



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCAS MARCELO MEIRA DA SILVA

**Exposição ao clorpirifós: panorama da literatura recente e
estudo experimental em fígado e rins de ratos púberes**

LUCAS MARCELO MEIRA DA SILVA

**EXPOSIÇÃO AO CLORPIRIFÓS: PANORAMA DA
LITERATURA RECENTE E ESTUDO EXPERIMENTAL EM
FÍGADO E RINS DE RATOS PÚBERES**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Goulart de Andrade.

Londrina
2026

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

Meira da Silva, Lucas Marcelo.

Exposição ao clorpirifós : Panorama da literatura recente e estudo experimental em fígado e rins de ratos púberes / Lucas Marcelo Meira da Silva. - Londrina, 2026.
118 f.

Orientador: Fábio Goulart Andrade.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2026.

Inclui bibliografia.

1. Clorpirifós - Tese. 2. Toxicidade hepática - Tese. 3. Estresse oxidativo - Tese. 4. Peripuberdade - Tese. I. Andrade, Fábio Goulart . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 574

LUCAS MARCELO MEIRA DA SILVA

**EXPOSIÇÃO AO CLORPIRIFÓS: PANORAMA DA LITERATURA
RECENTE E ESTUDO EXPERIMENTAL EM FÍGADO E RINS DE
RATOS PÚBERES**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Goulart de Andrade
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Glaura S. Alves Fernandes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Sheila Michele Levy
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gláucia E. M. de Lion Siervo
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Londrina, 14 de julho de 2026.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Fábio, meu orientador, que não me deixou desistir, não apenas do doutorado, mas também de mim mesmo. A ele, todo o meu agradecimento e carinho por ser um orientador tão exímio e humano.

Às professoras que compõem a minha banca, por aceitarem o convite para juntos, aprimorarmos este trabalho. E aos membros suplentes, pela disponibilidade e por aceitarem o convite.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas e aos recursos CAPES/PROAP ao Laboratório de Análise Histopatológica.

Aos meus colegas de laboratório, por estarem comigo do começo ao fim desta tese, em um projeto que se iniciou em 2020. Destaco aqui, principalmente, a colaboração e a imensa ajuda recebidas dos queridos Pedro e Gabriel, e das queridíssimas Letícia e Marina, que, além de tudo, compartilharam diversos momentos de angústia. Ao João, com quem, em meio a tantas análises na época do mestrado, conseguimos fazer surgir uma amizade e parceria.

Agradeço aos meus amigos, que são poucos, mas são os melhores que apareceram na minha vida e, acima de tudo, permaneceram. Vocês são luz. Nicolý, Nicolas e Ody, em meio a esse caos chamado doutorado, navegamos por águas frias no fim do mundo, e, mesmo no fim do mundo, vocês me ajudaram com palavras de calma e sabedoria, além de muita risada. Tati, você é minha saudade diária; resignificou meu conceito de trabalho e me aconselhou sempre que eu tentava desistir. Você foi estrutura. Liz, minha miga e japa favorita, nem existem palavras para expressar o tamanho da luz que você leva por onde passa. Como diria a querida Juh: “Quem tem uma Liz na vida, tem tudo”. À minha segunda família, a grande família Miranda, liderada por uma incrível mulher, Dona Alaíde — “tia”, para os íntimos —, que, desde os primórdios, esteve presente na minha vida.

À minha família, principalmente aos meus pais, que, mesmo diante de todas as adversidades da vida, persistiram para que o sol que um dia os queimou não fosse tão ardido para seus filhos. Ao meu pai, que hoje não está mais aqui, mas que sempre insistiu na importância dos estudos e de que o conhecimento poderia ser um divisor de águas. À minha mãe, que, mesmo diante do cansaço de plantão após plantão, teve energia e amor para me ajudar com as tarefas da escola e sempre me aconselhou a perseverar.

*“É preciso estudar muito para saber um pouco”
Montesquieu*

RESUMO

SILVA, Lucas Marcelo Meira. **Exposição ao clorpirifós: panorama da literatura recente e estudo experimental em fígado e rins de ratos púberes**. 2026. 118 f. Tese (Doutorado do Programa de Pós – Graduação em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2026.

O Brasil destaca-se como o maior consumidor mundial de agrotóxicos. Entre eles, o clorpirifós, um organofosforado banido na União Europeia e restrito nos EUA devido a riscos ao neurodesenvolvimento e potencial carcinogênico, continua sendo amplamente utilizado em território nacional. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos hepatorreais subclínicos da exposição ao clorpirifós durante a janela crítica do desenvolvimento peripuberal em ratos Wistar, integrando os achados experimentais a uma revisão sistemática da literatura (2014-2024). Na etapa experimental, dez ratos Wistar machos receberam clorpirifós (5 ou 15 mg/kg) ou veículo via gavagem, totalizando 30 animais experimentais (n= 10/grupo), do 25º ao 65º dia pós-natal (DPN). No DPN 66, os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia por punção cardíaca, coletou-se plasma para avaliação de marcadores de função renal e hepática (ureia, creatinina, proteína total, ALT, AST, albumina), rins para análise histopatológica e fígado para análises de estresse oxidativo e histopatologia. Os resultados experimentais indicaram que os marcadores séricos e a morfologia renal permaneceram inalterados. No entanto, o clorpirifós induziu alterações redox hepáticas dose-dependentes: a dose de 5 mg/kg provocou uma resposta adaptativa (redução da lipoperoxidação e preservação de tióis), enquanto a dose de 15 mg/kg induziu desequilíbrio oxidativo (aumento de TBARS e carbonilação de proteínas, com esgotamento de tióis livres). Embora a coloração de Tricrômico de Masson tenha sugerido fibrose leve, a quantificação por Picrosirius Red não demonstrou alterações significativas. Complementarmente, a revisão de literatura revelou que a exposição ao clorpirifós está associada a um amplo espectro de danos. Em modelos aquáticos, observou-se danos ao DNA renal e hipometilação global, sugerindo ruptura molecular precoce. Entre os artigos, os efeitos hepáticos incluíram elevação de transaminases, lesões histopatológicas e mudanças transcriptômicas em vias metabólicas e inflamatórias. Mecanicamente, a toxicidade envolve a bioativação em clorpirifós-oxon, resultando em disfunção mitocondrial e desregulação epigenética. Estudos de misturas indicam toxicidade sinérgica, e modificações epigenéticas persistentes levantam preocupações sobre danos a longo prazo mesmo após a interrupção da exposição. Coletivamente, os dados demonstram que a exposição puberal ao clorpirifós induz alterações oxidativas e histopatológicas hepáticas sutis na ausência de toxicidade enzimática evidente ou fibrose detectável. Conclui-se que o desequilíbrio redox subclínico pode preceder o comprometimento funcional hepático, evidenciando o potencial risco da exposição ao clorpirifós durante uma fase crítica do desenvolvimento.

Palavras-chave: clorpirifós; toxicidade hepática; estresse oxidativo; peripuberdade; rim.

ABSTRACT

SILVA, Lucas Marcelo Meira. **Chlorpyrifos Exposure: An Overview of the Recent Literature and an Experimental Study of the Liver and Kidneys in Pubertal Rats.** 2026. 118 f. Tese (Doutorado do Programa de Pós – Graduação em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2026.

Brazil stands out as the world's largest consumer of pesticides. Among these compounds, chlorpyrifos, an organophosphate pesticide banned in the European Union and restricted in the United States due to its neurodevelopmental risks and carcinogenic potential, remains widely used in Brazil. This study aimed to investigate the subclinical hepatorenal effects of chlorpyrifos exposure during the critical window of peripubertal development in Wistar rats, integrating the experimental findings with a systematic review of the literature published between 2014 and 2024. In the experimental study, ten male Wistar rats received chlorpyrifos (5 or 15 mg/kg) or vehicle by gavage, comprising a total of 30 experimental animals (n = 10/group), from postnatal day (PND) 25 to PND 65. On PND 66, the animals were anesthetized and euthanized by cardiac puncture. Plasma samples were collected to assess renal and hepatic function markers (urea, creatinine, total protein, ALT, AST, and albumin), kidneys were collected for histopathological analysis, and liver samples were obtained for oxidative stress and histopathological assessments. The experimental results showed that serum biochemical markers and renal morphology remained unchanged. However, chlorpyrifos induced dose-dependent hepatic redox alterations. The 5 mg/kg dose elicited an adaptive response, characterized by reduced lipid peroxidation and preservation of thiol groups, whereas the 15 mg/kg dose induced oxidative imbalance, as evidenced by increased TBARS and protein carbonylation, accompanied by depletion of free thiols. Although Masson's trichrome staining suggested mild fibrosis, quantitative assessment using Picrosirius Red staining revealed no significant changes. Complementarily, the literature review showed that chlorpyrifos exposure is associated with a broad spectrum of toxic effects. In aquatic models, renal DNA damage and global hypomethylation have been reported, suggesting early molecular disruption. Across the reviewed studies, hepatic effects included increased transaminase activity, histopathological lesions, and transcriptomic alterations affecting metabolic and inflammatory pathways. Mechanistically, chlorpyrifos toxicity involves its bioactivation to chlorpyrifos-oxon, resulting in mitochondrial dysfunction and epigenetic dysregulation. Mixture studies indicate synergistic toxicity, while persistent epigenetic modifications raise concerns regarding long-term adverse effects even after exposure cessation. Taken together, these findings demonstrate that peripubertal chlorpyrifos exposure induces subtle hepatic oxidative and histopathological alterations in the absence of overt biochemical evidence of hepatic dysfunction or detectable fibrosis. These results suggest that subclinical redox imbalance may precede functional hepatic impairment, highlighting the potential health risks associated with chlorpyrifos exposure during a critical period of development.

Keywords: chlorpyrifos; hepatotoxicity; oxidative stress; peripuberty; kidney.

SUMÁRIO

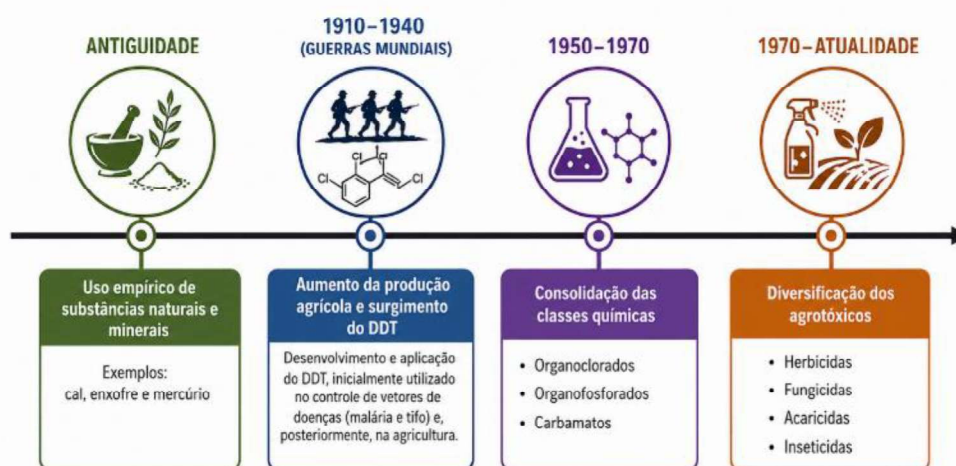
1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Clorpirifós: Perspectivas Globais e Toxicologia.....	17
1.2	Síntese Crítica: o Colonialismo Químico	28
1.3	Períodos críticos do desenvolvimento e vulnerabilidade a disruptores endócrinos: implicações toxicológicas da exposição ao clorpirifós	30
1.4	Mecanismos de estresse oxidativo hepatorenal no período peripuberal: papel da maturação funcional e da suscetibilidade à exposição a organofosforados	32
1.5	Referências	37
2	JUSTIFICATIVA.....	44
3	OBJETIVOS.....	46
4	ARTIGO 1 – Developmental hepatorenal toxicity of chlorpyrifos in experimental models: an integrative critical review (2014-2024)	47
5	ARTIGO 2 – Peripubertal chlorpyrifos exposure induces hepatic oxidative stress without overt hepatorenal toxicity	71
	APÊNDICES.....	96
	ANEXOS	112

1 INTRODUÇÃO

1.1 CLORPIRIFÓS: PERSPECTIVAS GLOBAIS E TOXICOLOGIA

O termo pesticida, agroquímico ou agrotóxico, compreende qualquer substância química ou biológica utilizada na produção, no armazenamento e no beneficiamento agrícola com o escopo de proteger a flora e a fauna contra organismos patogênicos, estendendo-se também ao ambiente urbano (Brasil, 1989; Estados Unidos, 2013). O desenvolvimento da sociedade moderna está estritamente vinculado ao avanço tecnológico e à intensificação das práticas agrícolas, particularmente no que se refere às estratégias de controle de pragas. Historicamente, conforme ilustrado na Figura 1, o uso de substâncias químicas na agricultura remonta à Antiguidade, período no qual compostos de origem mineral, como cal, enxofre e mercúrio, eram empregados de forma empírica para mitigar os danos causados por organismos invasores. Essas práticas iniciais, ainda que rudimentares, evidenciam a longa trajetória humana na busca por métodos que assegurassem a produtividade agrícola e a estabilidade no fornecimento de alimentos (Bortoli; Coumoul, 2018; Tudi *et al.*, 2021).

Figura 1 - Linha do tempo da evolução do uso de agrotóxicos.



Fonte: Autor.

A necessidade de produção de alimentos em larga escala intensificou-se ao longo do século XX, especialmente durante as guerras mundiais, quando se acentuou em resposta às crescentes demandas populacionais. Esse cenário impulsionou o

desenvolvimento e a aplicação de compostos sintéticos, com destaque para o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), inicialmente utilizado no controle de vetores de doenças como malária e tifo, mas que demonstrou elevada eficácia no controle de insetos em ambientes agrícolas. A introdução do DDT marcou um ponto crítico na história do controle químico de pragas, impulsionando a expansão da indústria de pesticidas e o desenvolvimento de novas classes químicas (Bortoli; Coumoul, 2018; Nicolopoulou-Stamati et al., 2016; Tudi *et al.*, 2021).

A partir desse marco, houve a consolidação de diferentes grupos de pesticidas, incluindo organoclorados, organofosforados e carbamatos, cada um com mecanismos de ação específicos e ampla aplicabilidade no manejo agrícola (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016). Ao longo das décadas seguintes, o aperfeiçoamento dessas substâncias e o surgimento de novas formulações contribuíram para a diversificação dos insumos disponíveis, englobando herbicidas, inseticidas, fungicidas e acaricidas (Bortoli; Coumoul, 2018). Dessa forma, o controle químico de pragas passou a desempenhar um papel central na agricultura moderna, sustentando elevados níveis de produtividade, ainda que acompanhado por crescentes preocupações relacionadas aos seus impactos ambientais e à saúde humana (Tudi *et al.*, 2021).

Diante dessas preocupações, a comunidade científica investiga, atualmente, alternativas ao uso de moléculas sintéticas, visando reduzir os impactos associados à exposição ambiental, ocupacional e à saúde humana. Sob essa perspectiva, os biopesticidas têm sido reconhecidos por apresentarem maior segurança ecológica, baixa toxicidade, elevada biodegradabilidade e pouca ou nenhuma ação sobre organismos não alvo. No entanto, sua adoção ainda é limitada devido a fatores como menor eficácia relativa, maior custo, ação mais lenta e vida útil reduzida (Ayilara *et al.*, 2023).

A despeito da busca por alternativas ecológicas, dados recentes indicam um aumento contínuo no consumo global de agrotóxicos. Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2025), o Brasil se destaca como o maior consumidor mundial em termos absolutos, com uso estimado em aproximadamente 801 quilotoneladas. Outros países também figuram entre os maiores consumidores, como Estados Unidos, China e nações asiáticas com forte produção agrícola. Quando analisado o uso em relação à área cultivada, o Brasil também se destaca entre os países com maior intensidade de aplicação de agrotóxicos por hectare, estando atrás apenas da Tailândia. Esses dados são particularmente relevantes considerando que o país

ocupa posição de destaque como um dos maiores exportadores de produtos agrícolas do mundo, o que condiciona o ecossistema a uma carga crônica de exposição a xenobióticos.

Os pesticidas podem ser classificados segundo diferentes critérios. Do ponto de vista químico, incluem-se classes como organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides, entre outras. Quanto ao alvo biológico, são categorizados como fungicidas, herbicidas, inseticidas e rodenticidas, além da distinção entre compostos orgânicos e inorgânicos (Garud *et al.*, 2024; Tudi *et al.*, 2021). Outro critério amplamente utilizado refere-se à toxicidade aguda, determinada por meio da dose letal média (DL_{50}). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os pesticidas são classificados em: classe Ia (extremamente perigosos; DL_{50} oral < 5 mg/kg); classe Ib (altamente perigosos; DL_{50} oral de 5 a 50 mg/kg); classe II (moderadamente perigosos; DL_{50} oral de 50 a 2.000 mg/kg); classe III (pouco perigosos; DL_{50} oral > 2.000 mg/kg); e classe U (improváveis de causar dano agudo; DL_{50} oral $\geq$ 5.000 mg/kg) (WHO, 2020).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2024b) adota um sistema próprio de classificação toxicológica (Figura 2), também baseado na DL_{50} oral, que associa categorias de risco à rotulagem: classe 1 (extremamente tóxico; rótulo vermelho); classe 2 (altamente tóxico; rótulo vermelho); classe 3 (moderadamente tóxico; rótulo amarelo); classe 4 (pouco tóxico; rótulo azul); classe 5 (improvável de causar dano agudo; rótulo azul); e classe NC (não classificado; rótulo verde).

Figura 2 – Classificação toxicológica com base nos critérios da ANVISA



Fonte: autor.

Complementar aos critérios de saúde pública, o Instituto Brasileiro do Meio

Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2026) estabelece a classificação ambiental dos agrotóxicos com base no potencial de periculosidade ambiental (Figura 3). Essa avaliação considera a persistência no ambiente, o potencial de bioacumulação, a mobilidade no solo (com risco de contaminação de águas subterrâneas) e a toxicidade para organismos não alvo. Com base nesses parâmetros, os produtos são classificados em: classe I (altamente perigoso ao meio ambiente); classe II (muito perigoso); classe III (perigoso); e classe IV (pouco perigoso).

Figura 3 – Classificação toxicológica conforme o potencial de periculosidade ambiental de acordo com IBAMA.



Fonte: Autor.

Dentre as diversas moléculas disponíveis atualmente no mercado, destaca-se o clorpirifós (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate), um agrotóxico introduzido em 1965 e amplamente utilizado no controle de insetos tanto na agricultura quanto em ambientes domésticos (Eaton *et al.*, 2008). No Brasil, o composto possui diversas formulações (Tabela 1), e sua utilização é autorizada para diversas culturas de grande relevância econômica e alimentar, como algodão, amendoim, aveia, batata, café, centeio, cevada, citros, ervilha, feijão, grão-de-bico, lentilha, maçã, milho, pastagens, soja, sorgo, tomate, trigo e triticale, o que evidencia seu amplo espectro de aplicação e de alvos biológicos (ANVISA, 2025). Essa amplitude de registro técnico ratifica o largo espectro de ação da molécula, mas, concomitantemente, acentua a necessidade de elucidação sobre os riscos biológicos e sistêmicos associados à sua exposição contínua.

Tabela 1 – Síntese dos produtos com ingrediente ativo clorpirifós liberados para uso no Brasil com suas classificações toxicológica e ambiental

Nome comercial	Situação	Classificação toxicológica	Toxicidade ambiental
Agrosban	Liberado - restrição de uso	Categoria 3 –Moderadamente Tóxico	Classe I – Altamente perigoso
Briva	Liberado - restrição de uso	Categoria 2 – Altamente tóxico	Classe II – Muito perigoso
Capataz	Liberado	Categoria 3 –Moderadamente Tóxico	Classe II – Muito perigoso
Chlorocil	Liberado	Categoria 3 –Moderadamente Tóxico	Classe I – Altamente perigoso
Chlorpyrifós 480 EC AGCN	Liberado	Categoria 2 – Altamente tóxico	Classe II – Muito perigoso
Clopanto	Liberado - restrição de uso	Categoria 2 – Altamente tóxico	Classe II – Muito perigoso
Clormax 480 EC	Liberado - restrição de uso	Categoria 2 – Altamente tóxico	Classe II – Muito perigoso
Clorpiri 480 EC	Liberado	Categoria 3 –Moderadamente Tóxico	Classe II – Muito perigoso
Clorpirifós 480 EC Luba	Liberado - restrição de uso	Categoria 2 – Altamente tóxico	Classe II – Muito perigoso
Clorpirifós Fersol 480 EC	Liberado - restrição de uso	Categoria 3 –Moderadamente Tóxico	Classe II – Muito perigoso
Clorpirifós Nortox EC	Liberado - restrição de uso	Categoria 4 – Pouco Tóxico	Classe II – Muito perigoso
Clorpirifós 48 EC Gharda	Liberado - restrição de uso	Categoria 4 – Pouco Tóxico	Classe II – Muito perigoso

continua...

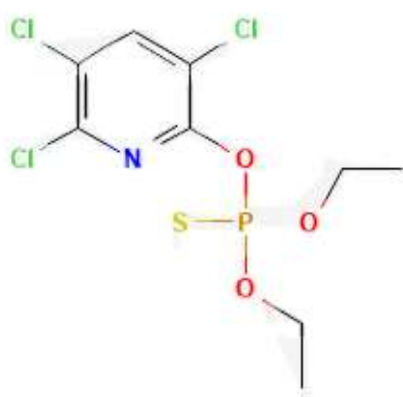
conclusão.

Nome comercial	Situação	Classificação toxicológica	Toxicidade ambiental
Clorpirifós Sabero 480 EC	Liberado - restrição de uso	Categoria 1 - Extremamente tóxico	Classe II – Muito perigoso
Generalbr	Liberado	Categoria 3 –Moderadamente Tóxico	Classe II – Muito perigoso
Incar 480 EC	Liberado - restrição de uso	Categoria 4 – Pouco Tóxico	Classe II – Muito perigoso
Klorpan 480 EC	Liberado	Categoria 3 –Moderadamente Tóxico	Classe II – Muito perigoso
Promitor 480 EC	Liberado - restrição de uso	Categoria 4 – Pouco Tóxico	Classe II – Muito perigoso
Pyrigran	Liberado - restrição de uso	Categoria 4 – Pouco Tóxico	Classe II – Muito perigoso
Pyrinex 480 EC	Liberado - restrição de uso	Categoria 4 – Pouco Tóxico	Classe II – Muito perigoso
Record	Liberado - restrição de uso	Categoria 3 –Moderadamente Tóxico	Classe I – Altamente perigoso
Wild	Liberado - restrição de uso	Categoria 2 – Altamente tóxico	Classe II – Muito perigoso
Wilphos	Liberado	Categoria 4 – Pouco Tóxico	Classe II – Muito perigoso

Fonte: ADAPAR (2026).

O clorpirifós (Figura 4) é um composto quimicamente classificado como organofosforado, pertencente à classe dos inseticidas, com ação por contato e ingestão, além de apresentar atividade acaricida e formicida (ANVISA, 2025). Sua classificação toxicológica varia conforme a formulação do produto, situando-se entre as categorias 2 (altamente tóxico) e 4 (pouco tóxico). Essa variação decorre das atualizações do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS), que considera parâmetros de toxicidade aguda para a definição das categorias de perigo (ADAPAR, 2026; ANVISA, 2024a; United Nations, 2019). No que se refere à classificação ambiental, o IBAMA enquadra o clorpirifós na classe II (produto muito perigoso ao meio ambiente) em razão de sua elevada toxicidade para organismos aquáticos e abelhas, além do potencial de bioacumulação em peixes (ADAPAR, 2026; IBAMA, 2026).

Figura 4 – Estrutura química do clorpirifós.



Fonte: Pubchem (2026).

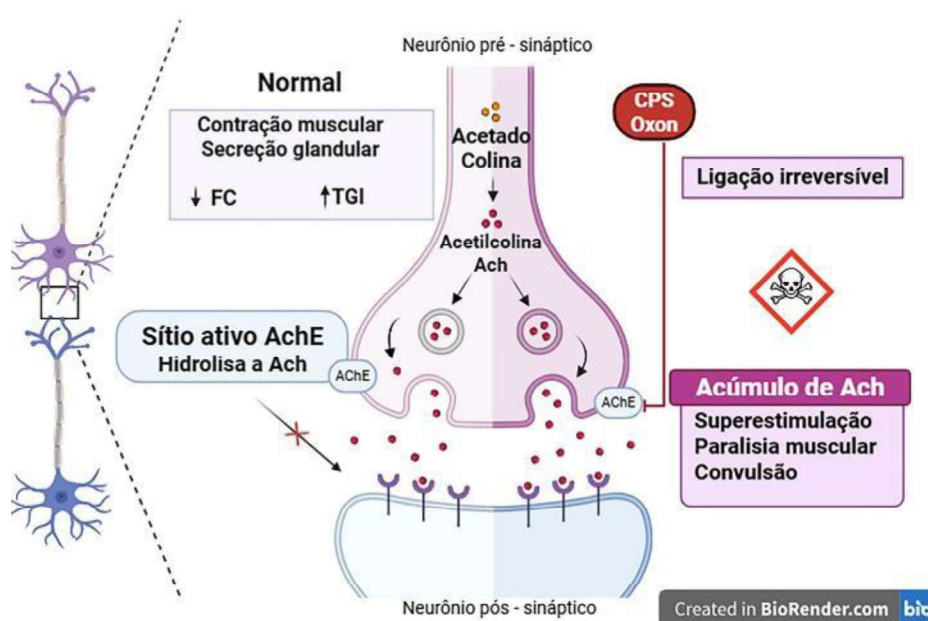
O mecanismo de ação do clorpirifós consiste na inibição irreversível das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto em tecidos periféricos, incluindo os eritrócitos. Na fisiologia básica, a acetilcolina (ACh) é sintetizada no terminal pré-sináptico a partir da colina e da acetil-CoA, sendo posteriormente armazenada em vesículas sinápticas. A chegada de um potencial de ação ao terminal pré-sináptico promove a despolarização da membrana, levando à abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem. O influxo de Ca^{2+} para o interior do neurônio desencadeia a fusão das vesículas sinápticas com a membrana plasmática, resultando na liberação da ACh na fenda sináptica (Prado *et al.*, 2002; Ramírez-Expósito; Cueto-Ureña; Martínez-Martos,

2026).

Uma vez liberada, a ACh liga-se a receptores colinérgicos localizados na membrana pós-sináptica, desencadeando respostas que variam conforme o tipo celular e o receptor envolvido. Entre os principais efeitos estão a contração muscular, a redução da frequência cardíaca (bradicardia) e a estimulação do sistema parassimpático, manifestada por aumento da salivação, lacrimejamento, motilidade intestinal, secreções gástricas e contração pupilar (miose). O fim do estímulo nos receptores pós-sinápticos ocorre por meio da rápida hidrólise da ACh, catalisada principalmente pela AChE e, em menor grau, pela BuChE (Eaton *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2002; Ramírez-Expósito; Cueto-Ureña; Martínez-Martos, 2026).

Após a absorção, o clorpirifós é metabolizado primariamente no fígado por enzimas do sistema citocromo P450 (CYP450), sendo convertido em seu metabólito mais tóxico, o clorpirifós-oxon. Esse metabólito apresenta alta afinidade pelas colinesterases e promove a inibição dessas enzimas por meio da fosforilação do resíduo de serina presente no sítio ativo, resultando em uma modificação covalente essencialmente irreversível. Como consequência, ocorre o acúmulo de ACh na fenda sináptica, levando à estimulação colinérgica excessiva e prolongada dos receptores pós-sinápticos (Figura 5) (Eaton *et al.*, 2008).

