



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA-UNIPAMPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICA

**IMUNOTOXICIDADE ACIDENTAL DO ACARICIDA
FLUAZURON (POUR ON)**

URUGUAIANA/RS

2018

JULIANA GONÇALVES RIBEIRO

**IMUNOTOXICIDADE ACIDENTAL DO ACARICIDA
FLUAZURON (POUR ON)**

Dissertação de mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Pampa, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Michel Mansur Machado

URUGUAIANA/RS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**IMUNOTOXICIDADE ACIDENTAL DO ACARICIDA FLUAZURON (POUR
ON)**

elaborada por

Juliana Gonçalves Ribeiro

como requisito parcial para a obtenção do grau de

Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Michel Mansur Machado (UNIPAMPA)

Orientador/Presidente

Prof^a. Dr^a. Jaqueline Escobar da Costa Piccoli (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Rodrigo José Freddo (UNIPAMPA)

AGRADECIMENTOS

É bom dizer obrigada a tanta gente que, neste período, em que se recoberto de tantas incertezas, cansaço e alegrias, conseguiu-se manter presente. Por isso os agradecimentos:

A Deus, pela força e coragem que tem me dado durante toda a minha vida.

Agradeço ao meu orientador Doutor Michel Mansur Machado a liberdade, apoio e orientação nas escolhas que me levaram à apresentação desta dissertação.

Agradeço aos meus pais Angelo Ribeiro e Angela Cristina Ribeiro por terem possibilitado a realização deste sonho. Sem eles não teria tido o financiamento e apoio necessário para o percurso acadêmico realizado.

Agradeço também ao grupo TOXCEL, pelo companheirismo e bom ambiente proporcionado nos diversos momentos de cada dia. Pois sem a dedicação e ajuda de cada um, não teria finalizado esse trabalho com tanto êxito.

Por fim agradeço a todos os meus familiares e amigos pelo apoio.

RESUMO

O Fluazuron é um dos mais novos medicamentos veterinários anti-carrapatos. Pertencente ao grupo das benzoilfeniluréias, seu mecanismo de ação se dá pela interferência na formação da quitina do carrapato, responsável pelo endurecimento de seus exoesqueletos. Além de cuidar da saúde do animal, para que receba o medicamento nas doses e na forma correta, é importante analisar a segurança para o operador. A redução da resistência a doenças infecciosas foi uma consequência bem documentada de imunodeficiências primárias e adquiridas. A consciência das consequências da alteração da função imunológica é o resultado mais provável da exposição inadvertida. As implicações para a saúde humana de estudos nos quais a exposição química reduziu a resistência à infecção levaram o foco dos novos estudos para a imunossupressão na área da toxicologia. O objetivo principal é realizar a avaliação por meio de plataformas computacionais e em cultura celular, buscando dados que possam servir de base para um melhor entendimento dos efeitos tóxicos envolvidos com a contaminação acidental do Fluazuron e, assim, auxiliar a comunidade médica e usuários compreender os riscos inerentes ao seu uso. Resumindo, o Fluazuron pode causar genotoxicidade por provável rearranjo da cromatina e citotoxicidade pela imunodepleção causada pela redução específica da subpopulação de linfócitos T CD8, mediada pela diminuição da produção de interferon-gama. Embora o uso do Fluazuron seja uma necessidade para o controle de carrapatos e para o manejo do gado, devemos ter em mente que existem riscos iminentes para sua aplicação. O uso descuidado pode danificar o sistema imunológico, o que, por sua vez, acarreta um perigo gigantesco ao abrir uma porta para doenças e patógenos e nos deixar indefesos.

Palavras-chave: Fluazuron; Imunotoxicidade; In Silico; Veterinária; Linfócitos; CD8.

ABTRACT

Fluazuron is one of the newest veterinary anti-tick medicines. Belonging to the benzoylphenylureas group, its mechanism of action acts by the interference of the formation of the chitin of the tick, which is responsible for the hardening of its exoskeletons. In addition to taking care of the health of the animal so that it receives the medication in the doses and the correct form, it is important to analyze the safety of the operator. Reduced resistance to infectious disease was a well-documented consequence of primary and acquired immunodeficiencies, but a novel finding following xenobiotic exposure. The awareness of the consequences of altered immune function is the most likely outcome of inadvertent exposure. The human health implications of studies in which chemical exposure reduced resistance to infection drove an early focus on immunosuppression within the toxicology community. The main objective is to perform the evaluation by computational platforms and in cell culture, searching for data that can serve as a foundation for a better understanding of the toxic effects involved with the accidental contamination of Fluazuron and thus, to assist the medical community and users to understand the risks inherent in its use. Summarizing, Fluazuron can cause genotoxicity by probable chromatin rearrangement and cytotoxicity by immunodepleting by specific reduction of the CD8 T lymphocyte subpopulation, mediated by the decrease in gamma interferon production. Although the use of Fluazuron is a necessity for tick control and for cattle management, we must bear in mind that the imminent risks to its application exist. Careless use can damage the immune system which in turn carries a gigantic hazard by opening a door to diseases and pathogens and leaving us defenseless.

Keywords: Fluazuron; Immunotoxicity; In Silico; Veterinary; Lymphocytes; CD8.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Molécula do composto Fluazuron.....	16
Figura 2: Origem e Diferenciação das Células Hematopoiéticas.....	19
Manuscript - Figure 01: Fluazuron chemical structure	25
Manuscript - Figure 02: Assessment of cell proliferation for determining the LC ₅₀ of Fluazuron in PBMC Culture. Inset shows the non-linear regression curve	29
Manuscript - Figure 03: Evaluation of Genotoxicity (A) and Mutagenicity (B) in human PBMC culture, exposed to Fluazuron. Data are expressed as mean ± standard deviation, performed in triplicates. * Represents a significant difference in relation to the negative control (p <0.005) in the same contact time.	30
Manuscript - Figure 04: Evaluation of Cytotoxicity of Fluazuron in human PBMC culture. Graph A represents the effects on total leukocytes and on B the effects on viability. The C - F graphs show the effects of Fluazuron on lymphocyte subpopulations. Data are expressed as mean ± standard deviation, performed in triplicates. * Represents a significant difference in relation to the negative control (p <0.005) in the same contact time	32

LISTA DE TABELAS

Manuscript - Table 01: Computational analysis of probable toxicity mechanisms for Fluazuron using the PROTOX - II Platform 31

Manuscript - Table 02: Computational analysis of probable biological interactions for Fluazuron using the Way2Drug Platform Associated with Genecards Databank 32

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 <i>O carrapato: seu impacto financeiro e na saúde</i>	13
2.2 <i>Fluazuron</i>	15
2.3 <i>Estudos com o Fluazuron</i>	16
2.4 <i>Sistema Imune</i>	18
2.4.1 <i>Linfócitos</i>	19
2.4.2 <i>Macrófagos</i>	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 <i>Objetivo Geral</i>	21
3.2 <i>Objetivos Específicos</i>	21
4. MANUSCRITO	23
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXOS	45

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação divide-se em três partes principais.

Parte I: Encontram-se INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA e OBJETIVOS.

Parte II: Encontram-se os resultados que estão apresentados sob a forma de manuscrito, descritos no item MANUSCRITO. As seções materiais e métodos, resultados, discussão dos resultados e referências bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

Parte III: Encontram-se os itens DISCUSSÃO e CONCLUSÃO. As REFERÊNCIAS referem-se somente às citações que aparecem nos itens introdução, revisão bibliográfica, discussão e conclusão desta dissertação.

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

Brasil se destaca mundialmente na produção e comércio de carne bovina, por conta de um estruturado processo de desenvolvimento no qual elevou a produtividade, assim como, à qualidade do produto brasileiro (GOMES, FEIJÓ e CHIARI, 2017).

Por causa do aumento da produção animal, houve uma multiplicação dos casos de parasitismo, resultando em perdas consideráveis de animais e seus produtos. Como no Brasil o clima é tropical, isso, proporcionou condições ideais para a proliferação e existências de uma ampla gama de espécies parasitárias, sendo uma entre elas o carrapato (VILELA et al., 2016).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasita hematófago originário da Ásia, sendo principal hospedeiro o bovino. Presente nos grandes rebanhos bovinos da América, África, Ásia e Oceania, tornando-se um dos principais parasitas que afeta a pecuária destas áreas, por conta das condições favoráveis do clima (COELHO et al., 2015). No Brasil, o carrapato é encontrado em todo o país, sua frequência depende das condições climáticas da região e da raça de bovinos criados (COELHO et al., 2015).

Um dos principais métodos disponíveis para o controle do carrapato são os acaricidas químicos utilizados com diferentes modos de aplicações e formulações. Os carrapaticidas constituem a base de controle e de erradicação, pois oferecem uma supressão rápida e econômica das populações de carrapatos (GOMES, 2017).

Devido ao uso indiscriminado dos acaricidas contra o carrapato bovino, desenvolveu-se a resistência do parasita a esses produtos. Uma vez que a resistência esta estabelecida, os produtores aumentam consequentemente a dose dos acaricidas ou a frequência das aplicações (FARIAS et al., 2018).

Ainda, conforme Dantas et al., (2017) o uso intensivo desses produtos agroveterinários provoca exposição e ao mesmo tempo risco a saúde de trabalhadores rurais.

Os acaricidas disponíveis no mercado são divididos em diferentes grupos químicos, como por exemplo, os piretróides sintéticos, os fenilpirazóis, as lactonas macrocíclicas, os organofosforados e as benzoilfeniluréias (COELHO et al., 2015).

Hoje, um dos mais modernos acaricidas é o Fluazuron, tem como formulação o “pour-on” no qual significa aplicar o medicamento ao longo do dorso do animal (SANTOS et al, 2015). Pertencente ao grupo das benzoilfeniluréias, seu mecanismo de ação atua pela interferência da formação da quitina do carrapato, a qual é responsável pelo endurecimento de seus exoesqueletos. No momento em que a formação da quitina é interrompida, os carrapatos não conseguem mudar de fase e crescer normalmente, não conseguindo por exemplo, passar pelas fases de larva, ninfa e adulta, interrompendo o ciclo de vida (NETO et al., 2012).

