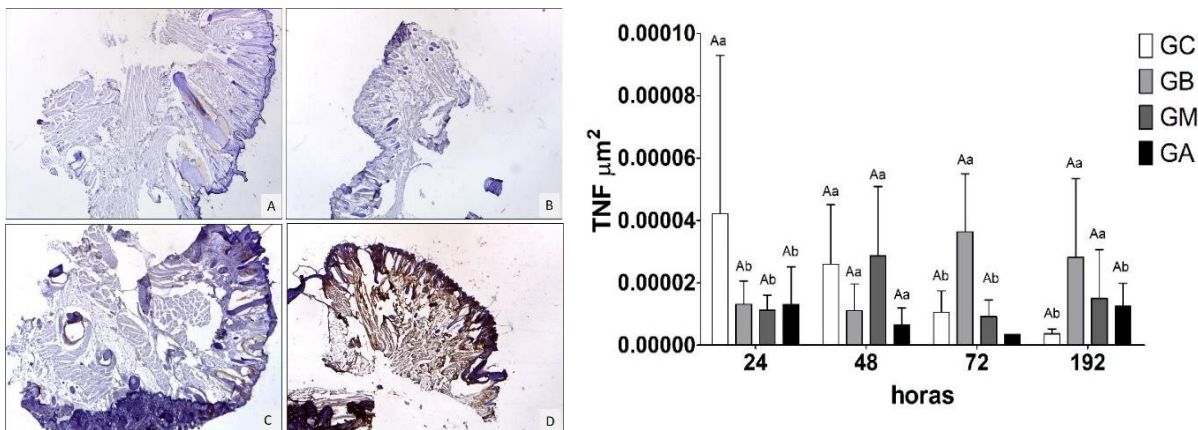


Fig. 2 Expressão de TNF- α no epitélio nasal de camundongos expostos ao herbicida 2,4-D. Letras maiúsculas representam a comparação entre os tempos (24, 48, 72, 192 horas). Letras minúsculas representam a comparação entre as doses (GC (A), GB (B), GM (C) e GA (D)). Letras diferentes representam diferença significativa ($p > 0,05$)

Na análise relacionada à IL-1, foi verificada uma redução significativa entre os grupos baixa e alta concentração em comparação ao grupo controle no tempo de 24 horas ($p < 0,05$). Para o tempo de 48 horas, houve uma redução significativa da expressão de IL-1 no grupo alta concentração quando comparado ao controle ($p < 0,05$). Em 72 horas de exposição, foi verificado um aumento da expressão de IL-1 no grupo baixa concentração e uma redução significativa no grupo média e alta concentração comparado ao controle ($p < 0,05$). Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no tempo de 192 horas (Figura 2).

