



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
*Campus São Gabriel*

ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA  
TOXICIDADE INDUZIDA PELO FUNGICIDA MANCOZEB EM  
EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio* Hamilton-  
Buchanan, 1822)

LUANA PAGANOTTO LEANDRO

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA  
TOXICIDADE INDUZIDA PELO FUNGICIDA MANCOZEB EM  
EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio* Hamilton-  
Buchanan, 1822)

LUANA PAGANOTTO LEANDRO

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de  
Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Pampa — UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel,  
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau  
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Jeferson Luis Franco

Rio Grande do Sul

Dezembro de 2017

ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA  
TOXICIDADE INDUZIDA PELO FUNGICIDA MANCOZEB EM  
EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio* Hamilton-  
Buchanan, 1822)

LUANA PAGANOTTO LEANDRO

ORIENTADOR: JEFERSON LUIS FRANCO

Monografia submetida à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada por:

---

Presidente, Prof. Dr. Jeferson Luis Franco

---

Prof. Dr. Angelo Alberto Schneider

---

Prof. Dr. Jair Putzke

São Gabriel, Dezembro de 2017.

## FICHA CATALOGRÁFICA

**LEANDRO, Luana**

Título: Envolvimento do Estresse Oxidativo na Toxicidade Induzida pelo Fungicida Mancozeb em Embriões de Peixe-zebra (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822)/ Luana Paganotto Leandro. – Rio Grande do Sul: UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel, 2017.

[ix], [48] f.: Il:20; 30 cm.

Orientador: Jeferson Luis Franco

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – UNIPAMPA/ *Campus* São Gabriel/ Trabalho de Conclusão de Curso, 2017.

Referências: f. [38-48].

1. Agroquímicos. 2. Ditiocarbamatos. 3. EROs. 4. Embriotoxicidade. 5. Antioxidante. 6. Ecotoxicologia – Monografia I. Franco, Jeferson. II. Universidade Federal do Pampa, *Campus* São Gabriel, Trabalho de Conclusão de Curso. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar meus caminhos até aqui.

Aos meus pais Eloci e Loreni por acreditarem em mim, pelo apoio incondicional por não deixarem que eu desistisse quando as coisas não iam bem. Sem vocês eu não conseguiria, não tenho palavras para descrever a gratidão e o orgulho que sinto de vocês, meus exemplos de garra e força, essa conquista também pertence a vocês.

Ao Prof. Dr. Jeferson Luis Franco e a Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thais Posser por me abrirem as portas do grupo de pesquisa e por todo o conhecimento compartilhado durante os últimos anos.

Aos meus amigos e família por todo o companheirismo dedicado.

Aos colegas do GPEOSCEL por todos os momentos compartilhados desde o início, momentos de choro, alegria, brincadeiras, conselhos, ensinamentos, amizade, união. Vocês são como uma grande família, da qual eu jamais esquecerei e levarei pra sempre em meu coração não importa onde eu esteja.

A banca examinadora deste trabalho pela disponibilidade e contribuições.

A UNIPAMPA pela oportunidade de cursar Ciências Biológicas e ainda a FAPERGS, pela bolsa de iniciação científica e pelos recursos financeiros concedidos.

## RESUMO

Pesticidas têm sido amplamente utilizados no combate a pragas em plantações, no entanto, podem ser prejudiciais a saúde humana e ao meio ambiente. Através de processos naturais como lixiviação e escoamento superficial, resíduos de pesticidas podem entrar em contato com matrizes aquáticas e causar efeitos prejudiciais à biota aquática. O estresse oxidativo tem sido apontado como um dos principais mecanismos de toxicidade induzida por pesticidas. Tendo em vista o fato de que organismos aquáticos são dependentes do equilíbrio redox para regular processos essenciais ao seu desenvolvimento, qualquer fator que afete esse equilíbrio pode resultar em prejuízos no desenvolvimento normal desses organismos. O Mancozeb, um ditiocarbamato de Manganês e Zinco, tem sido utilizado em diversas culturas no combate a fungos, devido a sua baixa toxicidade aguda e pouca persistência ambiental. Entretanto, esse composto já se demonstrou tóxico a organismos aquáticos como peixes expostos por exemplo. Porém, pouco se sabe sobre sua toxicidade em organismos em fase embrionária. O peixe-zebra (*Danio rerio*) tem se destacado como um bom modelo experimental para diversos campos de pesquisa, entre eles a toxicologia de contaminantes ambientais. O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos toxicológicos do fungicida Mancozeb sobre o desenvolvimento embrionário de peixe-zebra e o uso de um antioxidante clássico, como a N-acetilcisteína, com intuito de verificar o papel das espécies reativas de oxigênio na embriotoxicidade induzida pelo Mancozeb. Os resultados obtidos demonstraram que o Mancozeb afetou a sobrevivência e a eclosão dos embriões tratados, causou anomalias morfológicas, diminuição da frequência cardíaca, bem como nos níveis de GSH, induziu danos ao DNA, aumento na geração e espécies reativas de oxigênio, aumento no número de células em processo apoptótico e alterações nas respostas sensori-motoras. Em contrapartida, o pré-tratamento com N-acetilcisteína foi capaz de bloquear os efeitos tóxicos induzidos pelo Mancozeb em todos os parâmetros analisados, reforçando a hipótese do envolvimento do estresse oxidativo na embriotoxicidade induzida pelo MZ, bem como o papel fundamental do equilíbrio redox no desenvolvimento normal de embriões de peixe-zebra.

Palavras-chave: espécies reativas de oxigênio, embriotoxicidade, ditiocarbamatos, antioxidante, fungicida.

## *ABSTRACT*

Mancozeb (MZ) a manganese/zinc-containing dithiocarbamate fungicide has been claimed to present low acute toxicity and short environmental persistence, however, its effects on embryogenesis in non-target organisms is unclear. Zebrafish (*Danio rerio*), a highlighted model organism, has been used to characterize the toxicological properties of environmental toxicants in the embryo-larval phase. Redox balance is a key factor to the normal embryo development and oxidative stress has been pointed out as a major mechanism by which MZ elicits its deleterious effects. Here, we used zebrafish to assess the potential embryotoxic effects induced by MZ as well as the role of reactive oxygen species (ROS) in this process by pre-treatment with a classical antioxidant (N-acetylcysteine, NAC). According to the results, MZ was able to induce morphological abnormalities, DNA damage, cell death, increased ROS generation and changes on behavioral endpoints during zebrafish development. All these toxic effects were inhibited by the pre-treatment with NAC indicating a key role of redox unbalance during MZ-induced embryotoxicity. At least in our knowledge, this is the first report on the deleterious effect of MZ to the normal embryogenesis of zebrafish. In addition, the importance of ROS generation during this pathophysiological condition was highlighted.

Key-words: reactive oxygen species, embryotoxicity, dithiocarbamate, antioxidant, fungicide

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Lixiviação e Escoamento Superficial.....	13
<b>Figura 2:</b> Fórmula estrutural dos EBCDs.....	14
<b>Figura 3:</b> Fórmula estrutural do MZ.....	14
<b>Figura 4:</b> Ciclo da GSH.....	16
<b>Figura 5:</b> Fórmula estrutural da NAC.....	17
<b>Figura 6:</b> Peixe-zebra adulto.....	18
<b>Figura 7:</b> Estágios do desenvolvimento embrionário de peixe-zebra.....	19
<b>Figura 8:</b> Desenho experimental.....	23
<b>Figura 9:</b> Sobrevivência e eclosão de embriões expostos a diferentes concentrações de MZ.....	28
<b>Figura 10:</b> Alterações morfológicas induzidas pelo MZ.....	28
<b>Figura 11:</b> Efeitos da exposição ao MZ e pré-tratamento com NAC sobre a sobrevivência e eclosão de embriões de peixe-zebra.....	29
<b>Figura 12:</b> Capacidade protetora da NAC frente à exposição ao MZ.....	29
<b>Figura 13:</b> Efeitos do Mz e NAC sobre parâmetros morfológicos e frequência cardíaca de embriões de peixe-zebra.....	30
<b>Figura 14:</b> Efeitos de MZ e NAC sobre a produção de EROs ( <i>in vivo</i> ) em embriões de peixe-zebra.....	31
<b>Figura 15:</b> Avaliação dos níveis de GSH.....	31
<b>Figura 16:</b> Atividades Enzimáticas.....	32
<b>Figura 17:</b> Imagem representativa dos danos ao DNA.....	32
<b>Figura 18:</b> Efeitos do MZ e NAC sobre a fragmentação da cromatina (genotoxicidade) em embriões de peixe-zebra.....	33
<b>Figura 19:</b> Avaliação da morte celular induzida por MZ pelo método do fluoróforo Laranja de Acridina.....	33
<b>Figura 20:</b> Análise de movimento espontâneo e capacidade sensori-motora de embriões de peixe-zebra pré-tratados com NAC e expostos a MZ.....	34

**LISTA DE ABREVIATURAS**

DTCs -Ditiocarbamatos

EBCDs - Etileno-bis-ditiocarbamatos

ERNs - Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

ETU - Etilenotiouréia

GSH - $\gamma$ -glutamilcisteínaglicina

GSSG - Glutathiona oxidada

GST -Glutathiona S-transferase

GPx -Glutathiona Peroxidase

GR - Glutathiona Redutase

hpf - Horas pós-fertilização

Mn - Manganês

MZ -Mancozeb

NAC - N-acetilcisteína

Zn - Zinco

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 Pesticidas.....	12
1.2 Ditiocarbamatos.....	13
1.3 Mancozeb (MZ).....	14
1.4 Desenvolvimento Embrionário, Estresse Oxidativo e Sistema de Defesa Antioxidante.....	15
1.5 Potencial Antioxidante da N-acetilcisteína.....	16
1.6 Mancozeb como Agente Pró-oxidante.....	17
1.7 Peixe-zebra como Modelo Animal de Pesquisa.....	18
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	21
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	21
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
4.1 Reagentes.....	22
4.2 Manutenção de Peixes-zebra Adultos e Obtenção de Embriões.....	22
4.3 Curva de Concentração-resposta do MZ e NAC.....	22
4.4 Desenho Experimental.....	23
4.4.1 Pré-exposição à NAC e exposição ao MZ.....	23
4.5 Sobrevivência, Alterações Morfológicas e Taxa de Eclosão.....	23

4.6	Movimento Espontâneo.....	24
4.7	Frequência Cardíaca.....	24
4.8	Determinação da geração de EROs <i>in vivo</i> .....	24
4.9	Determinação dos Níveis de GSH.....	24
4.10	Preparação das Amostras para Ensaios Enzimáticos.....	25
4.10.1	Ensaio de GST.....	25
4.10.2	Ensaio de GPx.....	25
4.11	Determinação da Morte Celular.....	25
4.11.1	Ensaio Cometa.....	25
4.11.2	Ensaio de Apoptose Celular <i>in vivo</i> .....	26
4.12	Teste de Fuga Frente a Estímulo Adverso ( <i>Touch scape</i> ) e Capacidade Natatória.....	26
4.13	Quantificação Total de Proteínas.....	27
4.14	Análises Estatísticas.....	27
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
5.1	A exposição ao MZ prejudica a sobrevivência e a taxa de eclosão dos embriões.....	28
5.2	NAC impediu anormalidades morfológicas induzidas por MZ e diminuição da frequência cardíaca.....	29
5.3	NAC aumentou os níveis de GSH e atenuou a geração de EROs induzida pela exposição ao MZ.....	30
5.4	NAC impediu a fragmentação do DNA e aumento da morte celular em embriões expostos ao MZ.....	32
5.5	NAC protegeu contra os danos sensoriais e motores induzidos pelo MZ.....	33
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>37</b>

*“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo.”  
- Winston Churchill*

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Pesticidas

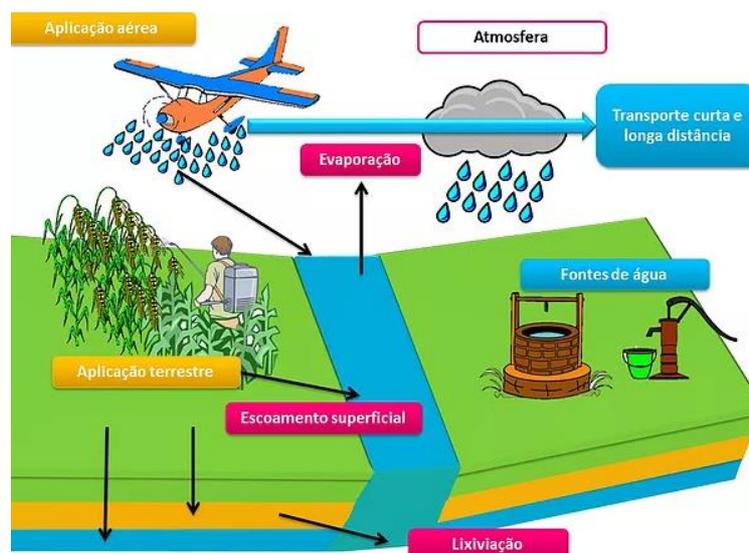
Pesticidas, também denominados agroquímicos, são um grupo de substâncias químicas planejados especificamente para combater doenças, pragas e ervas daninhas em plantações. São considerados um meio muito eficiente de proteção das culturas contra o ataque de organismos indesejados, garantindo a produtividade (BOLOGNESI, 2003).