Na sua forma comercial, o Fluazuron tem concentração de 25 mg para cada mL do produto, protegendo o animal por um período de 8 a 12 semanas. Após a aplicação do medicamento, em torno de 3 a 5% do Fluazuron administrado ao animal é metabolizado, sendo que a maior fração não é biotransformada, e posteriormente excretada na forma de fezes e urina sobre o solo (DA FONSECA PRIETSCH et al., 2014).

O risco para a saúde dos trabalhadores rurais da pecuária é a carência de orientação técnica e a pouca orientação que recebem de vendedores, assim aumentando a exposição dessas pessoas aos agentes químicos podendo acarretar danos à saúde (SILVA et al., 2012). A exposição excessiva aos agrotóxicos pode levar a diversos problemas de saúde, por exemplos, respiratórios, tais como: bronquite asmática e outras anomalias pulmonares; efeitos gastrointestinais e, para alguns compostos, como os organofosforados e organoclorados, distúrbios musculares, debilidade motora e fraqueza (ANDRADE E TERTO, 2017).

Além de cuidar da saúde do animal para que receba o medicamento nas doses e forma correta, é importante analisar a segurança do operador. Os carrapaticidas são venenos que atuam basicamente no sistema nervoso central (SNC), causando alergias, malformações de órgãos, processos tumorais e principalmente intoxicações (CATTO et al, 2010).

É essencial para a segurança dos indivíduos que manuseiam esse tipo de medicamento ter o conhecimento de seus efeitos sobre o organismo tanto do animal como do ser humano, desde sua farmacocinética e farmacodinâmica até os possíveis

aspectos toxicológicos, como citotoxicidade, genotoxicidade, imunotoxicidade, entre outros.

Atualmente, existem raros estudos na literatura sobre o Fluazuron e seus sintomas relacionados a intoxicação, principalmente em células do sistema imunológico e especialmente em baixas concentrações, como é usual em casos de intoxicações acidentais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O carrapato: seu impacto financeiro e na saúde

O Brasil ocupa uma posição de destaque no agronegócio mundial, sendo considerado um dos maiores produtores de carne bovina e derivados, tendo um aumento significativo ao passar dos anos na sua produção. Além disso, contém o terceiro maior rebanho, com aproximadamente 209,5 milhões de bovinos (CARNEIRO et al., 2015).

De acordo com o estudo efetuado em 2011 pela Organização para Cooperação de Desenvolvimento Econômico (OCDE) o Brasil exibe índices de desenvolvimento agrícola acima da média mundial. Além disso, possui posição relevante na pecuária bovina, pois é uma das principais atividades econômicas do país, movimentando cerca de 2% do Produto Interno Bruto (PIB) (NETO et al., 2014).

Ainda conforme Neto (2014) para continuar sendo um dos principais produtores de carne bovina, é preciso reforçar os programas sanitários que garantem a saúde dos rebanhos com vistas às conquistas de novos mercados, pois a melhoria da eficiência produtiva junto ao controle e erradicação das principais enfermidades que atingem o rebanho é indispensável para diminuir custos de produção.

No entanto, apesar dos avanços genéticos, sanitários e nutricionais, alguns índices de produtividade ainda preocupam, pois, no Brasil, as condições climáticas favoráveis, as doenças parasitárias são endêmicas, principalmente relacionadas ao carrapato (MARTINS, 2006). Esse parasita apresenta maior impacto negativo na economia brasileira, estando relacionado à veiculação de agentes das tristezas parasitárias (CARNEIRO et al., 2015).

Existe uma ampla variedade de espécies de carrapatos com relevante importância na sanidade animal, tendo em destaque o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sendo um parasita habitual em bovinos e animais silvestres na América do Sul, tendo principal característica associada à espoliação do animal, levando-o à perda de peso e baixa conversão alimentar (HEIDMANN, 2016).

Rhipicephalus (Boophilus) microplus é classificado como parasita, pois é preciso que obrigatoriamente, passe uma fase de sua vida sobre os animais. Dentre os sexos dos carrapatos, a fêmea é um grande problema, pois ingere uma grande quantidade de sangue enquanto estão sobre os animais. Tanto as fêmeas como os machos inoculam

substâncias pela saliva nos animais, provocando coceira e diminuição do apetite (FURLONG, 2005).

O ciclo desse carrapato pode ser dividido em fase não parasitária e parasitária, a primeira tem início com a fêmea ingurgitada (teleógina) que se desprende do bovino e cai no pasto. Logo, após quatro dias, começa a ovoposição. O tempo de duração para eclosão dos ovos é cerca de quinze dias, nesse tempo pode se verificar as larvas infestantes no capim, no qual, o seu tempo de sobrevivência no pasto é em torno de noventa dias. A fase parasitária inicia-se com a subida e fixação da larva no bovino, onde cresce e muda para ninfa e depois chega à fase adulta, em que acontece a cópula entre machos e fêmeas, no qual os machos permanecem no bovino até três meses e as fêmeas fecundadas, com cerca de vinte e um dias, se desprendem indo ao solo depositar seus ovos (VILELA et al., 2016).

Os prejuízos na agropecuária são muito maiores na fase parasitária, por ação direta ou indireta. A direta tem como, por exemplo, ingestão de sangue promovendo anemia, prurido, perda de peso, irritação da pele e entre outros. Na ação indireta se tem como exemplo a vetorização dos agentes etiológicos responsáveis pela Tristeza Parasitária Bovina, que é causada pelos protozoários *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e por bactérias do gênero *Anaplasma* (NETO et al., 2014). Além disso, o carrapato pode causar orifícios no couro facilitando a penetração de pequenas larvas de moscas, causadoras das miíases. Por conta de todos esses fatores, o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tem sido considerado o parasita bovino economicamente mais importante do país (FURLONG, 2005). A Tristeza Bovina pode causar febre, anemia e até levar os animais a óbito, além disso, ainda há os prejuízos decorrentes da aplicação de carrapaticidas e gastos com mão de obra (LEITE et al., 2011).

Atualmente uns dos principais modos de controlar os carrapatos nos bovinos são pela aplicação de carrapaticida, pois na maioria das propriedades, esse é o único método de controle dos carrapatos. No entanto, a troca de carrapaticida é frequente manuseado de forma incorreta, proporcionando assim, a resistência dos carrapatos aos carrapaticidas (FURLONG e SALES, 2007).

No mercado existem várias classes de carrapaticidas, podendo ser classificadas como de contato, no qual são aplicados por meio de pulverização e imersão, fazendo parte os grupos dos organofosforados, piretroides e amidinas. Ou sistêmicas onde são aplicados por meio de injeções ou “pour on” sendo esse último administrado o fármaco

ao longo do dorso do animal, no qual fazem parte os grupos das lactonas, macrocíclicas e benzoilfeniluréias. (CATTO et al., 2010).

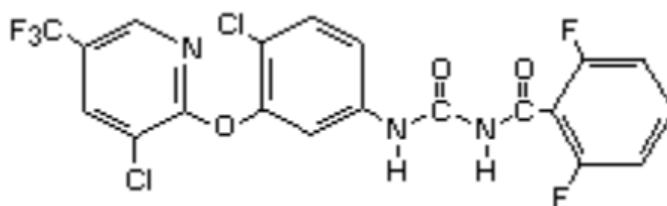
2.2 Fluazuron

Fluazuron é um fármaco pertencente à classe das benzoilfeniluréia, e foi o primeiro produto registrado como regulador de crescimento em ácaros para controle do carrapato bovino, sendo bastante seguro para espécie bovina, onde em quantidades extremamente baixas impede a formação do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, sendo altamente tóxicos para os mesmos. Esse medicamento é conhecido como inibidor do crescimento, pois tem a capacidade de intervir na produção de uma substância essencial para o ciclo do parasita, na qual é denominada quitina. A quitina é responsável pelo endurecimento dos exoesqueletos do parasita, uma vez essa substância inibida, o carrapato não consegue mudar de fase. (MENDONÇA, 2010).

Até o momento atual não há relatos sobre haver resistência contra este composto, seu modo de uso pode ser dado por meio de injeções ou sobre o lombo do animal (pour on), em ambas as formas o princípio ativo é absorvido pelo animal e distribuído pela corrente sanguínea do bovino (NETO et al., 2014).

Esse produto é inteiramente diferente de todos os outros carrapaticidas, pois tem como mecanismo de ação o interrompimento do desenvolvimento da vida do carrapato interferindo na formação da quitina, que é uma substância que delimita o corpo dos artrópodes, além de interromper o desenvolvimento das larvas e ninfas. Outro motivo por ser único no mercado, é que esse fármaco compromete a permeabilidade dos ductos salivares, acarretando no desequilíbrio de hemolinfa nos carrapatos. O efeito final do Fluazuron (**Figura 01**) é dado sobre os ovos, pois ao atingir as fêmeas, elas irão fazer a ovoposição com características poucos viáveis, além de que, as formas imaturas do parasita serão impedidas de passar para os próximos estágios de vida (MENDONÇA, 2010).

Figura 1- Molécula do composto Fluazuron



Fonte: NETO et al, 2014

O Fluazuron tem como nome químico 3-[3-(3-cloro-5-trifluorometil-2-piridiniloxy)-4-clorofenil]-1- (2,6-difluorobenzoil)-ureia, possuindo um tempo de meia vida dependendo do valor de pH, variando de 14 dias no pH 3 a 30 minutos no pH 9. Em estudos realizados com ratos, o Fluazuron demonstrou baixa toxicidade, apresentando DL 50 acima de 2.000 mg kg/1, já em exposição dérmica em ratos, a DL50 foi maior que 4.000 mg kg/1 (NETO et al., 2014).

