

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**ILLANA KEMMERICH MARTINS**

**TOXICIDADE DO FUNGICIDA MANCOZEB EM LARVAS DE PEIXE-ZEBRA  
*Danio rerio* (Hamilton, 1822) SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E  
COMPORTAMENTAIS**

**São Gabriel**

**Março, 2021**

**ILLANA KEMMERICH MARTINS**

**TOXICIDADE DO FUNGICIDA MANCOZEB EM LARVAS DE PEIXE-ZEBRA  
*Danio rerio* (Hamilton, 1822) SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E  
COMPORTAMENTAIS**

Tese de Doutorado apresentado ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thaís Posser

Coorientador: Prof. Dr. Jeferson Luis Franco

**São Gabriel**

**Março, 2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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) .

M386t Martins, Illana Kemmerich

Toxicidade do fungicida Mancozeb em larvas de peixe-zebra  
Danio rerio (Hamilton, 1822) sobre parâmetros bioquímicos e  
comportamentais / Illana Kemmerich Martins.

93 p.

Tese(Doutorado)-- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO  
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2021.

"Orientação: Thaís Posser".

1. apoptose. 2. agroquímico. 3. genotoxicidade. 4. vias de  
sinalização. 5. organismos não alvo. I. Título.

**ILLANA KEMMERICH MARTINS**

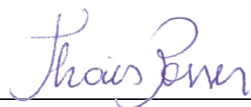
**TOXICIDADE DO FUNGICIDA MANCOZEB EM LARVAS DE PEIXE-ZEBRA  
*Danio rerio* (Hamilton, 1822) SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E  
COMPORTAMENTAIS**

Tese de Doutorado apresentado ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Ciências Biológicas

Tese de Doutorado apresentada e aprovada em: 30 de março de 2021.

Banca Examinadora:




---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Thaís Posser  
Orientadora - UNIPAMPA



---

Dr. Dennis Guilherme Costa Silva  
FURG



---

Prof. Dr. Nélon Rodrigues de Carvalho  
IFFar



---

Dr. Mauro Eugênio Medina Nunes  
UNIFESP



---

Dr.<sup>a</sup> Nathane Rosa Rodrigues  
FURG

Ao meu amado e saudoso pai, Estácio Martins (*in  
memorian*).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, em especial minha mãe Tereza e pai Estácio (*in memorian*) por todo o apoio, carinho e incentivo que me ofereceram ao longo desta jornada.

Agradeço imensamente a minha orientadora Thaís Posser, exemplo de pessoa e profissional, pelo incentivo, pelos ensinamentos diários que sempre contribuíram muito para o meu crescimento profissional e pessoal nestes anos de convívio. Ao meu co-orientador Jeferson Franco, pelos ensinamentos ao longo destes anos e por estar sempre disposto a auxiliar no que fosse preciso.

Agradeço a todos os colegas e amigos do GPEOSCEL por todo o coleguismo, além do divertidíssimo, agradável e saudável ambiente de trabalho que construímos juntos. Em especial, um agradecimento a Giulianna, Karen e Nathane pela amizade, carinho e companheirismo durante todo o período deste doutorado, a vocês, meu eterno carinho! Ao Leonardo que desde o início me auxiliou e se mostrou um colega de laboratório sempre disposto a aprender! Esta caminhada não seria a mesma sem a companhia de vocês.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A Universidade Federal do Pampa por proporcionar a busca de conhecimento científico.

A banca examinadora desta tese pela disponibilidade e todas as contribuições.

A Deus pelas oportunidades e força para superar todas as adversidades para realização deste trabalho.

E a todos que, de algum modo, contribuíram para a consolidação desta pesquisa e para meu crescimento pessoal e profissional.

“A vida sem ciência é uma espécie de morte.”

Sócrates

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Pampa

### **TOXICIDADE DO FUNGICIDA MANCOZEB EM LARVAS DE PEIXE-ZEBRA *Danio rerio* (Hamilton, 1822) SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS**

AUTORA: ILLANA KEMMERICH MARTINS

ORIENTADOR: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Thaís Posser

Data e local da defesa: São Gabriel, 30 de março de 2021.

O uso exacerbado de agroquímicos compromete a qualidade ambiental e causa danos a organismos não-alvo. O mancozeb (MZ) é um fungicida amplamente utilizado na agricultura em diversas culturas, alguns aspectos deste composto como instabilidade, decomposição e interações com o meio ambiente têm motivado estudos sobre a toxicidade do MZ em organismos aquáticos. O presente estudo avalia os efeitos da exposição ao fungicida MZ sobre as vias de sinalização celular na fase larval de *Danio rerio* (peixe-zebra). Larvas de peixe-zebra aos 4, 5 e 6 dias pós fertilização (dpf) foram expostas a MZ por até 72 horas a concentrações ambientalmente relevantes. Os resultados não mostraram alterações na mortalidade das larvas por MZ, entretanto, parâmetros comportamentais como habilidade motora avaliada pela distância percorrida, tempo imóvel e tempo gasto na área periférica foram profundamente afetados. No ensaio bioquímico DCF-DA, as larvas expostas demonstraram uma indução na geração de espécies reativas de oxigênio nas maiores concentrações após 24 horas de tratamento. Através do ensaio utilizando o corante laranja de acridina, foi registrado um aumento do número de células apoptóticas, severos danos ao DNA foram observados através do teste do cometa, seguidos de alterações nas enzimas antioxidantes e AChE. Proteínas de sinalização celular foram moduladas pelo MZ, sendo observada indução na fosforilação de p38, ERK1/2 e AKT enquanto a fosforilação de JNK1/2 foi inibida sem alterar o conteúdo total dessas proteínas. Nossos achados revelam de forma inédita que a fase larval dos peixes é suscetível a doses subletais de MZ, que induzem neurotoxicidade, formação de ERO e modulação da fosforilação de proteínas de sinalização celular. Assim, a exposição ao MZ na fase larval pode comprometer o comportamento exploratório, alimentação e reprodução na fase adulta.



**Palavras-chave:** apoptose; agroquímico; genotoxicidade; organismos não alvo, vias de sinalização.

## ABSTRACT

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Pampa

### **TOXICIDADE DO FUNGICIDA MANCOZEB EM LARVAS DE PEIXE-ZEBRA *Danio rerio* (Hamilton, 1822) SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS**

AUTORA: ILLANA KEMMERICH MARTINS

ORIENTADOR: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Thaís Posser

Data e local da defesa: São Gabriel, 30 de março de 2021.

## ABSTRACT

The exacerbated use of agrochemicals compromises environmental quality and causes damage to nontarget organisms. Mancozeb (MZ) is a fungicide used in several crops; some aspects of these compounds, such as instability, decomposition, and interactions with the environment, have motivated studies about MZ toxicity on aquatic organisms. The present study evaluates the effects of MZ on behavioral and biochemical parameters in larval phase of *Danio rerio* (zebrafish). Zebrafish larva at 4, 5- and 6-days post fertilization (dpf) were exposed to environmentally relevant concentrations of MZ until 72 h. MZ did not affect the larvae mortality, however, behavioral parameters such as motor ability evaluated by traveled distance, immobile time, and time spent in the peripheral area were deeply affected. Larvae exposed to the highest MZ concentration at 24 h of treatment demonstrated a significant change in ROS generation. An augmented number of apoptotic cells, severe DNA damage followed by antioxidant enzyme alterations were registered. MZ targeted cell signaling proteins, it was observed and induction in the phosphorylation of p38, ERK1/2, and AKT whereas JNK1/2 phosphorylation was inhibited without altering the total content of these proteins. Our findings reveal in an unprecedented way that the larval phase of fishes is susceptible to sublethal doses of MZ, which induced neurotoxicity, ROS formation, and modulation of phosphorylation of cell signaling proteins.

**Keywords:** apoptosis; agrochemical; genotoxicity; non target organism; signaling pathways.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura e derivação dos compostos ditiocarbamatos. ....	16
<b>Figura 2.</b> Fórmula estrutural do etileno bis-ditiocarbamato Mancozeb. ....	18
<b>Figura 3.</b> Locais de ação dos fungicidas multissítios na célula fúngica. ....	19
<b>Figura 4.</b> Estrutura do neurotransmissor acetilcolina. ....	21
<b>Figura 5.</b> Hidrólise do neurotransmissor acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase. ....	22
<b>Figura 6.</b> Síntese e degradação da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase na sinapse. ....	22
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática do mecanismo de ação do sistema de defesa antioxidante. ....	25
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática do mecanismo de ativação da via de sinalização ERK1/2. ....	28
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática do mecanismo de ativação da via de sinalização p38 <sup>MAPK</sup> . ....	29
<b>Figura 10.</b> Representação esquemática do mecanismo de ativação da via de sinalização da proteína quinase JNK1/2. ....	31
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática do mecanismo de ativação da via de sinalização da proteína AKT. ....	33
<b>Figura 12.</b> Peixe-zebra ( <i>Danio rerio</i> ). ....	34
<b>Figura 13.</b> Desenvolvimento do peixe-zebra ( <i>Danio rerio</i> ). ....	35
<b>Figura 14.</b> Desenvolvimento embrionário do peixe-zebra ( <i>Danio rerio</i> ) até o estágio larval. ....	36

## MANUSCRITO

<b>Figure 1.</b> Experimental design scheme of adult zebrafish exposed to MZ. ....	52
<b>Figure 2.</b> Survival curve of zebrafish larvae treated by immersion with the fungicide MZ. ....	53
<b>Figure 3.</b> Effect of motor parameter the distance traveled in zebrafish larvae exposed to the agrochemical MZ in static solution at different concentrations and exposure times. ....	54
<b>Figure 4.</b> Effect on motor immobility parameter in zebrafish larvae exposed to agrochemical MZ in static solution at different concentrations and exposure times. ....	56
<b>Figure 5.</b> Effect of MZ exposure on motor parameter, angle of rotation in zebrafish larvae exposed to agrochemical MZ in static solution at different concentrations and exposure times. ....	58
<b>Figure 6.</b> Effect of MZ exposure on the non-motor parameter in zebrafish larvae exposed to the MZ agrochemical in the static solution at different concentrations and exposure times. ....	60
<b>Figure 7.</b> Effect of MZ exposure in zebrafish larvae over a period of 6-7dpf on steady state redox. ....	62
<b>Figure 8.</b> Determination of genotoxicity in zebrafish larvae upon exposure to the MZ agrochemical. ....	63
<b>Figure 9.</b> Determination of cell death in zebrafish larvae exposed to agrochemical MZ for 24 hours. ....	64
<b>Figure 10.</b> Determination of acetylcholinesterase enzyme activity in zebrafish larvae exposed to the agrochemical MZ. ....	65
<b>Figure 11.</b> Determination of enzymatic activity in zebrafish larvae exposed to agrochemical MZ. ....	66
<b>Figure 12.</b> Phosphorylation of ERK, JNK, p38 and AKT in response to MZ exposure. ....	67

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Subclasses dos compostos Ditiocarbamatos. ....	17
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina  
AChE – Acetilcolinesterase  
CAT – Catalase  
ChAT – Colina acetiltransferase  
dpf – dias pós-fertilização  
DTC – Ditiocarbamato  
EBDC – Etileno bis-ditiocarbamato  
EO – Estresse Oxidativo  
ERN – Espécie reativa de nitrogênio  
ERO – Espécie reativa de oxigênio  
ETU – Etileno tioureia  
GPCR – Receptor acoplado a proteína G  
GPx – Glutaciona peroxidase  
GR – Glutaciona redutase  
GSH – Glutaciona  
GST – Glutaciona S-transferase  
hpf – horas pós-fertilização  
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno  
MZ – Mancozeb  
PDK1 – Proteína dependente quinase 1  
PDK2 – Proteína dependente quinase 2  
PTEN – Fosfatase homóloga a tensina  
RTK – Receptor tirosina quinase  
SAPK – Proteína quinase ativada pelo estresse  
SOD – Superóxido dismutase  
Trx-R – Tiorredoxina redutase

## APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, consta uma breve revisão da literatura sobre os temas trabalhados nesta tese. A metodologia realizada e os resultados obtidos que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de manuscrito, que se encontra no item **MANUSCRITO**. No mesmo constam as seções: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas. O item **CONCLUSÕES**, encontrado no final desta tese, apresenta interpretações e comentários gerais sobre os resultados dos manuscritos presentes neste trabalho. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO**.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
APRESENTAÇÃO.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Agroquímicos .....	15
1.2 Compostos Ditiocarbamatos.....	16
1.2.1 Toxicocinética dos Ditiocarbamatos .....	17
1.3 Mancozeb.....	18
1.3.1 Mancozeb e toxicidade .....	19
1.4 Sistema Colinérgico.....	20
1.4.1 Acetilcolinesterase.....	21
1.5 Estresse Oxidativo e Defesas Celulares.....	23
1.5.1 Mancozeb e o estresse oxidativo .....	25
1.6 Sinalização Celular .....	26
1.6.1 Proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPKs) .....	26
1.6.2 Proteína quinase B (AKT) .....	32
1.7 Modelo experimental.....	34
1.7.1 Peixe-zebra ( <i>Danio rerio</i> ).....	34
2.JUSTIFICATIVA .....	38
3.OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo Geral .....	39
3.2 Objetivos Específicos .....	39
4. RESULTADOS .....	40
Mancozeb fungicide hampers motor activity and increases MAPK phosphorylation in zebrafish larvae.....	41
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Agroquímicos

Ao longo dos séculos, o aumento populacional e a expansão agrícola levaram o homem a buscar por compostos químicos que auxiliem no aumento da produtividade visando atender a demanda de alimentos, atuando no controle de pragas e doenças que colocam em risco a produção de alimentos (IPEA, 2016).

Na década de 60, a revolução verde adentrou na agricultura mundial o uso de novas tecnologias, como máquinas, adubos e defensivos químicos, visando a maximização dos rendimentos dos cultivos em diferentes situações ecológicas através do controle de doenças e aumento de produtividade (Lazzari and Souza, 2017).

Segundo a Lei 7.802, de 11 de julho de 1989, são considerados agroquímicos e afins:

- a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;
- b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (Brasil, 1989).

De acordo com dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o mercado brasileiro cresceu 190% e, desde 2008, o Brasil adquiriu o título de maior mercado mundial de agroquímicos (Carneiro et al., 2015). A livre comercialização, sua ampla utilização e a pressão exercida através de empresas produtoras e distribuidoras de agroquímicos, são fatores que contribuem com o grande consumo destes produtos estando associado a altos níveis de contaminação humana e ambiental em regiões agrícolas no Brasil (Cassal et al., 2014).

Estudos associam o uso dos agroquímicos a efeitos nocivos à saúde humana, sendo que



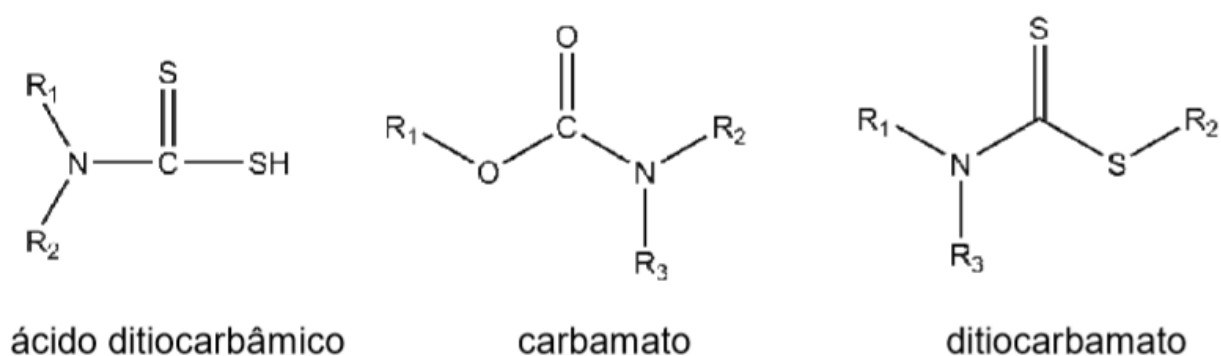
a contaminação pode ser ocupacional levando à intoxicação de agricultores e pelo consumo levando à contaminação dos consumidores deste alimento, tornando-se assim um problema de saúde pública (Cassal et al., 2014). A exposição a agroquímicos, pode causar comprometimento do funcionamento do sistema nervoso (Richardson et al., 2019) levando ao surgimento de doenças neurodegenerativas, como as Doença de Parkinson e Alzheimer entre outras (Kwakye et al., 2017; Voorhees et al., 2019).

## 1.2 Compostos Ditiocarbamatos

Os ditiocarbamatos (DTCs) constituem uma classe de compostos ligantes organossulfurados, que formam complexos estáveis com metais, são derivados do ácido ditiocarbâmico ( $\text{NH}_2\text{CS}_2\text{H}$ ) e análogos aos carbamatos ( $\text{CH}_3\text{NO}_2$ ) (Figura 1), onde os dois átomos de oxigênio do carbamato são substituídos por átomos de enxofre (Fu et al., 2017).

