

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

MIRIANE ACOSTA SARAIVA

**ETILENO-BIS-DITIOCARBAMATO MANCOZEBE ALTERA PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E GÊNICOS EM *Drosophila melanogaster***

São Gabriel, RS
2019

MIRIANE ACOSTA SARAIVA

**ETILENO-BIS-DITIOCARBAMATO MANCOZEBE ALTERA PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E GÊNICOS EM *Drosophila melanogaster***

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Pampa, como
requisito parcial para obtenção do Título de
Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Thaís Posser

Co-Orientador: Jeferson Luis Franco

São Gabriel, RS
2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

S243e Saraiva, Miriane Acosta

ETILENO-BIS-DITIOCARBAMATO MANCOZEBE ALTERA PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICOS E GÊNICOS EM *Drosophila*
melanogaster / Miriane Acosta Saraiva.

89 p.

Tese(Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2019.

"Orientação: Thaís Posser".

1. Mancozebe. 2. *Drosophila melanogaster*. 3. Estresse
oxidativo. 4. Mitocôndrias. 5. Agroquímicos. I. Título.

MIRIANE ACOSTA SARAIVA

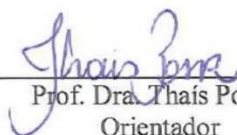
**ETILENO-BIS-DITIOCARBAMATO MANCOZEBE ALTERA PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS,
BIOQUÍMICOS E GÊNICOS EM *Drosophila melanogaster***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas.

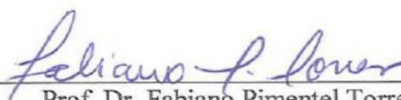
Área de concentração: Qualidade ambiental

Tese defendida e aprovada em: 9 de dezembro de 2019 .

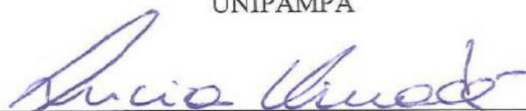
Banca examinadora:



Prof. Dra. Thaís Posser
Orientador
UNIPAMPA



Prof. Dr. Fabiano Pimentel Torres
UNIPAMPA



Prof. Dr. Lúcia Helena do Canto Vinadé
UNIPAMPA



Prof. Dr. Robson Puntel
UNIPAMPA- Uruguaiiana

Dedico esta tese a todas as pessoas que ousaram sonhar e acreditaram no poder destes sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as forças do universo que regeram esta jornada, possibilitando a realização deste sonho.

À minha família, pelo apoio e todo incentivo que puderam dar nesses anos todos. Ao meu pai Carlos e ao meu irmão Cassio pelos momentos de incentivo. À minha mãe Gislaine, meu maior exemplo de força e coragem, por nunca me deixar desistir de nada que sonhei até hoje.

Ao meu companheiro de vida Roberto Melo, que esteve ao meu lado, apoiando, acreditando e amparando todas as horas.

Aos meus bebês de quatro patinhas Sofia, Lucke e Nina por estarem sempre ao meu lado enquanto escrevia a tese.

Às amigas Júlia, Mariana, Afnan e Rosângela por todo apoio e amizade.

Ao primo Pedro Mainardi (in memoriam) por deixar um legado tão sincero de persistência e amor.

Agradeço imensamente a minha orientadora de doutorado, Professora Doutora Thaís Posser. Exemplo de ser humano, mulher, mãe e pesquisadora que com sua forma corajosa e tranquila de ser ajudou-me a chegar até estas páginas.

Ao Professor Doutor Jeferson Luis Franco por dividir seus conhecimentos de forma tão tranquila e poderosa comigo. Obrigada a estes mestres por todo apoio!

Aos colegas de graduação, mestrado, doutorado e aos colegas do grupo de pesquisa GPEOSCEL (o melhor grupo de pesquisas desta instituição) pelo apoio, coleguismo e ajuda durante esta fase de minha jornada na busca pelo saber.

Aos professores membros da banca, que participaram da avaliação deste trabalho e contribuíram de forma significativa para a conclusão desta pesquisa.

Aos professores e funcionários da UNIPAMPA *Campus* São Gabriel.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida.

A todos de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“A vida não é justa, ainda assim é boa”.

Regina Brett

RESUMO

O etileno-bis-ditiocarbamato (EBDC) Mancozebe (MZ) foi desenvolvido visando ação fungicida, após o início de sua utilização nos testes em lavouras experimentais sua ação acaricida foi observada. Com base neste efeito percebeu-se que este EBDC não é ativo apenas sobre seus organismos alvos, o que indica a necessidade de cuidados durante a aplicação do mesmo em lavouras e o correto destino de seus vasilhames e demais objetos contaminados. Tendo em vista a importância ambiental e econômica do fungicida MZ este trabalho busca verificar os efeitos da exposição de *Drosophila melanogaster* a diferentes concentrações de Mancozebe em período prolongado sobre as defesas antioxidantes, expressão gênica, bioenergética e alterações comportamentais. Os resultados indicam que MZ reduz o tempo de vida da *D. melanogaster*, e diminui a capacidade locomotora. Níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram aumentados, bem como houve uma modulação da atividade de enzimas antioxidantes e diminuição de tióis e aumento nos níveis de malondialdeído (MDA). Tais achados indicam o estabelecimento do estresse oxidativo culminando em dano oxidativo as membranas contribuindo para morte celular. Nossos dados também apontam para uma resposta adaptativa aos efeitos da exposição à concentração mais baixa, gerada a partir do aumento da expressão de RNAm para as proteínas HSP70 e 83, bem como Nrf2. A exposição ao MZ induziu acúmulo de Manganês (Mn). Paralelamente houve diminuição da capacidade bioenergética em paralelo com a inibição dos complexos I e II da cadeia transportadora de elétrons e consequente diminuição no consumo de oxigênio pela mitocôndria. Em paralelo os substratos energéticos como glicose e trealose foram diminuídos e o aumento dos níveis de triglicerídeos foi observado. A enzima responsável pela biossíntese de triglicerídeos ACeCS1 foi diminuída apenas na concentração mais baixa testada. Em suma, nossos resultados mostram que assim como em estudos com modelos vertebrados, as moscas da fruta consistem em um modelo susceptível ao efeito do fungicida MZ, levando a distúrbios metabólicos e dano oxidativo, culminando com morte celular e alterações comportamentais. Estes dados chamam atenção para os potenciais efeitos do MZ em organismos não alvo, descrevendo alvos bioquímicos da ação deste fungicida neste modelo e que podem representar alvos terapêuticos frente ao dano causado pela exposição a este composto.

Palavras-Chave: *Drosophila melanogaster*, Mancozebe, Estresse Oxidativo, Mitocôndria, Fungicida.

ABSTRACT

The ethylene-bis-dithiocarbamate Mancozeb was developed aiming an antifungal action but acaroid effects was additionally. Thus, EBDC could be active not only for fungi but also for non-target organisms drawing attention for special care in the application of this products and correct disposal of waste and packaging. Taking into account the economic and environmental importance of MZ, this work aims to investigate the effects of MZ prolonged exposition in *Drosophila melanogaster* exposed to different concentrations on antioxidant defenses, genic expression, bioenergetics capacity and behavioral alterations. The results point to a lifespan reduction and locomotor deficits. ROS levels were augmented with a modulation of antioxidant enzymes activity, decreased levels of thiols and augmented levels of MDA. With a base on these data, oxidative stress plays a main role in causing oxidative damage to biomembranes culminating with cell death. Our data suggest an adaptive response to the MZ exposition at lower concentration due to higher levels of mRNA of HSPs and Nfr2 that are cellular protective agents. MZ exposure causes Mn overload in flies. In parallel, a lower mitochondrial bioenergetic capacity and I and II mitochondrial complexes and oxygen consumption inhibition by mitochondria. Energetic substrates like glucoses and trehaloses were reduced and higher levels of triglycerides was observed. The AceCS1 content, an enzyme acting on the biosynthesis of triglycerides was decreased at the lowest tested concentration. In summary, our results shown that similarly to observed in vertebrates models, fruit fly are susceptible to MZ toxicity, disturbing flies metabolism and inducing oxidative damage resulting in flies mortality and behavioral alterations. These data draw attention to the potential toxicity of MZ on non-target organisms and describe possible molecular biochemical targets of MZ for therapeutic interventions following intoxication.

Keywords: *Drosophila melanogaster*, Mancozeb, Oxidative Stress, Mitochondria, Fungicide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:Lavoura de soja.....	15
Figura 2:Fórmula estrutural do Mancozebe (MZ).	16
Figura 3: Fórmula estrutural da etilenotiouréia (ETU).	17
Figura 4:Célula Eucarionte.....	18
Figura 5: Via de degradação do MZ.	23
Figura 6: Estresse Oxidativo.	24
Figura 7: Formação de radical livre.....	25
Figura 8: Processos de formação de EROs	27
Figura 9: Sistema antioxidante enzimático	29
Figura 10: Mosca da fruta	31
Figura 11: Ciclo de vida da mosca da fruta.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACeCS1	Acetyl-CoA Synthetase
ACSL1	Acyl-CoA synthetases
ADP	Adenosine Diphosphate
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosine Triphosphate
CAT	Catalase
CS ₂	Dissulfeto de Carbono
DNA	Desorribonuclei acid
EBDC	Etileno-bis-ditiocarbamato
EBIS	Etileno-bisisotiocianato
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETU	Etileno tiouréia
EU	Etileno uréia
FA	Fatty acids
FCCP	Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone
GO	Glutathione oxidase
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione forma oxidada
GST	Glutathione S-Transferase
HRR	High Resolution Respirometry
HS ₂	Dissulfeto de Hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
HSP70	Heat Shock Protein 70
HSP83	Heat Shock Protein 83
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
MDA	Malondialdeído
Mn	Manganês

Mn ²⁺	Íon Mn ²⁺
Mn ³⁺	Íon Mn ³⁺
MZ	Mancozebe
NADP+	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (forma reduzida de
NAD+)	
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NF-KB	Nuclear Factor kappa B
°NO	Óxido Nítrico
NOS	Nitric Oxyde Species
NOX	Nitric Oxyde synthetases
NRF2	Nuclear Related Factor 2
O ₂ ^{°-}	Ânion Superóxido
OXPHOS	Oxidative Phosphorilation
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos
RNAM	Rinonucleic Acid Messenger
ROS	Reactive Oxygen Species
SISAGUA	Sistema de Informação de Vigilância de Qualidade da Água para
Consumo Humano	
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
Zn	Zinco

Sumário

RESUMO.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Agricultura como base da sociedade	14
1.2 AGROQUÍMICOS: Mancozebe é o fungicida mais utilizado no Brasil	16
1.3 Os efeitos do fungicida Mancozebe em organismos não alvos	20
1.4 Agroquímicos e o estresse oxidativo	24
1.5 A mosca da fruta como modelo experimental.....	30
2. OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. DESENVOLVIMENTO	34
3.1 ARTIGO 1.....	35
3.2 MANUSCRITO 1.....	47
4. DISCUSSÃO	70
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
6. REFERÊNCIAS	77
7. ANEXOS.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 Agricultura como base da sociedade

O surgimento de cidades está diretamente atrelado ao início da agricultura, quando o homem percebeu que os vegetais utilizados em sua alimentação cresciam nos locais onde eram descartados (OYER; ROUDART, 2010). Este hábito de cultivar o solo com frutos utilizados na alimentação humana e animal foi nomeado de agricultura, palavra que deriva do prefixo *agru* que em latim refere-se à terra que pode ser cultivada e da palavra *cultura* que faz menção ao ato de cultivar.

A agricultura propiciou ao ser humano a possibilidade de abandonar a vida nômade e estabelecer-se em território fixo, com isso o número populacional aumentou, o ser humano pode desenvolver outras atividades além de caçar e coletar frutos e vegetais para a alimentação. Com o passar do tempo todos os vegetais utilizados na alimentação eram cultivados, porém a agricultura não cresceu tanto quanto a população mundial.

O Brasil possui 63.994.479 hectares de áreas destinadas ao cultivo, segundo dados lançados pela EMBRAPA, empresa brasileira de pesquisa agropecuária, no final do ano de 2017 e confirmado pela NASA (National Aeronautics and Space Administration). Esta área equivale a 7,6% do território brasileiro, enquanto que as áreas naturais com vegetação preservada ocupam 66% do território nacional (EMBRAPA, 2017). Cerca de 1,87 bilhão de hectares do nosso planeta estão ocupados pela atividade agrícola, enquanto que a população mundial atingiu quase 8 bilhões de pessoas no final do ano 2018. De acordo com a FAO (Organização das Nações Unidas para alimentos e agricultura) até 2050 a área agrícola mundial deverá aumentar em 70%, visando alimentar a população por igual (FAO, 2009).

A agricultura de larga escala tornou-se essencial para atender a grande demanda mundial por alimentos, com objetivo de obter a maior produtividade possível nas áreas cultivadas utilizando-se de toda a tecnologia disponível para isso. Neste cenário, o Brasil detém o título de maior exportador mundial de soja e o segundo maior produtor deste grão sendo que 42% da área plantada no Brasil hoje correspondem ao cultivo desta leguminosa (EMBRAPA, 2018).

A soja (*Glycine max L.*) é uma planta originária da China pertencente à família Fabaceae (Figura 1A). Amplamente utilizada na alimentação humana, além de ser utilizada como matéria prima para a fabricação de produtos cosméticos, sabões e

produção de biodiesel. A cultura ocupou uma área de 33,89 milhões de hectares brasileiros, o que totalizou uma produção de 113,92 milhões de toneladas na safra 2016/2017 (EMBRAPA, 2018). O Rio Grande do Sul (RS) ocupa a terceira posição neste cenário, contribuindo com 19,187 milhões de toneladas em 2018 (HARTMANN, 2017). O mercado da soja movimenta grande recurso financeiro, através da compra e venda do grão e também a partir do consumo de produtos que são utilizados para assegurar a produção como fertilizantes e controladores de pragas, além de todo o maquinário utilizado em lavouras. No ano de 2017, o estado do RS foi o terceiro maior consumidor brasileiro para agroquímicos, apenas para as lavouras de soja contabilizando cerca 1,08 bilhão de dólares (EMBRAPA, 2018).

A principal causa de prejuízo nas lavouras de soja é a doença comumente conhecida como ferrugem-asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* (H.Sydow & Sydow). A ferrugem-asiática é a principal causa de desfolhe precoce, que atrapalha a completa formação dos grãos, afetando diretamente a produtividade do cultivar (Figura 1B). O *Phakopsora pachyrhizi*, possui 18 diferentes linhagens tornando difícil o desenvolvimento de um vegetal resistente a sua infestação, que é propagada pela ação do vento (YORINORI; JUNIOR; LAZZAROTTO, 2004).



Figura 1: Lavoura de soja. 1A Soja sadia. 1B Lavoura de soja com ferrugem asiática. Fonte: Google imagens.

1.2 AGROQUÍMICOS: Mancozebe é o fungicida mais utilizado no Brasil

Neste ano o governo, através do ministério da agricultura, liberou o uso de 169 novos agroquímicos com a premissa de baratear os gastos do setor com tais produtos, com isso o uso de produtos químicos no Brasil só tem aumentado. Em 2017, o relatório do IBAMA apontou que 539.944,95 toneladas de agroquímicos foram vendidas no país e 199.375,64 toneladas de princípios ativos foram importadas e 71.669,64 toneladas produzidas. Os herbicidas lideram o percentual de produção, venda e uso de agroquímicos, seguidos pelos compostos de ação fungicida. O principal produto ativo com ação fungicida utilizado no Brasil é o Mancozebe, com mais de 30 mil toneladas comercializadas em 2017, este produto conta atualmente com 70 formulações registradas no ministério da agricultura com comercialização ativa, sendo efetivo no controle e/ou combate a 43 espécies de fungos fitopatogênicos (IBAMA, 2017).

Mancozebe foi desenvolvido e registrado em 1962 pela companhia Rohm & Haas, este contendo átomos de zinco complexados à fórmula de outro agente fungicida denominado Maneb (etileno-bis-ditiocarbamato de manganês) tornaria-se o EBDC mais importante deste grupo na indústria de agroquímicos (GULLINO et al., 1963). Este composto pertence à classe dos etileno-bis-ditiocarbamatos, com átomos de manganês (Mn) e zinco (Zn) complexados em sua fórmula, com ação fungicida e acaricida reconhecida (Figura 2).

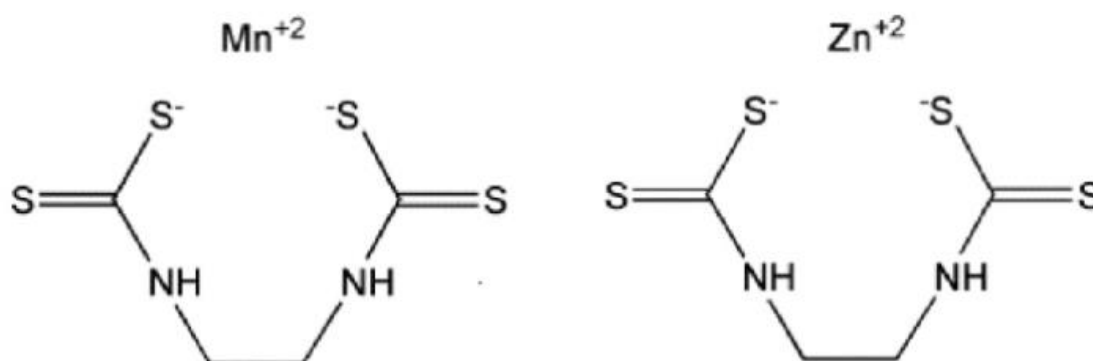


Figura 2: Fórmula estrutural do Mancozebe (MZ). Adaptado de: (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY., 2005).

Mancozebe possui classificação ambiental nível III produto considerado perigoso, a classificação toxicológica o considera como nível II, altamente tóxico. O Mancozebe quando aplicado não sofre bioacumulação no solo e em corpos d'água. Entretanto, ele sofre degradação e/ou biotransformação em seu metabólito etilenotiouréia (ETU) que é considerado tóxico, este pode acumular-se no meio ambiente (Figura 3). A formação da ETU ocorre devido à liberação de dissulfeto de carbono (CS_2) e sulfeto de hidrogênio (H_2S) por degradação oxidativa. Em meio aquoso a degradação fotolítica (decomposição ou dissociação provocada por absorção de fótons) é favorecida pela presença de clorofila, um agente fotossensibilizador que em interação com a luz produz espécies de oxigênio altamente reativas (BALARDIN, 2017; GULLINO et al., 1963).

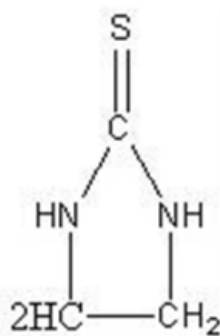


Figura 3: Fórmula estrutural da etilenotiouréia (ETU). Adaptado de: (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY., 2005).

O fungicida apresenta-se como um pó amarelado ou composto granulado que deve ser diluído em meio com pH ácido para sua dissolução e posterior aplicação por aspersão foliar (AGENCY, 2013). MZ é considerado um fungicida de ação protetiva, pois após sua aplicação forma-se uma película protetora que permanece na folha, este fato possibilita que o tubo germinativo do esporo absorva os compostos fungitóxicos que agem no núcleo das células do fungo impedindo a realização das funções básicas para o desenvolvimento do esporo, como a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e a produção de energia realizada pelas mitocôndrias, que parecem ser a organela alvo dos compostos do MZ (CALVIELLO et al., 2006; GOLDONI et al., 2014; JORDAN et al., 2012; SRIVASTAVA et al., 2016). Podem acumular-se na membrana ou penetrar e acumular-se no interior do esporo e/ou micélio, onde atuarão como inibidores

enzimáticos dos processos metabólicos fúngicos, como a produção de trifosfato de adenosina (ATP) que é a principal forma de energia utilizada pela célula em questão. A porção de Mn do MZ pode alterar a fluidez das membranas biológicas afetando suas funções básicas, como a entrada e saída de produtos celulares (Figura 4).

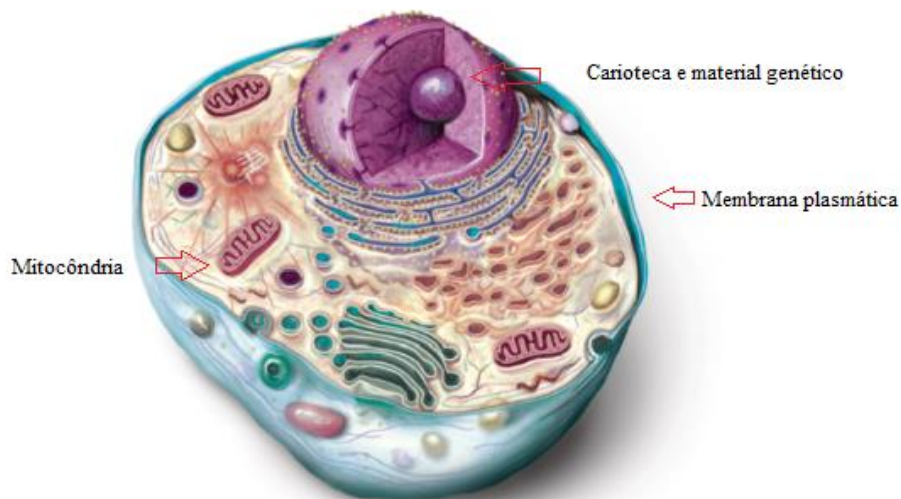


Figura 4: Célula Eucarionte

As estruturas celulares alvos da ação do MZ estão indicados pelas setas vermelhas, como a membrana plasmática, mitocôndria, núcleo e nucléolo. Adaptado de: (USP, 2010).

Conforme a utilização de agroquímicos foi intensificada nos cultivares agrícolas a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2001 criou um programa em parceria com o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) para monitorar os resíduos presentes nos alimentos que são produzidos e comercializados no Brasil. O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA) já analisou desde sua criação mais de 30 mil amostras de alimentos de origem vegetal, estas análises são realizadas por quatro laboratórios públicos LACEN (Laboratório central de saúde pública) de GO, MG, RS e PR e um privado que analisam amostras do país inteiro com o objetivo de ampliar a segurança alimentar brasileira e verificar as boas práticas no setor agrícola (ANVISA, 2016). No relatório que avaliou os resíduos de agroquímicos em verduras do período de 2013 a 2015, divulgado em 2016 apenas 1,11% das amostras apresentavam risco de potencial agudo de intoxicação, principalmente relacionado ao uso de produtos irregulares como o carbofurano, carbendazim e clorpirifós (ANVISA, 2016).

Um estudo avaliando resíduos de produtos químicos foi realizado em vegetais, como verduras e frutas produzidas no Brasil entre 2001 e 2010 e os EBDCs foram encontrados em 41,6% das amostras analisadas que apresentavam contaminação (JARDIM; CALDAS, 2012). Um levantamento realizado nos sistemas de abastecimento de água urbanos no Brasil apontou a presença de produtos químicos (agroquímicos) na água bruta, coletada para tratamento e que posteriormente passa ao abastecimento da população. Entretanto o número de cidades participantes deste levantamento é muito baixo. O SISAGUA (Sistema de Informação de Vigilância de Qualidade da Água para Consumo Humano) avaliou amostras de 887 municípios brasileiros em 2011 e 7,7% deles (69 municípios) apresentaram resultados acima dos considerados seguros para a água potável no que se refere a 13 substâncias diferentes (SAÚDE, 2013).

O governo brasileiro tem monitorado os níveis de agroquímicos utilizados e através desse acompanhamento, percebe-se que o uso de substâncias não permitidas e que os níveis de utilização de agroquímicos em lavouras é superior ao estipulado pelos fabricantes. Os levantamentos indicam que é preciso aumentar a vigilância e melhorar as práticas agrícolas, buscando reduzir o acúmulo de produtos químicos no ambiente, bem como os resíduos em alimentos e água para consumo. Neste sentido torna-se importante ressaltar que os efeitos da exposição humana a agentes agroquímicos não são completamente conhecidos, por isso os estudos com organismos modelos fazem-se de suma importância.

A portaria nº 1.271, publicada em 6 de junho de 2014, pelo Ministério da Saúde, torna obrigatória o registro de intoxicações causadas por exposição a agroquímicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). No período de 2007 a 2014 ocorreu um aumento de 83% no número de intoxicações por agroquímicos. Só em 2013 foram registrados quase 60 mil casos de intoxicação, destes 54,3% foram relacionadas a tentativas de suicídio (BRASIL., 2016). O levantamento mostra que a maior parte dos casos de intoxicação reportados são referentes a utilização inapropriada dos produtos agroquímicos. Grande parte destas intoxicações ocorreram em trabalhadores de áreas agrícolas. Este fato reforça a importância do uso dos equipamentos de proteção individual (EPIs), para o manuseio de produtos químicos.

1.3 Os efeitos do fungicida Mancozebe em organismos não alvos

O etileno-bis-ditiocarbamato Mancozebe foi criado com ação fungicida, após o início de sua utilização nos testes em lavouras experimentais sua ação acaricida foi observada. Com base neste efeito percebeu-se que este EBDC não é ativo apenas sobre seus organismos alvos, o que indica a necessidade de cuidados durante a aplicação do mesmo em lavouras e o correto destino de seus vasilhames e demais objetos contaminados. A partir de então diversos estudos apontam possíveis efeitos da exposição aguda e/ou prolongada ao Mancozebe em diferentes organismos.

A exposição de leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* ao MZ diluído em meio de cultura mostraram que o fungicida induz a morte celular por apoptose, hiper polarização da membrana das mitocôndrias e elevação da geração de espécies reativas de Oxigênio (EROs) mitocondrial (SCARIOT et al., 2016). *Caenorhabditis elegans*, Verme nematódeo, usado como organismo modelo amplamente utilizado em estudos comportamentais, mostrou alteração dos comportamentos normais e indícios de degeneração de células nervosas, limitação do crescimento nos estágios larvais e a regulação da expressão de proteínas de choque térmico foi observado apenas para a exposição ao MZ, enquanto a expressão de tais proteínas não foi alterada durante a exposição a outros EBDCs (BAILEY et al., 2016; BRODY et al., 2013; EASTON; GUVEN; DE POMERAI, 2001; NEGGA et al., 2012).

Muitas vezes a aplicação única de agroquímicos em áreas agrícolas faz-se ineficiente e novas aplicações são necessárias, levando ao uso excessivo destes componentes. Assim sendo, o excesso de fungicidas, herbicidas e demais produtos agroquímicos muitas vezes não ficam concentrados nas áreas de interesse e são transportados pelo vento e principalmente por chuvas e acabam se depositando em corpos d'água, que frequentemente margeiam lavouras, seguindo até rios, podendo chegar até o sistema de coleta de água urbano (CÉSAR; TEIXEIRA; CANELA, 2007; DUQUE; CARVALHO, 2013; SAMUSSONE, 2014; SAÚDE, 2013). Devido ao fato dos agroquímicos serem transportados pela água os peixes e demais organismos aquáticos são excelentes bioindicadores da qualidade de um ambiente. Alevinos e adultos da espécie bagre andador (*Clarias batrachus*), expostos a diferentes concentrações de MZ em ambos os estágios de desenvolvimento mostraram alterações bioquímicas e em vias enzimáticas destes peixes, indicando que a liberação deste composto em corpos d'água pode resultar em desequilíbrio ecológico importante

(SRIVASTAVA; SINGH, 2014). Alterações na formação da notocorda e alteração das contrações musculares responsáveis pelos movimentos de peixes zebra (*Danio rerio*) expostos a ditiocarbamatos também foram observadas (TILTON et al., 2006). Sobrecarga de manganês e alteração de enzimas antioxidantes em peixes foi observada após a exposição ao Mancozebe, dados semelhantes foram observados para peixes dourados (*Carassius auratus*) quanto à alteração de enzimas antioxidantes e estresse oxidativo (ATAMANIUK et al., 2013; COSTA-SILVA et al., 2018; KUBRAK et al., 2012). Alterações no material genético e cromossomal de enguias (*Anguilla anguilla* L.) foram observadas após exposição ao EBDC (MARQUES et al., 2016).