Devido ao crescimento populacional acelerado e à intensa expansão agrícola, agroquímicos têm sido usados indiscriminadamente em escala global. Segundo dossiê realizado pela Abrasco – Associação Brasileira de Saúde Coletiva, em 2011 o Brasil movimentou US\$ 8,5 bilhões no mercado global de agrotóxicos (ABRASCO, 2012).

Embora o uso de pesticidas seja benéfico à agricultura, seu uso demasiado pode causar sérios riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Pela exposição direta do trabalhador rural na aplicação desses produtos ou através da ingestão de alimentos contaminados com resíduos dos mesmos, como também por meio de processos naturais, movimentando esses resíduos do local onde foram aplicados, levando a contaminação do ecossistema adjacente às plantações (CALDAS; TRESSOU; BOON, 2006; CHAGNON et al., 2015; DE ABREU; ALONZO, 2014; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2017).

Estudos demonstraram que a exposição prolongada a agroquímicos está associada ao desenvolvimento de vários tipos de doenças, tais como, doenças neurodegenerativas, distúrbios respiratórios, câncer em múltiplos órgãos, entre outras (BALTAZAR et al., 2014; HOPPIN et al., 2008; PARRÓN et al., 2014).

Resíduos de agroquímicos provenientes do processo de aplicação podem causar contaminação de solos e chegar até recursos hídricos como rios e riachos, por meio de processos como lixiviação e escoamento superficial (Fig.1), prejudicando assim o desenvolvimento e fisiologia de organismos não – alvo mesmo em concentrações não letais (LEW et al., 2013; ROSE; CARTER, 2003).



Fonte: [goo.gl/LMwyoR](http://goo.gl/LMwyoR).

**Figura 1:** Lixiviação e Escoamento Superficial. Processos naturais que levam resíduos de agrotóxicos até ambientes aquáticos.

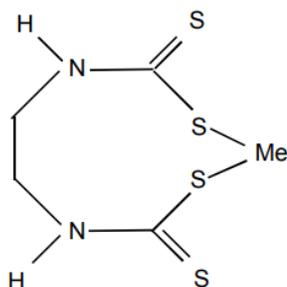
Pesquisas avaliando efeitos de pesticidas demonstraram efeitos deletérios sobre o DNA, distúrbios no sistema de defesa antioxidante, bem como alteração da taxa reprodutiva de peixes expostos (IBRAHIM; HARABAWY, 2014; MORENO; SOFIA; MARTINEZ, 2014; UREN WEBSTER et al., 2014), bem como toxicidade sobre macro-artrópodes aquáticos (HALSTEAD; CIVITELLO; ROHR, 2015).

## 1.2 Ditiocarbamatos

Ditiocarbamatos (DTCs) são uma subclasse de fungicidas, derivados do ácido bisditiocarbâmico e pertencentes ao grupo dos carbamatos. São compostos orgânicos sulfurados que foram desenvolvidos entre os anos de 1930 e 1940 e que ainda hoje são utilizados isoladamente ou agregados a outros compostos com capacidade antifúngica (RUNKLE et al., 2017; SINGH; SRIVASTAVA, 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA).

Entre os DTCs, os etileno - bis - ditiocarbamatos (EBCDs) são o subgrupo mais importante do ponto de vista comercial ao qual pertencem Mancozeb, Maneb, Zineb e outros, sendo amplamente utilizados no combate a fitopatologias causadas por fungos em diversas culturas como verduras, frutas e cereais (CORSINI et al., 2005).

Os EBCDs possuem uma estrutura orgânica em comum, composta por átomos de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre ( $C_4H_6N_2S_4$ ), como mostra a Fig.2, o que os difere é o tipo de íon metálico presente em sua fórmula ( $Mn^{2+}$ -  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ou  $Zn^{2+}$ ) (ARCANJO, 2007).

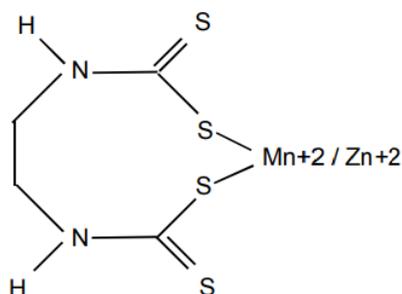


Fonte: Arcanjo, 2007.

**Figura 2:** Fórmula estrutural dos EBCDs. Fungicidas pertencentes à classe dos DTCs que possuem fórmula estrutural semelhante, sendo diferidos apenas pelos metais (Me) presentes em sua estrutura.

### 1.3 Mancozeb (MZ)

Mancozeb (MZ), de fórmula molecular  $(C_4H_6MnN_2S_4)_x(Zn)_y$ , (Fig.3), é um EBCD que possui em sua formulação metais como manganês (Mn) e zinco (Zn), é amplamente utilizado como fungicida, atuando no combate de diversos patógenos (RUNKLE et al., 2017; TSANG; TROMBETTA, 2007; XU, 2000).



Fonte: Arcanjo, 2007.

**Figura 3:** Fórmula estrutural do MZ. Fungicida EBDC de manganês (Mn) e zinco (Zn).

De acordo com estimativas de mercado, a produção de MZ representava um crescimento de 20% no mercado mundial de fungicidas em 2014, com tendência a continuar aumentando até 2020, devido ao baixo custo de investimento e sua grande eficácia (Fungicides Market, 2015).

Segundo o fabricante, a aplicação recomendada de MZ em culturas é de 2 a 3 kg por hectare em um volume que vai de 200 a 1000 L por hectare de solvente, devendo ser aplicado em um intervalo de 5 a 15 dias, dependendo da cultura. Além disso, o composto apresenta tempo curto de permanência no ambiente e também baixa toxicidade aguda (ADAPAR; CORSINI et al., 2005).

Segundo XU (2000), o MZ possui um baixo potencial de volatilização no ar e meia-vida de 2 dias em solos aeróbicos e 8 dias em solos anaeróbicos, em meio aquático o composto é rapidamente hidrolisado, apresentando meia vida de 2 dias dependendo do pH (pH 5, 7 e 9). No entanto, é considerado pelo Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários – Agrofit, como um composto de classificação ambiental III, considerado muito perigoso ao meio ambiente, devido ao seu metabólito principal de degradação, a etilenotiouréia (ETU), que pode permanecer no ambiente por mais tempo (de 7 a 15 dias) e apresentar riscos a biota aquática (ADAPAR; AGROFIT; SINGH; SRIVASTAVA, 2013).

#### **1.4 Desenvolvimento Embrionário, Estresse Oxidativo e Sistema de Defesa Antioxidante**

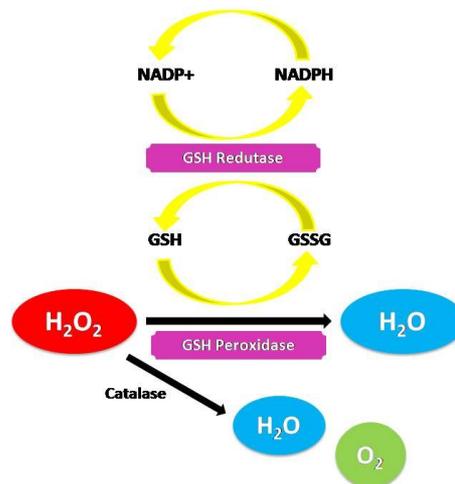
A intensificação da prática agrícola, aliada ao uso exacerbado de pesticidas tem causado sérios danos à biota aquática, principalmente em organismos em desenvolvimento (BUNZEL; LIESS; KATTWINKEL, 2014; GURUSHANKARA; VASUDEV; KRISHNAMURTHY, 2007; SHENOY et al., 2009). Estudos demonstram que a exposição dessas espécies a tais compostos são capazes de prejudicar a sua sobrevivência e o seu desenvolvimento, bem como causar anormalidades morfológicas e alterações comportamentais em espécies não-alvo (SULUKAN et al., 2017; WATSON et al., 2014).

Entre os principais mecanismos de toxicidade induzida por pesticidas, está o estresse oxidativo (MOURA et al., 2017; TELLEZ-BAÑUELOS et al., 2009; VISMARA et al., 2001). O estresse oxidativo é entendido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (EROs/ERNs) e a capacidade do organismo em neutralizá-las através do sistema de defesa antioxidante celular (PERSSON; POPESCU; CEDAZO-MINGUEZ, 2014).

EROs são moléculas que possuem papel fundamental no desenvolvimento embrionário regulando processos como proliferação, diferenciação e morte celular (DENNERY, 2007; REIS et al., 2008; SALAS-VIDAL et al., 1998). Embora sejam essenciais ao desenvolvimento embrionário, um aumento na produção dessas moléculas pode causar um desequilíbrio da homeostase celular culminando em danos a biomoléculas, seguido de um estado de senescência e por fim morte celular (LU; FINKEL, 2008; YAMASHITA, 2003).

Contudo, defesas antioxidantes foram desenvolvidas pelo organismo, com a finalidade de neutralizar e detoxificar as EROs, dentre estes, a principal é o sistema glutaciona, que inclui o tripeptídeo  $\gamma$ -glutamilcisteínaglicina (GSH) e enzimas antioxidantes como glutaciona S-transferase (GST), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR) (DAVIES, 2001). A GSH desempenha funções importantes na proteção celular atuando como

antioxidante, na sinalização regulatória e na manutenção do estado redox intracelular (HANSEN; HARRIS, 2015), além de agir como co-fator para a GPx e a GST (MORRIS et al., 2014), sendo que a GST atua na biotransformação de xenobióticos e também promove a conjugação da GSH com produtos oxidantes tornando-os mais solúveis e fáceis de serem excretados (COGO et al., 2009). A GPx é uma enzima redutora de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos utilizando o tripeptídeo GSH como doador de elétrons, além disso, contém o aminoácido selenocisteína no seu sítio ativo, sendo esse constantemente oxidado e reduzido durante o ciclo catalítico (MORRIS et al., 2014). Por fim, a GR é responsável pela reconstituição da GSH, reduzindo a glutatona oxidada (GSSG) à glutatona reduzida (GSH) e assim regenerando o ciclo da GSH (Fig.4) (TEKMAN et al., 2008).



Fonte: Adaptada de [goo.gl/x3TpxS](http://goo.gl/x3TpxS).

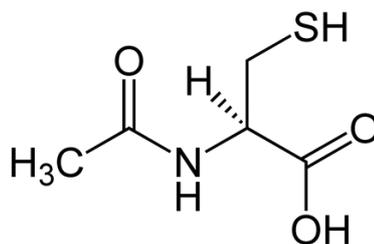
**Figura 4:** Ciclo da GSH. Reações de oxidação e redução responsáveis pela reconstituição da GSH.