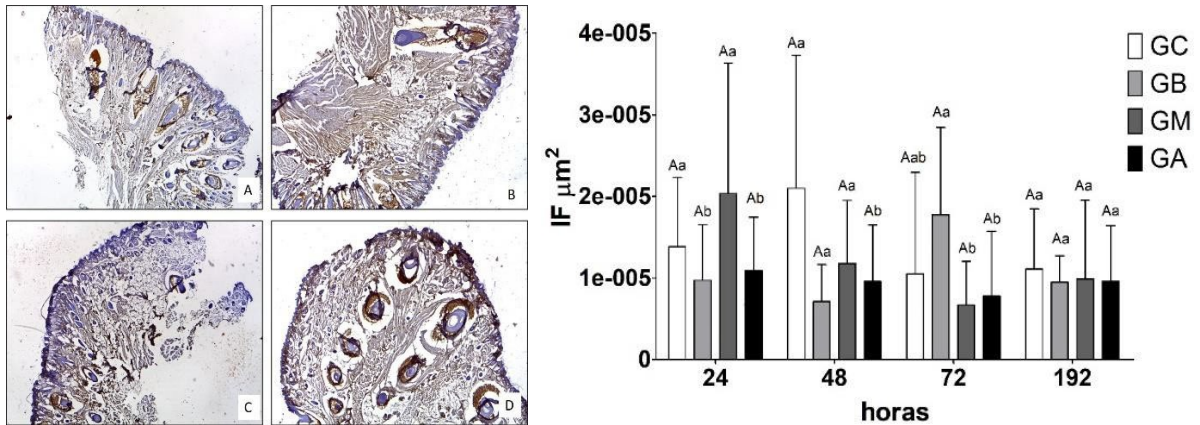


Fig. 3 Expressão de IL-1 no epitélio nasal de camundongos expostos ao herbicida 2,4-D. Letras maiúsculas representam a comparação entre os tempos (24, 48, 72, 192 horas). Letras minúsculas representam a comparação entre as doses (GC (A), GB (B), GM (C) e GA (D)). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Com relação à expressão de IL-6 em 24 horas, foi verificado um aumento significativo no grupo baixa concentração comparado aos demais ($p < 0,05$). Observou-se também uma redução significativa na expressão de IL-6 no grupo alta concentração, comparado aos outros grupos ($p < 0,05$). Em 48 horas, foi verificada uma redução na expressão de IL-6 nos grupos e baixa, média e alta concentração, comparado ao controle ($p < 0,05$). Verifica-se também uma redução significativa do grupo alta concentração, comparado aos demais ($p < 0,05$). Em 72 horas, houve um aumento significativo de IL-6 no grupo baixa concentração comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Em 192 horas, foi observado um aumento significativo no grupo baixa concentração comparado aos outros grupos e uma redução do grupo alta concentração comparado aos demais ($p < 0,05$) (Figura 3). Ademais, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos de exposição de IFN (Figura 4).

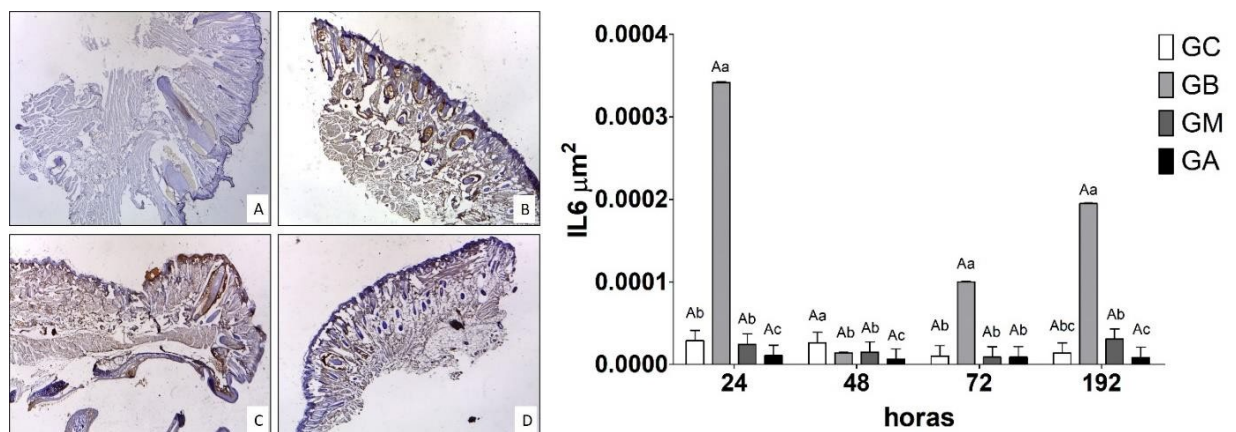


Fig. 4 Expressão de IL-6 no epitélio nasal de camundongos expostos ao herbicida 2,4-D. Letras maiúsculas representam a comparação entre os tempos (24, 48, 72, 192 horas). Letras minúsculas representam a comparação entre as doses (GC (A), GB (B), GM (C) e GA (D)). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

Além disso, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos de exposição de IFN- γ (Figura 5).