O estudo dos efeitos da exposição ao fungicida MZ também foi avaliado em mamíferos. Células do timo de ratos expostas ao fungicida apresentaram aumento dos níveis de estresse oxidativo causado por desequilíbrio das funções mitocondriais. O mesmo estudo avaliou o efeito antioxidante do ácido ascórbico sobre as células expostas ao MZ, observando efeito protetor apenas em pequenas doses. Entretanto, nas concentrações mais altas testadas a taxa de apoptose foi aumentada (PAVLOVIC et al., 2015).

MZ induziu a formação de micronúcleos em ratos Wistar, indicando que houve alteração significativa do material genético das cobaias, bem como indução de apoptose por regulação da expressão protéica (CALVIELLO et al., 2006; GOLDONI et al., 2014). Os níveis de hormônio produzidos pela tireoide foram alterados em ratos adultos expostos, alterações no sistema nervoso central, como hemorragia e perda de movimentos também foram observadas, bem como importante toxicidade para as células da neuroglia (astrócitos) (AXELSTAD et al., 2011; DOMICO et al., 2006; KEKES-SZABO et al., 1988; MIRANDA-CONTRERAS et al., 2005; TSANG; TROMBETTA, 2007). A fertilidade de cobaias expostas foi diminuída, bem como o número de anormalidades nos órgãos reprodutivos e degeneração de células germinativas foi aumentado (KSHEERASAGAR; KALIWAL, 2003; MAHADEVASWAMI et al., 2000).

Mancozebe mostrou alguns efeitos deletérios na exposição de hepatócitos humanos, induzindo à esteatose hepática, alterando o metabolismo e induzindo o aumento de morte celular (PIROZZI et al., 2016). Em culturas de linfócitos expostos observou-se o aumento da apoptose bem como o caráter genotóxico do fungicida (SRIVASTAVA et al., 2012). O acúmulo de metais foi observado em culturas de células do cólon (HOFFMAN; TROMBETTA; HARDEJ, 2016). Estudos de caso

indicam que trabalhadores de um vinhedo expostos ao fungicida que é aplicado por pulverização apresentaram resíduos de ETU na urina, como resultado da exposição (COLOSIO et al., 2002).

Um estudo realizado com base nos relatórios de programa de monitoramento de pesticidas brasileiro indicou a presença de quantidades aceitáveis de produtos químicos em alimentos. Entretanto, o estudo chama a atenção para o potencial risco desta exposição para a população (CALDAS; TRESSOU; BOON, 2006). Estudo realizado nos Estados Unidos relacionou o nascimento de três crianças com anormalidades congênitas ao fato das mães estarem expostas a pulverização com MZ, durante o período de organogênese (CALVERT et al., 2007). Na mesma linha, o acúmulo de Mn foi observado nos cabelos e sangue de mulheres que vivem próximas a plantações de banana na Costa Rica, o que pode amparar as alterações neurológicas verificadas em crianças que vivem próximas a plantações de banana onde o MZ é pulverizado (MORA et al., 2014; VAN WENDEL DE JOODE et al., 2016). A exposição ao EBDC também indicou efeito imunomodulatório em trabalhadores expostos, inibindo a expressão de NF-KB e TNF- α que podem estar relacionadas com doenças auto-imunes (CORSINI et al., 2005, 2006).

Existem muitas evidências dos riscos da exposição ao fungicida etileno-bis-ditiocarbamato Mancozebe, bem como, a exposição ao seu principal metabólito a Etilenotiouréia (ETU) ou ainda ao metabólito sulfeto de etilenobis-(isotiocianato) (EBIS) (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2017). A degradação do composto químico fungicida vai depender do local onde ele for depositado (Figura 5). O alvo principal é a superfície foliar da planta, para que o efeito protetor do MZ possa ser instaurado e então evitar a colonização de fungos nas folhas do vegetal. Quando o Mancozebe é depositado no solo sofre biotransformação, perdurando em solos aeróbicos cerca de 48 horas e em solos anaeróbicos cerca de 8 dias (XU, 2000). Os metabólitos liberados no solo como o EBIS tem alta permanência no ambiente, sendo considerado altamente tóxico para humanos e potencialmente perigoso para o meio ambiente, categoria II (BASF, 2017).

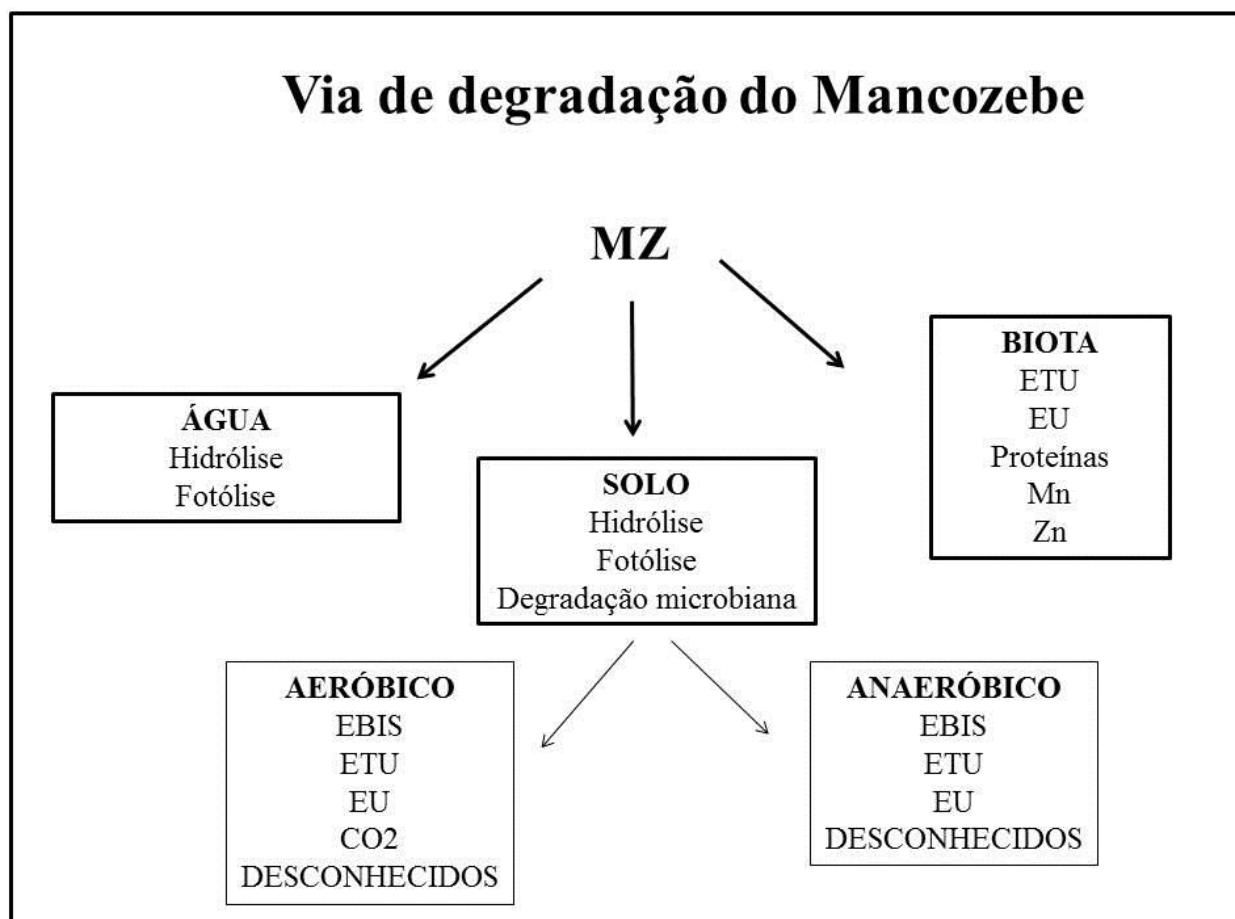


Figura 5: Via de degradação do MZ. Vias de degradação do Mancozebe.

O local onde o fungicida é depositado delimita o processo pelo qual ele é degradado e quais subprodutos são liberados. Fonte: Adaptado de (XU, 2000). EBIS: etileno-bis-isotiocianato. ETU: etileno tiouréia. EU: Etilenouréia. CO₂: dióxido de carbono. Zn: zinco. Mn: manganês.

Durante a exposição ocupacional a agroquímicos, os sintomas são comumente transitórios, como ardência nos olhos e vermelhidão na pele. Os fabricantes destes produtos aconselham lavar as regiões do corpo afetadas e procurar o hospital. Entretanto, os danos desta exposição em longo prazo podem ser alarmantes. Alguns estudos relacionam o aumento da incidência de câncer a partir da exposição a produtos químicos, como os utilizados em lavouras (CHIU et al., 2004; KUMAR; SABARWAL; SINGH, 2019; NORDBY et al., 2005; VALKO et al., 2006).

1.4 Agroquímicos e o estresse oxidativo

Um processo comum à exposição a agroquímicos é a alteração na produção de radicais livres e consequente modulação da atividade das enzimas antioxidantes. Quando a geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio superam as defesas antioxidantes celulares deflagra uma condição chamada estresse oxidativo (SIES, 2015) (Figura 6).

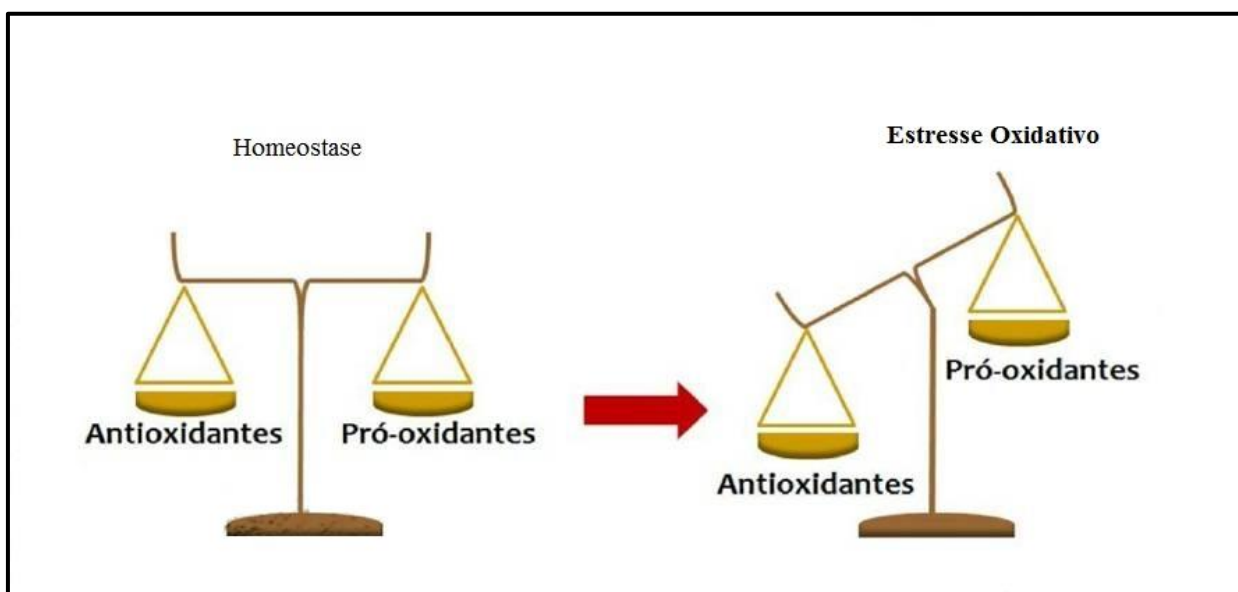


Figura 6: Estresse Oxidativo.

As defesas antioxidantes atenuam o surgimento dos radicais livres, entretanto quando este equilíbrio é quebrado surge o estresse oxidativo, que é marcado pela prevalência das espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio sobre estas defesas. Adaptado de: < <http://farmaciavivence.com.br/blog/view/id/16/estresse-oxidativo-no-exercicio-fisico.html> >. Acesso em 17 de novembro de 2019.

Os radicais livres são moléculas, átomos ou íons que possuem um ou mais elétrons livres em sua orbita externa (KUSS et al., 2005). Devido a esta característica de possuir elétrons livres ou não pareados, estas moléculas, íons ou átomos são altamente instáveis devido a esta instabilidade eletrônica, tendo relativo curto tempo de meia vida (Figura 7). Os radicais livres são altamente reativos devido à capacidade de interação com moléculas, células ou tecidos onde se encontram na tentativa de obter os elétrons que lhe faltam para a estabilidade eletrônica (DAVIES, 2000). Os radicais livres podem se associar a átomos livres como hidrogênio ou ainda com moléculas biológicas, como

proteínas, lipídeos e até mesmo o DNA (GAWEL et al., 2004; KU; SOHAL, 2014; KUMAR et al., 2012). Ao interagir com as moléculas biológicas danos podem ser observados. Estudos indicam que a ação oxidante dos radicais livres pode ser associada como o surgimento de diversas patologias incluindo o surgimento de diabetes tipo II, câncer de pele e problemas cardíacos, por exemplo, (LIU et al., 2013; NORDBY et al., 2005; REHNI; DAVE, 2018). A formação de radicais livres ocorre naturalmente nos organismos, no processo de produção de ATP pelas mitocôndrias, também nas células de defesa do organismo como os macrófagos, que produzem e liberam radicais que apresentam ação contra organismos invasores, como bactérias e fungos danificando as células invasoras.

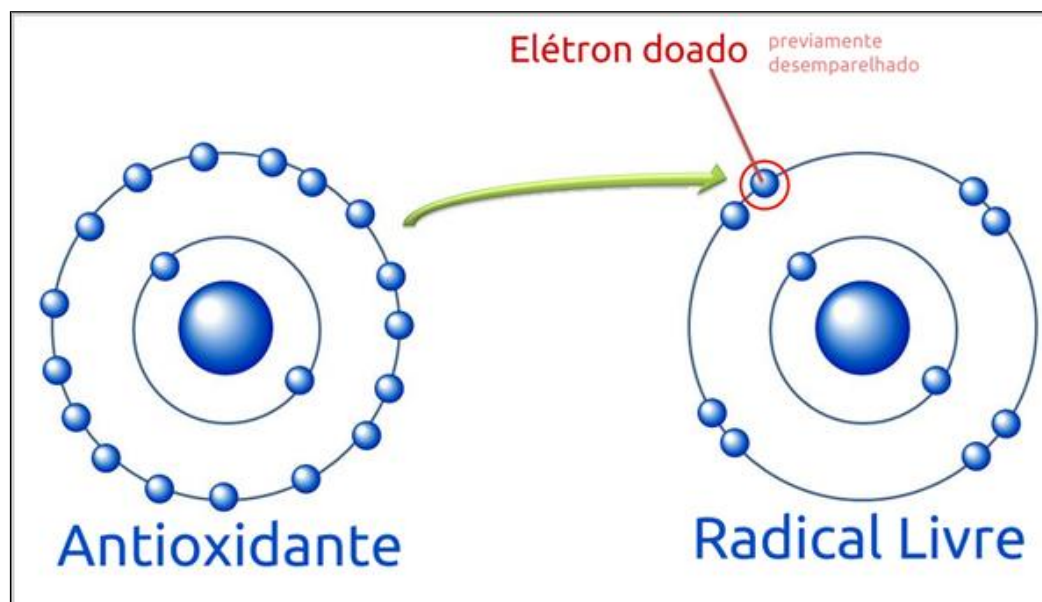


Figura 7: Formação de radical livre

Os antioxidantes doam elétrons para os radicais livres, que possuem a última camada eletrônica desemparelhada, tornando-se assim, instáveis. Ao receber o elétron doado a espécie o radical livre interrompe a atividade que desequilibra a homeostase no organismo. Adaptado de: <<https://radicaislivres97.wordpress.com/2013/05/26/introducao-aos-antioxidantes>>. Acesso em 17 de novembro de 2019.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) são representadas pelo radical ânion superóxido, hidroxila, peroxinitrito e óxido nítrico (PISOSCHI; POP, 2015). Estas moléculas ocorrem normalmente no organismo, sendo essenciais para a sinalização celular, além de participarem de processos fisiológicos como o envelhecimento e estarem envolvidos na etiologia do câncer, doenças neurodegenerativas, como o mal de Parkinson e a doença de Alzheimer (FLEMING;

REVEILLAUD; NIEDZWIECKI, 1992; PETRONILHO; PINTO; VILLARA, 2011; SCIALÒ et al., 2016; UTTARA et al., 2009; VALKO et al., 2006).

Radicais livres são gerados em processos biológicos aeróbicos como a respiração celular bem como decorrentes de exposição a agentes químicos como agroquímicos, radiação UV e poluição. Espécies reativas de oxigênio podem atuar como sinalizadores celulares, empregados em processos de expressão gênica, proliferação celular, apoptose ou desencadeando fatores de transcrição como o NF-KB e o Nrf2 (MA, 2016; PI et al., 2008; RODRIGUES et al., 2015; SANT et al., 2017; SIES, 2017; VAZIRI, 2012). Em processos aeróbicos que utilizam oxigênio para oxidar carbono e hidrogênio presentes em biomoléculas para produzir energia, o oxigênio é reduzido em uma série de espécies intermediárias, como: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($OH\bullet$).

A formação de EROs surge primeiramente com a formação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que pode ser dismutado pela ação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou ser catalizado pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). A enzima superóxido dismutase pode ser encontrada sob duas formas básicas no organismo, a primeira é a CuZnSOD presente no citoplasma das células, esta enzima é cobre-zinco-dependente. A segunda é encontrada nas mitocôndrias, a MnSOD, manganês-dependente. A SOD é a enzima mais abundante no organismo humano e a quinta proteína em abundância (ORR et al., 2003; REDDI et al., 2009; SANZ, 2016; SCHIFFRIN, 2008; ZOU et al., 2017) (Figura 8).

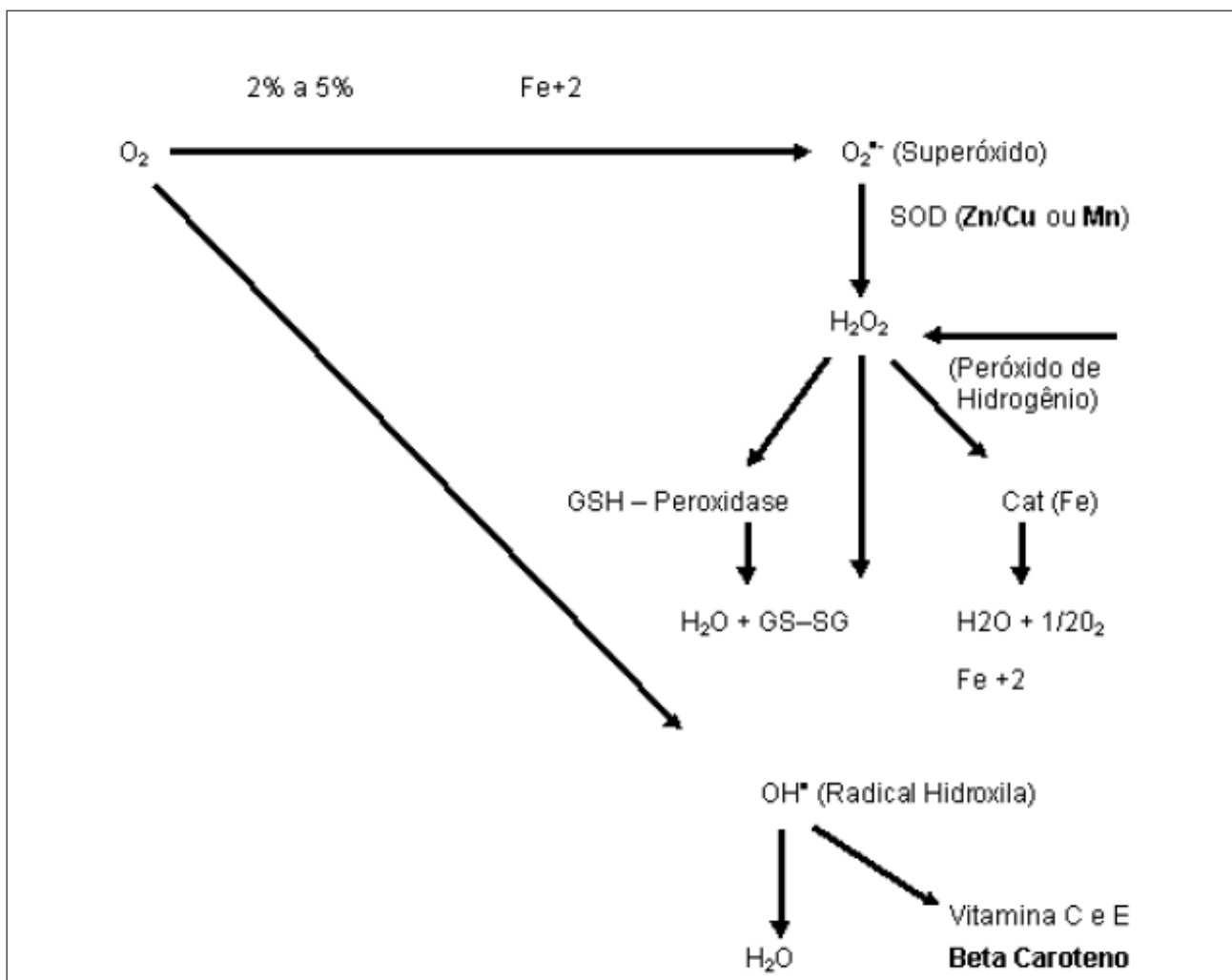


Figura 8: Processos de formação de EROs

As espécies reativas de oxigênio são reduzidas em produtos menos tóxicos para as células, buscando eliminar o agente causador de possíveis danos. Adaptado de: KUSS et al., 2005. SOD – Superóxido dismutase, Cat: Catalase, O_2^- : Superóxido, O_2 : Oxigênio, GSSH: Glutaciona Oxidada, GSH: Glutaciona Peroxidase, H_2O : Água, OH^\bullet : Radical Hidroxila, GSH: Glutaciona Reduzida, H_2O_2 : Peróxido de Hidrogênio.

O radical superóxido se forma a partir da redução de O_2 por um único elétron, reações univalentes subsequentes convertem o O_2 em H_2O_2 na reação de redução tetravalente do oxigênio. Então, depois de sofrer protonação o O_2^- , forma o radical peroxila (HO_2^\bullet) uma ERO mais reativa do que o superóxido (GLASAUER; CHANDEL, 2013). A dismutação do O_2^- a H_2O_2 é feita pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 participa da formação de OH^\bullet , sendo também capaz de inativar a enzima por oxidação dos seus grupamentos tiol, bem como interagir com moléculas através da interação com as pontes dissulfeto (SIES, 2017).

O H_2O_2 é produzido nas membranas celulares pela ação das NADPH oxidases (NOXs). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é gerado a partir da geração de superóxido. O H_2O_2 é capaz de produzir radicais altamente reativos como resultado da interação com íons metálicos como o Ferro (Fe) ou podendo ser diretamente inativado pela enzima catalase (CRAWFORD; DAVIES, 1994; THOMAS et al., 2009). Dentre estes, o radical hidroxila é altamente reativo sendo responsável por danos oxidativos em moléculas biológicas como o DNA, proteínas e lipídeos (HALLIWELL, 1989; THOMAS et al., 2009). A enzima Catalase é responsável em primeira linha pela eliminação do H_2O_2 , convertendo duas moléculas de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. O óxido nítrico está entre as raras moléculas sinalizadoras biológicas em forma gasosa, responsável por vasodilatação e neurotransmissão (NAPPI et al., 2000; PENNA; ANGOTTI; PAGLIARO, 2014; PRAUCHNER, 2017; SCHIFFRIN, 2008). Quando reagem com o superóxido formam o peroxinitrito que é um importante agente oxidante.

Outra enzima importante para a biotransformação e eliminação de compostos tóxicos do organismo é a glutathiona (GSH). A maior parte das reações que envolvem a GSH está relacionada com os grupamentos sulfidrilas (SH) que são altamente polarizáveis, sendo que a biossíntese da GSH ocorre no meio intracelular (OLSVIK et al., 2005). A habilidade de doar elétrons confere a esta enzima um importante papel redutor. Existem diferentes tipos de glutathionas, como as Glutathiona peroxidase (GPx) que remove o H_2O_2 de forma indireta da célula, utilizando-o como substrato para a oxidação da glutathiona reduzida (GSH) (Figura 9). A GPx também interage com peróxidos orgânicos, compostos celulares como ácidos graxos constituintes de membranas celulares. A GSH, além de ser cofator para a ação das GPx, atua inibindo a oxidação dos grupamentos -SH, auxiliando a manutenção do estado redox no meio intracelular, podendo atuar como antioxidante frente ao $OH\cdot$ e O_2 (SOHAL; SOHAL; BRUNK, 1990). A Glutathiona redutase (GR) catalisa a conversão de GSSG em GSH, mantendo a razão entre a forma reduzida e a oxidada. A Glutathiona é convertida pela glutathiona oxidase (GO) em Glutathiona dissulfeto (GSSG), trata-se de uma enzima FAD-dependente, que também oxida outros aminotióis (PAGANO, 2002). A Glutathiona-S-transferase (GST) catalisa a GSH em compostos que apresentem átomos de carbono, enxofre e nitrogênio.

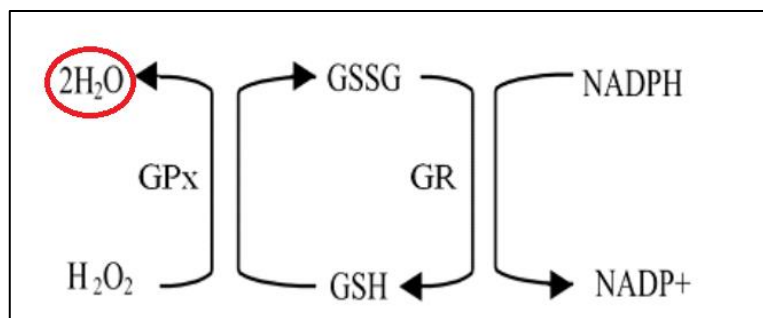


Figura 9: Sistema antioxidante enzimático

Neste esquema são mostrados os efeitos da glutatona em seus diferentes tipos. GR: glutatona redutase. GPx: Glutaciona peroxidase. GSH: Glutaciona reduzida. GSSG: Glutaciona oxidada. H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio. NADPH: Fosfato de nucleotídeo de adenina e nicotinamida. NADP^+ : Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida. Adaptado de: BOAS BALIEIRA, 2017. Acesso em 17 de novembro de 2019.

Os mecanismos de ação celulares contra os danos oxidativos causados pelas EROs e ERNs podem ser enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático de defesa é composto pelas enzimas Glutaciona, catalase e superóxido dismutase. Os não enzimáticos referem-se primeiramente ao mecanismo de reparo celular que removem as moléculas biológicas com algum defeito antes que estas sejam incorporadas pelo organismo. Em sua maioria são exógenos como as vitaminas A, C e E, carotenóides e os compostos fenólicos (MONGI et al., 2011; SINGH; BANO; MOHANTY, 2016). A vitamina A ou retinol é capaz de quelar algumas espécies reativas de hidroxilas e dióxido de nitrogênio, inibindo a peroxidação lipídica, bem como a ação de compostos fenólicos, como os carotenoides (KOSTYUK; POTAPOVICH, 1989). A vitamina C ou ácido ascórbico pode reagir com o superóxido e espécies reativas não radicais, interferindo na disponibilidade do óxido nítrico. Os tocoferóis, como a vitamina E são considerados os principais antioxidantes lipossolúveis, biologicamente ativos (SINGH; BANO; MOHANTY, 2016). Por apresentarem característica lipossolúvel pode ser armazenado no interior de membranas e ser transportado por lipoproteínas, principalmente as de baixa densidade como o LDL, o colesterol considerado ruim por se acumular nas paredes dos vasos causando aterosclerose e posteriores cardiopatias (LIU et al., 2013).