### 1.5 Potencial Antioxidante da N-acetilcisteína

Além do sistema antioxidante endógeno, vários alimentos como frutas e vegetais são importantes fontes exógenas de compostos antioxidantes como as vitaminas C e E,  $\beta$ -caroteno, flavonóides entre outros (BARBOSA et al., 2010). Além disso, o potencial antioxidante de moléculas em uso na clínica, como a N-acetilcisteína (NAC) tem sido estudado (ONDANI; CARVALHO; GALVÃO, 2011).

A NAC (Fig.5) é um metabólito do aminoácido cisteína (DODD et al., 2008) que possui potencial terapêutico, atuando como agente mucolítico no tratamento de doenças bronco pulmonares, anti-inflamatório, antídoto na intoxicação por paracetamol, contra doenças infecciosas e também desordens neurodegenerativas como Alzheimer (ADAIR;

KNOEFEL; MORGAN, 2001; GRANDJEAN et al., 2000; PRESCOTT, 2005; SPADA et al., 2002; ZUIN et al., 2005).



Fonte: [goo.gl/c8hsHk](http://goo.gl/c8hsHk).

**Figura 5:** Fórmula estrutural da NAC. Fármaco com potencial antioxidante, metabólito do aminoácido cisteína.

Sua atividade antioxidante consiste no aumento da concentração de cisteína dentro das células e dos níveis de GSH, pois este requer cisteína para sua síntese (GRIFFITH, 1999). A restauração do potencial antioxidante celular ocorre através da reposição de GSH e pela inativação e remoção de EROs (ELBINI DHOUIB et al., 2016).

A NAC vem sendo utilizada como uma ferramenta para testar o envolvimento das EROs na indução de morte celular (SUN, 2010), bem como na atenuação dos efeitos do estresse oxidativo frente a exposição a pesticidas como MZ *in vitro* (GROSICKA-MACIĄG et al., 2013).

## 1.6 Mancozeb como Agente Pró-oxidante

Estudos anteriores em diferentes organismos mostraram que o MZ exerce efeitos pró-oxidantes, induzindo danos ao DNA e morte celular em células humanas (SRIVASTAVA et al., 2012), bem como em células de rato (CALVIELLO et al., 2006). NEGGA et al. (2011) também demonstrou que o composto exerceu neurotoxicidade em *Caenorhabditis elegans* (nematóide utilizado como modelo alternativo de pesquisa) e também induziu déficits locomotores no mesmo modelo (HARRISON BRODY et al., 2013).

Foram demonstradas também alterações em biomarcadores de estresse oxidativo em espécies aquáticas como *Carassius auratus* (peixe-dourado) expostos ao MZ (ATAMANIUK et al., 2013; KUBRAK et al., 2012).

Tendo em vista esses fatos, o estresse oxidativo é apontado como um dos principais mecanismos envolvido nos efeitos deletérios induzidos por MZ em organismos expostos. Entretanto, a relação entre as alterações redox causadas pelo MZ e seus resultados de toxicidade durante o desenvolvimento embrionário ainda não são claras e pouco exploradas,

bem como a utilização da NAC como ferramenta para verificar o envolvimento do estresse oxidativo na fase embrionária.

### 1.7 Peixe-zebra como Modelo Animal de Pesquisa

O uso de modelos animais com semelhança genética a humanos em pesquisas biomédicas, toxicológicas, comportamentais, entre outras é de extrema importância, no entanto, diversas agências e organizações governamentais, por questões éticas, restringem o uso de animais como roedores (OLSON et al., 2000), sendo necessário o uso de modelos alternativos para suprir essa demanda.

Nesse contexto, o peixe-zebra (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822), apresentado na Fig.6, também conhecido como paulistinha, é um pequeno teleósteo de água doce, que mede de 3-4 cm de comprimento, da família *Cyprinidae*, nativo da Índia (WESTERFIELD, 2000) e que se destaca no ponto de vista científico em todas as suas fases de vida, como modelo para estudo em diversas áreas, como toxicologia de contaminantes ambientais, pesquisas sobre o potencial farmacológico de novas drogas, embriologia, biologia do comportamento entre outros (COLWILL; CRETON, 2011; GOLDSMITH, 2004; PAARDEKOOPE OVERMAN; DEN HERTOOG, 2014; SULUKAN et al., 2017).



Fonte: [goo.gl/Y7m8Jq](http://goo.gl/Y7m8Jq).

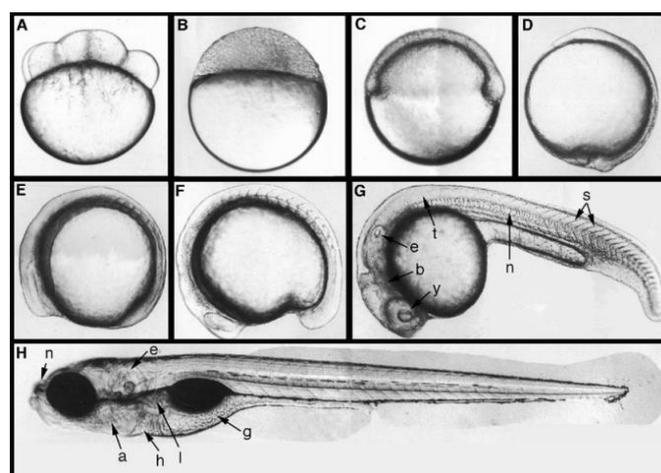
**Figura 6:** Peixe-zebra adulto. Teleósteo da família *Cyprinidae*, muito utilizado como modelo alternativo para diversas pesquisas.

Este reconhecimento se faz válido devido a algumas características relevantes que o peixe-zebra apresenta tais como, facilidade no manejo e manutenção, alta taxa reprodutiva, desenvolvimento embrionário rápido e externo, transparência dos embriões, entre outras, tornando-o um modelo alternativo e complementar excelente para inúmeros campos de pesquisa (LIESCHKE; CURRIE, 2007).

O peixe-zebra tem se destacado em sua fase embrionária principalmente na toxicologia, bem como na descoberta de novas drogas, devido ao seu desenvolvimento rápido

e a transparência dos embriões, o que possibilita observar o seu desenvolvimento desde as primeiras horas pós-fertilização (hpf) e também endpoints como mortalidade, frequência cardíaca, formação de somitos, anormalidades morfológicas, taxa de eclosão, entre outras. Além disso, é possível obter dados relacionados ao repertório comportamental da espécie, frente à exposição a um determinado contaminante ou droga (DAI et al., 2014; HILL et al., 2005; IRONS et al., 2013; PEREIRA; CAMPOS; BOGO, 2016).

Cada fase do desenvolvimento embrionário nos fornece “endpoints” de interesse toxicológico essenciais no entendimento do mecanismo de toxicidade do composto testado. Segundo a OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS - Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, (2013) que regulamenta testes toxicológicos em embriões de peixes, as exposições a químicos devem ocorrer nas primeiras hpf, fase esta que é caracterizada por uma intensa e rápida divisão celular. Período de segmentação (10 - 24 hpf): órgãos começam a se desenvolver e se tornam visíveis, as células iniciam sua diferenciação morfológica, ocorre o entendimento e desprendimento da cauda, formação de somitos, aumento do tamanho corporal e também adquirem a primeira movimentação dentro do córion. Durante o período de farínghula (24 - 48 hpf), ocorrem as seguintes modificações: organização bilateral, notocorda bem desenvolvida, formação das brânquias, desenvolvimento do cérebro e sistema nervoso, alongamento dos arcos faríngeos, adquirem pigmentação, formação do sistema circulatório. E por fim o período de eclosão (48 - 72 hpf): eclosão do córion, morfogênese completa, desenvolvimento das nadadeiras peitorais, brânquias e mandíbula, pequena abertura da boca, nado ativo (Fig.7) (KIMMEL et al., 1995).



Fonte: Ingham, 1997.

**Figura 7:** Estágios do desenvolvimento embrionário de peixe-zebra. (A) 1,25 hpf. (B) 4hpf. (C) 6hpf. (D) 10 hpf. (E) 11.5 hpf. (F) 16 hpf. (G) Embrião com 24 hpf. (H) Larva 120 hpf.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Tendo em vista o uso inadequado de pesticidas na prática agrícola, o envolvimento do estresse oxidativo como mecanismo causador de efeitos deletérios sobre a fisiologia de organismos não-alvo, a importância da regulação redox na fase embrionária de organismos aquáticos expostos a xenobióticos e a carência de informações sobre o potencial embriotóxico de fungicidas líderes de mercado como o MZ, faz-se necessário investigar e aprofundar os conhecimentos sobre mecanismos de ação tóxica e os riscos ambientais relacionados ao uso indiscriminado deste pesticida.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar o potencial efeito embriotóxico do fungicida Mancozeb em embriões de peixe-zebra

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar parâmetros de viabilidade e sobrevivência em embriões de peixe-zebra expostos a diferentes concentrações de MZ;

- Avaliar os efeitos do MZ sobre parâmetros morfológicos e comportamentais durante o desenvolvimento embrionário de peixe-zebra;

- Avaliar os efeitos da exposição ao MZ sobre a produção de EROS e parâmetros de defesa celular antioxidante;

- Avaliar os efeitos da exposição ao MZ sobre parâmetros relacionados a morte celular e dano oxidativo ao DNA;

- Avaliar o envolvimento do estresse oxidativo nos efeitos deletérios do MZ sobre o desenvolvimento embrionário de peixe-zebra.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes

N-acetilcisteína, Mancozeb (97,5%), diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>-DA), N, N', N'-tetrametilacridina-3,6-diamina (Laranja de Acridina), CDNB, tBOOH, GSH, NADPH, foram adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). Todos os outros produtos químicos foram de qualidade analítica e obtidos de fornecedores comerciais padrões.

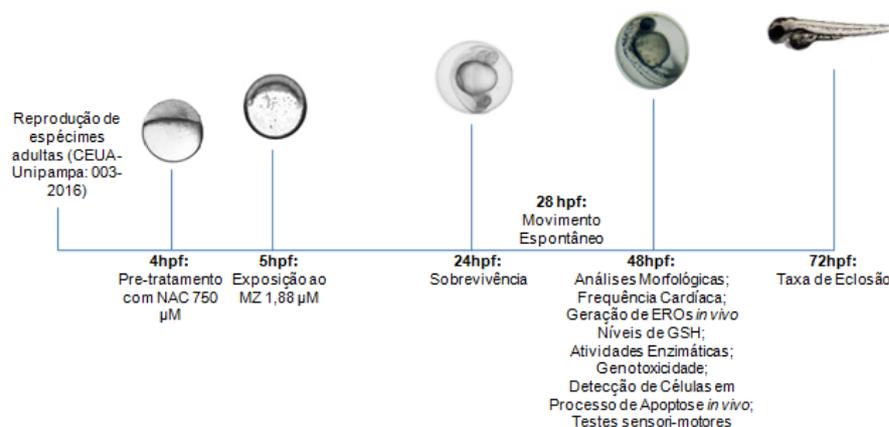
### 4.2 Manutenção de Peixes-zebra Adultos e Obtenção de Embriões

A criação e manutenção de peixe-zebra em biotério foi aprovada e regulamentada pelo CEUA - Unipampa (protocolo 003-2016). Espécimes adultas de peixe-zebra (*Danio rerio*), linhagem selvagem, adquiridos de um fornecedor local, foram mantidos sob condições adequadas em sistema de recirculação Zebtec®, seguindo alguns parâmetros considerados essenciais para uma boa qualidade de vida da espécie em biotério, como água de osmose reversa, pH 7,2, condutividade 400 µS, temperatura 28° C, fotoperíodo de 14 horas de claro e 10 horas de escuro e sua dieta constituída de ração comercial flocada e alimento vivo (*Artemia salina*) suplementados 4x ao dia nos respectivos horários: 8:30, 11:30 e 14:30 com ração comercial e 17:00 com *artemia salina*, de acordo com protocolos previamente estabelecidos (WESTERFIELD, 2000). Os embriões de peixe-zebra utilizados no presente trabalho foram obtidos a partir da reprodução de espécimes adultos, após reprodução e manutenção, os embriões foram mantidos em incubadora BOD a 28°C até o momento da exposição e durante os subseqüentes tratamentos.