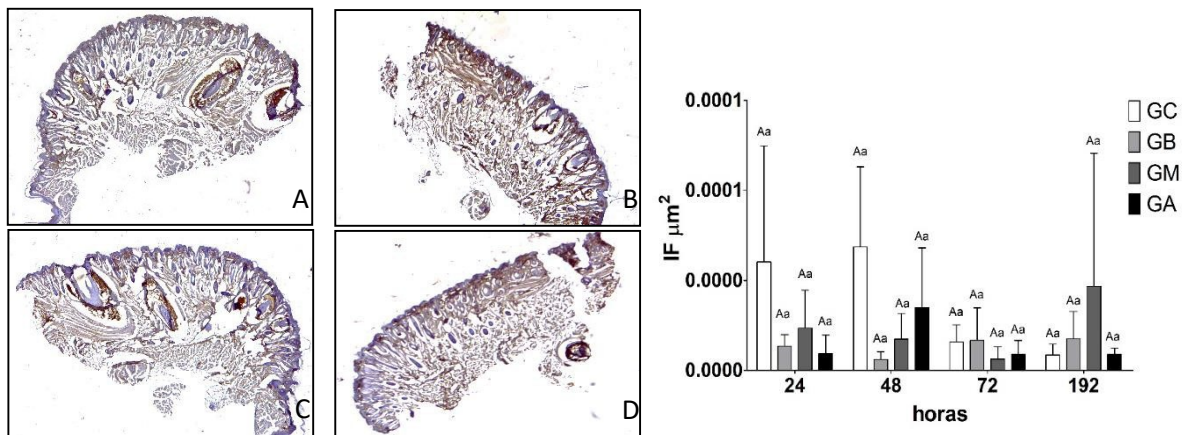


Fig. 5 Expressão de IFN- γ no epitélio nasal de camundongos expostos ao herbicida 2,4-D. Letras maiúsculas representam a comparação entre os tempos (24, 48, 72, 192 horas). Letras minúsculas representam a comparação entre as doses (GC (A), GB (B), GM (C) e GA (D)). Letras diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Pesquisas anteriores (Parizi et al., 2020, Melo et al., 2018) sobre a relação entre a exposição ao 2,4-D e a resposta celular inflamatória constataram, assim como nós, que o 2,4-D estimula a resposta inflamatória nas vias aéreas superiores do modelo animal e também observaram que ela está relacionada à dose do herbicida, e não ao tempo de exposição.

Entretanto, o atual estudo é inédito, pois nele investigamos a dinâmica da resposta inflamatória através da quantificação das citocinas inflamatórias IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6, após a exposição de camundongos Swiss machos adultos à nebulização com diferentes concentrações do herbicida 2,4-D.

Citocina é um termo genérico utilizado para denominar uma infinidade de glicoproteínas que são secretadas pelas células do sistema imune. Sua função precípua é regular a resposta imune por meio da sinalização e comunicação intercelular (Tizard, 2002), e podem estar envolvidas na gênese e progressão de tumores (Balkwill e Mantovani, 2001; Michaud et al., 2013), no processo de envelhecimento (Michaud et al., 2013) e em inúmeros outros estados patológicos.

O Fator de Necrose Tumoral - TNF - é uma citocina pró-inflamatória muito frequente em reações de fase aguda de infecções. Em nosso estudo, observamos que, nas primeiras 24 horas de exposição, houve uma redução na expressão desse marcador; e após 72 horas, os grupos baixa e média concentração sofreram um aumento significativo. Na literatura, estudos com Paraquat (Sharifi-Rigi et al., 2022; Zhang et al., 2021; Mitra et al., 2011) revelam maiores expressões de TNF em cérebro, pulmão e hipocampo após intoxicação por gavagem em doses elevadas. No entanto, esses dados divergem dos encontrados no estudo, já que os modelos experimentais foram submetidos à inalação do herbicida. Portanto, essa informação torna-se importante, uma vez que não existem dados na literatura sobre esse tipo de exposição inalatória com o herbicida 2,4-D.

A relação entre a expressão de citocinas inflamatórias e herbicidas foi estudada por Jacobsen-Pereira et al. (2020), com o objetivo de investigar se a exposição ocupacional a pesticidas afeta o perfil imunológico dos indivíduos, que acompanharam trabalhadores rurais expostos a múltiplos agrotóxicos por mais de uma década. Feito isso, os pesquisadores verificaram que houve um aumento de diversas citocinas no plasma dos agricultores, tais como IL-4 e IL-10, além de TNF e IFN- γ ; porém a única citocina a apresentar índices significativamente mais altos foi a IL-6.