Na sua forma comercial, o Fluazuron é vendido a 2,5 %, em concentração de 25mg/mL do produto comercial, protegendo o animal por um período de 8 a 12 semanas. Após a aplicação do medicamento no animal, parte do Fluazuron é metabolizado e a outra parte, que não é transformada, será posteriormente excretada na forma de fezes e urina sobre o solo (PRIETSCH et al., 2014).

2.3 Estudos com o Fluazuron

Atualmente existem poucos relatos na literatura de estudos realizados sobre a toxicidade do Fluazuron em humanos, no entanto, há estudos avaliando sua eficácia como carrapaticida. O estudo Rynal e colaboradores (2013) tiveram como objetivo avaliar a eficiência de diversos acaricidas sendo um deles o Fluazuron, sobre as populações do parasita *R. (B.) microplus* provenientes de propriedades rurais da Região Centro Norte do Estado da Bahia, Brasil, onde se obteve como resultado a comprovada eficiência do Fluazuron com 100%. Outro estudo realizado foi de Vieira (2009) onde

avaliou a eficácia do regulador de crescimento do Fluazuron no controle de pulga *Ctenocephalides felis felis*, onde utilizou dois grupos de cães da raça Beagle para realizar o estudo. Como resultado obteve-se que o Fluazuron possui eficácia sobre o desenvolvimento de ovo a larva e de ovo a adulto de *C. felis felis*.

Mais um estudo com o carrapaticida Fluazuron foi realizado por Souza e colaboradores, (2009), onde teve como objetivo avaliar a eficácia de uma formulação transdérmica, desenvolvida pelo laboratório Clarion Biociências Ltda. com o medicamento Novaluron frente ao carrapato *Boophilus microplus* em animais naturalmente infestados. Nos resultados foi realizado a eficácia da formulação de Novaluron 5% na posologia de 2,5mg/kg sendo comparado ao Fluazuron, na concentração de 2,5% na posologia de 2,5mg/kg em doses comparadas ao grupo controle. Essa pesquisa teve como resultado, a eficácia do Fluazuron frente ao outro medicamento testado.

Uma formulação medicamentosa inédita contendo Fluazuron 3,0% + Abamectina 0,5% foi realizada pelo autor Mendonça (2010), sendo administrada via tópica “pour on”, no qual foi avaliada em sete experimentos com observação da segurança clínica e farmacocinética de resíduos destes compostos em bovinos medicados. Como resultado, obteve-se que a nova formulação foi 100% eficaz contra parasitas bovinos, sendo assim, um promissor carrapaticida para bovinos.

O estudo Calligaris e colaboradores (2013) teve como objetivo avaliar a eficácia do Fluazuron e seus efeitos sobre as ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* alimentadas em coelhos expostos a diferentes doses desse acaricida. Foi testado três diferentes doses do Fluazuron, sendo 20/40/80 mg / kg sendo administrada no hospedeiro na forma de “pour on” porém no grupo controle foi aplicado água destilada. Essa pesquisa teve como resultado a confirmação da eficácia do Fluazuron, sendo um químico não agressivo ao meio ambiente.

Alguns estudos disponíveis na bibliografia também mostram a ineficácia da atividade do Fluazuron frente alguns tipos de parasitas, como mostra o estudo de Souza, Ramadinha e Scott (2014), no qual teve como objetivo avaliar a eficácia do Fluazuron e da Ivermectina “pour on” em diferentes protocolos terapêuticos no tratamento da demodicose, através da quantificação de ácaros por raspados cutâneos e exames histológicos, além da avaliação dos cães. Foi avaliado em torno de 18 cães, divididos em três grupos. Essa pesquisa teve como resultado que o Fluazuron 2,5% “pour on” e a

ivermectina 0,5% “pour on” associados ou como terapia única, não foram eficazes no tratamento da demodicose canina.

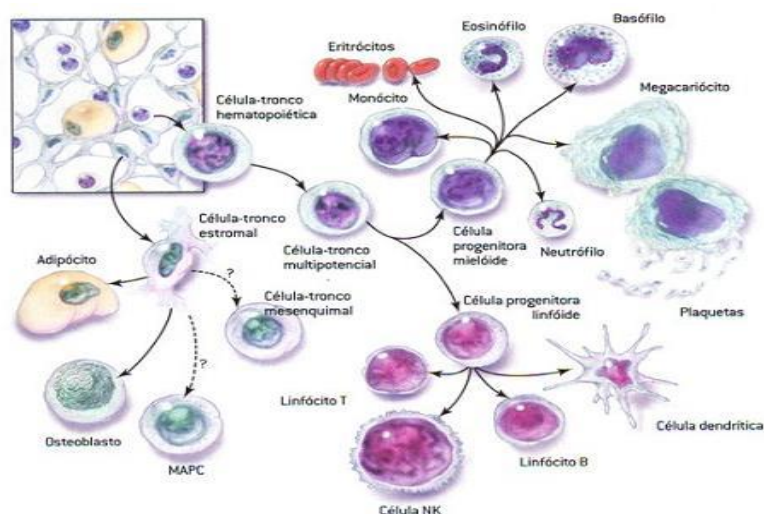
2.4 Sistema Imune

O sistema imune é muito importante para a compreensão e o funcionamento dos processos fisiológicos, ele permite ao organismo reconhecer-se e assim faz com que promova respostas apenas ao que é estranho (CALICH; VAZ, 2009). Assim, quando o corpo humano é exposto a determinados agentes estranhos como bactérias, parasitas, fungos e vírus, o sistema imunológico desencadeia uma série de eventos com o propósito de eliminar esses agentes, caracterizando dessa forma uma resposta imune (VAZ; TAKEI; BUENO, 2010) e diferentemente de outros sistemas, as células que o compõe são móveis o que facilita a identificação de qualquer molécula, microrganismos estranhos e alterações em células próprias (BALESTIERI, 2006).

Os eventos provocados pelo sistema imune pode ser denominado de resposta imunológica, na qual se divide em resposta inata ou resposta adaptativa. A resposta inata possui barreiras físicas, químicas e a participação de outras células (macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células natural killer). A resposta adaptativa envolve principalmente linfócitos T, B e os seus produtos, citocinas e anticorpos, respectivamente. Pode ser dividido em uma resposta imune humoral (mediada por anticorpos) e uma resposta imune celular (mediada por células, como linfócitos T e macrófagos) (TERRA et al., 2012).

As células do sistema imune são originadas pelas células hematopoiéticas (**Figura 02**) que são as responsáveis por atribuírem a ele suas principais características, especificidade e memória. Assim as células que fazem parte desse sistema são: os linfócitos T, linfócitos B e células natural killer (NK), as células apresentadoras de antígeno (macrófago, células dendríticas, células de Langerhans e os próprios linfócitos B), e os órgãos que o compõe são classificados como órgãos linfoides primários (timo e a medula óssea) os quais são responsáveis pela geração de linfócitos e os órgãos linfoides secundários (baço, linfonodos, tecido linfóide associado às mucosas do aparelho respiratório) (LEANDRO et al., 2002; CALICH; VAZ, 2009).

Figura 2: Origem e Diferenciação das Células Hematopoiéticas.



Fonte: Disponível em < <http://www.medicinageriatrica.com.br/2008/02/09/aplasia-da-medula-ossea/>>. Acessado em 16 de novembro de 2017.

2.4.1 Linfócitos

Existem dois tipos de linfócitos, o T e o B, ambos são produzidos na medula óssea e os responsáveis pelo reconhecimento específico de antígenos por meio de proteínas presentes em suas superfícies. (VAZ; TAKEI; BUENO, 2010).

Os linfócitos B são inicialmente produzidos no saco vitelino, na vida fetal a produção passa a ser no fígado e por último na medula óssea, onde serão diferenciados como efetores, células produtoras de anticorpos ou de memória (BALESTIERI, 2006; KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008; VAZ; TAKEI; BUENO, 2010,).

A ativação de linfócitos B é caracterizada como uma resposta humoral, mediada por imunoglobulinas com função de anticorpo os quais podem neutralizar ou destruir os antígenos contra os quais foram gerados (VAZ; TAKEI; BUENO, 2010), de modo que a porção humoral do sistema imune age na interação das células B com o antígeno e consequentemente na proliferação e diferenciação nas células plasmáticas secretoras de anticorpos (glicoproteínas), onde em suas extremidades aminoterminais é formado o sítio de ligação do antígeno (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE. 2008).

Os linfócitos T passam da medula óssea para o timo, se diferenciam em linfócitos T e podem ser divididos em linfócitos T auxiliares (ativa outras células para

exercerem suas funções) ou linfócitos T citotóxicos (possuem a função de eliminar células tumorais e/ou infectadas, porém dependem dos linfócitos T auxiliares) (BALESTIERI, 2006).

As células T auxiliares são a chave da resposta imune e a ativação de outras células depende de sua prévia ativação. Porém, são capazes de reconhecer moléculas próprias associadas com estranhas e possuem mecanismos de proteção para que não ocorra a estimulação dessas células de forma exagerada, o que ao contrário iria gerar uma doença auto-imune (BALESTIERI, 2006).

2.4.2. *Macrófagos*

Os monócitos quando migram do sangue periférico para os diferentes tecidos, se diferenciam em macrófagos (BALESTIERI, 2006). Estes, apresentam algumas características como a capacidade de aderência, quimiotaxia, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e citotoxicidade (SCHULENBURG et al., 2004).

Os macrófagos estão envolvidos em processos de resposta ao stress celular na fase aguda (MEYER & DA SILVA, 1999), quando esses são ativados ocorre produção de TNF- α , a qual liga-se a seus receptores, e conseqüentemente estimula a transcrição e a produção da enzima I κ B quinase, a qual irá produzir o fator nuclear κ B (NF- κ B), que é considerado o centro da resposta e funções imune (VITALE; RIBEIRO, 2007; HAYDEN; GHOSH, 2011).