1.5 A mosca da fruta como modelo experimental

A *Drosophila melanogaster* é um inseto díptero, membro da família Drosophilidae, comumente conhecida como mosca da fruta, mosca da banana, mosca do vinagre entre outros nomes comuns. Entretanto esta denominação popular não faz jus a este díptero, visto que não causam prejuízo na produção de frutas, como ocorre com outros tipos de moscas. A *D. melanogaster* se alimenta de leveduras que colonizam frutas em decomposição e da polpa destes vegetais. As moscas da fruta foram introduzidas para uso em laboratório no início do século vinte (1910) pelo pesquisador Thomas Hunt Morgan, que em 1933 ganhou o prêmio Nobel por estudar em moscas da fruta uma mutação genética responsável por olhos brancos a partir do cruzamento de moscas de olhos vermelhos e a sua associação com o sexo das moscas (MOORE, 1986; MORGAN, 1910; WILSON, 1986). Desde então as drosófilas são amplamente estudadas em diversas áreas, entre estas a área toxicológica, tornando-se um modelo conveniente para análise de efeitos tóxicos de compostos sobre parâmetros bioquímicos e padrões comportamentais.

As drosófilas são comumente utilizadas para estudar genes relacionados a doenças em humanos, principalmente as de caráter neurodegenerativo como Parkinson e Alzheimer (CLARKE, 2007; COULOM; BIRMAN, 2004; UTTARA et al., 2009). O genoma da *D. melanogaster* foi sequenciado completamente (ADAMS et al., 2000). Possui 3 cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais, o genoma total tem 183 Mb, com aproximadamente 13.639 genes. Os machos possuem pigmentação escura na porção terminal do abdômen, enquanto as fêmeas apresentam o abdômen listrado (Figura 10). A *D. melanogaster* apresentam ciclo de vida de curto período, vivendo em média 36 dias, apresentam fase de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 11).



Figura 10: Mosca da fruta

Diferenciação fenotípica em moscas macho (direita) e fêmea (esquerda). Disponível em: <<https://www.naturepl.com/stock-photo-fruit-fly-drosophila-melanogaster-female-left-and-male-right-image01559729.html>> Acesso em 12 de novembro de 2019.

Ciclo de vida da mosca da fruta

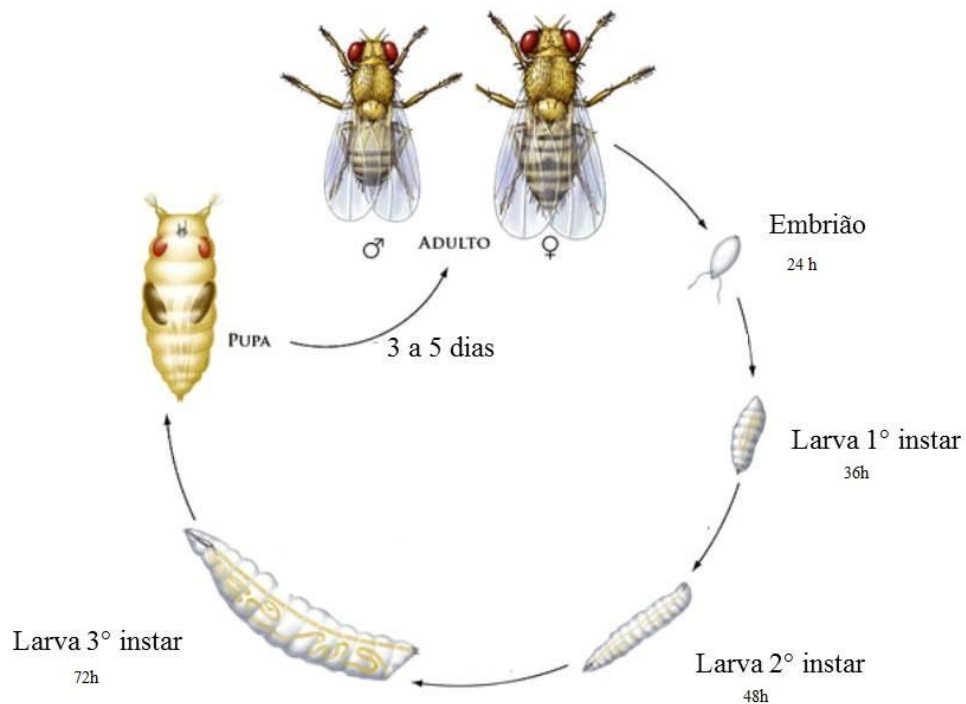


Figura 11: Ciclo de vida da mosca da fruta

Ciclo de vida da *Drosophila melanogaster*, todas as fases representadas, mostrando a modificação gradual do inseto desde o ovo até o indivíduo adulto. Modificado a partir de: <<https://www.naturepl.com/stock-photo-fruit-fly-drosophila-melanogaster..html> >. Acesso em 12 de novembro de 2019.

Os ovos medem em geral 0,5 mm de comprimento, revestido externamente por uma membrana, denominado córion, que forma dois filamentos que saem da porção dorsal do ovo, impedindo que o mesmo afunde no meio que é utilizado para alimentação futuramente. O desenvolvimento completo do embrião é concluído em cerca de 24 horas, em condições de temperatura e luminosidade ideais. A fase de embrião termina com a eclosão de uma larva, iniciando um novo estágio de vida, a fase larval. As larvas apresentam três diferentes estágios de desenvolvimento, caracterizados por modificações no exterior do corpo (COHEN; WIMMER; COHEN, 1991). Os estágios são denominados “Instar”, o primeiro instar (estágio) contém larvas, recém-eclodidas que apresentam corpo liso e com função basicamente de buscar alimento, adquirindo reserva energética para a modificação do corpo, esta fase dura em média 24 horas (STORELLI et al., 2018). O segundo instar inicia a partir de 24h até 72 horas, estas larvas também buscam alimento e se movimentam com muita facilidade, formando caminhos no meio de cultura onde se alimentam. Estas formações mostram o estado saudável do indivíduo, que quanto mais à distância percorrida, maior a capacidade de forrageio, logo mais saudável se apresentam. As larvas começam a apresentar segmentos no exterior do corpo, onde mais tarde serão formadas as partes de um indivíduo adulto. O terceiro instar ocorre depois de 72 horas da eclosão do ovo, nessa fase a segmentação do corpo larval é nítida, as larvas já não apresentam mais interesse por alimento, buscando agora um lugar para realizar o último estágio, a forma de pupa (LEE et al., 2008). A empupação ocorre em local seco, geralmente a larva migra para um ponto mais alto, longe do meio de alimentação, para evitar perturbações e poder realizar o processo completo, que termina com a saída do indivíduo adulto. A coloração da mosca jovem não é a coloração padrão das moscas, apresenta-se mais clara. A reprodução pode começar a ocorrer 8 horas após a eclosão.

Considerando as características apresentadas adicionadas ao baixo custo de manutenção, as drosófilas tornam-se um modelo interessante para avaliar a toxicidade de compostos químicos como o Mancozebe para efeitos em humanos, bem como em insetos polinizadores.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Verificar os efeitos da exposição de *Drosophila melanogaster* a diferentes concentrações de Mancozebe em período prolongado sobre as defesas antioxidantes, expressão gênica, bioenergética e alterações fenotípicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Buscando contemplar o objetivo principal deste trabalho, os objetivos específicos deste estudo compreendem:

- Avaliar alterações comportamentais (locomotoras) e taxa de sobrevivência de *Drosophila melanogaster* por até 15 dias de exposição ao MZ.
- Observar a ação do Mancozebe sobre a peroxidação lipídica e o sistema antioxidante do modelo adotado, analisando a atividade das enzimas Catalase, Glutathione S-Transferase e Superóxido dismutase de *D. melanogaster* expostas ao agroquímico.
- Verificar a produção de espécies reativas de Oxigênio e níveis de nitrito, após a administração do agroquímico em *D. melanogaster*.
- Avaliar a expressão dos genes CAT, SOD, GST, NRF2 e HSP 70 e HSP 83;
- Dosar a concentração de Manganês nas moscas;
- Analisar a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial em *D. melanogaster* após exposição ao Mancozebe.
- Avaliar os níveis de Glicose, Trealose, glicogênio e triglicerídeos, bem como de proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos.

3. DESENVOLVIMENTO

O Desenvolvimento desta tese está apresentado sob a forma de um artigo e um manuscrito. Os itens materiais e métodos, resultados, discussão e referências encontram-se nos já citados trabalhos, os quais estão estruturados de acordo com as normas de cada revista onde foram publicados ou submetidos, respectivamente.

3.1 ARTIGO 1

Exposição de *Drosophila melanogaster* a Mancozebe induz o dano oxidativo e modula Nrf2 e HSP70/83

Exposure of *Drosophila melanogaster* to Mancozeb induces oxidative damage and modulates Nrf2 and HSP70/83

Miriane Acosta Saraiva, Eduardo da Rosa Ávila, Gustavo Felipe da Silva, Giulianna Echeverria Macedo, Nathane Rosa Rodrigues, Patrícia de Brum Vieira, Mariele Samulel Nascimento, Rochele Sogari Picoloto, Illana Kemmerich Martins, Nelson Rodrigues de Carvalho, Jeferson Luis Franco and Thais Posser



Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2018,
DOI ://doi.org/10.1155/2018/5456928



Research Article

Exposure of *Drosophila melanogaster* to Mancozeb Induces Oxidative Damage and Modulates Nrf2 and HSP70/83

Miriane Acosta Saraiva,¹ Eduardo da Rosa Ávila,¹ Gustavo Felipe da Silva,² Giuliana Echeverria Macedo,¹ Nathane Rosa Rodrigues,¹ Patrícia de Brum Vieira,³ Mariele Samuel Nascimento,⁴ Rochele Sogari Picoloto,⁴ Ilana Kemmerich Martins,¹ Nelson Rodrigues de Carvalho,⁵ Jeferson Luis Franco¹ and Thais Posser¹

¹Oxidative Stress and Cell Signaling Research Group, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, 97300-000 São Gabriel, RS, Brazil

²Departamento de Medicina-Núcleo de Saúde, Universidade Federal de Rondônia, 76801-059 Porto Velho, RO, Brazil

³Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia (CIPBIOTEC), Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, 97300-000 São Gabriel, RS, Brazil

⁴Departamento de Química (DQ), Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

⁵Instituto Federal Farroupilha, Campus Santo Ângelo, 98806-700 Santo Ângelo, RS, Brazil

Correspondence should be addressed to Thais Posser; thaisposser@unipampa.edu.br

Received 21 February 2018; Revised 9 May 2018; Accepted 31 May 2018; Published 5 July 2018

Academic Editor: Seon-Heui Cha

Copyright © 2018 Miriane Acosta Saraiva et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Mancozeb (MZ), a manganese- and zinc-containing ethylene-bis-dithiocarbamate, is a broad-spectrum fungicide. Harmful effects of this fungicide have been reported in nontarget organisms via a not fully understood mechanism. *Drosophila melanogaster* has provided remarkable contributions for toxicological studies. This work was aimed at evaluating the biochemical targets and implication of oxidative stress in MZ-mediated toxicity in drosophilas. Exposure of flies for fifteen days to MZ at 5 and 10 mg/mL through the diet impaired locomotor performance and induced fly mortality. In parallel, it caused lipid peroxidation and reactive oxygen species (ROS) formation and Mn overload. MZ inhibited superoxide dismutase and induced catalase and glutathione S-transferase activities. Nitric oxide and reduced glutathione levels were significantly decreased by MZ. Heat shock proteins (HSP70 and HSP83) and Nrf2 mRNA levels were significantly augmented in MZ-exposed flies. Our study reinforced the use of *Drosophila melanogaster* as a reliable model for the study of biochemical targets of pesticides, and based on our data, MZ induced oxidative damage and Mn accumulation in a concentration-dependent manner. An adaptive cellular state was induced by the lower concentration of pesticide, possibly contributing to the slighter damage observed.

1. Introduction

Mancozeb (manganese/zinc ethylene-bis-dithiocarbamate) is a broad-spectrum contact fungicide (MZ) that has been widely used in agriculture for controlling fungal infections in different crops such as soybean, tobacco, and ornamental plants [1]. MZ is categorized as mildly toxic for vertebrates; however, evidence from animal experimentation reported neurotoxicity, genotoxicity, and endocrine dysfunctions

associated with exposure to this compound. MZ induced chromosomal aberrations and caspase activation in cultured human lymphocytes [2]; alteration in amino acid content in cerebellum and lower locomotor activity in pups exposed prenatally to MZ were reported [3]. Adult rats treated for prolonged periods with MZ presented hepatotoxicity and DNA damage with an augmented frequency of micronuclei [4, 5]. Deleterious effects of mancozeb were visualized in invertebrates as well, reducing the lifespan of butterflies

and causing developmental defects [6]. Additionally, MZ decreased body and progeny and induced leg paralysis in fruit flies [7].

Mechanisms of action contributing to toxicological effects of MZ to vertebrates are not fully known, but the main line of evidence points to oxidative stress playing a significant role in MZ toxicology. Oxidative stress arises from an imbalance between reactive oxygen species (ROS) levels and cellular antioxidant defense systems able to neutralize them [8]. This condition may lead to oxidative damage to biomolecules such as proteins, lipids, and nucleic acids [9] and is implicated in the etiology of several diseases, such as tumors and neurodegenerative disorders [10–12]. A possible cause of the increment of ROS levels by MZ is the inhibition of the mitochondrial complexes activity, resulting in an inefficient transfer of electrons, leading to the formation of oxygen radicals [13, 14]. Also, induction of NADPH oxidase and xanthine oxidase by MZ leading to augmented H_2O_2 has been reported [15], and modulation of antioxidant enzyme activity, as published recently by our research group, has been reported in carp brain [16].

One potential mechanism by which MZ induces oxidative stress may be attributed to the chelating properties of these class of compounds toward transition elements in the structure of proteins leading to the formation of complexes and resulting in an inhibitory action, as reported for SOD [17].

Flies are considered a very sophisticated and complex model organism in scientific research. The adult flies have structures that share equivalent functions to the mammal's heart, lung, kidney, gut, and reproductive tract. Furthermore, flies display complex behaviors as circadian rhythms, learning, memory, and feeding among others. Likewise, the responses of flies to different drugs are very comparable with that observed in mammals providing an attractive alternative model in pharmacology and toxicology. Therefore, although evolutionarily distant, conserved aspects of biology and physiology position the fruit flies as a valuable tool in the description of mechanisms implied in chemicals toxicology [18–20].

This study is aimed at investigating the effects from consumption of MZ through the diet on survivorship; locomotor performance; and biochemical parameters as oxidative stress; modulation of activity; and mRNA levels of antioxidant enzymes, HSPs, and Nrf2 in fruit flies. Our results extend the knowledge on the biochemical action of MZ and reinforce the use of drosophilas in toxicological studies.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents. Dimethylsulfoxide, quercetin, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), acetylcholine iodide, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA), Folin-Ciocalteu, HEPES minimum 99.5% titration, 2,4,6-tris(2-pyridyl)-5-triazine (TPTZ), resazurin sodium salt, albumin from bovine serum (BSA), sucrose, reduced glutathione, tetramethylethylenediamine, and quercetin were purchased from Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brazil). DNase I Amplification Grade, SYBR Select Master Mix, and TRIzol were obtained from Life Technologies; iScript

cDNA Synthesis kit was obtained from Biorad (CA, USA). Griess reagent system and Caspase-Glo 3/7 and caspase 9 were purchased from Promega (WI, USA). Mancozeb (80% purity, Enzeb 800 WP) was purchased from Sabero Organics America SA (Belo Horizonte, MG, Brazil). All other reagents were commercial products of the highest purity grade available.

2.2. *Drosophila* Culture and Procedures. Wild-type *Drosophila melanogaster* (Harwich strain) was obtained from the National Species Stock Center, Bowling Green, OH, USA. The flies were cultured under controlled temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 12h dark-light photoperiod, and 50–60% relative humidity. The standard commeal diet was composed of 39% cereal flour, 32% corn flour, 14% glucose, 2% powdered milk, 1% salt, 10% distilled water, and 1% antifungal agent (Nipagin®) and supplemented with 1% dried yeast as previously described by Macedo et al. [21].

2.3. Exposure of Flies to Mancozeb. Adult male fruit flies 2 days posteclosion were exposed to different concentrations of MZ (0, 5, and 10 mg of commercial MZ powder per mL of standard diet) for 15 days in polypropylene vials. Each vial contained 60 individuals. The concentrations of mancozeb used in this study were based on the field rate dilution recommended by the manufacturer (Sabero Organics America SA, Brazil) for fruit crops. This concentration is also by the recommendation of the United States Environmental Protection Agency [1]. Other studies have chosen a similar concentration to test the effect of mancozeb on worms [22].

2.4. Mortality and Locomotor Performance Assay. For mortality curve, the number of dead flies was registered daily for up to 15 days. The mobility assay was assessed by the Negative Geotaxis Test [23] at 7, 10, and 15 days of exposure. In brief, 6 groups of 10 flies per treatment were immobilized on ice for 1 minute and placed on glass tubes. After recovery, flies were gently tapped to the bottom of the glass column, and the number of flies that reach 5 cm of the column (top) was counted. Each group of flies was tested three times at 1-minute intervals.

2.5. Resazurin Reduction Assay. The conversion of resazurin to a fluorescent compound was used as a general index of metabolic activity [24]. For this test, twenty flies were homogenized in 1 mL of 20 mM Tris buffer, pH 7.0, and centrifuged at $1000 \times g$ for 10 minutes at 4°C . The supernatant was incubated in an ELISA plate containing buffer and 0.2 mg/mL resazurin for 4h. The fluorescence was read in a multimode EnsPire® reader (Perkin Elmer 2300, Waltham, MA) at an excitation wavelength of 573 nm and emission of 584 nm. Results were expressed as percent fluorescence arbitrary units (mean \pm SEM).

2.6. Caspase 3/7 and 9 Activity. To evaluate caspase activity, groups of twenty flies were homogenized in 20 mM HEPES buffer, pH 7.0, centrifuged at $2000 \times g$ for 1 minute at 4°C . The supernatant was used to quantify the caspase 3/7 and 9 using commercial kits (Apo-one homogeneous

caspace 3/7 assay[®] and Caspase-Glo[®]; Promega, Madison, WI). The results were expressed as fluorescence/luminescence arbitrary units (mean \pm SEM).

2.7. Determination of Arbitrary Steady-State ROS Levels and Nitric Oxide. The fluorescent dye 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) was used to determine the arbitrary steady-state ROS level. After 15 days of treatment, twenty flies were homogenized in 20 mM Tris buffer, pH 7.0. The homogenate was centrifuged at 1600 \times g for 10 minutes at 4°C, and the supernatant was removed for quantification of 2,7-dichlorofluorescein fluorescence as previously described by Pérez-Severiano et al. [25] and was monitored after one hour at 488_{nm}/530_{nm} excitation/emission in a multimode reader. The results were expressed as arbitrary fluorescence units (mean \pm SEM). Nitric oxide was evaluated by the measurement of nitrite (NO₂⁻) levels using the Griess reagent system protocol (Promega[®] Madison, WI). Briefly, supernatants were distributed to 96-well plates in triplicates in the presence of a Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, and 5% H₃PO₄). After incubation at room temperature, the optical density (OD) was read at 540 nm using a multimode reader. The NO₂⁻ concentration was calculated from a standard curve generated with the nitrite standard ranging from 0 to 100 μ M.

2.8. Malondialdehyde (MDA) Quantification. The determination of MDA was played by HPLC using a Shimadzu Prominence UFLC with LC-6AD contained absorbance detector UV SPD-20AV. The software LC Solution was applied for analyzing retention time, chromatograms, and its evaluation. The column utilized was reverse phase Kromasil[®] C18 (250 mm \times 4.6 mm, d.i.; 5 μ m). To prepare the samples, twenty male flies were homogenized in a bead-based PowerLyser[®] homogenate with 150 μ L of 0.5 M HClO₄ and 150 μ L of distilled water, and the homogenate was centrifuged (10,000 \times g for 10 minutes at 4°C). The supernatant was injected into the HPLC as described by Karatas et al. 2002 [26], with minor modifications. The flux was modified to 0.8 mL/min⁻¹ with average time retention of 3.528 minutes. The heads of flies were previously removed to avoid the interference of eye pigments with MDA absorbance. Results were expressed as μ g/mL (mean \pm SEM).

2.9. Determination of Thiol Levels. The measurement of thiol levels was performed by the reaction of -SH group-containing species present in the cells with O-phthalaldehyde as described by Hissin and Hilf [27]. For this technique, 20 flies were homogenized in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 5 mM EDTA and 5% phosphoric acid and then centrifuged at 100,000 \times g in an ultracentrifuge (HITACHI CP-100WX), for 30 min at 4°C. The supernatant was incubated in the presence of 1 mg/mL O-phthalaldehyde. The fluorescence was measured at 350_{nm}/420_{nm} excitation/in a multimode plate reader.

2.10. Enzyme Activity Assay. Twenty flies were homogenized in 20 mM HEPES, pH 7.0, and centrifuged for 1000 \times g for 5 minutes at 4°C. A supernatant aliquot was separated for

acetylcholinesterase (AChE) activity assay according to Ellman [28]. The remaining supernatant was centrifuged at 20,000g for 30 min at 4°C to measure the activity of catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), and superoxide dismutase (SOD). The CAT activity was determined following the clearance of H₂O₂ at 240_{nm} in a reaction media containing 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, 0.5 mM EDTA, 10 mM H₂O₂, and 0.012% Triton X100 as described by Aebi [29]. The GST activity was measured based on the GST-driven reaction of GSH with the substrate 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), leading to the formation of a complex of CDBN and GSH at 340 nm according to Habig and Jakoby [30]. The mixture was composed of 100 mM phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM EDTA, 1 mM GSH, and 2.5 mM CDBN. The assay for SOD activity quantification consists of the inhibition of superoxide-driven oxidation of quercetin by SOD at 406_{nm} according to Kostyuk and Potapovich [31]. The reaction system consisted of 25 mM phosphate buffer, pH 10, 0.25 mM EDTA, 0.8 mM TEMED, and 0.05 μ M quercetin. The enzymatic activities were calculated in milliunits per milligram of the total protein content, which was quantified by Bradford assay [32] using bovine serum albumin (BSA) as the standard. Results are expressed in % relative to the control group.

2.11. Metal Content. For verification of metal levels in *D. melanogaster*, male flies until 48 hours post-eclosion were exposed for fifteen days at two different MZ concentrations (5 mg/mL and 10 mg/mL). After the exposition, two hundred flies per group including the control were washed three times with distilled water abundantly and dried out for 90 minutes at 37°C. After this process, an inductively coupled plasma optical emission spectrometer (Optima 4300 DV, PerkinElmer, USA) with axial view configuration was used for the determination of calcium (Ca), copper (Cu), iron (Fe), potassium (K), magnesium (Mg), manganese (Mn), sodium (Na), phosphorus (P), sulfur (S), and zinc (Zn). Argon (99.998%, White Martins-Praxair, Brazil) was used for plasma generation, nebulization, and auxiliary gas. The operational conditions were set according to work described previously by Muller et al. [33]. The metal content was expressed relative to the weight of samples used for analysis (μ g metal/g of dried weight sample). Before determination, flies were digested in closed vessels by the work described by Bizzi et al. [34]. Samples (approximately 60 mg) were transferred directly into the closed quartz vessels, and 6 mL of nitric acid 2 mol·L⁻¹ was added. After closing the vessels, and capping of the rotor, each vessel was pressurized with oxygen at 7.5 bar. Then, the rotor was placed inside a microwave oven (Multiwave 3000 Microwave Sample Preparation System, Anton Paar, Graz, Austria). The system was equipped with eight high-pressure quartz vessels (80 mL, maximum pressure and temperature of 80 bar and 280°C, resp.). The microwave-heating programs used were (a) 1000 W, with a ramp of 5 min; (b) 1000 W for 10 min; and (c) 0 W for 20 min (cooling step). The pressure and temperature were monitored in each vessel during the run. The resultant solutions were diluted with water up to 25 mL.

in volumetric flasks. After each run, vessels were cleaned using 6 mL of concentrated HNO_3 , and the microwave programs were 1400 W for 10 min and 0 W for 20 min (cooling), and after, vessels were also rinsed with water. Three readings were averaged to give one value per biological replicate and expressed as a mean \pm standard deviation of the mean (SD). Metal levels were expressed relative to the weight of flies used for analysis (μg metal/g of dried weight tissue).

2.12. Relative Steady-State Level of mRNA. The profile of the relative steady-state level of specific mRNA in response to the treatments was performed by the polymerase chain reaction from the reverse transcriptase (RT-qPCR). Around $1\ \mu\text{g}$ of the total RNA from 20 adult male flies was extracted using the TRIZOL Reagent (Invitrogen®, CA, EUA) according to the manufacturer's protocol. The relative steady-state level of mRNA of GPDH, HSP70, HSP83, CAT, SOD, and Nrf2 (Table 1) was analyzed. The total RNA was treated with DNase I (DNase I Amplification Grade—Invitrogen CA, EUA), and cDNA was produced with iScript cDNA Synthesis Kit. Quantitative real-time polymerase chain reaction was performed according to what was previously described by Macedo et al. [21].

2.13. Statistical Analysis. Lifespan measurement was determined by comparing the survival curves with a log-rank (Mantel-Cox) test. Another statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey's posthoc test. Differences were considered significant between groups at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Mancozeb Exposure Reduces the Lifespan of *D. melanogaster* and Impairs Locomotor Performance. To evaluate the effects of MZ in fruit flies, we have determined the mortality curve and locomotor performance (Figures 1(a) and 1(b), resp.). After 15 days of exposure, MZ caused 80% of mortality at highest concentration (10 mg/mL) and 53% of mortality to intermediate concentration (5 mg/mL). At the 7th day of exposure, the impairment in locomotor deficits was visualized at 5 and 10 mg/mL ($P < 0.0001$). This effect was intensified over time, and after 15 days of exposure to the highest concentrations, surviving flies were totally unable to climb and remained at the base of the tube (Figure 1(b)). All the biochemical assays were performed after 15 days of MZ. This period of treatment was chosen because the most significant effects on fly mortality were observed after 15 days; moreover, the manufacturer (Sabero Organics America SA, Brazil) recommends the field reapplication of intervals of 15 days after the first application, totalizing 4 applications per cycle.

3.2. Cell Viability and Caspase 3/7 and 9 Activity. A reduction of 12% ($P < 0.0001$, $F = 13.99$) in the cellular viability by Resazurin reduction assay was observed, at a concentration of 10 mg/mL after 15 days of treatment (Figure 2(a)). The treatment with MZ did not alter significantly the activity

TABLE 1: Genes analyzed by quantitative real-time RT-qPCR in *D. melanogaster* exposed to MZ.

Genes	Primer sequences
GPDH	Left 5'-ATGGA GATGATTCGCTTCGT
	Right 5'-GCTCCTCAATGGTTTTTCCA
Catalase	Left 5'-ACCAGGCATCAAGAATCTG
	Right 5'-A ACTTCTTGGCCTGCTCGTA
HSP70	Left 5'-GCTGACGTTCCAGGATCCAT
	Right 5'-CGGAGTCTCCATTGAGGTGT
HSP83	Left 5'-CAAATCCCTGACCAACGACT
	Right 5'-CGCACGTACAGCTTGATGTT
Nrf2	Left 5'-CGTGTGTTTACCTCGGACT
	Right 5'-AGCGCATCTCGAACAAGTTT
Superoxide dismutase	Left 5'-GGAGTCGGTGATGTTGACCT
	Right 5'-GTTCCGGTGACCAACCAATG

of caspase 3/7 and 9 ($P = 0.1730$, $F = 2,146$ and $P = 0,051$, $F = 5,919$, resp.) (Figures 2(b) and 2(c)).