A IL-6 está envolvida no processo inicial da inflamação, estimulando a produção e liberação de proteínas de fase aguda (Roit et al., 1999). Nossos dados mostraram um aumento substancial na expressão dessa citocina nas primeiras 24 horas de exposição nos animais expostos à baixa concentração, para então diminuir e aumentar novamente às 72 e 192 horas, sugerindo que um leve processo inflamatório possa ser suficiente para ensejar sua liberação.

Zhang et al. (2020) observaram que o herbicida Paraquat ocasionou um aumento na expressão de IL-1 β e IL-6 no modelo animal (camundongo) e em células A 549 humanas. Zhang et al. (2018), utilizando modelo animal (rato), também observaram resultado semelhante para as citocinas TNF- β e IL-8. Em cultura de neutrófilos, Wang et al. (2014) avaliaram os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 após exposição ao Paraquat, composto que estimulou intensamente a produção dessas citocinas. Em contraste, a Atrazina parece ter um efeito imunossupressor (Ge et al., 2021). Os níveis séricos de várias citocinas foram mensurados, e os pesquisadores observaram diminuição importante dos níveis das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- γ ; entretanto, os níveis séricos de IL-1 cresceram substancialmente.

A IL-1 é uma citocina envolvida na ativação de processos da fase aguda da inflamação, em especial na ativação de algumas células do sistema imune (Roit et al., 1999). Em nosso experimento, observamos redução da expressão dessa citocina nos tempos de 24 e 48 horas de exposição para então aumentar após 72 horas de exposição, mantendo um padrão semelhante em todos os grupos. Uma vez que a liberação dessa citocina indica a ocorrência da reação inflamatória (Roit et al., 1999), presume-se, baseado nos dados observados, que a partir de 72 horas houve maior dano tecidual, a ponto de desencadear o estado inflamatório local necessário para a liberação da IL-1.

Uma vez que os agrotóxicos, e por consequência o 2,4-D, podem gerar um estado de inflamação por meio da modificação do padrão de expressão de citocinas inflamatórias, pode-se pressupor a existência de correlação entre a exposição a pesticidas e a ocorrência de câncer e outras patologias relacionadas ao estado inflamado, tais como doenças relacionadas ao sistema imunológico (Mokarizadeh et al., 2015; Corsini et al., 2013).

A despeito dos inegáveis benefícios que os agrotóxicos proporcionaram para o desenvolvimento agrícola, sua utilização desmedida e em larga escala é motivo de preocupação, pois seus efeitos sobre o meio ambiente e a saúde humana ainda não são bem conhecidos, ensejando pesquisas continuadas sobre o tema.

CONCLUSÃO

Neste estudo, investigamos os efeitos do 2,4-D na mucosa nasal de camundongos por meio da quantificação dos níveis de expressão de algumas citocinas inflamatórias. Os resultados demonstraram que a exposição a esse herbicida, em diferentes doses, é capaz de alterar a imunologia das vias aéreas superiores, bem como corroboram a hipótese da potencial patogenicidade do 2,4-D, uma vez que um padrão de expressão de citocinas alterado pode gerar um ambiente propício ao surgimento de diversas patologias, em especial as ligadas ao câncer e à gênese de tumores, às doenças reumáticas e ao sistema imunológico. A pouca literatura disponível referente aos efeitos tóxicos do 2,4-D à saúde imunológica humana, e até mesmo em modelos animais, indica o pioneirismo do presente ensaio científico e aponta para a necessidade de contínuas pesquisas sobre o tema.

REFERÊNCIAS

2,4-D Nortox (2020). Bula do Produto. Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA sob nº 03009.Nortox S/A.

https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2020-10/24-d_nortox_130120.pdf.

Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357: 539–45.

Banks CN, Lein PJ (2012). A review of experimental evidence linking neurotoxic organophosphorus compounds and inflammation. *Neurotoxicology* 33(3):575–584. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.02.002>.