Figura 5 – Neurofisiologia basal do neurônio colinérgico e mecanismo de ação do clorpirifós no neurônio colinérgico



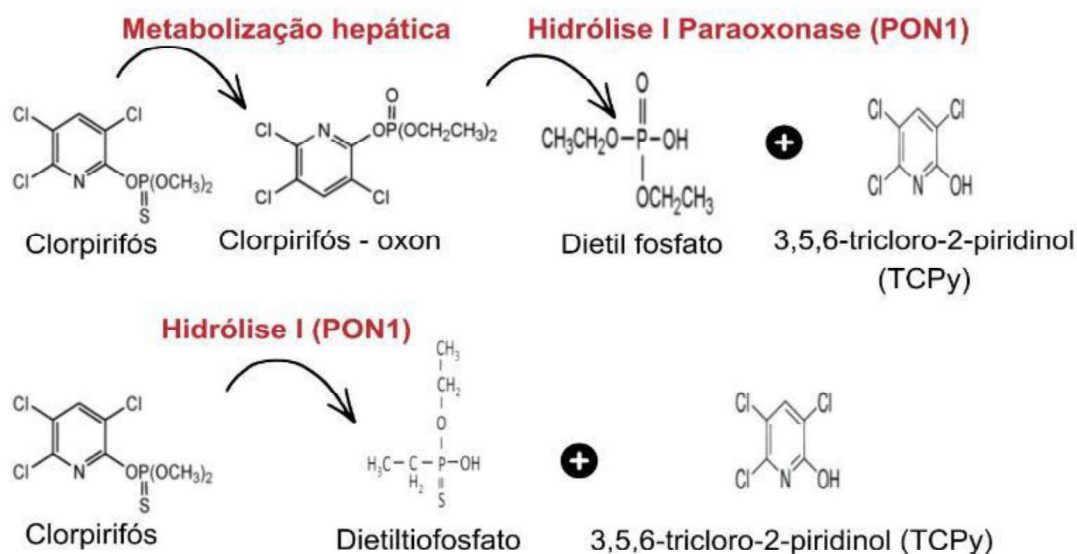
Fonte: Autor.

Em casos de intoxicação aguda, essa hiperestimulação pode culminar em falência respiratória, decorrente da paralisia dos músculos respiratórios, sendo um dos principais mecanismos de morte. Em exposições crônicas ou a baixas doses, o clorpirifós e o clorpirifós-oxon são progressivamente biotransformados em metabólitos mais hidrossolúveis, como o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCPy) e o dimetiltiofosfato, que é predominantemente excretado pela urina (mais de 80%), com menor fração eliminada pelas fezes (Eaton *et al.*, 2008).

O clorpirifós é um composto de baixo peso molecular (aproximadamente 350,6 g/mol), de aspecto cristalino, odor característico semelhante a mercaptanos e baixa solubilidade em água (Pubchem, 2026). Após a exposição, é amplamente absorvido pelo intestino delgado, podendo interagir com a glicoproteína-P, uma proteína de efluxo presente no epitélio intestinal (Cook; Shenoy, 2003; Lanning *et al.*, 1996). Em estudos experimentais, o clorpirifós apresenta rápida absorção, especialmente em animais jovens e, de forma ainda mais pronunciada, em fetos, uma vez que a barreira placentária não é totalmente eficaz em impedir a passagem desse organofosforado. Em humanos, a absorção oral também é rápida, embora apresente variações conforme a formulação e as condições de exposição descritas na literatura. Seus metabólitos podem ser detectados nas excretas poucas horas após a exposição (cerca de 6 horas), e, em casos de intoxicação aguda, os efeitos clínicos podem se manifestar rapidamente (Eaton *et al.*, 2008).

O clorpirifós sofre extensiva biotransformação no organismo (Figura 6), sendo a etapa mais relevante a dessulfuração mediada pela CYP450, que gera o metabólito ativo clorpirifós-oxon, responsável pela inibição da acetilcolinesterase. A detoxificação ocorre principalmente por hidrólise do oxon, catalisada por enzimas como a paraoxonase, formando o TCPy, o principal produto excretado na urina. Outras vias metabólicas incluem a desarilação oxidativa mediada por CYP450, além de reações de conjugação com glutatona, ácido glicurônico e sulfato, que aumentam a solubilidade e facilitam a excreção. A eficiência dessas vias pode variar conforme espécie, idade e fatores genéticos, influenciando a suscetibilidade à toxicidade do composto (Eaton *et al.*, 2008).

Figura 6 - Processo de metabolização e biotransformação do clorpirifós



Fonte: Adaptado de Eaton *et al.* (2008).

As propriedades físico-químicas dos pesticidas são fundamentais para compreender seu comportamento ambiental, especialmente no que se refere à sua dispersão, persistência e aos potenciais impactos sobre organismos não alvo. Entre essas propriedades, destacam-se o coeficiente de adsorção ao solo (K_{oc}), o coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}) e a meia-vida no solo (DT_{50}), que influenciam diretamente a mobilidade, a bioacumulação e a permanência desses compostos no ambiente (Tudi *et al.*, 2021).

O clorpirifós apresenta meia-vida no solo variando entre 7 e 120 dias, enquanto o 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCPy), seu principal produto de biodegradação, permanece no ambiente por períodos mais prolongados, com meia-vida entre 65 e 360 dias. Essas variações dependem das características do solo e das condições ambientais, como temperatura, umidade, teor de matéria orgânica e atividade microbiana (Nandhini; Harshiny; Gummadi, 2021). Embora o clorpirifós apresente elevado coeficiente de adsorção ao solo (K_{oc}) e alto coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}), favorecendo sua retenção na matéria orgânica e reduzindo sua mobilidade, o TCPy possui maior solubilidade em água, maior mobilidade no solo e maior persistência ambiental. Essas características aumentam seu potencial de lixiviação e de contaminação de águas subterrâneas, como os lençóis freáticos, tornando-o um importante contaminante ambiental (ATSDR, 1997).

Somada à persistência ambiental do clorpirifós e de seu principal metabólito, estudos comprovam sua acentuada toxicidade para organismos não alvo. O composto

é classificado como altamente tóxico para abelhas, invertebrados aquáticos e peixes, causando efeitos letais e subletais que comprometem funções ecológicas essenciais (EFSA, 2012; EPA, 2003).

Para mitigar esses riscos, estabelecem-se valores de Ingestão Diária Aceitável (IDA), que determinam limites de segurança para a exposição humana aos agrotóxicos (FAO, 2025). Atualmente, observa-se uma acentuada divergência regulatória em nível global quanto a esses limites. Até 2014, a substância era autorizada na União Europeia, com IDA de 0,001 mg/kg de peso corporal/dia; entretanto, após processo de reavaliação conduzido pela EFSA em 2019, concluiu-se que não era possível estabelecer um nível seguro de exposição, resultando no banimento do composto no bloco europeu (EFSA, 2019). Situação semelhante ocorreu nos Estados Unidos, onde a *Environmental Protection Agency* (EPA) adotava uma dose de referência (RfD) de aproximadamente 0,0003 mg/kg/dia até 2020, passando posteriormente por processos de reavaliação, restrições regulatórias e disputas judiciais que culminaram em decisões conflitantes quanto ao seu uso (EPA, 2024). Em contraste, no Brasil, a ANVISA ainda permite o uso do clorpirifós em diversas culturas, adotando uma IDA de 0,01 mg/kg de peso corporal/dia (ANVISA, 2021). Essa divergência evidencia um cenário regulatório heterogêneo, no qual diferentes critérios são aplicados à avaliação de risco, potencialmente expondo ecossistemas e a saúde humana a efeitos adversos, inclusive em baixas doses, especialmente em populações vulneráveis.

Até o ano de 2020, o clorpirifós figurava entre as moléculas mais comercializadas no Brasil, ocupando a décima posição. Com o avanço do uso de herbicidas, deixou de integrar o ranking geral dos produtos mais vendidos. No entanto, dentro da classe dos organofosforados, permanece entre os agroquímicos mais comercializados, ocupando a quarta posição nos relatórios de comercialização disponíveis (IBAMA, 2021, 2023). No Brasil, relatórios de vigilância monitoram e acompanham o uso de agrotóxicos nos cultivos, por meio da coleta de amostras e da análise de informações relacionadas ao uso irregular dessas substâncias, incluindo sua aplicação em culturas não autorizadas e o uso em níveis acima dos limites permitidos. No relatório mais recente, o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) identificou que o clorpirifós ainda apresenta detecções irregulares em diferentes culturas, de forma recorrente ao longo dos anos

de avaliação (ANVISA, 2023; 2024b).

Os questionamentos acerca do uso do clorpirifós intensificaram-se à medida que evidências acumuladas na literatura científica passaram a associar esse agroquímico a efeitos adversos relevantes, especialmente no neurodesenvolvimento, mesmo em níveis de exposição considerados baixos. Avaliações conduzidas pela EFSA (2019a, 2019b) destacaram não apenas a consistência dessas associações, mas também lacunas críticas quanto ao seu potencial carcinogênico e genotóxico, impedindo a definição de um nível seguro de exposição.

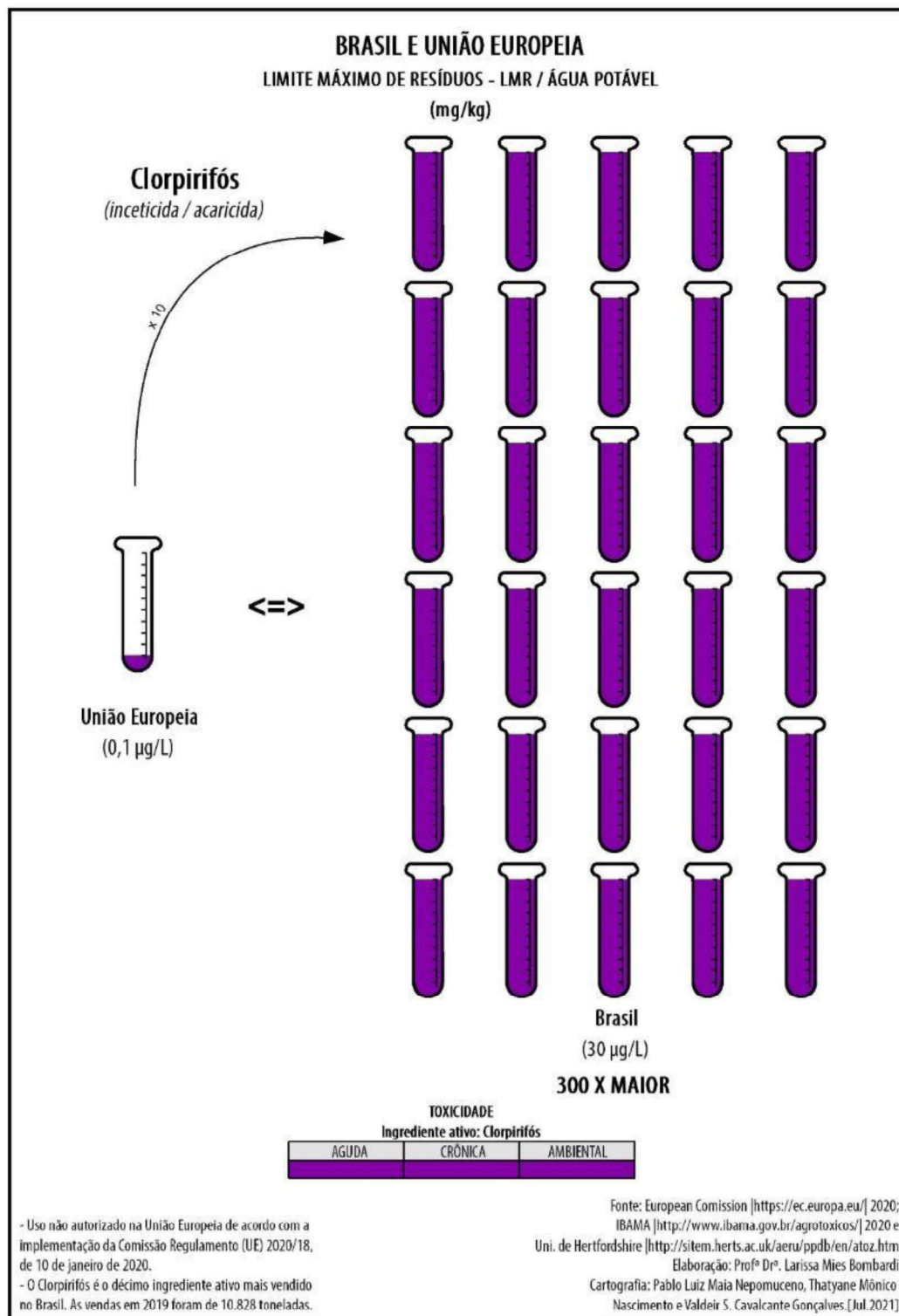
1.2 SÍNTESE CRÍTICA: O COLONIALISMO QUÍMICO

O conceito de colonialismo químico (Bombardi, 2023) descreve a assimetria na qual substâncias químicas, especialmente agrotóxicos proibidos ou restritos em países da União Europeia e nos Estados Unidos, continuam sendo produzidas e exportadas para países em desenvolvimento. Sob essa dinâmica, o clorpirifós, banido na União Europeia, permanece amplamente utilizado no Brasil, onde aproximadamente 30% dos agrotóxicos autorizados são proibidos no bloco europeu. Evidenciando uma contradição regulatória internacional.

Países latino-americanos, como Brasil e Argentina, configuram-se como importantes mercados receptores de agrotóxicos produzidos e comercializados por empresas sediadas no hemisfério norte. Em termos de consumo, enquanto os Estados Unidos e a China consumiram cerca de 257 mil e 244 mil toneladas de agrotóxicos em 2021, respectivamente, o Brasil liderou o consumo global com 719 mil toneladas, seguido pela Argentina, com 527 mil toneladas. Entre 2018 e 2019, a União Europeia exportou para o Mercosul cerca de 6,84 mil toneladas de defensivos proibidos em seu próprio território, integrando um volume total de exportação global que atingiu 2 milhões de toneladas em 2021 (Bombardi, 2023).

Há também uma discrepância nos limites máximos de resíduos permitidos, que podem ser significativamente mais elevados no Brasil em relação aos padrões europeus (Figura 7). Essa disparidade regulatória transfere riscos ambientais e sanitários para nações com legislações mais permissivas, preservando os mercados do hemisfério norte (Bombardi, 2023).

Figura 7 - Representação do LMR de clorpirifós permitido na União Europeia em relação ao permitido no Brasil.



Fonte: Bombardi (2023).

As preocupações relacionadas ao uso intensivo de agrotóxicos também se estendem aos impactos diretos sobre a saúde humana, especialmente em decorrência da exposição ambiental. Casos de intoxicação aguda são particularmente alarmantes, considerando que a pulverização aérea promove a dispersão dessas

substâncias em larga escala, atingindo não apenas as culturas agrícolas, mas também o solo, os recursos hídricos e populações vulneráveis, como comunidades rurais e povos indígenas. Destaca-se um episódio ocorrido em 2018, no estado do Paraná, em que a pulverização aérea de paraquate resultou na intoxicação de 96 pessoas, em sua maioria crianças. Dados adicionais indicam que, entre 2010 e 2019, o país registrou a contaminação por agrotóxicos de 3.754 crianças na faixa de 0 a 14 anos (Bombardi, 2023).

O paradoxo reside no fato de o Brasil figurar como um dos maiores produtores e exportadores de alimentos do mundo, sustentando cadeias produtivas altamente dependentes de insumos químicos. Esse cenário evidencia uma contradição estrutural, na qual países em desenvolvimento assumem os ônus toxicológicos associados à produção agrícola global, reforçando desigualdades históricas e configurando o fenômeno do colonialismo químico. Tal contexto é agravado por legislações mais permissivas, que permitem o uso de substâncias com evidências científicas de risco, incluindo efeitos sobre o neurodesenvolvimento, potencial carcinogênico e ação como desreguladores endócrinos, como é o caso do clorpirifós (Bombardi, 2023).

1.3 PERÍODOS CRÍTICOS DO DESENVOLVIMENTO E VULNERABILIDADE A DISRUPTORES ENDÓCRINOS: IMPLICAÇÕES TOXICOLÓGICAS DA EXPOSIÇÃO AO CLORPIRIFÓS

Na toxicologia do desenvolvimento, organismos jovens representam uma população particularmente vulnerável, sendo mais suscetíveis aos efeitos nocivos de xenobióticos (Kearns et al., 2003; Grandjean; Landrigan, 2014). Nesse contexto, os organofosforados, têm se mostrado importantes disruptores endócrinos, capazes de interferir em processos fisiológicos essenciais durante fases críticas do desenvolvimento. Em ratos, o período pós-natal pode ser dividido em quatro fases relacionadas ao Dia Pós Natal (DPN): neonatal (DPN 1 a 7), infantil (DPN 8 a 21), juvenil (DPN 22 a 35) e peripuberal (DPN 36 a 55/65). Os períodos das fases juvenil e peripuberal em ratos apresentam correspondência aproximada com a infância e a adolescência em humanos (Perobelli, 2014).

Os períodos da infância e da fase peripuberal demandam atenção especial, em razão da elevada suscetibilidade ao desenvolvimento de alterações biológicas

decorrentes da exposição a xenobióticos (Heindel; Vandenberg, 2015). Nessa fase, o organismo encontra-se particularmente sensível a processos de *imprinting* induzidos por disruptores endócrinos, os quais podem resultar em efeitos persistentes ou permanentes (Csaba, 2011). Adicionalmente, trata-se de um período caracterizado por intensas modificações endócrinas, bem como por mudanças na morfologia e composição corporal, no metabolismo e no comportamento. Importante destacar que determinadas alterações decorrentes dessas exposições podem não se manifestar imediatamente, sendo observadas apenas em fases posteriores da vida, como, por exemplo, no aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias (Perobelli, 2014).

Do ponto de vista fisiológico, organismos jovens apresentam características que potencializam os efeitos de disruptores endócrinos. Entre elas, destacam-se a imaturidade de barreiras biológicas, que favorece maior absorção de xenobióticos, diferenças na composição corporal, e o desenvolvimento ainda incompleto de sistemas fundamentais, como o enzimático hepático, a síntese proteica e função renal (Kearns et al., 2003; Hines, 2008). Esses fatores, em conjunto, demonstram contribuir para uma maior vulnerabilidade a exposições químicas durante fases críticas do desenvolvimento.

Conceitualmente, a OMS em conjunto com o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (WHO; UNEP, 2013), definem que “Disruptor endócrino é uma substância exógena ou mistura que altera funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, causa efeitos adversos à saúde de um organismo intacto, de sua prole ou de populações.”

As evidências relacionadas aos efeitos do clorpirifós sobre o neurodesenvolvimento e o sistema endócrino tornam particularmente relevante a análise de sua toxicidade durante períodos críticos do desenvolvimento. Nessa perspectiva, documentos regulatórios e estudos toxicológicos têm apontado desfechos preocupantes, incluindo alterações neurocomportamentais, disfunções endócrinas, estresse oxidativo e possíveis impactos imunológicos. Em conjunto, esses achados reforçam um cenário de incerteza científica associado a riscos potencialmente significativos, sobretudo para populações vulneráveis, como gestantes e crianças, e têm fundamentado decisões regulatórias mais restritivas em diferentes países, evidenciando a necessidade de reavaliação contínua quanto à segurança e ao uso desse composto. No âmbito hepático, predominam alterações

histológicas e bioquímicas, incluindo vacuolização de hepatócitos, necrose, infiltração inflamatória e distúrbios no metabolismo lipídico e proteico, além de elevação de enzimas hepáticas como alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP) (Abdulkareem; Ajetunmobi; Yekini, 2020; Kunwar *et al.*, 2022; Olsvik *et al.*, 2019; Reygner *et al.*, 2016; Samarghandian *et al.*, 2020; Soum *et al.*, 2022). Essas manifestações são corroboradas por alterações moleculares relevantes, como modulação da expressão gênica, desregulação de vias metabólicas e alterações em receptores nucleares, indicando comprometimento funcional do fígado (De Anna *et al.*, 2021; Olsvik *et al.*, 2019). Em relação aos efeitos renais, embora menos explorados, evidências apontam para o aumento de marcadores de disfunção, como ureia e creatinina, além de relatos de alterações renais em populações expostas e danos ao DNA em células renais (Catherine *et al.*, 2014; Kunwar *et al.*, 2022; Soum *et al.*, 2022).

Dos efeitos genético e epigenético, destacam-se danos ao DNA evidenciados por ensaios cometa e alterações no padrão de metilação do DNA, acompanhadas por mudanças na expressão de genes reguladores epigenéticos, sugerindo potencial genotóxico e impacto na regulação gênica (Soum *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2014). Por fim, do ponto de vista histopatológico geral, os estudos evidenciam lesões teciduais consistentes, como degeneração celular, fibrose, atrofia e alterações estruturais em órgãos-alvo, reforçando a toxicidade sistêmica do composto (Abdulkareem; Ajetunmobi; Yekini, 2020; De Anna *et al.*, 2021; Samarghandian *et al.*, 2020). Em conjunto, esses achados demonstram que o clorpirifós promove efeitos multissistêmicos, envolvendo desde alterações moleculares até danos estruturais em tecidos, com implicações relevantes para a saúde dos organismos expostos.

1.4 MECANISMOS DE ESTRESSE OXIDATIVO HEPATORRENAL NO PERÍODO PERIPUBERAL: PAPEL DA MATURAÇÃO FUNCIONAL E DA SUSCETIBILIDADE À EXPOSIÇÃO A ORGANOFOSFORADOS

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade do sistema antioxidante em neutralizá-las. Esse sistema é composto por mecanismos enzimáticos, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), e não enzimáticos, como a glutathione

reduzida (GSH), que atuam na detoxificação de radicais livres, incluindo o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$) (Rashid; Sinha; Sil, 2013). Quando há produção excessiva dessas espécies, frequentemente decorrente de injúrias celulares ou exposição a agentes tóxicos, ocorre a formação de compostos altamente reativos capazes de interagir com lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, promovendo danos estruturais e funcionais. No fígado e nos rins, a mitocôndria constitui uma das principais fontes endógenas de ERO, especialmente em condições de disfunção da cadeia respiratória (Cichoz-Lach; Michalak, 2014; Rashid; Sinha; Sil, 2013; Sureshbabu; Ryter; Choi, 2015).

Embora a desregulação endócrina seja um dos principais mecanismos envolvidos na toxicidade do clorpirifós durante o desenvolvimento (Rahman et al., 2021), evidências crescentes indicam que seus efeitos biológicos não se restringem às alterações hormonais (Rahman et al., 2021; Coppola et al., 2025). Diversos estudos demonstram que a exposição a esse organofosforado também está associada à indução de estresse oxidativo, um processo capaz de comprometer a homeostase celular e desencadear danos moleculares em diferentes órgãos-alvo (Crumpton; Seidler; Slotkin, 2000; Coppola et al., 2025). Nesse contexto, fígado e rins assumem papel de destaque, tanto por sua participação nos processos de biotransformação e eliminação de xenobióticos quanto por sua elevada suscetibilidade aos efeitos decorrentes do desequilíbrio redox, especialmente durante períodos críticos do desenvolvimento.

O fígado é um dos principais sítios de geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), devido à sua elevada atividade metabólica e à intensa atuação do sistema enzimático envolvido na biotransformação de xenobióticos. Em condições fisiológicas, as ERO desempenham papéis importantes na sinalização celular e na defesa imunológica. Entretanto, a produção excessiva dessas espécies, associada à incapacidade do sistema antioxidante em neutralizá-las, resulta em estresse oxidativo (Cichoz-Lach; Michalak, 2014). Nos rins, observa-se elevada suscetibilidade à formação de ERO, em razão da alta taxa de filtração, do elevado consumo de oxigênio e da abundância de mitocôndrias, além da atividade de enzimas como a NADPH oxidase, importantes fontes de espécies reativas (Sureshbabu; Ryter; Choi, 2015).

Além da produção endógena, a exposição a xenobióticos pode intensificar significativamente a geração das ERO, especialmente durante reações catalisadas

pela CYP450 (Zangar; Davydov; Verma, 2004). Esse aumento contribui para a peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial e ativação de vias inflamatórias, configurando um eixo central na fisiopatologia hepática. Do ponto de vista morfológico, o estresse oxidativo está associado a alterações no parênquima hepático, como esteatose (macro e microvesicular), necrose hepatocelular, com predileção pela região centrolobular, infiltração inflamatória, congestão sinusoidal e, em estágios mais avançados, fibrose e remodelamento tecidual. Paralelamente, essas alterações estruturais são acompanhadas por modificações em marcadores bioquímicos clássicos, como o aumento das transaminases hepáticas (ALT e AST), indicativos de dano hepatocelular, elevação de produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), e redução dos níveis de antioxidantes endógenos, como a GSH (Cichoz-Lach; Michalak, 2014; Jaeschke, 2002; Zangar; Davydov; Verma, 2004). Em conjunto, esses parâmetros reforçam a íntima relação entre o desequilíbrio redox e a progressão do dano hepático induzido por xenobióticos, a exemplo dos agrotóxicos.

o estresse oxidativo também pode ser avaliado por meio da quantificação de tióis livres totais e proteínas carboniladas. Os tióis livres, representados principalmente pela GSH e grupos sulfidril (-SH) de proteínas, constituem um importante sistema antioxidante não enzimático, atuando na neutralização de espécies reativas e na manutenção do estado redox celular, ou seja, sua depleção está amplamente associada ao aumento da vulnerabilidade ao dano oxidativo (Jones, 2006; Ulrich; Jakob, 2019). Assim, a redução dos níveis de tióis totais reflete o consumo de GSH e -SH frente ao excesso de espécies reativas. Por outro lado, a formação de proteínas carboniladas é um marcador amplamente utilizado de dano oxidativo irreversível a proteínas, resultante da oxidação direta de resíduos de aminoácidos ou de reações secundárias com produtos da peroxidação lipídica (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Fedorova; Bollineni; Hoffmann, 2014; Levine *et al.*, 1990). Em conjunto, a diminuição dos tióis livres e o aumento dos níveis de proteínas carboniladas fornecem evidências robustas do desequilíbrio redox e da extensão do dano celular induzido por xenobióticos.

Organismos jovens apresentam imaturidade funcional hepática e renal, o que impacta diretamente a toxicocinética e a resposta a xenobióticos. No fígado, a maturação pós-natal envolve a regulação temporal da expressão e atividade de

enzimas de biotransformação, especialmente aquelas da família CYP450. Isoformas como CYP3A, CYP2C e CYP2E1 apresentam expressão reduzida ao nascimento e aumentam progressivamente ao longo do desenvolvimento, o que limita inicialmente a capacidade de metabolização de compostos exógenos. Além disso, enzimas de fase II, como as UGTs e GSTs, também apresentam atividade reduzida em fases precoces, comprometendo reações de conjugação e eliminação (Hines, 2007; Kearns *et al.*, 2003). Paralelamente, o sistema antioxidante hepático encontra-se em desenvolvimento, com menores níveis de GSH e atividade de enzimas como SOD e CAT, o que favorece o acúmulo de ERO (Dennery, 2010; Kearns *et al.*, 2003).

No rim humano, a maturação funcional pós-natal é igualmente determinante. O fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular são significativamente menores em neonatos e aumentam gradualmente até atingirem níveis semelhantes aos de adultos. Essa limitação reduz a depuração de xenobióticos circulantes. Adicionalmente, o sistema tubular ainda é imaturo, com menor expressão e atividade de transportadores de membrana, como transportadores de ânions orgânicos e cátions orgânicos, além de transportadores de efluxo como P-glicoproteína e proteínas da família MRP (Kearns *et al.*, 2003). Essa condição compromete tanto a secreção ativa quanto a excreção de compostos tóxicos. Soma-se a isso a elevada demanda metabólica do túbulo proximal, rico em mitocôndrias, associada a um sistema antioxidante ainda em consolidação, o que pode tornar o rim, especialmente o túbulo contorcido proximal altamente suscetível ao estresse oxidativo (Jang *et al.*, 2013; Kearns *et al.*, 2003).

Em conjunto, a imaturidade dos sistemas enzimáticos hepáticos, das vias de conjugação, dos mecanismos de transporte renal e das defesas antioxidantes contribui para uma menor capacidade de metabolização e eliminação de xenobióticos, aumentando a suscetibilidade a danos celulares e ao desenvolvimento de estresse oxidativo em organismos jovens.

Sob essa perspectiva, a exposição a xenobióticos durante fases precoces do desenvolvimento pode resultar em maior acúmulo de metabólitos reativos e em desequilíbrio redox. A atividade metabólica incompletamente desenvolvida, associada à menor eficiência dos sistemas antioxidantes, favorece a geração excessiva de ERO, especialmente em órgãos altamente metabólicos como fígado e rins. Esse desbalanço entre a produção de ERO e a capacidade antioxidante culmina em estresse oxidativo,

promovendo peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA (Dennery, 2010; Kearns *et al.*, 2003; Z. Zhang *et al.*, 2025). Além disso, a elevada densidade mitocondrial e a intensa atividade metabólica desses tecidos potencializam a produção endógena de espécies reativas, agravando o dano celular (Bhargava; Schnellmann, 2017; Zhang *et al.*, 2021). Dessa forma, a imaturidade funcional hepatorenal, associada à exposição a agentes tóxicos, constitui um fator determinante para o aumento da suscetibilidade ao estresse oxidativo e às lesões teciduais durante o período peripuberal.