3.3. Lipid Peroxidation, ROS, and NO Levels in Response to MZ Exposure. Lipid peroxidation was quantified in the whole-body homogenate of flies by MDA quantification (Figure 3(a)). The highest concentration of MZ induced a fourfold increase in MDA content ($P < 0,0001$, $F = 236,6$). In parallel, the ROS levels in fly homogenate were investigated (Figure 3(b)). A reactive species was produced by MZ treatment from 5 mg/mL (58%), whereas the NO amount quantified by nitrite levels (NO_2^-) was 59% and 47% lower than the control group at concentrations of 5 and 10 mg/mL, respectively ($P < 0,0001$, $F = 139,1$) (Figure 3(c)).

3.4. Antioxidant Enzyme Activity and GSH Levels in Flies Exposed to MZ Treatment. The enzymes catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), and superoxide dismutase (SOD) and levels of reduced glutathione (GSH) were evaluated. The treatment with MZ stimulates CAT activity in 170% at 5 mg/mL and 300% at 10 mg/mL ($P < 0,0001$, $F = 87,59$) (Figure 4(a)). GST activity was increased by 100% and 154% at 5 mg/mL and 10 mg/mL, respectively ($P < 0,0001$, $F = 16,76$) (Figure 4(b)). In contrast, the activity of SOD was inhibited by 66% only at the highest concentration (10 mg/mL) of MZ (Figure 4(d)) without alteration in the lower concentration ($P < 0,005$, $F = 41,35$). Thiol levels were 33% lower than those in the control group in both concentrations analyzed ($P < 0,0001$, $F = 64,43$) (Figure 4(c)).

3.5. Measurement of Metal Levels in Response to MZ in *D. melanogaster*. Levels of Mn and other essential metals were evaluated by inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICPOES). Our results showed a concentration-dependent increase in Mn levels (0.11 and

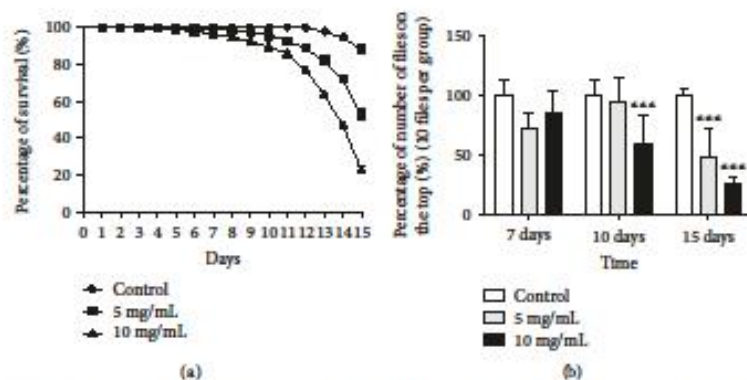


FIGURE 1: Effects of MZ exposure on survivorship, negative geotaxis. (a) The number of survival flies exposed to MZ was daily registered and expressed as percentage of survival flies with respect to the control group (ten flies were evaluated; an experiment was performed in triplicate). The statistic was performed by comparing the survival curves with a log-rank (Mantel-Cox) test. (b) After 15 days of exposure to MZ, negative geotaxis was evaluated. Results are presented as means \pm SEM, $P < 0.001$ from 3 different preparations. *** $P < 0.001$.

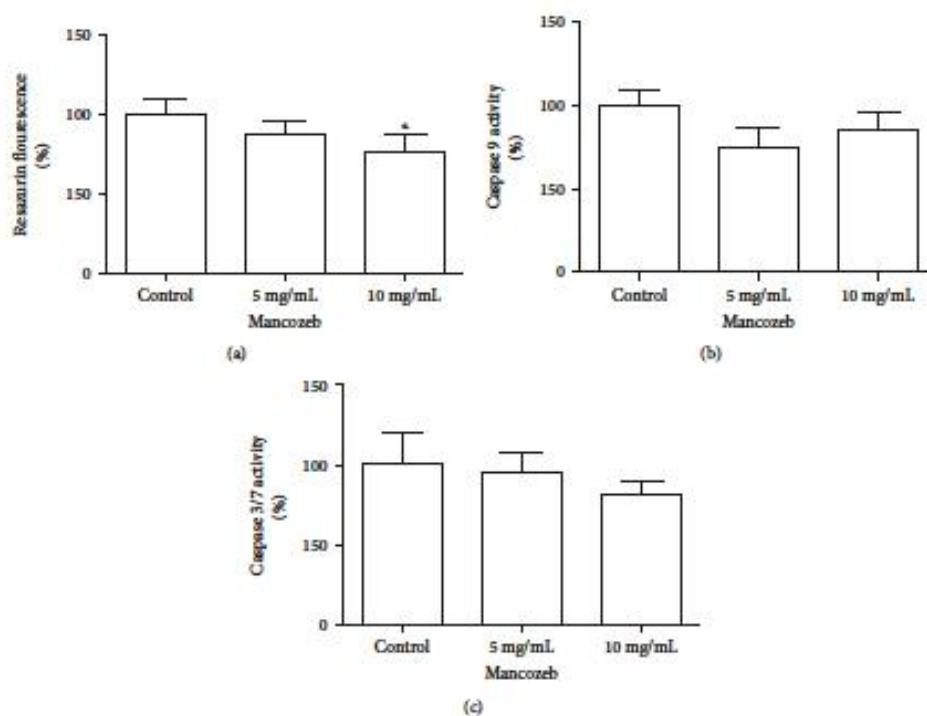


FIGURE 2: Cellular viability and caspase 3/7 and 9 activity in response to 15 days of MZ treatment (a) Resazurin fluorescence, (b) caspase 9 and (c) caspase 3/7 were evaluated in flies exposed to MZ. All experiments are expressed in percentage in relation to the control and represent an average of three experiments performed in triplicate. Results are presented as means from 3 different preparations. * $P < 0.05$.

0.19 mg/g at 5 mg/mL and 10 mg/mL, resp.) compared to control group (0.02 mg/g). There were no significant changes in the concentration of calcium (Ca), iron (Fe), potassium (K), magnesium (Mg), sodium (Na), potassium (P), sulfur (S), zinc (Zn), and copper (Cu) (Table 2).

3.6 Relative Steady-State Level of mRNA of Antioxidant Enzymes, Nrf2 Transcription Factor, and HSP70 and HSP83. Considering the significant increase in the antioxidant enzyme activity, there was speculation about a possible alteration in the relative steady-state levels of mRNA of those

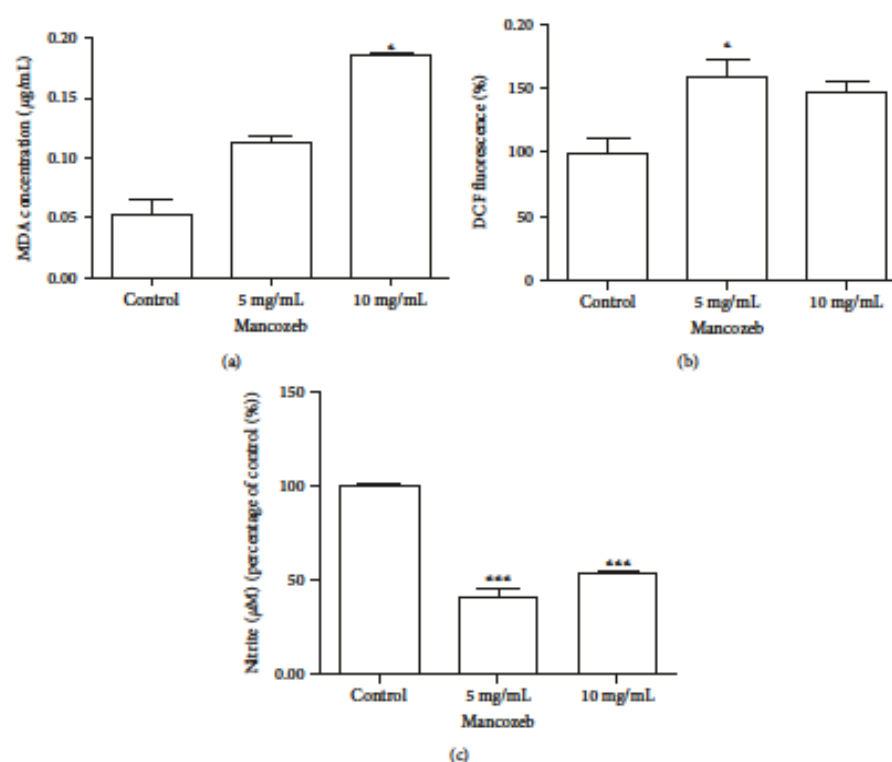


FIGURE 3: Effects of MZ exposure on MDA levels, arbitrary steady-state ROS levels, and nitric oxide levels. (a) MDA levels were evaluated after 15 days of exposure by HPLC on a fly homogenate. (b) ROS levels were evaluated by DCF-DA fluorescence. (c) Nitric oxide production was evaluated by a colorimetric assay based on nitrite presence. All experiments were repeated three times and performed in triplicate. * $P < 0,05$ and *** $P < 0,0001$. Results are presented as means \pm SEM, from 3 different preparations.

genes related to the antioxidant enzymes (CAT and SOD). Additionally, the relative steady-state levels of mRNA of Nrf2 and heat shock proteins HSP83 and HSP70, which are molecular pathways closely related to cellular redox balance and cell adaptation to stressful conditions, were evaluated. Our results pointed to a concentration-dependent alteration in the relative steady-state level of the mRNA of analyzed genes. The relative steady-state levels of the mRNA of HSP70 ($P < 0,005$, $F = 430,7$), HSP83 ($P < 0,0001$, $F = 2359$), CAT ($P < 0,001$, $F = 19,21$), and Nrf2 ($P < 0,0005$, $F = 377,7$) transcriptional factors were increased fivefold, twofold, twofold, and threefold, respectively, in relation to the control group at 5 mg/mL without significant alteration in the SOD mRNA level. At 10 mg/mL, a significant reduction in the relative steady-state level of mRNA for all targets' with the exception of SOD SOD ($P = 0,07$, $F = 6,893$) was observed at 10 mg/mL (Figures 5(a) and 5(e)).

4. Discussion

The present study was aimed at analyzing biochemical alterations resulting from the exposure of fruit flies *Drosophila melanogaster* up to 15 days to a diet mixed with

MZ. Previous studies have reported lifespan shortening and progeny reduction of flies by MZ [7]; however, at least to our knowledge, this is the first study describing molecular targets and mechanisms of toxicity of this compound on fruit flies.

MZ induced an accumulation of Mn in a concentration-dependent manner in the flies. In recent study, MZ caused Mn accumulation in carp brain [16]. Mn is one of the main byproducts of MZ degradation, and accumulation of Mn in specific brain regions is related to neurotoxicity and behavioral symptoms similar to Parkinson's disease in humans and rodents [24, 35, 36]. Similarly, exposure to Mn induced locomotor deficits in flies [36–38]. It was demonstrated previously that the link of manganese (Mn) to the organic molecule of MZ accounts for toxicity of this compound [15]. Oxidative stress is proposed to be the main mechanism implied in Mn-induced injury. Different sources of ROS by Mn includes the oxidation of Mn^{2+} to Mn^{3+} , which catalyzes DA oxidation with the formation of toxic and reactive intermediaries [39]. Also, Mn can increase the proportion of Fe (II), which can then prompt oxidative stress via the Fenton reaction [40]. Thus, the accumulation of Mn caused by MZ exposure, as

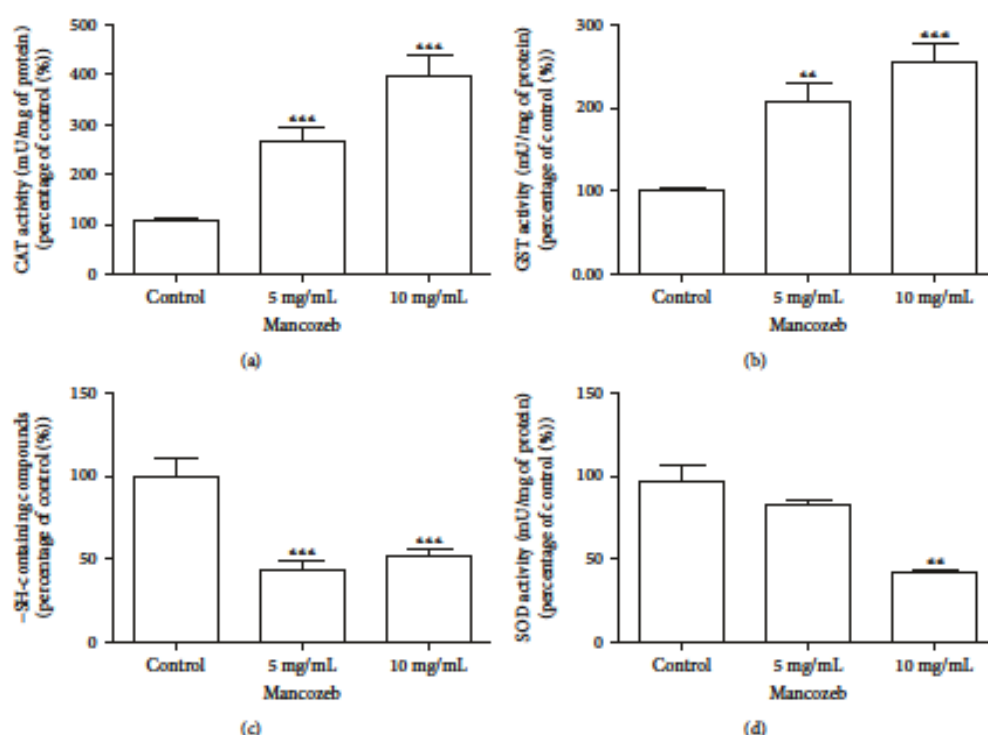


FIGURE 4: Effects of MZ exposure on the CAT, GST, and SOD activity and -SH group-containing species after 15 days of exposure in *D. melanogaster*. (a) CAT, (b) GST, (c) -SH group-containing species levels, and (d) SOD activity were measured in the whole homogenate of flies. The activity of antioxidant enzymes is expressed in percentage in relation to control group. All experiments were reiterated three times and performed in triplicate. ** $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ in relation to control. Results are presented as means \pm SEM, from 3 different preparations.

TABLE 2: Metal contents in *D. melanogaster* exposed for 15 days at two different mancozeb concentrations.

Metals	Control	5 mg/mL	10 mg/mL
Ca	0.44 \pm 0.04	0.41 \pm 0.02	0.41 \pm 0.08
Fe	0.34 \pm 0.05	0.26 \pm 0.03	0.22 \pm 0.04
K	5.03 \pm 0.56	4.56 \pm 0.59	4.75 \pm 0.53
Mg	0.59 \pm 0.07	0.48 \pm 0.07	0.54 \pm 0.08
Mn	0.02 \pm 0.01	0.11 \pm 0.02	0.19 \pm 0.02*
Na	1.60 \pm 0.14	1.64 \pm 0.15	1.41 \pm 0.24
P	5.76 \pm 0.85	5.24 \pm 0.71	6.05 \pm 0.83
S	2.82 \pm 0.36	2.62 \pm 0.34	2.94 \pm 0.38
Zn	0.09 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.09 \pm 0.02
Cu	<QL	<QL	<QL

Effect of exposure to MZ during 15 days on metal levels of fruit flies. The value is shown in mg g^{-1} . Results are expressed as a mean \pm standard deviation ($n = 3$). * indicates significant difference in comparison to the control group ($P < 0.05$). The quantification limit (QL) for Cu is 0.0025 mg g^{-1} .

measured by ICP-OS, could contribute to oxidative damage and behavioral impairment in flies by some of the mentioned mechanisms.

MZ stimulated GST activity; this effect was also described in rat hepatic tissue and carp brain [16, 41]. The family of protein GST plays multiple roles including cell protection against oxidative stress and potentially toxic compounds via conjugation of glutathione (GSH) to various molecules and products of oxidative metabolism [42], decreasing the toxicity and contributing to their elimination from the cell. An augmented GST activity was observed in both concentrations of MZ and occurred in parallel with decreased and reduced glutathione, indicating the activation of the detoxification mechanism mediated by GST in flies.

Since primitive life forms, SOD and catalase are primary ROS removal enzymes. SOD catalyzes the dismutation of superoxide ($\text{O}_2^{\cdot -}$) to hydrogen peroxide (H_2O_2), a toxic product that must be quickly removed from the cell, and catalase detoxifies H_2O_2 , reducing it to water and oxygen [10]. In this work, MZ inhibited the activity of SOD significantly, and similar results were observed in carp brain and human erythrocytes exposed to MZ [16, 43]. The chelating ability of dithiocarbamates toward metals present in the active center of enzymes contributes to enzymes inhibition, as was reported for SOD [17]. As no alteration in the SOD relative steady-state level of mRNA was observed in this study, a posttranslational inhibition of SOD due to an interaction with MZ molecule might be suggested. An unbalance of the

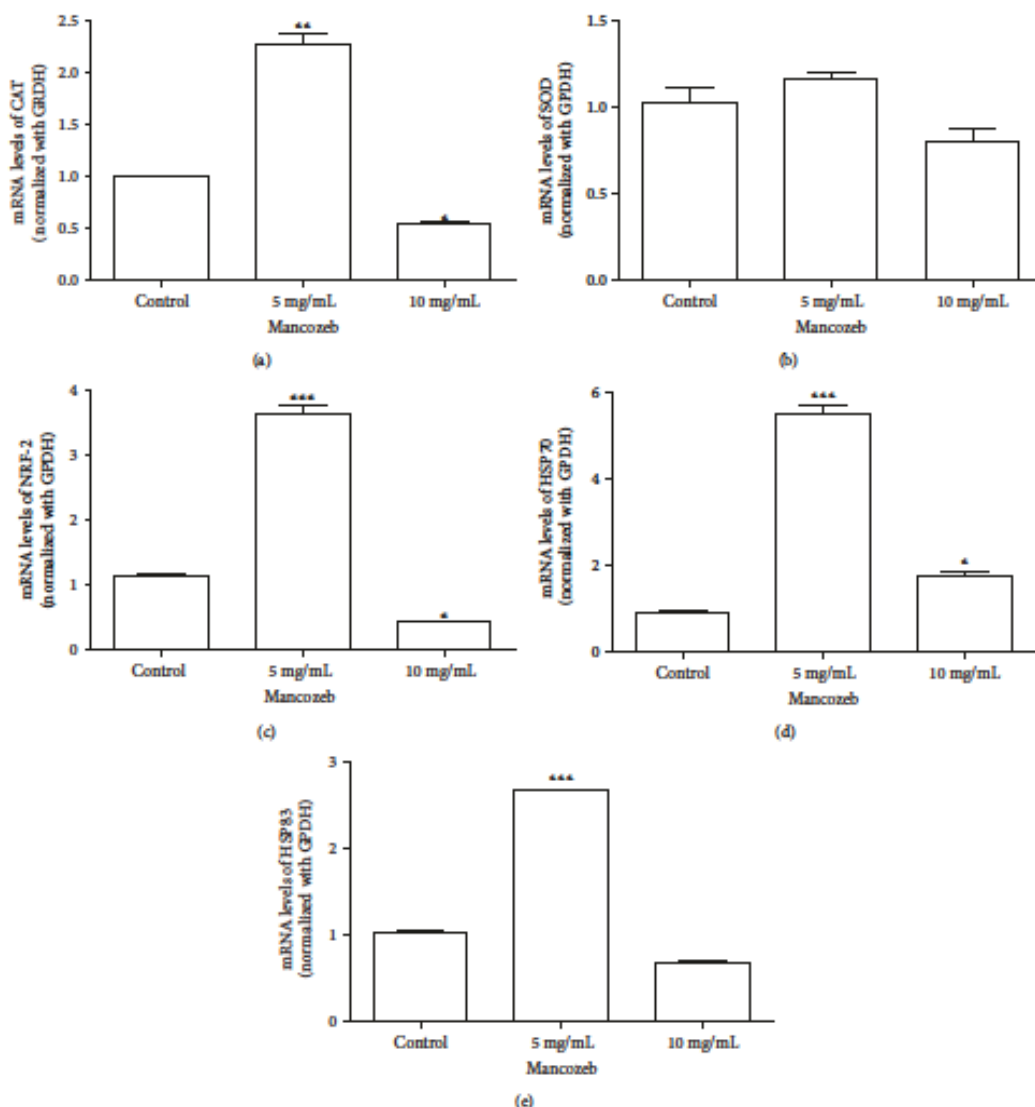


FIGURE 5: Relative steady-state level of specific mRNA in response to MZ exposure. The relative steady-state levels of the mRNA of (a) Cat, (b) SOD (c) Nrf2, (d) HSP70, and (e) HSP83 were evaluated after 15 days of exposure to MZ by RT-qPCR. All experiments were repeated three times and performed in triplicate. The data were normalized with GPDH constitutive gene. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; and *** $P < 0.001$. Results are presented as means \pm SEM, from 3 different preparations.

antioxidant system resulting from SOD inhibition might cause augmented levels of $O_2^{\cdot -}$ which, in turn, may react with NO, generating peroxynitrite, a potent oxidizing compound that has an effect upon mitochondrial function and triggers cell death via oxidation and nitration reactions [44]. This hypothesis could explain why nitric oxide levels were decreased and may be an outcome of SOD inhibition

(evidenced in this study) potentiating the pro-oxidant effect of MZ, contributing to oxidative damage to biomolecules, as indicated by MDA, a product of lipid peroxidation.

Nrf2 (nuclear factor erythroid 2- (NFE2-) related factor 2) is highly conserved across vertebrates, and similarly to mammals, in drosophilas, this factor regulates constitutive expression and coordinated induction of numerous gene

encoding antioxidants and phase-2 detoxifying enzymes and related proteins, such as superoxide dismutases (SODs), catalase, UDP-glucuronosyltransferase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase-1 (NQO1), heme oxygenase-1, glutamate cysteine ligase, glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and thioredoxin [43]. Nrf2 is implied in the promotion of cell resistance to chemicals, such as herbicide paraquat and arsenic [45, 46].

Heat shock proteins are reported to protect the cells against the damage promoted by oxidative stress [47–50]. These proteins assist in the correct folding of nascent and misfolded proteins. HSP genes are known as “stress genes,” serving as indicators of the cellular toxicity of different environmental stressors [47–50]. In this study, larger relative steady-state levels of the specific mRNA of Nrf2, catalase, HSP70, and 83 were observed at the concentration of 5 mg/mL, suggesting an adaptative response of flies to the presence of the lower concentration of MZ in the diet for 15 days [42, 43]. In contrast, at a higher concentration, a decrease in the relative steady-state level of the mRNA of those genes occurred, and this inhibition was not extended to the activity of catalase, which remained augmented. This contradictory result could be explained by taking into account the stability of proteins in comparison with mRNA. It was demonstrated previously that under oxidative insult, protein levels of SOD and other antioxidant proteins increased during the first 30 min and remained constant or slightly decreased over the time, while the mRNA decreased after 30 min of the oxidant insult [51]. These data point to superior protein stability or even an increased rate of translation per available mRNA. In this aspect, the higher activity of catalase observed here might represent a temporal event that will cause a diminished expression and activity of antioxidant enzymes and HSPs over the time.

5. Conclusion

Our study shows that MZ intake induces a time- and concentration-dependent locomotor impairment and fly death, which occurred in parallel with oxidative stress revealed by decreased thiol levels and altered activity enzymes culminating in oxidative damage to membranes and consequent cell death. The degree of insult was intensified at the highest concentration of MZ. This fact may be attributed to an adaptive response represented by the augmented expression of HSPs and Nrf2 gene, providing cytoprotection. These data draw attention to the hazardous effects of MZ on fruit flies and describe molecular targets of MZ on this model pointing to antioxidant and stress-related proteins as key factors on the adaptative response during MZ exposure.

Data Availability

The data are under the responsibility of the research group and can be accessed if requested.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by CNPq process no. 456207/2014-7 and Fapergs/PRONEX no. 16/2551-0000499-4. Jefferson Luis Franco is the recipient of CNPq fellowship.

References

- [1] Environmental protection Agency, *Reregistration Eligibility Decision for Mancozeb*, United States Environ, Environment Protection Agency, 2005.
- [2] A. K. Srivastava, W. Ali, R. Singh et al., “Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes,” *Life Sciences*, vol. 90, no. 21–22, pp. 815–824, 2012.
- [3] L. Miranda-Contreras, R. Dávila-Ovalles, P. Benítez-Díaz, Z. Peña-Contreras, and E. Palacios-Prü, “Effects of prenatal paraquat and mancozeb exposure on amino acid synaptic transmission in developing mouse cerebellar cortex,” *Developmental Brain Research*, vol. 160, no. 1, pp. 19–27, 2005.
- [4] E. Yahia, M. A. Aiche, A. Chouabba, and M. S. Boulakoud, “Subchronic Mancozeb treatment induced liver toxicity via oxidative stress in male Wistar rats,” *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, vol. 79, no. 3, pp. 553–559, 2014.
- [5] A. Goldoni, C. R. Klauck, S. T. Da Silva, M. D. Da Silva, P. G. Ardenghi, and L. B. Da Silva, “DNA damage in Wistar rats exposed to dithiocarbamate pesticide Mancozeb,” *Folia Biologica*, vol. 60, no. 4, pp. 202–204, 2014.
- [6] Z. Adamski and K. Ziemiński, “Side-effects of mancozeb on *Spodoptera exigua* (Hüb.) larvae,” *Journal of Applied Entomology*, vol. 128, no. 3, pp. 212–217, 2004.
- [7] D. Marchal-Ségault, J. Seugé, G. Laugé, and E. de Turckheim-Lesquoy, “Effets de dix fongicides commerciaux sur la survie des adultes de *Drosophila melanogaster* meig.,” *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, vol. 20, no. 4, pp. 407–424, 1985.
- [8] K. J. A. Davies, “Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems,” *IUBMB Life*, vol. 50, no. 4, pp. 279–289, 2000.
- [9] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, and M. Mazur, “Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer,” *Chemico-Biological Interactions*, vol. 160, no. 1, pp. 1–40, 2006.
- [10] B. Uttara, A. Singh, P. Zamboni, and R. Mahajan, “Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options,” *Current Neuropharmacology*, vol. 7, no. 1, pp. 65–74, 2009.
- [11] L. Phom, B. Achumi, D. P. Alone, Muralidhara, and S. C. Yeniseti, “Curcumin’s neuroprotective efficacy in *Drosophila* model of idiopathic Parkinson’s disease is phase specific: implication of its therapeutic effectiveness,” *Rejuvenation Research*, vol. 17, no. 6, pp. 481–489, 2014.
- [12] A. Kumar, A. Singh, and Ekavali, “A review on Alzheimer’s disease pathophysiology and its management an update,” *Pharmacological Reports*, vol. 67, no. 2, pp. 195–203, 2015.