Levando em consideração que o trabalhador rural envolvido com a produção pecuária encontra-se exposto aos riscos acidentais de contato com produtos químicos acaricidas, assim como o fluazuron na forma “pour-on”, é que devemos estar conscientes das conseqüências e danos causados ao organismo humano pelo sintético em questão quando em contato com o homem, relevando-se desta forma a importância do sistema imune como primeira barreira de defesa contra intoxicações e o uso dos equipamentos de proteção individual assim como macacões, luvas, óculos e máscaras respiratórias garantindo ou pelo menos otimizando a segurança do operador, assim como cita CATTO et al., 2010.

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo Geral*

- Avaliar os efeitos do medicamento Fluazuron sobre parâmetros imunotoxicológicos.

3.2 *Objetivos Específicos*

- Determinar os efeitos do medicamento Fluazuron sobre parâmetros genotoxicológicos em culturas de células periféricas sanguíneas humanas;
- Determinar os efeitos do medicamento Fluazuron sobre parâmetros mutagênicos em culturas células de periféricas sanguíneas humanas;
- Determinar os efeitos do medicamento Fluazuron sobre parâmetros citotóxicos (viabilidade e proliferação celular) em culturas de células periféricas sanguíneas humanas e subpopulações linfocitárias.

PARTE II

4. MANUSCRITO

Submission Confirmation to Toxicology and Applied Pharmacology |

TAAP

para michelmachado, eu ▾

🌐 inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem

*** Automated email sent by the system ***

Article Type: Research Paper

Dear Dr. Machado,

Your submission entitled "VETERINARY DRUG FLUAZURON CAUSE IMMUNOTOXICITY VIA SELECTIVE DEPLETION OF LYMPHOCYTES T CD8." has been received for consideration in Toxicology and Applied Pharmacology.

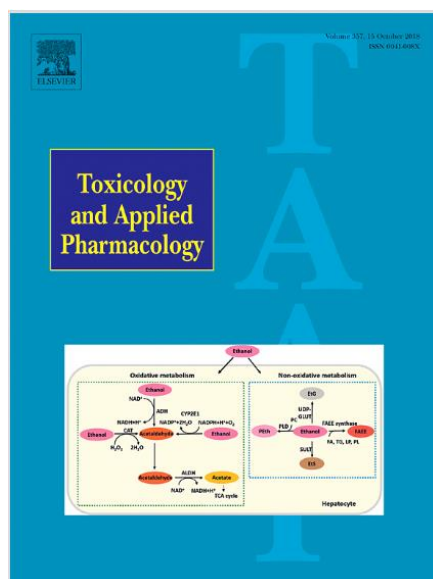
Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your work to Toxicology and Applied Pharmacology.

Kind regards,

Toxicology and Applied Pharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.



**VETERINARY DRUG FLUAZURON CAUSE IMMUNOTOXICITY VIA
SELECTIVE DEPLETION OF LYMPHOCYTES T CD8.**

Juliana Gonçalves Ribeiro^{1,2}, Anelise Santos Soares², Pamella Eduardha Espindola
Chaves², Jéssica Tamara Limberger², Emanoeli da Rosa^{1,2}, Luísa Zuravski², Luís Flávio
Souza de Oliveira^{1,2}, Michel Mansur Machado^{1,2}

¹ Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil, BR 472, Km 585, Mail box 118, Uruguaiiana, RS, CEP: 97500-970, Brazil.

² TOXCEL – Cellular Toxicology Research Group, Federal University of Pampa, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil, BR 472, Km 585, Mail box 118, Uruguaiiana, RS, CEP: 97500-970, Brazil.

*Correspondences must be addressed to Prof. Dr. Michel Mansur Machado, Federal University of Pampa – Campus Uruguaiiana. BR 472, Km 585, Mail box 118, Uruguaiiana, RS, Brazil, CEP: 97.500-970. Tel.: +55 55 3911.02.00 – Line: 4837.

*e-mail address: michelmachado@unipampa.edu.br

ABSTRACT

Fluazuron is one of the newest veterinary anti-tick medicines. Belonging to the benzoylphenylureas group, its mechanism of action acts by the interference of the formation of the chitin of the tick, which is responsible for the hardening of its exoskeletons. In addition to taking care of the health of the animal so that it receives the medication in the doses and the correct form, it is important to analyze the safety of the operator. Reduced resistance to infectious disease was a well-documented consequence of primary and acquired immunodeficiencies, but a novel finding following xenobiotic exposure. The awareness of the consequences of altered immune function is the most likely outcome of inadvertent exposure. The human health implications of studies in which chemical exposure reduced resistance to infection drove an early focus on immunosuppression within the toxicology community. The main objective is to perform the evaluation by computational platforms and in cell culture, searching for data that can serve as a foundation for a better understanding of the toxic effects involved with the accidental contamination of Fluazuron and thus, to assist the medical community and users to understand the risks inherent in its use. Summarizing, Fluazuron can cause genotoxicity by probable chromatin rearrangement and immunodepleting by specific reduction of the CD8 T lymphocyte subpopulation, mediated by the decrease in gamma interferon production. Although the use of Fluazuron is a necessity for tick control and for cattle management, we must bear in mind that the imminent risks to its application exist. Careless use can damage the immune system which in turn carries a gigantic hazard by opening a door to diseases and pathogens and leaving us defenseless.

Keywords: Fluazuron; Immunotoxicity; In Silico; Veterinary; Lymphocytes; CD8.

INTRODUCTION

In recent years there have been several changes in beef cattle, with modern production applications, which allowed the sector to increase volume and productivity (1). Due to the increase in animal production, there was a multiplication of the cases of parasitism, developing a wide range of parasitic species, one among them being the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (2).

One of the main control methods for the tick is the use of acaricides, the main ones being applied under immersion, spray, pour-on and injectable formulations, the latter two being classified as systemic action (3).

In the market there are several active principles and formulations. Fluazuron (N-[[4-chloro-3-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]oxyphenyl]carbamoyl]-2,6-difluorobenzamide) (**Figure 01**) is one of the newest veterinary anti-tick medicines, which has the "pour-on" formula in which it means to apply the drug along the animal's back (4). Belonging to the benzoylphenylureas group, its mechanism of action acts by the interference of the formation of the chitin of the tick, which is responsible for the hardening of its exoskeletons (5). After administration of Fluazuron, absorption occurs slowly, and elimination can be observed for 3-4 weeks after treatment. Fluazuron was not extensively metabolized as unchanged fluazuron accounted for more than 90% of the total (6).

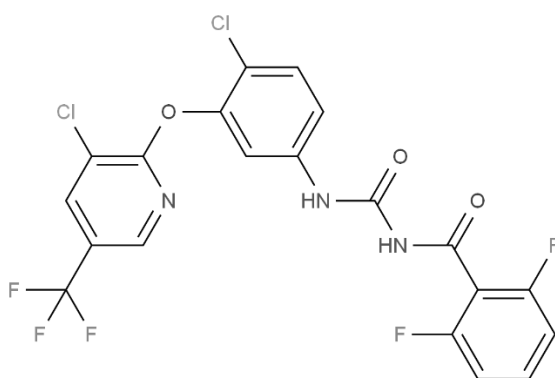


Figure 01: Fluazuron chemical structure (7).

In addition to taking care of the health of the animal so that it receives the medication in the doses and the correct form, it is important to analyze the safety of the operator. Carrapaticides are poisons that act primarily on the central nervous system (CNS),

causing allergies, malformations of organs, tumor processes and mainly intoxications. Typically, individuals who have contact with these products are the same on the property, and as they often do the handling, tend to decrease care with these toxic substances (8).

Reduced resistance to infectious disease was a well-documented consequence of primary and acquired immunodeficiencies, but a novel finding following xenobiotic exposure. The awareness of the consequences of altered immune function is the most likely outcome of inadvertent exposure. The human health implications of studies in which chemical exposure reduced resistance to infection drove an early focus on immunosuppression within the toxicology community (9).

Currently there are few studies on their toxicity to humans are available, mainly in relation to low concentrations and risks of genetic toxicity. Because of this, an alternative means of performing the first steps of a research would be the *in silico* and *in vitro* models.

In silico computational models are developed using several programs that allow the prediction of the risk and danger of various chemical substances according to their molecular structure. There is now a wide range of free software available to predict chemical properties, toxicological parameters and other effects (10). many years, *in vitro* models have been used for several tests during the research. They are effective in replacing tests on animals that are limited in time and ethical aspects, in addition to the financial burden (11).

In our study, the main objective is to perform the evaluation by computational platforms and in cell culture, searching for data that can serve as a foundation for a better understanding of the toxic effects involved with the accidental contamination of Fluazuron and thus, to assist the medical community and users to understand the risks inherent in its use.

MATERIAL AND METHODS

Chemical: All chemicals were of analytical grade and acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) Cultures: The PBMC cultures were prepared using 10 mL of venous blood taken from the medial cubital vein of a 23-year-old healthy male volunteer donor who had not consumed alcohol, smoked, or taken any medication that could interfere with the scientific results in the last 72h. Blood was collected into a heparin-containing Vacutainer® (approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Pampa, n°. 27045614.0.0000.5323). PBMC were isolated with Histopaque-1077® (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) and transferred to the culture medium containing 9 mL of RPMI 1640 supplemented with 20% fetal bovine serum and 1% streptomycin / penicillin, as described in previous work (13, 14). The cells were conditioned in culture flasks and placed in a microenvironment at 37°C in 5% CO₂ environment for up to 48 hours.

Selection of concentrations for tests of Fluazuron: Due to a lack of studies on the compound, doses were chosen to allow a broad-spectrum evaluation, which enabled the determination of a median lethal concentration (LC₅₀) (12). Therefore, concentrations of 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0.1 µg/mL, and 0.01 µg/mL were initially tested in cultures of PMBC, and after analysis of cell proliferation, the LC₅₀ was determined. The LC₅₀ was determined by the statistical method of non-linear. Brazil follows the security assessment protocols proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). The tests performed here were selected and followed the indications of these protocols for their experimental design when applicable or the indications when suggested. The selected concentrations were based on these OECD indications and relate to decimal fractions of the LC₅₀ found.