A exposição de organismos jovens, ainda em processo de maturação fisiológica e morfológica, a compostos químicos como agrotóxicos organofosforados, como o clorpirifós, está associada a diversas alterações hepáticas. Entre essas, destacam-se o aumento na produção de ERO e o consequente estresse oxidativo, que desempenha papel central na fisiopatologia da lesão hepática. Esse ambiente pró-oxidante contribui para alterações no parênquima hepático, incluindo a ativação de células estreladas hepáticas, fundamentais na resposta fibrogênica do fígado, uma vez que as ERO atuam como importantes mediadoras de sua ativação (Friedman, 2008; Karami-Mohajeri; Abdollahi, 2011). Além disso, em organismos jovens, os danos hepáticos podem ocorrer de forma precoce e, em alguns casos, preceder alterações detectáveis nos marcadores bioquímicos clássicos de lesão hepática, como as transaminases ALT e AST, evidenciando a sensibilidade do tecido hepático a insultos tóxicos durante fases críticas do desenvolvimento (McGill; Jaeschke, 2019).

Nos rins, a nefrotoxicidade associada ao clorpirifós envolve não apenas a formação de metabólitos reativos, mas também mecanismos complexos de transporte e eliminação. Após biotransformação hepática, o clorpirifós é convertido em TCP, que é distribuído sistemicamente e eliminado predominantemente pela urina (Eaton *et al.*, 2008). No entanto, a depuração renal desses compostos depende de transportadores específicos, como o transportador de cátions orgânicos 2, altamente expresso na membrana basolateral das células do túbulo contorcido proximal. Por sua vez, o clorpirifós pode inibir competitivamente esse transportador, comprometendo a captação e o fluxo tubular de xenobióticos, reduzindo sua excreção e favorecendo o acúmulo intracelular (Chiba *et al.*, 2013).

Adicionalmente, a imaturidade dos sistemas de transporte e excreção em organismos jovens pode intensificar esse processo, aumentando a probabilidade de

recirculação sistêmica de metabólitos como o TCPy e prolongando o tempo de exposição tecidual (Kearns *et al.*, 2003). Esse cenário, associado à elevada atividade metabólica e à alta densidade mitocondrial do túbulo proximal, potencializa a geração de ERO, promovendo disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica e danos a proteínas e ao DNA (Bhargava; Schnellmann, 2017). Em conjunto, esses mecanismos estabelecem um eixo crítico entre biotransformação, transporte renal e estresse oxidativo, que contribui para a elevada suscetibilidade do rim, especialmente em fases precoces do desenvolvimento, à lesão induzida por organofosforados.

A compreensão do impacto sistêmico dos xenobióticos exige a análise detalhada de órgãos responsáveis pelo processamento dessas substâncias. Assim, o fígado, sítio central de detoxificação, e os rins, responsáveis pela excreção e balanço eletrolítico, apresentam particularidades morfofisiológicas fundamentais para o entendimento da toxicidade aqui discutida.

1.5 REFERÊNCIAS

ABDULKAREEM, S. I.; AJETUNMOBI, M. O.; YEKINI, Y. O. Histopathological alterations in some tissues of heteroclaris juveniles exposed to lethal and sub-lethal concentrations of chlorpyrifos and ameliorative potentials of vitamin e to the toxicity of the pesticide. **Tanzania Journal of Agricultural Sciences**, Morogoro, v. 19, n. 2, p. 67–77, 2020. Disponível em:

<https://www.ajol.info/index.php/tjags/article/view/205051>. Acesso em: 4 maio 2026.

ADAPAR - AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ. **Agrotóxicos:** inseticidas. Curitiba: ADAPAR, 2026. Disponível em:

<https://www.adapar.pr.gov.br/Pagina/Agrotoxicos-Inseticidas>. Acesso em: 19 abr. 2026.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **C20:** Clorpirifós.

Brasília: ANVISA, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/c/4226json-file-1>. Acesso em: 19 abr. 2026.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Nota técnica nº 140/2024:** diretrizes para a realização da classificação do produto formulado obtido a partir de produto técnico equivalente. Brasília: ANVISA, 2024a. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/agrotoxicos/notas-tecnicas/nota-tecnica-rdc-950-24.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2026.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA):** relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2018 a 2022. Brasília: ANVISA, 2023.

Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/relatorio-2018-2019-2022>. Acesso em: 22 abr. 2026.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)**: relatório plurianual 2023–2025. Brasília: ANVISA, 2024b. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/relatorio-2013-para-2023>. Acesso em: 22 abr. 2026.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografia do clorpirifós**. Brasília: ANVISA, 2021.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for chlorpyrifos**. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1997. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp84.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2026.

AYILARA, M. S. *et al.* Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 14, p. 1-16, fev. 2023. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1040901>.

BHARGAVA, P.; SCHNELLMANN, R. G. Mitochondrial energetics in the kidney. **Nature Reviews Nephrology**, London, v. 13, n. 10, p. 629-646, 2017. doi: <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.107>.

BOMBARDI, L. M. **Agrotóxicos e colonialismo químico**. São Paulo: Elefante, 2023.

BORTOLI, S.; COUMOUL, X. Impact of pesticides on human health. **Pratiques En Nutrition**, [S. l.], v. 14, n. 53, p. 18-24, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pranut.2017.12.005>.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção [...] e a fiscalização de agrotóxicos. Brasília, DF: Diário Oficial da União, 12 jul. 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm. Acesso em: 14 abr. 2026.

BRESLIN, W. J. *et al.* Evaluation of the developmental and reproductive toxicity of chlorpyrifos in the rat. **Fundamental and Applied Toxicology**, Orlando, v. 29, p. 119-130, 1996. doi: <https://doi.org/10.1006/faat.1996.0013>.

CATHERINE, L. C. *et al.* Chlorpyrifos Exposure and Respiratory Health among Adolescent Agricultural Workers. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 11, n. 12, p. 13117–13129, 2014. doi: <https://doi.org/10.3390/IJERPH111213117>.

CHIBA, S. *et al.* Human organic cation transporter 2 (hOCT2): Inhibitor studies using S2-hOCT2 cells. **Toxicology**, Amsterdam, v. 310, p. 98-103, 2013. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.06.001>.

CICHOZ-LACH, H.; MICHALAK, A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 20, n. 25, p. 8082–8091, 2014. doi: <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i25.8082>.

COOK, T. J.; SHENOY, S. S. Intestinal permeability of chlorpyrifos using the single-pass intestinal perfusion method in the rat. **Toxicology**, Amsterdam, v. 184, n. 2–3, p. 125–133, 2003. doi: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00555-3](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00555-3).

COPPOLA, L.; LORI, G.; TAIT, S.; *et al.* Evaluation of developmental toxicity of chlorpyrifos through new approach methodologies: a systematic review. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 99, p. 935–981, 2025. DOI: 10.1007/s00204-025-04042-2.

CRUMPTON, T. L.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A. Is oxidative stress involved in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos? **Developmental Brain Research**, Amsterdam, v. 121, n. 2, p. 189–195, 2000. DOI: 10.1016/S0165-3806(00)00065-1.

CSABA, G. The biological basis and clinical significance of hormonal imprinting, an epigenetic process. **Clinical Epigenetics**, London, v. 1, n. 3–4, p. 187–196, 2011. DOI: 10.1007/s13148-010-0018-4.

DALLE-DONNE, I. *et al.* Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**, Maryland Heights, v. 9, n. 4, p. 169–176, 2003. doi: [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(03)00031-5).

DE ANNA, J. S. *et al.* Exposure to hydrocarbons and chlorpyrifos alters the expression of nuclear receptors and antioxidant, detoxifying, and immune response proteins in the liver of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 208, p. 111394, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2020.111394>.

DENNERY, P. A. Oxidative stress in development: Nature or nurture? **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 49, n. 7, p. 1147–1151, 2010. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.011>.

EATON, D. L. *et al.* Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 38, suppl. 2, p. 1–125, 2008. doi: <https://doi.org/10.1080/10408440802272158>.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on the science behind the development of a risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). **EFSA Journal**, Parma, v. 10, n. 5, p. 2668, 2012. doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2668>.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos. **EFSA Journal**, Parma, v. 17, n. 8, 2019. doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5809>.

EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Chlorpyrifos**: analysis of risks to endangered and threatened salmon and steelhead. Washington, DC: Office of Pesticide Programs, 2003.

EPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Chlorpyrifos: tolerance revocation. **Federal Register**, Washington, 10 dez. 2024. Disponível em: <https://www.federalregister.gov/documents/2024/12/10/2024-28332/chlorpyrifos-tolerance-revocation>. Acesso em: 22 abr. 2026.

ESTADOS UNIDOS. [7 U.S. Code § 136]. **7 U.S. Code § 136 – Definitions**. Washington, DC: Government Publishing Office, 2013. Disponível em: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/USCODE-2013-title7/html/USCODE-2013-title7-chap6-subchapII-sec136.htm>. Acesso em: 14 abr. 2026.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Pesticides use and trade – 1990–2023. **FAOSTAT Analytical Briefs**, Rome, n. 109, 2025. doi: <https://doi.org/10.4060/cd5968en>

FEDOROVA, M.; BOLLINENI, R. C.; HOFFMANN, R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. **Mass Spectrometry Reviews**, New York, v. 33, n. 2, p. 79-97, 2014. doi: <https://doi.org/10.1002/mas.21381>.

FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 88, n. 1, p. 125–172, 2008. doi: <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2007>.

GARUD, A. *et al.* A scientific review of pesticides: classification, toxicity, health effects, sustainability, and environmental impact. **Cureus**, San Francisco, v. 16, n. 8, 2024. doi: <https://doi.org/10.7759/cureus.67945>.

HEINDEL, J. J.; VANDENBERG, L. N. Developmental origins of health and disease: a paradigm for understanding disease etiology and prevention. **Current Opinion in Pediatrics**, Philadelphia, v. 27, n. 2, p. 248–253, 2015. DOI: 10.1097/MOP.000000000000191.

HINES, R. N. Ontogeny of human hepatic cytochromes P450. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, Kansas City, v. 21, n. 4, p. 169-175, 2007. doi: <https://doi.org/10.1002/jbt.20179>.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Avaliação ambiental para registro de agrotóxicos, seus componentes e afins de uso agrícola**. Brasília: IBAMA, 2026. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/avaliacao-ambiental>. Acesso em: 19 abr. 2026.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatório de comercialização de agrotóxicos no Brasil**: 2020. Brasília: IBAMA, 2021. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br>. Acesso em: 22 abr. 2026.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatório de comercialização de agrotóxicos no Brasil**: 2022. Brasília: IBAMA, 2023. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br>. Acesso em: 22 abr. 2026.

JAESCHKE, H. Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicological Sciences**, San Diego, v. 65, n. 2, p. 166-176, 2002. doi: <https://doi.org/10.1093/toxsci/65.2.166>.

JANG, K.-J. *et al.* Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. **Integrative Biology**, Arkansas, v. 5, n. 9, p. 1119-1129, 2013. doi: <https://doi.org/10.1039/c3ib40049b>.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 8, n. 9-10, p. 1865-1879, 2006. doi: <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.1865>.

KARAMI-MOHAJERI, S.; ABDOLLAHI, M. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: A systematic review. **Human and Experimental Toxicology**, Hampshire, v. 30, n. 9, p. 1119-1140, 2011. doi: <https://doi.org/10.1177/0960327110388959>.

KEARNS, G. L. *et al.* Developmental pharmacology - drug disposition, action, and therapy in infants and children. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 349, n. 12, p. 1157-1167, 2003. doi: <https://doi.org/10.1056/nejmra035092>.

KUNWAR, P. S. *et al.* Modulations of blood biochemical parameters of golden mahseer, *Tor putitora* following exposures to single and mixed organophosphate. **Comparative Biochemistry and Physiology: Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 251, p. 109207, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2021.109207>.

LANNING, C. L. *et al.* Chlorpyrifos oxon interacts with the mammalian multidrug resistance protein, p-glycoprotein. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Washington, v. 47, n. 4, p. 395-407, 1996. doi: <https://doi.org/10.1080/009841096161726>.

LEVINE, R. L. *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 464-478, 1990. doi: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H).

MCGILL, M. R.; JAESCHKE, H. Biomarkers of drug-induced liver injury. **Advances in Pharmacology**, San Diego, v. 85, p. 221-239, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.02.001>.

NANDHINI, A. R.; HARSHINY, M.; GUMMADI, S. N. Chlorpyrifos in environment and food: a critical review of detection methods and degradation pathways. **Environmental Science: Processes & Impacts**, [S. l.], v. 23, n. 9, p. 1255-1277, 2021. doi: <https://doi.org/10.1039/D1EM00178G>.

NICOLOPOULOU-STAMATI, P. *et al.* Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. **Frontiers in Public Health**, Kingdom, v. 4, p. 1-8, jul. 2016. doi: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>.

OLSVIK, P. A. *et al.* Transcriptional effects of dietary chlorpyrifos-methyl exposure in Atlantic salmon (*Salmo salar*) brain and liver. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, Amsterdam, v. 29, p. 43-54, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/J.CBD.2018.11.003>.

PEROBELLI, J. The male peripubertal phase as a developmental window for reproductive toxicology studies. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 20, n. 34, p. 5398-5415, 2014. doi: <https://doi.org/10.2174/1381612820666140205150059>.

PRADO, M. A. M. *et al.* Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochemistry International**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 291-299, 2002. doi: [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(02\)00044-X](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00044-X).

PUBCHEM. **Chlorpyrifos**. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2026. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorpyrifos>. Acesso em: 21 abr. 2026.

RAHMAN, H. U. U.; ASGHAR, W.; NAZIR, W.; *et al.* A comprehensive review on chlorpyrifos toxicity with special reference to endocrine disruption: Evidence of mechanisms, exposures and mitigation strategies. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 755, pt. 2, p. 142649, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142649.

RAMÍREZ-EXPÓSITO, M. J.; CUETO-UREÑA, C.; MARTÍNEZ-MARTOS, J. M. Molecular physiology of the neuronal synapse. **Current Issues in Molecular Biology**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 88, 2026. doi: <https://doi.org/10.3390/cimb48010088>.

RASHID, K.; SINHA, K.; SIL, P. C. An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 62, p. 584-600, out. 2013. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.09.026>.

REYGNER, J. *et al.* Inulin supplementation lowered the metabolic defects of prolonged exposure to chlorpyrifos from gestation to young adult stage in offspring rats. **Plos One**, Califórnia, v. 11, n. 10, p. e0164614, 2016. doi: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0164614>.

SAMARGHANDIAN, S. *et al.* The impact of age-related sub-chronic exposure to chlorpyrifos on metabolic indexes in male rats. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 27, n. 18, p. 22390-22399, 2020. doi: <https://doi.org/10.1007/S11356-020-08814-0>.

SOUM, T. *et al.* Acute Toxicity of Chlorpyrifos (CPF) to juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): genotoxicity and histological studies. **Journal of Fisheries and Environment**, Bangkok, v. 46, n. 1, 2022. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/360384389>. Acesso em: 21 abr. 2026.

SURESHBABU, A.; RYTER, S. W.; CHOI, M. E. Oxidative stress and autophagy: Crucial modulators of kidney injury. **Redox Biology**, Nuthetal, v. 4, p. 208-214, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.001>.

TUDI, M. *et al.* Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 18, n. 3, p. 1–24, 2021. doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>.

ULRICH, K.; JAKOB, U. The role of thiols in antioxidant systems. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 140, p. 14-27, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035>.

UNITED NATIONS. **Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS)**. 8. rev. ed. New York; Geneva: United Nations, 2019.

WANG, C. *et al.* Effects of atrazine and chlorpyrifos on DNA methylation in the liver, kidney and gill of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 108, p. 142-151, 2014. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.003>.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification**: 2019 edition. Geneva: WHO, 2020. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/332193>. Acesso em: 19 abr. 2026.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION; UNEP - UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. **State of the science of endocrine disrupting chemicals – 2012**. Geneva: WHO, 2013.

ZANGAR, R. C.; DAVYDOV, D. R.; VERMA, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 199, n. 3, p. 316-331, 2004. doi: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.01.018>.

ZHANG, I. W. *et al.* Mitochondrial Dysfunction in Advanced Liver Disease: Emerging Concepts. **Frontiers in Molecular Biosciences**, Lausanne, v. 8, p. 1–15, nov. 2021. doi: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.772174>.

ZHANG, Z. *et al.* Reactive oxygen species as key molecules in the pathogenesis of alcoholic fatty liver disease and nonalcoholic fatty liver disease: future perspectives. **Current Issues in Molecular Biology**, Wymondham, v. 47, n. 6, p. 1-27, 2025. doi: <https://doi.org/10.3390/cimb47060464>.

2 JUSTIFICATIVA

A otimização da produção agrícola e o manejo de pragas historicamente fundamentam a segurança alimentar humana. O avanço tecnológico no desenvolvimento de moléculas sintéticas consolidou o papel central dos agrotóxicos na agricultura contemporânea. Contudo, em paralelo ao incremento produtivo, acumulam-se evidências científicas sobre os efeitos deletérios decorrentes da exposição ocupacional, ambiental e alimentar a esses compostos (Bortoli; Coumoul, 2018; Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016; Tudi *et al.*, 2021). Desse modo, as exposições agudas ou crônicas associam-se a desordens fisiológicas, bioquímicas e moleculares, o que impõe a reavaliação dos critérios de segurança da exposição dessas substâncias.

Dentre as classes disponíveis, os organofosforados demandam atenção em virtude de seu potencial neurotóxico e da capacidade de desencadear alterações sistêmicas, tais como efeitos mutagênicos, genotóxicos e desregulações metabólicas. Tais repercussões tornam-se críticas durante janelas do desenvolvimento marcadas por imaturidade funcional e alta vulnerabilidade a insultos tóxicos (Dennery, 2010; Kearns *et al.*, 2003; Perobelli, 2014). Sob essa perspectiva, o clorpirifós protagoniza debates regulatórios globais: a União Europeia banuiu a molécula após concluir pela impossibilidade de estabelecer níveis seguros de exposição, especialmente devido aos riscos ao neurodesenvolvimento e ao potencial genotóxico (EFSA, 2019), enquanto os Estados Unidos adotaram restrições sucessivas (EPA, 2024). Em contrapartida, o Brasil mantém a autorização do composto para múltiplas culturas agrícolas, perpetuando seu uso em larga escala no cenário nacional (ANVISA, 2021; 2025).

Para além da inibição clássica da acetilcolinesterase, o clorpirifós induz disfunções oxidativas, inflamatórias e estruturais no fígado e nos rins, órgãos centrais na eliminação de xenobióticos (Cichoz-Lach; Michalak, 2014; Eaton *et al.*, 2008; Sureshbabu; Ryter; Choi, 2015). Entretanto, apesar do crescente número de estudos sobre os efeitos do clorpirifós, ainda existem lacunas importantes relacionadas aos impactos da exposição durante a janela peripuberal, especialmente em modelos com mamífero, considerando que essa fase é marcada por intensa remodelação fisiológica, metabólica e endócrina (Perobelli, 2014).

Para mitigar essa lacuna, o presente delineamento experimental adotou as doses de 5 e 15 mg/kg de clorpirifós, visando mimetizar cenários de exposição subletal na fase peripuberal. A seleção baseou-se no menor nível de efeito adverso observado (LOAEL, 15 mg/kg) para neurotoxicidade em ratos, com o intuito de evitar manifestações clínicas agudas e viabilizar a identificação de injúrias hepatorreais subclínicas (Breslin *et al.*, 1996). Essas concentrações foram fundamentadas na literatura toxicológica para modelos murinos e correspondem a frações da dose letal média (DL₅₀) capazes de induzir toxicidade subclínica sem provocar mortalidade aguda ou colapso colinérgico severo (Eaton *et al.*, 2008).

A hipótese central desta tese propõe que a exposição peripuberal ao clorpirifós, mesmo em doses subletais, induz alterações hepatorreais subclínicas associadas ao desequilíbrio redox e a modificações histopatológicas precoces. Nesse modelo, a dose de 5 mg/kg foi utilizada para simular uma exposição de baixa intensidade, potencialmente capaz de desencadear respostas adaptativas teciduais iniciais, enquanto a dose de 15 mg/kg foi empregada como um desafio toxicológico moderado, suficiente para sobrecarregar os sistemas antioxidantes hepáticos, favorecer o estresse oxidativo e evidenciar alterações estruturais e funcionais precoces. O emprego desse intervalo confere plausibilidade biológica ao estudo, permitindo investigar alterações moleculares e morfológicas que precedem manifestações clínicas evidentes de disfunção orgânica.

3 OBJETIVOS

O objetivo geral desta tese consistiu em investigar os efeitos hepatorreais subclínicos da exposição repetida ao clorpirifós durante a janela crítica peripuberal em ratos Wistar.

Assim, os objetivos específicos foram:

- Caracterizar o perfil histopatológico e o remodelamento da matriz extracelular hepatorenal após exposição repetida ao inseticida;
- Mensurar o desequilíbrio redox hepático induzido pelo protocolo experimental;
- Consolidar o estado da arte (2014–2024) referente à toxicidade do clorpirifós durante o desenvolvimento pós-natal, mapeando as lacunas teóricas remanescentes.

O conteúdo desta tese organiza-se em dois estudos complementares, estruturados sob a forma dos seguintes manuscritos:

- Artigo 1: Developmental Hepatorenal Toxicity of Chlorpyrifos in Experimental Models: An Integrative Critical Review (2014–2024).
- Artigo 2: Peripubertal Chlorpyrifos Exposure Induces Hepatic Oxidative Stress Without Overt Hepatorenal Toxicity.

4 ARTIGO 1 – DEVELOPMENTAL HEPATORENAL TOXICITY OF CHLORPYRIFOS IN EXPERIMENTAL MODELS: AN INTEGRATIVE CRITICAL REVIEW (2014-2024)

Lucas Marcelo Meira da Silva; Fábio Goulart de Andrade

Esse artigo foi submetido para publicação na revista *Toxicological and Environmental Chemistry*. ISSN: 0277-2248, fator de impacto: 1.1 (2024). As normas para publicação constam no seguinte endereço eletrônico: <https://www.tandfonline.com/action/authorSubmission?show=instructions&journalCode=gtec20#format-free-submission>. O comprovante de submissão encontra-se no anexo A.

Abstract

Chlorpyrifos (CPS) is a widely used organophosphate pesticide with recognized neurotoxic effects; however, the liver and kidneys are also important targets of toxicity, particularly during development. This integrative critical review synthesizes evidence on the hepatorenal effects of CPS exposure during the peripubertal period. A structured literature search was conducted across multiple databases, and studies published between 2014 and 2024 were selected according to predefined eligibility criteria. Eleven studies were included, comprising fish, rodent, avian, and one human observational model. Overall, CPS exposure was associated with hepatic and renal alterations. In aquatic models, CPS induced renal DNA damage and global hypomethylation, indicating early molecular disruption. Hepatic effects included increased transaminase levels, histopathological lesions, and transcriptomic alterations involving metabolic, inflammatory, and oxidative stress pathways. Mechanistically, CPS toxicity has been linked to oxidative stress, mitochondrial dysfunction, lipid metabolism disruption, and epigenetic dysregulation. Combined exposures enhanced toxicity and biochemical alterations.

Despite limitations related to model heterogeneity and limited human evidence, the findings indicate that CPS poses significant hepatorenal risks during development and warrant further mechanistic investigation and regulatory attention.

Keywords: chlorpyrifos; hepatotoxicity; nephrotoxicity; developmental toxicity; organophosphate pesticides; environmental exposure; pesticide toxicity

Highlights

- Developmental exposure to Chlorpyrifos (CPS) impairs liver and kidney maturation.
- Fish, rodent, and avian models demonstrate consistent biochemical and histological damage.
- CPS induces global DNA hypomethylation and MBD2 upregulation in hepatorenal tissues.
- Oxidative stress and mitochondrial dysfunction are core mechanisms of CPS toxicity.
- Co-exposure with other pesticides synergistically intensifies hepatorenal injury.

Introduction

Pesticides are extensively used in modern agriculture, regarded as essential for large-scale crop production and pest control. Yet, substantial evidence indicates that these compounds may exert unintended and potentially harmful effects on non-target organisms, including mammals (Tudi et al. 2021). Several pesticides have been characterized as endocrine disruptors capable of inducing oxidative stress, cellular damage, and molecular alterations associated with carcinogenesis (Gore et al. 2015; Lushchak et al., 2018; Mostafalou and Abdollahi, 2013). Despite these concerns, global pesticide consumption remains high, with countries such as Brazil, the United States, Thailand, and China among the leading users, according to the Food and Agriculture Organization (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2023).

Within this context, chlorpyrifos (CPS) has emerged as a compound of significant toxicological concern. Its continued use has been increasingly questioned due to the lack of clearly established safe exposure thresholds for humans. In 2019, the European Food Safety Authority (EFSA) concluded that CPS and chlorpyrifos-methyl should be banned within the European Union, citing evidence of developmental neurotoxicity and unresolved uncertainties regarding carcinogenic potential (European Food Safety Authority, 2019a, 2019b). Similarly, regulatory actions in the United States have reflected comparable concerns (United States Environmental Protection Agency, 2020). Nevertheless, CPS remains in use in Brazil, which is both one of the largest consumers and exporters of agricultural products (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2024; Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2023). This discrepancy highlights a critical gap between regulatory precaution and agricultural practice, raising important questions regarding risk assessment and public health protection.

National monitoring data from Brazil further reinforce these concerns, as chlorpyrifos has been repeatedly identified among the pesticides most frequently detected above permitted levels in food samples (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2024). Mechanistically, CPS is an organophosphate insecticide that inhibits AChE and butyrylcholinesterase, enzymes primarily associated with the central nervous system but also widely distributed in peripheral tissues such as the liver, kidneys, and plasma (Eaton et al, 2008). Crucially, a growing body of evidence suggests that CPS toxicity extends beyond cholinesterase inhibition, involving oxidative stress, metabolic disruption, and molecular alterations across multiple organ systems (European Food Safety Authority, 2019a).

From a developmental toxicology perspective, juvenile organisms represent a particularly vulnerable population (Perobelli, 2014). The functional immaturity of xenobiotic-metabolizing systems, particularly cytochrome P450 (CYP450) enzymes in the liver and kidneys, may significantly alter the balance between bioactivation and detoxification pathways.

This imbalance heightens susceptibility to reactive metabolite formation, oxidative stress, and downstream cellular damage, including inflammation and genomic instability. Although these vulnerabilities are recognized, they remain insufficiently explored in the context of CPS exposure during the peripubertal period, a critical developmental window characterized by ongoing physiological and endocrine maturation.

Supporting this concern, experimental evidence from our research group demonstrates that daily gavage exposure of Wistar rats to 5 or 15 mg/kg/day of CPS for 40 days impaired pubertal testicular and epididymal development, adversely affecting spermatogenesis and spermiogenesis (Costa et al, 2024; Costa et al, 2026). Despite substantial literature on prenatal and adult exposure, studies addressing the peripubertal stage remain limited and fragmented. This gap is particularly relevant, as toxicological outcomes during this window reflect not only acute effects but also potential contributors to long-term physiological alterations. Furthermore, establishing translational parallels requires a critical evaluation of the experimental models employed to study this specific developmental timeframe.

Based on these considerations, we hypothesize that chlorpyrifos exposure during the peripubertal period induces subclinical yet biologically significant alterations in renal and hepatic function, mediated by oxidative stress, metabolic disruption, and epigenetic dysregulation, which may not be fully captured by conventional biomarkers of toxicity.

Therefore, considering the regulatory controversies, widespread human exposure, and the biological vulnerability associated with developmental stages, the present integrative critical review aims to address the following question: “What are the effects of chlorpyrifos exposure on renal and hepatic function in studies published between 2014 and 2024?” Ultimately, a better understanding of these mechanisms may contribute to refining risk assessment strategies and informing regulatory policies, with important implications for global public health, particularly in populations exposed during critical windows of development.

Methods

This study was conducted as an integrative review aimed at synthesizing and critically discussing the available evidence on the hepatorenal effects of chlorpyrifos exposure during the peripubertal period. The review followed established stages for integrative synthesis: (a) definition of the topic and research question; (b) establishment of inclusion and exclusion criteria; (c) literature search; (d) extraction of relevant data; (e) critical evaluation of included studies; (f) interpretation and synthesis of results; and (g) presentation of findings (Owonikoko and Alimba, 2024).

Eligibility Criteria

The inclusion criteria comprised original research articles published between 2014 and 2024 that evaluated renal and/or hepatic effects of chlorpyrifos. Only articles published in Portuguese, English, or Spanish were considered, and full-text availability was required. Exclusion criteria included duplicate records, studies not addressing hepatorenal endpoints, and non-peer-reviewed academic works such as dissertations or theses.