### 4.3 Curva de Concentração-resposta do MZ e NAC

Nossas concentrações de MZ foram baseadas em uma curva de concentração-resposta (TILTON et al., 2006). A partir dessa curva, foi escolhida uma concentração de trabalho (1,88 µM) a qual não comprometeu a sobrevivência dos embriões, ao contrário das demais concentrações testadas (2,81 e 3,75 µM). Além disso, foi realizada uma curva de concentração do antioxidante NAC, baseado na literatura (KRISHNAN, 2013). Foram testadas as concentrações de 200, 300, 500 e 750 µM de NAC, a fim de prevenir as alterações morfológicas induzidas pelo MZ, bem como atenuar os efeitos sobre a sobrevivência dos embriões expostos. A partir da curva, foi escolhida a concentração de 750 µM, a qual demonstrou ação preventiva sobre a sobrevivência e alterações morfológicas induzidas pelo MZ frente à concentração de 1,88 µM.

## 4.4 Desenho Experimental



Fonte: Adaptada pelo autor a partir do Zebrafish Book (Westerfield, 2000).

**Figura 8:** Desenho experimental. A figura demonstra os períodos de exposições a NAC e ao MZ, respectivamente, assim como os posteriores ensaios.

### 4.4.1 Pré-exposição à NAC e exposição ao MZ

Para determinar o envolvimento do estresse oxidativo durante a embriotoxicidade induzida por MZ, um pré-tratamento com NAC foi realizado na concentração final de 750 µM. Em resumo, 50 embriões de peixe-zebra no tempo de 4hpf foram expostos durante 1 hora a NAC e posteriormente (5 hpf), expostos a MZ 1,88 µM em um volume final de 30 mL em placas de Petri. As diluições dos reagentes foram preparadas em água do sistema e os embriões foram mantidos em incubadora BOD, sob parâmetros de temperatura e fotoperíodo supervisionado durante todo o tratamento.

## 4.5 Sobrevivência, Alterações Morfológicas e Taxa de Eclosão

A taxa de sobrevivência dos embriões foi avaliada 24 hpf sob estereó microscópio Carl ZeissStemi 2000C. A viabilidade dos embriões foi analisada por observação da coagulação dos ovos e ausência de batimento cardíaco. A análise das alterações morfológicas foi realizada 48 hpf. Foram avaliadas características como distorção do eixo corporal e tamanho corporal. A taxa de eclosão foi avaliada 72 hpf. Todos os parâmetros aqui descritos foram avaliados de acordo com protocolos publicados anteriormente (OECD, 2013). As imagens foram obtidas através de um estereó microscópio Carl ZeissStemi 2000C acoplado a uma câmera digital Moticam 2000, zoom 1.25x e analisadas usando o software Image J.

#### **4.6 Movimento Espontâneo**

Através desse teste, foi contabilizado o número de movimentos totais do eixo do corpo realizados pelos embriões dentro do córion (SAINT-AMANT; DRAPEAU, 1998). Após os tratamentos, 15 embriões a 28 hpf foram selecionados aleatoriamente para o teste (um número total de 75 embriões por grupo). Os embriões foram deixados para se adaptando durante 2 min em placas de Petri contendo água do sistema e seu movimento espontâneo foi contado por 1 minuto e as avaliações feitas sob estéreomicroscópio Carl Zeiss Stemi 2000C acoplado a uma câmera digital Moticam 2000 (zoom 1.6x).

#### **4.7 Frequência Cardíaca**

A frequência cardíaca dos embriões foi medida a 48 hpf. Após tratamentos, 15 embriões de cada grupo foram aclimatados durante 2 minutos em placas de Petri contendo água do sistema. Os batimentos cardíacos foram contados com a ajuda de um estéreo microscópio Carl ZeissStemi 2000C acoplado a uma câmera digital Moticam2000, zoom 1.25x, durante 1 min, de acordo comXIA; ZHENG; ZHOU(2017).

#### **4.8 Determinação da geração de EROs *in vivo***

Para a avaliação da geração de EROs, foram utilizados procedimentos previamente estabelecidos (ANICHTCHIK et al., 2008)com pequenas modificações. Resumidamente, os embriões a 48 hpf foram retirados do córion e colocados em placa de 96 poços (5 embriões por poço), em um volume final de 250  $\mu$ L de água do sistema. Em seguida, os embriões foram incubados com o corante fluoróforo diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>DA), na concentração final de 1 $\mu$ g / mL durante 1 h no escuro e a intensidade de fluorescência foi medida logo após em um leitor de microplacas (PerkinElmerEnspire 2300) excitação e emissão de 495nm/529nm, respectivamente. Para obtenção de imagens representativas, os embriões foram montados em lâminas para microscopia, fixados com metilcelulose 1,5% e as imagens obtidas usando microscópio de fluorescência (Olympus 1x71) com uma ampliação de 40x, com uma exposição de 500 milissegundos, em luz verde (Olympus URFLT luz UV). Imagens representativas foram adquiridas com ajuda do software (Q Capture).

#### **4.9 Determinação dos Níveis de GSH**

Para este ensaio, utilizaram-se 10 embriões por concentração (n=4) com 48 hpf, homogeneizados em 375  $\mu$ L de tampão fosfato de Na + EDTA (100 mM + 5 mM, pH 8,0) no *powerlyzer* durante 30 segundos a 2000 vibrações. Foram adicionados 125  $\mu$ l de ácido fosfórico a 25% às amostras e centrifugados em ultracentrífuga durante 30 min a 4 ° C e

100000 g. Para determinar os níveis de GSH, foram retirados 10 µL do sobrenadante, 180 µL de tampão de fosfato de sódio, foram adicionados 10 µL de Oftalaldeído (OPT) (1 mg / ml) numa placa de 96 poços, incubados durante 15 min no local e lido em fluorímetro nos comprimentos de onda de excitação e emissão, 350/420 nm, respectivamente, de acordo com HISSIN; HILF(1976).

#### **4.10 Preparação das Amostras para Ensaio Enzimáticos**

Para as análises bioquímicas 30 embriões inteiros (n=90) a 48 hpf foram homogeneizados em 200 µL de tampão HEPES 20 mM, pH 7,0 no *powerlyzer* durante 30s a 2000 rpm. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 30 min a 4 ° C e 20000 g e o sobrenadante armazenado a -20 ° C para posteriores análises.

##### **4.10.1 Ensaio de GST**

A avaliação da atividade da GST foi baseada na metodologia descrita por HABIG; JAKOBY (1981). Após a preparação da amostra, foi adicionado ao sobrenadante um mix de tampão fosfato, constituído por EDTA 0,0025 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25 M, pH 7,0 e GSH 100 mM. A reação terá início quando se adicionar 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB) e a atividade da enzima será avaliada através de espectrofotômetro a 340nm, sendo determinada através da conjugação do grupamento tiol da GSH com o CDNB durante 2 minutos.

##### **4.10.2 Ensaio de GPx**

O ensaio para avaliar a atividade da enzima GPx foi realizado segundo WENDEL(1981). Após a preparação da amostra, foi adicionado ao sobrenadante um mix de tampão fosfato, constituído por EDTA 0,0025 M, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,25 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25 M, pH 7,0, GSH 100 mM, NADPH 100 mM e GR 5U/mL. A reação terá início quando se adicionar tBOOH (Hidroperóxido de tert-butila) 10 mM e a atividade da enzima será avaliada através de espectrofotômetro a 340nm, sendo determinada através do consumo de NADPH durante 2 min.

#### **4.11 Determinação da Morte Celular e dano à ácidos nucléicos**

##### **4.11.1 Ensaio Cometa**

A genotoxicidade foi avaliada por quebras na dupla hélice do ácido desoxirribonucléico através do teste cometa de acordo com KOSMEHL et al. (2008), com

algumas modificações. Para este fim, prepararam-se lâminas contendo 150 µL de agarose 1% (diluída em PBS) e colocadas para secagem a 40 ° C. Em seguida, 20 embriões por grupo foram homogeneizados manualmente com auxílio de um pistilo durante 5 minutos com 1mL de tampão DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium), centrifugados durante 10 minutos a 3000 rpm, para remoção adicional do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* em tampão PBS 1% . Para completar a preparação de lâminas, foram colocados 10 µL de amostra em 90 µL de agarose 0,75% com baixo ponto de fusão e adicionados a lâmina, espalhando o conteúdo. As lâminas foram colocadas a 4 ° C durante 15 minutos e depois adicionadas numa solução de lise contendo 100 mM de EDTA, 2,5 M de NaCl, 1% de Triton X100 e 10% de DMSO (pH 13,0) no escuro a 4 ° C durante a noite. Após este tempo, as lâminas foram imersas em solução neutralizante contendo Tris 400 mM durante 30 minutos. Para o desenrolamento do DNA, as lâminas foram imersas por 30 minutos em um tanque de eletroforese horizontal contendo um tampão alcalino (12 g/L de NaOH e 0,37 g / L de EDTA) a 25 V e 300 mA. Após a eletroforese correr, as lâminas foram lavadas em água destilada, fixadas com álcool 70% durante 5 minutos e colocadas na geladeira durante 1 h. Então, as lâminas foram coradas com *Cyber Green* por 5 minutos. Todas as lâminas foram analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus 1x71), 100xmagnificação, com exposição de 1044,7 milissegundos, na luz verde (Olympus URFLT luz UV) e um sistema de análise de imagem (Q Capture). As imagens obtidas foram analisadas pelo software de análise de imagem ImageJ/Open Comet.

#### **4.11.2 Ensaio de Apoptose Celular *in vivo***

Para este ensaio, os embriões com 48 hpf foram retirados do córion e incubados com o fluoróforo laranja de acridina para a detecção de células em processo de apoptose. Em um eppendorf de 2mL foram colocados 5 embriões, água do sistema e o reagente na concentração final de 5 µg/mL, incubados no escuro durante 30 min (TILTON; LA DU; TANGUAY, 2008). Após, os embriões foram lavados três vezes em água do sistema, posteriormente fixados em lâminas para microscopia com metilcelulose 1,5% e as imagens obtidas através de microscópio de fluorescência (Olympus 1x71) a 40xmagnificação, com uma exposição de 500 milissegundos, na luz verde (Olympus URFLT luz UV) e um sistema de análise de imagem (Q Capture). As imagens obtidas foram analisadas pelo software ImageJ, apenas a área total da cauda foi mesurada.

#### **4.12 Teste de Fuga Frente a Estímulo Adverso (*Touch scape*) e Capacidade Natatória**

Os testes comportamentais foram realizados 48 hpf, os embriões foram submetidos ao teste comportamental de resposta ao toque (SAINT-AMANT; DRAPEAU, 1998). Nesta fase

de desenvolvimento, os embriões permanecem inertes no ambiente, respondendo apenas a estímulos, como o toque. Resumidamente, um embrião de cada vez foi colocado suavemente no centro de uma placa de Petri contendo 20 mL de água do sistema e aclimatado durante 2 minutos, depois foi realizado o toque com auxílio de uma pinça entomológica (estímulo) e, em seguida, o número de estímulos necessários para o primeiro deslocamento foi calculado, assim como a capacidade do indivíduo de realizar um escape padrão (resposta de natação). Esses comportamentos foram avaliados por dois operadores (30 embriões por grupo).

#### **4.13 Quantificação Total de Proteínas**

O teor de proteína foi determinado utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, de acordo com Bradford (1976).