Treatment of the cultures: All cultures received Fluazuron diluted in RPMI 1640 in the final volume of 1000µL. The groups tested were: Negative Control (NC) with phosphate buffer pH 7.4, Positive Control (PC) with Colchicine 10 µM and three concentrations of the acaricide Fluazuron. These concentrations were chosen, as mentioned, based on the LC₅₀, as indicated by the OECD. All tests were performed in triplicate. All analyzes were performed at time zero, 24 hours and 48 hours after exposure to Fluazuron.

Effects of Fluazuron on the cell viability: The analyzed parameter for evaluation of cytotoxicity was cell viability through the loss of membrane integrity using the trypan blue method (13). This requires put the sample in contact with the Trypan blue, which stains dead cells. The analysis was performed using an optical microscope at 400x. One hundred cells were counted.

Genotoxicity Assessment (Alkaline Comet Assay): This test was performed using the technique described by Singh (14) and Rice-Evans (15). DNA damage was classified according to the damage index evaluated from the migration of the DNA proteins, which can vary from 0 - where there is no damage, until 4 - where there is maximum damage. DNA damage was determined as DNA damage index (ID). DNA damage was calculated from cells with different damage classifications; the damage index ranges from 0 (100 cells x 0 when no damage occurred) to 400 (100 cells x 4, when maximum damage occurred).

Mutagenicity Assessment (Micronucleus Test): The micronucleus test was the parameter used to evaluate mutagenicity. For this, the method described was performed according to described by Schmid (16) and Fenech (17).

Determination of Lymphocyte Subpopulations: Characterization of lymphocyte subpopulations was performed by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. The detection of the immune cell fractions was determined using anti-CD45, anti-CD3, anti-CD8 and anti-CD4 antibodies. 15,000 lymphocytes were counted per sample per replicate.

In Silico Analyses: In a complementary way and to search for possible methods of action in humans, the compound Fluazuron was submitted to a series of computational tests (*In Silico*) through the platforms: ProTox (18), Way2Drug (19) and GeneCards (20). The addresses of these platforms are in the references.

Statistical analysis: All analyzes were performed in specific statistical software. Normality distribution analysis was performed by the Komolgorov-Smirnov test. With the

verification that the distribution followed a Gaussian standard, data were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey *Post-Hoc* test. Results are expressed as means $\pm$ S.D. A p value <0.05 were considered significant. Negative controls and positive presented, in all tests, a statistical difference with $p < 0.0001$).

RESULTS AND DISCUSSION:

As we mentioned, the first protocol was aimed at determining the best concentrations to perform the experiment. To do so, we tested a wide curve of Fluazuron concentrations, and the parameter used as standard was cell proliferation, following OECD protocols. The results obtained are shown in **Figure 02**.

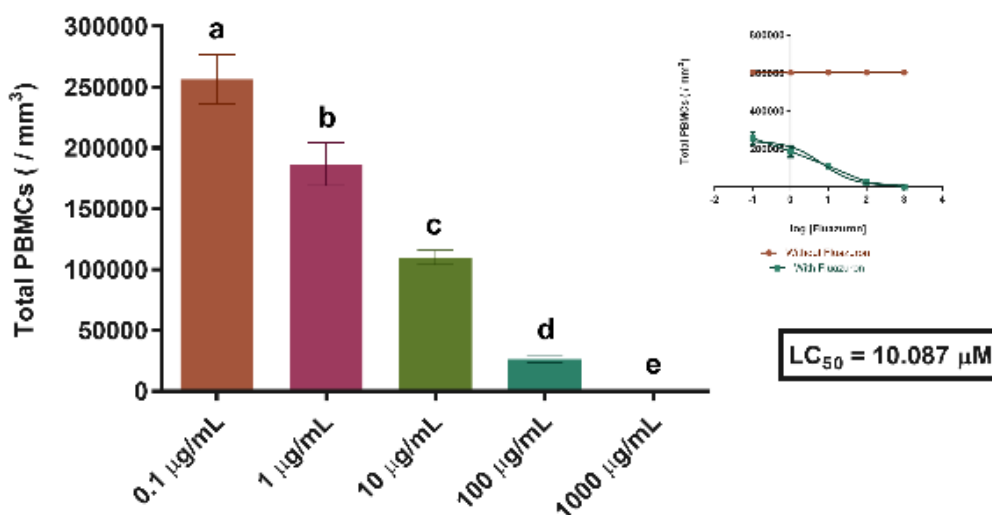


Figure 02: Assessment of cell proliferation for determining the LC_{50} of Fluazuron in PBMC Culture. Inset shows the non-linear regression curve.

Once the cytotoxicity curve was reached in PBMC, we found that the lethal concentration was close to 10.087 μ M. From this value, the test concentrations for the other protocols were determined as 10, 1 and 0.1 μ M.

The other protocols of this experiment were evaluated at three times: initial, 24 and 48 hours after exposure to Fluazuron concentrations. The results are shown in figures 03 and 04.

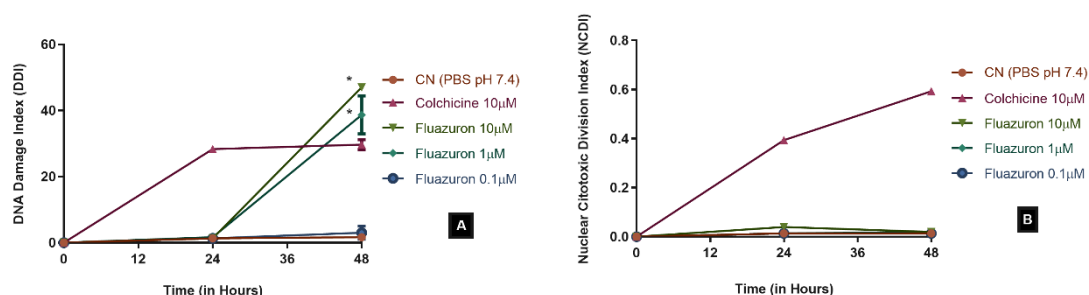


Figure 03: Evaluation of Genotoxicity (A) and Mutagenicity (B) in human PBMC culture, exposed to Fluazuron. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, performed in triplicates. * Represents a significant difference in relation to the negative control ($p < 0.05$) in the same contact time.

As we can see, no concentration tested showed mutagenic effects in the experiment period ($p < 0.05$). The same cannot be said about genotoxic effects. It can be observed in Figure 03A that concentrations of 10 and 1 μ M cause lesions higher than those caused by the positive control itself in 48 hours of exposure. Although there are no studies that relate the direct effects of Fluazuron on DNA, we can associate these damages with those proposed by the *In Silico* PROTOX platform, which are shown in Table 01.

Table 01: Computational analysis of probable toxicity mechanisms for Fluazuron using the PROTOX - II Platform (18).

Target	Prediction	Probability
Hepatotoxicity	Active	0.72
Carcinogenicity	Active	0.56
Immunotoxicity	Active	0.55
Mutagenicity	Inactive	0.93
Cytotoxicity	Active	0.51
Aryl hydrocarbon Receptor (AhR)	Inactive	0.90
Androgen Receptor (AR)	Inactive	1.0
Androgen Receptor Ligand Binding Domain (AR-LBD)	Inactive	0.99
Aromatase	Inactive	0.97
Estrogen Receptor Alpha (ER)	Inactive	0.98
Estrogen Receptor Ligand Binding Domain (ER-LBD)	Inactive	1.0
Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma	Inactive	0.78
Heat shock factor response element (HSE)	Inactive	0.97
Mitochondrial Membrane Potential (MMP)	Active	1.0
Phosphoprotein (Tumor Suppressor) p53	Active	1.0
ATPase family AAA domain-containing protein 5	Inactive	0.99

As we see, the results of Table 01 agree with those found in the experiment, both for mutagenesis and for genotoxicity (carcinogenesis). Protox uses the system of comparison of molecular fractions to analyze its results. This comparison is made with a database of more than 4000 studies of molecules, thus being a very robust and reliable method (21).

Also, chemically Fluazuron is characterized as a 2,6-difluorobenzamide. This molecule has been previously studied and its deleterious effects on DNA are already known. Its action occurs by causing the production of pyknotic nuclei by the disorganized rearrangement of the nuclear chromatin (22) .