Os DTCs foram desenvolvidos entre as décadas de 1930 e 1940 e ainda hoje são utilizados isoladamente ou associados a outros compostos, atuando como antifúngicos (Balardin et al., 2017). Atualmente, 21 compostos da classe dos ditiocarbamatos são comercializados, sendo seu uso direcionado à produção de frutas e vegetais, tratamento de sementes, solo, foliar e pós-colheita (Motarjemi and Lelieveld, 2013).

**Figura 1. Estrutura e derivação dos compostos ditiocarbamatos.**



Fonte: Mello, 2014.

Com base na estrutura do esqueleto de carbono, os DTCs são divididos em subclasses

dependendo da natureza do elemento que está complexado ao esqueleto organossulfurado (Bala et al., 2014), como mostrado abaixo (Tabela 1).

**Tabela 1. Subclasses dos compostos Ditiocarbamatos.**

<i>Subclasses</i>	<i>Metais de transição</i>
<i>Metilditiocarbamatos (MDTC)</i>	Metam-sódico (Na)
<i>Dimetilditiocarbamatos (DMD)</i>	Ziram (Zn), Ferbam (Fe) e Tiram
<i>Propilenobisditiocarbamatos (PBDC)</i>	Propinebe (Zn)
<i>Etileno bis-ditiocarbamatos (EBDC)</i>	Manebe (Mn), Zineb (Zn), Nabam (Na), Metiram (Zn), Mancozeb (Mn e Zn).

Segundo a Anvisa (2017), no Brasil são autorizados o uso e comercialização de cinco ditiocarbamatos com uso em 38 culturas de alimentos sendo estes o mancozeb, metiram, propinebe, tiram e metam-sódico.

### 1.2.1 Toxicocinética dos Ditiocarbamatos

A sua natureza lipofílica dos compostos DTC os torna adequados para sua passagem através da membrana celular (Alves, 2016). Sua absorção ocorre através do trato gastrointestinal, pulmões e pele (Janz, 2014). Estudos com compostos ditiocarbamatos incluindo mancozeb demonstraram que estes sofrem detoxificação via S-glicuronidação ou biodegradação formando metabólitos como dissulfeto de carbono (CS<sub>2</sub>), tiouréia, alquilaminas, etilenoaminas entre outros produtos de biotransformação (Bala et al., 2014; Easton et al., 2001; Odularu and Ajibade, 2019).

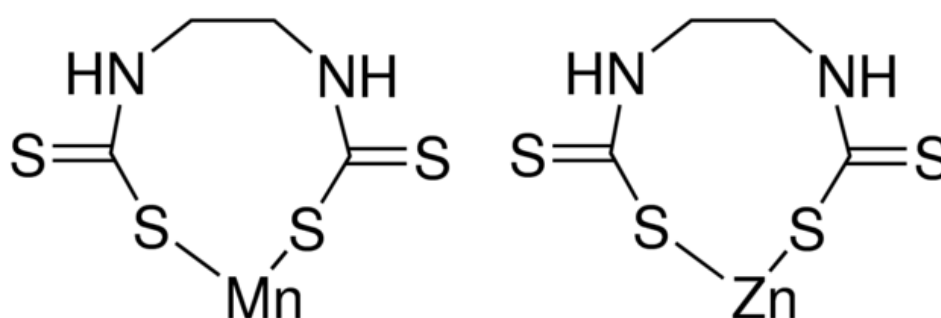
A biotransformação *in vivo* ou degradação ambiental de etileno bis-ditiocarbamatos para formar ETU é de importância toxicológica devido às propriedades antitireoidianas e carcinogênicas deste produto de degradação. Na verdade, a disfunção tireoidiana e os parâmetros relacionados são os desfechos mais sensíveis observados em animais de laboratório (Axelstad et al., 2011; Maranghi et al., 2013). Foi relatado que a neurotoxicidade após a exposição crônica ao maneb envolve a neurotransmissão dopaminérgica; no entanto, a associação com o parkinsonismo permanece obscura e pode estar relacionada ao conteúdo de manganês do maneb, a certos metabólitos como dissulfeto de carbono e/ou à capacidade dos

ditiocarbamatos de se ligarem a metais divalentes e formar mais complexos lipofílicos capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. Os compostos pertencentes a subclasse dos etilenos bis-ditiocarbamatos, como o fungicida mancozeb tem o mesmo potencial (Costa-Silva et al., 2018b; Montgomery et al., 2018).

### 1.3 Mancozeb

O Mancozeb (MZ) consiste em um fungicida de amplo espectro, pertencente ao grupo dos organossulfurados, classe dos ditiocarbamatos e subclasse dos etilenos bis-ditiocarbamato possuindo os metais manganês e zinco na sua fórmula molecular  $(C_4H_6MnN_2S_4) \times (Zn)_y$  (Figura 2). O MZ apresenta-se como um pó amarelo-cinza, possuindo com baixa solubilidade em água (6mg/L a 25°C) e na maioria dos solventes orgânicos, sendo complexado com 20% de manganês e 2-5% de zinco. No ambiente, o MZ possui meia-vida de 2 dias em solos aeróbicos, de 8 dias em solos anaeróbicos, possui baixo potencial de volatilização no ar além de ser decomposto em altas temperaturas pela umidade e condições ácidas (Balardin et al., 2017). Já nas matrizes aquáticas, o composto é rapidamente hidrolisado, apresentando meia vida de 2 dias (López-Fernández et al., 2016).

**Figura 2. Fórmula estrutural do etileno bis-ditiocarbamato Mancozeb.**

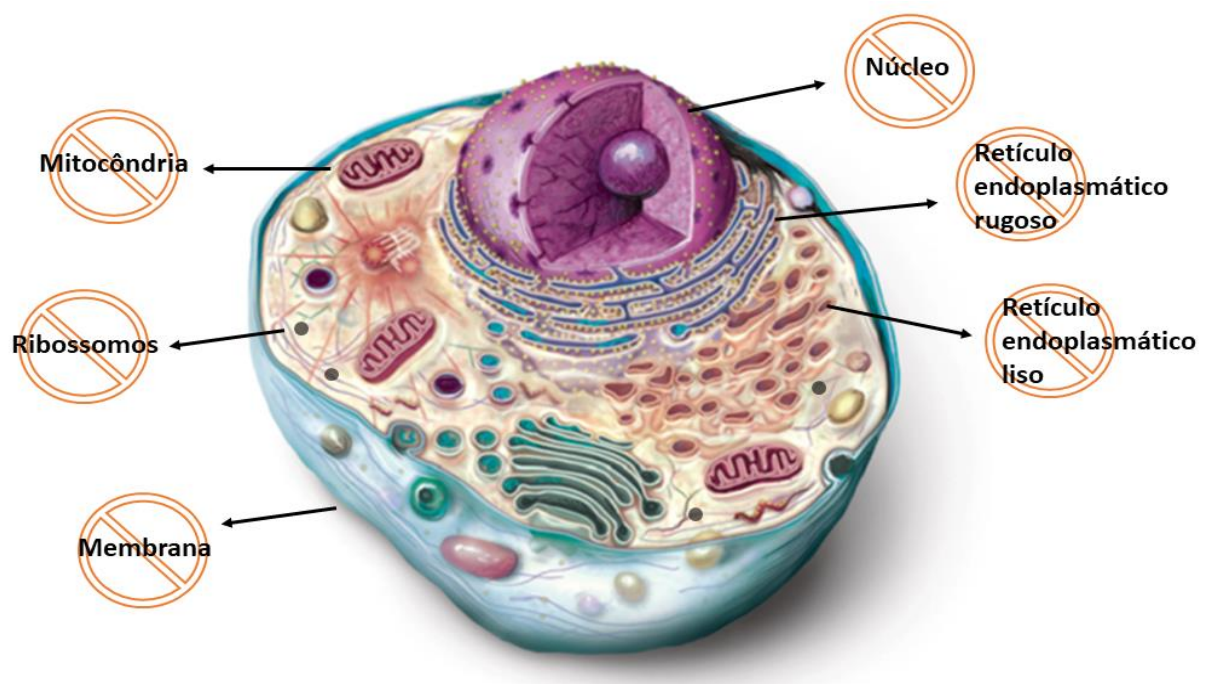


Fonte: Sigma Aldrich – <https://shorturl.at/sIXY0>

Este composto, assim como os demais ditiocarbamatos, possui a vantagem de apresentar um modo de ação do tipo multissítio (Figura 3), interagindo inespecificamente com vários passos no metabolismo fúngico, como na formação de complexos com enzimas que possuem

grupos sulfidríla, conseqüentemente essas enzimas são inativadas causando distúrbios no metabolismo e integridade celular, além de promover controle de fungos em amplo espectro e uma gestão de resistência para novos fungicidas (Marques, 2017).

**Figura 3. Locais de ação dos fungicidas multissítios na célula fúngica.** Na célula fúngica, os fungicidas podem comprometer estruturas celulares como mitocôndria, ribossomos, membrana plasmática, núcleo, retículo endoplasmático liso e rugoso.



Fonte: Adaptado de Balardin et al., 2017.

No Brasil, o fungicida MZ possui registro para ser utilizado em aplicação foliar para 46 culturas, possuindo 34 diferentes formulações comercializadas no país e sendo indicado para o controle de 43 espécies de fungos fitopatogênicos (MAPA, 2019), desempenhando um papel significativo no mercado global de agroquímicos (Gullino et al., 2010). Dessa forma, o mancozeb é o terceiro agroquímico mais comercializado no país com mais de 49 mil toneladas vendidas em 2019 (IBAMA, 2019).

### 1.3.1 Mancozeb e toxicidade

Parte dos efeitos toxicológicos do MZ são atribuídos à presença dos metais manganês e

zinco em sua formulação e ao seu principal produto de degradação, como a ETU (Runkle et al., 2017).

O estudo de Calviello et al. (2006) demonstrou que a exposição ao MZ alterou a expressão de genes relacionados à modulação da cascata apoptótica. Este efeito pró-apoptótico em células de ratos foi relacionado a um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), tendo como consequência uma elevação de danos ao DNA.

Em cultura de linfócitos humanos expostos ao MZ, foi observado aumento na apoptose. Este, foi associado a um aumento na concentração intracelular de ERO, que ocorreu de forma dose dependente. Além disso, em decorrência à exposição ao fungicida, foi observado um aumento na frequência de células com aberrações cromossômicas e micronúcleos (Srivastava et al., 2012).

Estudos têm demonstrado diversos efeitos tóxicos do MZ como disfunções reprodutivas (Liu et al., 2017; Mohammadi-Sardoo et al., 2018), alteração da produção de energia a nível mitocondrial (Todt et al., 2016) e genotoxicidade (Goldoni et al., 2014). Além disso, estudos prévios do nosso grupo de pesquisa identificaram que a exposição ao fungicida acarretou no acúmulo de metais no encéfalo de *Cyprinus carpio*, além de causar alterações em marcadores de estresse oxidativo (Costa-Silva et al., 2018b), *Drosophila melanogaster* adultas (Saraiva et al., 2018) e embriões de peixe-zebra (Costa-Silva et al., 2018a).

A toxicidade do fungicida MZ vem sendo associada à presença do íon metálico manganês em sua formulação, causando efeitos neurotóxicos relacionados ao aumento de ERO (Domico et al., 2006; Negga et al., 2011), este é capaz de penetrar a barreira hematoencefálica, acumulando-se no cérebro de organismos não alvos (Costa-Silva et al., 2018b), além de mimetizar sinais semelhantes a doença de Parkinson (Montgomery et al., 2018) como alterações locomotoras nos indivíduos expostos ao agroquímico.

Sabendo que o MZ pode estar associado a incidência de doenças neurodegenerativas, torna-se importante elucidar os mecanismos envolvidos na toxicidade do composto, uma vez que ainda não estão bem descritos na literatura.

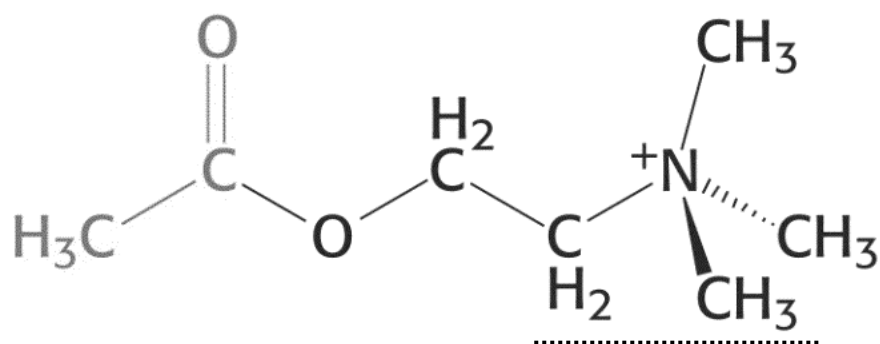
#### **1.4 Sistema Colinérgico**

O sistema colinérgico está envolvido em processos fisiológicos críticos, como atenção,

aprendizagem, memória, resposta ao estresse, vigília e sono, e informações sensoriais (Bertrand and Wallace, 2020).

Neste sistema, a acetilcolina (ACh) (Figura 4), foi a primeira substância encontrada e caracterizada como um neurotransmissor (Loewi, 1921) e posteriormente foi definida como um neurotransmissor excitatório na junção neuromuscular de nematódeo (Castillo et al., 1967, 1963).

**Figura 4. Estrutura do neurotransmissor acetilcolina.** Na estrutura, em cinza, é destacado o grupamento éster e a linha pontilhada, o grupamento amônio quaternário.



Fonte: [shorturl.at/juHQ1](http://shorturl.at/juHQ1)

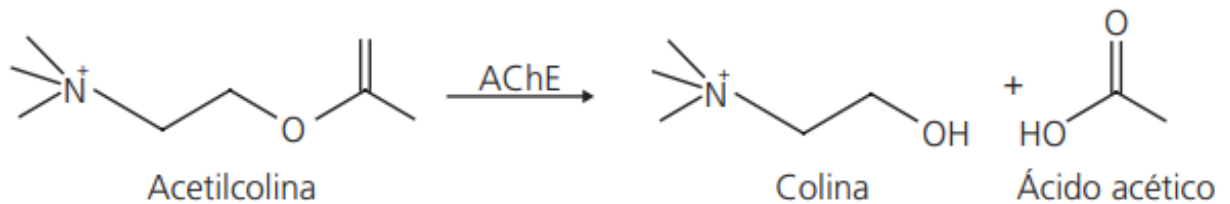
A ACh é o mediador químico da neurotransmissão colinérgica, estando presente nas sinapses das junções neuromusculares colinérgicas dos sistemas nervoso central e periférico (Bertrand and Wallace, 2020). Depois de ser sintetizado pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) e liberada na fenda sináptica, a ACh estimula os receptores nicotínicos e muscarínicos (Dani and Bertrand, 2007), induzindo uma série de efeitos. A etapa final da sinalização colinérgica envolve a degradação da ACh por duas enzimas homólogas, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) (Soreq, 2001).

#### 1.4.1 Acetilcolinesterase

A enzima acetilcolinesterase (AChE) (EC 3.1.1.7), uma serina do grupo das hidrolases e pertencente à família das colinesterases, está presente em todos os vertebrados, particularmente no músculo e nos tecidos nervosos. Esta enzima é responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas e na junção neuromuscular,

atuando na hidrólise de ésteres de colina principalmente a ACh (Bertrand and Wallace, 2020), como demonstrado na Figura 5.