Search Strategy

A structured literature search was conducted in the following databases: LILACS, PubMed, Google Scholar, SciELO, and ScienceDirect. Combinations of the following descriptors were used: “chlorpyrifos AND kidney AND liver,” “chlorpyrifos-methyl AND kidney AND liver,” and “chlorpyrifos AND renal function AND hepatic function,” combined with the terms peripubertal, pubescent, juvenile, and adolescent.

Screening and Selection

All records were initially screened based on titles and abstracts. Studies that met the eligibility criteria were subsequently assessed through full-text reading. The study selection process was guided by the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) framework (Page et al, 2021), and a PRISMA-style flowchart is presented in Figure 1.

Data Extraction and Critical Appraisal

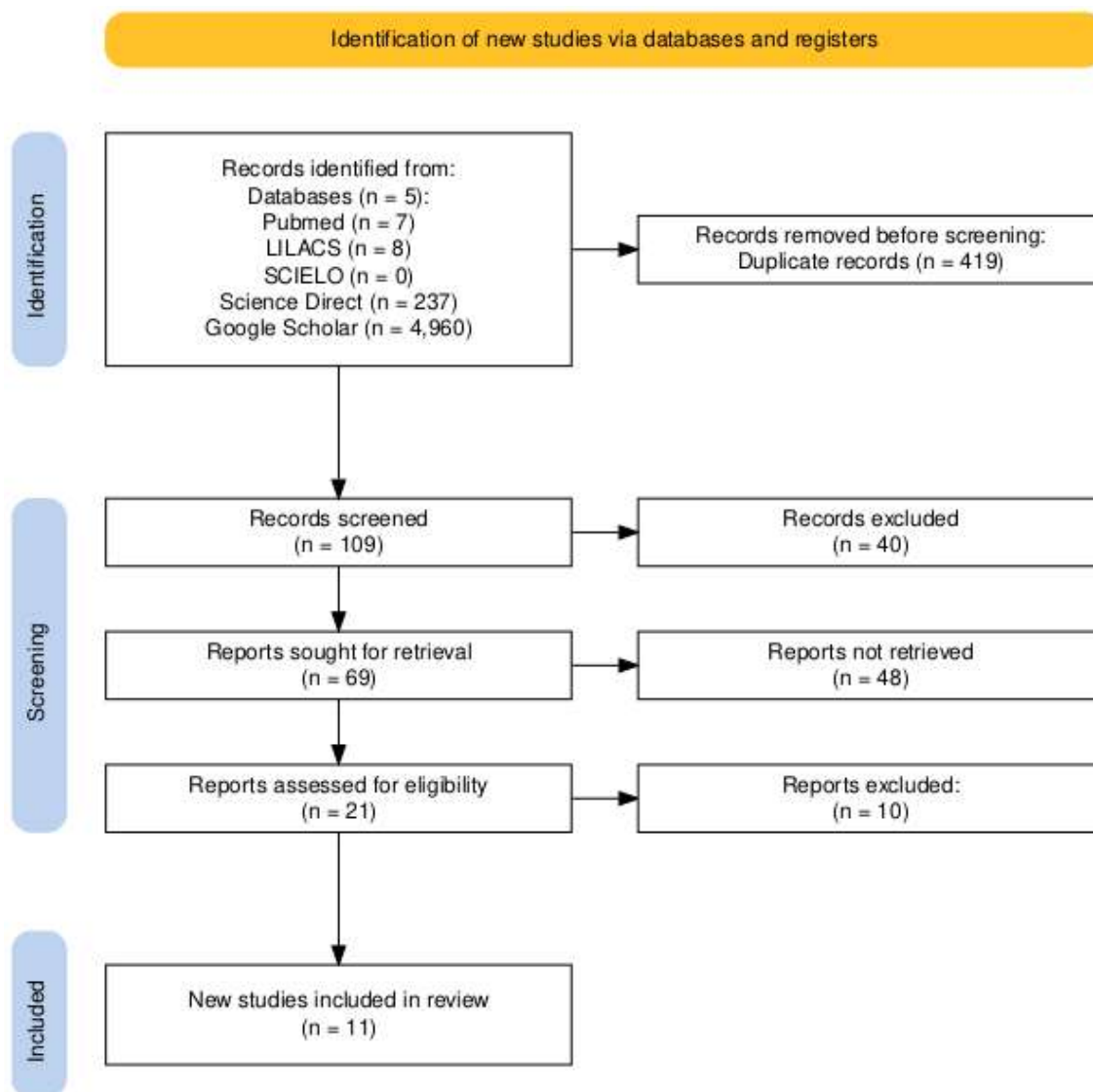
Data extraction included information on study design, experimental models, exposure route, dose, exposure duration, and reported renal and hepatic outcomes. Although a formal risk-of-bias tool was not applied, methodological aspects of the included studies were critically considered, including study design, exposure characterization, outcome assessment, and potential sources of bias, such as lack of randomization, blinding, and co-exposure scenarios.

Results

The search yielded 5,217 records. After screening and full-text evaluation, 11 studies met the inclusion criteria. Two were published in 2014, three in 2016, one in 2019, two in 2020, one in 2021, and two in 2022. Exposure durations ranged from acute (24–96 h) to subchronic (30–67 days). Aquatic vertebrates models predominantly used waterborne exposure, whereas rodent studies employed oral gavage.

Notably, the selected literature exhibits high experimental model heterogeneity. Among the included studies, aquatic models predominated (seven fish studies), compared to a limited number of terrestrial models (three rodent studies, one avian study, and a single human observational cohort). This disproportionate reliance on non-mammalian models underscores a significant translational gap in the current evidence base regarding human pubertal toxicology.

Figure 1 - *Flow Diagram of the stages in the literature review process*



Fonte: Adapted from Haddaway et al (2022).

The main findings on chlorpyrifos exposure identified in the literature are summarized in Table 1.

Table 1 - Summary of studies evaluating the hepatic and renal effects of chlorpyrifos (2014–2024).

References	Subjects/Animals Exposure Route, Duration, and Concentration	Hepatic Effects	Renal Effects
Soum et al. (2022)	Animal: Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>). Exposure route: Water. Exposure duration: 96 h. Concentration: 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, and 0.08 mg/L.	Comet assay: Increased DNA tail percentage; Histology: Hepatocyte vacuolization.	Comet assay: Increased DNA tail percentage, indicating higher DNA damage in kidney cells.
Furlong et al (2014)	Subjects: Male adolescents aged 12–21 years. Exposure route: Air dispersion. Exposure duration: Indeterminate (269 days of work in cotton fields). Concentration: Indeterminate (cotton crop exposure).	Not reported.	Biomonitoring: Elevated detection of TCP (active metabolite) in urine; renal disorders reported (unspecified).
Wang et al (2014)	Animal: Common carp (<i>Cyprinus carpio</i>). Exposure route: Water. Exposure duration: 40 days. Concentration: 1.16, 11.6, and 116 µg/L.	Epigenetic alterations: Reduced DNA methylation, partially reversed after recovery; increased MBD2 mRNA levels, which later decreased during recovery; changes in DNMT gene mRNA levels depending on dose and compound type.	Epigenetic alterations: Decreased DNA methylation, partially reversed after the recovery period; increased MBD2 mRNA levels, which decreased during recovery.

continua...

References	Subjects/Animals Duration, and Concentration	Exposure Route,	Hepatic Effects	Renal Effects	continuação...
Anna et al (2021)	Animal: Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>). Exposure route: Ex vivo (liver). Exposure duration: 1 day. Concentration: 20 µg/L CPS.		GR (glucocorticoid receptor): mRNA induction; Histology: 60% of livers showed moderate atrophy; WAF-CPS group: 80% moderate atrophy, 20% mild steatosis, 20% moderate congestion, and 20% mild focal hemorrhage.	Not reported.	
Abdulkareem, Ajetunmobi and Yekini (2020)	Animal: Heteroclaras. Exposure route: Water. Exposure duration: 96 h. Concentration: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, and 5.0 ppm.		Histopathology: Cytoplasmic degeneration, fatty degeneration, sinusoidal distortion, focal fibrosis, and necrosis.	Not reported.	
Shoalb, Jamal and Siddiqui (2016)	Animal: <i>Aphanius dispar</i> . Exposure route: Water. Exposure duration: 24 h. Concentration: 0.0025 ppm.		Biochemical markers: Effects on enzymatic biomarkers in fish; inhibition of AChE; decreased AST and ALP; increased ALT and ACP.	Not reported.	continua...

References	Subjects/Animals Duration, and Concentration	Hepatic Effects	Renal Effects
Reygner et al (2016)	Animals: Wistar rats (generational study). Exposure route: Gavage. Exposure duration: From gestational day (GD) to postnatal day (PND) 21; from PND 1 to 60, male offspring were treated by gavage. Concentration: 1 and 3.5 mg/kg/day.	Biochemical changes: Increased glycemia at PND 60; decreased triglycerides at 3.5 mg/kg; increased ALT levels in groups exposed to 1 and 3.5 mg/kg.	Not reported.
Kunwar et al (2022)	Animal: Golden mahseer (<i>Tor putitora</i>). Exposure route: Water dilution. Exposure duration: 96 h followed by 1-week recovery. Concentration: 0.075 mg/L CPS.	Serum parameters: Decrease in albumin (especially with pesticide mixtures); reduced total protein, albumin, and globulin levels with later recovery; decreased blood triglycerides; increased ALT, AST, and ALP levels, all showing recovery after exposure.	Biochemical parameters: Increased urea levels following exposure to pesticide mixtures; a trend toward elevated creatinine levels; both urea and creatinine returned to baseline after recovery.
Narváez et al (2016)	Animals: Birds (<i>Coturnix japonica</i>) Exposure route: Feed Exposure duration: 4 weeks. Concentration: 10.1 and 20.2 mg/kg/feed.	Organ changes: Alterations in liver size and weight.	Not reported.

continua...

References	Subjects/Animals Duration, and Concentration	Exposure Route,	Hepatic Effects	Renal Effects	conclusão
Samarghandian et al (2020)	Animals: Wistar rats aged 2, 10, and 20 weeks Exposure route: Gavage Exposure duration: 45 days Concentration: 5 mg/kg		Histopathology: Hepatocellular proliferation, necrosis, inflammatory cell infiltration (lymphocytes and neutrophils), edema, hepatocellular vacuolation, lipid alterations, vascular damage, central vein congestion, portal tract inflammation, and bile duct proliferation.	Not reported.	
Olsvik et al (2019)	Animal: Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i> L.) Exposure route: Mixed in pellets Exposure duration: 30 and 67 days Concentration: 0.1, 1, and 8 mg/kg		Molecular and metabolic effects: Dose-dependent accumulation of TCP (main metabolite detected); downregulation of Cryl and fkbp5; altered hepatic metabolism; modulation of protein turnover and cholesterol biosynthesis after 30 days; after 67 days, disruption of steroid and fatty acid metabolism pathways, protein ubiquitination, and circadian rhythm signaling; phenotypic alterations in growth, survival, and lipid metabolism, with impacts on steroid metabolism and protein synthesis after prolonged exposure.	Not reported.	

Renal Outcomes

Genotoxic and epigenetic alterations

In juvenile *Oreochromis niloticus*, Soum et al (2022) reported a significant increase in DNA tail percentage in renal tissue following 96 h of CPS exposure, indicating DNA damage. In *Cyprinus carpio*, Wang et al (2014) observed renal DNA hypomethylation after 40 days of exposure (1.16–116 µg/L), which was partially reversible after a 40-day recovery period. Increased mRNA expression of methyl-CpG binding protein 2 (MBD2) was also reported.

Biochemical indicators of renal dysfunction

Kunwar et al (2022) exposed *Tor putitora* to CPS alone or in combination with dichlorvos. CPS alone did not significantly alter urea or creatinine levels. Conversely, combined exposure resulted in marked elevations in these biomarkers, followed by biochemical recovery after withdrawal. The human cohort study by Furlong et al. (2014) reported the detection of urinary 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCPy) in adolescent agricultural workers exposed to pesticides, along with alterations in renal health parameters.

Hepatic Outcomes

Biochemical alterations

Multiple experimental models demonstrated elevated alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), and acetylcholinesterase (AChE) inhibition. In Wistar rats, Reygnier et al (2016) observed increased ALT levels and altered triglyceride profiles following gestational and postnatal exposure. Samarghandian et al (2020) reported metabolic and inflammatory alterations after 45 days of exposure.

Histopathological findings

In fish models, CPS exposure was associated with hepatocyte vacuolization, fatty degeneration, sinusoidal distortion, necrosis, and inflammatory infiltration. In birds (*Coturnix japonica*), Narváez et al (2016) reported increased liver weight and altered carboxylesterase activity.

Molecular and transcriptomic alterations

Wang et al (2014) reported hepatic DNA hypomethylation and downregulation of DNA methyltransferases (DNMT) genes in *C. carpio*. Anna et al (2021) observed induction of TNF- α , IL-6, and caspases 9 and 3 in trout liver. Olsvik et al (2019) described transcriptomic changes in *Salmo salar*, including alterations in steroid metabolism, cholesterol biosynthesis, circadian regulation, and downregulation of oxidative stress-related transcription factors (e.g., NFE2L2, MYC, PPARA).

Discussion

The hepatorenal toxicity of CPS during the peripubertal period emerges from a complex intersection of organ-specific vulnerabilities and developmental immaturity. The kidneys are particularly susceptible to xenobiotic-induced injury because their high perfusion rates and active filtration processes lead to substantial exposure to circulating compounds such as CPS and its bioactivated metabolites. Beyond their excretory function, the kidneys possess a well-developed metabolic capacity mediated by diverse enzymatic systems, including cytochrome enzymes, monoamine oxidases, alcohol and aldehyde dehydrogenases, prostaglandin synthase complexes, UDP-glucuronosyltransferases (UGTs), glutathione S-transferases, and N-acetyltransferases (Dobrek, 2023).

The peripubertal period represents a critical window of development during which significant toxic effects may arise, potentially impacting organ maturation and physiological function. This stage is characterized by ongoing developmental processes and functional refinement across multiple organ systems (Perobelli, 2014). In the kidneys, nephrogenesis

continues after birth; however, the organ becomes morphologically complete within a relatively short timeframe. Despite this structural completion, functional maturation occurs later than morphological development across species, which may compromise homeostatic regulation in immature organisms. During this developmental phase, reduced detoxification capacity, associated with the immaturity of organic anion transporters, may increase susceptibility to xenobiotic-induced toxicity. Conversely, in some contexts, this same immaturity may confer partial protection, as the kidney may lack the ability to efficiently metabolize and concentrate xenobiotics within renal tubules (Seely, 2017).

Hormonal signaling pathways, including glucocorticoids, thyroid hormones, and aldosterone, regulate the maturation of renal components, promoting the activity of sodium pumps and organic anion transporters (Cheng, Chen; Cheng, 2025; Gattineni; Baum, 2015). Given that organophosphates are recognized as potential endocrine-disrupting factors, exposure during the juvenile period disrupts these pathways, leading to functional alterations (Perobelli, 2014).

While defining a strict "peripubertal" equivalent in aquatic and avian models presents distinct physiological challenges, the developmental transitions in juvenile fish and birds share highly conserved molecular, metabolic, and endocrine milestones with mammalian peripuberty, justifying their inclusion in broader developmental toxicity assessments. In this review, CPS exposure in aquatic vertebrates models exhibited DNA damage and global DNA hypomethylation. Reduced methylation levels, often accompanied by altered expression of DNMTs, may facilitate aberrant activation of pro-inflammatory and pro-apoptotic pathways (Anna et al, 2021; Olsvik et al, 2019; Soum et al, 2022; Wang et al, 2014). Although not directly assessed in the included studies, these epigenetic alterations likely arise from oxidative stress-mediated mechanisms. Increased reactive oxygen species (ROS) can disrupt DNA methylation patterns and promote genomic instability, thereby amplifying inflammatory signaling and

cellular injury in renal tissue (Franco et al, 2008; Wu; Ni, 2015).

Evidence that oxidative stress modulates DNMT activity and DNA methylation dynamics reinforces the interplay between redox imbalance and epigenetic dysregulation, suggesting an important role in toxicant-induced organ injury (Coppedè, 2021; Valinluck; Sowers, 2007). The observed upregulation of methyl-CpG-binding domain protein 2 (MBD2) further suggests the involvement of chromatin remodeling processes that may contribute to genomic instability (Wang et al, 2014). Although partial reversibility was observed following recovery, the persistence of epigenetic alterations during critical developmental windows, such as puberty, raises concerns regarding potential long-term biological consequences.

Importantly, overt renal biochemical dysfunction was not consistently observed following isolated CPS exposure, suggesting that classical biomarkers may lack sensitivity to detect early or subclinical renal injury. In contrast, more pronounced alterations were reported under mixture exposure scenarios (Furlong et al, 2014; Kunwar et al, 2022), supporting the hypothesis of synergistic or additive toxicity under conditions that more closely resemble real-world agricultural settings (Adu et al, 2019; Cheng Y et al, 2025).

These findings indicate that CPS exposure during juvenile stages is associated with renal genomic and epigenetic alterations in aquatic models, even in the absence of overt functional impairment. Although some studies involved combined pesticide exposure, these results provide preliminary evidence of potential translational relevance, particularly considering that early-life exposure to environmental contaminants may induce persistent molecular alterations that precede clinically detectable renal dysfunction (Cheng; Chen; Cheng, 2025; Perobelli, 2014). Collectively, these observations underscore the need to incorporate mixture-based approaches and sensitive molecular endpoints when assessing nephrotoxicity during critical developmental windows.

In contrast to the renal system, the liver is the primary site of CPS bioactivation and,

therefore, represents a biologically plausible target for toxicity (Eaton et al, 2008; Milić et al., 2018). Hepatocytes, the main parenchymal cells of the liver, are highly specialized in xenobiotic metabolism, primarily through enzymes of the CYP450 family. Notably, the expression and activity of these enzymes are developmentally regulated and remain immature during the postnatal period (Huppert; Iwafuchi-Doi, 2019). Given its central role in xenobiotic biotransformation, hepatic injury may lead to significant systemic consequences, including increased ROS production due to redox imbalance. Elevated ROS levels are known to induce DNA damage (Dar et al, 2019; Ma et al, 2020; Rives et al, 2020). CPS is metabolically activated by hepatic CYP450 enzymes to its oxon form, chlorpyrifos-oxon, a more reactive metabolite capable of inducing cellular damage. This bioactivation process is often accompanied by ROS generation and subsequent redox imbalance, triggering lipid peroxidation, protein oxidation, and DNA damage (Eaton et al, 2008; European Food Safety Authority, 2019a).

Similar to the kidney, the peripubertal period represents a critical window of hepatic development characterized by ongoing functional maturation rather than structural growth (Perobelli, 2014). Although the liver is morphologically established during embryogenesis, structural and functional maturation continues postnatally. This includes the progressive reorganization of hepatic architecture, such as the transition to single-cell hepatocyte plates and the expansion of hepatic lobules (Alexander et al, 1997; Kung et al, 2010). In parallel, key metabolic processes, including xenobiotic biotransformation, antioxidant defense, and endocrine regulation, continue to develop throughout the juvenile and peripubertal stages. In particular, the expression and activity of CYP450 enzymes, as well as phase I and II conjugation systems, are developmentally regulated and may remain functionally immature during this period (Elbarbry; McNamara; Alcorn, 2007; Kearns et al., 2003; Messina; Duclos-Vallée, 2023).

This incomplete maturation can result in an imbalance between bioactivation and

detoxification pathways (Kearns et al, 2003), potentially increasing susceptibility to reactive metabolite formation and oxidative stress. Thus, immature antioxidant systems may further limit the capacity to counteract ROS, exacerbating cellular damage. Peripubertal individuals may therefore exhibit a distinct toxicological profile compared to adults, with increased vulnerability to xenobiotic-induced hepatic injury and a greater likelihood of persistent metabolic and inflammatory disturbances (Kearns et al, 2003). Collectively, the convergence of biochemical, histological, molecular, and transcriptomic alterations across different species provides robust evidence of consistent hepatic involvement, supporting the biological plausibility of CPS-induced hepatotoxicity.

Elevated transaminase levels and histopathological alterations indicate hepatocellular stress and injury (Abdulkareem; Ajetunmobi; Yekini, 2020; Anna et al, 2021; Kunwar et al, 2022; Reygner et al, 2016; Samarghandian et al, 2020; Shoaib; Jamal; Siddiqui, 2016; Soum et al, 2022). Mechanistically, CPS undergoes hepatic bioactivation by CYP450 enzymes to chlorpyrifos-oxon, which is associated with increased ROS generation and redox imbalance (Eaton et al, 2008). This oxidative stress may impair mitochondrial function, disrupt lipid metabolism and steroidogenesis, and promote lipid peroxidation and protein oxidation. In parallel, ROS-mediated signaling can activate pro-inflammatory pathways, further exacerbating hepatocellular injury (Messina; Duclos-Vallée, 2023; Morgan; Liu, 2011). These interconnected processes support a model of CPS-induced hepatotoxicity driven by oxidative stress and metabolic dysregulation. Notably, hepatic alterations were more consistently reported across species than renal endpoints, suggesting that the liver represents a primary and more sensitive target of CPS-induced toxicity.

Beyond AChE inhibition, CPS toxicity appears to involve a multi-step cascade, including hepatic bioactivation and metabolite generation, oxidative stress induction, mitochondrial dysfunction, lipid metabolism disruption, inflammatory signaling activation,

epigenetic remodeling, and structural tissue alterations. This integrated pathway provides biological plausibility for the observed hepatorenal alterations during developmental exposure.

Extrapolation from interspecies models to humans requires caution due to differences in metabolism and exposure routes (MacRae; Peterson, 2023; Martignoni; Groothuis; Kanter, 2006). Particularly, extrapolating findings from predominantly aquatic models to human risk assessment demands rigorous evaluation due to profound differences in peripubertal endocrine milestones and systemic toxicokinetics. However, the detection of urinary TCPy in adolescents occupationally exposed to pesticides suggests that juvenile exposure is environmentally relevant (Furlong et al, 2014). Nevertheless, human evidence remains limited and potentially confounded by multi-pesticide exposure scenarios.

The interpretation of the available evidence requires caution due to methodological limitations across the included studies. Several studies presented incomplete reporting of key experimental procedures, such as randomization, blinding, and exposure monitoring, which may affect internal validity. Furthermore, aquatic models based on waterborne exposure without continuous verification of chemical concentrations may introduce variability in actual dosing, potentially influencing dose–response relationships (Organization for Economic Co-operation and Development, 2019). The human study also showed potential confounding due to co-exposure to multiple pesticides, limiting causal inference. These limitations do not invalidate the findings but highlight the need for cautious interpretation and for more robust, well-controlled studies.

Despite these limitations, the convergence of hepatic and renal molecular alterations across independent models supports the biological plausibility of CPS toxicity. However, overall confidence in the strength of evidence remains limited to moderate, particularly regarding renal functional impairment. The current body of evidence suggests that peripubertal exposure to chlorpyrifos is consistently associated with hepatic biochemical, structural, and

molecular alterations across species, while renal effects appear more subtle and context-dependent. Epigenetic dysregulation emerges as a potentially unifying mechanism linking oxidative stress and inflammatory signaling to persistent molecular remodeling. Although partial recovery has been reported in some models, the possibility of sustained epigenetic reprogramming during critical developmental windows warrants further investigation in mammalian systems, given that CPS toxicity is multifactorial and may persist after exposure cessation.

Conclusion

The evidence compiled in this review indicates that chlorpyrifos induces nephrotoxic and hepatotoxic effects, with severity influenced by dose, exposure duration, and co-exposure to other pesticides. The underlying mechanisms involve esterase inhibition, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, inflammatory signaling, apoptosis, and epigenetic dysregulation, contributing to genomic instability and tissue injury. Synergistic toxicity is particularly evident when CPS is combined with other organophosphates, leading to more pronounced biochemical impairment. Although some studies report partial recovery following exposure withdrawal, persistent epigenetic alterations suggest the potential for long-term effects.

Critical methodological limitations include high experimental model heterogeneity, specifically the predominance of aquatic studies, coupled with a limited number of mammalian and human investigations, and the insufficient characterization of real-world co-exposure scenarios. Nonetheless, the detection of urinary TCPy and the observation of renal alterations in exposed workers underscore the translational relevance of these findings.

Ultimately, CPS exhibits significant hepatorenal toxicity. Considering its environmental persistence, widespread human exposure, and the consistency of mechanistic evidence, further research and strengthened regulatory strategies are warranted to protect vulnerable populations, particularly during critical developmental stages.

References

- Abdulkareem SI, Ajetunmobi MO, Yekini YO. Histopathological alterations in some tissues of *Heteroclinas* juveniles exposed to lethal and sub-lethal concentrations of chlorpyrifos and ameliorative potentials of vitamin E to the toxicity of the pesticide. *Tanzan J Agric Sci*. 2020; 19:67-77.
- Adu P, Forkuo EK, Issah A, Asumadu IO, Cadman-Sackey E, Quarshie AAA, et al. High incidence of moderately reduced renal function and lead bioaccumulation in agricultural workers in Assin South District, Ghana: a community-based case-control study. *Int J Nephrol* [Internet]. 2019 [cited 2026 Apr 18]; 2019:5368427. doi: <https://doi.org/10.1155/2019/5368427>.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos - PARA. Brasília: ANVISA; 2024.
- Alexander B, Guzail MA, Foster CS. Morphological changes during hepatocellular maturity in neonatal rats. *Anat Rec* [Internet]. 1997 [cited 2026 Apr 18]; 248(1):104-109. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199705\)248:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199705)248:1).
- Anna JS, Castro JM, Darraz LA, Elías FD, Cárcamo JG, Luquet CM. Exposure to hydrocarbons and chlorpyrifos alters the expression of nuclear receptors and antioxidant, detoxifying, and immune response proteins in the liver of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2021 [cited 2026 Mar 20]; 208:111394. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111394>.
- Cheng Y, Lv Y, Zhao X, Lu Y, Jiao T, Ma T, et al. Multidimensional toxicity of organophosphate pesticides and mitigation strategies for agricultural sustainability. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2025 [cited 2026 Mar 18]; 73(32):18047-18062. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c02491>.
- Cheng YG, Chen C, Cheng C. Postnatal changes in renal tubular transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens* [Internet]. 2025 [cited 2026 Mar 18]; 33(6):518-525. doi: <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000001007>.
- Coppedè F. One-carbon epigenetics and redox biology of neurodegeneration. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2021 [cited 2026 Mar 18]; 170:19-33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.002>.
- Costa IR, Quadreli DH, da Silva LMM, Andrade FG, Fernandes GSA. Chlorpyrifos impairs sperm parameters and number of Sertoli and Leydig cells in rats after exposure during the peripubertal period. *Toxicology* [Internet]. 2024 [cited 2026 Mar 19]; 504:153789. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2024.153789>.
- Costa IR, Quadreli DH, Silva LMM, Andrade FG, Fernandes GSA. Exposure to chlorpyrifos influences epididymal development in pubescent rats. *Environ Toxicol* [Internet]. 2026 [cited 2026 Apr 19]; 6 Jan. doi: <https://doi.org/10.1002/tox.70033>.
- Dar MA, Khan AM, Raina R, Verma PK, Wani NM. Effect of bifenthrin on oxidative stress parameters in the liver, kidneys, and lungs of rats. *Environ Sci Pollut Res Int* [Internet]. 2019 [cited 2026 Apr 19]; 26:9365-9370. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04362-4>.

Dobrek L. A synopsis of current theories on drug-induced nephrotoxicity. *Life* [Internet]. 2023 [cited 2026 Apr 19]; 13(2):325. doi: <https://doi.org/10.3390/life13020325>.

Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, et al. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Crit Rev Toxicol* [Internet]. 2008 [cited 2026 Apr 26]; 38 (Suppl 2):1-125. doi: <https://doi.org/10.1080/10408440802272158>.

Elbarbry FA, McNamara PJ, Alcorn J. Ontogeny of hepatic CYP1A2 and CYP2E1 expression in rat. *J Biochem Mol Toxicol* [Internet]. 2007 [cited 2026 Apr 19]; 21(1): 41-50. doi: <https://doi.org/10.1002/jbt.20156>.

European Food Safety Authority (EFSA). Statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos. *EFSA J* [Internet]. 2019a [cited 2026 Apr 26]; 17(5): 5809. doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5809>.

European Food Safety Authority (EFSA). Statement on the available outcomes of the human health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance chlorpyrifos-methyl. *EFSA J* [Internet]. 2019b [cited 2026 Apr 26]; 17(5): 5810. doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5810>.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Pesticides use and trade 1990-2021. *FAOSTAT Anal Brief*. 2023; 70:1-12.

Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* [Internet]. 2008 [cited 2026 Apr 26]; 266(1): 6-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.026>.