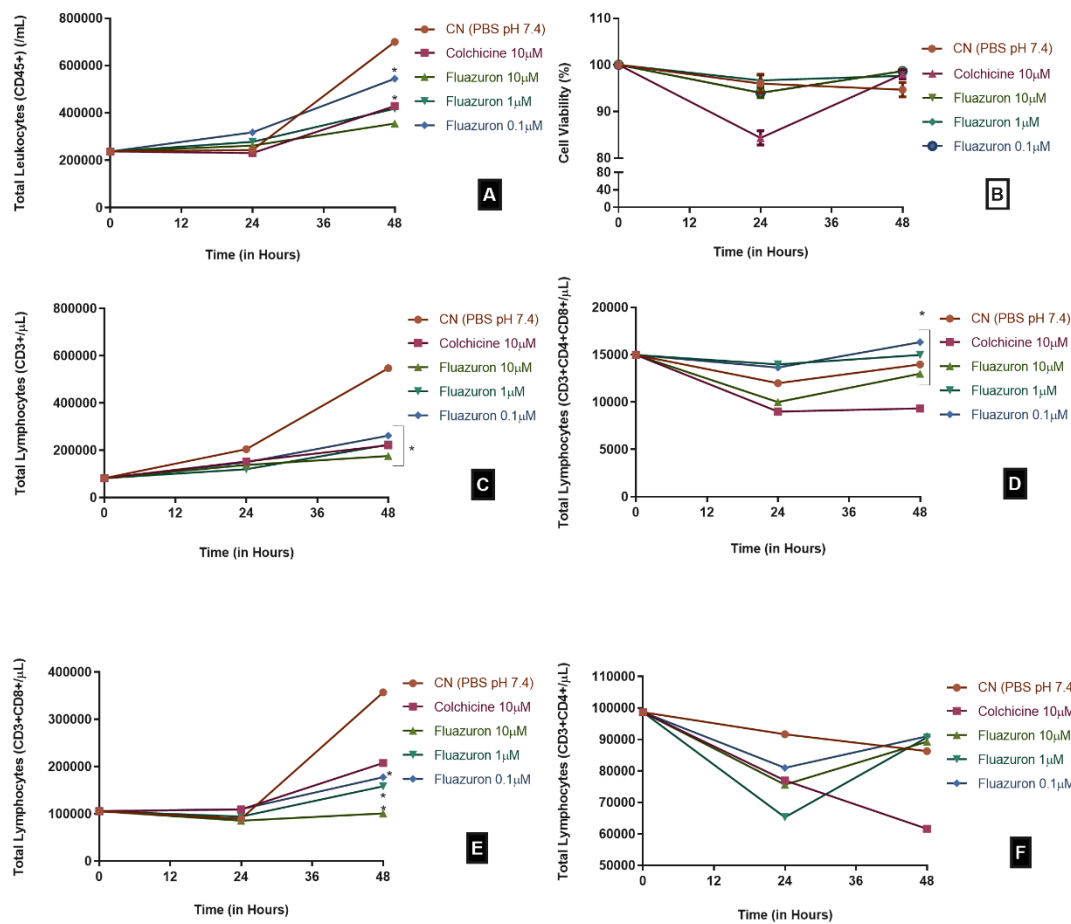


Figure 04: Evaluation of Cytotoxicity of Fluazuron in human PBMC culture. Graph A represents the effects on total leukocytes and on B the effects on viability. The C - F graphs show the effects of Fluazuron on lymphocyte subpopulations. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation, performed in triplicates. * Represents a significant difference in relation to the negative control ($p < 0.05$) in the same contact time.

When analyzing the results of cytotoxicity, we observed that all concentrations caused a decrease in the total growth of leukocytes and lymphocytes (Fig 4A and 4C), but without reducing the viability of the remaining cells (Fig. 4B). When we evaluated the lymphocyte subpopulations, we observed that this reduction was due to the specific reduction in the number of T CD8 lymphocytes (cytotoxic) (Fig 4 D-F).

This is the first time that the effects of Fluazuron immunomodulators are evaluated in lymphocyte subpopulations. Again, we can make use of in silico tools to elucidate the mechanisms involved in this action. Table 2 shows the results of the evaluation by the Way2Drug Platform associated with Genecards Databank. In these platforms are demonstrated the possible interactions of Fluazuron in biological activities and gene expressions that may be related to the actions verified here.

Table 02: Computational analysis of probable biological interactions for Fluazuron using the Way2Drug Platform (19) Associated with Genecards Databank (20).

Target	Prediction	Genecards information
Cytokine production inhibitor	Active	-----
DNA polymerase I inhibitor	Active	-----
Increases expression of the ATG5 gene	Active	Protein involved in the formation of the Autophagic Vesicle in Cell Death.
Reduces expression of the CCNC gene	Active	Cyclin protein involved in apoptosis routes.
Reduces IFNG gene expression	Active	γ Interferon protein, important mediator of the immune system.

Inhibition of cytokine production is shown to complement information on the reduction of gamma interferon gene expression. Perhaps this is the most expressive information for the action seen here. The immune system is known to act as a messaging system with multiple exchanges of information along the route. Cytokines are commonly seen as the mediators of these information passages (23). Without them, the cells are not activated, and the immune response does not continue, which means that there is no need to proliferate the defense cells because there is no defense to be made once the message has been lost (24). Gamma interferon is one such messenger. Its function is, among others, to activate CD8 T lymphocytes. A reduction in its production leads to a reduction in the continuity of the immune response and to a non-activation of this

subpopulation. With this non-activation, the cells do not proliferate, and the immune response is weakened, just like the organism (25).

If we consider the information already postulated that Fluazuron can remain in the body for up to three to four weeks, we are talking about a failure in the immune system that can last up to 30 days, leaving the body totally open to infections and / or unresponsive to pathogens.

Summarizing, Fluazuron can cause genotoxicity by probable chromatin rearrangement and immunodepleting by specific reduction of the CD8 T lymphocyte subpopulation, mediated by the decrease in gamma interferon production. Although the use of Fluazuron is a necessity for tick control and for cattle management, we must bear in mind that the imminent risks to its application exist. Careless use can damage the immune system which in turn carries a gigantic hazard by opening a door to diseases and pathogens and leaving us defenseless. It is up to the health professionals to emphasize the importance of the correct application of the product, as well as the use of protection equipment, but above all, it is the responsibility of the dissemination of this information.

REFERENCES

1. Mendonça RPD. Atividade endectocida, segurança clínica e farmacocinética de resíduos de uma nova alternativa terapêutica (Fluazuron+ Abamectina) em bovinos. 2010.
2. Vilela LF, de Sousa IJA, Fontoura MHP, Monteiro HC, de Sousa GPB, de Paiva Costa O, et al. Eficácia De Ectoparasiticidas Contra O *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* Em Bovinos Na Região De Paraíso Do Tocantins. Revista Integralização Universitária. 2016(15).
3. Martins J. Carrapato *Boophilus microplus* (Can. 1887)(Acari: Ixodidae) resistente a ivermectina, moxidectina e doramectina. Rio Grande do Sul. 2006.
4. COUTO FILHO MR, GONÇALVES GR, MARINO PC. Eficácia Do Controle Químico de Carrapatos *Rhipicephalus* (Boophilus) *Microplus* Em Bovinos Leiteiros Com Uso De Fluazuron: Relato De Caso. REVISTA UNINGÁ. 2018;53(2).

5. Duran CNE, Berni NEA, Marcato GPD. Polymer Nanoparticles Containing Amitraz And/or Fluazuron, Production Method, Formulation And Uses. 2014.
6. Meeting JFWCoFA, Organization WH. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food: World Health Organization; 2009.
7. Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, et al. PubChem substance and compound databases. 2015;44(D1):D1202-D13.
8. Catto J, Andreotti R, Koller W. Atualização sobre o controle estratégico do carrapato-do-boi. Embrapa Gado de Corte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E). 2010.
9. Germolec D, Luebke R, Rooney A, Shipkowski K, Vandebriel R, van Loveren HJCoit. Immunotoxicology: A brief history, current status and strategies for future immunotoxicity assessment. 2017;5:55-9.
10. Victal JC, Valério LB, Oshiro MC, Baptista SC, Pinheiro F. Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade. 2015;7(2).
11. Raies AB, Bajic VB. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. 2016;6(2):147-72.
12. Güez CM, Souza ROd, Fischer P, Leão MFdM, Duarte JA, Boligon AA, et al. Evaluation of basil extract (*Ocimum basilicum* L.) on oxidative, anti-genotoxic and anti-inflammatory effects in human leukocytes cell cultures exposed to challenging agents. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017;53(1).
13. Burow ME, Weldon CB, Tang Y, Navar GL, Krajewski S, Reed JC, et al. Differences in susceptibility to tumor necrosis factor α -induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. Cancer research. 1998;58(21):4940-6.
14. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental cell research. 1988;175(1):184-91.
15. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free radical biology and medicine. 1996;20(7):933-56.
16. Schmid W. The micronucleus test. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects. 1975;31(1):9-15.
17. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2000;455(1):81-95.

18. Drwal MN, Banerjee P, Dunkel M, Wettig MR, Preissner RJ. ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. 2014;42(W1):W53-W8.
19. Filimonov D, Lagunin A, Glorizova T, Rudik A, Druzhilovskii D, Pogodin P, et al. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. 2014;50(3):444-57.
20. Safran M, Dalah I, Alexander J, Rosen N, Iny Stein T, Shmoish M, et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator. 2010;2010.
21. Gold LS, Slone TH, Manley NB, Garfinkel GB, Hudes ES, Rohrbach L, et al. The Carcinogenic Potency Database: analyses of 4000 chronic animal cancer experiments published in the general literature and by the US National Cancer Institute/National Toxicology Program. 1991;96:11.
22. Gabal AA. Micro and macro genetic damage induced by the insecticide Match in mice genome. 2006;9:437-52.
23. O'Shea JJ, Gadina M, Siegel RM. Cytokines and cytokine receptors. Clinical Immunology (Fifth Edition): Elsevier; 2019. p. 127-55. e1.
24. Liang Y, Yang C, Zhou Q, Pan W, Zhong W, Ding R, et al. Serum monokine induced by gamma interferon is associated with severity of coronary artery disease. 2017;58(1):24-9.
25. Abril-Rodriguez G, Ribas AJ. SnapShot: immune checkpoint inhibitors. 2017;31(6):848-. e1.

PARTE III

5. DISCUSSÃO

Fluazuron é uns dos mais modernos acaricidas no qual tem sido utilizado pelos produtores na tentativa de controlar os carrapatos. A falta de orientação a esses pecuaristas sobre o cuidado com a saúde do humano no manejo desses produtos, pode ser um grande problema, já que os carrapaticidas são venenos que atuam basicamente no sistema nervoso central. Como primeira barreira de defesa contra uma intoxicação, temos o sistema imune, no qual através das células imunológicas vai atingir esse antígeno, que pode ser um vírus, fungo ou até mesmo uma molécula, como a o Fluazuron.

O primeiro protocolo da OECD que utilizamos anteriormente teve como objetivo determinar a partir da LC50, as melhores concentrações para realizar os experimentos in vitro com o Fluazuron. Para tanto, testamos uma ampla curva das concentrações de Fluazuron, e o parâmetro utilizado como padrão foi a proliferação celular.

Uma vez que a curva de citotoxicidade foi realizada com os PBMC, descobrimos que a concentração letal estava próxima de 10 μM (figura 02 do artigo). A partir deste valor, as concentrações-teste para os outros protocolos foram determinadas como 10, 1 e 0,1 μM .