**Figura 5. Hidrólise do neurotransmissor acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase.**

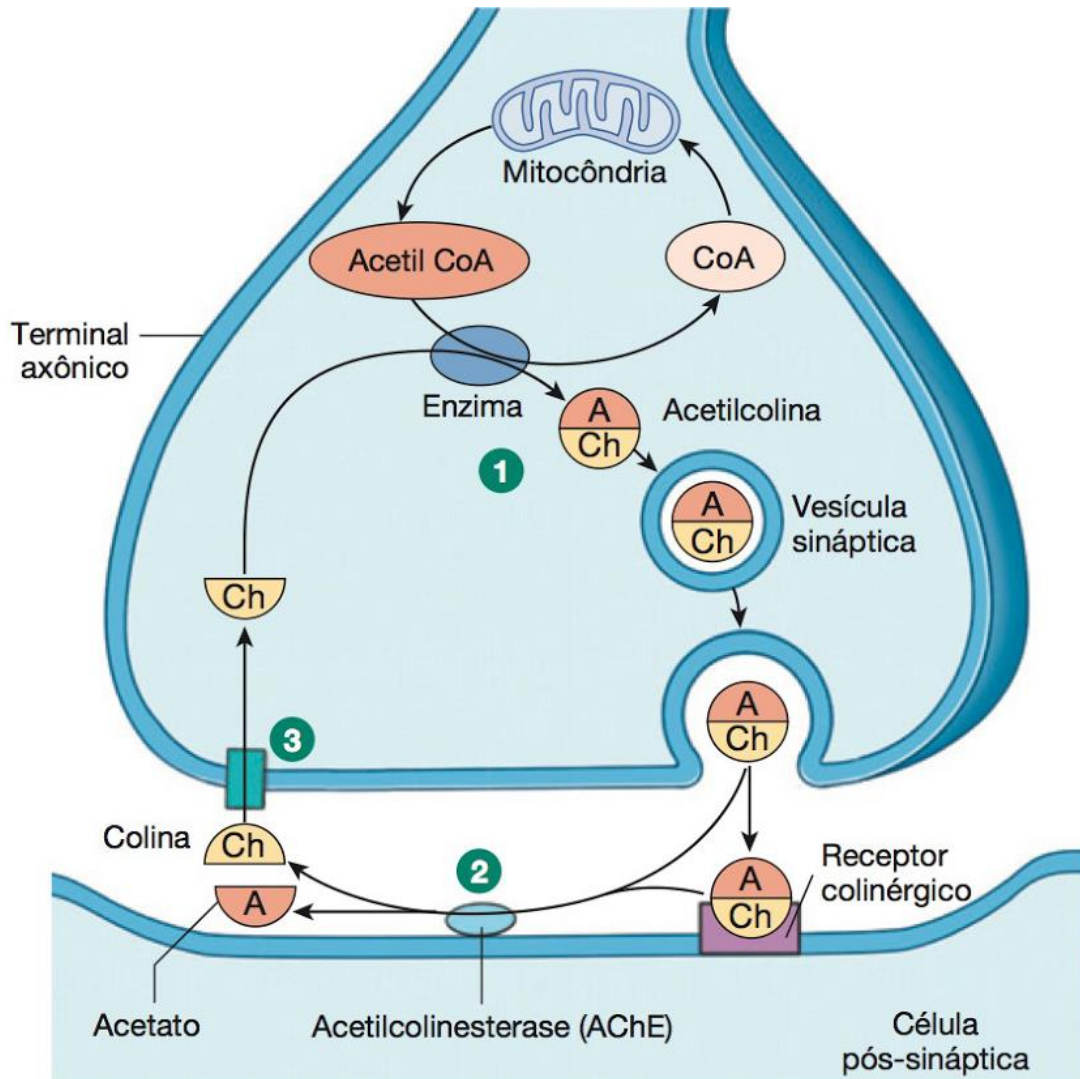


Fonte: [shorturl.at/bisuC](http://shorturl.at/bisuC)

Antes que ocorra nova liberação da ACh, a molécula que anteriormente foi liberada, deve ser hidrolisada pela AChE (Figura 6) controlando os níveis de ACh e, assim, influenciar a excitabilidade neural e a liberação de outros neurotransmissores e, conseqüentemente, a homeostase cerebral (Higley and Picciotto, 2014), além desta sinapse conectar os motoneurônios aos músculos e ser responsável pela contração muscular (Legay, 2018), um processo fisiológico essencial para a sobrevivência.

**Figura 6. Síntese e degradação da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase na sinapse.**

1. O neurotransmissor ACh é sintetizado a partir da colina e acetil-CoA pela enzima ChAT. 2. Na fenda sináptica, a ACh é rapidamente hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase. 3. A colina é transportada de volta para o terminal axônico e utilizada novamente para a síntese de mais ACh.



Fonte: [shorturl.at/vzH35](http://shorturl.at/vzH35)

### 1.5 Estresse Oxidativo e Defesas Celulares

O estresse oxidativo (EO) está relacionado com inúmeras condições patológicas como artrite, câncer, inflamações, doenças cardíacas, neurodegenerativas e o processo de envelhecimento (Bissinger et al., 2018; Daenen et al., 2016; Gerber and Rutter, 2017; Gill et al., 2016). O EO é caracterizado por um desequilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e os antioxidantes, ocasionado pela diminuição ou inibição da ação das defesas antioxidantes em relação à produção de espécies reativas. O EO pode levar a danos oxidativos celulares, em biomoléculas como lipídios, proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e outras substâncias oxidáveis, culminando na alteração do estado redox celular, de forma aguda, ou ainda de forma crônica (Li et al., 2013; Robaczewska et al., 2016; Salim, 2016). Dentre os oxidantes mais

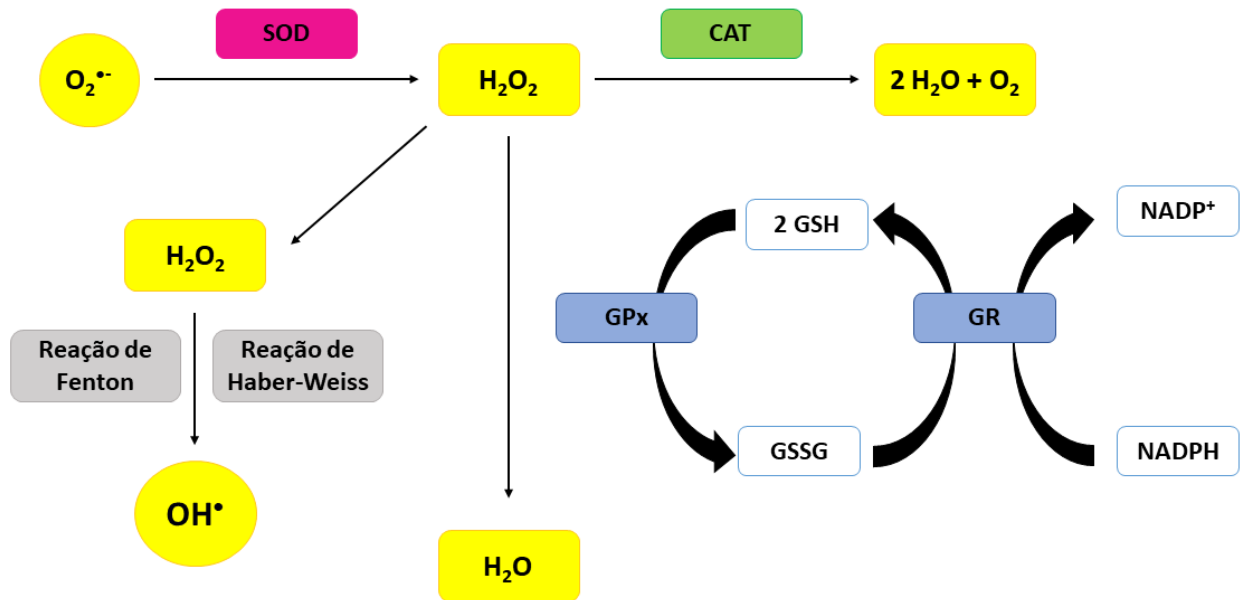


importantes envolvidos em processos patológicos estão as ERO e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Lushchak, 2014). Dentre estes, o superóxido ( $O^{\bullet-}$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e, o não radical peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), são espécies reativas de oxigênio formadas e degradadas pelo metabolismo natural da célula. Quando em níveis fisiológicos, são necessários para a sobrevivência da célula, atuando em sistemas de sinalização celular e nas reações redox, porém, uma geração excessiva de ERO está implicada no aumento de radicais livres, podendo ocasionar um quadro de EO (Li et al., 2013; Salim, 2016).

No decorrer da evolução, os seres vivos desenvolveram mecanismos adaptativos que permitem coexistir com a exposição a espécies reativas de oxigênio (Kowaltowski et al., 2009; Lushchak, 2014). Dentre estes estão o sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimáticos, o segundo formado pelo tripeptídeo glutathiona (GSH), vitaminas e aminoácidos. O sistema enzimático formado pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona S-transferase (GST), glutathiona redutase (GR) e tioredoxina redutase (Trx-R) (Birben et al., 2012; He et al., 2017a).

A enzima SOD é responsável por catalisar a dismutação do radical superóxido ( $O^{\bullet-}$ ) em  $H_2O_2$  (Wang et al., 2018). O  $H_2O_2$  formado é então transformado pela CAT em  $O_2$  e  $H_2O$  (Nandi et al., 2019), porém este  $H_2O_2$  poderá também ser removido através da atividade do sistema GPx. No entanto, um desbalanço nesses dois sistemas de detoxificação de  $H_2O_2$ , pode ocasionar a geração do radical  $OH^{\bullet}$ , através das reações de Fenton e de Haber-Weiss, este radical é altamente instável e reativo e não há sistema enzimático de defesa (Circu and Aw, 2010). No processo de detoxificação de xenobióticos, a GSH é oxidada a glutathiona oxidada (GSSG) pela ação da enzima GPx, a qual é transformada e novamente reduzida a GSH através da ação da enzima (GR), como demonstrado na Figura 7. Este ciclo redox é muito importante e fundamental para o equilíbrio do sistema de defesa enzimático (He et al., 2017b). Além das enzimas citadas anteriormente, a GST é responsável por transformar os xenobióticos em compostos mais solúveis, a fim de promover a sua eliminação pelos organismos, através da conjugação de GSH com produtos endógenos com potencial oxidativo, como radicais hidroxila, peróxidos de lipídios de membrana e produtos de degradação oxidativa do DNA, visando sua detoxificação (Kumar et al., 2017).

**Figura 7. Representação esquemática do mecanismo de ação do sistema de defesa antioxidante.**



Fonte: Adaptado de Macedo, 2017.

### 1.5.1 Mancozeb e o estresse oxidativo

Agroquímicos como o MZ, são considerados poluentes ambientais com alta capacidade em causar dano oxidativo. Estes químicos podem afetar diversos sistemas biológicos não-alvo, como os organismos aquáticos, estes, muito vulneráveis ao desequilíbrio do sistema homeostático (Costa-Silva et al., 2018a).

Sabe-se que o MZ possui em sua composição dois metais, os quais, quando na forma de íons são notórios indutores de estresse oxidativo (Li and Yang, 2018). Esses metais podem inativar ou modular os sistemas enzimáticos, críticos ao reparo e defesa celular, ou ainda, alterar estruturas proteicas, levando à disfunção celular e, conseqüentemente, morte celular (Chen et al., 2018).

De tal modo, torna-se importante a elucidação dos mecanismos envolvidos na adaptabilidade das defesas antioxidantes celulares dos organismos na presença do agente pró-oxidante como o MZ, a fim de prevenir, atenuar ou bloquear os danos oxidativos.

## 1.6 Sinalização Celular

As células respondem a uma variedade de modificações ambientais que incluem alterações na disponibilidade de nutrientes, fatores de crescimento, citocinas e alterações físicas mediada por variações na osmolaridade do meio (Hotamisligil and Davis, 2016). Estas variações alteram cascatas de sinalização, que por sua vez, podem afetar diversas funções celulares, como sobrevivência, proliferação, taxa de metabolismo, interação com outras células, além de numerosos processos celulares envolvidos na homeostase e saúde do organismo (Hotamisligil and Davis, 2016).

Em resposta as mudanças, as células de mamíferos ativam quatro subfamílias bem caracterizadas de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs): proteína reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) e as proteínas quinase JNK1/2 e p38<sup>MAPK</sup> ativadas pelo estresse (SAPK), além da proteína quinase B (AKT).

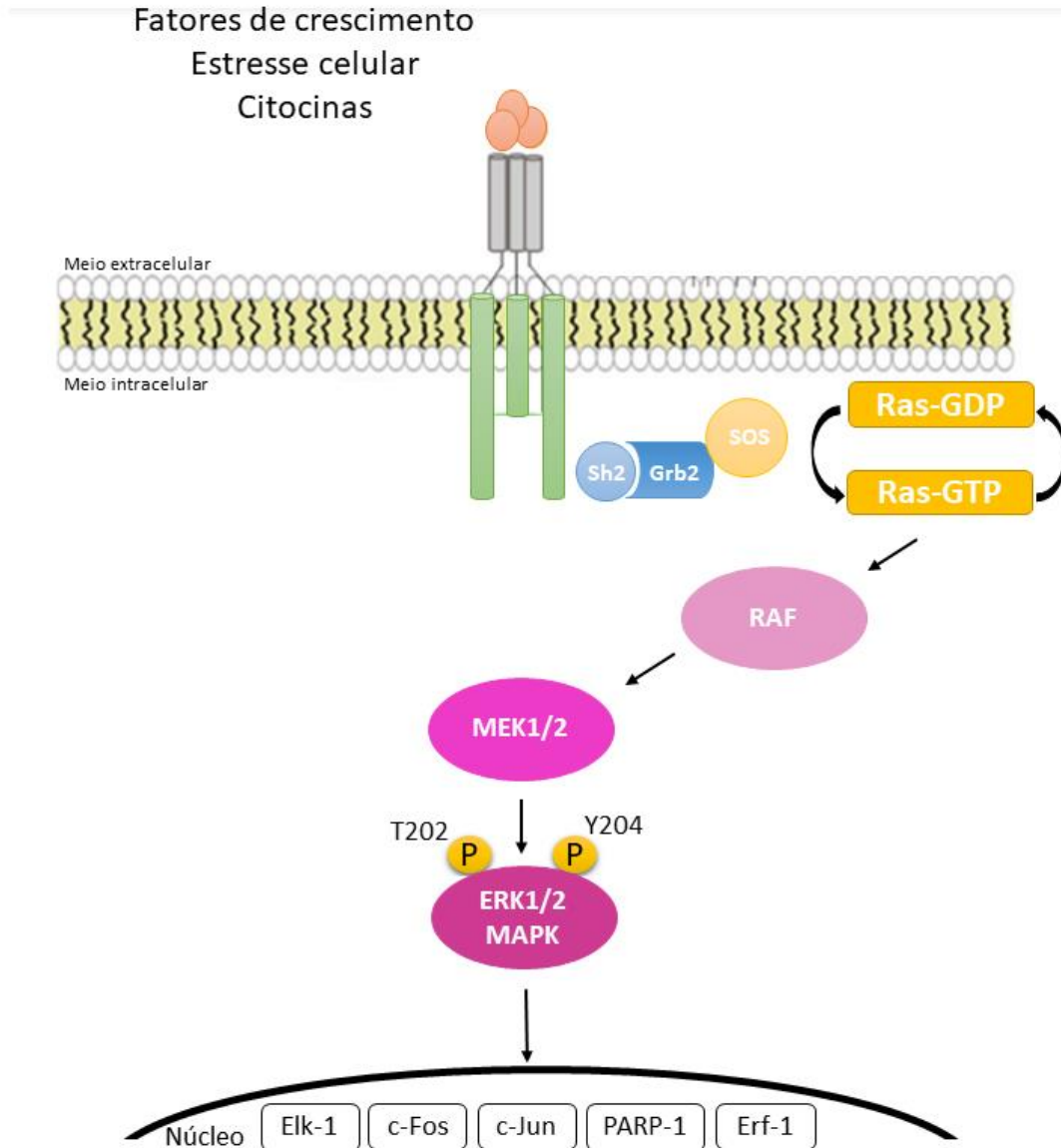
### 1.6.1 Proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPKs)

As proteínas quinase pertencentes a família das MAPKs são compostas por resíduos de serina-treonina, que medeiam a sinalização intracelular e estão associadas a diversos eventos celulares (Yue and López, 2020). Reguladas através de uma cascata de fosforilação, estabelecem uma via sequencial de ativação composta de três proteínas quinases ou mais e, esta transmissão de sinais pode ser iniciada por uma molécula sinalizadora no receptor acoplado a uma proteína G, por exemplo. Uma vez acionadas, as MAPKs fosforilam resíduos de serina e treonina em seus alvos específicos (Hotamisligil and Davis, 2016; Kim and Choi, 2015). A ativação de MAPKs tem sido observada em resposta a estresse osmótico, estresse oxidativo, exposição as citocinas e danos tóxicos (Kim and Choi, 2015). A família das MAPKs inclui proteínas reguladas por sinal extracelular (ERK1/2). Estas, operam em resposta a estímulos externos, transmitindo sinais para seus alvos no interior da célula, além de proteínas quinases ativadas pelo estresse (SAPKs) como JNK1/2 e p38<sup>MAPK</sup> (Hammouda et al., 2020; Martínez-Limón et al., 2020).