Bhat SV, Sultana T, Körnig A, McGrath S, Shahina Z, Dahms TE (2018) Correlative atomic force microscopy quantitative imaging-laser scanning confocal microscopy quantifies the impact of stressors on live cells in real-time. *Sci Rep* 8(1):8305. <https://www.nature.com/articles/s41598-018-26433-1>.

Heinrich Böll Stiftung (2022) Pesticide Atlas. Facts and figures about toxic chemicals in agriculture. 2.nd. ed. Heinrich Böll Stiftung, Berlin.

Corsini E, Sokooti, M, Galli CL, Moretto A, Colosio C (2013) Pesticide induced immunotoxicity in humans: a comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology* 307:123–135. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.10.009>

Dellamatrice PM, Monteiro RT (2014) Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. *Rev Bras de Eng Agricola e Ambient* 18(12):1296–1301. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v18n12p1296-1301>

Dhouib I, Jallouli M, Annabi A, Marzouki S, Gharbi N, Elfazaa S, Lasram MM (2016) From immunotoxicity to carcinogenicity: the effects of carbamate pesticides on the immune system. *Environ Sci Pollut Res Int* 23(10):9448–9458. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6418-6>

Ferro AB (2014) Imunohistoquímica. IPL: Lisboa. <https://repositorio.ipl.pt/bitstream/10400.21/4569/1/Imunohistoqu%C3Admica.pdf>

Fukuyama T, Tajima Y, Ueda H, Hayashi K, Shutoh Y, Harada T, Kosaka T (2009) Allergic reaction induced by dermal and/or respiratory exposure to low-dose phenoxyacetic acid, organophosphorus, and carbamate pesticides. *Toxicology* 261:152–161. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.05.014>

Ganguli A, Choudhury D, Chakrabarti G (2014) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid induced toxicity in lung cells by disruption of the tubulin-microtubule network. *Toxicol Res* 3(2):118–130. <https://doi.org/10.1039/c3tx50082a>

Ge J, Liu J, Wang T, Huang D, Li J, Zhang S, Wang M, Liu W, Zhao L (2021) Prolonged exposure to the herbicide atrazine suppresses immune cell functions by inducing spleen cell apoptosis in rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 220:112386. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112386>

- Harkema JR (1991) Comparative aspects of nasal airway anatomy: relevance to inhalation toxicology. *Toxicol Pathol* 19(4):321–336. <https://doi.org/10.1177/0192623391019004-102>
- IARC. International Agency for Research on Cancer (2018) DDT, lindane, and 2,4-D. v.113. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/mono113.pdf>
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (2016). Relatórios de comercialização de agrotóxicos. <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>
- INCA. Instituto Nacional de Câncer (2022) Agrotóxico. <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxico>
- Jacobsen-Pereira CH, Cardoso CC, Gehlen TC, Santos, CRD, Santos-Silva MC (2020) Immune response of Brazilian farmers exposed to multiple pesticides. *Ecotoxicol Environ Saf* 202:110912. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110912>
- Jones KA, Thomsen C (2021) The role of the innate immune system in psychiatric disorders. *Mol Cell Neurosci* 53:52–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2012.10.002>.
- Jurewicz J, Hanke W, Sobala W, Ligocka D (2012) Exposure to phenoxyacetic acid herbicides and predictors of exposure among spouses of farmers. *Ann Agric Environ Med* 19(1): 51-56.
- Loomis D, Guyton K, Grosse Y, El Ghissasi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Mattock H, Straif K (2015) Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Lancet Oncol* 16(8):891–892. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00081-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00081-9)
- Maillet I, Perche O, Pâris A, Richard O, Gombault A, Herzine A, Pichon J, Huaux F, Mortaud S, Ryffel B, Quesniaux VF, Montécot-Dubourg C. (2016) Glufosinate aerogenic exposure induces glutamate and IL-1 receptor dependent lung inflammation. *Clin Sci (Lond)*:1979, 130(21):1939–1954. <https://doi.org/10.1042/CS20160530>
- Mello FDA, Quinallia G, Marion AC, Jorge FC, Marinelli LM, Salge AKM, ... Rossi RC (2018) Avaliação da cavidade nasal de camundongos submetidos à exposição ao herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético. *Medicina (Ribeirão Preto)* 51(4): 247-253. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v51i4p247-253>
- Michaud M, Balardy L, Moulis G, Gaudin C, Peyrot C, Vellas B, Cesari M, Nourhashemi F (2013) Proinflammatory cytokines, Aging, and Age-Related Diseases. *J Am Med Dir Assoc* 14(12): 877–882. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamda.2013.05.009>