Os outros protocolos deste experimento foram avaliados em três momentos: inicial, 24 e 48 horas após a exposição às concentrações de Fluazuron. Os resultados são mostrados nas figuras 03 e 04 do artigo.

Nenhuma concentração testada mostrou efeitos mutagênicos no período do experimento ($p > 0,05$). O mesmo não pode ser dito sobre os efeitos genotóxicos. Pode-se observar na Figura 03A que concentrações de 10 e 1 μM causam lesões maiores que as causadas pelo próprio controle positivo em 48 horas de exposição. Embora não existam estudos que relacionem os efeitos diretos do Fluazuron no DNA, podemos

associar esses danos aos propostos pela plataforma *In Silico* PROTOX, que são mostrados na Tabela 01 do artigo.

Como podemos ver, os resultados da Tabela 01 concordam com os encontrados no experimento, tanto para mutagênese quanto para genotoxicidade (carcinogênese). Protox usa o sistema de comparação de frações moleculares para analisar seus resultados. Essa comparação é feita com um banco de dados de mais de 4000 estudos de moléculas, sendo um método muito robusto e confiável (GOLD, SLONE et al. 1991).

Além disso, quimicamente o Fluazuron é caracterizado como 2,6-difluorobenzamida. Esta molécula foi previamente estudada e seus efeitos deletérios sobre o DNA já são conhecidos. Sua ação ocorre pela produção de núcleos picnóticos gerados pelo rearranjo desorganizado da cromatina nuclear (GABAL 2006).

Ao analisar os resultados da citotoxicidade, observamos que todas as concentrações causaram diminuição no crescimento total de leucócitos e linfócitos (Fig. 4A e 4C do artigo), mas sem reduzir a viabilidade das células remanescentes (Fig. 4B do artigo). Quando avaliamos as subpopulações de linfócitos, observamos que essa redução foi devida à redução específica no número de linfócitos T CD8 (citotóxico) (Fig 4 D-F do artigo).

Esta é a primeira vez que os efeitos imunomoduladores do Fluazuron são avaliados em subpopulações de linfócitos. Mais uma vez, podemos utilizar ferramentas *in silico* para elucidar os mecanismos envolvidos nessa ação. A Tabela 2 mostra os resultados da avaliação da Plataforma Way2Drug associada ao *Genecards Databank*. Nestas plataformas são demonstradas as possíveis interações do Fluazuron em atividades biológicas e expressões gênicas que podem estar relacionadas às ações aqui verificadas.

A inibição da produção de citocinas mostra-se complementar a informação sobre a redução da expressão gênica do interferon- γ . Talvez esta seja a informação mais expressiva para a ação vista aqui. Sabe-se que o sistema imunológico atua como um sistema de mensagens com múltiplas trocas de informações ao longo dessa rota. As citocinas são comumente vistas como mediadores dessas passagens de informação (O'SHEA, GADINA et al. 2019). Sem eles, as células não são ativadas, e a resposta imune não continua, o que significa que não há necessidade de proliferar as células de defesa, porque não há defesa a ser feita uma vez que a mensagem foi perdida (LIANG, YANG et al. 2017). O interferon- γ é um desses mensageiros. Sua função é, entre outros, ativar linfócitos T CD8. Uma redução em sua produção leva a uma redução na

continuidade da resposta imune e a uma não ativação desta subpopulação. Com essa não ativação, as células não proliferam e a resposta imune é enfraquecida, assim como o organismo (ABRIL-RODRIGUEZ; RIBAS 2017).

Se considerarmos as informações já postuladas que o Fluazuron pode permanecer no organismo do animal por até três a quatro semanas, estamos falando de uma falha no sistema imunológico que pode durar até 30 dias, deixando o corpo humano propenso a infecções e / ou a não responde a patógenos.

6. CONCLUSÃO

O Fluazuron pode causar genotoxicidade por rearranjo da cromatina e citotoxicidade pela imunodepleção por redução específica da subpopulação de linfócitos T CD8, mediada pela diminuição da produção de interferon-gama.

Embora o uso do Fluazuron seja uma necessidade para o controle de carrapatos e para o manejo do gado, devemos ter em mente que existem riscos iminentes durante sua aplicação. O uso descuidado onde o operário tenha contato ou inalação do referido químico, pode prejudicar o sistema imunológico, comprometendo a saúde do mesmo pela ação do Fluazuron devido ao contato acidental.

Cabe aos profissionais de saúde a responsabilidade da divulgação de informações de segurança aos operários rurais ao ressaltar a importância da correta aplicação do produto, bem como o uso de equipamentos de proteção.

REFERÊNCIAS

ABRIL-RODRIGUEZ G, RIBAS AJCC. SnapShot: immune checkpoint inhibitors. 2017;31(6):848-. e1.

ARNOLD, Christina E. et al. The activation status of human macrophages presenting antigen determines the efficiency of Th17 responses. Immunobiology, v. 220, n. 1, p. 10-19, 2015.

BALESTIERI, F. M. P. Imunologia. Barueri, São Paulo: Manole, 2006.

BERNI NETO, Elias Antonio et al. Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo amitraz, fluazuron e/ou violaceína para o uso na pecuária. 2014.

BULL, M.S. AND STRONG, M.B. (1994). Absorption and dissipation profiles for fluazuron in cattle following two routes of administration. Unpublished report No. 94/11/1472. Ciba-Geigy Limited, Kems Creek, Australia. Submitted to JECFA by Ciba-Geigy Limited, Basle, Switzerland.

BUROW ME, WELDON CB, TANG Y, NAVAR GL, KRAJEWSKI S, REED JC, et al. Differences in susceptibility to tumor necrosis factor α -induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. Cancer research. 1998;58(21):4940-6.

BUROW, M.E.; WELDON, C.B.; TANG, Y.; NAVAR, G.L.; KRAJEWSKI, S.; REED, J.C. Differences in Susceptibility to Tumor Necrosis Factor α -induced Apoptosis among MCF-7 Breast Cancer Cell Variants. Cancer Research. 58: 4940-46, 1998.

CALICH, V., VAZ, P. Imunologia. Revinter Ltda, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2ªEd, 2009.

CALLIGARIS, Izabela Braggião et al. Action of the insect growth regulator fluazuron, the active ingredient of the acaricide Acatak®, in *Rhipicephalus sanguineus nymphs* (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae). Microscopy research and technique, v. 76, n. 11, p. 1177-1185, 2013.

CARNEIRO, Juliana Campos et al. Diagnosis of the control and efficacy of acaricides to bovine tick in the semiarid of north of Minas Gerais. Acta Scientiae Veterinariae, v. 43, 2015.

CATTO J, ANDREOTTI R, KOLLER W. Atualização sobre o controle estratégico do carrapato-do-boi. Embrapa Gado de Corte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E). 2010.

CATTO, J. B.; ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W. Atualização sobre o controle estratégico do carrapato-do-boi. Embrapa Gado de Corte-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2010.

COELHO, Cristiane Nunes et al. Associação de abamectina com fluazuron no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus* em bovinos naturalmente infestados. Brazilian Journal of Veterinary Medicine, v. 37, n. Supl. 1, p. 51-54, 2015.

COUTO FILHO MR, GONÇALVES GR, MARINO PC. Eficácia Do Controle Químico de Carrapatos *Rhipicephalus* (Boophilus) Microplus Em Bovinos Leiteiros Com Uso De Fluazuron: Relato De Caso. REVISTA UNINGÁ. 2018;53(2).

DA FONSECA PRIETSCH, Rafael et al. Formas farmacêuticas de liberação modificada utilizadas em ruminantes: uma revisão. Science and animal health, v. 2, n. 1, p. 03-26, 2014.

DAVIS, George E. The Mac-1 and p150, 95 β 2 integrins bind denatured proteins to mediate leukocyte cell-substrate adhesion. Experimental cell research, v. 200, n. 2, p. 242-252, 1992.

DE SOUZA MARTINS, Joao Ricardo. Carrapato *Boophilus microplus* (Can. 1887) (Acari: ixodidae) resistente a ivermectina, moxidectina e doramectina. Rio Grande do Sul, Brasil. 2006.

DOS SANTOS MONTAGNER, Greice Franciele Feyh et al. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. Toxicology in vitro, v. 24, n. 5, p. 1410-1416, 2010.

DRWAL MN, BANERJEE P, DUNKEL M, WETTIG MR, PREISSNER RJNAr. ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. 2014;42(W1):W53-W8.

DURAN CNE, BERNI NEA, MARCATO GPD. Polymer Nanoparticles Containing Amitraz And/or Fluazuron, Production Method, Formulation And Uses. 2014.

FARIAS, Nara Amélia; LOPES RUAS, Jerônimo; BETTIN DOS SANTOS, Tânia Regina. Análise da eficácia de acaricidas sobre o carrapato *Boophilus microplus*, durante a última década, na região sul do Rio Grande do Sul. Ciência Rural, v. 38, n. 6, 2008.

FENECH M. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2000;455(1):81-95.

FILIMONOV D, LAGUNIN A, GLORIOZOVA T, RUDIK A, DRUZHILOVSKII D, POGODIN P, et al. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. 2014;50(3):444-57.

FURLONG, J.; SALES, R. O. Strategical control of cattle tick in the Milk Bovine: A Revision. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.1, n.2) p. 44 – 72, jul - dez (2007).

FURLONG, John. Carrapato: problemas e soluções. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p. 65, 2005.

GABAL AAJJB. Micro and macro genetic damage induced by the insecticide Match in mice genome. 2006;9:437-52.

GERMOLEC D, LUEBKE R, ROONEY A, SHIPKOWSKI K, VANDEBRIEL R, VAN LOVEREN HJCoit. Immunotoxicology: A brief history, current status and strategies for future immunotoxicity assessment. 2017;5:55-9.