A ativação da proteína quinase ERK1/2 (Figura 8) é iniciada principalmente através de receptores de membrana, como o receptor tirosina quinase (RTK), receptores acoplados à proteína G (GPCRs), canais iônicos e outros. Estes receptores transmitem o sinal recrutando proteínas adaptadoras (Gbr2) e fatores de troca (SOS) que, por sua vez, induzem a ativação de

Ras na membrana plasmática. O Ras ativado, ligado a GTP, transmitirá o sinal ativando as proteínas quinases Raf-1, B-Raf e A-Raf (Rafs) dentro do nível de MAP3K desta cascata. Essa ativação ocorre pelo recrutamento de Rafs para as membranas, onde são fosforiladas e ativadas. Após a ativação, a proteína Raf transmite seu sinal por fosforilação das proteínas MEK1 e MEK2. Essas proteínas são compostas por um grande domínio regulatório N-terminal contendo um sinal de exportação nuclear, seguido por um domínio de quinase catalítica e uma região C-terminal mais curta. MEK1 e MEK2 são ativadas através da fosforilação de serina no motivo MAPKK em sua alça de ativação. A fosforilação mediada por MEK1 e MEK2 ocorre em ERK1/2 nos resíduos Thr e Tyr em seu motivo de assinatura Thr-Xaa-Tyr (Thr202 e Tyr204) e é o mecanismo que induz sua ativação completa de seus únicos substratos conhecidos, sugerindo que MEK1 e MEK2 servem como componentes determinantes de especificidade da cascata ERK1/2 (Wortzel and Seger, 2011).

**Figura 8. Representação esquemática do mecanismo de ativação da via de sinalização ERK1/2.**

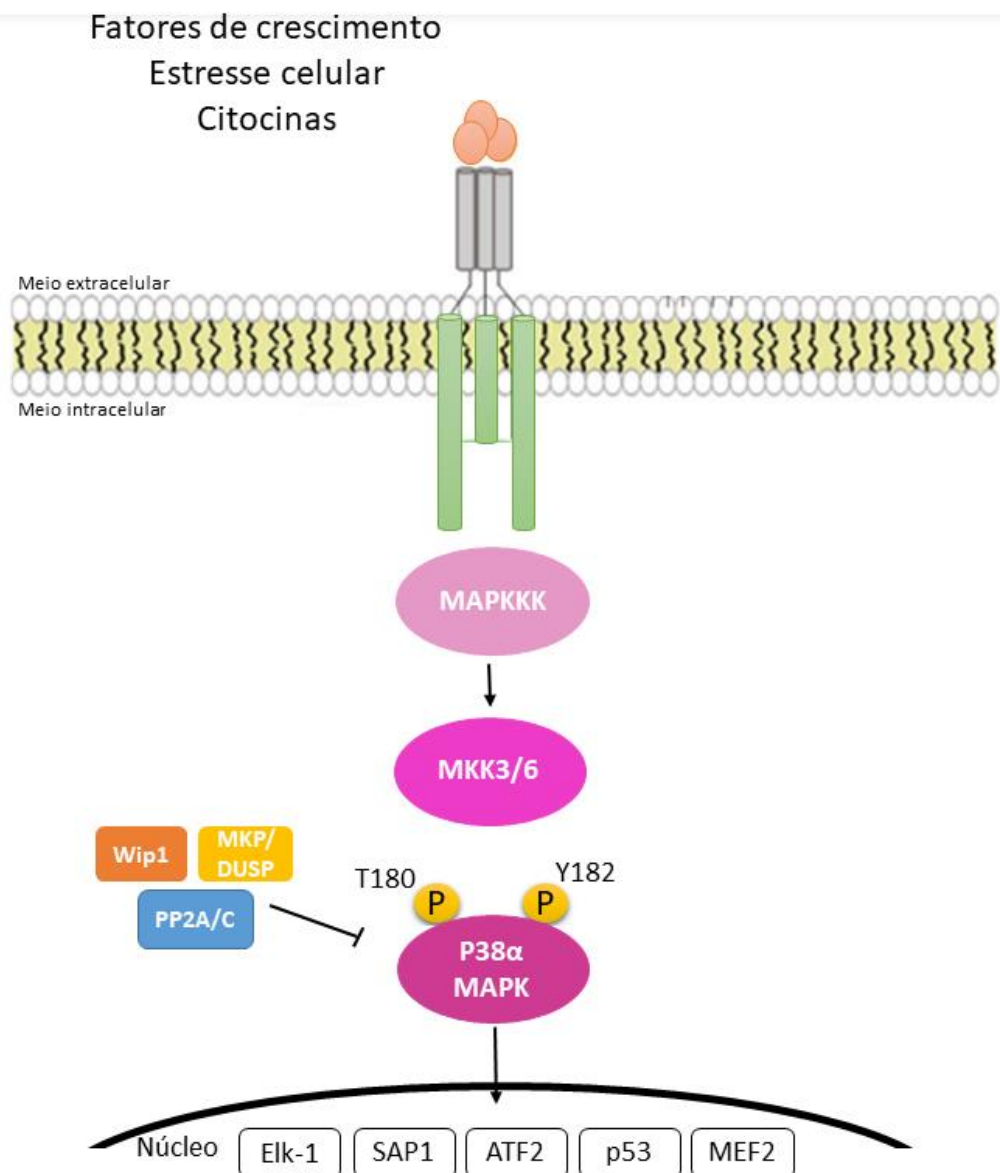


Fonte: Adaptado de Wortzel and Seger, 2011.

A via de sinalização  $p38^{\text{MAPK}}$  pode ser ativada através de um repertório de diferentes estímulos, como fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, podem desencadear a fosforilação em cascata de moléculas efetoras e/ou ativadoras da sinalização  $p38^{\text{MAPK}}$  (Cuenda and Rousseau, 2007). Resumidamente, o estímulo externo é transmitido para o meio intracelular onde ocorre a ativação canônica da  $p38^{\text{MAPK}}$  via fosforilação dupla no motivo Thr-Gly-Tyr pelas proteínas quinase MKK3 e MKK6, estes altamente específicos para  $p38^{\text{MAPK}}$ , como demonstrado na Figura 9. A proteína quinase MKK6

fosforila todas as isoformas de p38 (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\delta$  e p38 $\gamma$ ), enquanto MKK3 é seletiva para as isoformas p38 $\alpha$ , p38 $\delta$  e p38 $\gamma$ . MKK3/6 transmitem esse sinal à p38 que por consequência, será translocada do citoplasma para o núcleo, ativando fatores de transcrição que controlam a expressão de enzimas envolvidas em rotas antioxidantes, proliferação, diferenciação, inflamação e apoptose (Cuadrado and Nebreda, 2010).

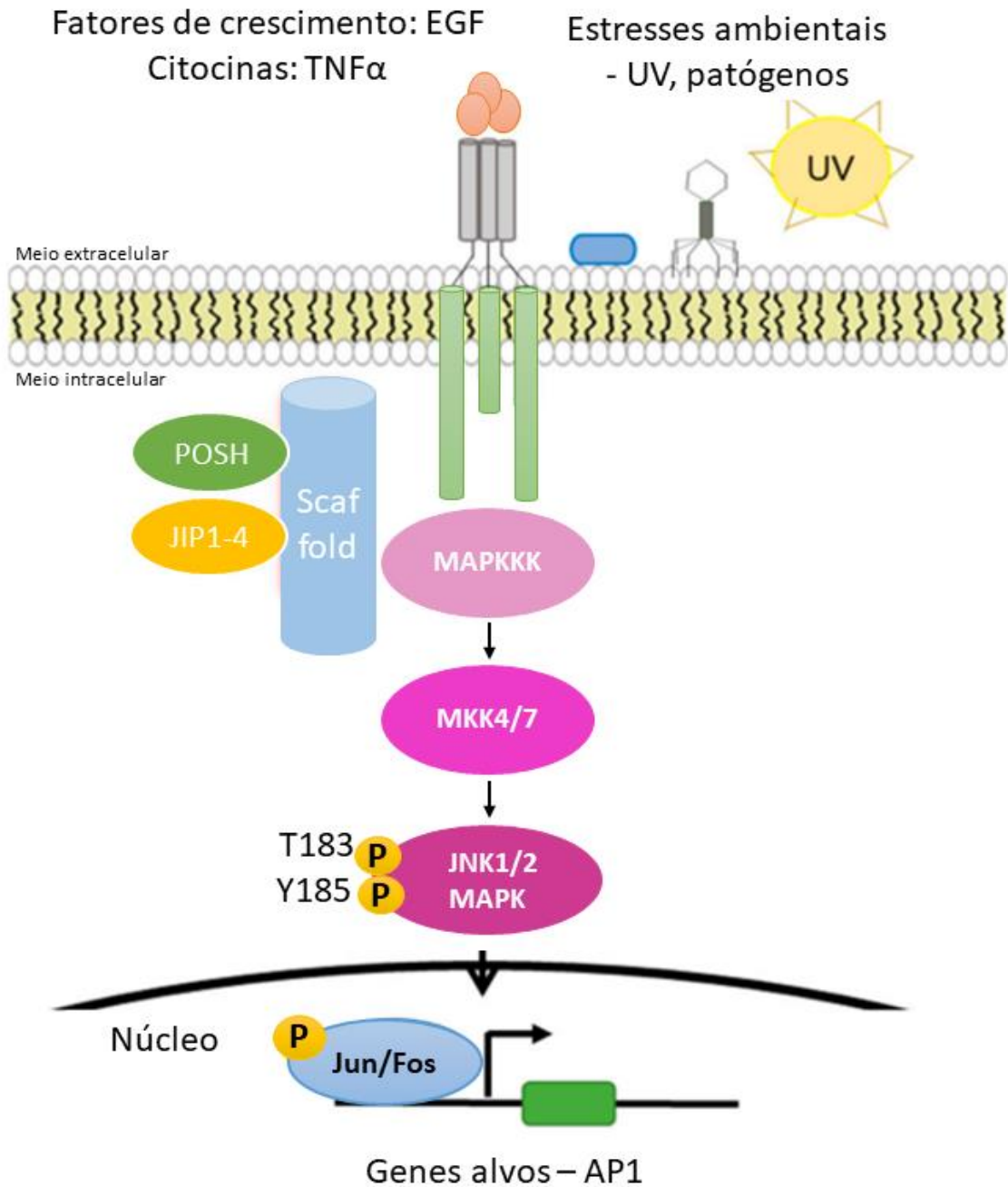
**Figura 9. Representação esquemática do mecanismo de ativação da via de sinalização p38<sup>MAPK</sup>.**



Fonte: Adaptado de Martínez-Limón et al., 2020.

Outra SAPKs altamente responsiva a diversos estímulos celulares, é a proteína quinase JNK1/2. Ela está envolvida em inúmeros processos biológicos como progressão do ciclo celular, sobrevivência celular e apoptose e resposta imunológica. A ativação da proteína JNK1/2 ocorre por proteínas JNKKs (JNK quinases) que são reguladas por JNKKKs (JNK quinase quinases). Resumidamente, sua ativação é iniciada via fosforilação de seus resíduos em seu motivo conservado (Thr-Pro-Tyr) pelas MKK4 e MKK7. Estas proteínas estão sujeitas à regulação por outras proteínas MAP3K e MAP4K, como as proteínas de interação JNK (JIP1, JIP2 e JIP3), proteínas SH3 (POSH) e a proteína quinase I $\kappa$ B associada ao complexo (IKAP). Após a sua total ativação, JNK fosforila proteínas alvo a jusante, como proteínas da família da proteína ativadora do fator de transcrição-1 (AP1), fatores de transcrição de ativação (ATF) e (proteína ETS Like-1) Elk1 (Hammouda et al., 2020; Yarza et al., 2016; Yue and López, 2020), como demonstrado na Figura 10.

**Figura 10. Representação esquemática do mecanismo de ativação da via de sinalização da proteína quinase JNK1/2.**



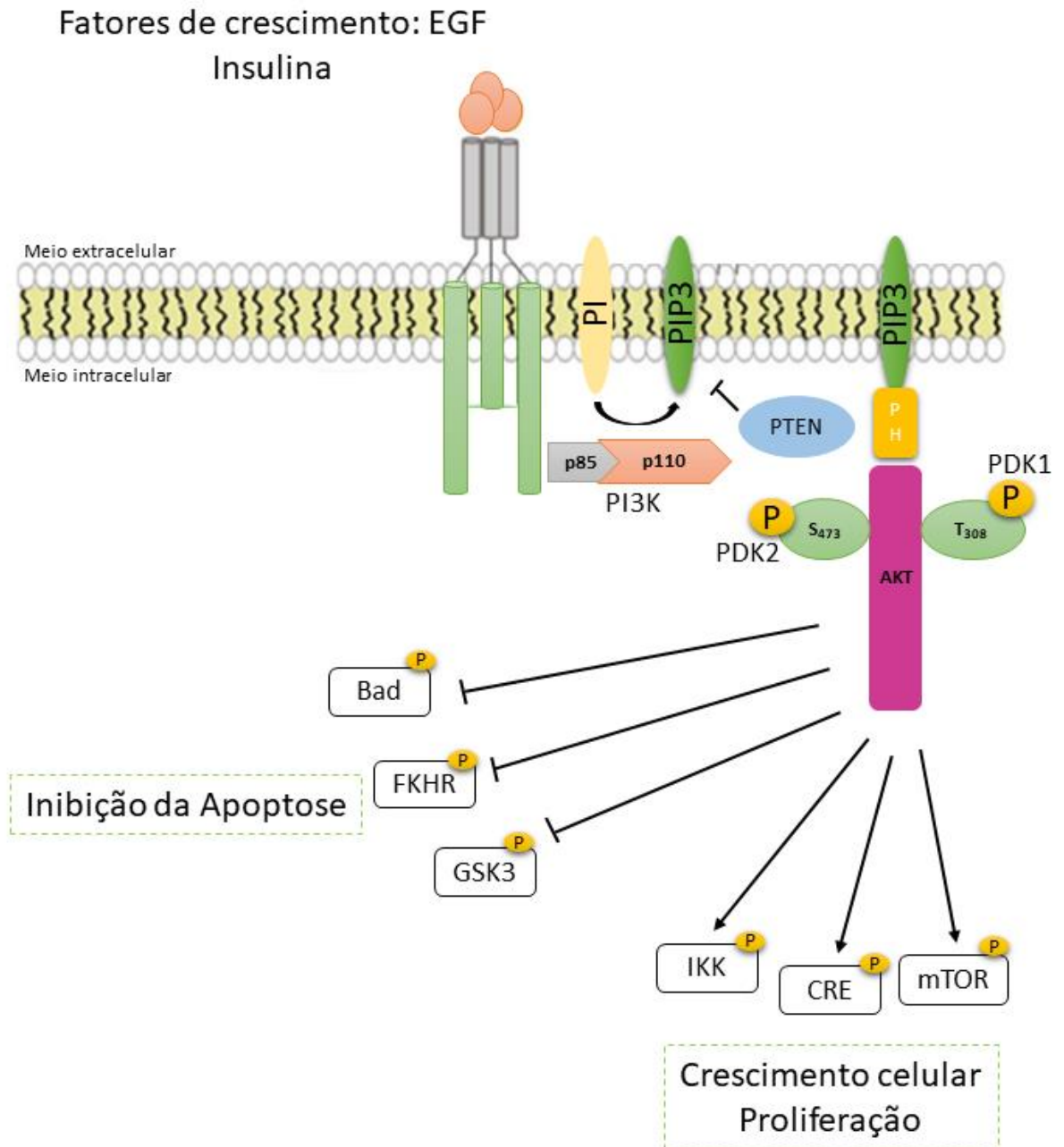
Fonte: Adaptado de Hammouda et al., 2020.



### 1.6.2 Proteína quinase B (AKT)

Além das MAPKs, outra proteína quinase muito importante, a AKT ou também PKB (proteína quinase B), é uma proteína quinase com resíduos serina/treonina, que possui um domínio PH (homologia a pleckstrina) na região N-terminal, seguido por um domínio catalítico e uma região regulatória C-terminal (Manning and Toker, 2017). Esta proteína está envolvida em processos biológicos como crescimento e diferenciação celular, sobrevivência, progressão do ciclo celular e inibição da apoptose, além de ser um dos principais reguladores da sinalização da insulina e metabolismo da glicose (Ersahin et al., 2015). Sua ativação é iniciada em resposta a estímulos como fatores de crescimento e insulina através de receptores tirosina quinase (RTK) ou receptores acoplados a proteína G (GPCR), via recrutamento para a membrana plasmática, ativando uma ou mais isoformas da família PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) (Manning and Toker, 2017). PI3K é uma proteína formada por duas subunidades: regulatória (p85) e catalítica (p110) que se associam após ativação. A ativação da subunidade catalítica ocorre através do receptor do fator de crescimento via recrutamento da subunidade regulatória correspondente ou ativação de Ras, a qual ativa diretamente a subunidade catalítica. A subunidade catalítica fosforila o PI (fosfatidilinositol) gerando PIP3. O acoplamento do PIP3 com o domínio PH da proteína AKT promovem a translocação da proteína para a membrana plasmática, local onde ocorrem alterações conformacionais que permitem sua fosforilação nos resíduos treonina e serina pelas proteínas PDK1 (proteína dependente quinase 1) e PDK2 (proteína dependente quinase 2) respectivamente (Figura 11) (Hanada et al., 2004; Hemmings and Restuccia, 2012). A regulação negativa ou a terminação do sinal da via PI3K/AKT é efetuada pela fosfatase PTEN (fosfatase homóloga a tensina), degradando PIP3 e levando-o a sua conformação original, reduzindo assim os níveis de fosforilação da proteína AKT (Manning and Toker, 2017).