- [13] J. Zhang, V. A. Fitsanakis, G. Gu et al., "Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: a link through mitochondrial dysfunction," *Journal of Neurochemistry*, vol. 84, no. 2, pp. 336-346, 2003.
- [14] C. E. Todt, D. C. Bailey, A. S. Pressley et al., "Acute exposure to a Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate fungicide leads to mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species production in *Caenorhabditis elegans*," *NeuroToxicology*, vol. 57, pp. 112-120, 2016.
- [15] L. Domico, K. Cooper, L. Bernard, and G. Zeevalk, "Reactive oxygen species generation by the ethylene-bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide mancozeb and its contribution to neuronal toxicity in mesencephalic cells," *NeuroToxicology*, vol. 28, no. 6, pp. 1079-1091, 2007.
- [16] D. G. Costa-Silva, A. R. Lopes, I. K. Martins et al., "Mancozeb exposure results in manganese accumulation and Nrf2-related antioxidant responses in the brain of common carp *Cyprinus carpio*," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, no. 16, pp. 15529-15540, 2018.
- [17] G. Hogarth, "Metal-dithiocarbamate complexes: chemistry and biological activity," *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 12, no. 12, pp. 1202-1215, 2012.
- [18] U. B. Pandey and C. D. Nichols, "Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery," *Pharmacological Reviews*, vol. 63, no. 2, pp. 411-436, 2011.
- [19] E. L. Arrese and J. L. Soulages, "Insect fat body: energy, metabolism and regulation," *Annual Review of Entomology*, vol. 55, no. 1, pp. 207-225, 2010.
- [20] M. A. Jones and M. Grotewiel, "*Drosophila* as a model for age-related impairment in locomotor and other behaviors," *Experimental Gerontology*, vol. 46, no. 5, pp. 320-325, 2011.
- [21] G. E. Macedo, K. K. Gomes, N. R. Rodrigues et al., "Senecio brasiliensis impairs edosion rate and induces apoptotic cell death in larvae of *Drosophila melanogaster*," *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 198, pp. 45-57, 2017.
- [22] R. Negga, J. A. Stuart, M. L. Machen et al., "Exposure to glyphosate- and/or Mn/Zn-ethylene-bis-dithiocarbamate-containing pesticides leads to degeneration of γ -aminobutyric acid and dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*," *Neurotoxicity Research*, vol. 21, no. 3, pp. 281-290, 2012.
- [23] H. Coulom and S. Birman, "Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*," *The Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 48, pp. 10993-10998, 2004.
- [24] J. L. Franco, T. Posser, P. R. Dunkley et al., "Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase," *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 47, no. 4, pp. 449-457, 2009.
- [25] F. Pérez-Severiano, M. Rodríguez-Pérez, J. Pedraza-Chaverri et al., "S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats," *Neurochemistry International*, vol. 45, no. 8, pp. 1175-1183, 2004.
- [26] F. Karatas, M. Karatepe, and A. Baysal, "Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography," *Analytical Biochemistry*, vol. 311, no. 1, pp. 76-79, 2002.
- [27] P. J. Hissin and R. Hilf, "A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues," *Analytical Biochemistry*, vol. 74, no. 1, pp. 214-226, 1976.
- [28] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres Jr., and R. M. Featherstone, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity," *Biochemical Pharmacology*, vol. 7, no. 2, pp. 88-95, 1961.
- [29] H. Aebi, "Catalase in vitro," *Methods in Enzymology*, vol. 105, pp. 121-126, 1984.
- [30] W. H. Habig and W. B. Jakoby, "Assays for differentiation of glutathione S-transferases," *Methods in Enzymology*, vol. 77, pp. 398-405, 1981.
- [31] V. A. Kostyuk and A. I. Potapovich, "Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase," *Biochemistry International*, vol. 19, no. 5, pp. 1117-1124, 1989.
- [32] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248-254, 1976.
- [33] C. C. Muller, A. L. H. Muller, C. Pirola, F. A. Duarte, E. M. M. Flores, and E. I. Muller, "Feasibility of nut digestion using single reaction chamber for further trace element determination by ICP-OES," *Microchemical Journal*, vol. 116, pp. 255-260, 2014.
- [34] C. A. Bizzi, J. S. Barin, J. S. S. Oliveira, G. Cravotto, and E. M. M. Flores, "Microwave-assisted oxidation of organic matter using diluted HNO₃ under O₂ pressure: rationalization of the temperature gradient effect for acid regeneration," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 28, pp. 1673-1681, 2017.
- [35] M. Bouchard, D. Mergler, M. Baldwin, M. Panisset, R. Bowler, and H. A. Roels, "Neurobehavioral functioning after cessation of manganese exposure: a follow-up after 14 years," *American Journal of Industrial Medicine*, vol. 50, no. 11, pp. 831-840, 2007.
- [36] P. Chen, N. Parmalee, and M. Aschner, "Genetic factors and manganese-induced neurotoxicity," *Frontiers in Genetics*, vol. 5, 2014.
- [37] E. Bonilla, R. Contreras, S. Medina-Leendertz et al., "Manganese toxicity in *Drosophila melanogaster*: extension of the life span by resveratrol," *Toxicological and Environmental Chemistry*, vol. 94, no. 4, pp. 742-747, 2012.
- [38] A. Mitra, E. Sovik, A. Barron, J. Duncan, and B.-S. Yehuda, "Manganese affects behavior of *Drosophila melanogaster* by altering biogenic amine levels in brain," *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, vol. 6, 2012.
- [39] G. Diaz-Veliz, S. Mora, M. A. D. Gomez et al., "Behavioral effects of manganese injected in the rat substantia nigra are potentiated by dicumarol, a DT-diaphorase inhibitor," *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, vol. 77, no. 2, pp. 245-251, 2004.
- [40] K. Fernsebner, J. Kanawatti, A. Walker, and B. Michalke, "Manganese leads to an increase in markers of oxidative stress as well as to a shift in the ratio of Fe (II)/(III) in rat brain tissue," *Metallomics*, vol. 6, no. 4, pp. 921-931, 2014.
- [41] A. Siddiqui, B. Ali, and S. P. Srivastava, "Effect of mancozeb on hepatic glutathione S-transferase in rat," *Toxicology Letters*, vol. 68, no. 3, pp. 301-305, 1993.
- [42] B. Balaji, B. Rajendar, and M. Ramanathan, "Quercetin protected isolated human erythrocytes against mancozeb-

- induced oxidative stress," *Toxicology and Industrial Health*, vol. 30, no. 6, pp. 561–569, 2014.
- [43] R. Radi, "Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 37, pp. 26464–26472, 2013.
- [44] N. D. Vaziri, "Protective effect of Nrf2 and catalase in maternal diabetes-induced perinatal hypertension and kidney disease," *Diabetes*, vol. 61, no. 10, pp. 2400–2402, 2012.
- [45] Q. Ma and X. He, "Molecular basis of electrophilic and oxidative defense promises and perils of Nrf2," *Pharmacological Reviews*, vol. 64, no. 4, pp. 1055–1081, 2012.
- [46] Q. Ma, "Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 53, no. 1, pp. 401–426, 2013.
- [47] H. Eckwert and H. R. Köhler, "The indicative value of the hsp70 stress response as a marker for metal effects in *Oniscus asellus* (isopoda) field populations: variability between populations from metal-polluted and uncontaminated sites," *Applied Soil Ecology*, vol. 6, no. 3, pp. 275–282, 1997.
- [48] E. Pyza, P. Mak, P. Kramarz, and R. Laskowski, "Heat shock proteins (HSP70) as biomarkers in ecotoxicological studies," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 38, no. 3, pp. 244–251, 1997.
- [49] A. Piano, P. Valbonesi, and E. Fabbri, "Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals," *Cell Stress & Chaperones*, vol. 9, no. 2, pp. 134–142, 2004.
- [50] K. Said Ali, A. Ferencz, J. Nemcsok, and E. Hermesz, "Expressions of heat shock and metallothionein genes in the heart of common carp (*Cyprinus carpio*): effects of temperature shock and heavy metal exposure," *Acta Biologica Hungarica*, vol. 61, no. 1, pp. 10–23, 2010.
- [51] C. Vogel, G. M. Silva, and E. M. Marcotte, "Protein expression regulation under oxidative stress," *Molecular & Cellular Proteomics*, vol. 10, no. 12, article M111.009217, 2011.

3.2 MANUSCRITO 1

Tratamento de longo período com Mancozebe altera atividade mitocondrial e Bioenergética em *Drosophila melanogaster*

Long term treatment with Mancozeb impairs mitochondrial and bioenergetic activity in *Drosophila melanogaster*

Miriane Acosta Saraiva, Illana Kemmerich Martins, Giulianna Echeverria Macedo, Nathane Rodrigues, Patrícia de Brum Vieira, Nelson Rodrigues de Carvalho, Marina Prigol, Karen Kich Gomes, Cynthia Camila Ziech, Jeferson Luis Franco and Thais Posser.



Submetido a: **Toxicology Letters**

Long term treatment with Mancozeb impairs mitochondrial and bioenergetic activity in *Drosophila melanogaster*

Miriane Acosta Saraiva², Illana Kemmerich Martins², Giulianna Echeverria Macedo², Nathane Rodrigues², Patrícia de Brum Vieira¹, Nelson Rodrigues de Carvalho^{2,3}, Marina Prigol⁴, Karen Kich Gomes², Cynthia Camila Ziech², Jeferson Luis Franco² and Thais Posser².

1. Centro Interdisciplinar de Pesquisas em Biotecnologia – CIPBIOTEC, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, 97300-000 RS, Brazil.
2. Oxidative Stress and Cell Signaling Research Group, Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel, 97300-000, São Gabriel, RS, Brazil.
3. Instituto Federal Farroupilha, *Campus* Santo Ângelo, 98806700, RS, Brazil.
4. UNIPAMPA *Campus* Uruguaiana, 97501-970, RS, Brazil.

*Corresponding author:

Dr. Thaís Posser

Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel Av Antonio Trilha 1847, Centro, São Gabriel, RS, 97300-000, Brazil +55 553237 0851 (2637)
thaisposser@unipampa.edu.br

Abstract

The ethylene-bis-dithiocarbamate fungicide Mancozeb (MZ) is largely used in a diversity of crops worldwide. Although recommended as a low toxicity compound a number of studies have related contamination with MZ to neurological disorders, hormonal dysfunctions both in humans and animals. We demonstrated earlier the susceptibility of fruit flies to this compound followed 15 days exposure on parameters of oxidative stress, behavioral and genic alterations. The present study explores the modulation of mitochondrial respiration complexes through oxygen consumption and metabolic markers in drosophilas exposed to MZ. Fruit flies were exposed to MZ (5 and 10 mg/mL) for fifteen days. The flies presented loss weight, reduced levels of sugars glucoses, trehaloses and glycogen in both concentrations and increased triglycerides. A reduction in oxygen consumption and bioenergetic activity in 35% and 32% to 5mg and 10mg to MZ were observed. Our results point to mitochondria as a target of MZ in a non-vertebrate model impairing oxygen consumption due a disruption in mitochondrial respiration rate which lead to compromised ATP production and lower bioenergetics balance. The MZ damage on mitochondria could be the main pathway leading to cellular oxidative stress causing lipoperoxidation and fly mortality observed earlier in our studies.

Keywords: High Resolution Respirometry, mitochondria, Mancozeb, fruit fly.

1.Introduction

Mancozeb (MZ) is an ethylene-bis-dithiocarbamate complexed with Manganese and Zinc. It is a broad spectrum fungicide applied in a variety of plants, crops, and fruits (ALVES; JULIATTI, 2018). The large use of MZ is in part attributed to its classification as a low acute toxicity and short environmental persistence fungicide. But in spite of this studies focused on Mancozeb toxicology drawn attention to its potential effects on environmental, animal and human health. In this aspect, it was demonstrated that MZ causes genotoxicity in lymphocytes, steatosis in hepatocytes and oxidative stress in erythrocytes (BALAJI; RAJENDAR; RAMANATHAN, 2014; PIROZZI et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016). Exposure of aquatic organisms to Mancozeb lead to Mn accumulation, behavioural alterations and biochemical markers alteration (Costa-Silva et al). Not only Mancozeb but also its metabolites like Etilenotiurea (ETU) were associated with damage promoted by this fungicide. Study conducted by (VAN WENDEL DE JOODE et al., 2016) correlated ETU concentrations in urine with poorer verbal learning outcomes in children living near banana crops.

In previous studies, it was shown that the insect *Drosophila melanogaster* present susceptibility to Mancozeb and may represent an appropriated model for investigation of fungicide toxicity. The fruit flies *Drosophila melanogaster* were exposed for a long period (15 days) to MZ taking into consideration the life expectancy of this organism (SARAIVA et al., 2018). It was verified high mortality and a condition of oxidative stress with modulation of enzymatic and genic targets.

The biochemical mechanisms involved in Mancozeb toxicology are not clear, However mitochondria seems to represent an important target for Mancozeb, whose effects are mentioned in several studies. Stimulation of ROS and loss of mitochondrial transmembrane potential and apoptotic cell death was observed in human cell lineage (KUMAR; SABARWAL; SINGH, 2019). Previous reports also demonstrate that isolated mitochondria exposed to Mn/Zn-EBDC exhibited decreased respiration (ZHANG et al., 2003). This effects may be in part attributed to the multi-modal character of this fungicide, with multiple mechanisms of action as inhibition of metal-containing enzymes possible by chelation (CORNELL, 1987), interference in lipid synthesis (DELF et al., 2013), and inactivation of sulfhydryl groups in aminoacids (KUMAR; SABARWAL; SINGH, 2019).

The present study investigate the effect of *in vivo* exposure to Mancozeb on mitochondrial viability and directly on respiration. Additionally considering the impact of mitochondria activity on metabolism, some markers were evaluated.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

All the chemical were acquired from Sigma Aldrich® (São Paulo, SP, Brazil). The other materials, including fruit flies food, were obtained from commercial suppliers. Mancozeb (80 % purity, Enzeb 800 WP) from Sabero Organics America S.A (Belo Horizonte, MG, Brazil). All other chemicals and reagents used here were of the highest analytical grade.

2.2 *Drosophila* strains culture and procedures

The flies used in this experiments was *Drosophila melanogaster* wild-type (strain Harwich) obtained from the National Species Stock Center, Bowling Green, OH, USA. *Drosophilas* were cultured in a special room with controlled temperature 25 ± 1 °C, 12 h dark-light photoperiod and 50–60% relative humidity. The basic cornmeal diet was composed of cereal flour, corn flour, milk, salt, water, antifungal agent (Nipagin) and supplemented with dried yeast as previously described to PAULA *et al.*, 2016.

2.3 Exposure of flies to Mancozeb

Male adult flies after 48h eclosion were exposed to 5 e and 10 mg/mL of Mancozeb, mixed into the cornmeal. Each group contained 30 individuals. This exposition for 15 days. At the end of the treatment, these flies were used in all tests. The chemical tested in this work was Mancozeb (Emzeb® 800 WP Ameria S.A.)

2.4 High Resolution Respirometry

Oxygraph-2K (O2K, OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria) was used for quantification of mitochondrial energetics functions. All experiments were performed at 24°C using DatLab 4.0 software (Oroboros Inc., Austria), with continuous stirring at 750 rpm. This technique was carried out according with MIWA *et al.*, 2003 and CARVALHO *et al.*, 2017.

2.4.1 Mitochondrial Isolation

Thirty male fruit flies were immobilized by chilling on ice and homogenized into a cold pestle glass with 2 mL ice-cold medium containing 250 mM sucrose, 0.1 % free fat acid bovine serum albumin, 2 mM EGTA and 5 mM Tris-HCl pH 7.4. The homogenate was filtered with nylon membrane (10 μ m pore size) and then centrifuged at 200 x g for 3 min. The supernatant was collected and centrifuged at 9.000 x g for 10 min. The mitochondrial pellet was carefully suspended in 2 mL of ice-cold albumin free isolation medium, followed by centrifugation at 9,000 x g for 10 min. The final pellet was resuspended in 100 μ l of albumin free isolation medium, this resuspension contained the isolated mitochondria and was used in the respiration assay described below. All the above procedures were performed at 4 °C, according to previously described for CARVALHO *et al*;2017.

2.4.2 Mitochondrial respiration assays

Using titration, it was evaluated the abilities of a series of substrates and inhibitors to influence mitochondrial function reflected as a change in the respiration states. Mitochondrial bioenergetics in *D. melanogaster* mitochondria was carried out according to the literature (GNAIGER; PESTA; GNAIGER, 2012). Oxidizable substrates were used in all experiments, like L-Proline+Pyruvate+Malate and Succinate. After signal stabilization, the basal respiration was supported by endogenous substrates, the Complex I (CI)-mediated Leak (LEAK) respiration was determined using 5 mM pyruvate, 5 mM L-proline and 1 mM malate. CI-mediated OXPHOS (OXPHOS) was determined using ADP (2.5 mM). The functional integrity of the outer mitochondrial membrane (CI_cOXPHOS) was determined by addition of exogenous cytochrome c (cyt c) from equine heart (10 μ M). Outer mitochondrial membrane disruption is associated with cyt c release, thus the respiration stimulated when cyt c is added is proportional to membrane damage (PICHAUD et al., 2013). Respiratory control ratios (RCR = CIOXPHOS/CILEAK) and the increase of oxygen flux after injection of Cyt c (CI_cOXPHOS/CIOXPHOS) were used as quality control of isolated mitochondria. The convergent electron flow during the maximal OXPHOS respiration (CI_c+CIIOXPHOS) was determined with substrates of CI_c and CII (10 mM Succinate). The electron transport system (ETS) respiration represents the noncoupled respiration using FCCP (optimum concentration reached between 0.5 and 1.5 μ M), CI_c+CII-mediated ETS respiration (CI_c+CIIETS) was determined using FCCP (optimum concentration reached between 0.5 and 1.5 μ M). CII-mediated ETS respiration (CIIETS) was determined with 0.5 μ M rotenone. Addition of 2.5

μM antimycin A inhibited complex III, resulting in nonmitochondrial respiration, the residual oxygen consumption (Rox) with small contributions from electron leak in the uncoupled state.

2.5 Metabolism markers

The evaluation of energetic metabolism markers of *D. melanogaster* was conducted with colorimetric kits. Twenty flies were homogenized in 100 μL of HEPES 20mM pH 7.0 in PowerLyzer with one metallic bead for a tube with 2.000 rpm at 30 seconds and posteriorly centrifuged for 30 minutes at 14.000 rpm. The samples were kept at 4°C during the preparations until the end of the tests. After centrifugation, the clear supernatant was used to analyze glucose, trehalose, glycogen, triglycerides according to manufacturer's protocol (Labtest®, MG). The results were calculated and expressed in control percentage.

2.6 Protein Quantification

The protein assay was performed by BRADFORD, 1976 method using 10 μL of sample diluted in 190 μL of distilled water. The protein values were used to adapt the content for 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$; the assay was performed at 24°C.

2.7 Western Blotting

Groups of 30 whole flies were mechanically homogenized at 4°C in 200 μL of buffer (pH 7.0) containing 50 mM Tris, 1mM EDTA, 20mM Na_3VO_4 , 100 mM sodium fluoride, and protease inhibitor cocktail. Then, the homogenate was centrifuged for 10min at 1000 $\times g$ at 4°C and the supernatant was collected. After protein determination according to Bradford (BRADFORD, 1976), 4% SDS solution, 25 % glycerol and 8% β -mercaptoethanol were added to samples to a final volum of 405 μL . Samples were frozen for further analysis. The proteins were separated by SDS-PAGE using 10% gels and then electrotransferred to nitrocellulose membranes as previously described by (DE PAULA et al., 2012). Membranes were washed in Tris-buffered saline with Tween 100mmol/L Tris-HCl, 0.9% NaCl and 0.1% Tween-20, pH 7.5 and incubated overnight (4°C) with specific primary antibodies anti-Acetyl-Coenzyme A Synthetase (ACeCS1) and anti-Acyl-Coenzyme Synthetase (ACSL1) and anti- β actin. Subsequently, the membranes were washed in Tris-buffered saline with Tween and incubated for 1 h at 25°C with anti-rabbit Ig-secondary antibodies. Antibody binding was visualized using the ECL Western Blotting Substrate Kit (Promega). Band staining density was quantified using the Scion Image software (Scion Image for Windows).

Results are expressed as optical density of ACSL1 or ACeCS1/optical density of respective β -actin.

3. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad (version 5.0 for Macintosh OSX, GraphPad Software, San Diego, CA). Analysis of variance (ANOVA) by one-way followed by Bonferroni's Test for post-hoc comparison. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

4. Results

4.1 MZ consumption reduces body weight, glucose, trehaloses and glycongen levels in *D. melanogaster* improving triglycerides levels

Groups with 30 male fruit flies were supplemented for 15 day with MZ in two different concentrations (5 and 10 mg/mL) in the cornmeal diet. According to Figure 1 (a) MZ consumption showed body weight reduction to 9.5 folds in the highest concentration (10mg/mL) and the intermediate concentration (5mg/mL) the body weight reduction was 10.8 folds compared to control group. The levels of glucose, trehalose and glycogen were measured in *D. melanogaster* and to 5 mg/mL occurs relative decreased to 35%, 43% and 33%, respectively (Figure 1b, c, and d). The significant decrease was observe in highest concentration (10mg/mL) 27%, 46% and 49%, respectively. To other hand, the triglycerides relative levels were reased to 37% to supplementation with 5 mg/ml of MZ and 20% to 10 mg/mL $P < 0.05$ (Figure 1e).

Figure 1:

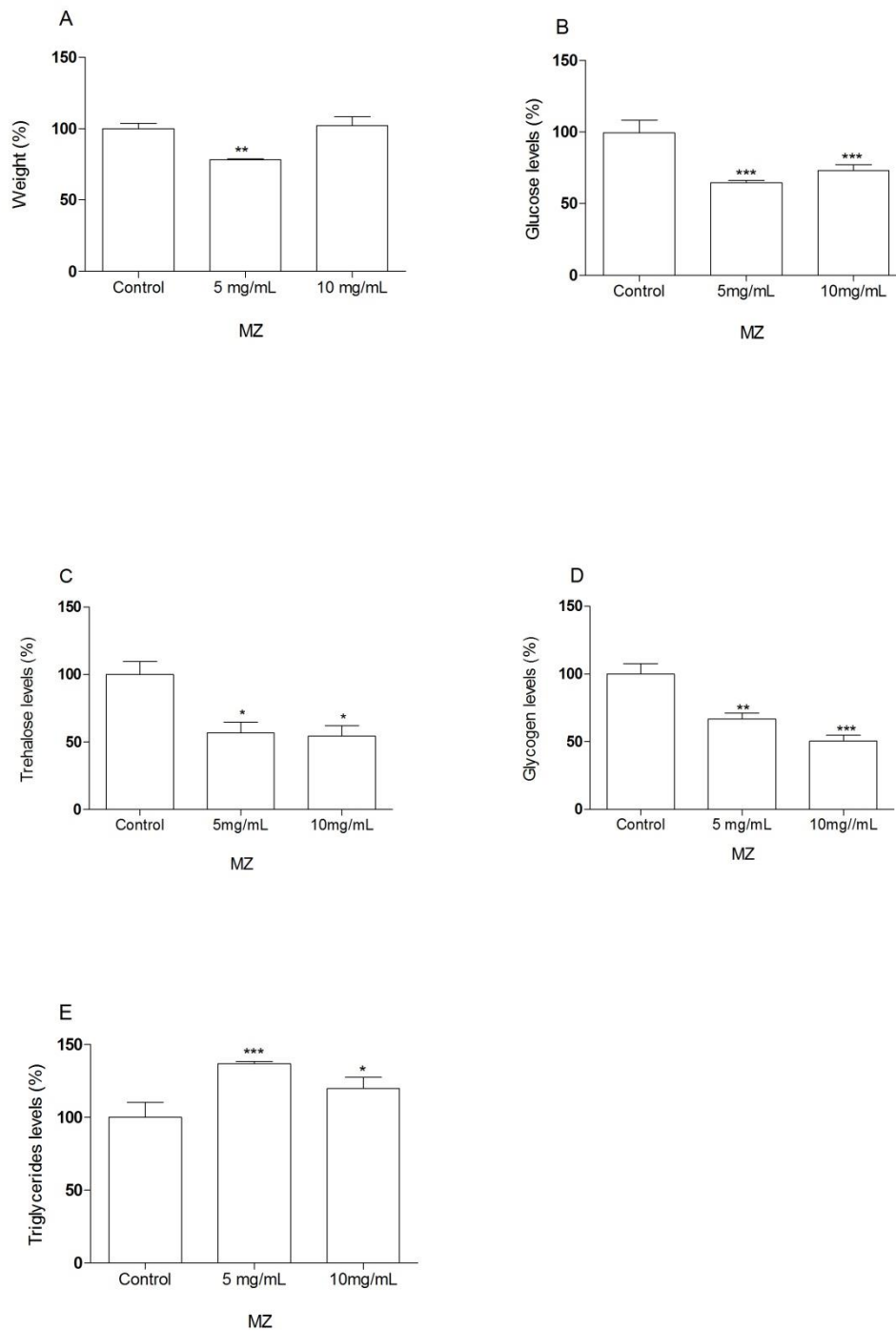


Figure 1: After fifteen days of treatment three sets of fruit flies of each MZ exposition were analyzed to measure weight of group, glucose, trehalose, glycogen and triglycerides levels. The data were expressed to relative levels in mg ($P < 0.05$). The total group was weighted and to 5 mg/ml of MZ exposition had important reduction of body weight (a). The glucoses relative levels were reduced to MZ exposition to both of concentrations, but to 5 mg/mL this was higher than 10mg/mL (b). Trehalose relative levels of 5mg/mL were 57% whilst 10mg/mL were 54% (c). Glycogen relative levels were decreased to 50% to 10mg/mL of MZ while to 5mg/mL the levels were 67% compared to control group (d). Triglycerides had increasing to 5mg/mL this raising were 37% and to 10mg/mL were 20% compared the control group (e) $P < 0.05$.

4.2 Levels of Acetyl-Coenzyme A Synthetase (ACeCS1) were evaluated in flies exposed to MZ

Acetyl-Coenzyme A Synthetase (ACeCS 1) and Acyl-Coenzyme Synthetase (ACSL 1) were investigated in flies exposed to MZ for 15 days in diet (Figure 2a). There was a significant decrease in ACeCS1 content in the supplemented groups to 5 mg/mL of MZ, when comparing to control group. The levels of ACSL1 were evaluated to both concentrations but have no significant decreases data comparing to control group (Figure 2b) $P < 0.05$.

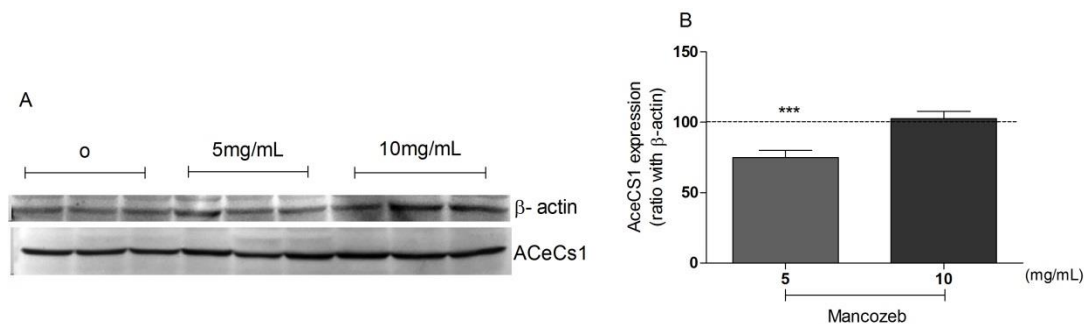


Figure 2: Levels of enzyme ACeCS1 in response to the treatment of *D. melanogaster* with MZ for fifteen days. The flies were homogenized and the proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Total content of proteins using specific antibodies was quantified. (a) The upper panel is a Western Blot showing expression levels of Acetyl-CoA Synthetase (ACeCS1) with respective contents of β-actin. (b) The graphs are showing the ratio of quantification of immunoreactive bands β-actin and represent an average \pm standard deviation. Three sets of forty flies were used for each diet condition. * indicates a significant difference between the control group and the MZ exposition ($P < 0.05$).

4.3 Mancozeb exposition reduced the O₂ flux to mitochondria evaluated to High Resolution Respirometry (HRR)

The mitochondrial bioenergetic state was analyzed to HRR. The basal and CI_{LEAK} respiration levels indicated no significant differences between control group and two MZ concentrations tested. The OXPHOS was induced by ADP addition. MZ lead to a decreasing in oxygen consumption in CI_{OXPHOS} and $CI_c + CII_{OXPHOS}$. When mitochondrial respiration was uncoupled using FCCP a significant reduction in ETS at $CI_c + CII_{ETS}$ was verified. Antimycin A (AmA) decreased the O₂ flux to the basal levels.