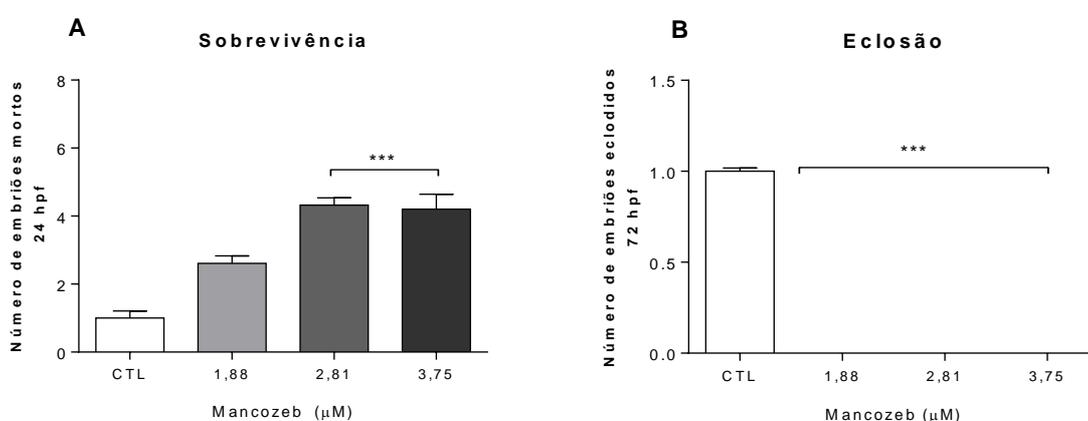
#### **4.14 Análises Estatísticas**

Foram aplicados testes de normalidade (Kolmogorov Smirnov) e homogeneidade (teste de Bartlett). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão (S.E.M.), para os dados não paramétricos, a análise foi feita através do teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's. Os dados paramétricos foram analisados pelo teste unidirecional (ANOVA) e pós-teste de Tukey, considerando os resultados significativos quando  $p \leq 0,05$ . Todas as análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5.0<sup>®</sup>.

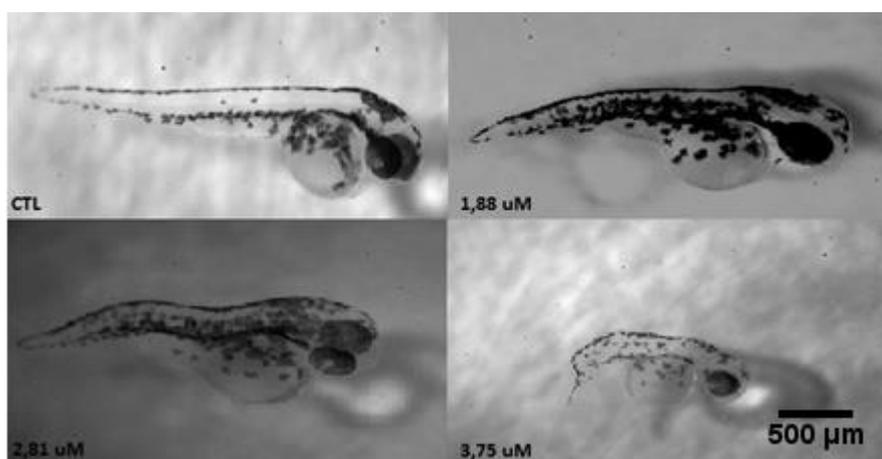
## 5. RESULTADOS

### 5.1 A exposição ao MZ prejudica a sobrevivência e a taxa de eclosão dos embriões

MZ foi capaz de afetar o desenvolvimento e comprometer a sobrevivência e taxa de eclosão dos embriões em todas as concentrações testadas (Fig. 9A e 9B). Bem como afetou a morfologia dos embriões tratados de modo dose-dependente (Fig. 10). Controles e NAC não resultaram em efeitos tóxicos. No entanto, quando os embriões de peixe-zebra foram pré-tratados com NAC, os efeitos tóxicos induzidos pelo MZ foram bloqueados na sobrevivência, taxa de eclosão e morfologia dos embriões apenas uma concentração de 1,88  $\mu\text{M}$  (Fig. 11A, 11B e 12).

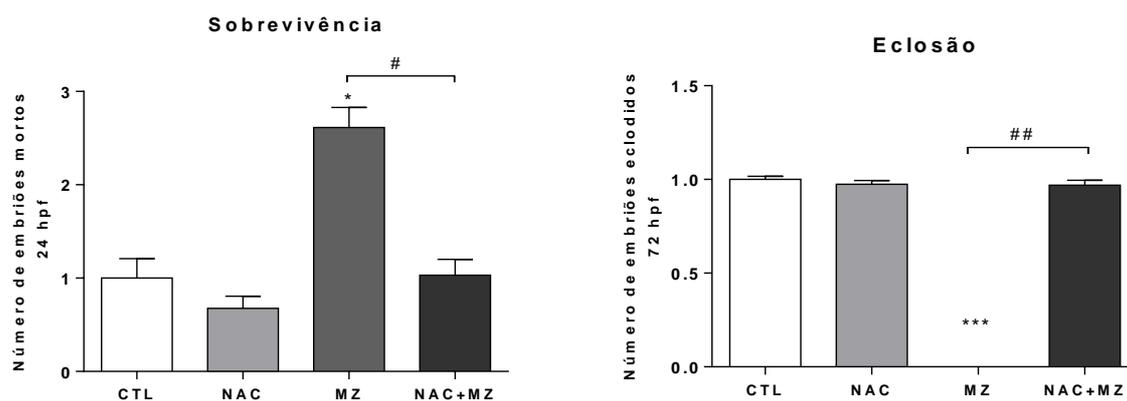


**Figura 9:** Sobrevivência e eclosão de embriões expostos a diferentes concentrações de MZ. (A) Número de embriões mortos após 24 hpf. (B) Número de embriões eclodidos após 72 hpf. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM ( $n=150$  embriões por grupo). A análise estatística foi realizada através do teste Kruskal-Wallis seguido pelo Teste Comparativo Múltiplo de Dunn's (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

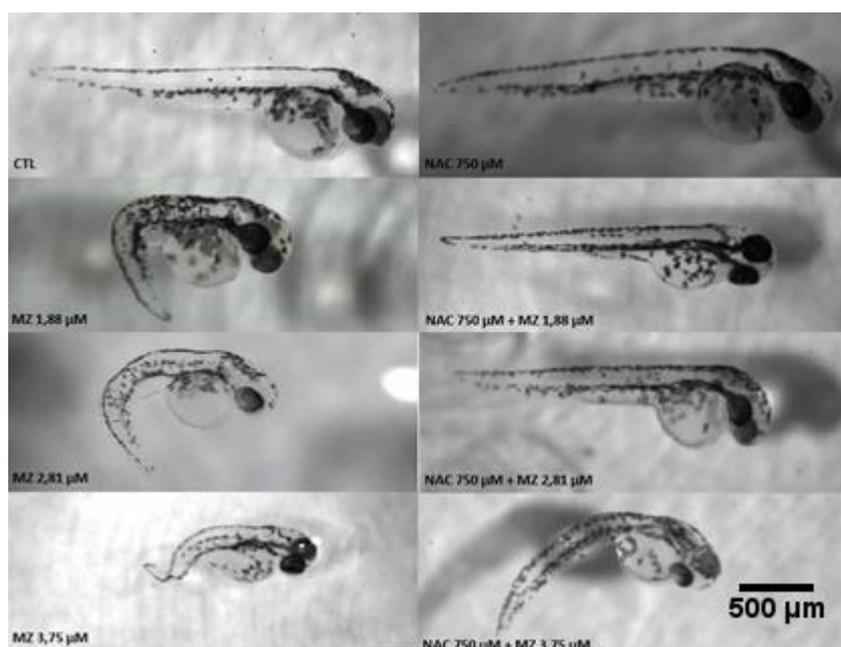


Fonte: Imagem do autor.

**Figura 10:** Alterações morfológicas induzidas pelo MZ. A figura acima demonstra a principal alteração morfológica observada no trabalho (distorção da notocorda), que se mostrou de maneira dose-dependente. Escala: 500  $\mu\text{m}$ .



**Figura 11:** Efeitos da exposição ao MZ e pré-tratamento com NAC sobre a sobrevivência e eclosão de embriões de peixe-zebra. (A) Número de embriões não-viáveis após 24 hpf. (B) Número de embriões não eclodidos após 72hpf. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada através do teste Kruskal-Wallis seguido pelo Teste Comparativo Múltiplo de Dunn's (\*\* $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$  comparando CTL e MZ. ### $p < 0,001$ ; #  $p < 0,05$  comparando MZ e NAC+MZ).



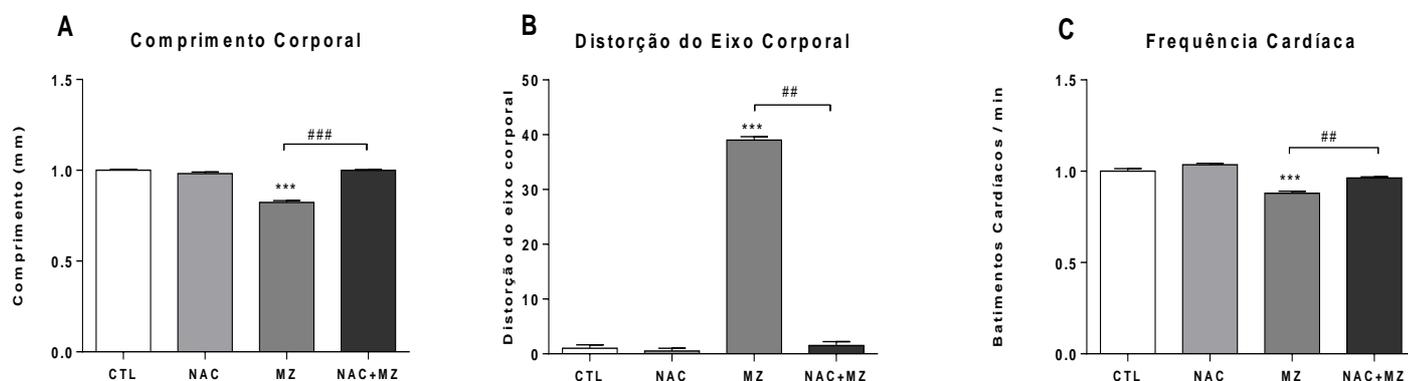
Fonte: Foto do autor.

**Figura 12:** Capacidade protetora da NAC frente à exposição ao MZ. A imagem demonstra que apenas os danos causados pela concentração mais baixa de MZ testada foram prevenidos pela NAC. Escala: 500  $\mu$ m.

## 5.2 NAC bloqueou anormalidades morfológicas induzidas por MZ e aumento da frequência cardíaca

As anormalidades morfológicas induzidas pelo tratamento com MZ foram apresentadas na figura 13. Assim, a toxicidade de MZ induziu distorção do eixo do corpo, causou uma redução significativa do comprimento do corpo e diminuição da frequência

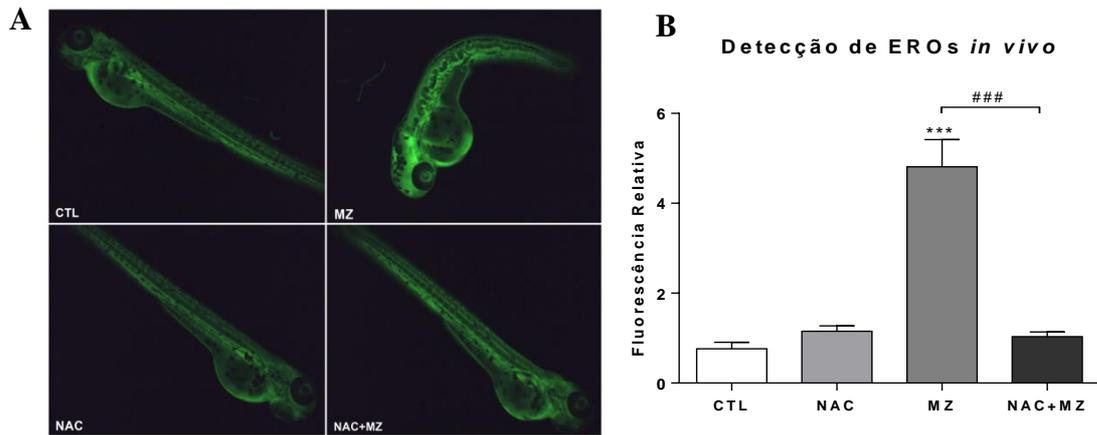
cardíaca. No entanto, o pré-tratamento com NAC foi capaz de proteger contra alterações morfológicas e cardiotoxicidade induzida pela exposição ao MZ.