**Figura 11. Representação esquemática do mecanismo de ativação da via de sinalização da proteína AKT.**



Fonte: Adaptado de Macedo, 2017.

Tendo em vista a importância da sinalização celular em diversos processos biológicos, além de poucos estudos na literatura a respeito dos mecanismos de toxicidade do agroquímico MZ, se faz necessário entender como ocorre a modulação das respostas celulares, a fim de descobrir possíveis alvos terapêuticos.

## 1.7 Modelo experimental

O uso de modelos animais, como os roedores, com alta semelhança genética com a espécie humana, são de extrema importância em pesquisas bioquímicas, toxicológicas, comportamentais. Contudo, várias agências e organizações governamentais, devido às questões éticas, passaram a restringir o uso desses animais (Olson et al., 2000). A caracterização de modelos animais complementares que permitam análises moleculares e embriológicas, contribui para o melhor conhecimento dos mecanismos relacionados a doenças, bem como no desenvolvimento. Com isso, o peixe-zebra em sua fase embrionária e larval acaba por facilitar estes estudos em larga escala.

### 1.7.1 Peixe-zebra (*Danio rerio*)

O peixe-zebra, *Danio rerio* (Figura 12) descrito por Hamilton no ano de 1822, é um peixe teleósteo de água doce pertencente à família Cyprinidae, nativo do sul e sudeste asiático, regiões que apresentam clima tropical (Westerfield, 2000).

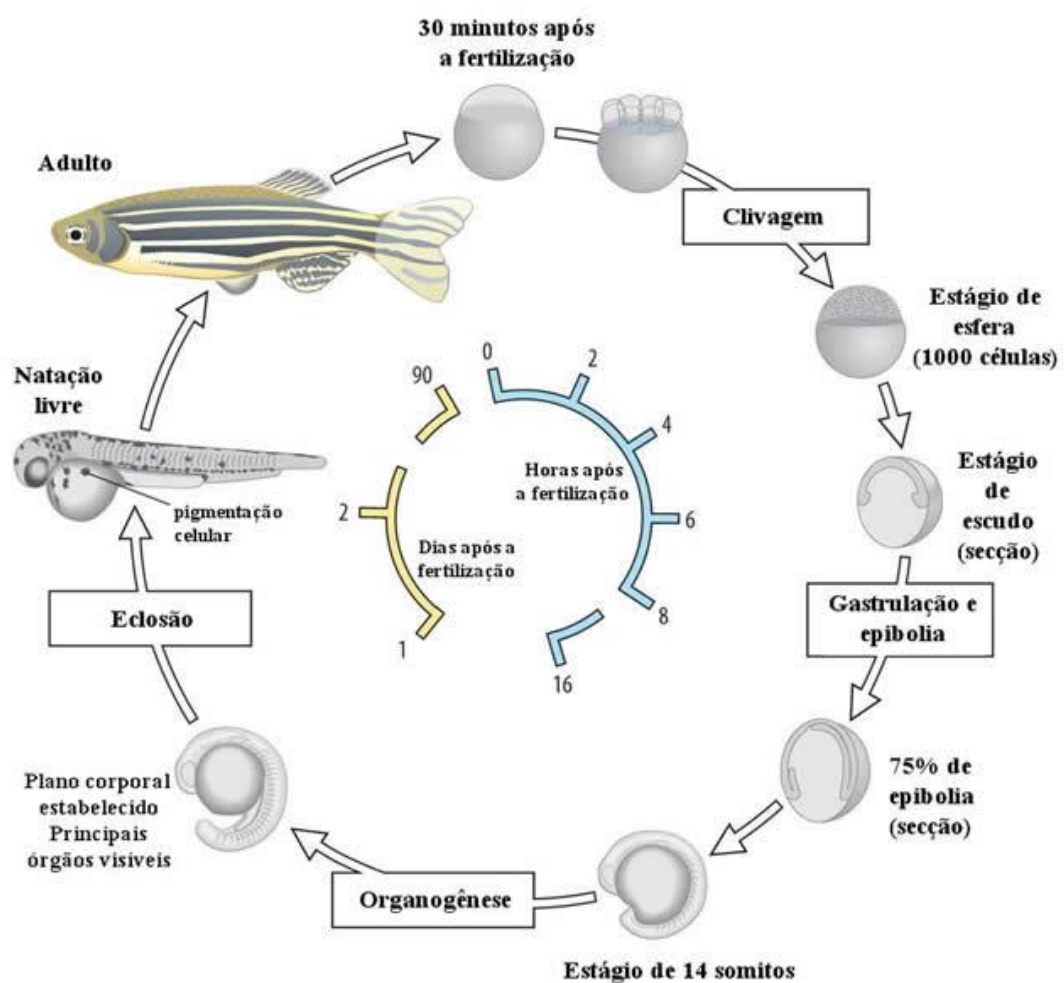
**Figura 12. Peixe-zebra (*Danio rerio*).** Teleósteo, pertencente à família Cyprinidae, amplamente utilizado como modelo experimental complementar.



Fonte: [shorturl.at/twxFP](http://shorturl.at/twxFP)

Existem muitas vantagens práticas no uso do peixe-zebra como modelo animal, como fertilização externa, transparência dos embriões, tamanho pequeno, alta fecundidade, baixo custo de alojamento, além do seu rápido desenvolvimento e maturação sexual (Figura 13) (Ablain and Zon, 2013).

**Figura 13. Desenvolvimento do peixe-zebra (*Danio rerio*).** Na figura é possível visualizar os diferentes estágios de desenvolvimento do peixe-zebra em relação ao tempo.



Fonte: [shorturl.at/iEHOS](http://shorturl.at/iEHOS)

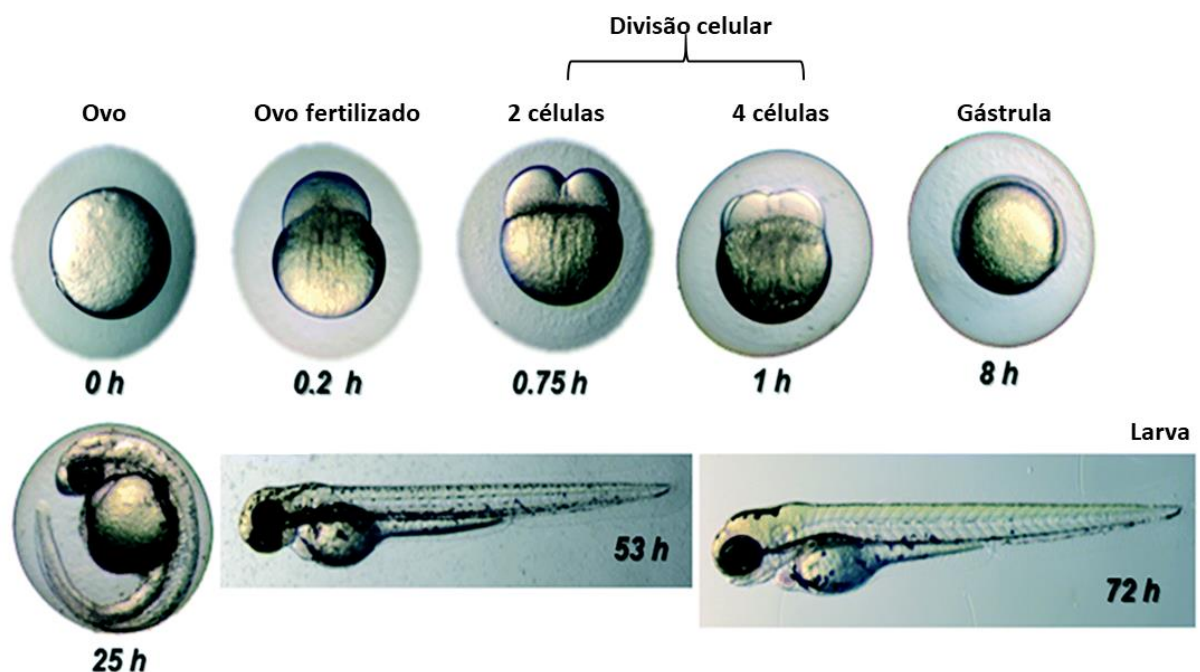
O genoma do peixe-zebra foi completamente sequenciado e demonstrou que seu genoma possui 71% de similaridades quando comparado ao humano, sendo que 84% dos genes estão associados a doenças humanas (Howe et al., 2013). O peixe-zebra também possui uma alta homologia com a morfologia e biologia dos mamíferos, tornando-os um modelo animal

muito atraente no estudo de doenças humanas (Nishimura et al., 2015). A validade dos modelos do peixe-zebra não se deve apenas à proximidade morfológica e genética, mas também comportamentalmente, pois exibe uma variedade de comportamentos complexos, incluindo social, ansiedade, aprendizagem e memória que pode ser útil para modelar doenças neurológicas e psiquiátricas (Gerlai, 2016; Maciag et al., 2020; Norton, 2013).

O aumento da pesquisa utilizando o peixe-zebra como modelo experimental, levou à caracterização de diversos comportamentos em diferentes estágios de desenvolvimento. Kalueff et al. (2013), descreveu mais de cem comportamentos de embriões, larvas e peixes-zebra adultos. Porém, o estudo do peixe-zebra na fase adulta apresenta certas limitações, como o longo período para atingir a fase adulta (três meses de desenvolvimento), o que eleva os gastos, dificulta experimentos em grande escala e aumenta a variabilidade entre os indivíduos. O vasto repertório de comportamentos torna as avaliações mais complexas e dificultando o estabelecimento de modelos mais simples e pontuais de estudo (Levin and Cerutti, 2009).

O uso de larvas de peixe-zebra trazem algumas vantagens em relação ao peixe-zebra adulto (Wolman and Granato, 2012). Dentre estas, está o fato de o desenvolvimento de embrião até o estágio larval ocorrer até o 7 dpf (Figura 14).

**Figura 14. Desenvolvimento embrionário do peixe-zebra (*Danio rerio*) até o estágio larval.**



Fonte: Adaptado de García-Camero et al., 2019.

As larvas do peixe-zebra mostram semelhança com o peixe-zebra adulto e outros vertebrados nos principais comportamentos utilizados em neurofarmacologia, como ansiedade e estresse (Ahmad et al., 2012). Algumas vantagens da larva do peixe-zebra em relação ao adulto são a sua fácil manipulação, tempo de geração rápido, tamanho pequeno, permeabilidade a moléculas pequenas. Recentemente, com o avanço da tecnologia, o uso de larvas de peixe-zebra está ganhando força no campo da pesquisa comportamental, particularmente em neurofarmacologia e neurociência de circuito (Friedrich et al., 2010; Kokel et al., 2010). Utilizando larvas de peixe-zebra,

O uso de larvas de peixe-zebra em pesquisas comportamentais sofre de algumas limitações, como por exemplo, o repertório de comportamento das larvas do peixe-zebra não é tão sofisticado quanto o do peixe-zebra adulto e de outros vertebrados, além do tamanho e a cor dos poços individuais, afetarem o comportamento das larvas do peixe-zebra (Palmér et al., 2017). Embora a utilização de larvas do peixe-zebra apresentem certas limitações, seu uso permite realizar uma análise de alto rendimento em grande escala, como rastrear compostos em um único dia, além da possibilidade de visualizar, monitorar a atividade nas larvas envolvidas em um comportamento (Kokel et al., 2010).

## **2.JUSTIFICATIVA**

O Mancozeb é um fungicida amplamente utilizado na agricultura, cuja toxicidade foi demonstrada em humanos e animais, como nas fases embrionária, larval e adulta no modelo complementar vertebrado peixe-zebra. Embora a toxicidade do fungicida já tenha sido demonstrada, a implicação das vias de transdução de sinais na toxicidade do Mancozeb é um tema ainda pouco abordado. Sendo assim, nosso estudo busca explorar os potenciais riscos ecotoxicológicos associados ao fungicida Mancozeb, seu efeito sobre as vias de sinalização celular e marcadores de estresse oxidativo no estágio larval do peixe-zebra, além de possíveis alterações em padrões comportamentais que permitam complementar a compreensão dos aspectos moleculares envolvidos na ação deste composto.

### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da exposição do fungicida Mancozeb no modelo experimental vertebrado na fase larval (embrião eleuthero) de peixe-zebra (*Danio rerio*) sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Após a exposição das larvas do peixe-zebra ao agroquímico MZ:

- Avaliar a sobrevivência;
- Avaliar o perfil comportamental;
- Avaliar a geração de espécies reativas de oxigênio;
- Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes e acetilcolinesterase;
- Investigar a modulação das vias de sinalização ERK1/2, p38<sup>MAPK</sup>, JNK1/2 e AKT;
- Investigar possíveis danos ao material genético e processos apoptóticos.



#### **4. RESULTADOS**

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual será submetido à revista Environmental Pollution ISSN: 0269-7491. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no manuscrito, o qual está disposto na forma em que serão submetidos para publicação.

## **Mancozeb fungicide hampers motor activity and increases MAPK phosphorylation in zebrafish larvae**

Illana Kemmerich Martins<sup>a</sup>, Leonardo Gomes Pereira<sup>a</sup>, Mauro Eugênio Medina Nunes<sup>a,b</sup>, Andressa Rubim Lopes<sup>a</sup>, Luana Paganotto Leandro<sup>a,b</sup>, Renata Siqueira de Mello<sup>a</sup>, Maria Vitória Takemura Mariano<sup>a</sup>, Jeferson Luis Franco<sup>a</sup>, Thaís Posser<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Oxidative Stress and Cell Signaling Research Group, Interdisciplinary Center for Biotechnology Research – CIPBIOTEC, Campus São Gabriel, Federal University of Pampa, São Gabriel, RS, 97300-000, Brazil.

<sup>b</sup> Postgraduate Program in Biological Sciences - Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

### **Abstract:**

Agrochemical usage in recent decades has gained worrying proportions, since they are closely associated with several health and environmental complications. The present study aimed to investigate behavioral, biochemical stress markers, and signaling pathways in larvae of fish *Danio rerio* exposed to fungicide Mancozeb (MZ). MZ is a fungicide belonging to the dithiocarbamate class and is widely used in agriculture. Larvae of 4-, 5-, and 6-days post fertilization (dpf) were exposed to non-lethal concentrations of MZ for 24, 48, or 72 hours. MZ decreased motor ability evaluated by traveled distance, immobile time, and time spent in the peripheral area. Moreover, MZ promoted an increase of AChE activity, ROS levels and apoptotic cells, followed by severe DNA damage and antioxidant enzyme activity changes, such as an increase of SOD activity and inhibition of GPx and Trx-R activity. Additionally, phosphorylation levels of the proteins p38, ERK1/2, and AKT were stimulated, whereas JNK1/2 phosphorylation was inhibited. Overall, the present study demonstrated that Mancozeb could disrupt motor behavior and cause cell death in the larval phase of fish, possibly due to alteration in signaling pathways and disruption in cholinergic mechanisms.

**Keywords:** *Danio rerio*, Acetylcholinesterase, DNA damage, apoptosis, dithiocarbamates.

## 1. Introduction

The intensive use of agrochemical in agriculture is a worldwide concern since agricultural effluents represent a freshwater ecosystem risk. Fungicide Mancozeb (MZ) plays a significant role in the global agrochemical market, representing one of the most used fungicides (Fitsanakis et al., 2002; Gullino et al., 2010). MZ is a broad-spectrum agent belonging to the dithiocarbamate class and ethylene-bis-dithiocarbamate subclass with manganese and zinc in their structure  $[(C_4H_6MnN_2S_4)_x(Zn)_y]$  (US EPA, 2005).

Behavioral and redox alterations have been reported in fishes in response to contamination of the aquatic environment by dithiocarbamate compounds (Leandro et al., 2021). Additionally, embryonic development (Cao et al., 2019a) and mitochondrial dysfunction (Cao et al., 2019b) in zebrafish were reported. Our group had demonstrated significant changes in antioxidant system when carps were exposed to Mancozeb and accumulation of manganese in blood and brain, with phosphorylation of transcriptional factor NRF-2 (Costa-Silva et al., 2018b). The phase of embryogenesis of zebrafish was susceptible to the MZ presence which induced morphological abnormalities that were avoided with the addition of antioxidant (Costa-Silva et al., 2018a).

Mitogen-activated protein kinases (MAPK) comprise a family of well-conserved serine-threonine protein kinases that participate in several biological processes, including cell cycle progression, survival, inflammation, and cell death. They are activated by dual phosphorylation on tyrosine and threonine residue (Hotamisligil and Davis, 2016; Manning and Toker, 2017). AKT kinase regulated cell survival mediated for most trophic factors in zebrafish. The inhibition of this enzyme reduces brain size during embryogenesis (Chen et al., 2017). There is a lack of studies in the literature about the possible effects of MZ on phosphorylation of MAPKs and Akt. However, it was demonstrated that inhibition of p38 by curcumin avoided MZ toxicity in thymocytes, suggesting the involvement of these proteins in the mechanism of toxicity of this compound (Pavlovic et al., 2016).