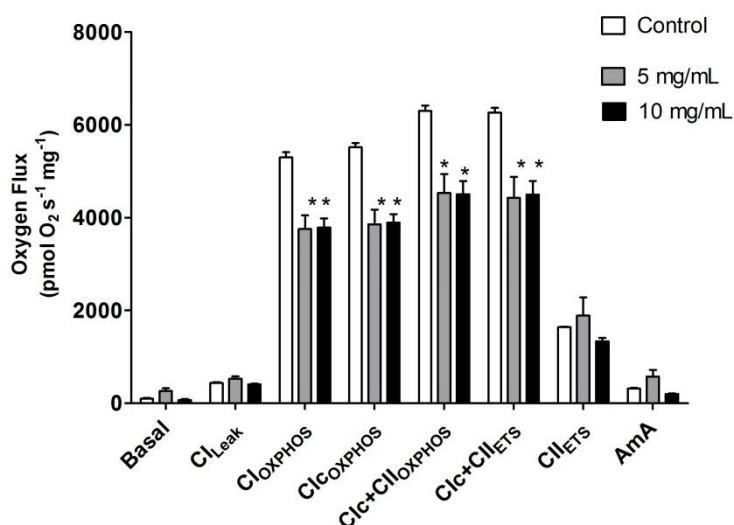


Figure 3: The MZ effects was evaluated in three different concentrations on fruit flies cultures on the mitochondrial activities of complexes by High-Resolution Respirometry (HRR) using *Oxígrafo-2k (O2k, OROBOROS Instruments, Innsbruck, Austria)*. Mitochondrial function are presented with the abbreviation(s) of the complex(es) involved followed by the state of respiration measured in presence of L-proline + pyruvate + malate (CILEAK), + ADP (CIOXPHOS), + cytochrome c (CIcOXPHOS), + succinate (CIc + CIIOXPHOS), + FCCP (CIc + CIIETS), + rotenone (CIIETS), + antimycin A (Ama) used to correct for residual O₂ consumption. Results are presented as means \pm S.E.M, from 4 different preparations. * $p < 0.05$

4.4 The mitochondrial functionality and integrity was compromed according RCR_I and CYT_c values

The respiratory control (RCR) were used to mitochondrial functionality. Integrity mitochondrial outer membrane were evaluated to Cyt_c values (1.1 was considered ideal). MZ concentration of 5mg/mL decreased the RCR. Cyt_c values were similar in all MZ concentrations tested confirming the mitochondrial integrity during the experiments (Table 1).

Table 1: Effect on different concentrations of Mancozeb in *D. melanogaster*, evaluating taxa values for respiratory control, decoupling to Complex I and the Cytochrome c effects.

Treated	RCR CI	Cyt C
CTL	12,29 ± 0,67	1,04 ± 0,02
1mg/MI	10,77 ± 3,53	1,05 ± 0,01
5mg/mL	7,77 ± 1,77 *	1,01 ± 0,02
10mg/mL	10,40 ± 1,70	1,03 ± 0,01

The respiratory taxa control CI (RCR=CI_{OXP}HOS/ CI_{LEAK}) and the cytochrome c effect. These values were expressed in medium and standard deviation, the ANOVA variance analysis used in one way, followed Bonferroni's Test *(P < 0,05).

4.5 MZ decreases bioenergetic capacity of mitochondrias

The mitochondrial bioenergetics capacity was analyzed by subtracting CI_{LEAK} from ADP- CI_{OXP}HOS from the values to both MZ concentrations tested (Figure 4). Treatment for fifteen days with 5mg/mL of MZ reduced 35% of bioenergetic mitochondrial capacity and 10mg/mL decreased to 32% to bioenergetic capacity.

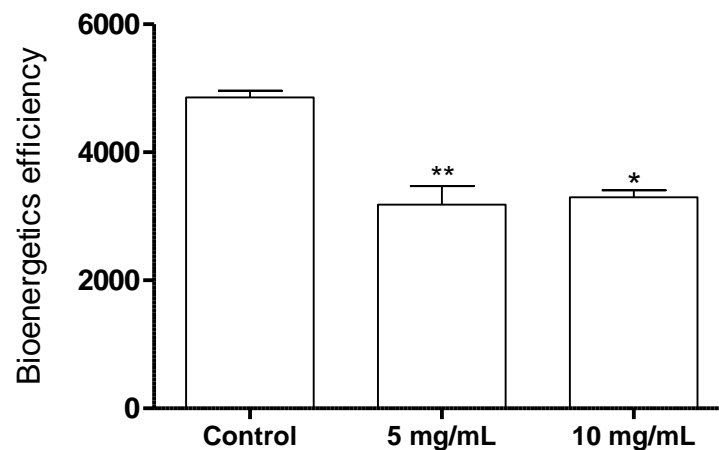


Figure 4: Analysis of Bioenergetics capacity of *D. melanogaster* exposed to two MZ different concentrations . Results are presented as means ± S.E.M, from 3 different preparations. Statistical difference from control group by one-way ANOVA, followed by Bonferroni's posthoc test. P<0.05* and P<0.005**.

5. Discussion

Mancozeb (MZ) is a multiple site fungicide largely used for fungi control in several crops, and in spite of to be recognized as a low acute toxicity agent its potential as a toxic agent in different species including humans have been reported (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY., 2005). *Drosophila melanogaster* is a reliable model for toxicological studies due to physiological, genetic and biochemical similarities with vertebrates reproducing many effects in response to chemicals (IGBOIN; GRIFFEN; LEYS, 2012; INAMDAR et al., 2012; WUNDERLICH; BRAGDON; DEPACE, 2014). Our group has reported previously the effect of long term consumption of MZ in fruit flies, leading to mortality, behavioral alterations, and altered oxidative stress markers as antioxidant enzymes and gene expression (SARAIVA et al., 2018). Herein, male fruit flies were exposed to MZ for fifteen days and oxygen consumption and mitochondrial bioenergetic capacity were evaluated besides metabolic markers.

The evaluation of biochemical markers showed significant changes in the lipid and glucose profiles. MZ exposure for 15 days increased the level of triglycerides and reduced the glucose level, glucogen, and trehalose. These results are in agreement with Yahia et al. (YAHIA; EL-AMIR; RUSHDI, 2019; YAHIA et al., 2014), who found that exposure of rats to MZ increased triglycerides and decreased serum glucose. A weight loss of flies was observed only at a lower concentration. Experiments conducted by MONGI et al., 2011 reported similarly a weight loss in rats treated with the pesticide deltamethrin. Two hypotheses could explain the weight loss, one is a decreasing in food consumption and a second hypothesis is low absorption of nutrients due to damage in gastrointestinal tract associated with the toxicity of compound and impacting levels of glucose, glycogen and disaccharide trehalose in the fly body (YASUGI; YAMADA; NISHIMURA, 2017).

In the process of glycolysis, glucose is broken down in pyruvate, which has different fates, one is entering the citric acid cycle within the mitochondrial matrix and undergoing oxidative phosphorylation (MELKONIAN; SCHURY, 2019). In a situation of lower levels of glucose for a longer period, a condition called chronic hypoglycemia caused a decreasing in state 3 respiration and RCR (respiratory control ratio) (REHNI; DAVE, 2018). In accordance, the lower levels of glucose showed here, might lead to a decreased rate of mitochondrial respiration due to the lower levels of substrate for feeding of the citric acid cycle.

Triglycerides are a source of energy when broken down in fatty acids and glycerol. When there is a low availability of glucose as in a starvation, the resulting fatty acids are

oxidized by β -oxidation into acetyl CoA, which is used in citric acid cycle to generate ATP by aerobic respiration, in the same mode that Acetyl CoA derived from pyruvate (OPENSTAX, [s.d.]). The augmented levels of triglycerides induced by MZ exposure could be associated with a lower demanding of Acetyl CoA attributed to the inhibition of mitochondrial complexes and lower respiration ratio. It was investigated if a possible induction in the biosynthesis of lipids by analysis of cytoplasmic acetyl-Coa Synthetase (AceCS1) levels. This enzyme catalyzes the conversion of acetate and CoA to acetyl-CoA, which is used in fatty acid and lipid biosynthesis (IKEDA et al., 2001). In the present study, the expression of AceCS1 measured by the use of specific antibodies was unaltered in higher concentrations and significantly decreased in a lower concentration of MZ. It was detected a decreasing in AceCS1 levels only at lower MZ concentration but was not enough to prevent the increase in triglycerides level caused by MZ. Long-chain acyl-CoA synthetases (ACSL) catalyze the first step in FA metabolism by converting long-chain FA into acyl-CoA thioesters. Acyl-CoAs enter both anabolic and catabolic pathways and disturbance of these pathways is linked to disorders such as hepatic steatosis, hyperlipidemia, and insulin (COLEMAN; LEWIN; MUOIO, 2000; LI et al., 2006). In this respect, it was not observed an alteration in the expression of this enzyme following MZ treatment (data not shown).

Mitochondrial function is essential for the survival of aerobic organisms and mitochondrial bioenergetics function is a potential target of pesticides (GAO et al., 2017; LEUNG; MEYER, 2019). Dysfunction in mitochondrial machinery is associated with several dysfunctions like cancer and neurodegenerative disorders as Parkinson and Alzheimer's disease (CLARKE, 2007; PRAUCHNER, 2017; UTTARA et al., 2009). It was demonstrated that MZ inhibited complex I and ATP levels and induces H₂O₂ generation in brain tissue, which was not observed for the MZ metabolite Etilenothiorueia (ETU) or MZ organic backbone without the presence of Manganese ion in nervous cell cultures (DOMICO et al., 2006, 2007; SRIVASTAVA et al., 2016). Damage to this organelle by environmental contaminants can impair cellular bioenergetics and induce ROS generation. In our previous work we reported an oxidative effect of MZ on flies causing lipoperoxidation flies exposed to MZ demonstrated augmented MDA levels followed by DCFDA fluorescence, and altered activity of antioxidant enzymes (SARAIVA et al., 2018). Thus a deficit in mitochondrial activity can in part contributes for this effects. To investigate the effects of MZ at the mitochondrial level, we verified the mitochondrial bioenergetics function using HRR. Our results indicated that MZ exposure impairs bioenergetics efficiency at 5 mg/mL

(Cioxphos- CI_{LEAK}), this process is associated with impairment in electron transport system and phosphorylation capacity and might culminate in a reduced production of ATP. The HRR assay showed that MZ promoted the reduction of RCR at 5 mg/mL. This result strongly suggests that MZ leads to an impairment of mitochondrial functionality through damage in the inner membranes possible driven by oxidant effects of MZ demonstrated once the mitochondrial integrity was confirmed by cit c assay.

In addition, The HRR data indicates that MZ disrupts active respiration supported by complex I and II active substrates (CIOXPHOS and complex II $CIc+CIIOXPHOS$). This effect might be at least in part attributed to an impairment of the mitochondrial OXPHOS system, including the ADP and ATP carrier and ATP synthase. In this regard, it was explored the effect of MZ on an electron transport system (ETS) in the presence of an uncoupler (FCCP). Under this condition, occurs the maximal respiration by mimicking a physiological energy demand leading to an increase in oxygen consumption. It was observed a disruption of ETS in $CIc + CII$ ETS. Change in electron flow induces ROS generation, causing oxidative damage in mitochondria. The oxidative damage reportedly alters the fluidity of the mitochondrial membrane causing leakage of radicals (THOMAS et al., 2009).

6. Conclusion

The present study demonstrates that MZ exposure hampers mitochondria ETS taking as a consequence a compromised bioenergetics capacity that may result in a reduced ATP production for sustaining essential cellular activities. This fact may contribute to augmented ROS generation corroborating with previous work when oxidative damage was confirmed. In parallel a decay in levels of energetic substrates glucose, trehalose as observed followed by an increasing in triglycerides. The enzyme of triglycerides biosynthesis AceCS1 was diminished only at 5 mg/mL. Our results shown that similarly to studies in vertebrates model, drosophila mitochondria is a target of Mancozeb which impair ETS and metabolic markers, which in turn culminate with a ROS leakage and oxidative damage.

7. References

- ADAMS, M. D. et al. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, [s. l.], v. 287, n. 5461, p. 2185–2195, 2000.
- AGENCY, Health Canada Pest Management Regulatory. Mancozeb. [s. l.], n. July, 2013.
- ALVES, Viviane Moreira; JULIATTI, Fernando Cezar. Fungicidas no manejo da ferrugem da soja, processos fisiológicos e produtividade da cultura. [s. l.], p. 245–251, 2018.
- ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) - Relatório 2013-2015. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.**, [s. l.], 2016.
- ATAMANIUK, Tetiana M. et al. The Mancozeb-Containing Carbamate Fungicide Tattoo Induces Mild Oxidative Stress in Goldfish. [s. l.], p. 1–9, 2013.
- AXELSTAD, Marta et al. Exposure to the Widely Used Fungicide Mancozeb Causes Thyroid Hormone Disruption in Rat Dams but No Behavioral Effects in the Offspring. **Toxicological Sciences**, [s. l.], v. 120, n. 2, p. 439–446, 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/toxsci/article/1670226/Exposure>>
- BAILEY, Denise C. et al. *Caenorhabditis elegans* chronically exposed to a Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate fungicide show mitochondrial Complex I inhibition and increased reactive oxygen species. **NeuroToxicology**, [s. l.], 2016.
- BALAJI, Bhaskar; RAJENDAR, Bandi; RAMANATHAN, Muthiah. Quercetin protected isolated human erythrocytes against mancozeb-induced oxidative stress. **Toxicology and Industrial Health**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 561–569, 2014.
- BALARDIN, Ricardo Silveiro. Mancozebe muito além de um fungicida. **Mancozebe: muito Além de Um Fungicida**, [s. l.], p. 147, 2017.
- BASF. Acrobat MZ. **BASF chemical Company**, [s. l.], p. 1–12, 2017.
- BOAS BALIEIRA, Kamília Vilas. Efeito oxidante do imidacloprido em abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) e potencial ação antioxidante da cafeína. [s. l.], 2017.
- BOUCHARD, M. et al. Neurobehavioral functioning after cessation of manganese exposure: A follow-up after 14 years. **American Journal of Industrial Medicine**, [s. l.], v. 50, n. 11, p. 831–840, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17096374>>
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRASIL., Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. [s.l: s.n.].
- BRODY, A. Harrison et al. Mancozeb-induced behavioral deficits precede structural neural degeneration. **NeuroToxicology**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 74–81, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2012.10.007>>
- CALDAS, E. D.; TRESSOU, J.; BOON, P. E. Dietary exposure of Brazilian consumers to dithiocarbamate pesticides — A probabilistic approach. [s. l.], v. 44, p. 1562–1571, 2006.
- CALVERT, Geoffrey M. et al. Case report: three farmworkers who gave birth to infants with birth defects closely grouped in time and place-Florida and North Carolina, 2004-2005. **Environmental health perspectives**, [s. l.], v. 115, n. 5, p. 787–91, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17520069>>
- CALVIELLO, Gabriella et al. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], 2006.
- CARVALHO, Néelson R. De et al. Eugenia uniflora Leaves Essential Oil Promotes Mitochondrial Dysfunction In *Drosophila melanogaster* Through The Inhibition Of Oxidative Phosphorylation. [s. l.], 2017.

- CÉSAR, Silvio; TEIXEIRA, Godinho; CANELA, Cristina. DEGRADAÇÃO DO PESTICIDA PADRON® POR PROCESSOS FOTOQUÍMICOS UTILIZANDO LUZ ARTIFICIAL E SOLAR. [s. l.], v. 30, n. 8, p. 1830–1834, 2007.
- CHEN, Pan; PARMALEE, Nancy; ASCHNER, Michael. Genetic factors and manganese-induced neurotoxicity. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 5, n. AUG, p. 1–8, 2014.
- CHIU, Brian C. H. et al. Agricultural Pesticide Use , Familial Cancer , and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma. [s. l.], v. 13, n. April, p. 525–532, 2004.
- CLARKE, C. E. Parkinson's disease. **British Medical Journal**, [s. l.], v. 335, n. 7617, p. 441–445, 2007. a.
- CLARKE, C. E. Parkinson's disease. [s. l.], v. 335, n. February, p. 441–445, 2007. b.
- COHEN, Barbara; WIMMER, Ernst A.; COHEN, Stephen M. Early development of leg and wing primordia in the *Drosophila* embryo. **Mechanisms of Development**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 229–240, 1991. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/092547739190030A?via%3Dihub>>. Acesso em: 12 nov. 2019.
- COLEMAN, Rosalind A.; LEWIN, Tal M.; MUOIO, Deborah M. Physiological and Nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. **Annual Review of Nutrition**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 77–103, 2000.
- COLOSIO, Claudio et al. Ethylenethiourea in urine as an indicator of exposure to mancozeb in vineyard workers. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 134, n. 1–3, p. 133–140, 2002.
- CORNELL. Pesticide Management Education Program (PMEP): Mancozeb (Dithane M-45, Manzate 200) - Chemical Profile 4/87. **Cornell University**, [s. l.], 1987.
- CORSINI, Emanuela et al. Immunomodulatory effects of the fungicide Mancozeb in agricultural workers. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 208, n. 2, p. 178–185, 2005.
- CORSINI, Emanuela et al. Molecular mechanisms underlying mancozeb-induced inhibition of TNF-alpha production. [s. l.], v. 212, p. 89–98, 2006.
- COSTA-SILVA, Dennis Guilherme et al. Mancozeb exposure results in manganese accumulation and Nrf2-related antioxidant responses in the brain of common carp *Cyprinus carpio*. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], p. 1–12, 2018.
- COULOM, Helene; BIRMAN, Serge. Chronic Exposure to Rotenone Models Sporadic Parkinson's Disease in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 48, p. 10993–10998, 2004. Disponível em:
<<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004>>
- CRAWFORD, Dana R.; DAVIES, Kelvin J. A. Adaptive Response and Oxidative Stress. [s. l.], p. 25–28, 1994.
- DAVIES, Kelvin J. A. Oxidative Stress , Antioxidant Defenses , and Damage Removal , Repair , and Replacement Systems. [s. l.], p. 279–289, 2000.
- DE PAULA, M. T. et al. Effects of Hg (II) Exposure on MAPK Phosphorylation and Antioxidant System in *D. melanogaster*. [s. l.], n. June, p. 621–630, 2012.
- DELF, C. et al. Mancozeb Update. United Phosphorus Ltd. **Warrington, Cheshire**, [s. l.], p. 3, 2013.
- DIAZ-VÉLIZ, Gabriela et al. Behavioral effects of manganese injected in the rat substantia nigra are potentiated by dicumarol, a DT-diaphorase inhibitor. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 245–251, 2004. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305703003435?via%3Dihub>>. Acesso em: 12 nov. 2019.
- DOMICO, Lisa M. et al. Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. **NeuroToxicology**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 816–825, 2006.

- DOMICO, Lisa 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**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1079–1091, 2007.
- DOS SANTOS, Alessandra Antunes et al. Long-term and low-dose malathion exposure causes cognitive impairment in adult mice: evidence of hippocampal mitochondrial dysfunction, astrogliosis and apoptotic events. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 90, n. 3, p. 647–660, 2016.
- DUQUE, Regina; CARVALHO, Estrada. Resíduos De Agrotóxicos Organofosforados E Ditiocarbamatos Presentes Na Cultura De Tomate Consumidos No Estado De Minas Gerais Nos Anos De 2006 , 2007 E 2008 : Avaliação Da Exposição Humana Waste Organophosphate Pesticides and Dithiocarbamates Presents in. [s. l.], v. 13, p. 171–190, 2013.
- EASTON, Anna; GUVEN, Kemal; DE POMERAI, David I. Toxicity of the dithiocarbamate fungicide Mancozeb to the nontarget soil nematode, *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 15–25, 2001.
- ECKWERT, Helga; KÖHLER, Heinz R. The indicative value of the hsp70 stress response as a marker for metal effects in *Oniscus asellus* (Isopoda) field populations: Variability between populations from metal-polluted and uncontaminated sites. **Applied Soil Ecology**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 275–282, 1997.
- EMBRAPA. **NASA confirma dados da Embrapa sobre área plantada no Brasil**. 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/30972114/nasa-confirma-dados-da-embrapa-sobre-area-plantada-no-brasil>>.
- EMBRAPA. Soja em numeros safra (2017/2018). [s. l.], p. 2017–2018, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Reregistration Eligibility Decision for Mancozeb. **United States Environmental Protection Agency**, [s. l.], n. July, p. 259, 2005.
- FAO. How to Feed the World in 2050. **Insights from an expert meeting at FAO**, [s. l.], v. 2050, n. 1, p. 1–35, 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/wsfs/forum2050/wsfs-forum/en/>>
- FERNSEBNER, Katharina et al. Manganese leads to an increase in markers of oxidative stress as well as to a shift in the ratio of Fe(ii)/(iii) in rat brain tissue. **Metallomics**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 921–931, 2014.
- FRANCO, Jeferson L. et al. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: Protective effects of quercetin. **Chemical Research in Toxicology**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 1919–1926, 2007.
- GAO, Jie et al. Chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon impair the transport of membrane bound organelles in rat cortical axons. **NeuroToxicology**, [s. l.], v. 62, p. 111–123, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2017.06.003>>
- GAWEL, Stefan et al. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. **Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)**, Poland, v. 57, n. 9–10, p. 453–455, 2004.
- GLASAUER, Andrea; CHANDEL, Navdeep S. Ros. **Current Biology**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 100–102, 2013.
- GNAIGER, Erich; PESTA, Dominik; GNAIGER, Erich. **High-Resolution Respirometry : OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of ... Chapter 3 High-Resolution Respirometry : OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle**. [s.l: s.n.].
- GOLDONI, A. et al. DNA damage in Wistar rats exposed to dithiocarbamate pesticide mancozeb. **Folia Biologica (Czech Republic)**, [s. l.], v. 60, n. 4, p. 202–204, 2014.
- GULLINO, Maria Lodovica et al. Mancozeb Past, Present and Future. **Plant Disease**, [s. l.], v. 94, n. 9, p. 1076–1087, 1963.
- HALLIWELL, Barry. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical

- evaluation with special reference to atherosclerosis. **British journal of experimental pathology**, [s. l.], v. 70, n. 6, p. 737–57, 1989. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2040729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>
- HARTMANN, Marcus Luis. O comportamento dos preços dos insumos agrícolas na produção de milho e soja. **Conab**, [s. l.], 2017.
- HOFFMAN, Lisa; TROMBETTA, Louis; HARDEJ, Diane. Ethylene bisdithiocarbamate pesticides Maneb and Mancozeb cause metal overload in human colon cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 41, p. 78–88, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2015.11.002>>
- HOGARTH, Graeme. Metal-dithiocarbamate complexes: chemistry and biological activity. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 1202–1215, 2012.
- IGBOIN, Christina O.; GRIFFEN, Ann L.; LEYS, Eugene J. The *Drosophila melanogaster* host model. [s. l.], 2012.
- IKEDA, Yukio et al. Transcriptional Regulation of the Murine Acetyl-CoA Synthetase 1 Gene through Multiple Clustered Binding Sites for Sterol Regulatory Element-binding Proteins and a Single Neighboring Site for Sp1. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 276, n. 36, p. 34259–34269, 2001.
- INAMDAR, Arati A. et al. *Drosophila melanogaster* as a Model to Characterize Fungal Volatile Organic Compounds. [s. l.], p. 829–836, 2012.
- JARDIM, Andreia N. O.; CALDAS, Eloisa D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food e Results from 2001 to 2010. **Food Control**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 607–616, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.001>>
- JORDAN, Katherine W. et al. Genome-wide association for sensitivity to chronic oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 6, 2012.
- KEKES-SZABO et al. The neurotoxic effect of mancozeb in the rat. [s. l.], p. 1988, 1988.
- KOSTYUK, V. A.; POTAPOVICH, A. I. Superoxide--driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. **Biochemistry international**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 1117–24, 1989.
- KSHEERASAGAR, Raghavendra L.; KALIWAL, Basappa B. Temporal effects of mancozeb on testes, accessory reproductive organs and biochemical constituents in albino mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 9–17, 2003.
- KU, Hung-Hai; SOHAL, R. S. Comparison of mitochondrial pro-oxidant generation and anti-oxidant defenses between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential. [s. l.], v. 72, p. 2013, 2014.
- KUBRAK, Olga 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**, [s. l.], v. 85, p. 37–43, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.08.021>>
- KUMAR, Amit et al. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. **Life Sciences**, [s. l.], v. 90, n. 21–22, p. 815–824, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.12.013>>
- KUMAR, Kunal; SABARWAL, Akash; SINGH, Rana P. Mancozeb selectively induces mitochondrial-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cells through ROS generation. **Mitochondrion**, [s. l.], v. 48, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567724917303215?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 nov. 2019.
- KUSS, Fernando et al. agentes oxidantes e antioxidantes. [s. l.], 2005.
- LEE, Kwang Pum et al. Lifespan and reproduction in *Drosophila*: New insights from nutritional geometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United**

States of America, [s. l.], v. 105, n. 7, p. 2498–2503, 2008.

LEUNG, Maxwell C. K.; MEYER, Joel N. Mitochondria as a target of organophosphate and carbamate pesticides: Revisiting common mechanisms of action with new approach methodologies. **Reproductive Toxicology**, [s. l.], v. 89, p. 83–92, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623818306592>>. Acesso em: 11 nov. 2019.

LI, Lei O. et al. Overexpression of Rat Long Chain Acyl-CoA Synthetase 1 Alters Fatty Acid Metabolism in Rat Primary Hepatocytes *. [s. l.], v. 281, n. 48, p. 37246–37255, 2006.

LIU, Liqun et al. Size-fractioned particulate air pollution and cardiovascular emergency room visits in Beijing, China. [s. l.], v. 121, p. 52–63, 2013.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, O. et al. Effects of hydrochemistry variables on the half-life of mancozeb and on the hazard index associated to the sum of mancozeb and ethylenethiourea.

Environmental Research, [s. l.], v. 154, n. January, p. 253–260, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2017.01.016>>

MA, Qiang. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. **Annual Review Pharmacology Toxicologic**, [s. l.], n. 1, p. 401–426, 2016. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4680839/pdf/nihms-742707.pdf>>

MA, Qiang; HE, Xiaoqing. Molecular Basis of Electrophilic and Oxidative Defense: Promises and Perils of Nrf2. [s. l.], v. 64, n. 4, p. 1055–1081, 2012.

MAHADEVASWAMI, M. P. et al. Effect of mancozeb on ovarian compensatory hypertrophy and biochemical constituents in hemicastrated albino rat. **Reproductive Toxicology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 127–134, 2000.

MARCHAL-SÉGAULT, D. et al. Effets De Dix Fongicides Commerciaux Sur La Survie Des Adultes De Drosophila Melanogaster Meig. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 407–424, 1985.

MARQUES, Ana et al. Evidences of DNA and chromosomal damage induced by the mancozeb-based fungicide Mancozan® in fish (*Anguilla anguilla* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 133, p. 52–58, 2016.

MELKONIAN, Erica A.; SCHURY, Anoosh Zafar Gondal; Mark P. Physiology, Gluconeogenesis. **StatPearls Publishing**, [s. l.], 2019. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541119/#_NBK541119_pubdet_>

MIRANDA-CONTRERAS, Leticia et al. Effects of prenatal paraquat and mancozeb exposure on amino acid synaptic transmission in developing mouse cerebellar cortex. **Developmental Brain Research**, [s. l.], v. 160, n. 1, p. 19–27, 2005.

MITRA, Aniruddha et al. **Manganese affects behavior of Drosophila melanogaster by altering biogenic amine levels in brain** *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2012.

MONGI, Saoudi et al. Protective effects of vitamin C against haematological and biochemical toxicity induced by deltamethrin in male Wistar rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 74, n. 6, p. 1765–1769, 2011. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014765131100087X?via%3Dihub>>. Acesso em: 12 nov. 2019.