Furlong CL, Holland N, Richter RJ, Bradman A, Ho A, Eskenazi B. Chlorpyrifos exposure and respiratory health among adolescent agricultural workers. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2014 [cited 2026 Apr 19]; 11(12): 13117-13129. doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph111213117>.

Gattineni J, Baum M. Developmental changes in renal tubular transport: an overview. *Pediatr Nephrol* [Internet]. 2015 [cited 2026 Apr 19]; 30(12): 2085-2098. doi: <https://doi.org/10.1007/s00467-013-2666-6>.

Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, et al. EDC-2: the Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr Rev* [Internet]. 2015 [cited 2026 Apr 18]; 36(6): E1-E150. doi: <https://doi.org/10.1210/ER.2015-1010>.

Haddaway NR, Page MJ, Pritchard CC, McGuinness LA. PRISMA2020: an R package and Shiny app for producing PRISMA 2020-compliant flow diagrams, with interactivity for optimised digital transparency and Open Synthesis. *Campbell Syst Rev* [Internet]. 2022 [cited 2026 Apr 19]; 18(2): e1230. doi: <https://doi.org/10.1002/cl2.1230>.

Huppert SS, Iwafuchi-Doi M. Molecular regulation of mammalian hepatic architecture. In: *Current Topics in Developmental Biology* [Internet]. Cambridge: Academic Press; 2019 [cited 2026 Apr 19]. p. 91-136. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.12.003>.

- Kearns GL, Abdel-Rahman SM, Alander SW, Blowey DL, Leeder JS, Kauffman RE. Developmental pharmacology: drug disposition, action, and therapy in infants and children. *N Engl J Med* [Internet]. 2003 [cited 2026 Apr 19]; 349(12): 1157-1167. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMra035092>.
- Kung JWC, Currie IS, Forbes SJ, Ross JA. Liver development, regeneration, and carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2010 [cited 2026 Apr 19]; 2010: 984248. doi: <https://doi.org/10.1155/2010/984248>.
- Kunwar PS, Sinha AK, Boeck G, Sapkota K. Modulations of blood biochemical parameters of golden mahseer, *Tor putitora* following exposures to single and mixed organophosphate. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2022 [cited 2026 Apr. 19]; 251:109207. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109207>.
- Lushchak VI, Matviishyn TM, Husak VV, Storey JM, Storey KB. Pesticide toxicity: a mechanistic approach. *EXCLI J* [Internet]. 2018 [cited 2026 Apr 19]; 17:1101-1136. doi: <https://doi.org/10.17179/excli2018-1710>.
- Ma X, McKeen T, Zhang J, Ding WX. Role and mechanisms of mitophagy in liver diseases. *Cells* [Internet]. 2020 [cited 2026 Apr. 26]; 9(4): 837. doi: <https://doi.org/10.3390/cells9040837>.
- MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as a mainstream model for in vivo systems pharmacology and toxicology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2023 [cited 2026 Apr. 26]; 63:43-64. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-051421-105617>.
- Martignoni M, Groothuis GMM, Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* [Internet]. 2006 [cited 2026 Apr 26]; 2(6): 875-894. doi: <https://doi.org/10.1517/17425255.2.6.875>.
- Messina A, Duclos-Vallée JC. Molecular mechanisms of hepatotoxicity. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 [cited 2026 Apr 6]; 24(4):3791. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms24043791>.
- Milić M, Žunec S, Micek V, Kašuba V, Mikolić A, Lovaković BT, et al. Oxidative stress, cholinesterase activity, and DNA damage in the liver, whole blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to glyphosate. *Arh Hig Rada Toksikol* [Internet]. 2018 [cited 2026 Apr 9]; 69(2): 154-168. doi: <https://doi.org/10.2478/aiht-2018-69-3114>.
- Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* [Internet]. 2011 [cited 2026 Apr 6]; 21(1): 103-115. doi: <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>.
- Mostafalou S, Abdollahi M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2013 [cited 2026 Mar 26]; 268(2): 157-177. doi: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025>.
- Narváez C, Ríos JM, Píriz G, Sanchez-Hernandez JC, Sabat P. Subchronic exposure to chlorpyrifos affects energy expenditure and detoxification capacity in juvenile Japanese quails. *Chemosphere* [Internet]. 2016 [cited 2026 Apr 6]; 144: 775-784. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.060>.
- Olsvik PA, Berntssen MHG, Søfteland L, Sanden M. Transcriptional effects of dietary

chlorpyrifos-methyl exposure in Atlantic salmon (*Salmo salar*) brain and liver. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* [Internet]. 2019 [cited 2026 Apr 6]; 29:43-54. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2018.11.003>.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Guidance document on aqueous-phase aquatic toxicity testing of difficult test chemicals. Series on Testing and Assessment No. 23. Paris: OECD Publishing; 2019.

Owonikoko WM, Alimba CG. Systematic literature review of heavy metal contamination of the Nigerian environment from e-waste management: associated health and carcinogenic risk assessment. *Toxicology* [Internet]. 2024 [cited 2026 Apr 8]; 505:153811. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2024.153811>.

Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* [Internet]. 2021 [cited 2026 Apr 9]; 372:71. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>.

Perobelli J. The male peripubertal phase as a developmental window for reproductive toxicology studies. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2014 [cited 2026 Apr 5]; 20(34): 5398-5415. doi: <https://doi.org/10.2174/1381612820666140205150059>.

Reygner J, Lichtenberger L, Elmhiri G, Dou S, Bahi-Jaber N, Rhazi L, et al. Inulin supplementation lowered the metabolic defects of prolonged exposure to chlorpyrifos from gestation to young adult stage in offspring rats. *PLoS One* [Internet]. 2016 [cited Apr 8]; 11(11): e0164614. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164614>.

Rives C, Fougerat A, Ellero-Simatos S, Loiseau N, Guillou H, Gamet-Payraastre L, et al. Oxidative stress in NAFLD: role of nutrients and food contaminants. *Biomolecules* [Internet]. 2020 [cited 2026 Apr 8]; 10(12): 1702. doi: <https://doi.org/10.3390/biom10121702>.

Samarghandian S, Foadoddin M, Zardast M, Mehrpour O, Sadighara P, Roshanravan B, et al. The impact of age-related sub-chronic exposure to chlorpyrifos on metabolic indexes in male rats. *Environ Sci Pollut Res Int* [Internet]. 2020 [cited 2026 Apr 7]; 27(18): 22390-22399. doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08814-0>.

Seely JC. A brief review of kidney development, maturation, developmental abnormalities, and drug toxicity: juvenile animal relevancy. *J Toxicol Pathol* [Internet]. 2017 [cited 2026 Mar 8]; 30(2): 125-133. doi: <https://doi.org/10.1293/tox.2017-0006>.

Shoaib N, Jamal P, Siddiqui A. Impact of organophosphate pesticides, methyl parathion and chlorpyrifos on some tissue enzymes in fish (*Aphanius dispar*). *Int J Multidiscip Sci Eng*. 2016; 45:869-874.

Soum T, Ritchie RJ, Navakanitworakul R, Bunthawin S, Dummee V. Acute toxicity of chlorpyrifos (CPF) to juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): genotoxicity and histological studies. *J Fish Environ*. 2022; 46(1): 130-140.

Tudi M, Ruan HD, Wang L, Lyu J, Sadler R, Connell D, et al. Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2021 [cited 2026 Apr 18]; 18(3):1112. doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph18031112>.

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). Revised human health risk

assessment on chlorpyrifos [Internet]. Washington (DC): U.S. Environmental Protection Agency; 2020 [cited 2026 Apr 7]. Available from: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/revised-human-health-risk-assessment-chlorpyrifos>.

Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* [Internet]. 2007 [cited 2026 Apr 8]; 67(3): 946-950. doi: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3123>.

Wang C, Zhang Z, Yao H, Zhao F, Wang L, Wang X, et al. Effects of atrazine and chlorpyrifos on DNA methylation in the liver, kidney and gill of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2014 [cited 2026 Mar 5]; 108:142-151. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.011>.

Wu Q, Ni X. ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis. *Curr Drug Targets* [Internet]. 2015 [cited 2026 Apr 5]; 16(1): 13-19. doi: <https://doi.org/10.2174/1389450116666150113121054>.

5 ARTIGO 2 – PERIPUBERTAL CHLORPYRIFOS EXPOSURE INDUCES HEPATIC OXIDATIVE STRESS WITHOUT OVERT HEPATORENAL TOXICITY IN WISTAR RATS

Lucas Marcelo Meira da Silva; Pedro Rocha Tenório; Gabriel Smolak Sobieski e Silva; Letícia Cavalcante dos Santos; Marina Imbriani Silva; Maria Isabela Andrade Bueno; Bruno Henrique Sebastião de Jesus; Glaura Scantamburlo Alves Fernandes; Fábio Goulart de Andrade

Esse artigo será submetido para publicação na revista *Environmental Toxicology and Pharmacology*. ISSN: 1382-6689, Qualis CAPES: A2 (Ciências biológicas II, 2024), fator de impacto: 4.2 (2024). As normas para publicação constam no seguinte endereço eletrônico: <https://www.sciencedirect.com/journal/environmental-toxicology-and-pharmacology/publish/guide-for-authors#writing-and-formatting>.

Abstract

Peripubertal exposure to environmental contaminants remains a critical public health concern due to the heightened susceptibility of developing physiological systems. This study investigated the hepatorenal effects of repeated chlorpyrifos (CPS) exposure during the susceptible peripubertal window. Male Wistar rats received CPS (5 or 15 mg/kg) or vehicle via oral gavage from postnatal day 25 to 65. Serum hepatorenal toxicity markers (ALT, AST, creatinine, urea) and renal morphology remained unchanged. However, CPS induced dose-dependent hepatic redox alterations. The 5 mg/kg dose elicited an adaptive response, reducing lipid peroxidation and preserving thiols. Conversely, 15 mg/kg induced oxidative imbalance, increasing TBARS and protein carbonylation while depleting free thiols. Furthermore, although Masson's trichrome staining suggested mild fibrosis, quantitative analysis of Picrosirius Red staining demonstrated no significant alterations in collagen deposition. Collectively, peripubertal chlorpyrifos exposure induces subtle hepatic oxidative and histopathological

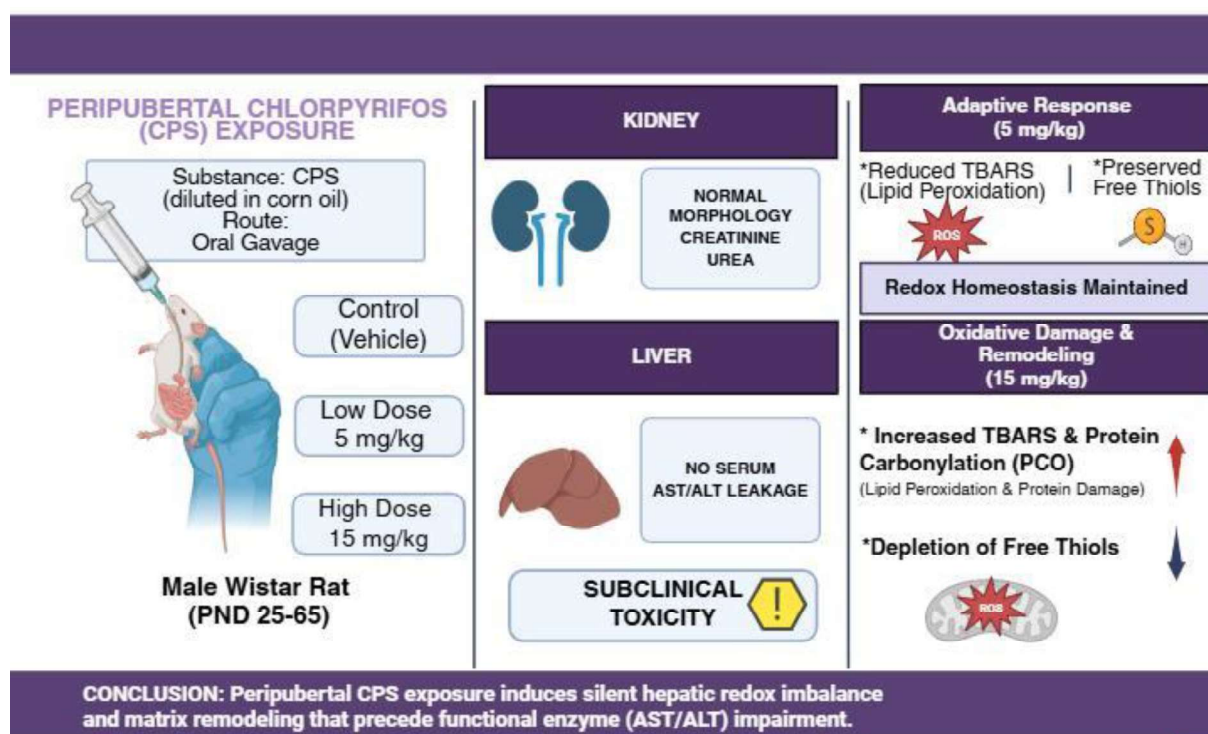
alterations without overt enzymatic toxicity or detectable fibrosis, highlighting that subclinical redox imbalance may precede functional impairment during this critical developmental phase.

Keywords: chlorpyrifos; peripubertal exposure; oxidative stress; liver; histopathology; kidney.

Highlights

- Peripubertal exposure to chlorpyrifos causes hepatic oxidative stress without overt toxicity.
- Low-dose exposure preserves redox homeostasis and reduces lipid peroxidation.
- High-dose exposure drives hepatic protein carbonylation and lipid peroxidation.
- Hepatic structural and biochemical changes occur independently of renal injury.

Graphical Abstract



1. Introduction

Chlorpyrifos (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridinol phosphorothioate) is a widely used organophosphate insecticide, acaricide, and termiticide employed in agricultural and domestic pest control worldwide (Raj & Kumar, 2022). The extensive use of chlorpyrifos in agricultural practices, coupled with its environmental persistence, contributes to its widespread distribution in environmental matrices. Chlorpyrifos can remain in the environment for 7–120 days, while its major metabolite, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCPy), may persist for up to 360 days. This prolonged environmental half-life increases the likelihood of continuous dietary and ecological exposure, making chlorpyrifos a significant public health concern due to its neurotoxic, endocrine-disrupting, and potentially carcinogenic properties (Kabir et al., 2015; European Food Safety Authority [EFSA], 2019a). Human exposure occurs primarily through contaminated food, water, and environmental residues, raising concerns regarding chronic low-dose exposure in vulnerable populations.

Over the last decade, increasing toxicological evidence has led several regulatory agencies to reassess the safety of chlorpyrifos. In 2020, the European Union banned chlorpyrifos due to concerns related to neurodevelopmental toxicity and insufficient evidence supporting its safe use (EFSA, 2019a). Similarly, in 2022, the United States Environmental Protection Agency (EPA) revoked tolerances for chlorpyrifos-containing products after concluding that the compound did not meet food safety standards (U.S. Environmental Protection Agency [EPA], 2022). Nevertheless, chlorpyrifos continues to be marketed and detected in food products in several countries, particularly in regions with intensive agricultural activity. Among these countries, Brazil stands out as one of the world's largest consumers of agrochemicals, where chlorpyrifos remains commercially available and extensively used, despite reports of irregular detections and inappropriate use of this pesticide (Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA], 2024; Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2023).

Chlorpyrifos is also recognized as an endocrine disruptor capable of interfering with hormonal homeostasis (Kabir et al., 2015). The peripubertal period represents a critical developmental window marked by intense physiological maturation and complex endocrine signaling, which may increase vulnerability to organophosphate exposure. During this stage, the metabolic, endocrine, and reproductive systems are still developing, making them particularly susceptible to xenobiotic-induced disturbances (Perobelli, 2014).

Although substantial evidence has demonstrated the neurodevelopmental and reproductive toxicity of chlorpyrifos, considerably fewer studies have investigated its subclinical hepatorenal effects during critical developmental windows. Notably, although the liver and kidneys are morphologically developed at birth, both organs continue to undergo intense physiological and functional maturation throughout the postnatal period. This ongoing maturation may increase their vulnerability to xenobiotic-induced damage, particularly during periods of accelerated metabolic and endocrine development. Therefore, the present study aimed to investigate the hepatorenal consequences of repeated low-dose chlorpyrifos exposure during the peripubertal period in male Wistar rats. Specifically, we evaluated histopathological architecture, extracellular matrix remodeling, and biochemical markers of oxidative stress, testing the hypothesis that this developmental stage is highly susceptible to metabolic disruption even in the absence of overt systemic toxicity.

2. Methods

2.1. Drug Preparation

Chlorpyrifos (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate; CAS No. 2921-88-2) was obtained from Sumitomo Chemical (Klorpan 480 EC [48%], São Paulo, Brazil) and diluted in corn oil to achieve final doses of 5 and 15 mg/kg. Doses were calculated

based on the active ingredient. Dose selection relied on the established lowest observed adverse effect level (LOAEL; 15 mg/kg) for neurotoxicity in rats, aiming to avoid overt clinical signs of systemic toxicity while enabling the investigation of subclinical hepatorenal effects (Breslin et al., 1996).

2.2. *Animals*

All procedures were conducted in accordance with the *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA) of the State University of Londrina (UEL) (Approval No. OF. Circular CEUA 34/2021), in compliance with the ethical principles established by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA). Reporting follows the ARRIVE guidelines.

Adult male Wistar rats ($n = 30$; postnatal day [PND] 22) were obtained from the Central Animal Facility of UEL. Animals were acclimatized for three days at the Laboratory of Toxicology and Metabolic Disorders of Reproduction. Rats were housed in polypropylene cages ($45 \times 30 \times 15$ cm), three per cage, under controlled environmental conditions (12-h light/dark cycle, 22 ± 3 °C), with *ad libitum* access to water and standard chow.

2.3. *Experimental protocol*

Rats were randomized into three groups ($n = 10$ animals/group): a control group (vehicle/corn oil), and two chlorpyrifos-treated groups: CPS5 (5 mg/kg) and CPS15 (15 mg/kg). Treatments were administered via oral gavage from PND 25 to 65, covering the peripubertal period (Clegg, 1960; Ojeda et al., 1980). Body weight, food intake, and water consumption were recorded every three days. Animals were monitored daily for clinical signs of cholinergic toxicity (lacrimation, salivation, nasal discharge, diarrhea, polyuria, tremors, agitation, and

piloerection). On experimental day 41 (PND 66), rats were deeply anesthetized with isoflurane and euthanized by exsanguination via cardiac puncture. Blood was collected and centrifuged (4,000 rpm, 20 min, 4 °C) to yield plasma, which was stored at −20 °C. Liver and kidneys were excised and weighed. The left lateral liver lobe was processed for histopathology and oxidative stress biomarkers; while the right kidney was used for histopathology.

2.4. Plasma Biochemical Assays

Plasma albumin, aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) levels were quantified using commercial kits (Labtest® Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brazil). Renal function was assessed via plasma total protein, creatinine, and urea (VIDA Biotecnologia, Brazil). Analyses were performed on a Multiskan GO spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). ALT and AST results were expressed as U/L, albumin as g/dL, and total protein, creatinine, and urea as mg/dL.

2.5. Oxidative Stress Biomarkers

Protein quantification: Concentration was determined via the biuret method. Liver homogenates (1:10 w/v, prepared in 100 mM PBS, 1% Triton X-100, pH 7.4) were centrifuged ($10,000 \times g$, 10 min, 4 °C) and supernatants analyzed (VIDA Biotecnologia, Brazil). Samples were normalized to a final concentration of 1 mg/mL.

Lipid peroxidation: Assessed using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay (Esterbauer & Cheeseman, 1990). Samples (50 μ L) were mixed with 10% trichloroacetic acid (TCA), incubated on ice for 15 min, and centrifuged. Supernatants reacted with 0.67% thiobarbituric acid (TBA) at 90–100 °C for 10 min. Absorbance was read at 532 nm. Results are expressed as nmol/mg protein.

Protein Carbonylation: Determined using the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) assay

(Colombo et al., 2016). Normalized samples reacted with 10 mM DNPH in 2 M HCl. After incubation and TCA precipitation, pellets were washed (ethanol:ethyl acetate, 1:1) and resuspended in SDS/Tris-HCl. Absorbance was measured at 366 nm and expressed as nmol carbonyl groups/mg protein.

Total free thiol levels: Determined via the 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) assay. Samples reacted with DTNB (10 mM in methanol) in Tris-EDTA buffer. Absorbance was recorded at 412 and 700 nm before and after incubation. Results are expressed as $\mu\text{mol/mg}$ protein (Koning et al., 2016).

2.6. Histopathological Evaluation

Histological sections (4 μm thick) were prepared at the Histopathological Analysis Laboratory of UEL. The sections were deparaffinized, rehydrated, and stained with Harris hematoxylin (8 min) and eosin (0.25%, 1 min), followed by dehydration, clearing, and mounting.

For liver analysis, ten images (periportal and centrilobular regions) were captured per animal (10 $\times$). Hydropic degeneration, inflammation, steatosis, necrosis, fibrosis, and congestion were evaluated by two blinded researchers using a semiquantitative scoring system (table 1) generating a total liver injury score (Gasmi & Kleiner, 2019),

Table 1 - *Semi-quantitative histopathological scoring system used for liver lesion assessment*

Lesion	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
Hydropic degeneration	None	Mild, few affected cells	Moderate numerous affected cells	-	-
Inflammation	Absent or minimal	<25% of tissue affected	25–50% of tissue affected	>50% of tissue affected	-
Steatosis	Absent or minimal	<25% of tissue affected	25–50% of tissue affected	>50% of tissue affected	-
Necrosis	None	<5% of tissue affected	5–33% of tissue affected	33–66% of tissue affected	>66% of tissue affected
Congestion	None	Portal or centrilobular	Sinusoidal	-	-

Fibrosis*	Absent or minimal	Restricted to the portal triad	Extending beyond the portal triad	Bridging fibrosis between portal triads	-
------------------	-------------------	--------------------------------	-----------------------------------	---	---

*Fibrosis was evaluated according to the extent of collagen deposition and architectural distortion within the hepatic parenchyma.

For kidney analysis, 20 images (cortical/medullary, 40×) and 10 cortical images (10×) were analyzed per animal. Morphometry included renal corpuscle area, glomerular area, and Bowman's space, expressed in μm^2 . Semiquantitative analysis followed Altintas et al. (2014), generating a total renal injury score (table 2).

Table 2 - Semi-quantitative histopathological scoring system used for renal lesion assessment

Lesion	Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
Tubular epithelial desquamation	<20% of tubules affected	20–60% of tubules affected	>60% of tubules affected	-	-
Glomerular congestion	Absent	1 affected glomerulus	2 affected glomeruli	≥ 3 affected glomeruli	-
Interstitial congestion	Absent	<10% of interstitium affected	10–20% of interstitium affected	>20% of interstitium affected	-
Inflammatory infiltrate	Absent or minimal	<25% of interstitium affected	25–50% of interstitium affected	>50% of interstitium affected	-
Hydropic degeneration	Absent	<5% of interstitium affected	5–33% of interstitium affected	>33% of interstitium affected	-
Necrosis	Absent	<5% of interstitium affected	5–33% of interstitium affected	33–66% of interstitium affected	>66% of interstitium affected

Masson's trichrome (type I collagen/elastin) and Picrosirius Red (type I/III collagen) staining were performed on liver sections, and 10 non-overlapping images per animal were acquired at 10× magnification (Levene & Goldin, 2012). Picrosirius Red-stained sections were examined under polarized light to visualize birefringent collagen fibers. All images were captured using identical microscope settings, including illumination intensity, exposure time, and white balance. Quantitative image analysis was performed using Image-Pro Plus 4.5 software (Media Cybernetics, USA). Regions of interest (ROIs) corresponding to the

centrilobular and periportal areas were manually delineated, and collagen-positive areas were identified by color thresholding. The collagen-positive area fraction (%) was determined by dividing the collagen-positive area by the total ROI area, multiplied by 100.

2.7. Statistical Analysis

Data normality and homoscedasticity were assessed using the Kolmogorov–Smirnov and Levene tests, respectively. One-way ANOVA or Kruskal–Wallis tests were applied for parametric and non-parametric data, followed by Tukey’s or Dunn’s post hoc tests, respectively. A significance level of $p < 0.05$ was adopted.

3. Results

3.1. Food and Water Intake, Capillary Glycemia, and Body and Tissue Weights

Food intake, final body weight, organ weights (liver/kidney), and capillary blood glucose remained comparable across all groups (Table 3). Conversely, water intake decreased significantly in the CPS 15 mg/kg group ($p = 0.02$). No cholinergic alterations were observed.

Table 3 - Effects of exposure during peripuberty to chlorpyrifos on food and water intake, capillary glycemia, and body and tissue weights.

	Groups		
	Control	CPS 5 mg/kg	CPS 15 mg/kg
Final body weight (g) ¹	292.0 ± 46.4	292.6 ± 25.1	294.6 ± 19.4
Right kidney (g) ¹	1.205 ± 0.254	1.114 ± 0.064	1.222 ± 0.191
Left kidney (g) ¹	1.119 ± 0.232	1.108 ± 0.114	1.204 ± 0.153
Liver weight (g) ¹	9.694 ± 1.517	9.438 ± 1.132	9.881 ± 1.330
Food intake (g) ²	151.4 (109.4–211.6)	164.6 (112.0–219.3)	148.9 (108.4–184.4)
Water intake (g) ²	226.0 (150.0–295.0)	220.0 (155.0–300.0)	165.0 (121.3–245.0)*

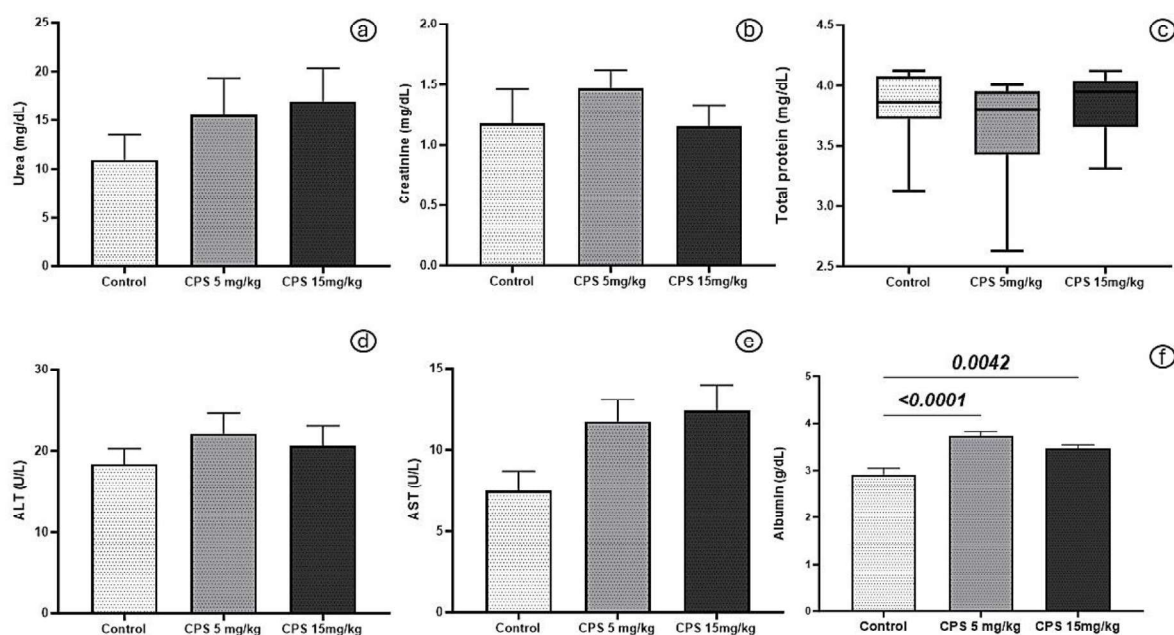
Blood glucose (mg/dL) ¹	97.2 ± 17.7	98.2 ± 26.2	96.2 ± 26.1
------------------------------------	-------------	-------------	-------------

Control: rats in the experimental group that received the vehicle (corn oil); CPS 5 mg/kg: rats in the experimental group that received 5 mg/kg of chlorpyrifos; CPS 15 mg/kg: rats in the experimental group that received 15 mg/kg of chlorpyrifos. ¹Data are presented as mean ± standard deviation and were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. ²Data are presented as median and interquartile range and were analyzed using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test ($p < 0.05$).

3.2. Quantitative Determination of ALT, AST, Urea, Creatinine, Total Protein, and Albumin

Plasma ALT, AST, urea, creatinine, and total protein levels did not differ among groups. Notably, plasma albumin concentrations were significantly increased in the CPS 5 ($p < 0.0001$) and CPS 15 ($p = 0.0042$) groups (29% and 19% increase, respectively) relative to controls (Figure 1).