Zebrafish larvae have contributed to the investigation of behavioral and biochemical toxicity of environmental toxicants and provide insights into the neurobiology of human diseases such as schizophrenia and psychosis through various high-throughput assays (Basnet et al., 2019). The larval phase's susceptibility to Mancozeb is not described until now; thus, our study aims to investigate the action of exposure to MZ during the larval stage in behavioral and biological parameters, seeking to understand the biochemical mechanisms involved in the

toxicity of this compound.

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Chemicals**

Mancozeb (45553), reduced glutathione (GSH, G4251); tetramethylethylenediamine (TEMED, T9281); Quercetin (Q4951); 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB, D8130); 1-Chloro, 2,4-dinitrobenzene (CDNB, 237329); 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, 35845); Hepes Minimum 99,5% (Titration, H3375); Albumin from bovine serum (BSA, A6003); acridine orange (318337); Triton X-100 (T8532); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1110216); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (P0662); β-mercaptoethanol (M6250); anti-rabbit 41 immunoglobulin (HRP peroxidase-linked antibody) were obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brazil). SDS; acrylamide; bis-acrylamide and hybond nitrocellulose were obtained from GE Healthcare Life Division (Uppsala, Sweden). Anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182), anti phospho-AKT (Thr308), anti-phospho JNK1/2 (Thr183/Tyr185), anti-phospho ERK1/2 (Thr202/Tyr204) and β-actin antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). All other reagents were commercial products of the highest purity grade available.

### **2.2 *Danio rerio* maintenance**

The zebrafish model's establishment and maintenance were approved and regulated by CEUA - Unipampa (protocol n° 052/2019). Wild adult zebrafishes (*Danio rerio*) were acquired from a local supplier and kept under suitable conditions in a Zebtec® recirculation system, following parameters considered essential for the well-being of the species in the vivarium. Reverse osmosis filtered the system's water with pH 7.2, the conductivity of 400 μS, temperature 28°C, photoperiod of 14 h light, and 10 hours dark. According to previously established protocols (Westerfield, 2000), the fishes were fed with flocked commercial feed and live food (*Artemia salina*) four times a day. Zebrafish embryos were obtained by the reproduction of adults and maintained under controlled temperature and photoperiod until they reached the larval phase, which was used in the assays.

### **2.3 Exposure to agrochemical Mancozeb / Experimental design**

The MZ stock solution was prepared using water from the Zebtec<sup>®</sup> system and subsequently the treatment dilutions were made. Zebrafish larvae with 4, 5 and 6 days post-fertilization (dpf) were exposed by immersion to sublethal concentration of MZ (0, 0.25, 0.5 and 0.75 mg/L) (Costa-Silva et al., 2018a) in 12-well plates during 24, 48 and 72 hours (4 mL per well). Larvae were kept in BOD throughout the treatment period. Exposure studies were conducted in triplicate with 30 larvae per group and experiments were repeated at least three times independently. Briefly, Figure 1 shows the experimental timeline of larval exposure.

## **2.4 Survival**

Thirty zebrafish larvae with 48 hpf were transferred to 12-well plate (ten per well). The group control was water from the Zebtec<sup>®</sup> system only and the treatments were MZ at concentrations of 0.25, 0.5, 0.75 mg/L dilute in water from Zebtec<sup>®</sup> system. The number larvae were counted daily for a period of 5 days, to obtain the survival curve. Results were analyzed and plotted as percent survival of a total 30 larvae. All the experiments were performed in triplicate.

## **2.5 Exploratory Behavioral Testing**

The larvae locomotor activity was evaluated by the Open Field test (Altenhofen et al., 2017). MZ exposed larva (15 per group) was individually placed in a well of a 24-well plate and recorded through a digital magnifier coupled to a computer for approximately 6 minutes; an acclimatization period of 60 seconds was considered. Each larva was analyzed individually for 330 seconds by ANY-maze<sup>®</sup> software (Stoelting CO, USA). This behavioral apparatus is divided into two regions: central and peripheral area and allows the evaluation of motor parameters such as distance traveled, absolute turning angle, immobility, and non-motor parameters like time spent in the central and peripheral area.

## **2.6 Measurement of ROS production**

The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) was used as a general index of ROS in larvae, according to Anichtchik et al., 2008 with minor modifications. Larvae (15 per group) were homogenized and incubated with the fluorescent dye 2,7-

dichlorofluorescein diacetate (DCFH<sub>2</sub>-DA) for 1h in the dark and the fluorescence intensity was measured on a microplate reader (PerkinElmer Enspire 2300) in a wavelength 495 nm<sub>ex</sub> and 529 nm<sub>em</sub>. The DCF formation rate was calculated as a percentage of the DCF fluorescence relative to the control group, and the protein concentration normalized the values. Experiments were conducted in triplicates (15 larvae/group) and were repeated at least three times independently.

## **2.7 Enzyme Assays**

For determination of enzymatic activity, zebrafish larvae (30 per group) per group were homogenized in 200 µL of 20 mM HEPES buffer pH 7.0 at 3,000 rpm for 5 minutes at 4°C and an aliquot of the supernatant was destined to acetylcholinesterase (AChE) determination (Ellman et al., 1961). The remaining supernatant was centrifuged again at 45,000 rpm for 30 minutes at 4°C to measure catalase (CAT) (Aebi, 1984), superoxide dismutase (SOD) (Kostyuk and Potapovich, 1989), glutathione S-transferase (GST) (Habig and Jakoby, 1981), glutathione peroxidase (GPx) (Wendel, 1981), glutathione reductase (GR) (Carlberg and Mannervik, 1985) and thioredoxin reductase (Trx-R) (Holmgren and Björnstedt, 1995).

## **2.8 Apoptotic cells evaluation**

The acridine orange, a fluorescent dye was used for the detection of apoptotic cells. For this experiment, 7dpf larvae were used. Zebrafish larvae (10 per group) were placed in centrifuge microtubes containing 2 mL of system water and acridine orange at the final concentration of 5 µg/mL and incubated in the dark for 20 minutes (Tilton et al., 2008). After, the larvae were washed three times in the system water and then fixed on microscopy slides with 1.5% methylcellulose. The images were obtained by fluorescence microscopy (Olympus 1X71), with a 500ms exposure in green light (Olympus Light UV U-RFL-T) and an image analysis system called Q-capture. ImageJ software was used for counting the number of apoptotic cells.

## **2.9 Genotoxicity**

Genotoxicity was evaluated by the comet assay (Kosmehl et al., 2008). Zebrafish larvae (20 per group) were homogenized in HEPES buffer and subsequently centrifuged for 10

minutes at 1000 rpm to remove the supernatant, and the pellet was resuspended in 1% PBS. Then 10  $\mu$ l of the sample was placed in 90  $\mu$ L of 0.75% low melting point agarose and added to coverslip previously covered with 1% agarose. The slides were incubated at 4°C for 15 minutes and then added in a lysis solution (100 mM EDTA, 2.5 M NaCl, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 13.0) in the dark at 4°C overnight. After this time, the slides were immersed in a neutralizing solution (400 mM Tris) for 30 min. For the unwinding of the DNA, the slides were immersed for 30 min in a horizontal electrophoresis tank containing an alkaline buffer (NaOH 12 g/L and EDTA 0.37 g/L) at 25 V and 300 mA. After electrophoresis, the slides were washed in distilled water, fixed with 70% alcohol for 5 min, and incubated at 4°C for one hour. The slides were then stained with Sybr Green for 5 minutes. All slides were analyzed by fluorescence microscopy (Olympus 1x71) at 100x magnification, with a 1044.7 ms exposure in the green light (Olympus U-RFL-T UV light) and an image analysis system (Q-Capture). The images obtained were analyzed by ImageJ/Open Comet Image Analysis Software.

## **2.10 Quantification of Protein Content**

The protein content of samples was determined with bovine serum albumin (0.11% BSA) as standard, according to Bradford (1976).

## **2.11 Western Blotting**

Analysis of protein phosphorylation analysis was performed according to Martins et al., 2018 with minor modifications. MZ exposed larvae (50 per group) were homogenized, and protein was quantified. SDS stop solution (4% SDS, 50 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 6.8), 25% glycerol sample, and 8%  $\beta$ -mercaptoethanol were added. Proteins were separated by SDS-PAGE gel using 10% polyacrylamide gels and then electroblotted onto nitrocellulose membranes. After transfer, the membranes were washed in Tris-saline buffer with Tween (100 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl and 0.1% Tween-20, pH 7.5) and subsequently incubated overnight (4°C) with specific anti-rabbit antibodies, anti phospho p38 (1:1.000), anti phospho ERK1/2 (1:1.000), anti-phospho-JNK1/2 (1:1.000), anti-phospho-AKT (1:1.000) and anti- $\beta$ -Actin HRP conjugated (1:10.000) was used as a loading control. Subsequently, the membranes were washed with TBS-T buffer and incubated for 1 hour at room temperature with a specific secondary antibody (anti-peroxidase-linked IgG). Immunoblotting was visualized on the IS4000 MM Pro Bruker imaging system using ECL detection reagent. Subsequently, the optical

density of the bands was analyzed using Scion Image® software and expressed as a percentage in relation to the control group.

### 2.12 Statistical analysis

Data were submitted to D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk, and Kolmogorov Smirnov normality tests. For comparative analysis between groups, the One-Way Variance Analysis (ANOVA), followed by Tukey *post hoc* of multiple comparisons or t-test, was used for data following a Gaussian distribution. Non-parametric data were analyzed using the Mann-Whitney or Kruskal Wallis test. The parametric results were expressed as mean  $\pm$  standard error (SEM), considering the significant results when  $p \leq 0.05$  (represented as bars) and non-parametric data expressed as median  $\pm$  interquartile range (represented as box plot).

## 3. Results

### 3.1 MZ exposure does not alter the survival of zebrafish larvae

Zebrafish larvae were monitored for 72 h with MZ treatment after 48 hpf. Mz treatment did not affect survival rate after the treatment with concentration of 0.25, 0.5 and 0.75 mg/L (Fig.2).

### 3.2 Behavioral parameters of zebrafish larvae

To determine the behavioral parameters the openfield assay was performed. So, Mz treatment promoted a significant reduction of distance traveled in zebrafish larvae exposed to 0.5 and 0.75 mg/L of agrochemical at 24, 48 and 72 h (Fig. 3). As expected, when the immobility time was determined an increase was noticed in this parameter when zebrafish larvae was treated with 0.5 and 0.75 mg/L of MZ at 24, 48 and 72 h (Fig 4).

When the angle of rotation was evaluated in zebrafish larvae, a reduction of angle of rotation was noticed only in 0.75 mg/L at 24 h (Figure 5A), while at 72 h (Figure 5C) of MZ treatment there was an increase of angle of rotation in 0.5 mg/L.

A natural behaviour of zebrafish larvae to remain on the peripheral area of the apparatus, is called thigmotaxis. Only the highest concentration, 0.75 mg/L of MZ was able to significantly increase the time spend in peripheral area at 24, 48 and 72 h (Figure 6A-C). Time in peripheral



area was increased in 0.5 mg/L at 24 and 72 h (Figure 6A and C), remained unchanged at 48 h. It is noteworthy that MZ 0.25 mg/L remained unchanged at 24, 48 and 72 h (Fig 6A-C).

### **3.3 MZ exposure increases ROS levels in zebrafish larvae**

ROS levels in zebrafish larvae were investigated (Figure 7). A significant increase was observed reactive species was produced by MZ treatment from 0.25 and 0.5 mg/L at 24 h of exposure.

Biochemical parameters such as DCF-DA oxidation were evaluated in zebrafish larvae exposed to MZ for 24 hours. A significant increase (50%) in reactive oxygen species formation was observed at concentrations of 0.25 and 0.5 mg/L when compared to the control group (Figure 7).

### **3.4 Exposure to MZ causes apoptosis and DNA damage in zebrafish larvae**

The damage to DNA and apoptosis induced by agrochemical MZ in zebrafish larvae was evaluated by the Comet and Acridine Orange tests, respectively. A significant increase in comet length (600%) and comet tail length (10%) were observed when compared to the control group, as shown in Figure 8.

Corroborating this result, was observed a significant increase in the number of pyknotic nuclei or cells in apoptotic processes stained with acridine orange (Figure 9).

### **3.5 MZ exposure induces enzymatic changes in zebrafish larvae**

A significant increase (290%) in AchE enzyme activity was observed in zebrafish larvae exposed to MZ (Figure 10).

The activity of antioxidant enzymes is well known and widely described for being modulated under oxidative stress conditions. The enzyme SOD responsible for dismuting the superoxide radical in  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{H}_2\text{O}$  significantly increased (44%) its activity when compared to the control (Figure 11A), while the enzyme CAT responsible for breaking down the non-radical  $\text{H}_2\text{O}_2$  into 2  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{O}_2$  molecules remained at the control group level (Figure 11B). There was a significant decrease of 24% and 45% in the activity of GPx and Trx-R, respectively

(Figure 11D and F) when compared to the control group. No significant changes in GST and GR enzyme activity were observed (Figure 11C and E).

### **3.6 MZ exposure modulate MAPK and AKT signaling pathways**

In order to determine the effects of MZ treatment in zebrafish larvae, we identified the signaling pathway that it would be probably associated with toxicity mechanism (Figure 12).

The zebrafish larvae exposed to MZ, demonstrated a significant increase in p38<sup>MAPK</sup> (66%), ERK1/2 (22%), and AKT (89%) phosphorylation (Figure 12A, B and D), while in JNK1/2 phosphorylation (Figure 12C) showed a substantial decrease (39%).

## **4. Discussion**

Agrochemicals are used to increase cultivars' productivity and control pests avoiding economic losses. The continuous use of these compounds associated with their decomposition in more toxic compounds leads to water contamination and compromises several species' survival (Tilton et al., 2008). When in water, MZ presents instability, being fastly decomposed due to the interaction with environmental factors (Balardin et al., 2017).

It was previously shown that MZ induced severe malformations and biochemical alterations in zebrafish embryos when exposed to sublethal concentrations (Costa-Silva et al., 2018a; Tilton et al., 2006). Thus, in this study, the knowledge about the susceptibility of developmental stages to this compound was extended to the larval phase. The larval phase can be considered an appropriate model for toxicological studies on aquatic organisms. At 24 hpf, the larva exhibits exploratory behavior, developed eyes, beating heart, and tail movements (Kimmel et al., 1995). Between 4-5 dpf, zebrafish larvae demonstrate behaviors like hunting, avoidance, scototaxis, and thigmotaxis (Colwill and Creton, 2011; Schnörr et al., 2012), allowing different behavioral tests to be performed during this stage (Colwill and Creton, 2011). In this study based on behavioral studies, MZ leads to a disruption in locomotor ability of fishes. Other studies have shown that some agrochemicals are also capable of causing changes in zebrafish larva's behavioral profile (Melo et al., 2015; Perez-Rodriguez et al., 2019; Velki et al., 2017).

Acetylcholinesterase (AChE) activity analysis was performed to verify whether MZ was interfering with zebrafish larvae behavior through cholinergic system, since acetylcholine is

related to movement. Our results demonstrated an increase in AChE activity in zebrafish larvae exposed to MZ fungicide. The cholinergic system plays a fundamental role in several vital functions, with acetylcholine being the main neurotransmitter of this system (Thapa et al., 2017). Responsible for regulating the transmission and levels of acetylcholine available in the synaptic cleft, the AChE enzyme degrades the neurotransmitter into choline and acetate, and is involved in many neural functions such as sleep, behavioral, learning, memory, glutamatergic modulation and dopaminergic therapy (Trang and Khandhar, 2019). This increase observed in its activity may be related to cholinergic dysfunction due to the decrease in neurotransmitter levels in the synaptic cleft, compromising larvae's exploratory movement after MZ exposure.

When performing the redox steady state assay, which measures the generation of reactive oxygen species, we observed an increase in their production at concentrations of 0.25 mg/L and 0.5 mg/L. Divalent metals like Zn and Mn could account in part for MZ toxicity. It is known that exposure to Mn induces reactive oxygen species in fish and fruit flies (Costa-Silva et al., 2018a, 2018b; Saraiva et al., 2018).

Considering that in our study MZ exposure increased the generation of reactive oxygen species, the activity of some enzymatic antioxidants was also analyzed, such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and thioredoxin reductase (Trx-R), these enzymes known to delay or prevent oxidative damage to biomolecules (Pisoschi and Pop, 2015). CAT and SOD enzymes are known to be the first line of cellular defense against deleterious effects caused by reactive oxygen species (He et al., 2017). The increase in SOD activity may be related to the free radicals generated by exposure to MZ, which under stress conditions, this enzyme can be regulated via antioxidant response element (ARE) (Lacher et al., 2015), in order to increase its expression, as well as mitochondrial dysfunction, resulting in increased generation of the superoxide radical due to this exposure, as observed in other studies (Bailey et al., 2016; Todt et al., 2016). The inhibition of GPx and Trx-R enzymes activity, as obtained in our study, may reflect the fact that they are not required due to other detoxification mechanisms, such as CAT and GST enzymes, as they may act on the same product of the dismutation of the enzymes superoxide radical, hydrogen peroxide (Costa-Silva et al., 2018).