MOORE, John A. Science as a Way of Knowing—Genetics 1. [s. l.], v. 747, n. 26, p. 583–747, 1986.

MORA, Ana M. et al. Blood and Hair Manganese Concentrations in Pregnant Women from the Infants' Environmental Health Study (ISA) in Costa Rica. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 3467–3476, 2014. Disponível em:

<<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/es404279r>>

MORGAN, T. H. Sex Limited Inheritance in Drosophila Author (s): T. H. Morgan Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/1635471>. **Science**, [s. l.], v. 32, n. 812, p. 120–122, 1910.

- NAPPI, Anthony J. et al. Nitric Oxide Involvement in Drosophila Immunity. [s. l.], v. 4, n. 4, p. 423–430, 2000.
- NEGGA, Rekek et al. Exposure to Glyphosate- and/or Mn/Zn-Ethylene-bis- Dithiocarbamate-Containing Pesticides Leads to Degeneration of γ -Aminobutyric Acid and Dopamine Neurons in Caenorhabditis elegans. **Neurotox Res**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 281–290, 2012.
- NORDBY, Karl Christian et al. Indicators of mancozeb exposure in relation to thyroid cancer and neural tube defects in farmers' families. **Scandinavian Journal of Work, Environment and Health**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 89–96, 2005.
- OLSVIK, P. A. et al. mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD , CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (Salmo salar) exposed to hyperoxic water during smoltification. [s. l.], v. 141, p. 314–323, 2005.
- OPENSTAX, Anatomy & Physiology. OpenStax. **Anatomy and Physiology**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://cnx.org/contents/14fb4ad7-39a1-4eee-ab6e-3ef2482e3e22@8.24>>
- ORR, William C. et al. Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in Drosophila melanogaster. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 29, p. 26418–26422, 2003.
- OYER, Marcel M. A. Z.; ROUDART, Laurence. **História das agriculturas no mundo**. [s.l: s.n.].
- PAGANO, G. Redox-modulated xenobiotic action and ROS formation: a mirror or a window? **Human & Experimental Toxicology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 77–81, 2002. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1191/0960327102ht214oa>>
- PAVLOVIC, V. et al. The effect of ascorbic acid on mancozeb-induced toxicity in rat thymocytes. **Folia Biologica (Czech Republic)**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 116–123, 2015.
- PENNA, Claudia; ANGOTTI, Carmelina; PAGLIARO, Pasquale. Protein S-nitrosylation in preconditioning and postconditioning. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 239, n. 6, p. 647–662, 2014.
- PI, Jingbo et al. Activation of Nrf2-mediated oxidative stress response in macrophages by hypochlorous acid. [s. l.], v. 226, p. 236–243, 2008.
- PIANO, Annamaria; VALBONESI, Paola; FABBRI, Elena. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of Ostrea edulis exposed to heat and heavy metals. **Cell Stress and Chaperones**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 134–142, 2004.
- PICHAUD, Nicolas et al. Diet influences the intake target and mitochondrial functions of Drosophila melanogaster males. **Mitochondrion**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 817–822, 2013.
- PIROZZI, Anna Virginia Adriana et al. Mancozeb, a fungicide routinely used in agriculture, worsens nonalcoholic fatty liver disease in the human HepG2 cell model. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 249, p. 1–4, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.03.004>>
- PRAUCHNER, Carlos André. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. **Burns**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 471–485, 2017.
- PYZA, E. et al. Heat shock proteins (HSP70) as biomarkers in ecotoxicological studies. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, [s. l.], v. 38, n. 1997, p. 244–251, 1997.
- RADI, Rafael. Peroxynitrite , a Stealthy Biological Oxidant *. [s. l.], v. 288, n. 37, p. 26464–26472, 2013.
- REDDI, Amit R. et al. The Overlapping Roles of Manganese and Cu/Zn SOD in Oxidative Stress Protection. **NIH Public Access**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 154–162, 2009.
- REHNI, Ashish K.; DAVE, Kunjan R. Impact of Hypoglycemia on Brain Metabolism During Diabetes. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 55, n. 12, p. 9075–9088, 2018.
- RODRIGUES, Nathane Rosa et al. Activation of p38MAPK and NRF2 signaling pathways in the toxicity induced by chlorpyrifos in Drosophila melanogaster: Protective effects of Psidium guajava pomifera L. (Myrtaceae) hydroalcoholic extract. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], 2015.

- SAID ALI, K. et al. Expressions of heat shock and metallothionein genes in the heart of common carp (*Cyprinus carpio*): effects of temperature shock and heavy metal exposure. **Acta biologica Hungarica**, Hungary, v. 61, n. 1, p. 10–23, 2010.
- SAMUSSONE, Manuel. Pesticida Mancozeb : Determinação de Limites de Risco para Ecossistemas de Água Doce. [s. l.], 2014.
- SANT, Karilyn E. et al. The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of glutathione and redox dynamics in the developing zebrafish embryo. **Redox Biology**, [s. l.], v. 13, n. March, p. 207–218, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.05.023>>
- SANZ, Alberto. Biochimica et Biophysica Acta Mitochondrial reactive oxygen species : Do they extend or shorten animal lifespan ? **BBA - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1857, n. 8, p. 1116–1126, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.018>>
- SARAIVA, Miriane Acosta et al. Exposure of *Drosophila melanogaster* to Mancozeb Induces Oxidative Damage and Modulates Nrf2 and HSP70/83. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2018, 2018.
- SAÚDE, Secretaria de Vigilância em. Monitoramento de agrotóxicos na água para consumo humano no Brasil. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, [s. l.], v. 44, n. 10, p. 24, 2013.
- SCARIOT, F. J. et al. The fungicide Mancozeb induces metacaspase-dependent apoptotic cell death in *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. **Apoptosis**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 866–872, 2016.
- SCHIFFRIN, Ernesto L. Oxidative stress, nitric oxide synthase, and superoxide dismutase: A matter of imbalance underlies endothelial dysfunction in the human coronary circulation. **Hypertension**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 31–32, 2008.
- SIDDIQUI, Abrar; ALI, Basheer; SRIVASTAVA, S. P. Effect of mancozeb on hepatic glutathione S-transferase in rat. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 301–305, 1993.
- SIES, Helmut. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, [s. l.], v. 4, p. 180–183, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>>
- SIES, Helmut. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, [s. l.], v. 11, n. December 2016, p. 613–619, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>>
- SINGH, Saurabh Kumar; BANO, Farhad; MOHANTY, Banalata. Vitamin E pretreatment prevents the immunotoxicity of dithiocarbamate pesticide mancozeb in vitro : A comparative age-related assessment in mice and chick. **YPEST**, [s. l.], v. 126, p. 76–84, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.08.001>>
- SOHAL, R. S.; SOHAL, Barbara H.; BRUNK, Ulf T. Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. **Mechanisms of Ageing and Development**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 217–227, 1990.
- SRIVASTAVA, Amit Kumar et al. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. **Life Sciences**, [s. l.], 2012.
- SRIVASTAVA, Amit Kumar et al. Protective effects of lupeol against mancozeb-induced genotoxicity in cultured human lymphocytes. **Phytomedicine**, [s. l.], 2016.
- SRIVASTAVA, Pallavi; SINGH, Ajay. **Potential effects of agricultural fungicides (Mancozeb) on fish *Clarias batrachus***, 2014.
- STORELLI, Gilles et al. *Drosophila* Perpetuates Nutritional Mutualism by Promoting the Fitness of Its Intestinal Symbiont *Lactobacillus plantarum* Article *Drosophila* Perpetuates Nutritional Mutualism by Promoting the Fitness of Its Intestinal Symbiont *Lactobacillus plantarum*. [s. l.], p. 362–377, 2018.
- THOMAS, Carin et al. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: Implications for diseases associated with iron accumulation. **Redox Report**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 102–108, 2009.
- TILTON, Fred et al. Dithiocarbamates have a common toxic effect on zebrafish body axis formation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 216, n. 1, p. 55–68, 2006.

- TRINDADE DE PAULA, Mariane et al. High-Fat Diet Induces Oxidative Stress and MPK2 and HSP83 Gene Expression in *Drosophila melanogaster*. **Oxidative medicine and cellular longevity**, [s. l.], v. 2016, p. 4018157, 2016.
- TSANG, M. M.; TROMBETTA, L. D. The protective role of chelators and antioxidants on mancozeb-induced toxicity in rat hippocampal astrocytes. [s. l.], p. 459–470, 2007. USP. *Biologia Celular - Módulo 1*. [s. l.], 2010.
- UTTARA, Bayani et al. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], 2009.
- VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.
- VAN WENDEL DE JOODE, Berna et al. Pesticide exposure and neurodevelopment in children aged 6–9 years from Talamanca, Costa Rica. **Cortex**, [s. l.], v. 85, p. 137–150, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cortex.2016.09.003>>
- VAZIRI, Nosratola D. Protective Effect of Nrf2 and Catalase in Maternal Diabetes-Induced Perinatal Hypertension and Kidney Disease. **Diabetes**, [s. l.], v. 61, n. 10, p. 2400–2402, 2012.
- VOGEL, Christine; SILVA, Gustavo Monteiro; MARCOTTE, Edward M. Protein Expression Regulation under Oxidative Stress. **Molecular & Cellular Proteomics**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. M111.009217, 2011. Disponível em: <<http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M111.009217>>
- WILSON, B. OS PRIMEIROS TRABALHOS COM DROSOPHILA MELANOGASTER. [s. l.], n. 82, 1986.
- WUNDERLICH, Zeba; BRAGDON, Meghan D.; DEPACE, Angela H. Comparing mRNA levels using in situ hybridization of a target gene and. **Methods**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 233–241, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.01.003>>
- XU, Sue. Environment fate of mancozeb. **Environmental fate of mancozeb**, [s. l.], p. 1–10, 2000.
- YAHIA, Doha; EL-AMIR, Yasmin O.; RUSHDI, Mahmoud. Mancozeb fungicide-induced genotoxic effects, metabolic alterations, and histological changes in the colon and liver of Sprague Dawley rats. **Toxicology and Industrial Health**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 265–276, 2019.
- YAHIA, E. et al. Subchronic Mancozeb Treatment Induced Liver Toxicity Via Oxidative Stress in Male Wistar Rats. **Communications in agricultural and applied biological sciences**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 553–559, 2014.
- YASUGI, Tetsuo; YAMADA, Takayuki; NISHIMURA, Takashi. Adaptation to dietary conditions by trehalose metabolism in *Drosophila*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 2–10, 2017.
- YORINORI, José; JUNIOR, José; LAZZAROTTO, Joelsio. Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. **Documentos/Embrapa Soja**, [s. l.], v. 1, p. 36, 2004.
- ZHANG, Jing et al. Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: A link through mitochondrial dysfunction. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 336–346, 2003.
- ZOU, Xianghui et al. Manganese superoxide dismutase (SOD2): is there a center in the universe of mitochondrial redox signaling ? [s. l.], p. 325–333, 2017.

4. DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar alterações nos padrões bioquímicos, comportamentais e gênico de machos das moscas da fruta (*Drosophila melanogaster*), expostas ao etileno-bis-ditiocarbamato Mancozebe, um fungicida amplamente utilizado na agricultura, principalmente para o cultivo de soja (*Glycine max L.*). *D. melanogaster* foram expostas por quinze dias ao Mancozebe misturado ao seu meio de alimentação padrão, a polenta de farinha de milho. Estudos já publicados indicam que o MZ é responsável por reduzir o tempo de vida das moscas da fruta, bem como reduzir sua capacidade reprodutiva, resultando em menor número de crias (MARCHAL-SÉGAULT et al., 1985). Entretanto, este é o primeiro estudo descrevendo alvos e mecanismos moleculares de toxicidade do MZ sobre drosófilas.

Em estudos prévios nosso grupo demonstrou que a ingestão de MZ pelas moscas aumentou os níveis de manganês (Mn) de forma dose-dependente (SARAIVA et al., 2018) bem como no cérebro de carpas (COSTA-SILVA et al., 2018). O Mn consiste em um dos principais subprodutos da degradação do MZ, o acúmulo de Mn em regiões específicas do cérebro está relacionado à neurotoxicidade e também com sintomas comportamentais semelhantes aos apresentados na doença de Parkinson em humanos e roedores (BOUCHARD et al., 2007; CHEN; PARMALEE; ASCHNER, 2014; FRANCO et al., 2007).

Assim como em vertebrados, a exposição e acúmulo de Mn altera a capacidade locomotora em drosófilas (CHEN; PARMALEE; ASCHNER, 2014; MITRA et al., 2012). Foi demonstrado que a indução de toxicidade neuronal pelo MZ está relacionada à ligação do Mn à cadeia orgânica do composto (DOMICO et al., 2007). O estresse oxidativo é indicado como o principal mecanismo implicado nos danos induzidos pelo Mn. O Mn pode induzir a geração de espécies reativas a partir da oxidação do Mn^{2+} a Mn^{3+} que catalisam a oxidação da dopamina com a formação de intermediários reativos tóxicos (DIAZ-VÉLIZ et al., 2004). Mn também pode aumentar a proporção de ferro (II)/Fe (III), que pode então promover o estresse oxidativo via reação de Fenton (FERNSEBNER et al., 2014). Logo, o acúmulo de Mn causado pela exposição ao fungicida MZ como foi demonstrado pela medição ICP-OS, pode contribuir para o dano oxidativo e alteração comportamental em moscas da fruta através de alguns dos mecanismos já mencionados.

MZ estimula a atividade da GST, este efeito foi descrito também em tecido hepático de ratos e no tecido cerebral de carpas (COSTA-SILVA et al., 2018; SIDDIQUI; ALI; SRIVASTAVA, 1993). O grupo de proteínas GST desempenha múltiplas funções, incluindo a proteção celular contra o estresse oxidativo e potenciais compostos tóxicos, via conjugação da

Glutathione (GSH) em diversas moléculas e produtos do metabolismo oxidativo e diminui a toxicidade destes, contribuindo para sua eliminação do meio intra celular (BALAJI; RAJENDAR; RAMANATHAN, 2014). A atividade aumentada da GST foi observada em ambas concentrações de MZ testadas e ocorreu em paralelo com a diminuição e redução da Glutathione, indicando que há ativação do mecanismo de detoxificação mediado por GST em moscas da fruta em resposta ao MZ.

Desde as formas primitivas de vida, a enzima SOD e Catalase são as enzimas primárias na remoção de espécies reativas de oxigênio. A enzima superóxido dismutase catalisa a dismutação do superóxido ($O_2^{\circ-}$) ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é um produto extremamente tóxico e que deve ser rapidamente removido do interior da célula, já a catalase detoxifica o H_2O_2 reduzindo-o a água e oxigênio (UTTARA et al., 2009). Neste trabalho, MZ inibiu a atividade da enzima SOD significativamente, estes resultados são similares aos observados no cérebro de carpas e em eritrócitos humanos expostos ao MZ (COSTA-SILVA et al., 2018; RADI, 2013).

Ditiocarbamatos apresentam capacidade quelante de metais presentes no centro ativo de enzimas e que contribuem para inibição destas, como foi observado para a SOD (HOGARTH, 2012). Como nenhuma alteração nos níveis de RNAm da SOD foram observados neste estudo, sugere-se uma ação direta do MZ sobre a enzima SOD levando a sua inibição. Como consequência, um desequilíbrio do sistema antioxidante resultado da inibição da SOD poderia causar aumento nos níveis de $O_2^{\circ-}$, que por sua vez, pode reagir com $^{\circ}NO$, gerando peroxinitrito, um potencial composto oxidante que tem efeito sobre a função mitocondrial e conduz a morte celular via reações de oxidação e nitratação (VAZIRI, 2012). Esta hipótese poderia justificar os níveis de óxido nítrico diminuídos, como consequência da inibição da enzima SOD, assim potencializando o efeito pro-oxidante do MZ, contribuindo para danos oxidativos em biomoléculas, como evidenciado pelo aumento de malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica a partir da decomposição de hidroperóxidos lipídicos.

Nrf2 (Nuclear Related Factor 2) tem sua estrutura bem conservada nos vertebrados. Assim como em mamíferos, nas drosófilas este fator regula a expressão constitutiva e a indução coordenada de muitos genes que codificam antioxidantes e enzimas de detoxificação de fase 2 entre outras proteínas relacionadas, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase, UDP-glucuronosiltransferase, NAD(P) H:quinona oxidoreductase-1 (NQO1), hemeoxigenase-1, glutamato cisteína ligase, glutathione S-transferase, glutathione peroxidase e

tio redoxina (RADI, 2013). Nrf2 é atuante na promoção de resistência celular a agentes químicos, como o paraquat e o arsênico (MA, 2016; MA; HE, 2012).

Outro grupo importante de proteínas na resposta a xenobióticos são as proteínas de choque térmico, as quais atuam como agente protetores frente aos danos celulares do estresse oxidativo (ECKWERT; KÖHLER, 1997; PIANO; VALBONESI; FABBRI, 2004; PYZA et al., 1997; SAID ALI et al., 2010). Estas proteínas atuam no correto enovelamento de proteínas nascentes e na correção de proteínas com erros de enovelamento. Os genes que codificam HSPs são conhecidos como “genes de estresse”, e são indicadores de toxicidade celular em resposta a diversos estressores ambientais (ECKWERT; KÖHLER, 1997; PIANO; VALBONESI; FABBRI, 2004; PYZA et al., 1997; SAID ALI et al., 2010). Neste estudo, níveis aumentados de RNAm dos genes Nrf2, Catalase, HSP70 e HSP83 foram observados na concentração de 5mg/mL, sugerindo uma resposta adaptativa nas moscas em resposta à concentração mais baixa de MZ na dieta (BALAJI; RAJENDAR; RAMANATHAN, 2014; RADI, 2013). Na concentração mais alta houve um decréscimo nos níveis de RNAm dos genes Nrf2, HSP70 e HSP83 sendo que para Catalase permaneceu aumentado. Os níveis de RNAm de SOD e Catalase não apresentaram o mesmo perfil da atividade de tais enzimas. Este resultado é intrigante, mas pode ser explicado tendo em vista a estabilidade das proteínas em comparação com o RNAm. Demonstrou-se que frente a um dano oxidativo os níveis de proteína SOD e outras proteínas antioxidantes aumentaram durante os primeiros trinta minutos e permaneceram constantes ou discretamente diminuídos ao longo do tempo, enquanto o conteúdo de RNAm diminuiu após trinta minutos do insulto oxidante (VOGEL; SILVA; MARCOTTE, 2011). Tal estudo demonstrou primeiramente que a estabilidade das proteínas são superiores ao do RNAm mas também levanta a hipótese de poder haver uma taxa aumentada de tradução de proteína por RNAm disponível. Neste aspecto, levando em consideração os dados do presente trabalho a atividade aumentada de catalase em 10 mg/mL sem alterar os níveis de RNAm, poderia representar um evento temporal que levará a uma diminuição da expressão e atividade de enzimas antioxidantes ao longo do tempo.

Tendo em vista a participação da mitocôndria como uma fonte de espécies reativas e evidências de estudos que demonstraram esta organela como um alvo importante de agroquímicos (DOS SANTOS et al., 2016; KUMAR; SABARWAL; SINGH, 2019), analisou-se neste trabalho o consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas das moscas expostas *in vivo* ao MZ seguindo o mesmo protocolo de exposição. O estado metabólico geral das moscas foi investigado pela medição dos substratos energéticos e pesagem da massa

corporal das moscas. Observou-se um aumento dos níveis de triglicerídeos ao passo que houve uma diminuição dos níveis de glicose, glicogênio e trealose. Estes resultados estão em consonância com Yahia *et al.* 2014 (YAHIA; EL-AMIR; RUSHDI, 2019; YAHIA *et al.*, 2014) que demonstrou que a exposição de ratos ao MZ aumentou os níveis de triglicerídeos e diminuiu os níveis de glicose no soro. No presente estudo, houve redução da massa corporal das moscas na concentração mais baixa. Experimentos conduzidos por Mongi *et al.* 2011 (MONGI *et al.*, 2011), demonstraram perda de peso em ratos tratados com o pesticida deltametrina. Duas hipóteses podem explicar a perda de peso em resposta ao MZ, a primeira pode estar relacionada com uma diminuição no consumo de alimento, outra hipótese poderia ser uma baixa absorção de nutrientes devido ao dano causado pelo MZ no trato gastrointestinal (YASUGI; YAMADA; NISHIMURA, 2017), e assim impactando os níveis de glicose e dissacarídeos como a trealose no corpo das moscas da fruta.

Em condições aeróbicas, as duas moléculas de piruvato produzidas a partir de uma molécula de glicose, são transportadas para a mitocôndria, entrando no ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico) e contribuindo com equivalentes redutores para a cadeia transportadora de elétrons (MELKONIAN; SCHURY, 2019). Em uma situação onde ocorra níveis mais baixos de glicose por um período de tempo mais longo, como na hipoglicemia crônica, há uma diminuição no estado 3 (adição de ADP) e da taxa de controle respiratório (RCR) (REHNI; DAVE, 2018). Assim sendo, os níveis mais baixos de glicose mostrados neste estudo, poderiam diminuir a taxa de respiração mitocondrial devido aos níveis mais baixos de substrato para a alimentação do ciclo de Krebs. Triglicerídeos consistem em importante fonte de energia sendo quebrados em ácidos graxos e glicerol. Quando existe uma baixa disponibilidade de glicose como em um jejum prolongado, por exemplo, os ácidos graxos resultantes são oxidados por β -oxidação em acetil-CoA, que é usada no ciclo de Krebs para gerar ATP através da respiração aeróbica, da mesma forma que a acetil-CoA derivada do piruvato (OPENSTAX, 2010).

Neste estudo, houve um aumento nos níveis de triglicerídeos induzido pela exposição ao MZ. Este fato pode ser associado com a menor demanda de acetil-CoA atribuída a inibição de complexos mitocondriais e menores taxas de respiração. Outra hipótese poderia ser uma indução na biossíntese de lipídios pela aumentada expressão de enzimas que participam deste processo. Assim sendo, foi avaliada a possível indução na biossíntese de lipídeos pela análise dos níveis de acetil-CoA sintetase citoplasmática (ACeCS1). Esta enzima catalisa a conversão de acetato e CoA para acetil-CoA, que é usada na biossíntese de lipídeos e ácidos graxos

(IKEDA et al., 2001). A expressão de ACeCS1 foi quantificada pelo uso de anticorpos específicos. Os resultados demonstraram que não houve alteração nos níveis desta enzima na concentração mais alta de MZ ao passo que uma significativa diminuição ocorreu na concentração mais baixa. Pode-se concluir que a diminuição observada nesta enzima não foi suficiente para prevenir o aumento dos níveis de triglicerídeos induzidos pela exposição ao MZ. Acil-CoA sintetase de cadeia longa (ACSL) catalisa o primeiro passo do metabolismo de ácidos graxos pela conversão de ácidos graxos de cadeia longa em acil CoA tioésteres. Acyl-CoA sintetase participa de rotas anabólicas e catabólicas e a alteração destas rotas é ligada a desordens hepáticas, como a esteatose hepática, hiperlipidemia e resistência a insulina (LI et al., 2006). Nesta linha, não foi observado alteração na expressão desta enzima nos tratamentos com MZ (dados não mostrados).

A atividade mitocondrial é essencial para a sobrevivência de organismos aeróbicos e o funcionamento da bioenergética mitocondrial é um alvo importante dos pesticidas (GAO et al., 2017; LEUNG; MEYER, 2019). Disfunções na maquinaria mitocondrial são associadas com inúmeras patologias como doenças degenerativas como o mal de Parkinson e a Doença de Alzheimer (CLARKE, 2007; PRAUCHNER, 2017; UTTARA et al., 2009). Estudos prévios demonstraram que o MZ inibiu o complexo I da cadeia de transporte de elétrons e a geração de ATP e induziu a geração de peróxido de hidrogênio no tecido cerebral, sendo que o mesmo não foi observado para o metabólito Etilenotriuréia (ETU) ou para a cadeia orgânica de MZ desprovida do íon Mn em culturas de células nervosas (DOMICO et al., 2006, 2007; SRIVASTAVA et al., 2016). Danos em mitocôndrias causados por contaminantes ambientais podem impactar a produção de energia celular e induzir a produção de espécies reativas de oxigênio. Em estudos anteriores, observou-se o efeito oxidativo do MZ em moscas da fruta causando lipoperoxidação em drosófilas expostas a MZ, aumentando os níveis de MDA seguidos pela fluorescência do composto DCFDA e alteração da atividade de enzimas antioxidantes (SARAIVA et al., 2018). O déficit da atividade mitocondrial poderia em parte, contribuir para tais efeitos.

Neste estudo, para avaliar os efeitos do fungicida a nível mitocondrial, foi verificada a função bioenergética mitocondrial usando para isto a análise por respirometria de alta resolução (HRR, sigla em inglês de high resolution respirometry). Nossos resultados indicam que a exposição ao MZ diminuiu a eficiência bioenergética em 5 mg/mL ($CI_{oxphos} - CI_{LEAK}$), este processo é associado com a alteração no sistema de transporte de elétrons e a capacidade de fosforilação podendo culminar em uma redução na produção de ATP. O ensaio mostrou

também que MZ promove uma diminuição da taxa de controle respiratório para concentração de 5 mg/mL. Este resultado pode sugerir que MZ desencadeia o desequilíbrio da função mitocondrial a partir dos possíveis danos causados à membrana interna mitocondrial, uma vez que a integridade da membrana externa mitocondrial foi comprovada pelo ensaio do citocromo c. Somados, os dados da respirometria indicam que o MZ perturba a atividade respiratória fornecida pelo complexo I e II e seus substratos ativos (CI_{OXPHOS} e Complexo II CII_{OXPHOS}). Este efeito pode ser pelo menos em parte atribuído ao sistema OXPHOS, incluindo o carreador de ADP e o ATP e a síntese de ATP. Neste contexto, o efeito de MZ foi explorado sobre o sistema de transporte de elétron na presença de um desacoplador (FCCP), nestas condições a respiração está em sua máxima capacidade, mimetizando um mecanismo fisiológico de demanda energética, conduzindo ao aumento do consumo de oxigênio. Foi observado desequilíbrio da cadeia de transporte de elétrons no $CIC + CII$ ETS em resposta ao MZ. Mudanças no fluxo de elétrons induzem a geração de espécies reativas de oxigênio que podem levar a dano mitocondrial (THOMAS et al., 2009).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados indicam que a exposição prolongada ao fungicida MZ, induz alterações locomotoras e a morte em *D. melanogaster* submetidas ao protocolo de exposição pela ingestão do mesmo. A condição celular de estresse oxidativo, revelado pelo decréscimo dos níveis de tiol e atividade enzimática alterada, bem como a aumentados níveis de MDA poderiam demonstrar que houve dano oxidativo a biomembranas, o que poderia ter contribuído para a morte celular e aumento da mortalidade observada. O perfil de expressão gênica, com aumento da expressão de RNAm na concentração mais baixa, sugere uma resposta adaptativa ao dano oxidativo.

Outro dado relevante refere-se ao efeito do MZ sobre a cadeia transportadora de elétrons presente nas mitocôndrias, causando comprometimento da capacidade bioenergética, que pode reduzir a produção de ATP utilizado em atividades celulares básicas. Este fato pode contribuir para o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pela inibição de complexos I e II mitocondriais levando ao estresse e dano oxidativo a longo prazo como evidenciado no primeiro estudo. Em paralelo os substratos energéticos como glicose e trealose foram diminuídos e o aumento dos níveis de triglicérides foi observado demonstrando o que poderia repercutir em uma diminuição na biodisponibilidade de substratos, somando-se com a inibição da atividade da organela. Nossos resultados mostram que assim como em estudos com modelos vertebrados, as mitocôndrias das *D. melanogaster* são alvo da ação do fungicida, que desequilibra marcadores metabólicos, bem como a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, que culminam com a produção/liberação de espécies reativas de oxigênio que causam dano oxidativo no organismo.