Figure 1 - Plasma concentrations of urea, creatinine, total protein, ALT, AST, and albumin in Wistar rats exposed to chlorpyrifos during the peripubertal period.



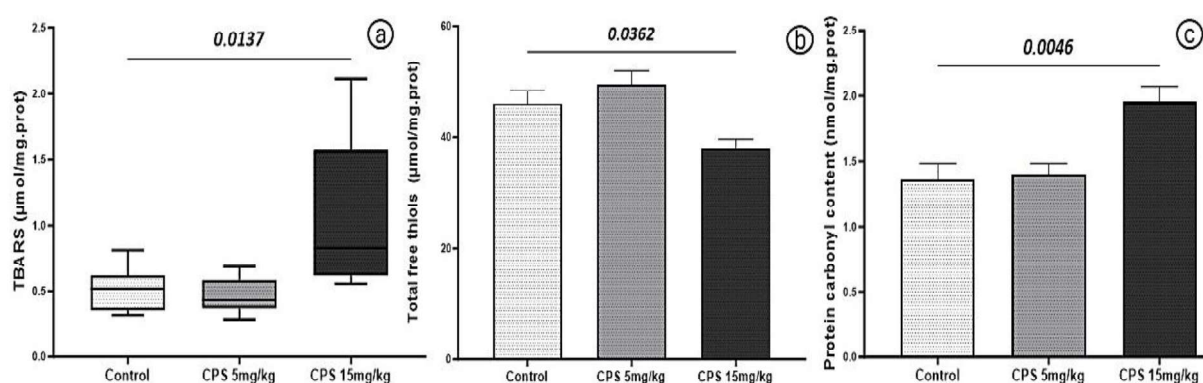
Control: Wistar rats exposed to corn oil; CPS 5 mg/kg: Wistar rats exposed to chlorpyrifos at 5 mg/kg; CPS 15 mg/kg: Wistar rats exposed to chlorpyrifos at 15 mg/kg. Figures a, b, d, e and f: Data are expressed as mean ±

standard error of the mean and were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test ($p < 0.05$). Figure C: Data expressed as median and interquartile range (IQR), analyzed by Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test ($p < 0.05$).

3.3. Biomarkers of Oxidative Stress

Hepatic oxidative stress markers displayed distinct dose-dependent patterns. In the 15 mg/kg CPS group, total thiol levels decreased by 17.59% ($p = 0.03$), whereas TBARS levels rose by 59.7% ($p = 0.01$) compared to controls. Additionally, protein carbonylation (PCO) exhibited a progressive elevation (42.4% increase; $p = 0.004$), with the highest dose eliciting a fourfold greater effect than that observed in the control group (Figure 2).

Figure 2 - Oxidative stress biomarkers in the liver of Wistar rats exposed to chlorpyrifos during the peripubertal period.

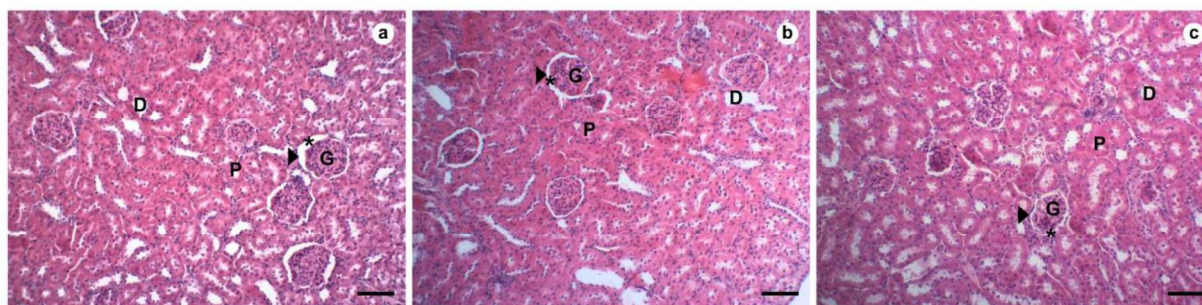


Control: Wistar rats exposed to corn oil; CPS 5 mg/kg: Wistar rats exposed to chlorpyrifos at 5 mg/kg; CPS 15 mg/kg: Wistar rats exposed to chlorpyrifos at 15 mg/kg. Figure a: Data expressed as median and interquartile range (IQR), using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test ($p < 0.05$). Figures b and c: Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean and were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test ($p < 0.05$).

3.4. Renal Histopathological Evaluation

Kidneys exhibited no histological alterations in semiquantitative H&E analyses (Figure 3).

Figure 3 - Photomicrographs of the renal cortex of pubertal Wistar rats exposed to repeated chlorpyrifos (CPS) treatment.



(a) Control Group (corn oil), (b) CPS 5 mg/kg Group, and (c) CPS 15 mg/kg Group. Glomerulus (G); Bowman's space (asterisk); parietal layer of Bowman's capsule (arrowhead); proximal convoluted tubule (P); distal convoluted tubule (D). Staining: Hematoxylin and Eosin (H&E). Scale bar = 20 μ m.

Morphometric analyses confirmed the absence of significant changes in renal corpuscle, glomerular, or Bowman's space areas.

Table 4 - *Morphometric analysis of the total area of renal corpuscles, glomeruli, and Bowman's space in the kidneys of rats after exposure to low doses of chlorpyrifos during the peripubertal period.*

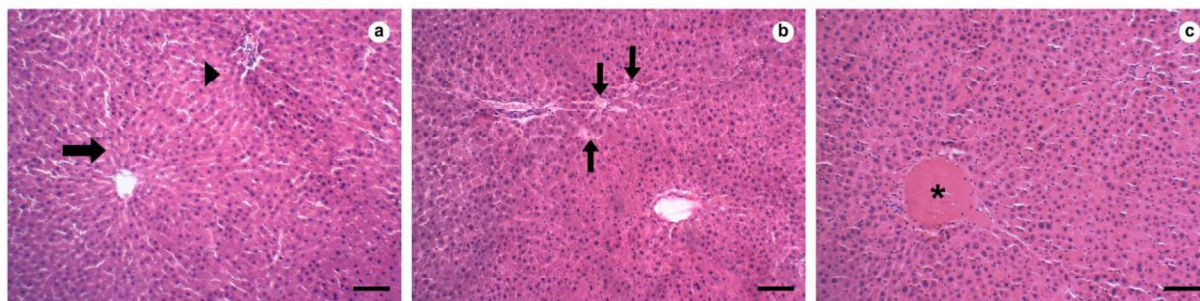
Parameters	Groups		
	Control	CPS 5 mg/kg	CPS 15 mg/kg
Total corpuscle area	69.89 $\pm$ 5.55	68.00 $\pm$ 8.28	75.13 $\pm$ 4.26
Total glomerular area	83.18 $\pm$ 6.32	83.68 $\pm$ 11.06	82.08 $\pm$ 7.36
Bowman's space area	13.23 $\pm$ 2.71	15.28 $\pm$ 4.77	11.05 $\pm$ 4.27

Control: rats in the control group receiving corn oil; CPS 5: rats in the experimental group receiving chlorpyrifos at 5 mg/kg; CPS 15: rats in the experimental group receiving chlorpyrifos at 15 mg/kg. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test ($p < 0.05$).

3.5. Hepatic Histopathological Evaluation

Analysis of H&E staining sections revealed significantly increased hydropic degeneration (figure 4.b) in the CPS 5 mg/kg group ($p = 0.01$). No significant differences occurred regarding inflammation, necrosis, steatosis, or congestion (Figure 4).

Figure 4 - Photomicrographs of the liver of pubertal Wistar rats exposed to repeated chlorpyrifos (CPS) treatment.

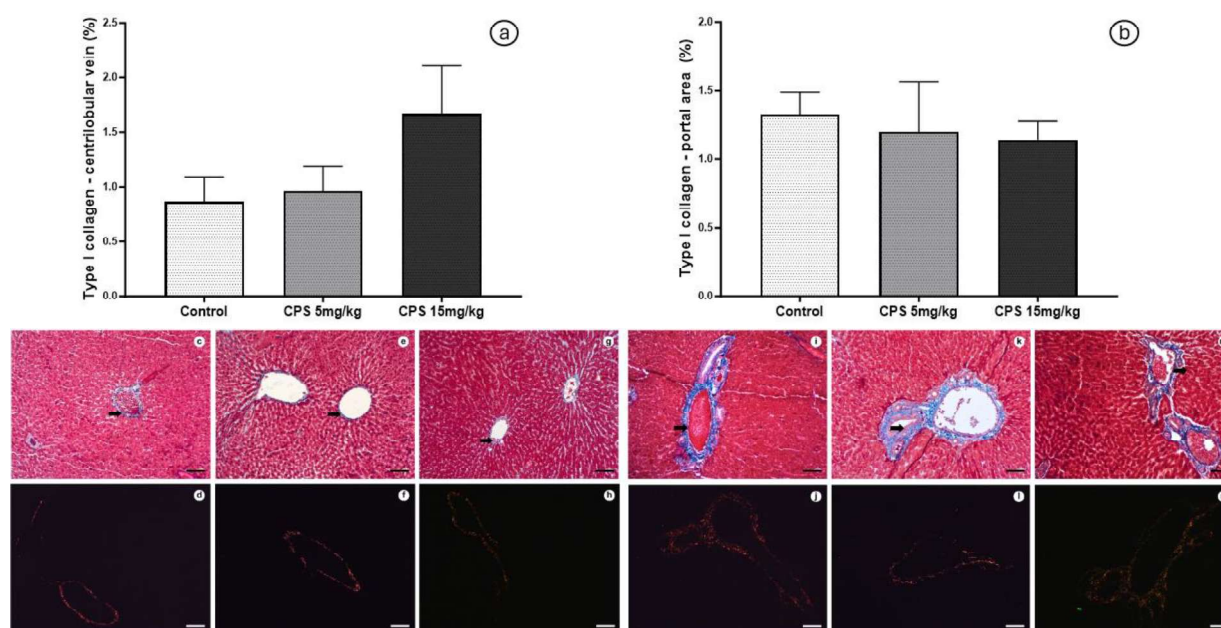


(a) Control Group (corn oil), (b) CPS 5 mg/kg Group, and (c) CPS 15 mg/kg Group. Centrilobular region (arrow); periportal region (arrowhead); foci of hepatocellular hydropic degeneration (arrows); congestion in the lumen of the central vein (asterisk). Staining: Hematoxylin and Eosin (H&E). Scale bar = 20 μ m.

3.6. Histochemical Analyses of Rat Liver

Masson's trichrome staining revealed mild periportal fibrosis (score 1) in all groups. Nevertheless, quantitative analysis of Picrosirius Red staining did not demonstrate significant differences in collagen-positive area density in either the centrilobular or periportal regions among experimental groups (Figure 5). Consistently, qualitative evaluation of renal sections stained with Masson's trichrome did not reveal evidence of increased collagen accumulation in chlorpyrifos-exposed animals.

Figure 5 - *Morphometric quantification of collagen deposition and histochemical evaluation by Masson's trichrome and Picrosirius Red staining in centrilobular and periportal regions of pubertal Wistar rats.*



Quantitative analysis of the collagen-positive area (%) within the (a) centrilobular and (b) periportal regions.

Representative photomicrographs of Masson's trichrome staining showing collagen fibers in blue (arrows) within the centrilobular (c, e, g) and periportal (d, f, h) zones. Representative photomicrographs of Picrosirius Red-stained sections under polarized light highlighting birefringent collagen fibers within the centrilobular (i, k, m) and periportal (j, l, n) regions. Experimental groups are represented by: Control Group (corn oil/vehicle; c, d, j, i); CPS 5 mg/kg Group (e, f, k, l); and CPS 15 mg/kg Group (g, h, m, n). Photomicrographs were obtained at original 100 $\times$ magnification. Scale bar = 20 μ m. Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test ($p < 0.05$).

4. Discussion

The present study demonstrates that pubertal exposure of Wistar rats to chlorpyrifos leads to distinct alterations in hepatic architecture, oxidative stress markers, and albumin levels, without changes in markers of hepatic injury or renal morphology. It is well recognized that pesticide exposure disrupts redox homeostasis, a primary mechanism of toxicity given the liver's central role in xenobiotic biotransformation (Banerjee et al., 2001). The magnitude of these effects is heavily modulated by factors such as exposure duration, route, and the developmental stage.

The timing of exposure is particularly critical (EFSA, 2019a). The peripubertal period

is characterized by the maturation of multiple physiological systems, rendering the organism highly susceptible to environmental insults (Perobelli, 2014). This vulnerability has been previously demonstrated by our research group in terms of impaired spermatogenesis and epididymal development (Costa et al., 2024; 2026). Here, we extend these findings to the hepatorenal axis, showing that the liver is a primary target of pubertal toxicity even at doses that do not elicit overt clinical signs.

A notable finding of the present study was the paradoxical increase in plasma albumin levels observed in both chlorpyrifos-treated groups. Given the central role of albumin in xenobiotic transport and distribution (Tarhoni et al., 2008), this finding contrasts with the hypoalbuminemia commonly associated with severe hepatic dysfunction. Although reduced water intake in the 15 mg/kg group may have contributed to hemoconcentration, the elevated albumin levels observed in the 5 mg/kg group, in which water consumption remained unchanged, suggest the involvement of an adaptive physiological response. This observation differs from previous findings reported by Uzun and Kalender (2013), who demonstrated decreased albumin concentrations in adult male Wistar rats exposed to chlorpyrifos (5.4 mg/kg/day) by oral gavage for 28 days. Therefore, our results raise the possibility that hepatic metabolic plasticity and compensatory mechanisms may be more pronounced during the peripubertal period than in adulthood.

Serum ALT and AST levels remained unchanged following chlorpyrifos exposure. Although chlorpyrifos is rapidly absorbed, distributed, and metabolized after oral administration, with acute toxicity studies demonstrating a wide range of adverse effects depending on dose and exposure conditions (EFSA, 2019a; 2019b), no evidence of hepatocellular injury was observed under the present experimental conditions. These findings contrast with previous studies reporting significant alterations in hepatic enzyme activity in adult Sprague–Dawley rats exposed to chlorpyrifos (13.5 mg/kg/day) for eight weeks, as well

as in a developmental exposure model involving Wistar dams treated with chlorpyrifos (1 or 3.5 mg/kg/day) from gestational day 0 to lactational day 21, followed by direct exposure of offspring from postnatal day (PND) 21 to PND 60 (Goel et al., 2000; Reygner et al., 2016).

Similarly, renal function biomarkers remained unaffected by treatment. Considering that chlorpyrifos and its metabolites are predominantly eliminated through the renal route within approximately 48 h following biotransformation (EFSA, 2019a; 2019b), alterations in renal parameters could be expected. Nevertheless, no significant changes were observed in serum creatinine, urea, or total protein concentrations. In contrast, Saoudi et al. (2021) reported renal biochemical disturbances in Wistar rats (210 g/weight) exposed to chlorpyrifos (63 mg/kg/day) by oral gavage for two weeks. Such discrepancies may be explained by differences in administered dose, exposure duration, experimental design, and, importantly, the developmental stage at which exposure occurred.

Importantly, the absence of enzymatic leakage does not preclude the presence of cellular stress. In the present study, oxidative stress biomarkers revealed a distinct dose-dependent response to chlorpyrifos exposure. Animals exposed to 5 mg/kg exhibited reduced TBARS levels together with preserved or increased thiol content, suggesting the activation of compensatory antioxidant mechanisms capable of maintaining redox homeostasis at lower exposure levels. This finding contrasts with previous reports demonstrating increased lipid peroxidation following chlorpyrifos exposure at doses as low as 5.4 mg/kg/day in adult rats (Uzun & Kalender, 2013).

Likewise, Verma et al. (2007) reported significantly elevated TBARS levels in the liver and other tissues of adult male Wistar rats treated with chlorpyrifos (100 mg/kg) by intramuscular injection for three consecutive days. The discrepancy between these findings and the present results may be attributed to substantial differences in dose, route of administration, exposure duration, and developmental stage at the time of exposure. Collectively, these

observations suggest that low-dose chlorpyrifos exposure during the peripubertal period may elicit adaptive redox responses that initially counteract oxidative damage, whereas higher doses or alternative exposure paradigms may overwhelm antioxidant defenses and promote lipid peroxidation.

Conversely, exposure to 15 mg/kg chlorpyrifos appeared to overwhelm these adaptive antioxidant defenses, shifting the redox balance toward a pro-oxidant state, as evidenced by increased lipid peroxidation and depletion of thiol groups. Furthermore, protein carbonylation, an irreversible marker of oxidative protein damage closely associated with impaired cellular function (Fedorova et al., 2014), exhibited a dose-dependent increase, with a significant elevation observed only in the high-dose group. This finding suggests that oxidative modification of structural and functional proteins may occur prior to the onset of overt hepatocellular injury, which could explain the absence of detectable changes in serum AST and ALT activities.

These observations are consistent with previous studies demonstrating increased lipid peroxidation and protein oxidation following chlorpyrifos exposure. Acker et al. (2012) reported elevated malondialdehyde and protein carbonyl levels in Wistar rats treated with chlorpyrifos (50 mg/kg) by subcutaneous administration for two days, while Taha et al. (2021) observed similar oxidative alterations in male albino rats exposed to chlorpyrifos (1.9 mg/kg/day) by oral gavage for 28 days. These comparative findings strongly support the hypothesis that oxidative damage represents an early and sensitive event in chlorpyrifos-induced toxicity, preceding detectable alterations in conventional biochemical markers of organ injury.

The marked reduction in total free thiol levels observed in the 15 mg/kg group further highlights this disruption of tissue redox balance and the impairment of antioxidant defenses. Thiol groups play a critical role in maintaining redox homeostasis, and their depletion is widely

associated with enhanced vulnerability to oxidative damage (Ulrich & Jakob, 2019).

This oxidative imbalance observed at the higher exposure level provides a plausible mechanistic basis for the histomorphometric alterations detected in the present study. Although histopathological evaluation revealed only mild and potentially reversible changes, including hydropic degeneration in animals exposed to 5 mg/kg chlorpyrifos, such alterations are generally considered indicative of early cellular adaptation to toxic insult rather than overt tissue injury. In this context, the concomitant occurrence of oxidative stress and subtle morphological changes supports the notion that redox disturbances may contribute to the initiation of hepatic injury before the development of detectable functional impairment.

From a broader perspective, the biochemical and histological findings suggest that pubertal chlorpyrifos exposure induces subtle and subclinical hepatic alterations that precede overt structural damage or measurable changes in conventional biomarkers of liver function. These observations are consistent with the findings of Samarghandian et al. (2020), who reported histopathological alterations in male Wistar rats exposed to chlorpyrifos (5 mg/kg/day) by oral gavage for 45 days, despite the absence of significant changes in serum hepatic enzyme activities. Accordingly, these data reinforce the concept that histological and oxidative stress markers may be more sensitive indicators of early chlorpyrifos-induced hepatotoxicity than traditional biochemical parameters.

Histomorphometric analysis of collagen deposition did not reveal significant differences among experimental groups in either the centrilobular or periportal regions. Although Masson's trichrome staining revealed mild periportal connective tissue deposition, quantitative analysis of Picrosirius Red-stained sections showed no measurable changes in collagen-positive area density. These findings suggest that chlorpyrifos exposure under the present experimental conditions was insufficient to induce detectable collagen accumulation or fibrotic remodeling in the liver.

In contrast, alterations in collagen deposition, extracellular matrix remodeling, and fibrotic changes have been reported in experimental models exposed to chlorpyrifos under different exposure conditions, including adult Wistar rats treated by oral gavage (13.5 mg/kg/day for 28 days), female mice exposed intraperitoneally (3 mg/kg for six weeks), and juvenile *Heteroclinas* exposed to chlorpyrifos-contaminated water (1–5 ppm for 96 h) (Abdel-Naim et al., 2023; Abdulkareem et al., 2020; Barzi et al., 2020). When interpreted alongside the oxidative stress and histopathological findings, the results indicate that hepatic injury occurred in the absence of significant extracellular matrix deposition, supporting the notion that the observed alterations represent an early stage of tissue response rather than established hepatic fibrosis.

In essence, repeated low-dose chlorpyrifos exposure during the peripubertal period induces subtle hepatic alterations, specifically redox imbalance and mild morphological shifts, prior to the onset of overt clinical toxicity or classical enzymatic leakage. Furthermore, while the renal parameters evaluated herein remained unaffected, the observed hepatic plasticity underscores the critical need for sensitive biochemical endpoints to detect early xenobiotic-induced disruptions under environmentally relevant exposure paradigms.

A limitation of the present study is the absence of acetylcholinesterase (AChE) measurements. However, the 15 mg/kg dose was selected based on established LOAEL values for neurotoxicity (Breslin et al., 1996), ensuring toxicological relevance sufficient to induce the systemic oxidative stress and metabolic adaptations described herein. Additionally, oxidative stress biomarkers were assessed exclusively in liver tissue. This decision was supported by the absence of significant alterations in renal biochemical and histopathological parameters, which indicated no evidence of kidney injury under the present experimental conditions. Nevertheless, subtle renal redox disturbances cannot be completely excluded and warrant further investigation in future studies.

5. Conclusion

In summary, repeated pubertal chlorpyrifos exposure disrupts hepatic redox homeostasis, even in the absence of overt renal toxicity or enzymatic evidence of liver injury. Our findings reveal a complex dose-dependent response, in which lower exposure levels appear to trigger adaptive metabolic adjustments, whereas higher doses promote oxidative imbalance and histopathological alterations. Although no significant changes in collagen deposition were detected, the observed hepatic alterations highlight the susceptibility of the developing liver to chlorpyrifos exposure. These subclinical effects underscore the insidious nature of pesticide exposure during critical developmental windows and suggest that physiological compensation may conceal underlying molecular and tissue disturbances with potential long-term health consequences.

References

- Abdel-Naim, A. B., Hassanein, E. H. M., Binmahfouz, L. S., Bagher, A. M., Hareeri, R. H., Algandaby, M. M., Fadladdin, Y. A. J., Aleya, L., & Abdel-Daim, M. M. (2023). Lycopene attenuates chlorpyrifos-induced hepatotoxicity in rats via activation of Nrf2/HO-1 axis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 262, 115122. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115122>
- Abdulkareem, S. I., Ajetunmobi, M. O., & Yekini, Y.O. (2020). Histopathological alterations in some tissues of *Heteroclinas* juveniles exposed to lethal and sub-lethal concentrations of chlorpyrifos and ameliorative potentials of vitamin E to the toxicity of the pesticide. *Tanzania Journal of Agricultural Sciences*, 19, 67-77.
- Acker, C. I., Souza, A. C. G., Santos, M. P., Mazzanti, C. M., & Nogueira, C. W. (2012). Diphenyl diselenide attenuates hepatic and hematologic toxicity induced by chlorpyrifos acute exposure in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 3481–3490.

<https://doi.org/10.1007/s11356-012-0882-4>

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2024). *Programa de Análise de Resíduos de*

Agrotóxicos em Alimentos - PARA. [https://www.gov.br/anvisa/pt-](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos)

[br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos)

Altintas, R., Polat, A., Parlakpınar, H., Vardi, N., Beytur, A., Oguz, F., Sagir, M., Yildiz, A.,

& Duran, Z.R. (2014). The effect of melatonin on acetylsalicylic acid-induced kidney and testis damage. *Human & Experimental Toxicology*, 33(4), 383–395.

<https://doi.org/10.1177/0960327113506240>

Banerjee, B. D., Seth, V., & Ahmed, R.S. (2001). Pesticide-induced oxidative stress:

perspectives and trends. *Reviews on Environmental Health*, 16(1), 1-40.

<https://doi.org/10.1515/REVEH.2001.16.1.1>

Barzi, N. V., Eftekhari, Z., Doroud, D., & Eidi, A. (2020). DNA methylation changes of

apoptotic genes in organogenesis stage of mice embryos by maternal chlorpyrifos

induction. *Environmental Toxicology*, 35(7), 794-803. <https://doi.org/10.1002/tox.22915>

Breslin, W. J., Liberacki, A. B., Dittenber, D. A., & Quast, J. F. (1996). Evaluation of the

developmental and reproductive toxicity of chlorpyrifos in the rat. *Fundamental and*

Applied Toxicology, 29(1), 119-130. <https://doi.org/10.1006/faat.1996.0013>

Clegg, E. (1960). The age at which male rats become fertile. *Journal of Reproduction and*

Fertility, 1, 119-120.

Colombo, G., Clerici, M., Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., & Dalle-Donne, I. (2016). A

step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *Journal of*

Chromatography B, 1019, 178-190. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.052>

Costa, I. R., Quadrelli, D. H., Silva, L. M. M., Andrade, F. G., & Fernandes, G. S. A. (2024).

Chlorpyrifos impairs sperm parameters and number of Sertoli and Leydig cells in rats

after exposure during the peripubertal period. *Toxicology*, 504, 153789.

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2024.153789>

Costa, I. R., Quadreli, D. H., Silva, L. M. M., Andrade, F. G., & Fernandes, G. S. A. (2026).

Exposure to chlorpyrifos influences epididymal development in pubescent rats.

Environmental Toxicology, 1-8. <https://doi.org/10.1002/tox.70033>

Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation

products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186, 407-421.

[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-h)

European Food Safety Authority. (2019a). Statement on the available outcomes of the human

health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance

chlorpyrifos-methyl. *EFSA Journal*, 17(8), e05810.

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5810>

European Food Safety Authority. (2019b). Statement on the available outcomes of the human

health assessment in the context of the pesticides peer review of the active substance

chlorpyrifos. *EFSA Journal*, 17(8), e05809. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5809>

Fedorova, M., Bollineni, R.C., & Hoffmann, R. (2014). Protein carbonylation as a major

hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrometry*

Reviews, 33(2), 79–97. <https://doi.org/10.1002/mas.21381>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2023). Pesticides use and trade

1990-2021. *FAOSTAT Analytical Brief*, 70, 1–12.

Gasmi, B., & Kleiner, D. E. (2019). Liver histology: diagnostic and prognostic features.