GOLD LS, SLONE TH, MANLEY NB, GARFINKEL GB, HUDES ES, ROHRBACH L, et al. The Carcinogenic Potency Database: analyses of 4000 chronic animal cancer experiments published in the general literature and by the US National Cancer Institute/National Toxicology Program. 1991;96:11.

GOMES, A. O carrapato-do-boi *Boophilus microplus*: ciclo, biologia, epidemiologia, patogenia e controle. 1997.

GOMES, R. C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L. Evolução e qualidade da pecuária brasileira. Documentos/Embrapa Gado de Corte, ISSN, p. 1517-3747, 2017.

GÜEZ CM, SOUZA ROD, FISCHER P, LEÃO MFDM, DUARTE JA, BOLIGON AA, et al. Evaluation of basil extract (*Ocimum basilicum* L.) on oxidative, anti-genotoxic and anti-inflammatory effects in human leukocytes cell cultures exposed to challenging agents. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017;53(1).

HAYDEN, Matthew S.; GHOSH, Sankar. NF- κ B in immunobiology. Cell research, v. 21, n. 2, p. 223, 2011.

HEIDMANN, Maycon Junior et al. Eficácia acaricida da associação de Cipermetrina, Fenthion e Clorpirifós em bovinos naturalmente infestados por *Rhipicephalus microplus* na Amazônia Matogrossense. Veterinária e Zootecnia, v. 23, n. 4, p. 713-721, 2016.

KIM S, THIESSEN PA, BOLTON EE, CHEN J, FU G, GINDULYTE A, et al. PubChem substance and compound databases. 2015;44(D1):D1202-D13.

LEANDRO, Carol et al. Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações. Revista Portuguesa de Ciência Desportiva, v. 2, n. 5, p. 80-90, 2002.

LEITE, R. C. et al. Controle de ectoparasitos em bovinocultura de corte. Bovinocultura de corte, 2011.

LIANG Y, Yang C, Zhou Q, Pan W, Zhong W, Ding R, et al. Serum monokine induced by gamma interferon is associated with severity of coronary artery disease. 2017;58(1):24-9.

MARTINS J. Carrapato *Boophilus microplus* (Can. 1887)(Acari: Ixodidae) resistente a ivermectina, moxidectina e doramectina. Rio Grande do Sul. 2006.

MEETING JFWECOFA, Organization WH. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food: World Health Organization; 2009.

MENDONÇA RPD. Atividade endectocida, segurança clínica e farmacocinética de resíduos de uma nova alternativa terapêutica (Fluazuron+ Abamectina) em bovinos. 2010.

MENDONÇA, Rafael Paranhos de. Atividade endectocida, segurança clínica e farmacocinética de resíduos de uma nova alternativa terapêutica (Fluazuron+ Abamectina) em bovinos. 2010.

MEYER, T. N.; DA SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 45, n. 2, p. 181-188, 1999.

NETO, E. A. B. et al. Nanopartículas oliméricas contendo amitraz e/ou Fluazuron, método de produção, formulação e usos. Núcleo de pesquisas integradas LTDA, 2014.

O'SHEA JJ, GADINA M, SIEGEL RM. Cytokines and cytokine receptors. Clinical Immunology (Fifth Edition): Elsevier; 2019. p. 127-55. e1.

RAIES AB, BAJIC VB. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. 2016;6(2):147-72.

RAYNAL, José Tadeu et al. Acaricides efficiency on Rhipicephalus (Boophilus) microplus from Bahia state North-Central region. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 22, n. 1, p. 71-77, 2013.

RICE-EVANS CA, MILLER NJ, PAGANGA G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free radical biology and medicine. 1996;20(7):933-56.

SAFRAN M, DALAH I, ALEXANDER J, ROSEN N, INY STEIN T, SHMOISH M, et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator. 2010;2010.

SANTOS, A. R. I. S. Uso De “Rotação” De Princípios Ativos Para O Combate De Carrapatos Em Bovinos Mestiços De Corte. Salão do Conhecimento, 2015.

SCHMID W. The micronucleus test. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects. 1975;31(1):9-15.

SCHULENBURG, Hinrich; LÉOPOLD KURZ, C.; EWBANK, Jonathan J. Evolution of the innate immune system: the worm perspective. Immunological reviews, v. 198, n. 1, p. 36-58, 2004.

SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental cell research. 1988;175(1):184-91.

SOUZA, Clarissa P.; RAMADINHA, Regina HR; SCOTT, Fabio B. Clinical and parasitological evaluation of pour-on fluazuron and ivermectin for treating canine demodicosis. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 34, n. 11, p. 1094-1100, 2014.

SOUZA, Gladstone Santos de et al. Avaliação da atividade do novaluron, sobre *Boophilus microplus* (Canestrini) em bovinos de corte naturalmente infestados. 2009.

TERTO, Héber Eliaquim Borges; ANDRADE, Leonardo Rosa. UTILIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS POR TRABALHADORES RURAIS NA MICROBACIA DO

CÓRREGO DAS AREIAS NO MUNICÍPIO DE NOVA BRASILÂNDIA D'OESTE-RO. Revista Científica da UNESC, v. 15, n. 1, 2017.

THOMAS, J.; KINDT, Richard A.; GOLDSBY, Barabara A. Osborne. Kuby immunology. The Korean Society for Microbiology, p. 389-409, 2008.

VAZ, A. J., TAKEI, K., BUENO, C. Imunoensaios: Fundamentos e Aplicação. Guanabarra- Rio de Janeiro. Koogau, 2010.

VICTAL JC, VALÉRIO LB, OSHIRO MC, BAPTISTA SC, PINHEIRO F. Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade. 2015;7(2).

VILELA LF, DE SOUSA IJA, FONTOURA MHP, MONTEIRO HC, DE SOUSA GPB, DE PAIVA COSTA O, et al. Eficácia De Ectoparasiticidas Contra O *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* Em Bovinos Na Região De Paraíso Do Tocantins. Revista Integralização Universitária. 2016(15).

VILELA, Layla Faria et al. EFICÁCIA DE ECTOPARASITICIDAS CONTRA O *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* EM BOVINOS NA REGIÃO DE PARAÍSO DO TOCANTINS. Revista Integralização Universitária, n. 15, 2016.

VITALE, Rodrigo Faller; RIBEIRO, Fernando de Andrade Quintanilha. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology, v. 1, n. 1, p. 123-127, 2007.

VITALE, Rodrigo Faller; RIBEIRO, Fernando de Andrade Quintanilha. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. Revista Brasileira de Otorrinolaringologia, v. 73, n. 1, p. 123-127, 2007.
VOGEL, Daphne YS et al. Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. Immunobiology, v. 219, n. 9, p. 695-703, 2014.

YUNIS, Jorge J. High resolution of human chromosomes. Science, p. 1268-1270, 1976.

ANEXOS

TRABALHOS APRESENTADOS DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO REFERENTES A ESTA DISSERTAÇÃO.



CERTIFICADO

Certificamos que **Pamella Eduardha Espindola Chaves** apresentou o trabalho "EFEITOS CITOTÓXICOS DO ACARICIDA FLUAZURON EM LINFÓCITOS HUMANOS EM CULTURA CELULAR", de coautoria de Juliana Gonçalves Ribeiro; Jéssica Tamara Limberger; Paola Ribeiro Motta; Luísa Zuravski; Queila Daiane Fonseca do Amaral; Emanoeli da Rosa; Luís Flávio Souza de Oliveira; Michel Mansur Machado,, modalidade Pôster no I Simpósio Integrado dos PPGs da UNIPAMPA/Campus Uruguiana, realizado nos dias 26 e 27 de Outubro de 2017, na Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguiana.

Uruguiana, 27 de Outubro de 2017


Caiana Silva de Ávila
Coordenadora do Simpósio


PPG bioquímica




unipampa
Universidade Federal do Pampa




CIÊNCIA
ANIMAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS

a autenticidade deste documento pode ser verificada através da URL:
<https://eventos.unipampa.edu.br/certificados/validar/0D8C871F>



CERTIFICADO

Certificamos que **Juliana Gonçalves Ribeiro** apresentou o trabalho "ANALISE DAS POSSÍVEIS ATIVIDADES DO ACARICIDA FLUAZURON NO ORGANISMO HUMANO UTILIZANDO MODELO COMPUTACIONAL (IN SILICO)", de coautoria de Jéssica Tamara Limberger, Paola Ribeiro Motta, Luísa Zuravski, Queila Daiane Fonseca do Amaral, Emanoeli da Rosa, Pamela Eduardha Espindola Chaves, Luís Flávio Souza de Oliveira, Michel Mansur Machado, modalidade Pôster no I Simpósio Integrado dos PPGs da UNIPAMPA/Campus Uruguaiana, realizado nos dias 26 e 27 de Outubro de 2017, na Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana.

Uruguaiana, 27 de Outubro de 2017

Diana Silva de Ávila

Diana Silva de Ávila
Coordenadora do Simpósio



a autenticidade deste documento pode ser verificada através da URL:
<https://eventos.unipampa.edu.br/certificados/validar/5DC48ACD>



certificado

O Comitê Científico do 9º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão (SIEPE) certifica que o trabalho intitulado **USO DE MODELOS IN SILICO PARA PREDIÇÃO DE METABOLISMO DO MEDICAMENTO VETERINÁRIO FLUAZURON** de autoria de **Juliana Gonçalves Ribeiro e Luísa Zuravski, Emanoeli da Rosa, Queila Daiane Fonseca do Amaral, Luís Flávio Souza de Oliveira, Michel Mansur Machado** na categoria **Pesquisadores - Pesquisa**, na modalidade **Apresentação Oral** foi apresentado na Mostra Científica do 9º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão (SIEPE), realizado entre os dias 21 e 23 de novembro de 2017, em Santana do Livramento, RS.

Santana do Livramento, 05 de dezembro de 2017.

Marco Antonio Fontoura Hansen

Marco Antonio Fontoura Hansen
Reitor da Universidade Federal do Pampa