Mitra S, Chakrabarti N, Bhattacharyya A (2011) Differential regional expression patterns of α -synuclein, TNF- α , and IL-1 β ; and variable status of dopaminergic neurotoxicity in mouse brain after Paraquat treatment. *J Neuroinflammation* 2011;8:163. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-163>

Mokarizadeh A, Faryabi MR, Rezvanfar MA, Abdollahi M (2015). A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: mechanisms, evidence and consequences. *Toxicol Mech Methods* 25(4): 258–278. <https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1020182>

Morgan MK, Sheldon LS, Thomas KW, Egeghy PP, Croghan CW, Jones PA, Chuang JC, Wilson NK (2008) Adult and children's exposure to 2,4-D from multiple sources and pathways. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 18(5):486–494. <https://doi.org/10.1038/sj.jes.7500641>

Nishioka MG, Lewis RG, Brinkman MC, Burkholder HM, Hines CE, Menkedick JR (2001) Distribution of 2,4-D in air and on surfaces inside residences after lawn applications: comparing exposure estimates from various media for young children. *Environ Health Perspect* 109(11):1185–1191. <https://doi.org/10.1289/ehp.011091185>

Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Fome (FAO) (2022) O estado da segurança alimentar e da nutrição no mundo. Relatório 2021, FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/cc0639en>.

Parizi JLS, Odorizzi GASDM, Sato GMRH, Patrão IB, Nai GA (2020) Oral mucosa changes associated with chronic oral and inhalation exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in Wistar rats. *Toxicol Res (Camb)* 9(6):746–757. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa085>

Rede PENSSAN. (2022) Insegurança Alimentar e Covid-19 no Brasil. II Inquérito Nacional sobre Insegurança Alimentar no Contexto da Pandemia da COVID-19 no Brasil. Fundação Friedrich Ebert, São Paulo:

Roit I, Brostoff J, Male D (1999) *Imunologia*. Manole, São Paulo.

Saath KCDO, Fachinello AL (2018) Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. *Rev Econ Sociol Rural* 56:195–212. <http://dx.doi.org/10.1590/1234-56781806-94790560201>

Sharifi-Rigi A, Heidarian E, Amini SA (2018) Protective and anti-inflammatory effects of hydroalcoholic leaf extract of *Origanum vulgare* on oxidative stress, TNF- α gene expression and liver histological changes in paraquat-induced hepatotoxicity in rats. *Arch Physiol Biochem* 125(1):56-63. <https://doi.org/10.1080/13813455.2018.1437186>

Song W, Wan Y, Jiang Y, Liu Z, Wang Q (2021) Urinary concentrations of 2,4-D in repeated samples from 0-7 year old healthy children in central and south China. *Chemosphere* 267:129225. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129225>

Tanner CM, Ross GW, Jewell SA, Hauser RA, Jankovic J, Factor SA ... Langston JW (2009) Occupation and risk of parkinsonism: a multicenter case-control study. *Arch Neurol* 66(9):1106–1113. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.195>

Tizard IR (2002) *Imunologia veterinária: uma introdução*. Roca, São Paulo.

Thomaz T (2018) O uso do 2,4-D e seu papel na agricultura. *Rev Cultivar*.
<https://revistacultivar.com.br/noticias/o-uso-do-2-4-d-e-seu-papel-na-agricultura>.