Clinics in Liver Disease, 24(1), 61-74. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2019.09.004>

Goel, A., Chauhan, D. P., & Dhawan, D. K., 2000. Protective effects of zinc in chlorpyrifos

induced hepatotoxicity: a biochemical and trace elemental study. *Biological Trace*

Element Research, 74, 171–183. <https://doi.org/10.1385/bter:74:2:171>

Kabir, E. R., Rahman, M. S., & Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and

- their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 40(1), 241-258. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>
- Koning, A. M., Meijers, W. C., Pasch, A., Leuvenink, H. G. D., Frenay, A. S., Dekker, M. M., Feelisch, M., Boer, R. A., & van Goor, H. (2016). Serum free thiols in chronic heart failure. *Pharmacological Research*, 111, 452-458. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.06.027>
- Levene, A. P., & Goldin, R. D. (2012). The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology* 61(2), 141-152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.04145.x>
- Ojeda, S. R., Andrews, W. W., Advis, J. P., & White, S. S. (1980). Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocrine Reviews*, 1(3), 228-257. <https://doi.org/10.1210/edrv-1-3-228>
- Perobelli, J. E. (2014). The male peripubertal phase as a developmental window for reproductive toxicology studies. *Current Pharmaceutical Design*, 20(34), 5398–5415. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140205150059>
- Raj, A., & Kumar, A. (2022). Recent advances in assessment methods and mechanism of microbe-mediated chlorpyrifos remediation. *Environmental Research*, 214(4), 114011. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114011>
- Reygner, J., Lichtenberger, L., Elmhiri, G., Dou, S., Bahi-Jaber, N., Rhazi, L., Depeint, F., Bach, V., Khorsi-Cauet, H., & Abdennebi-Najar, L. (2016). Inulin supplementation lowered the metabolic defects of prolonged exposure to chlorpyrifos from gestation to young adult stage in offspring rats. *PLoS One* 11, e0164614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164614>
- Samarghandian, S., Foadoddin, M., Zardast, M., Mehrpour, O., Sadighara, P., Roshanravan, B., & Farkhondeh, T. (2020). The impact of age-related sub-chronic exposure to

- chlorpyrifos on metabolic indexes in male rats. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(18), 22390-22399. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08814-0>
- Saoudi, M., Badraoui, R., Rahmouni, F., Jamoussi, K., & El Feki, A. (2021). Antioxidant and protective effects of *Artemisia campestris* essential oil against chlorpyrifos-induced kidney and liver injuries in rats. *Frontiers in Physiology*, 12, 618582. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.618582>
- Taha, M. A. I., Badawy, M. E. I., Abdel-Razik, R. K., Younis, H. M., & Abo-El-Saad, M. M. (2021). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in liver of male albino rats after exposing to sub-chronic intoxication of chlorpyrifos, cypermethrin, and imidacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 178, 104938. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104938>
- Tarhoni, M. H., Lister, T., Ray, D. E., & Carter, W. G. (2008). Albumin binding as a potential biomarker of exposure to moderately low levels of organophosphorus pesticides. *Biomarkers*, 13(4), 343-363. <https://doi.org/10.1080/13547500801973563>
- U.S. Environmental Protection Agency. (2022). Chlorpyrifos; tolerances and exemptions: Final rule. *Federal Register*, 87(39), 11222-11272.
- Ulrich, K., & Jakob, U. (2019). The role of thiols in antioxidant systems. *Free Radical Biology & Medicine*, 140, 14-27. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.035>
- Uzun, F. G., & Kalender, Y. (2013). Chlorpyrifos induced hepatotoxic and hematologic changes in rats: the role of quercetin and catechin. *Food Chemical Toxicology*, 55, 549-556. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.056>
- Verma, R. S., Mehta, A., & Srivastava, N. (2007). In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress: attenuation by antioxidant vitamins. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(2), 191-196. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.11.002>

APÊNDICES

APÊNDICE A - Morfofisiologia Hepática e Renal

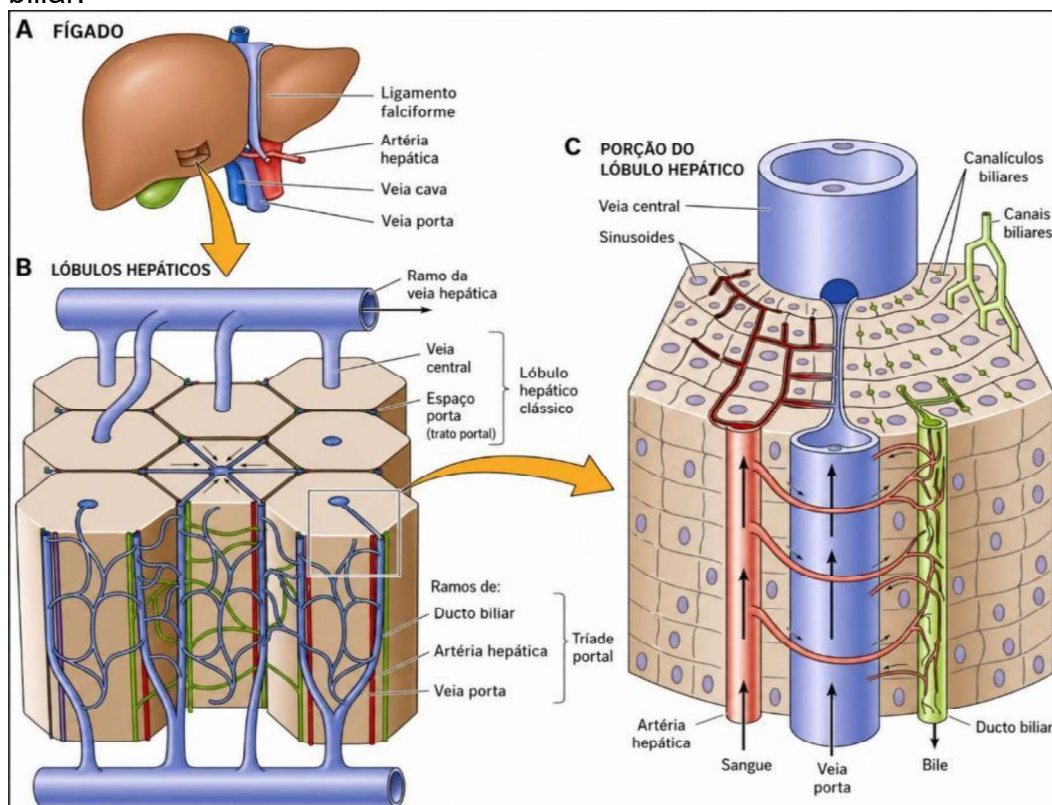
Visando estabelecer uma base conceitual unificada que sirva de material de referência para futuros pesquisadores do grupo, esta seção apresenta uma revisão didática da morfofisiologia básica hepatorenal, culminando nos aspectos de vulnerabilidade toxicológica fundamentais para este estudo.

Morfofisiologia Hepática

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo humano, com peso aproximado entre 1200 e 1500 gramas, correspondendo a cerca de 2 a 5% do peso corporal em adultos e de 4 a 5% em recém-nascidos, porém, estes valores podem variar a depender da etnia, composição corporal e designação sexual ao nascimento (Chan *et al.*, 2006; Vadgama *et al.*, 2014). Trata-se da maior glândula do organismo, desempenhando funções essenciais para a manutenção da homeostase sistêmica, incluindo o metabolismo energético, a síntese de proteínas, o armazenamento de nutrientes e a biotransformação de xenobióticos. Sua complexa organização estrutural e funcional resulta da integração entre os sistemas vascular, biliar e linfático, o que permite uma intensa interação com os sistemas digestório e circulatório (Bangru; Kalsotra, 2020).

Conforme representado na figura 1, o fígado (figura 1-A) apresenta diversos segmentos de igual importância para sua estrutura e funcionamento. Sua unidade estrutural clássica é o lóbulo hepático (figura 7-B), constituído predominantemente por hepatócitos, que correspondem a aproximadamente 80% do parênquima hepático (Wahlang *et al.*, 2013). Os hepatócitos organizam-se em placas ao redor de sinusoides hepáticos, formando uma estrutura altamente vascularizada que converge até a veia centrolobular (figura 7-C). Na periferia observa-se o espaço porta, composto pela tríade portal, sendo os ramos da veia porta, artéria hepática e ducto biliar, responsáveis pelo suprimento sanguíneo e drenagem biliar (Huppert; Iwafuchi-Doi, 2019).

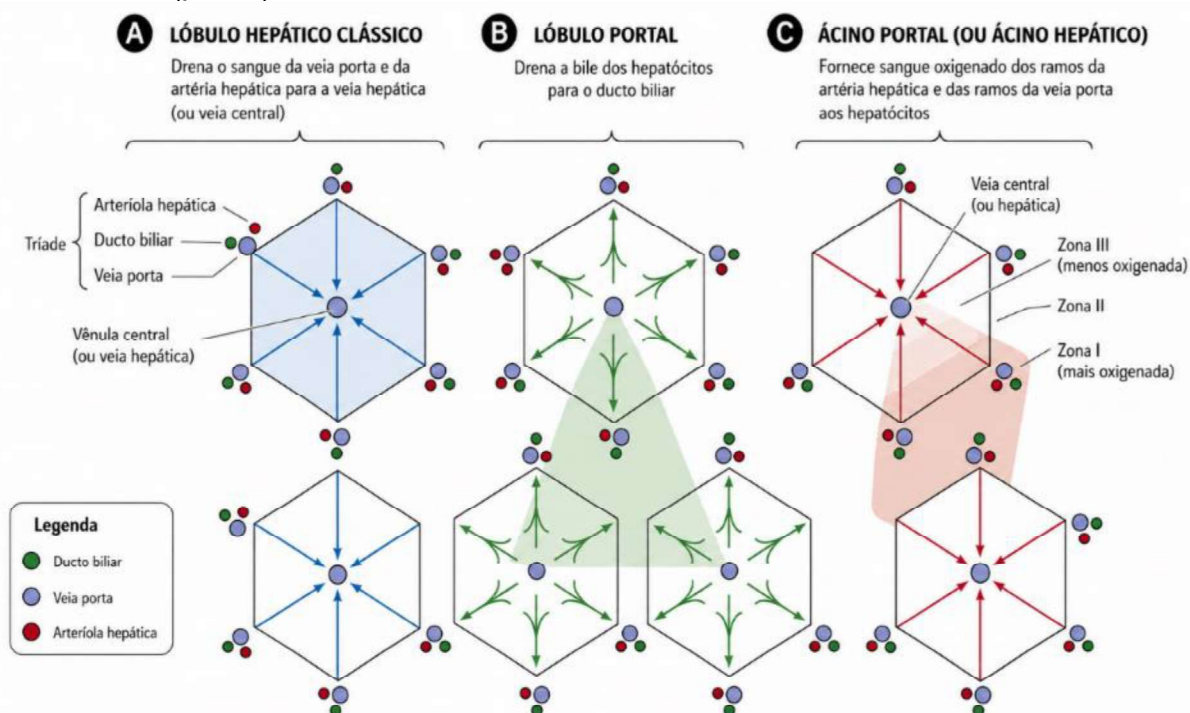
Figura 1 – Representação esquemática da organização macroscópica e microscópica do fígado, incluindo lóbulos hepáticos, tríade portal e fluxo sanguíneo e biliar.



Fonte: Adaptado e traduzido de Boron e Boulpaep (2017).

No parênquima hepático, didaticamente, podem ser reconhecidos três modelos de organização estrutural (figura 2). O primeiro é o lóbulo hepático clássico (figura 2 - A) no qual os hepatócitos estão organizados em torno da veia central, para onde o sangue converge. O segundo é o lóbulo portal (figura 2-B), que enfatiza a drenagem da bile em direção ao ducto biliar localizado no espaço porta. Por fim, o ácino hepático ou ácino portal (figura 2-C) destaca o suprimento sanguíneo arterial aos hepatócitos e o gradiente de oxigenação estabelecido entre os ramos da artéria hepática e da veia porta em direção à veia central (Trefts; Gannon; Wasserman, 2018).

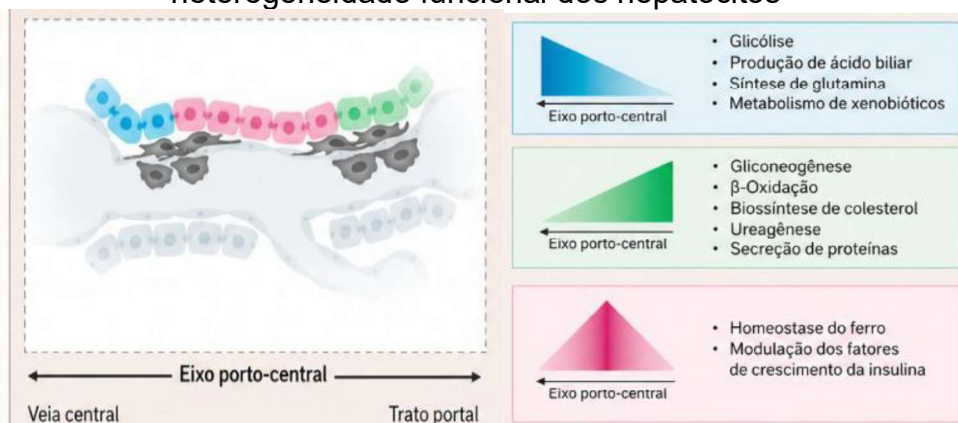
Figura 2 – Representação esquemática da organização hepática, incluindo os modelos do lóbulo hepático clássico, do lóbulo portal e do ácino hepático (portal).



Fonte: Adaptado e traduzido de Boron e Boulpaep (2017).

Do ponto de vista funcional, o fígado apresenta uma marcada zonificação metabólica (figura 3), sendo dividido em três regiões ao longo do eixo porta-central: zona 1 (periportal), zona 2 (intermediária) e zona 3 (centrolobular). A zona periportal é mais rica em oxigênio e especializada em processos oxidativos, como gliconeogênese, β -oxidação de ácidos graxos e o ciclo da ureia. Em contraste, a zona centrolobular apresenta maior atividade glicolítica e lipogênica, além de elevada capacidade de biotransformação de xenobióticos, atribuída à maior expressão de enzimas da família CYP450 (Ben-Moshe; Itzkovitz, 2019).

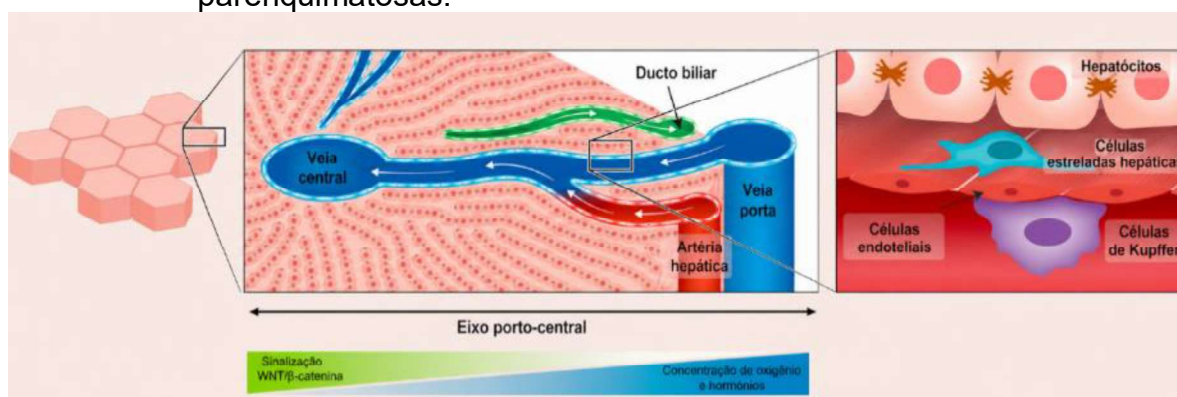
Figura 3 – Zonificação hepática ao longo do eixo porto-central, evidenciando a heterogeneidade funcional dos hepatócitos



Fonte: Adaptado e traduzido de Ben-Moshe e Itzkovitz (2019).

Essa heterogeneidade funcional torna a zona 3 particularmente suscetível a lesões tóxicas, hipóxia e estresse oxidativo, sendo frequentemente o principal sítio de dano hepático induzido por xenobióticos (Trefts; Gannon; Wasserman, 2018). Além disso, ao se analisar a composição do parênquima hepático, conforme figura 4, observa-se, além dos hepatócitos, a presença de células não parenquimatosas, como as células de Kupffer, células estreladas hepáticas, células endoteliais sinusoidais e colangiócitos (Manco; Itzkovitz, 2021).

Figura 4 – Visão estrutural do lóbulo hepático com caracterização das células não parenquimatosas.



Fonte: Adaptado de Manco e Itzkovitz (2021).

O suprimento sanguíneo do fígado é duplo, sendo proveniente da veia porta e da artéria hepática. A veia porta é responsável por aproximadamente 75% do fluxo sanguíneo hepático total, enquanto a artéria hepática contribui com cerca de 25% restantes. O sangue que chega ao fígado pela veia porta é parcialmente desoxigenado e proveniente do baço, estômago, intestinos delgado e grosso, vesícula biliar e

pâncreas. Em contrapartida, o sangue oriundo da artéria hepática apresenta elevada oxigenação. Embora o fígado represente uma fração relativamente pequena do peso corporal, recebe cerca de 25% do débito cardíaco. A veia porta, por não possuir válvulas, integra um sistema de baixa pressão e baixa resistência, enquanto a artéria hepática opera em um sistema de alta pressão e maior resistência (Eipel; Abshagen; Vollmar, 2010).

O fígado assim, exerce papel central no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, regulando a disponibilidade energética por meio de processos como glicogênese, glicogenólise, cetogênese e síntese de lipoproteínas. Além disso, é o principal local de síntese de proteínas plasmáticas, como a albumina, essencial para a manutenção da pressão oncótica e para o transporte de substâncias endógenas e exógenas (Trefts; Gannon; Wasserman, 2018). Paralelamente a essas funções metabólicas, o fígado desempenha papel fundamental na biotransformação de xenobióticos, um processo que ocorre em três fases interdependentes.

Na fase I, predominam reações de oxidação, redução ou hidrólise, catalisadas principalmente pelas enzimas da família CYP450, que introduzem ou expõem grupos funcionais nas moléculas. *Na fase II*, esses metabólitos são conjugados a compostos hidrossolúveis, como glicuronato, sulfato ou glutatona, aumentando sua polaridade e facilitando sua eliminação. Por fim, na *fase III*, transportadores de membrana promovem o efluxo desses compostos para a bile ou para a circulação sistêmica (Almazroo; Miah; Venkataramanan, 2017; Xu; Li; Kong, 2005). Embora esse sistema esteja associado à detoxificação, a biotransformação hepática também pode gerar metabólitos reativos, capazes de induzir estresse oxidativo e contribuir para o desenvolvimento de lesões hepáticas (Almazroo; Miah; Venkataramanan, 2017; Xu; Li; Kong, 2005).

Morfofisiologia Renal

Os rins são órgãos pares localizados retroperitonealmente, posicionados em ambos os lados da coluna vertebral, sendo o rim direito ligeiramente mais inferior em relação ao esquerdo, em decorrência da posição do fígado. Apesar de relativamente pequenos, correspondendo, em conjunto, a aproximadamente 0,5% do peso corporal, desempenham funções essenciais à manutenção da homeostase. Esses órgãos são responsáveis pela filtração do sangue, promovendo a remoção de produtos do

metabolismo e de substâncias potencialmente tóxicas da circulação sistêmica. Além disso, exercem papel central na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico, ácido-base e da pressão arterial. Complementarmente, apresentam funções endócrinas relevantes, incluindo a produção de eritropoetina, fundamental para a eritropoese, participação no metabolismo do cálcio por meio da ativação da vitamina D e do sistema renina–angiotensina–aldosterona (Wallace, 1998).

Apesar de os rins representarem aproximadamente 0,5% do peso corporal, são órgãos altamente vascularizados e recebem um volume sanguíneo expressivo. O fluxo sanguíneo renal é de cerca de 1 L/min, o que corresponde a aproximadamente 20 a 25% do débito cardíaco total (~5 L/min). Como consequência, os rins são capazes de filtrar, em média, cerca de 180 litros de plasma por dia (Faria et al., 2019; Radi, 2019).

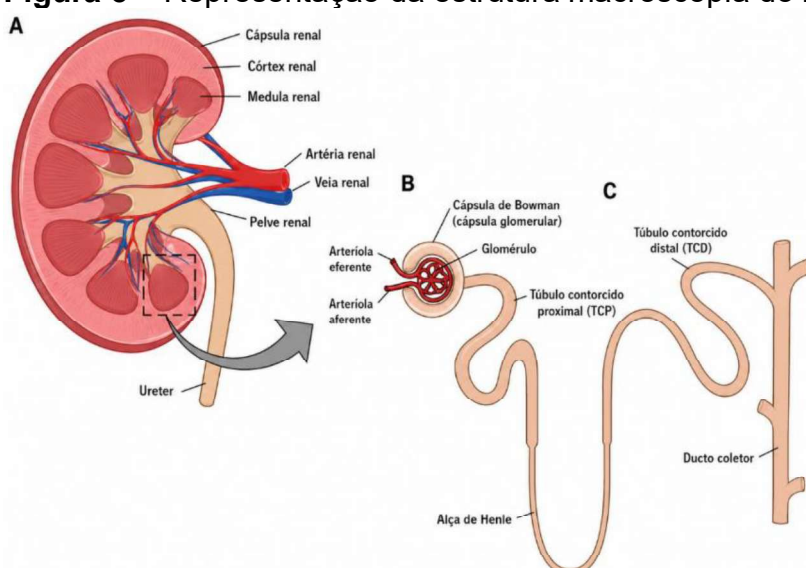
O parênquima renal pode ser dividido em córtex e medula (Figura 5 - A). A região cortical apresenta aspecto granular e contém estruturas como os glomérulos, capilares e grande quantidade de túbulos contorcidos de natureza epitelial. Já a região medular, histologicamente mais escura, não apresenta glomérulos, sendo caracterizada por um arranjo paralelo de túbulos e vasos sanguíneos (Radi, 2019). Cada rim humano possui, em média, cerca de 800 mil a 1,2 milhão de néfrons. O néfron, unidade funcional do rim, é composto por um componente vascular, o glomérulo, e um componente tubular epitelial. O glomérulo (Figura 5 - B) consiste em um tufo de capilares sanguíneos onde ocorre a filtração do plasma, originando o ultrafiltrado glomerular. Esse ultrafiltrado é coletado pela cápsula de Bowman (ou cápsula glomerular), uma estrutura epitelial em forma de fundo cego que envolve o glomérulo e delimita o espaço de Bowman, contínuo com o lúmen tubular. A partir desse ponto, o filtrado percorre o túbulo renal, constituído pelo túbulo contorcido proximal (TCP), alça de Henle e túbulo contorcido distal (TCD), segmentos especializados que promovem modificações sucessivas no filtrado até a formação da urina final (Bertram et al., 2011; Radi, 2019; Wallace, 1998).

O TCP (Figura 5 - B) é responsável pela reabsorção da maior parte do filtrado glomerular, incluindo glicose, aminoácidos, bicarbonato e proteínas de baixo peso molecular, sendo funcionalmente mais especializado que os segmentos distais do néfron. Assim como o fígado, desempenha papel central na captação, metabolismo e secreção de xenobióticos por meio de transportadores específicos e enzimas das fases I e II, o que o torna particularmente suscetível à toxicidade, especialmente em

fases de imaturidade funcional (Hall; Trepiccione; Unwin, 2022). Já a alça de Henle (Figura 5 - B) é responsável pela geração do gradiente osmótico medular por meio do mecanismo de contracorrente, essencial para a concentração urinária. Nesse segmento, o ramo descendente apresenta alta permeabilidade à água, favorecendo sua reabsorção passiva, atribuída à presença de aquaporinas e à baixa atividade da bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$. Em contraste, o ramo ascendente espesso é impermeável à água e promove a reabsorção ativa de íons, especialmente sódio, potássio e cloreto, por meio do cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC2) e do trocador Na^+/H^+ (NHE3), contribuindo para a formação de um interstício medular hipertônico. Esse segmento é responsável por aproximadamente 25–30% da reabsorção total de sódio no néfron (Palmer; Schnermann, 2015).

No TCD (Figura 5 - C) e no ducto coletor ocorre o controle fino da excreção de sódio e água, com elevada capacidade de modulação em resposta a alterações no estado fisiológico, contribuindo para a manutenção da homeostase hidroeletrolítica e do volume extracelular. O TCD é responsável pela reabsorção de aproximadamente 6–10% do sódio filtrado, predominantemente por meio do cotransportador Na^+/Cl^- (NCC) em sua porção inicial. Já na porção mais distal e no túbulo conector, a reabsorção de sódio ocorre principalmente por meio dos canais epiteliais de sódio, cuja atividade é regulada por hormônios, especialmente a aldosterona (Palmer; Schnermann, 2015).

Figura 5 – Representação da estrutura macroscópica do rim e microscópica do néfron



Fonte: Adaptado e traduzido de Faria *et al.* (2019).

Como já caracterizado brevemente nos parágrafos anteriores, o processo de maturação fisiológica hepática e renal ocorre predominantemente no período pós-natal, caracterizando-se pela progressiva especialização estrutural e funcional desses órgãos. No fígado, destaca-se a maturação do sistema enzimático de biotransformação, especialmente das enzimas da família da CYP450, além de enzimas de fase II, como as UDP-glucuronosiltransferases (UGTs), sulfotransferases e glutathione-S-transferases. Esse processo resulta no aumento da capacidade de metabolização e detoxificação de xenobióticos ao longo do desenvolvimento.

Paralelamente, no rim, observa-se a maturação funcional do néfron, incluindo o aumento da taxa de filtração glomerular, o aprimoramento dos mecanismos de reabsorção e secreção tubular, particularmente no túbulo contorcido proximal, onde há expressão crescente de transportadores e enzimas envolvidas na biotransformação, e o estabelecimento completo dos mecanismos de concentração urinária na alça de Henle. Assim, quando o organismo é exposto a agentes tóxicos, como o clorpirifós, a exposição a agentes tóxicos deflagra respostas fisiológicas compensatórias com o objetivo de manter a homeostase. Entre essas respostas, destaca-se a indução de mecanismos de defesa celular, incluindo a ativação de sistemas antioxidantes e o aumento da produção de espécies reativas, culminando em um estado de estresse oxidativo quando há desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a capacidade antioxidante do organismo.

REFERÊNCIAS

- ALMAZROO, O. A.; MIAH, M. K.; VENKATARAMANAN, R. Drug metabolism in the liver. **Clinics in Liver Disease**, San Clemente, v. 21, n. 1, p. 1–20, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.001>.
- BANGRU, S.; KALSOTRA, A. Cellular and molecular basis of liver regeneration. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, London, v. 100, p. 74-87, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2019.12.004>.
- BEN-MOSHE, S.; ITZKOVITZ, S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, London, v. 16, n. 7, p. 395-410, 2019. doi: <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0134-x>.
- BERTRAM, J. F. et al. Human nephron number: Implications for health and disease. **Pediatric Nephrology**, Berlin, v. 26, n. 9, p. 1529-1533, 2011. doi: <https://doi.org/10.1007/s00467-011-1843-8>.

BORON, W. F.; BOULPAEP, E. L. **Medical physiology**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2017.

CHAN, S. C. et al. Estimating liver weight of adults by body weight and gender. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 12, n. 14, p. 2217–2222, 2006.

EIPEL, C.; ABSHAGEN, K.; VOLLMAR, B. Regulation of hepatic blood flow: The hepatic arterial buffer response revisited. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 16, n. 48, p. 6046–6057, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i48.6046>.

FARIA, J. et al. Kidney-based in vitro models for drug-induced toxicity testing. **Archives of Toxicology**, New York, v. 93, n. 12, p. 3397–3418, 2019. doi: <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02598-0>.

HALL, A. M.; TREPICCIONE, F.; UNWIN, R. J. Drug toxicity in the proximal tubule: new models, methods and mechanisms. **Pediatric Nephrology**, Berlin, v. 37, n. 5, p. 973–982, 2022. doi: <https://doi.org/10.1007/s00467-021-05121-9>.

HUPPERT, S. S.; IWAFFUCHI-DOI, M. Molecular regulation of mammalian hepatic architecture. In: **Current Topics in Developmental Biology**, [S. l.], v. 132, p. 91–136, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.12.003>.

MANCO, R.; ITZKOVITZ, S. Liver zonation. **Journal of Hepatology**, Copenhagen, v. 74, n. 2, p. 466–468, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.09.003>.

PALMER, L. G.; SCHNERMANN, J. Integrated control of Na transport along the nephron. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 676–687, 2015. doi: <https://doi.org/10.2215/CJN.12391213>.

RADI, Z. A. Kidney pathophysiology, toxicology, and drug-induced injury in drug development. **International Journal of Toxicology**, Cincinnati, v. 38, n. 3, p. 215–227, 2019. doi: <https://doi.org/10.1177/1091581819831701>.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. The liver. **Current Biology**, London, v. 27, n. 21, p. R1147–R1151, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>.

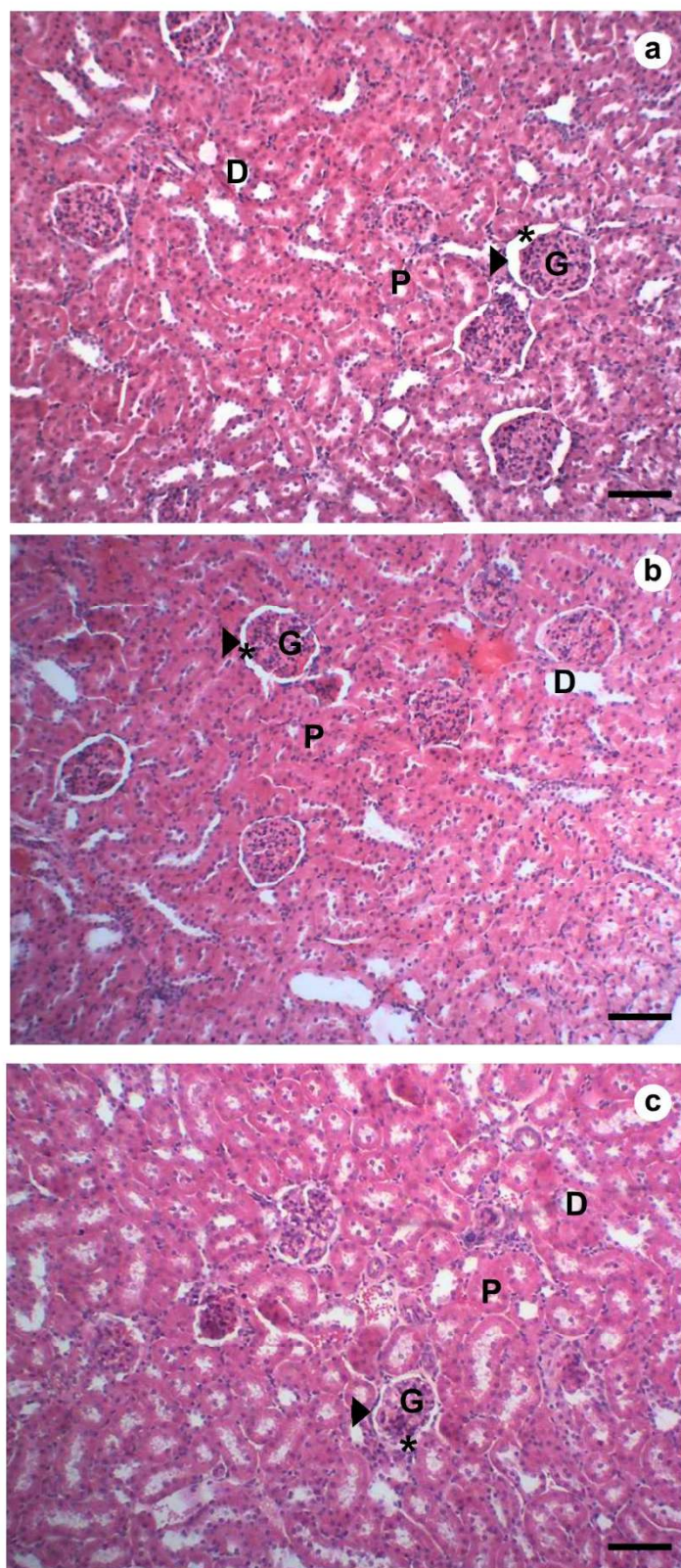
VADGAMA, D. K. et al. Autopsy Study of Organ Weights in Relation to Body Weight and Body Length of Adult Cases in Jamnagar Region. **Journal of Indian Academy of Forensic Medicine, Berhampur**, v. 36, n. 3, p. 238–241, 2014.