**Figura 13:** Efeitos do Mz e NAC sobre parâmetros morfológicos e frequência cardíaca de embriões de peixe-zebra. (A) Comprimento corporal. (B) Número de embriões que apresentaram distorção do eixo corporal. (C) Frequência cardíaca de embriões expostos aos compostos ao final de 48hpf. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada através do teste Kruskal-Wallis seguido pelo Teste Comparativo Múltiplo de Dunn's (\*\*\*)  $p < 0,001$  comparando CTL e MZ. ###  $p < 0,001$ ; ##  $p < 0,01$  comparando MZ e NAC+MZ).

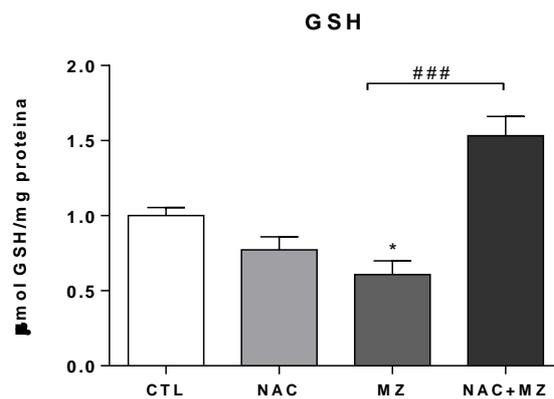
### 5.3 NAC aumentou os níveis de GSH e atenuou a geração de EROs induzida pela exposição ao MZ

Para determinar a associação com o estresse oxidativo na embriotoxicidade induzida por MZ foi realizada a determinação de EROS, bem como avaliado os níveis de GSH. MZ promoveu um aumento significativo na geração de EROs, em contraste, a fluorescência relativa foi atenuada com o pré-tratamento com NAC (Fig. 14). Além disso, MZ reduziu os níveis de GSH, no entanto, o pré-tratamento com NAC apresentou um efeito protetor, impedindo a diminuição dos níveis de GSH (Fig. 15). Por outro lado, as atividades de GST e GPx não mostraram diferenças significativas em relação ao controle (Fig. 16A e 16B).

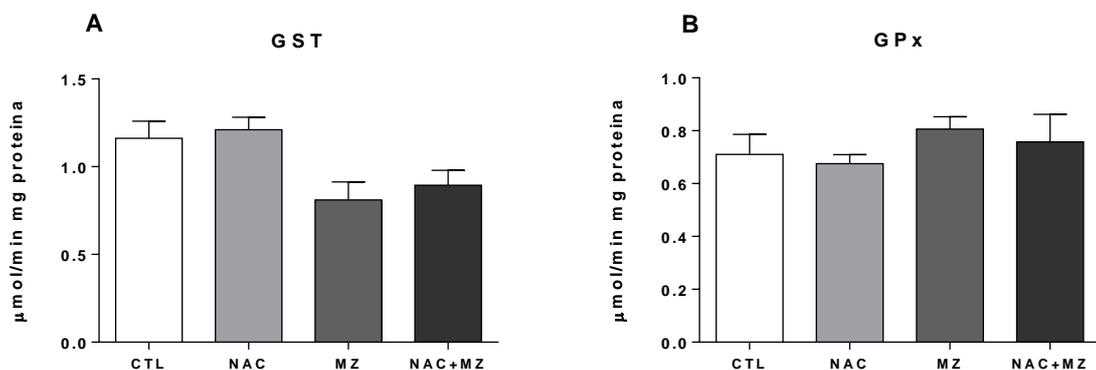


Fonte: Imagem do autor.

**Figura 14:** Efeitos de MZ e NAC sobre a produção de EROS (in vivo) em embriões de peixe-zebra. (A) Imagem representativa. (B) A produção de espécies reativas foi determinada através da quantificação da fluorescência relativa do corante DCFDA após a exposição aos compostos. Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada através de análise de variância (One-way ANOVA) seguido de teste comparativo Tukey (\*\*\*)  $p < 0,001$  comparando CTL e Mz. ###  $p < 0,001$  comparando MZ e NAC+MZ).



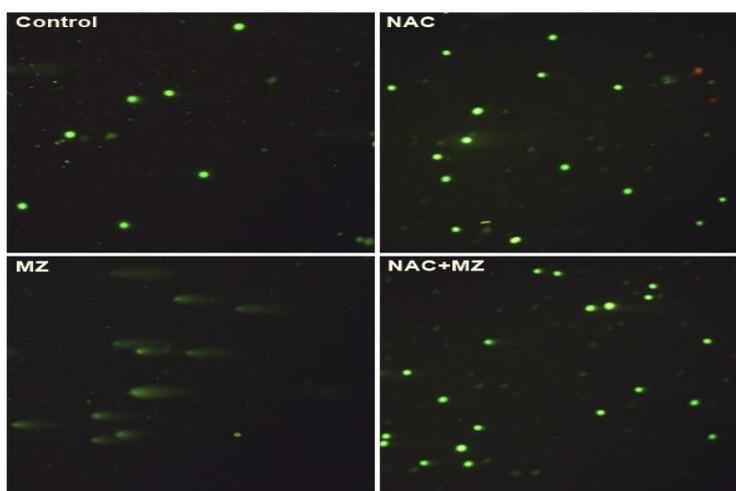
**Figura 15:** Avaliação dos níveis de GSH. Níveis de glutathiona total reduzida (tGSH) em embriões a 48 hpf. O resultado foi expresso por  $\mu\text{mol}$  GSH/mg de proteína de 10 animais individualmente para cada grupo em três testes independentes. Dados expressados como média  $\pm$  SEM e analisados por ANOVA unidirecional seguido por pós-teste de Tukey (\*  $p < 0,05$  em comparação com o controle), (###  $p < 0,001$  comparado MZ a NAC + MZ).



**Figura 16:** Atividades Enzimáticas. (A) Atividade da GST em embriões de 48 hpf, expressada por  $\mu\text{mol} / \text{min}$  mg de proteína de 30 animais individualmente para cada grupo em pelo menos três testes independentes. Dados expressados como média  $\pm$  SEM e analisados por Kruskal-Wallis e o Teste Comparativo Múltiplo de Dunn. (B) atividade de GPx em embriões de 48 hpf, expressada por  $\mu\text{mol}/\text{min}$  mg de proteína de 30 animais individualmente para cada grupo em pelo menos três testes independentes. Dados expressos como média  $\pm$  SEM e analisados por ANOVA unidirecional seguido de Tukey's post-hoc.

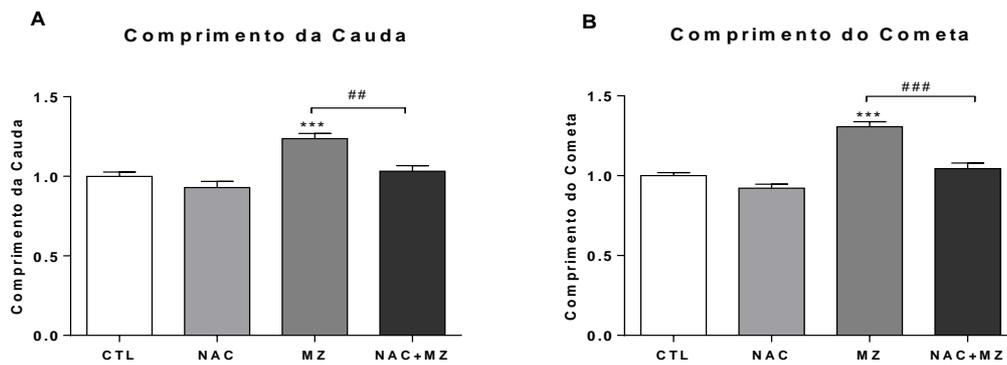
#### 5.4 NAC impediu a fragmentação do DNA e aumento da morte celular em embriões expostos ao MZ

No ensaio cometa, MZ revela um aumento significativo no comprimento total e comprimento da cauda dos cometas em comparação com o controle (CTL), além disso, os resultados corroboram para um aumento no número de células apoptóticas (apontadas pelas setas brancas), de acordo com a fluorescência relativa, dados também mostrados na imagens representativas. Em contraste, o pré-tratamento com NAC reduziu a fragmentação do DNA (Fig. 17, 18A e 18B) e o número de células apoptóticas (apontadas pelas setas brancas), induzidas pela exposição ao MZ (Fig. 19).

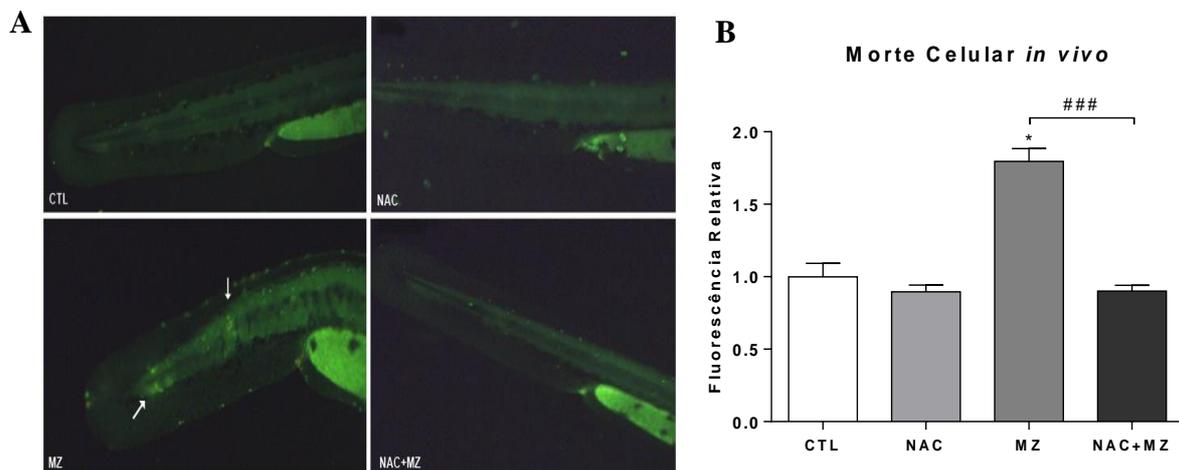


Fonte: Imagem do autor.

**Figura 17:** Imagem representativa dos danos ao DNA. Imagem representando a fragmentação do DNA induzida pelo MZ e a atenuação desses danos devido ao pré-tratamento com NAC.



**Figura 18:** Efeitos do MZ e NAC sobre a fragmentação da cromatina (genotoxicidade) em embriões de peixe-zebra. A avaliação da genotoxicidade foi realizada através do teste Cometa. Os valores foram expressos em microns. Um total de 100 núcleos foram analisados para cada grupo experimental. Os dados são expressos como médias  $\pm$  SEM e analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo Teste Comparativo Múltiplo de Dunn's (\*\*\*)  $p < 0,001$  comparando CTL e MZ. ###  $p < 0,001$ ; ##  $p < 0,01$  comparando MZ e NAC+MZ).



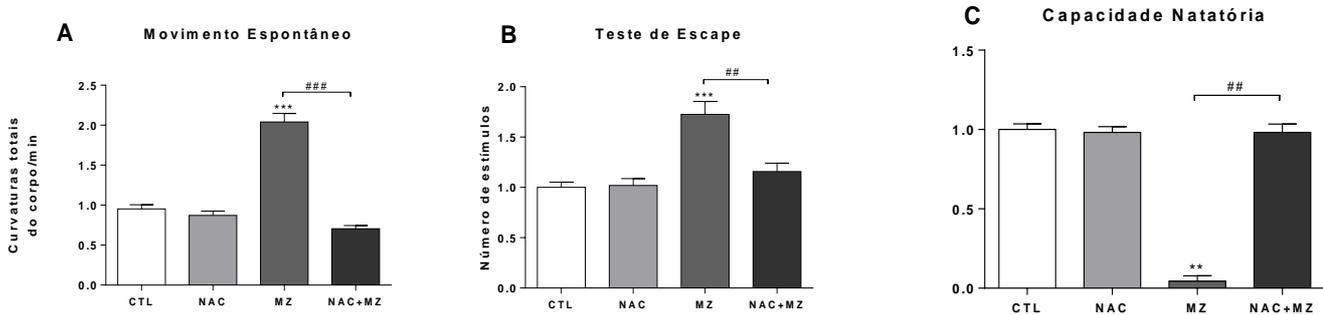
Fonte: Imagem do autor.