Estes dados chamam atenção para os potenciais efeitos do MZ sobre as moscas da fruta, que assim como para os demais insetos, incluindo os que realizam atividade polinizadora e representam organismos não alvo da ação deste fungicida. Além disso descreve alvos moleculares que podem ser modulados pela ação de agroquímicos contribuindo assim para a toxicidade do mesmo sendo potenciais alvos terapêuticos frente a toxicidade deste composto.

6. REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. D. et al. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, [s. l.], v. 287, n. 5461, p. 2185–2195, 2000.
- AGENCY, Health Canada Pest Management Regulatory. Mancozeb. [s. l.], n. July, 2013.
- ALVES, Viviane Moreira; JULIATTI, Fernando Cezar. Fungicidas no manejo da ferrugem da soja, processos fisiológicos e produtividade da cultura. [s. l.], p. 245–251, 2018.
- ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) - Relatório 2013-2015. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.**, [s. l.], 2016.
- ATAMANIUK, Tetiana M. et al. The Mancozeb-Containing Carbamate Fungicide Tattoo Induces Mild Oxidative Stress in Goldfish. [s. l.], p. 1–9, 2013.
- AXELSTAD, Marta et al. Exposure to the Widely Used Fungicide Mancozeb Causes Thyroid Hormone Disruption in Rat Dams but No Behavioral Effects in the Offspring. **Toxicological Sciences**, [s. l.], v. 120, n. 2, p. 439–446, 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/toxsci/article/1670226/Exposure>>
- BAILEY, Denise C. et al. *Caenorhabditis elegans* chronically exposed to a Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate fungicide show mitochondrial Complex I inhibition and increased reactive oxygen species. **NeuroToxicology**, [s. l.], 2016.
- BALAJI, Bhaskar; RAJENDAR, Bandi; RAMANATHAN, Muthiah. Quercetin protected isolated human erythrocytes against mancozeb-induced oxidative stress. **Toxicology and Industrial Health**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 561–569, 2014.
- BALARDIN, Ricardo Silveiro. Mancozebe muito além de um fungicida. **Mancozebe: muito Além de Um Fungicida**, [s. l.], p. 147, 2017.
- BASF. Acrobat MZ. **BASF chemical Company**, [s. l.], p. 1–12, 2017.
- BOAS BALIEIRA, Kamília Vilas. Efeito oxidante do imidacloprido em abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) e potencial ação antioxidante da cafeína. [s. l.], 2017.
- BOUCHARD, M. et al. Neurobehavioral functioning after cessation of manganese exposure: A follow-up after 14 years. **American Journal of Industrial Medicine**, [s. l.], v. 50, n. 11, p. 831–840, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17096374>>
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRASIL., Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de

Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. [s.l: s.n.].

BRODY, A. Harrison et al. Mancozeb-induced behavioral deficits precede structural neural degeneration. **NeuroToxicology**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 74–81, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2012.10.007>>

CALDAS, E. D.; TRESSOU, J.; BOON, P. E. Dietary exposure of Brazilian consumers to dithiocarbamate pesticides — A probabilistic approach. [s. l.], v. 44, p. 1562–1571, 2006.

CALVERT, Geoffrey M. et al. Case report: three farmworkers who gave birth to infants with birth defects closely grouped in time and place-Florida and North Carolina, 2004-2005.

Environmental health perspectives, [s. l.], v. 115, n. 5, p. 787–91, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17520069>>

CALVIELLO, Gabriella et al. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], 2006.

CARVALHO, Nélon R. De et al. Eugenia uniflora Leaves Essential Oil Promotes Mitochondrial Dysfunction In Drosophila melanogaster Through The Inhibition Of Oxidative Phosphorylation. [s. l.], 2017.

CÉSAR, Silvio; TEIXEIRA, Godinho; CANELA, Cristina. DEGRADAÇÃO DO PESTICIDA PADRON® POR PROCESSOS FOTOQUÍMICOS UTILIZANDO LUZ ARTIFICIAL E SOLAR. [s. l.], v. 30, n. 8, p. 1830–1834, 2007.

CHEN, Pan; PARMALEE, Nancy; ASCHNER, Michael. Genetic factors and manganese-induced neurotoxicity. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 5, n. AUG, p. 1–8, 2014.

CHIU, Brian C. H. et al. Agricultural Pesticide Use , Familial Cancer , and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma. [s. l.], v. 13, n. April, p. 525–532, 2004.

CLARKE, C. E. Parkinson's disease. **British Medical Journal**, [s. l.], v. 335, n. 7617, p. 441–445, 2007. a.

CLARKE, C. E. Parkinson ' s disease. [s. l.], v. 335, n. February, p. 441–445, 2007. b.

COHEN, Barbara; WIMMER, Ernst A.; COHEN, Stephen M. Early development of leg and wing primordia in the Drosophila embryo. **Mechanisms of Development**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 229–240, 1991. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/092547739190030A?via%3Dihub>>.

Acesso em: 12 nov. 2019.

COLEMAN, Rosalind A.; LEWIN, Tal M.; MUOIO, Deborah M. Physiological and

Nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. **Annual Review of Nutrition**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 77–103, 2000.

COLOSIO, Claudio et al. Ethylenethiourea in urine as an indicator of exposure to mancozeb in vineyard workers. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 134, n. 1–3, p. 133–140, 2002.

CORNELL. Pesticide Management Education Program (PMEP): Mancozeb (Dithane M-45, Manzate 200) - Chemical Profile 4/87. **Cornell University**, [s. l.], 1987.

CORSINI, Emanuela et al. Immunomodulatory effects of the fungicide Mancozeb in agricultural workers. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 208, n. 2, p. 178–185, 2005.

CORSINI, Emanuela et al. Molecular mechanisms underlying mancozeb-induced inhibition of TNF- α production. [s. l.], v. 212, p. 89–98, 2006.

COSTA-SILVA, Dennis Guilherme et al. Mancozeb exposure results in manganese accumulation and Nrf2-related antioxidant responses in the brain of common carp *Cyprinus carpio*. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], p. 1–12, 2018.

COULOM, Helene; BIRMAN, Serge. Chronic Exposure to Rotenone Models Sporadic Parkinson's Disease in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 48, p. 10993–10998, 2004. Disponível em:

<<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004>>

CRAWFORD, Dana R.; DAVIES, Kelvin J. A. Adaptive Response and Oxidative Stress. [s. l.], p. 25–28, 1994.

DAVIES, Kelvin J. A. Oxidative Stress , Antioxidant Defenses , and Damage Removal , Repair , and Replacement Systems. [s. l.], p. 279–289, 2000.

DE PAULA, M. T. et al. Effects of Hg (II) Exposure on MAPK Phosphorylation and Antioxidant System in *D . melanogaster*. [s. l.], n. June, p. 621–630, 2012.

DELF, C. et al. Mancozeb Update. United Phosphorus Ltd. **Warrington, Cheshire**, [s. l.], p. 3, 2013.

DIAZ-VÉLIZ, Gabriela et al. Behavioral effects of manganese injected in the rat substantia nigra are potentiated by dicumarol, a DT-diaphorase inhibitor. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 245–251, 2004. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091305703003435?via%3Dihub>>.

Acesso em: 12 nov. 2019.

DOMICO, Lisa M. et al. Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. **NeuroToxicology**, [s. l.], v.

27, n. 5, p. 816–825, 2006.

DOMICO, Lisa 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**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1079–1091, 2007.

DOS SANTOS, Alessandra Antunes et al. Long-term and low-dose malathion exposure causes cognitive impairment in adult mice: evidence of hippocampal mitochondrial dysfunction, astrogliosis and apoptotic events. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 90, n. 3, p. 647–660, 2016.

DUQUE, Regina; CARVALHO, Estrada. Resíduos De Agrotóxicos Organofosforados E Ditiocarbamatos Presentes Na Cultura De Tomate Consumidos No Estado De Minas Gerais Nos Anos De 2006 , 2007 E 2008 : Avaliação Da Exposição Humana Waste Organophosphate Pesticides and Dithiocarbamates Presents in. [s. l.], v. 13, p. 171–190, 2013.

EASTON, Anna; GUVEN, Kemal; DE POMERAI, David I. Toxicity of the dithiocarbamate fungicide Mancozeb to the nontarget soil nematode, *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 15–25, 2001.

ECKWERT, Helga; KÖHLER, Heinz R. The indicative value of the hsp70 stress response as a marker for metal effects in *Oniscus asellus* (Isopoda) field populations: Variability between populations from metal-polluted and uncontaminated sites. **Applied Soil Ecology**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 275–282, 1997.

EMBRAPA. **NASA confirma dados da Embrapa sobre área plantada no Brasil**. 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/30972114/nasa-confirma-dados-da-embrapa-sobre-area-plantada-no-brasil>>.

EMBRAPA. Soja em numeros safra (2017/2018). [s. l.], p. 2017–2018, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>>

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Reregistration Eligibility Decision for Mancozeb. **United States Environmental Protection Agency**, [s. l.], n. July, p. 259, 2005.

FAO. How to Feed the World in 2050. **Insights from an expert meeting at FAO**, [s. l.], v. 2050, n. 1, p. 1–35, 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/wsfs/forum2050/wsfs-forum/en/>>

FERNSEBNER, Katharina et al. Manganese leads to an increase in markers of oxidative stress as well as to a shift in the ratio of Fe(ii)/(iii) in rat brain tissue. **Metallomics**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 921–931, 2014.

FRANCO, Jeferson L. et al. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain

- mitochondria: Protective effects of quercetin. **Chemical Research in Toxicology**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 1919–1926, 2007.
- GAO, Jie et al. Chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon impair the transport of membrane bound organelles in rat cortical axons. **NeuroToxicology**, [s. l.], v. 62, p. 111–123, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2017.06.003>>
- GAWEL, Stefan et al. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. **Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)**, Poland, v. 57, n. 9–10, p. 453–455, 2004.
- GLASAUER, Andrea; CHANDEL, Navdeep S. Ros. **Current Biology**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 100–102, 2013.
- GNAIGER, Erich; PESTA, Dominik; GNAIGER, Erich. **High-Resolution Respirometry : OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of ... Chapter 3 High-Resolution Respirometry : OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle**. [s.l: s.n.].
- GOLDONI, A. et al. DNA damage in Wistar rats exposed to dithiocarbamate pesticide mancozeb. **Folia Biologica (Czech Republic)**, [s. l.], v. 60, n. 4, p. 202–204, 2014.
- GULLINO, Maria Lodovica et al. Mancozeb Past, Present and Future. **Plant Disease**, [s. l.], v. 94, n. 9, p. 1076–1087, 1963.
- HALLIWELL, Barry. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. **British journal of experimental pathology**, [s. l.], v. 70, n. 6, p. 737–57, 1989. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2040729&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>
- HARTMANN, Marcus Luis. O comportamento dos preços dos insumos agrícolas na produção de milho e soja. **Conab**, [s. l.], 2017.
- HOFFMAN, Lisa; TROMBETTA, Louis; HARDEJ, Diane. Ethylene bisdithiocarbamate pesticides Maneb and Mancozeb cause metal overload in human colon cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 41, p. 78–88, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2015.11.002>>
- HOGARTH, Graeme. Metal-dithiocarbamate complexes: chemistry and biological activity. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 1202–1215, 2012.
- IGBOIN, Christina O.; GRIFFEN, Ann L.; LEYS, Eugene J. The Drosophila melanogaster host model. [s. l.], 2012.
- IKEDA, Yukio et al. Transcriptional Regulation of the Murine Acetyl-CoA Synthetase 1

- Gene through Multiple Clustered Binding Sites for Sterol Regulatory Element-binding Proteins and a Single Neighboring Site for Sp1. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 276, n. 36, p. 34259–34269, 2001.
- INAMDAR, Arati A. et al. *Drosophila melanogaster* as a Model to Characterize Fungal Volatile Organic Compounds. [s. l.], p. 829–836, 2012.
- JARDIM, Andreia N. O.; CALDAS, Eloisa D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food e Results from 2001 to 2010. **Food Control**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 607–616, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.001>>
- JORDAN, Katherine W. et al. Genome-wide association for sensitivity to chronic oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 6, 2012.
- KEKES-SZABO et al. The neurotoxic effect of mancozeb in the rat. [s. l.], p. 1988, 1988.
- KOSTYUK, V. A.; POTAPOVICH, A. I. Superoxide--driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. **Biochemistry international**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 1117–24, 1989.
- KSHEERASAGAR, Raghavendra L.; KALIWAL, Basappa B. Temporal effects of mancozeb on testes, accessory reproductive organs and biochemical constituents in albino mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 9–17, 2003.
- KU, Hung-Hai; SOHAL, R. S. Comparison of mitochondrial pro-oxidant generation and anti-oxidant defenses between rat and pigeon: possible basis of variation in longevity and metabolic potential. [s. l.], v. 72, p. 2013, 2014.
- KUBRAK, Olga 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**, [s. l.], v. 85, p. 37–43, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.08.021>>
- KUMAR, Amit et al. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. **Life Sciences**, [s. l.], v. 90, n. 21–22, p. 815–824, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.12.013>>
- KUMAR, Kunal; SABARWAL, Akash; SINGH, Rana P. Mancozeb selectively induces mitochondrial-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cells through ROS generation. **Mitochondrion**, [s. l.], v. 48, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567724917303215?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 nov. 2019.
- KUSS, Fernando et al. agentes oxidantes e antioxidantes. [s. l.], 2005.

- LEE, Kwang Pum et al. Lifespan and reproduction in *Drosophila*: New insights from nutritional geometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 105, n. 7, p. 2498–2503, 2008.
- LEUNG, Maxwell C. K.; MEYER, Joel N. Mitochondria as a target of organophosphate and carbamate pesticides: Revisiting common mechanisms of action with new approach methodologies. **Reproductive Toxicology**, [s. l.], v. 89, p. 83–92, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623818306592>>. Acesso em: 11 nov. 2019.
- LI, Lei O. et al. Overexpression of Rat Long Chain Acyl-CoA Synthetase 1 Alters Fatty Acid Metabolism in Rat Primary Hepatocytes *. [s. l.], v. 281, n. 48, p. 37246–37255, 2006.
- LIU, Liqun et al. Size-fractioned particulate air pollution and cardiovascular emergency room visits in Beijing , China. [s. l.], v. 121, p. 52–63, 2013.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, O. et al. Effects of hydrochemistry variables on the half-life of mancozeb and on the hazard index associated to the sum of mancozeb and ethylenethiourea. **Environmental Research**, [s. l.], v. 154, n. January, p. 253–260, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2017.01.016>>
- MA, Qiang. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. **Annual Review Pharmacology Toxicologic**, [s. l.], n. 1, p. 401–426, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4680839/pdf/nihms-742707.pdf>>
- MA, Qiang; HE, Xiaoqing. Molecular Basis of Electrophilic and Oxidative Defense: Promises and Perils of Nrf2. [s. l.], v. 64, n. 4, p. 1055–1081, 2012.
- MAHADEVASWAMI, M. P. et al. Effect of mancozeb on ovarian compensatory hypertrophy and biochemical constituents in hemicastrated albino rat. **Reproductive Toxicology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 127–134, 2000.
- MARCHAL-SÉGAULT, D. et al. Effets De Dix Fongicides Commerciaux Sur La Survie Des Adultes De *Drosophila Melanogaster* Meig. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 407–424, 1985.
- MARQUES, Ana et al. Evidences of DNA and chromosomal damage induced by the mancozeb-based fungicide Mancozan® in fish (*Anguilla anguilla* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 133, p. 52–58, 2016.
- MELKONIAN, Erica A.; SCHURY, Anoosh Zafar Gondal; Mark P. Physiology, Gluconeogenesis. **StatPearls Publishing**, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541119/#_NBK541119_pubdet_>

MIRANDA-CONTRERAS, Leticia et al. Effects of prenatal paraquat and mancozeb exposure on amino acid synaptic transmission in developing mouse cerebellar cortex. **Developmental Brain Research**, [s. l.], v. 160, n. 1, p. 19–27, 2005.

MITRA, Aniruddha et al. **Manganese affects behavior of *Drosophila melanogaster* by altering biogenic amine levels in brain** *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2012.

MONGI, Saoudi et al. Protective effects of vitamin C against haematological and biochemical toxicity induced by deltamethrin in male Wistar rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 74, n. 6, p. 1765–1769, 2011. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014765131100087X?via%3Dihub>>.

Acesso em: 12 nov. 2019.

MOORE, John A. Science as a Way of Knowing—Genetics 1. [s. l.], v. 747, n. 26, p. 583–747, 1986.

MORA, Ana M. et al. Blood and Hair Manganese Concentrations in Pregnant Women from the Infants' Environmental Health Study (ISA) in Costa Rica. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 48, n. 6, p. 3467–3476, 2014. Disponível em:

<<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/es404279r>>

MORGAN, T. H. Sex Limited Inheritance in *Drosophila* Author (s): T. H. Morgan

Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL :

<http://www.jstor.org/stable/1635471>. **Science**, [s. l.], v. 32, n. 812, p. 120–122, 1910.

NAPPI, Anthony J. et al. Nitric Oxide Involvement in *Drosophila* Immunity. [s. l.], v. 4, n. 4, p. 423–430, 2000.

NEGGA, Rekek et al. Exposure to Glyphosate- and/or Mn/Zn-Ethylene-bis- Dithiocarbamate-Containing Pesticides Leads to Degeneration of γ -Aminobutyric Acid and Dopamine Neurons in *Caenorhabditis elegans*. **Neurotox Res**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 281–290, 2012.

NORDBY, Karl Christian et al. Indicators of mancozeb exposure in relation to thyroid cancer and neural tube defects in farmers' families. **Scandinavian Journal of Work, Environment and Health**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 89–96, 2005.

OLSVIK, P. A. et al. mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD , CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. [s. l.], v. 141, p. 314–323, 2005.

OPENSTAX, Anatomy & Physiology. OpenStax. **Anatomy and Physiology**. [s.l: s.n.].

Disponível em: <<http://cnx.org/contents/14fb4ad7-39a1-4eee-ab6e-3ef2482e3e22@8.24>>

ORR, William C. et al. Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide

- dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 29, p. 26418–26422, 2003.
- OYER, Marcel M. A. Z.; ROUDART, Laurence. **História das agriculturas no mundo**. [s.l.: s.n.].
- PAGANO, G. Redox-modulated xenobiotic action and ROS formation: a mirror or a window? **Human & Experimental Toxicology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 77–81, 2002. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1191/0960327102ht214oa>>
- PAVLOVIC, V. et al. The effect of ascorbic acid on mancozeb-induced toxicity in rat thymocytes. **Folia Biologica (Czech Republic)**, [s. l.], v. 61, n. 3, p. 116–123, 2015.
- PENNA, Claudia; ANGOTTI, Carmelina; PAGLIARO, Pasquale. Protein S-nitrosylation in preconditioning and postconditioning. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 239, n. 6, p. 647–662, 2014.
- PI, Jingbo et al. Activation of Nrf2-mediated oxidative stress response in macrophages by hypochlorous acid. [s. l.], v. 226, p. 236–243, 2008.
- PIANO, Annamaria; VALBONESI, Paola; FABBRI, Elena. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. **Cell Stress and Chaperones**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 134–142, 2004.
- PICHAUD, Nicolas et al. Diet influences the intake target and mitochondrial functions of *Drosophila melanogaster* males. **Mitochondrion**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 817–822, 2013.
- PIROZZI, Anna Virginia Adriana et al. Mancozeb, a fungicide routinely used in agriculture, worsens nonalcoholic fatty liver disease in the human HepG2 cell model. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 249, p. 1–4, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.03.004>>
- PRAUCHNER, Carlos André. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. **Burns**, [s. l.], v. 43, n. 3, p. 471–485, 2017.
- PYZA, E. et al. Heat shock proteins (HSP70) as biomarkers in ecotoxicological studies. **Ecotoxicol. Environ. Safety**, [s. l.], v. 38, n. 1997, p. 244–251, 1997.
- RADI, Rafael. Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant *. [s. l.], v. 288, n. 37, p. 26464–26472, 2013.
- REDDI, Amit R. et al. The Overlapping Roles of Manganese and Cu/Zn SOD in Oxidative Stress Protection. **NIH Public Access**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 154–162, 2009.
- REHNI, Ashish K.; DAVE, Kunjan R. Impact of Hypoglycemia on Brain Metabolism During Diabetes. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 55, n. 12, p. 9075–9088, 2018.
- RODRIGUES, Nathane Rosa et al. Activation of p38MAPK and NRF2 signaling pathways in

the toxicity induced by chlorpyrifos in *Drosophila melanogaster*: Protective effects of *Psidium guajava pomifera* L. (Myrtaceae) hydroalcoholic extract. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], 2015.

SAID ALI, K. et al. Expressions of heat shock and metallothionein genes in the heart of common carp (*Cyprinus carpio*): effects of temperature shock and heavy metal exposure.

Acta biologica Hungarica, Hungary, v. 61, n. 1, p. 10–23, 2010.

SAMUSSONE, Manuel. Pesticida Mancozeb : Determinação de Limites de Risco para Ecossistemas de Água Doce. [s. l.], 2014.

SANT, Karilyn E. et al. The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of glutathione and redox dynamics in the developing zebrafish embryo. **Redox Biology**, [s. l.], v. 13, n. March, p. 207–218, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.05.023>>

SANZ, Alberto. Biochimica et Biophysica Acta Mitochondrial reactive oxygen species : Do they extend or shorten animal lifespan ? **BBA - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1857, n. 8, p. 1116–1126, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.018>>

SARAIVA, Miriane Acosta et al. Exposure of *Drosophila melanogaster* to Mancozeb Induces Oxidative Damage and Modulates Nrf2 and HSP70/83. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2018, 2018.

SAÚDE, Secretaria de Vigilância em. Monitoramento de agrotóxicos na água para consumo humano no Brasil. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, [s. l.], v. 44, n. 10, p. 24, 2013.

SCARIOT, F. J. et al. The fungicide Mancozeb induces metacaspase-dependent apoptotic cell death in *Saccharomyces cerevisiae* BY4741. **Apoptosis**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 866–872, 2016.

SCHIFFRIN, Ernesto L. Oxidative stress, nitric oxide synthase, and superoxide dismutase: A matter of imbalance underlies endothelial dysfunction in the human coronary circulation. **Hypertension**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 31–32, 2008.

SIDDIQUI, Abrar; ALI, Basheer; SRIVASTAVA, S. P. Effect of mancozeb on hepatic glutathione S-transferase in rat. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 301–305, 1993.

SIES, Helmut. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, [s. l.], v. 4, p. 180–183, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>>

SIES, Helmut. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, [s. l.], v. 11, n. December 2016, p. 613–619, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>>

SINGH, Saurabh Kumar; BANO, Farhad; MOHANTY, Banalata. Vitamin E pretreatment prevents the immunotoxicity of dithiocarbamate pesticide mancozeb in vitro : A comparative

- age-related assessment in mice and chick. **YPEST**, [s. l.], v. 126, p. 76–84, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.08.001>>
- SOHAL, R. S.; SOHAL, Barbara H.; BRUNK, Ulf T. Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. **Mechanisms of Ageing and Development**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 217–227, 1990.
- SRIVASTAVA, Amit Kumar et al. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. **Life Sciences**, [s. l.], 2012.
- SRIVASTAVA, Amit Kumar et al. Protective effects of lupeol against mancozeb-induced genotoxicity in cultured human lymphocytes. **Phytomedicine**, [s. l.], 2016.
- SRIVASTAVA, Pallavi; SINGH, Ajay. **Potential effects of agricultural fungicides (Mancozeb) on fish Clarias batrachus**, 2014.
- STORELLI, Gilles et al. Drosophila Perpetuates Nutritional Mutualism by Promoting the Fitness of Its Intestinal Symbiont Lactobacillus plantarum Article Drosophila Perpetuates Nutritional Mutualism by Promoting the Fitness of Its Intestinal Symbiont Lactobacillus plantarum. [s. l.], p. 362–377, 2018.
- THOMAS, Carin et al. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: Implications for diseases associated with iron accumulation. **Redox Report**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 102–108, 2009.
- TILTON, Fred et al. Dithiocarbamates have a common toxic effect on zebrafish body axis formation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 216, n. 1, p. 55–68, 2006.
- TRINDADE DE PAULA, Mariane et al. High-Fat Diet Induces Oxidative Stress and MPK2 and HSP83 Gene Expression in Drosophila melanogaster. **Oxidative medicine and cellular longevity**, [s. l.], v. 2016, p. 4018157, 2016.
- TSANG, M. M.; TROMBETTA, L. D. The protective role of chelators and antioxidants on mancozeb-induced toxicity in rat hippocampal astrocytes. [s. l.], p. 459–470, 2007.
- USP. Biologia Celular - Módulo 1. [s. l.], 2010.
- UTTARA, Bayani et al. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], 2009.
- VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 160, n. 1, p. 1–40, 2006.
- VAN WENDEL DE JOODE, Berna et al. Pesticide exposure and neurodevelopment in children aged 6–9 years from Talamanca, Costa Rica. **Cortex**, [s. l.], v. 85, p. 137–150, 2016.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cortex.2016.09.003>>

VAZIRI, Nosratola D. Protective Effect of Nrf2 and Catalase in Maternal Diabetes-Induced Perinatal Hypertension and Kidney Disease. **Diabetes**, [s. l.], v. 61, n. 10, p. 2400–2402, 2012.

VOGEL, Christine; SILVA, Gustavo Monteiro; MARCOTTE, Edward M. Protein Expression Regulation under Oxidative Stress. **Molecular & Cellular Proteomics**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. M111.009217, 2011. Disponível em:

<<http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M111.009217>>

WILSON, B. OS PRIMEIROS TRABALHOS COM DROSOPHILA MELANOGASTER. [s. l.], n. 82, 1986.

WUNDERLICH, Zeba; BRAGDON, Meghan D.; DEPACE, Angela H. Comparing mRNA levels using in situ hybridization of a target gene and. **Methods**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 233–241, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.01.003>>

XU, Sue. Environment fate of mancozeb. **Environmental fate of mancozeb**, [s. l.], p. 1–10, 2000.

YAHIA, Doha; EL-AMIR, Yasmin O.; RUSHDI, Mahmoud. Mancozeb fungicide-induced genotoxic effects, metabolic alterations, and histological changes in the colon and liver of Sprague Dawley rats. **Toxicology and Industrial Health**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 265–276, 2019.

YAHIA, E. et al. Subchronic Mancozeb Treatment Induced Liver Toxicity Via Oxidative Stress in Male Wistar Rats. **Communications in agricultural and applied biological sciences**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 553–559, 2014.

YASUGI, Tetsuo; YAMADA, Takayuki; NISHIMURA, Takashi. Adaptation to dietary conditions by trehalose metabolism in Drosophila. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 2–10, 2017.

YORINORI, José; JUNIOR, José; LAZZAROTTO, Joelsio. Ferrugem “asiática” da soja no Brasil: evolução, importância econômica e controle. **Documentos/Embrapa Soja**, [s. l.], v. 1, p. 36, 2004.

ZHANG, Jing et al. Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: A link through mitochondrial dysfunction. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 336–346, 2003.

ZOU, Xianghui et al. Manganese superoxide dismutase (SOD2): is there a center in the universe of mitochondrial redox signaling ? [s. l.], p. 325–333, 2017.

7. ANEXOS

Anexo A

E-mail de submissão do artigo: para o periódico: Toxicology Letters, submetido em 21 de novembro de 2019.

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

Ms. Ref. No.: TOXLET-D-19-01040

Title: Long term treatment with Mancozeb impairs mitochondrial and bioenergetic activity in *Drosophila melanogaster*
Toxicology Letters

Dear Dr. Thaís Posser,

Your submission entitled "Long term treatment with Mancozeb impairs mitochondrial and bioenergetic activity in *Drosophila melanogaster*" has been assigned the following manuscript number: TOXLET-D-19-01040.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/toxlet/>.

Your username is: thaisposser@unipampa.edu.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/toxlet/automail_query.asp.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Toxicology Letters