WAHLANG, B. et al. Toxicant-associated steatohepatitis. **Toxicologic Pathology**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 343–360, 2013. doi: <https://doi.org/10.1177/0192623312468517>.

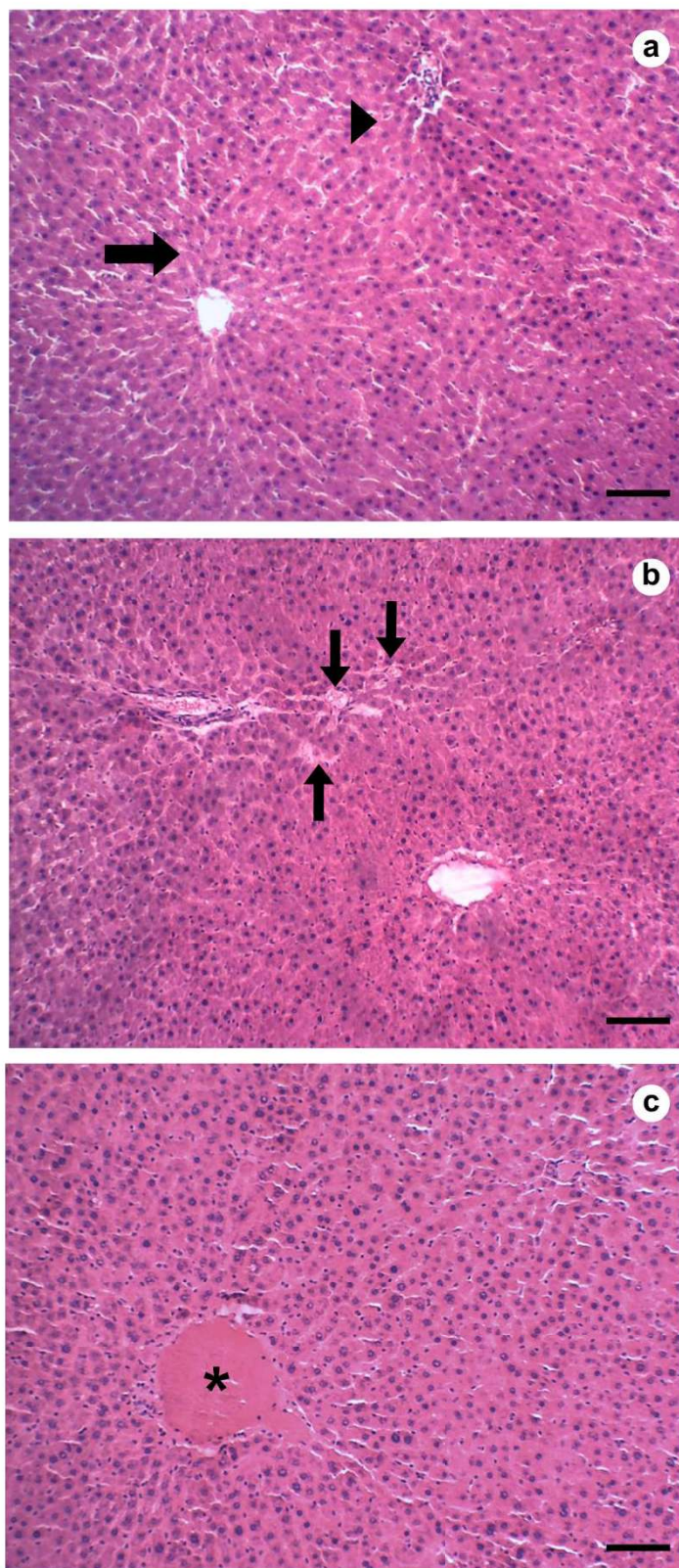
WALLACE, M. A. Anatomy and physiology of the kidney. **AORN Journal**, Denver, v. 68, n. 5, p. 799–800, 1998. doi: [https://doi.org/10.1016/s0001-2092\(06\)62377-6](https://doi.org/10.1016/s0001-2092(06)62377-6).

XU, C.; LI, C. Y.-T.; KONG, A.-N. T. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 28, n. 3, p. 249–268, 2005.

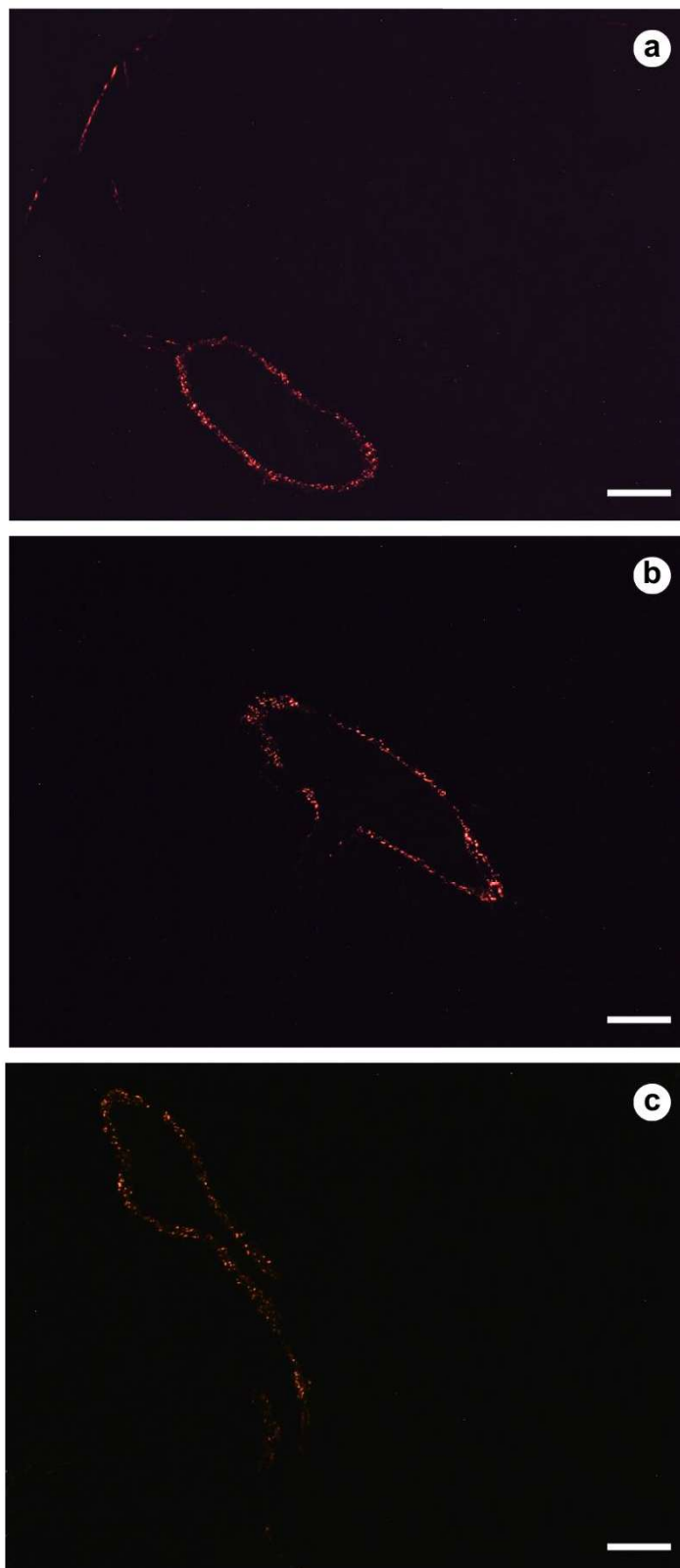
APÊNDICE B - Fotomicrografias do córtex renal de ratos Wistar peripuberais submetidos à exposição repetida ao clorpirifós (CPS). (a) Grupo Controle (óleo de milho), (b) Grupo CPS 5 mg/kg e (c) Grupo CPS 15 mg/kg. Glomérulo (G); espaço de Bowman (asterisco); folheto parietal da cápsula de Bowman (cabeça de seta); túbulo contorcido proximal (P); túbulo contorcido distal (D). Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E). Barra de escala = 20 μ m.



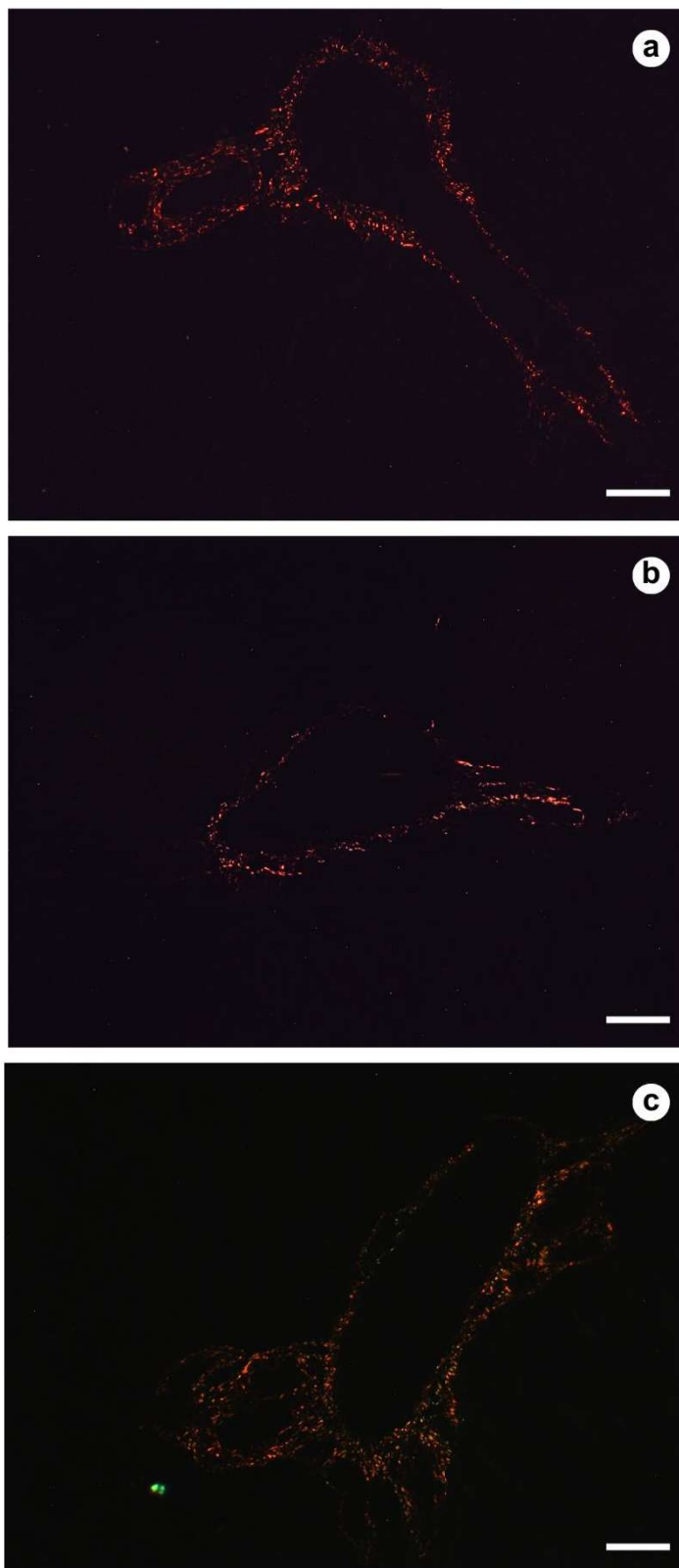
APÊNDICE C - Fotomicrografias do fígado de ratos Wistar peripuberais submetidos à exposição repetida ao clorpirifós (CPS). (a) Grupo Controle (óleo de milho), (b) Grupo CPS 5 mg/kg e (c) Grupo CPS 15 mg/kg. Região centrolobular (seta); região periportal (cabeça de seta); focos de degeneração hidrópica citoplasmática (setas); congestão no lúmen da veia centrolobular (asterisco). Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E). Barra de escala = 20 μ m.



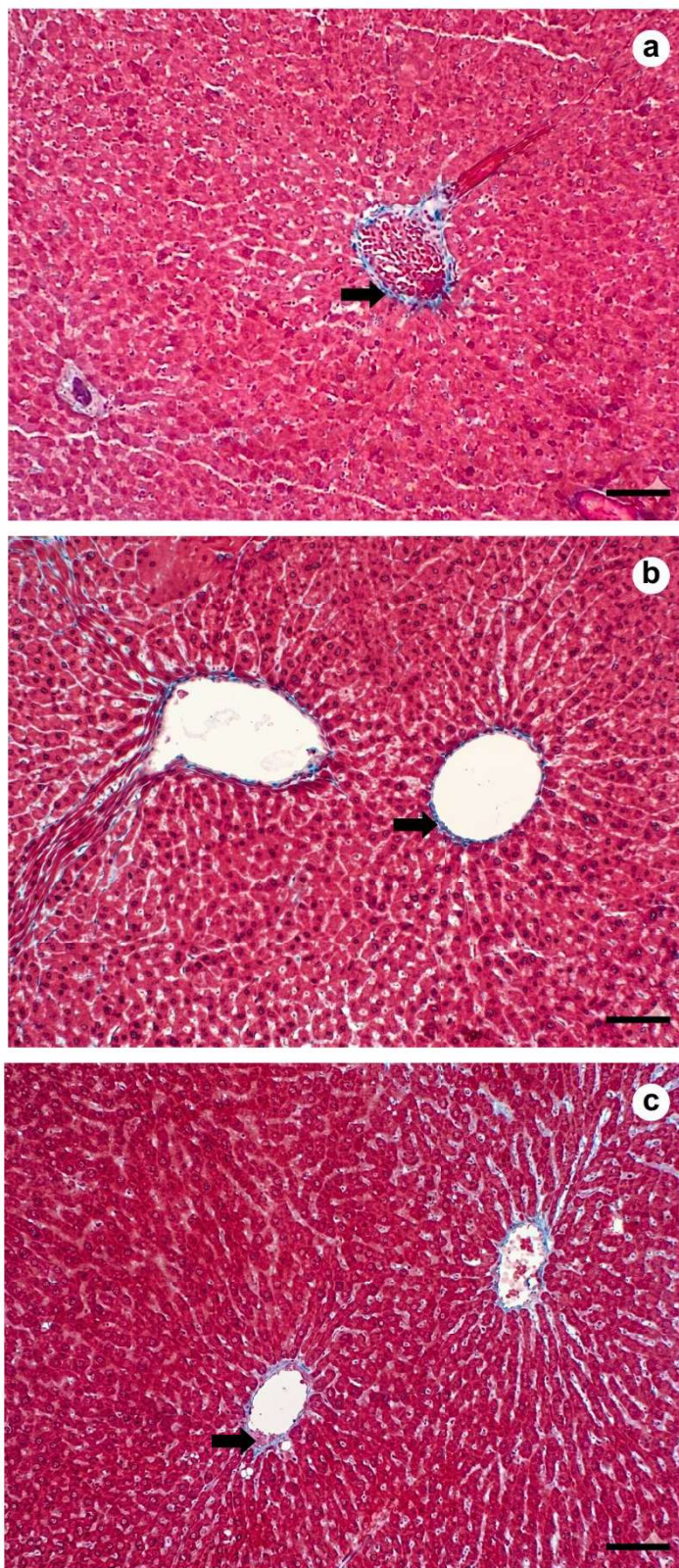
APÊNDICE D - Fotomicrografias da região centrolobular do fígado de ratos Wistar peripuberais submetidos à exposição repetida ao clorpirifós (CPS). (a) Grupo Controle (óleo de milho), (b) Grupo CPS 5 mg/kg e (c) Grupo CPS 15 mg/kg. Observa-se a distribuição e organização normais das fibras colágenas birrefringentes ao redor da veia centrolobular nas diferentes condições experimentais. Coloração: Picrosirius Red sob luz polarizada. Barra de escala = 20 μ m.



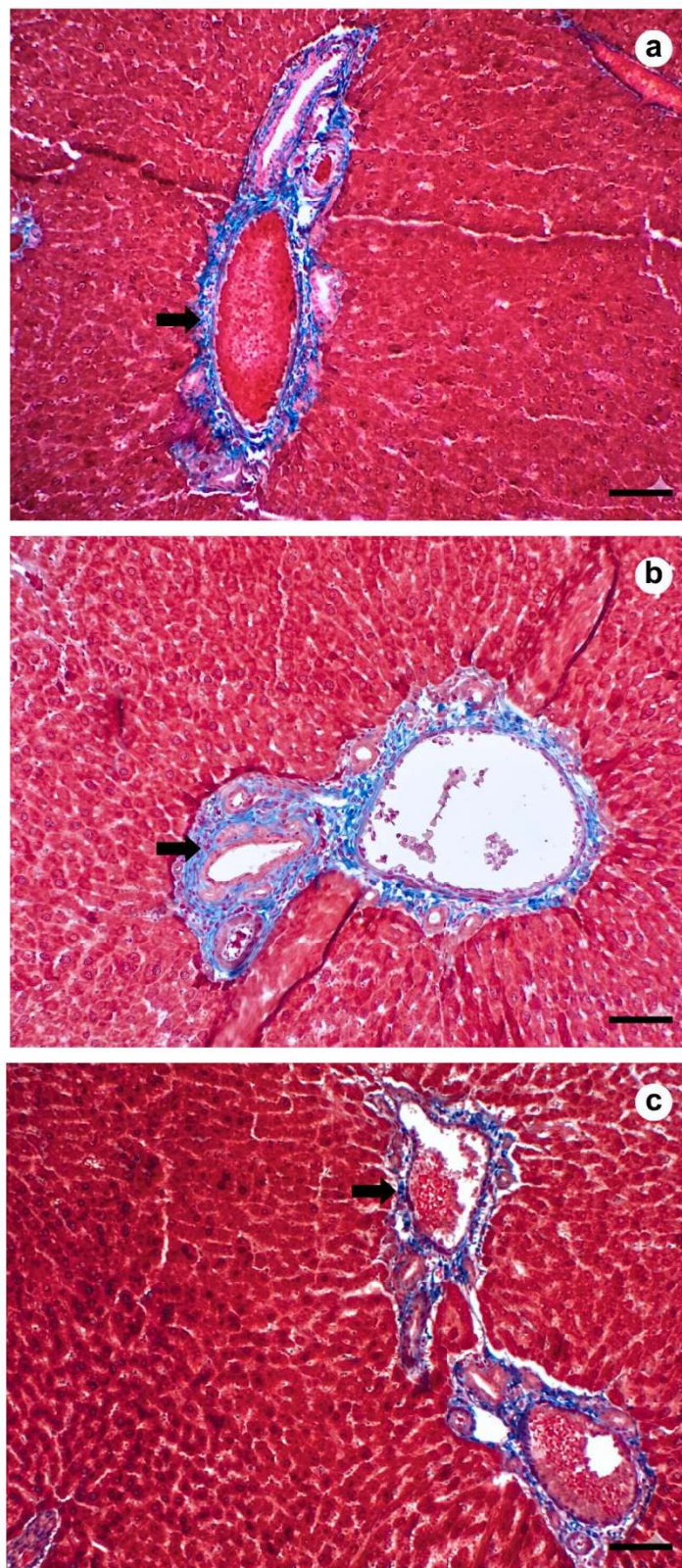
APÊNDICE F - Fotomicrografias da região periportal do fígado de ratos Wistar peripuberais submetidos à exposição repetida ao clorpirifós (CPS). (a) Grupo Controle (óleo de milho), (b) Grupo CPS 5 mg/kg e (c) Grupo CPS 15 mg/kg. Evidencia-se o padrão estrutural preservado das fibras colágenas birrefringentes que circundam o espaço porta nos diferentes grupos. Coloração: Picrosirius Red sob luz polarizada. Barra de escala = 20 μ m.



APÊNDICE G - Fotomicrografias da região centrolobular do fígado de ratos Wistar peripuberais submetidos à exposição repetida ao clorpirifós (CPS). (a) Grupo Controle (óleo de milho), (b) Grupo CPS 5 mg/kg e (c) Grupo CPS 15 mg/kg. Evidenciação de fibras colágenas coradas em azul na região perivascular da veia centrolobular (seta). Coloração: Tricrômico de Masson. Barra de escala = 20 μ m.



APÊNDICE H - Fotomicrografias da região periportal do fígado de ratos Wistar peripuberais submetidos à exposição repetida ao clorpirifós (CPS). (a) Grupo Controle (óleo de milho), (b) Grupo CPS 5 mg/kg e (c) Grupo CPS 15 mg/kg. Evidenciação de fibras colágenas coradas em azul delimitando os componentes do espaço porta (seta). Coloração: Tricrômico de Masson. Barra de escala = 20 μ m.



ANEXOS

ANEXO A - Comprovante de submissão - Artigo 1

**Toxicological & Environmental Chemistry****Developmental Hepatorenal Toxicity of Chlorpyrifos in Experimental Models: An Integrative Critical Review (2014–2024)**

Submission ID	268391324
Article Type	Review
Keywords	chlorpyrifos, environmental exposure, hepatotoxicity, developmental toxicity
Authors	LUCAS MARCELO MEIRA DA SILVA, Fábio Goulart de Andrade

For any queries please contact:

journalshelpdesk@taylorandfrancis.com

Note for Reviewers:

To submit your review please visit <https://mc.manuscriptcentral.com/GTEC>

ANEXO B – Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética no uso de animais – Universidade Estadual de Londrina.



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 034/2021

Londrina, 01 de abril de 2021.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto intitulado: **“Efeitos sistêmicos e reprodutivos da exposição ao clorpirifós durante o período peripuberal de ratos Wistar”** protocolo CEUA n° **013.2021** sob a responsabilidade de **Fábio Goulart de Andrade**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/Uel) no dia 01/04/2021.

Este projeto tem por objetivo verificar os efeitos sistêmicos e reprodutivos da exposição ao clorpirifós durante o período peripuberal de ratos Wistar. **Grau de invasividade: 2.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	19/04/2021 a 18/04/2024
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogêneo/ Wistar
Nº de animais	30
Peso/ Idade	22 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UEL
Amostras a serem coletadas	Sangue, testículos, epidídimos, próstata, ductos deferentes, fígado, glândulas adrenais, rins, intestino: jejuno proximal e cólon distal, tecido adiposo perivisceral.

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/Uel anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

Prof.ª Dr.ª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/Uel

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a) Fábio Goulart de Andrade

Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia do Departamento de Histologia /CCB

C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas/ CCB

C/C para o Biotério Central da UEL/ CCB

Campos Universitários: Rodovia Celso Garcia Cid (PR-405), km 308 - Fone (043) 3371-4000 FAX: - Fax 3328-6400 - Caixa Postal 10.031 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>

LONDRIANA - PARANÁ - BRASIL

ANEXO B - Protocolo de inclusão em parafina histológica – Laboratório de Análise Histopatológica

Alcool Isopropílico 70%	30 min
Alcool Isopropílico 90%	30 min
Alcool Isopropílico 100%	30 min
Alcool Isopropílico 100%	30 min
Parafina (40%) + Iso (40%) + Xilol (10%)	30 min
Parafina + 5% Resina de EVA	Overnight
Incluir	

PROTOCOLO DE INCLUSÃO EM PARAFINA (NORMAL COM XILOL)

ETAPA	TEMPO
ÁLCOOL 92% ou 95% I	30 minutos
ÁLCOOL 92% ou 95% II	30 minutos
ÁLCOOL 92% ou 95% III	30 minutos
ÁLCOOL 100% I	30 minutos
ÁLCOOL 100% II	30 minutos
ÁLCOOL 100% III	30 minutos
XILOL I	30 minutos
XILOL II	30 minutos
XILOL III	30 minutos
XILOL IV (ESTUFA)	30 minutos
PARAPLAST® I	30 minutos
PARAPLAST® II	30 minutos
PARAPLAST® III	30 minutos
PARAPLAST® IV	30 minutos
INCLUSÃO EM FORMAS DE PAPEL	

Após o resfriamento completo, as peças incluídas devem ser afixadas em cassetes apropriados e destinadas à microtomia.

A espessura dos cortes em micrótomo semiautomático pode variar de acordo com o tecido a ser analisado (ex. 5 ou 7µm).

Os cortes obtidos devem ser colocados em banho-maria à temperatura de 45°C e coletados em lâmina histológica de vidro, que serão então armazenadas em estufa a 36°C por no mínimo 24 horas, para completa distensão do corte.

**ANEXO C - Protocolo de coloração com hematoxilina e eosina – Laboratório de
Análise Histopatológica**

ETAPA	TEMPO
Xilol I	3 min
Xilol II	3 min
Álcool 100%	1 min
Álcool 95% ou comercial (92%)	1 min
Álcool 70%	1 min
Água Destilada	3 min
Hematoxilina	8 min
Água corrente	5 min
Álcool Ácido 1%	30 segundos
Água corrente	1 min
Eosina Amarela 0,25%	1 min
Água Destilada	3 banhos
Álcool 70%	1 min
Álcool 95% ou comercial (92%)	1 min
Álcool 100%	1 min
Xilol-álcool (1:1)	1 min
Xilol III	3 min
Xilol IV	3 min
Montagem	

ANEXO D - Protocolo de coloração com Picrossirius + fast green – Laboratório de Análise Histopatológica

ETAPA	TEMPO
XIOL I	5 minutos
XIOL II	5 minutos
ÁLCOOL/FORMOL	3 minutos
ÁLCOOL 100%	3 minutos
ÁLCOOL 92/95%	3 minutos
ÁLCOOL 70%	3 minutos
ÁGUA DESTILADA (52°C)	15 minutos
SOLUÇÃO DE PICROSSIRIUS+FAST GREEN	30 minutos
ÁGUA/ÁCIDO ACÉTICO (1%)	3 trocas
ÁGUA DESTILADA (25°C)	5 minutos
ÁLCOOL 100%	1 troca
ÁLCOOL-XIOL (1:1)	1 minuto
XIOL I	3 minutos
XIOL II	3 minutos
Montagem com bálsamo do Canada	

Preparo solução Picrossirius 0,1%
Reagentes
Sirius Red – 0,1g
Solução de ácido pícrico saturado – 100mL

Preparo álcool-formol
Reagentes
Ácido acético – 2 mL
Água destilada – 398 mL

ANEXO E - Protocolo de coloração Tricrômico de Masson – Laboratório de Análise Histopatológica

ETAPA	TEMPO
XILOL I	3 minutos
XILOL II	3 minutos
ÁLCOOL 100%	3 minutos
ÁLCOOL 95%	3 minutos
ÁLCOOL 70%	3 minutos
ÁGUA DESTILADA	3 minutos
ÁCIDO PICRICO ALCOOLICO SATURADO	5 minutos
ÁGUA CORRENTE	5 minutos
CORANTE DE VERHOEFF*	6 minutos
ÁGUA CORRENTE	10 minutos
ESCARLATE + FUCSINA	3 minutos
ÁGUA DESTILADA	3x
ÁCIDO FOSFOTUNGSTICO + FOSFOMOLIBIDICO	15 minutos
AZUL DE ANILINA	3 minutos
Ac. ACÉTICO 1%	3 minutos
ÁGUA DESTILADA	3x
ÁLCOOL 70%	3x
ÁLCOOL 95%	1 minutos
ÁLCOOL 100%	1 minutos
ÁLCOOL 100%	1 minutos
ÁLCOOL-XILOL (1:1)	1 minutos
XILOL I	3 minutos
XILOL II	3 minutos
Montagem em balsamo do Canada	