**Figura 19:** Avaliação da morte celular induzida por MZ pelo método do fluoróforo Laranja de Acridina. (A) Imagem representativa de células em processo de apoptose (apontadas pelas flechas brancas). Quantificação da fluorescência relativa em embriões de peixe-zebra expostos às diferentes condições experimentais. Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada através do teste Kruskal-Wallis seguido pelo Teste Comparativo Múltiplo de Dunn's (\* $p < 0,05$  comparando CTL e Mz.### $p < 0,001$  comparando MZ e NAC+MZ).

### 5.5 NAC protege contra os danos sensoriais e motores induzidos pelo MZ

A 28 hpf, o movimento espontâneo foi significativamente aumentado em embriões expostos ao MZ, no entanto, os embriões pré-tratados com NAC demonstraram comportamento semelhante ao CTL (Fig. 20A). A resposta a um estímulo adverso (*touch*) e capacidade natatória foram utilizadas como medida de avaliação do comportamento sensorio-motor dos embriões com 48 hpf. Embriões expostos ao MZ necessitaram de mais de um toque para realizar movimento, porém não realizaram um nado padrão de fuga como o CTL,

responderam com contrações onduladas do eixo do corpo e incapacidade de nadar, no entanto, esses danos foram prevenidos compré-tratados com NAC (Fig. 20B e 20C).



**Figura 20:** Análise de movimento espontâneo e capacidade sensori-motora de embriões de peixe-zebra pré-tratados com NAC e expostos a MZ. (A) Movimento espontâneo de embriões a 28 hpf, expresso por curvaturas totais do corpo/min. (B) Teste de Escape (*Touchscape*), expresso como o número de estímulos necessários para o primeiro movimento natatório. (C) Capacidade natatória, expressa como capacidade de realizar um comportamento padrão de natação perante a um estímulo adverso. Para todos esses dados, foram utilizados 50 embriões individualmente para cada grupo, e a análise estatística é expressa como média  $\pm$  SEM, analisada por Kruskal-Wallis e o Teste Comparativo Múltiplo de Dunn (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  em comparação com controle), (###  $p < 0,001$ ; #  $p < 0,01$  comparou MZ a NAC + MZ).

## 6. DISCUSSÃO

Agroquímicos são utilizados em larga escala, no combate a pragas agrícolas, evitando assim a perda da produtividade e prejuízos econômicos. No entanto, os subprodutos derivados da decomposição desses compostos, podem chegar até ambientes aquáticos através de processos naturais como lixiviação e escoamento superficial, levando a consequências como a contaminação desses ambientes e prejuízos a fisiologia de organismos não-alvo (ROSE; CARTER, 2003; SINGH; SRIVASTAVA, 2013).

MZ, um fungicida pertence aos DTCs, é frequentemente utilizado e as evidências da literatura demonstraram várias consequências nocivas para o meio ambiente, em especial para os organismos aquáticos como peixes e anfíbios (HARRIS et al., 2000; PALLAVI SRIVASTAVA AND AJAY SINGH, 2014; SHENOY et al., 2009).

O desenvolvimento embrionário é caracterizado por uma alta taxa de diferenciação e apoptose celular, que depende da homeostase redox (DENNERY, 2007). Organismos aquáticos em fase embrionária são mais suscetíveis ao estresse oxidativo, uma vez que dependem essencialmente do equilíbrio redox para o seu desenvolvimento (PAŠKOVÁ; HILSCHEROVÁ; BLÁHA, 2011). Porém, uma produção exacerbada de EROs pode perturbar esse equilíbrio, causando assim alterações morfológicas, afetar a taxa de sobrevivência desses organismos, entre outros prejuízos (COLE; ROSS, 2001; HAHN et al., 2015).

O presente trabalho apresentou como principal anomalia morfológica a distorção do eixo da notocorda, com isso, este resultado corrobora com outros estudos que demonstraram que compostos pertencentes aos DTCs promovem alterações morfológicas comuns durante o desenvolvimento de embriões de peixe-zebra, como distorção da notocorda (HAENDEL et al., 2004; TILTON et al., 2006; VAN BOXTEL et al., 2010). Além disso, prejudicou a sobrevivência e eclosão dos embriões expostos, bem como causou um atraso no desenvolvimento do tamanho corporal e exerceu efeitos cardiotoxicos, observados através da diminuição da frequência cardíaca. Segundo HALLARE et al. (2005), a eclosão dos embriões, processo que ocorre 72 hpf, é relacionado a movimentos corporais com a finalidade de romper o córion, a incapacidade de romper o envoltório pode estar associada com a perda da capacidade muscular decorrente das má-formações observadas (YAMAGAMI, 1988).

Em contrapartida, a NAC foi capaz de prevenir as alterações morfológicas, prejuízos a sobrevivência e eclosão, além dos efeitos induzidos sobre a frequência cardíaca frente à exposição à concentração de trabalho (1,88  $\mu\text{M}$ ). Desse modo, foi reforçada a hipótese do envolvimento do estresse oxidativo na embriotoxicidade induzida pelo MZ e enfatizado o potencial antioxidante da NAC.

DTCs, como o MZ, têm como principal alvo a oxidação de grupos sulfidril (SH), em especial o sistema glutatona. A exposição ao MZ reduziu os níveis de GSH em relação ao CTL, somado a isso, houve um aumento na geração de EROs. Assim, o pré-tratamento com NAC foi capaz de manter os níveis de GSH, que é indispensável para a regulação, proliferação celular e transcrição na fase embrionária de vertebrados (SANT et al., 2017; TIMME-LARAGY et al., 2013), bem como atenuar a produção de EROs. Estudos anteriores demonstraram que a NAC poderia aumentar a biossíntese e a reciclagem da GSH (ELBINI DHOUIB et al., 2016; PEÑA-LLOPIS; FERRANDO; PEÑA, 2003), mantendo assim a homeostase redox, fator este que desempenha um papel importante para a elucidação do comprometimento embrionário induzido por MZ.

Além disso, o tratamento com MZ induziu a genotoxicidade determinada através dos biomarcadores de morte celular e de dano do DNA. Um fator importante associado ao mecanismo alternativo de toxicidade poderia estar estreitamente relacionado com o composto metálico inorgânico principal deste fungicida. O Mn poderia promover a ativação de proteínas-chaves envolvidas na sinalização de apoptose (ALTENHOFEN et al., 2017). No entanto, o mecanismo de toxicidade de MZ pode ser uma associação complexa de ligação tanto da porção orgânica como inorgânica do composto (DOMICO et al., 2007; LI et al., 2013).

Nossos resultados revelaram que houve um aumento no número de movimentos espontâneos realizados pelos embriões expostos ao MZ. A toxicidade induzida pelo MZ pode comprometer o sistema sensorial embrionário de resposta a estímulos fotoreceptores, causando uma possível hiperatividade nos embriões expostos. Esta anormalidade pode estar ligada a neurotoxicidade induzida pela composição metálica do MZ, o Mn (CENTONZE et al., 2001; KRISHNA et al., 2014), além disso, a exposição continuada ao composto causou uma diminuição da capacidade de resposta a estímulos adversos.

Sabendo-se do possível envolvimento do estresse oxidativo na toxicidade induzida pelo MZ, conseguiu-se demonstrar através dos resultados obtidos com o pré-tratamento com NAC a capacidade de redução da natação anormal dos embriões, bem como o looping, que geralmente é causado devido à distorção da notocorda, um dano associado aos efeitos tóxicos dos DTCs e altas doses de Mn (ALTENHOFEN et al., 2017; BAKTHAVATSALAM et al., 2014).

## 7. CONCLUSÃO

Em conclusão, no presente trabalho se tornou evidente que o MZ é um potente agente pró-oxidante, capaz de induzir embriotoxicidade em embriões de peixe-zebra. Tendo em vista o fato de que o antioxidante NAC foi capaz de exercer um efeito protetor sobre os parâmetros avaliados, a hipótese do envolvimento do estresse como um dos principais mecanismos de toxicidade do MZ foi reforçada, enfatizando o papel chave do equilíbrio redox no desenvolvimento embrionário normal de organismos aquáticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRASCO. Dosiê Abrasco, parte 1: Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. In: ABRASCO, 2012.

ADAIR, J. C.; KNOEFEL, J. E.; MORGAN, N. Controlled trial of N-acetylcysteine for patients with probable Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 57, n. 8, p. 1515–7, 23 out. 2001.

ADAPAR. Adapar - EMZEB 800 WP. AGROFIT. **AGROFIT**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/acesso-a-informacao/acoes-e-programas/cartas-de-servico/defesa-agropecuaria-agrotoxicos/agrotoxicos-registrados-no-agrofit>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

ALTENHOFEN, S. et al. Manganese(II) chloride alters behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 182, p. 172–183, jan. 2017.

ANICHTCHIK, O. et al. Loss of PINK1 function affects development and results in neurodegeneration in zebrafish. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 33, p. 8199–207, 13 ago. 2008.

ARCANJO, M. E. Monitoramento do Agrotóxico Mancozeb no Solo em Diferentes Sistemas de Plantios de Tomate.2007.

ATAMANIUK, T. M. et al. The mancozeb-containing carbamate fungicide tattoo induces mild Oxidative Stress in goldfish brain, liver, and kidney. **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 11, p. n/a-n/a, nov. 2013.

BAKTHAVATSALAM, S. et al. A zebrafish model of manganese reveals reversible and treatable symptoms that are independent of neurotoxicity. **Disease Models & Mechanisms**, v. 7, n. 11, p. 1239–1251, nov. 2014.

BALTAZAR, M. T. et al. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases—A mechanistic approach. **Toxicology Letters**, v. 230,

n. 2, p. 85–103, 15 out. 2014.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation research**, v. 543, n. 3, p. 251–72, jun. 2003.

BUNZEL, K.; LIESS, M.; KATTWINKEL, M. Landscape parameters driving aquatic pesticide exposure and effects. **Environmental Pollution**, v. 186, p. 90–97, 1 mar. 2014.

CALDAS, E. D.; TRESSOU, J.; BOON, P. E. Dietary exposure of Brazilian consumers to dithiocarbamate pesticides--a probabilistic approach. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 44, n. 9, p. 1562–71, set. 2006.

CALVIELLO, G. et al. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, n. 2, p. 87–96, 1 mar. 2006.

CENTONZE, D. et al. Impaired Excitatory Transmission in the Striatum of Rats Chronically Intoxicated with Manganese. **Experimental Neurology**, v. 172, n. 2, p. 469–476, dez. 2001.

CHAGNON, M. et al. Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 119–134, 19 jan. 2015.

COGO, A. J.D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M. Using oxidative stress enzymes as biomarkers in environmental impacts. 2009.

COLE, L. K.; ROSS, L. S. Apoptosis in the Developing Zebrafish Embryo. **Developmental Biology**, v. 240, n. 1, p. 123–142, 1 dez. 2001.

COLWILL, R. M.; CRETON, R. Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae. **Reviews in the Neurosciences**, v. 22, n. 1, 1 jan. 2011.

CORSINI, E. et al. Immunomodulatory effects of the fungicide Mancozeb in agricultural workers. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 208, n. 2, p. 178–85, 15 out. 2005.

DAI, Y.-J. et al. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 11–17, jan. 2014.

DAVIES, K. Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. **IUBMB Life**, v. 50, n. 4, p. 279–289, 1 out. 2001.

DE ABREU, P. H. B.; ALONZO, H. G. A. Rural work and health risks: a review into safe use of pesticides in Brazil. **Ciencia & saude coletiva**, v. 19, n. 10, p. 4197–208, out. 2014.

DENNERY, P. A. Effects of oxidative stress on embryonic development. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 81, n. 3, p. 155–162, set. 2007.

DODD, S. et al. N-acetylcysteine for antioxidant therapy: pharmacology and clinical utility. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 8, n. 12, p. 1955–1962, 6 dez. 2008.

DOMICO, L. M. et al. Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells. **Neurotoxicology**, v. 28, n. 6, p. 1079–91, nov. 2007.