Wang X, Luo F, Zhao H (2014) Paraquat-induced reactive oxygen species inhibit neutrophil apoptosis via a p38 MAPK/NF- κ B-IL-6/TNF- α positive-feedback circuit. *PLoS One* 9(4): e93837.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093837>

Zhang LC, Wang Y, Liu W, Zhang XM, Fan M, Zhao M (2018) Protective effects of SOD2 overexpression in human umbilical cord mesenchymal stem cells on lung injury induced by acute paraquat poisoning in rats. *Life Sci* 214:11–21. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.10.020>

Zhang Y, Yuan D, Li Y, Yang F, Hou L, Yu Y, Sun C, Duan G, Meng C, Yan H, Li D, Gao Y, Sun T, Zhu C (2021) Paraquat promotes acute lung injury in rats by regulating alveolar macrophage polarization through glycolysis. *Ecotoxicol Environ Saf*. 223:112571. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34352584/>

Zhang Z, Nian Q, Chen G, Cui S, Han Y, Zhang J (2020) Klotho Alleviates Lung Injury Caused by Paraquat via Suppressing ROS/P38 MAPK-Regulated Inflammatory Responses and Apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020:1854206. <https://doi.org/10.1155/2020/1854206>

ANEXO A - APROVAÇÃO ÉTICA

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PERC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DO EPITÉLIO NASAL DE CAMUNDONGOS APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA POR VIA INALATÓRIA AO HERBICIDA ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO 2,4-D", cadastrado na Coordenação de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 7106 e tendo como participante(s) GABRIELA VIDOTTO CAVALIERI (discente), JOSE RAFAEL ASSAD CAVALCANTE (discente), BRUNA VELLINI MOREIRA (discente), RENATA MARGARIDA ETCHEBERERE (participante externo/voluntária), GISELE ALBORGHETTI NAI (discente), RENATA CALCIOLARI ROSSI (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ACESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com as normas da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.089, de 15 de Julho de 2009, e com as normas adotadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 13/10/2021.

MATERIAL ARMAZENADO DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	Edição	Detalhes armazenamento
2583	26/08/2015	UNOESTE	NÃO	Sala dos professores de Patologia

Presidente Prudente, 18 de Fevereiro de 2022.



Prof. Dr. José Roberto Gomes Jr.
Orientador Responsável pelo CAPI



Prof. Dr. Sérgio Ruyjão de Rangel
Coordenador da CEUA - UNOESTE

ANEXO B – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO EM EVENTO



40º Congresso Brasileiro de
Pneumologia e Tisiologia
16º Congresso Brasileiro de
Endoscopia Respiratória
12 a 16 de outubro de 2022
Centro de Convenções Royal Palm
CAMPINAS / SP

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO EPITÉLIO NASAL DE CAMUNDONGOS APÓS EXPOSIÇÃO AGUDA POR VIA INALATÓRIA AO HERBICIDA ÁCIDO DICLOROFENOXIACÉTICO 2,4-D

de autoria de **ALINE DOBROWOLSKI KOVALSKI; BRUNA VELLINI MOREIRA; ALINE RAQUEL DE OLIVEIRA MORAES; ANTONIO RODRIGUES NETO; JOSÉ RAFAEL ASSAD CAVALCANTE; SANÍVIA APARECIDA DE LIMA PEREIRA; RENATA MARGARIDA ETCHEBERERE; ANA KARINA MARQUES SALGE MENDONÇA; DEBORA TAVARES DE RESENDE E SILVA; RENATA CALCIOLARI ROSSI**, foi apresentado na forma de PÔSTER durante o **40º Congresso Brasileiro de Pneumologia e Tisiologia e 16º Congresso Brasileiro de Endoscopia Respiratória**, realizado de 12 a 16 de outubro de 2022, na cidade de Campinas/SP, no Centro de Convenções de Royal Palm Hall.

Campinas/SP, 16 de outubro de 2022.