ELBINI DHOUIB, I. et al. A minireview on N -acetylcysteine: An old drug with new approaches. **Life Sciences**, v. 151, p. 359–363, 15 abr. 2016.

Fungicides Market. Disponível em: <<https://www.prnewswire.com/news-releases/fungicides-market-mancozeb-chlorothalonil-metalaxyl-strobilurin-and-others-for-cereals--grains-oilseeds--pulses-fruits--vegetables-and-other-crops---global-industry-analysis-size-share-growth-trends-and-forecast-20>>. Acesso em: 05 nov. 2017.

GOLDSMITH, P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 5, p. 504–512, out. 2004.

GRANDJEAN, E. M. et al. Efficacy of oral long-term N-acetylcysteine in chronic

bronchopulmonary disease: A meta-analysis of published double-blind, placebo-controlled clinical trials. **Clinical Therapeutics**, v. 22, n. 2, p. 209–221, fev. 2000.

GRIFFITH, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free radical biology & medicine**, v. 27, n. 9–10, p. 922–35, nov. 1999.

GROSICKA-MACIĄG, E. et al. Modulation of antioxidant defense system by the dithiocarbamate fungicides Maneb and Zineb in Chinese hamster V79 cells and the role of N-acetyl-L-cysteine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 130–134, out. 2013.

GURUSHANKARA; VASUDEV; KRISHNAMURTHY. Morphological abnormalities in natural populations of common frogs inhabiting agroecosystems of central Western Ghats. **Applied Herpetology**, v. 4, n. 1, p. 39–45, 1 jan. 2007.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in enzymology**, v. 77, p. 398–405, 1981.

HAENDEL, M. A. et al. Developmental Toxicity of the Dithiocarbamate Pesticide Sodium Metam in Zebrafish. **Toxicological Sciences**, v. 81, n. 2, p. 390–400, 14 jul. 2004.

HAHN, M. E. et al. Nrf2 and Nrf2-related proteins in development and developmental toxicity: Insights from studies in zebrafish ( *Danio rerio* ). **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, n. Pt B, p. 275–289, nov. 2015.

HALLARE, A. et al. Assessing contamination levels of Laguna Lake sediments (Philippines) using a contact assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Science of The Total Environment**, v. 347, n. 1–3, p. 254–271, 15 jul. 2005.

HALSTEAD, N. T.; CIVITELLO, D. J.; ROHR, J. R. Comparative toxicities of organophosphate and pyrethroid insecticides to aquatic macroarthropods. **Chemosphere**, v. 135, p. 265–271, set. 2015.

HANSEN, J. M.; HARRIS, C. Glutathione during embryonic development. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1850, n. 8, p. 1527–1542, 1 ago. 2015.

HARRIS, M. L. et al. Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 64, n. 2, p. 263–70, fev. 2000.

HARRISON BRODY, A. et al. Mancozeb-induced behavioral deficits precede structural neural degeneration. **NeuroToxicology**, v. 34, p. 74–81, jan. 2013.

HILL, A. J. et al. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 6–19, 1 jul. 2005.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 214–26, jul. 1976.

HOPPIN, J. A. et al. Pesticides and Atopic and Nonatopic Asthma among Farm Women in the Agricultural Health Study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 177, n. 1, p. 11–18, 1 jan. 2008.

IBRAHIM, A. T. A.; HARABAWY, A. S. A. Sublethal toxicity of carbofuran on the African catfish *Clarias gariepinus*: Hormonal, enzymatic and antioxidant responses. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 106, p. 33–9, ago. 2014.

IRONS, T. D. et al. Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 4, p. 792–813, fev. 2013.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253–310, jul. 1995.

KOSMEHL, T. et al. DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p. 1–14, 31 jan. 2008.

KRISHNA, S. et al. Brain deposition and neurotoxicity of manganese in adult mice exposed via the drinking water. **Archives of Toxicology**, v. 88, n. 1, p. 47–64, 6 jan. 2014.

KRISHNAN, V. IS THERE A ROLE FOR REACTIVE OXYGEN SPECIES IN ZEBRAFISH EMBRYOGENESIS? 2013.

KUBRAK, O. I. et al. Oxidative stress responses in blood and gills of *Carassius auratus* exposed to the mancozeb-containing carbamate fungicide Tattoo. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 85, p. 37–43, nov. 2012.

LEW, S. et al. Impact of pesticide contamination on aquatic microorganism populations in the littoral zone. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 64, n. 3, p. 399–409, abr. 2013.

LI, P. et al. The ethylene bis-dithiocarbamate fungicide Mancozeb activates voltage-gated KCNQ2 potassium channel. **Toxicology Letters**, v. 219, n. 3, p. 211–217, 7 jun. 2013.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature reviews. Genetics**, v. 8, n. 5, p. 353–67, maio 2007.

LU, T.; FINKEL, T. Free radicals and senescence. **Experimental Cell Research**, v. 314, n. 9, p. 1918–1922, 10 maio 2008.

MORENO, N. C.; SOFIA, S. H.; MARTINEZ, C. B. R. Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 448–454, jan. 2014.

MORRIS, G. et al. The Glutathione System: A New Drug Target in Neuroimmune Disorders. **Molecular Neurobiology**, v. 50, n. 3, p. 1059–1084, 22 dez. 2014.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 2, p. 549–599, 8 fev. 2017.

MOURA, M. A. M. et al. The sugarcane herbicide ametryn induces oxidative stress and developmental abnormalities in zebrafish embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–10, 12 jul. 2017.

NEGGA, R. et al. Exposure to Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate and glyphosate pesticides

leads to neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. **NeuroToxicology**, v. 32, n. 3, p. 331–341, jun. 2011.

OECD 236 - GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS - Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.2013.

OLSON, H. et al. Concordance of the Toxicity of Pharmaceuticals in Humans and in Animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 56–67, ago. 2000.

ONDANI, A. C.; CARVALHO, M. B.; GALVÃO, A. L. B. N-acetilcisteína - ação antioxidante e utilização na clínica de pequenos animais. **Archives of Veterinary Science**, v. 16, n. 2, 31 ago. 2011.

PAARDEKOOPE OVERMAN, J.; DEN HERTOOG, J. Zebrafish as a model to study PTPs during development. **Methods**, v. 65, n. 2, p. 247–253, 15 jan. 2014.

PALLAVI SRIVASTAVA AND AJAY SINGH. Potential Effects of Agricultural Fungicide (Mancozeb) on Fish *Clarias batrachus*. 2014.

PARRÓN, T. et al. Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems. **Toxicology Letters**, v. 230, n. 2, p. 157–165, 15 out. 2014.

PAŠKOVÁ, V.; HILSCEROVÁ, K.; BLÁHA, L. Teratogenicity and Embryotoxicity in Aquatic Organisms After Pesticide Exposure and the Role of Oxidative Stress. In: **Reviews of environmental contamination and toxicology**. [s.l: s.n.]. v. 211p. 25–61.

PEÑA-LLOPIS, S.; FERRANDO, M. D.; PEÑA, J. B. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 65, n. 4, p. 337–60, 10 dez. 2003.

PEREIRA, T. C. B.; CAMPOS, M. M.; BOGO, M. R. Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 7, p. 876–885, jul. 2016.

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Why Did Antioxidant Therapy Fail? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

PRESCOTT, L. Oral or Intravenous N-Acetylcysteine for Acetaminophen Poisoning? **Annals of Emergency Medicine**, v. 45, n. 4, p. 409–413, abr. 2005.

REIS, J. S. et al. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 7, p. 1096–1105, out. 2008.

ROSE, S. C.; CARTER, A. D. Agrochemical Leaching and Water Contamination. In: **Conservation Agriculture**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003. p. 417–424.

RUNKLE, J. et al. A systematic review of Mancozeb as a reproductive and developmental hazard. **Environment International**, v. 99, p. 29–42, fev. 2017.

SAINT-AMANT, L.; DRAPEAU, P. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. **Journal of neurobiology**, v. 37, n. 4, p. 622–32, dez. 1998.

SALAS-VIDAL, E. et al. Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. **Experimental cell research**, v. 238, n. 1, p. 136–47, 10 jan. 1998.

SANT, K. E. et al. The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of glutathione and redox dynamics in the developing zebrafish embryo. **Redox Biology**, v. 13, p. 207–218, out. 2017.

SHENOY, K. et al. GROWTH AND SURVIVAL OF NORTHERN LEOPARD FROG (RANA PIPIENS) TADPOLES EXPOSED TO TWO COMMON PESTICIDES. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 1469, jul. 2009.

SINGH, D. A.; SRIVASTAVA, D. P. In-vivo study of effects of dithiocarbamates fungicide (Mancozeb) and its metabolite ethylenethiourea (ETU) on fresh water fish *Clarius batrachus*. **Journal of Biology and Earth Sciences**, v. 3, n. 2, p. 228–235, 3 out. 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. **Química nova publication of the Sociedade**

**Brasileira de Química.**

SPADA, C. et al. The Effect of N-Acetylcysteine Supplementation upon Viral Load, CD4, CD8, Total Lymphocyte Count and Hematocrit in Individuals Undergoing Antiretroviral Treatment. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, n. 5, p. 452–5, 6 jan. 2002.

SRIVASTAVA, A. K. et al. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. **Life Sciences**, v. 90, n. 21–22, p. 815–824, 6 jun. 2012.

SULUKAN, E. et al. An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 180, p. 77–85, ago. 2017.

SUN, S.-Y. N-acetylcysteine, reactive oxygen species and beyond. **Cancer biology & therapy**, v. 9, n. 2, p. 109–10, jan. 2010.

TEKMAN, B. et al. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, n. 2, p. 117–121, 1 ago. 2008.

TELLEZ-BAÑUELOS, M. C. et al. Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 105–111, 1 ago. 2009.

TILTON, F. et al. Dithiocarbamates have a common toxic effect on zebrafish body axis formation. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 216, n. 1, p. 55–68, 1 out. 2006.

TILTON, F.; LA DU, J. K.; TANGUAY, R. L. Sulfhydryl systems are a critical factor in the zebrafish developmental toxicity of the dithiocarbamate sodium metam (NaM). **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 90, n. 2, p. 121–7, 11 nov. 2008.

TIMME-LARAGY, A. R. et al. Glutathione redox dynamics and expression of glutathione-related genes in the developing embryo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 89–101, dez. 2013.

TSANG, M.; TROMBETTA, L. The protective role of chelators and antioxidants on mancozeb-induced toxicity in rat hippocampal astrocytes. **Toxicology and Industrial Health**, v. 23, n. 8, p. 459–470, 30 set. 2007.

UREN WEBSTER, T. M. et al. Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish ( *Danio rerio* ). **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 2, p. 1271–1279, 21 jan. 2014.

VAN BOXTEL, A. L. et al. Dithiocarbamates are teratogenic to developing zebrafish through inhibition of lysyl oxidase activity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 244, n. 2, p. 156–161, 15 abr. 2010.

VISMARA, C. et al. Paraquat embryotoxicity in the *Xenopus laevis* cleavage phase. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 55, n. 1–2, p. 85–93, 1 nov. 2001.

WATSON, F. L. et al. Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and decrease locomotor activity and heart rate in *Danio rerio* and *Xenopus laevis*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 6, p. 1337–1345, jun. 2014.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, v. 77, p. 325–33, 1981.

WESTERFIELD, M. The Zebrafish Book. A Guide for The Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*).2010.

XIA, L.; ZHENG, L.; ZHOU, J. L. Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish ( *Danio rerio* ). **Chemosphere**, v. 182, p. 416–425, set. 2017.

XU, S. ENVIRONMENTAL FATE OF MANCOZEB.2000.

YAMAGAMI, K. 7 Mechanisms of Hatching in Fish. **Fish Physiology**, v. 11, p. 447–499, 1 jan. 1988.

YAMASHITA, M. Apoptosis in zebrafish development. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 136, n. 4, p. 731–42, dez. 2003.

ZUIN, R. et al. High-dose N-acetylcysteine in patients with exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. **Clinical drug investigation**, v. 25, n. 6, p. 401–8, 2005.