Para validar este certificado, acesse:
<https://congresso.sbpt.itarget.com.br/certificado/auth/validar> - Código de validação: QyG6zmpygz

Realização:




ANEXO C –NORMAS DA REVISTA ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH



[Environmental Science and Pollution Research](https://www.springer.com/journal/11356)

<https://www.springer.com/journal/11356/submission-guidelines>

Instructions for Authors

General Information

Note on preprint server:

Please add a note to the manuscript cover letter declaring whether you have submitted your manuscript to a preprint server. Please add one of the following sentences:

"I have submitted my manuscript to a preprint server before submitting it to *Environmental Science and Pollution Research*" or

"I have not submitted my manuscript to a preprint server before submitting it to *Environmental Science and Pollution Research*".

Types of Papers

Peer-reviewed contributions:

- Research Articles (full papers)
- Short Original Communications and Discussion Articles
- Review Articles
- Research Communications

Please ensure that the length of your paper is in harmony with your research area and with the science presented.

All papers – excluding Editorials, Letters to the Editor, Conference Reports – are subject to peer-review by a minimum of two and a maximum of three experts.

While submitting your paper you will be asked for three potential reviewers. Indicating three reviewers is mandatory.

- To authors from non-English language countries:
To have the best possible pre-requisition for the review process, please ask a native speaker to check the quality of the English, before you submit the complete paper.

Letters to the Editor

Please provide the following details within your manuscript:

- full title of the article you are commenting on
- corresponding author of the article you are commenting on
- DOI of the article that you are commenting on

The title of your letter should be structured as follows:

- Comments on "Title of the Article" by Corresponding Author's Last name, First name et al., DOI (e.g.: <https://doi.org/10.1007/s11356...>)

or

- Answer to "Comments on "Title of the Article" by Corresponding Author's Last name, First name et al., DOI (e.g.: <https://doi.org/10.1007/s11356...>)"

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink "Submit manuscript" and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Source Files

Please ensure you provide all relevant editable source files at every submission and revision. Failing to submit a complete set of editable source files will result in your article not being considered for review. For your manuscript text please always submit in common word processing formats such as .docx or LaTeX.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
 - Please avoid acronyms in the title of your article
 - For local studies, please indicate the name of the region and country in the title.
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author
-

Abstract

Please provide an abstract of about 10 to 15 lines.

Keywords

Please provide 6 to 8 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using [Springer Nature's LaTeX template](#).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Additional Information Text Formatting

All manuscripts should be formatted containing continuous line numbering. Use the page and line numbering function to number the pages.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).
-

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Please alphabetize according to the following rules: 1) For one author, by name of author, then chronologically; 2) For two authors, by name of author, then name of coauthor, then chronologically; 3) For more than two authors, by name of first author, then chronologically.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. "https://doi.org/abc").

- Journal article
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>
Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

- Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329
- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*.
<https://doi.org/10.1007/s001090000086>
 - Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
 - Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
 - Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb.
<http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
 - Dissertation
Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California
Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see [ISSN LTWA](#)
If you are unsure, please use the full journal title.

Specific Remarks

- Online documents: wikipedia documents are not acceptable as references.
- LanguageReferences should be in English with an appropriate title in English. If it's in a different language the language should be indicated Zhu J, Wu F-C, Deng Q-J, Shao S-X, Mo C-L, Pan X-L, Li W, Zhang R-Y (2009) Environmental characteristics of water near the Xikuangshan antimony mine. *Acta Scientiae Circumstantiae* 29:655-661 (in Chinese)

Statements & Declarations

The following statements must be included in your submitted manuscript under the heading 'Statements and Declarations'. This should be placed after the References section. Please note that submissions that do not include required statements will be returned as incomplete.

Funding

Please describe any sources of funding that have supported the work. The statement should include details of any grants received (please give the name of the funding agency and grant number).

Example statements:

"This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...]). Author A.B. has received research support from Company A."

"The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript."

Competing Interests

Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work.

Example statements:

"Financial interests: Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company N. Author D has received travel support from Company O. Non-financial interests: Author D has served on advisory boards for Company M and Company N."

"The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose."

Please refer to the "Competing Interests" section below for more information on how to complete these sections.

Author Contributions

Authors are encouraged to include a statement that specifies the contribution of every author to the research and preparation of the manuscript.

Example statement:

"All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

Please refer to the "Authorship Principles " section below for more information on how to complete this section.

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.