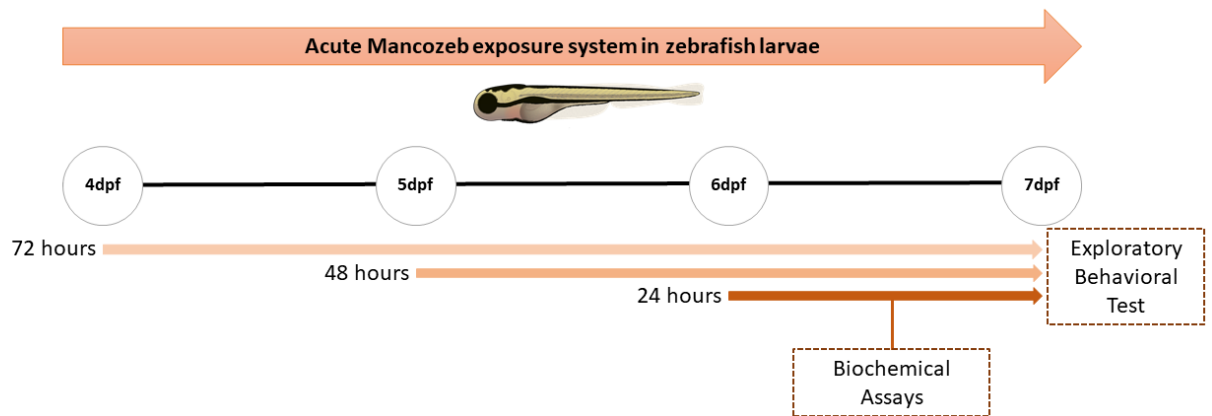
This study demonstrated that treatment with agrochemical MZ induced apoptosis and genotoxicity, which were determined by biomarkers of cell death and DNA damage. The same effect was observed in zebrafish larvae exposed during the embryonic period (Costa-Silva et al., 2018) to dithiocarbamate compounds such as MZ. These compounds have a broad mode of

action, including GSH depletion, which may be related to the activation of apoptotic pathways (Circu and Aw, 2012); moreover manganese metal present in its composition also activates proteins involved in cell death (Altenhofen et al., 2017).

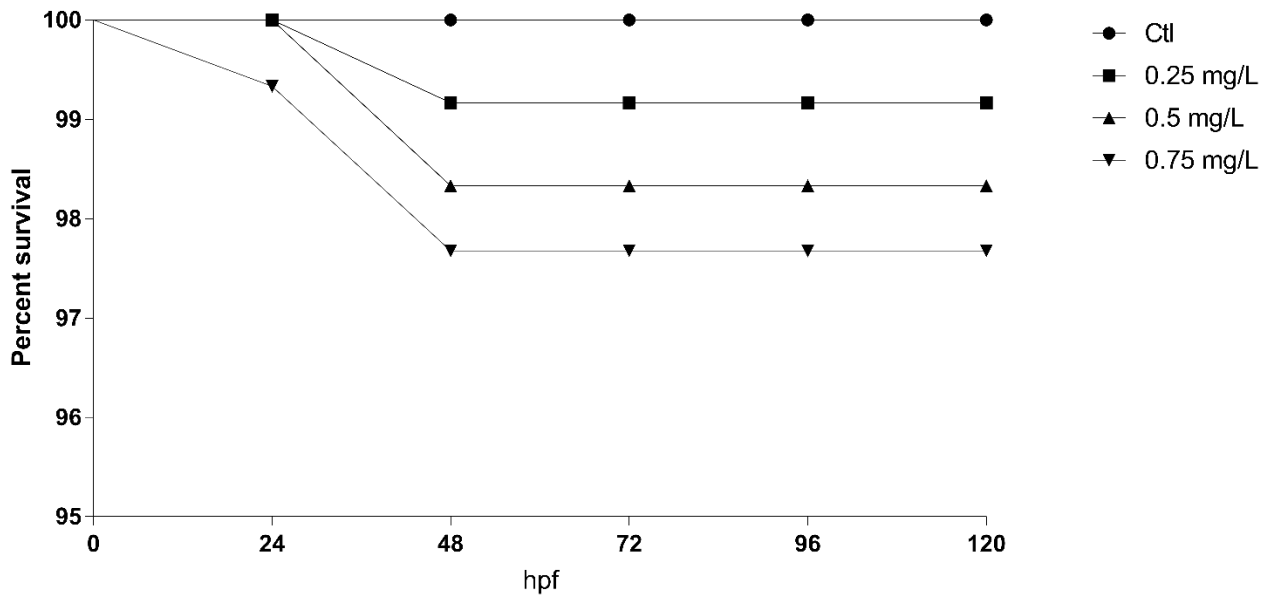
Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are responsible for cell signal transduction in response to various stimuli, including oxidative stress. The MAPK family comprises three kinases: ERK1/2, JNK1/2, and p38<sup>MAPK</sup>. Activation of these proteins results in serine, threonine, and tyrosine residues' phosphorylation to regulate different functions such as cell adhesion, division, migration, and proliferation (Lee et al., 2018). In this study, exposure to MZ increased ERK and p38 phosphorylation. These kinases are responsive to oxidative stress, possibly stimulating apoptosis by inducing the expression of pro-apoptotic Bcl-2 proteins (Kasprowska-Liśkiewicz, 2017; Su et al., 2019). JNK protein is also known to regulate critical physiological processes of cell differentiation and proliferation, neuronal function, embryonic development, cell death and survival processes (Zeke et al., 2016). In this study, it was possible to observe the inhibition of JNK protein. Yinghua et al., (2014) showed that the transcription factor FOXO-1 interacts directly with JNK, and its inhibition may be involved in the low expression of FOXO-1, which modulates the expression of genes involved in DNA repair and apoptosis. In contrast, AKT activation may trigger an adaptive stress response generated by the MZ fungicide, allowing zebrafish larvae's survival until their functions are restored. It is related to survival, proliferation, cell growth, among others (Iorio et al., 2015).

## 5. Conclusion

In conclusion, this study demonstrated for the first time the potential neurotoxic effect exerted by the fungicide MZ on zebrafish larvae. Our study showed severe locomotor damage following exposure to MZ at sublethal doses, causing changes in the cell's redox homeostasis, resulting in damage to biomolecules such as DNA and subsequent cell death apoptosis. An important finding was the activation of signaling pathways that are involved in the cell response to the stress and are implicated in repair and apoptotic mechanisms and, together with modulation of antioxidant enzyme activity, could minimize the damage caused by MZ. Our findings reveal new target of MZ contributing to a better understanding of the mechanisms involved in this compound's toxicity on aquatic organisms.



**Figure 1.** Experimental design scheme of adult zebrafish exposed to MZ. The acute toxicity test was performed at different concentrations (0, 0.25, 0.5 and 0.75 mg/L) of Mancozeb from 24, 48, 72 h of exposure. After the exposure, the larvae were submitted to exploratory behavioral test. The biochemical assay was performed only after the 24 h treatment.



**Figure 2.** Survival curve of zebrafish larvae treated by immersion with the fungicide MZ. For each of the independent 7 experiments 30 larvae at 48 hpf were immersed for 120 h in MZ concentrations of 0.25, 0.5 and 0.75 mg/L and a control group with water Zebtec® system. Subsequently, larvae survival was monitored during 120 h. Survival varied between approximately 97% and 100%.

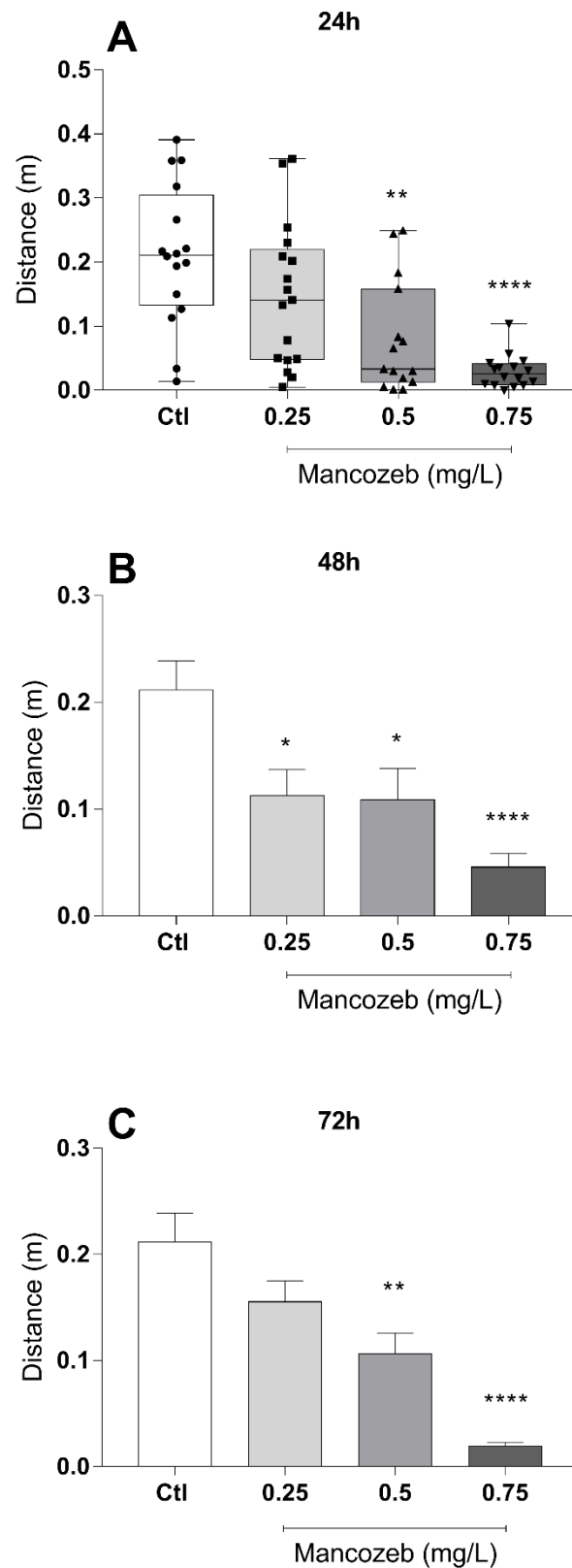
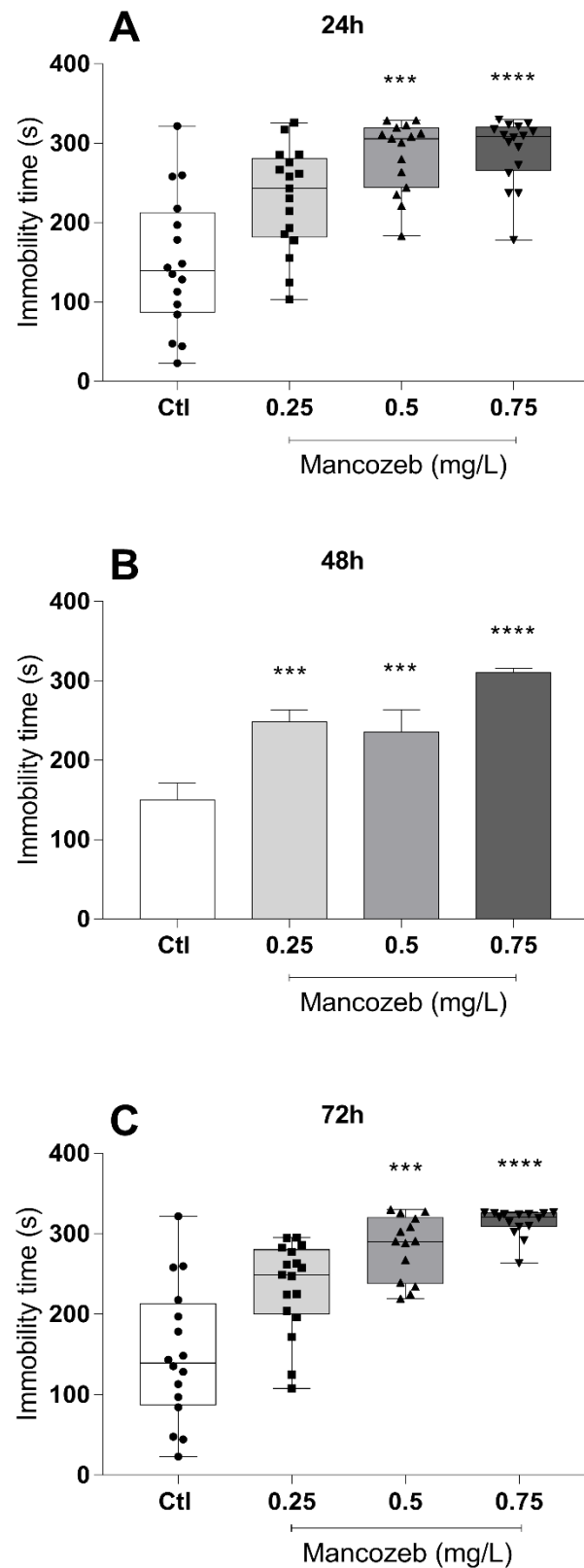


Figure 3. Effect of motor parameter the distance traveled in zebrafish larvae exposed to the agrochemical MZ in static solution at different concentrations and exposure times. At the end of the day of exposure, larvae exposed to MZ were subjected to the Open Field exploratory

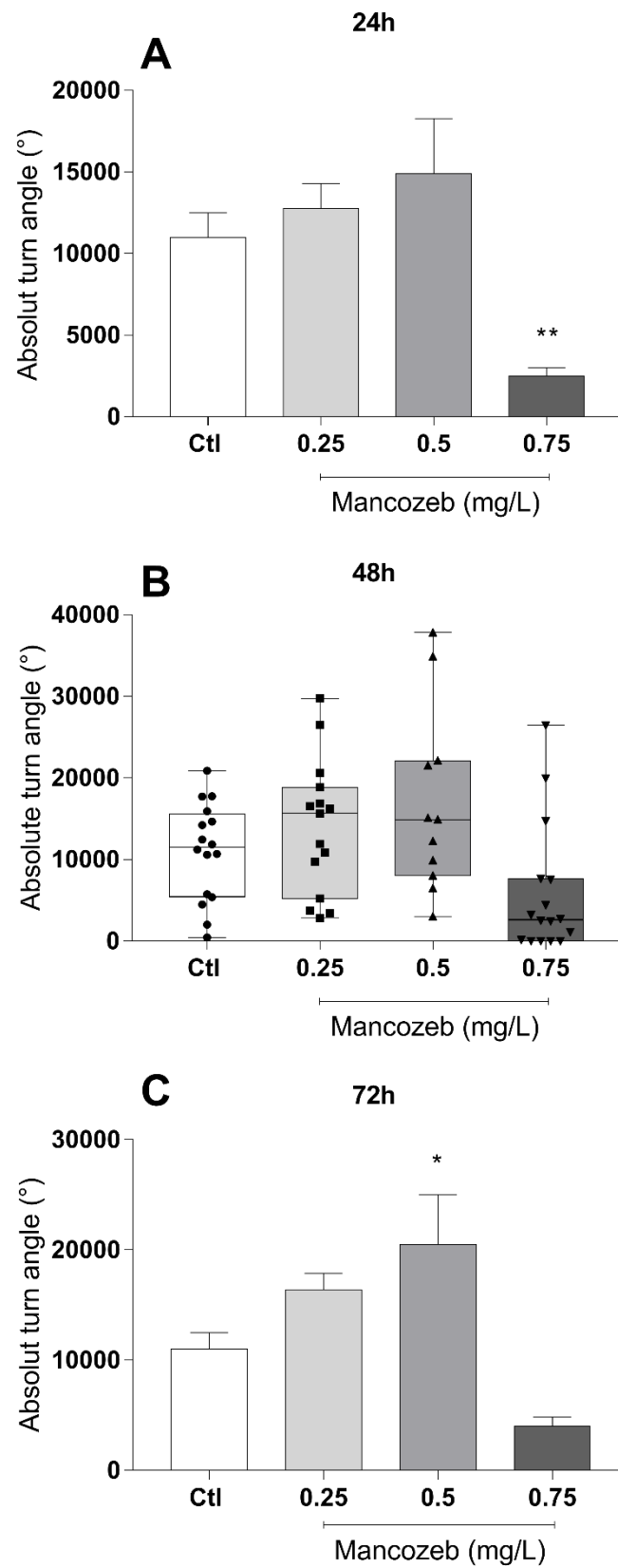
behavioral test. The analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by post-test of multiple key comparisons for parametric data and nonparametric data were submitted to Kruskal-Wallis test after Dunn test. Data expressed as mean  $\pm$  SEM (B and C), median  $\pm$  interquartile range (A) and considered statistically reduced when \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .





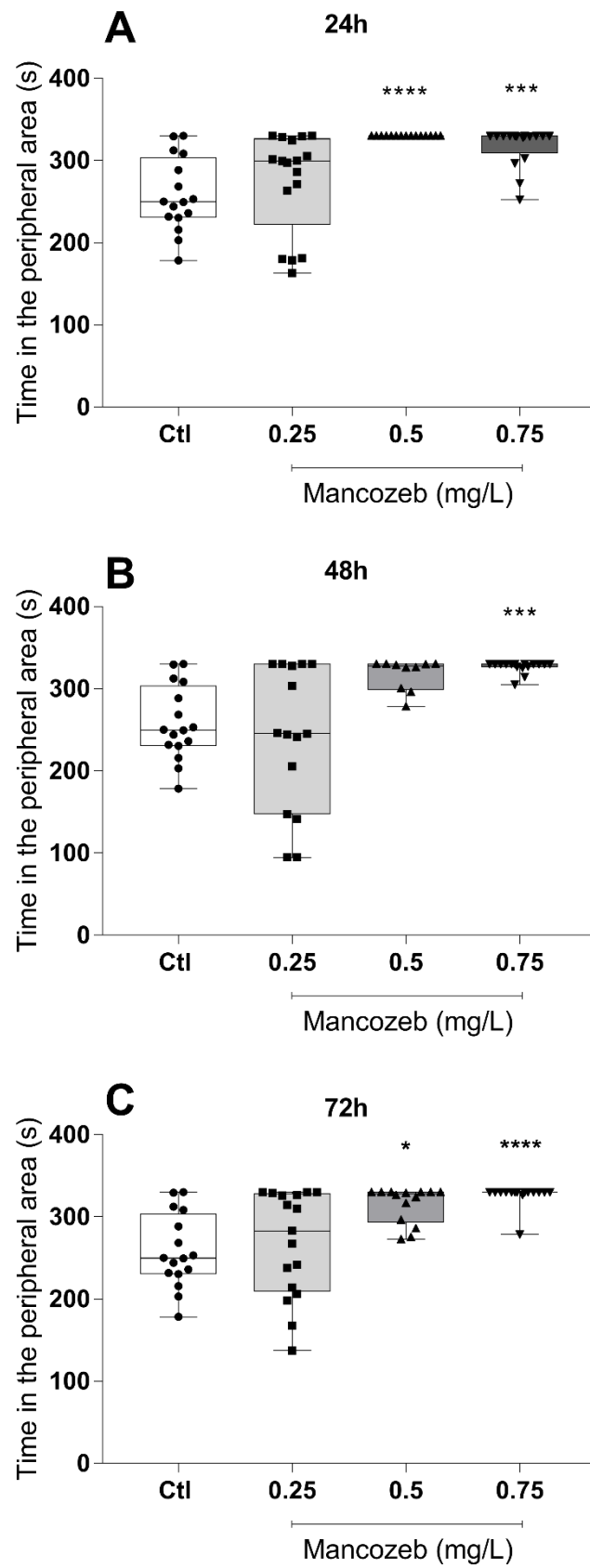
**Figure 4.** Effect on motor immobility parameter in zebrafish larvae exposed to agrochemical MZ in static solution at different concentrations and exposure times. At the end of the exposure, larvae exposed to MZ were subjected to the Open Field exploratory behavioral test. The

analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by post-test of multiple key comparisons for parametric data and nonparametric data were submitted to Kruskal-Wallis test after Dunn test. Data expressed as mean  $\pm$  SEM (B), median  $\pm$  interquartile range (A and C) and statistically estimated when \*\*\*  $p < 0.001$  and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .



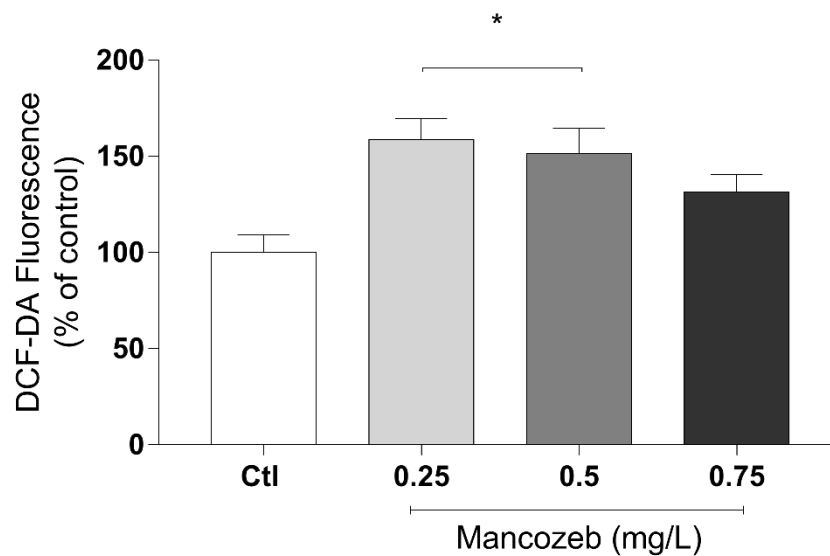
**Figure 5.** Effect of MZ exposure on motor parameter, angle of rotation in zebrafish larvae exposed to agrochemical MZ in static solution at different concentrations and exposure times.

At the end of the day of exposure, larvae exposed to MZ were subjected to the Open Field exploratory behavioral test. The analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by post-test of multiple key comparisons for parametric data and nonparametric data were submitted to Kruskal-Wallis test after Dunn test. Data expressed as mean  $\pm$  SEM (A and C), median  $\pm$  interquartile range (B) and considered statistically reduced when \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

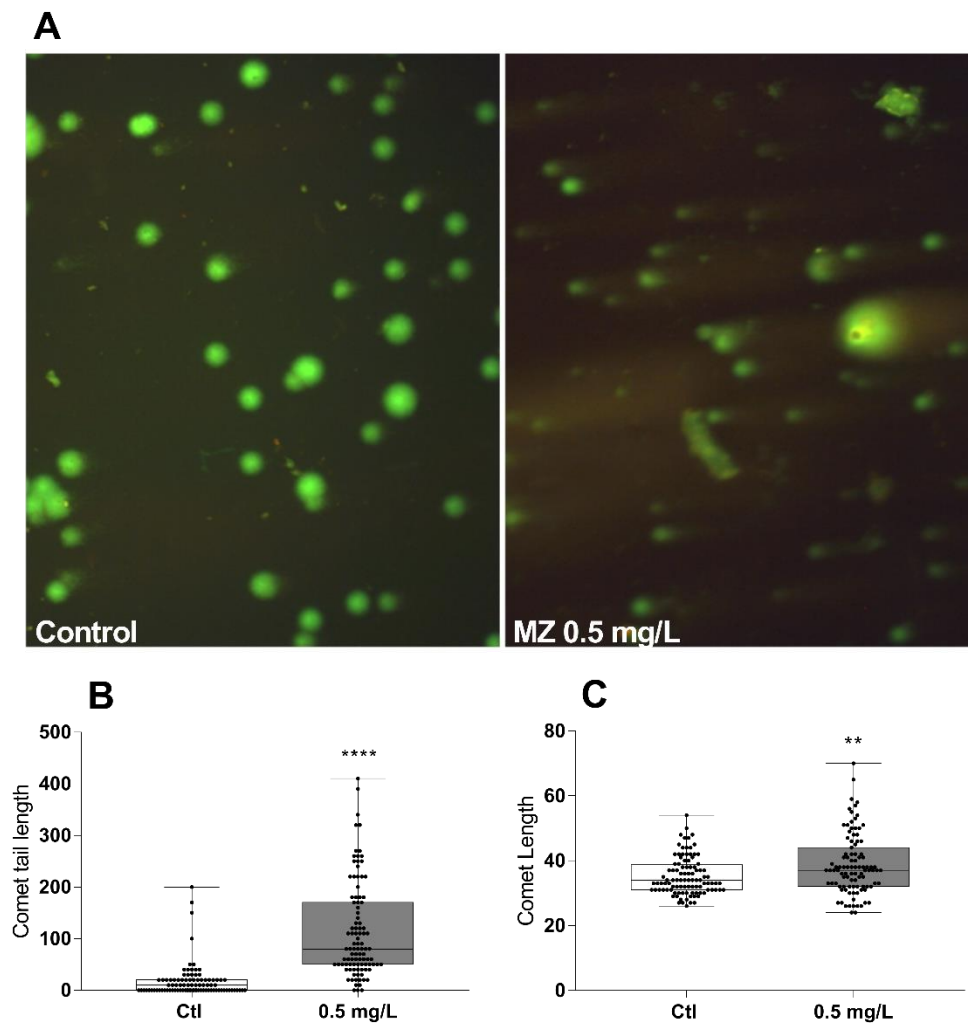


**Figure 6.** Effect of MZ exposure on the non-motor parameter in zebrafish larvae exposed to

the MZ agrochemical in the static solution at different concentrations and exposure times. At the end of the day of exposure, larvae exposed to MZ were subjected to the Open Field exploratory behavioral test. The analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by post-test of multiple key comparisons for parametric data and nonparametric data were submitted to Kruskal-Wallis test after Dunn test. Data expressed as mean  $\pm$  interquartile range and considered statistically determined when \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

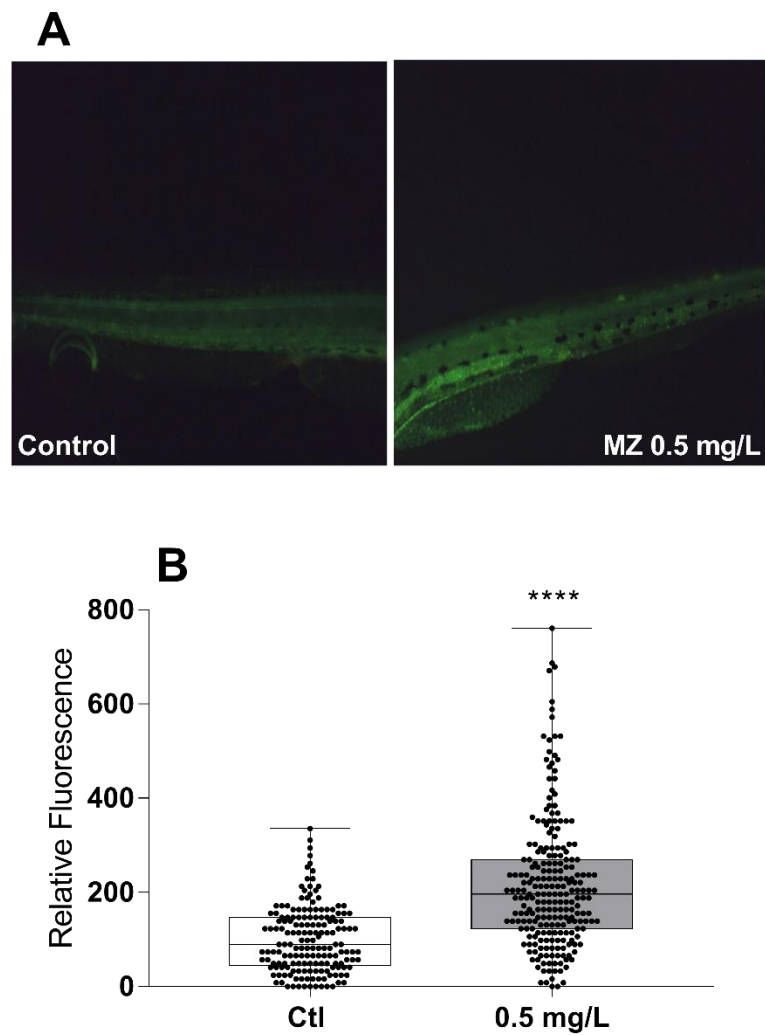


**Figure 7.** Effect of MZ exposure in zebrafish larvae over a period of 6-7dpf on steady state redox. At the end of the exposure period, the larvae were homogenized following standard protocol redox stable state were analyzed. The analysis was performed by the One-Way Analysis of Variance (ANOVA) test followed by Tukey post hoc multiple comparisons. Data were expressed as percentage of control  $\pm$  SEM and considered statistically significant when \*  $p < 0.05$ .

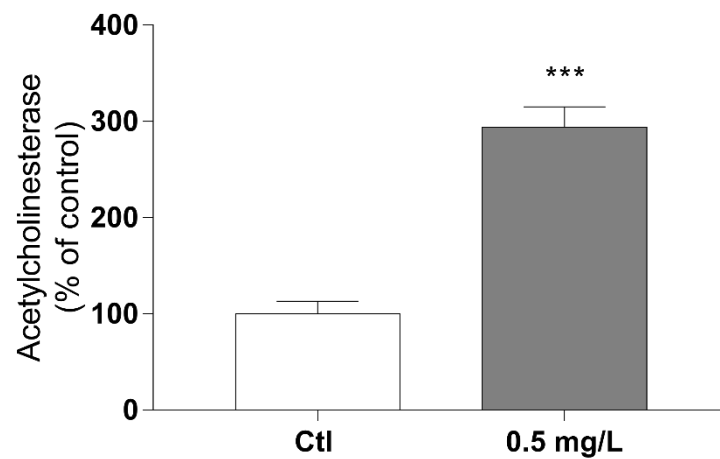


**Figure 8.** Determination of genotoxicity in zebrafish larvae upon exposure to the MZ agrochemical. Representative images of single cell gel electrophoresis, comet assay (A) of 7dpf zebrafish larvae, quantification of comet cause size (B) and total comet length (C). The nonparametric data obtained were submitted to the Mann-Whitney test. Data expressed as median  $\pm$  interquartile range and results considered significant when  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

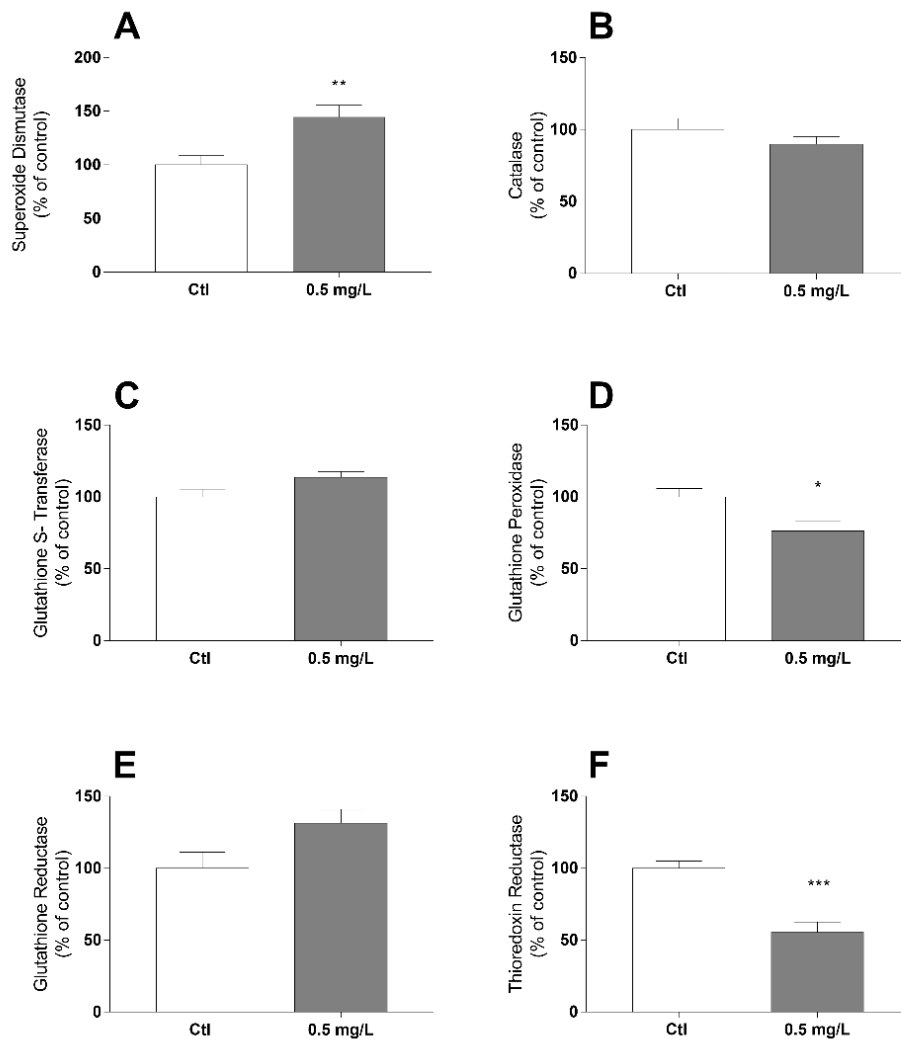




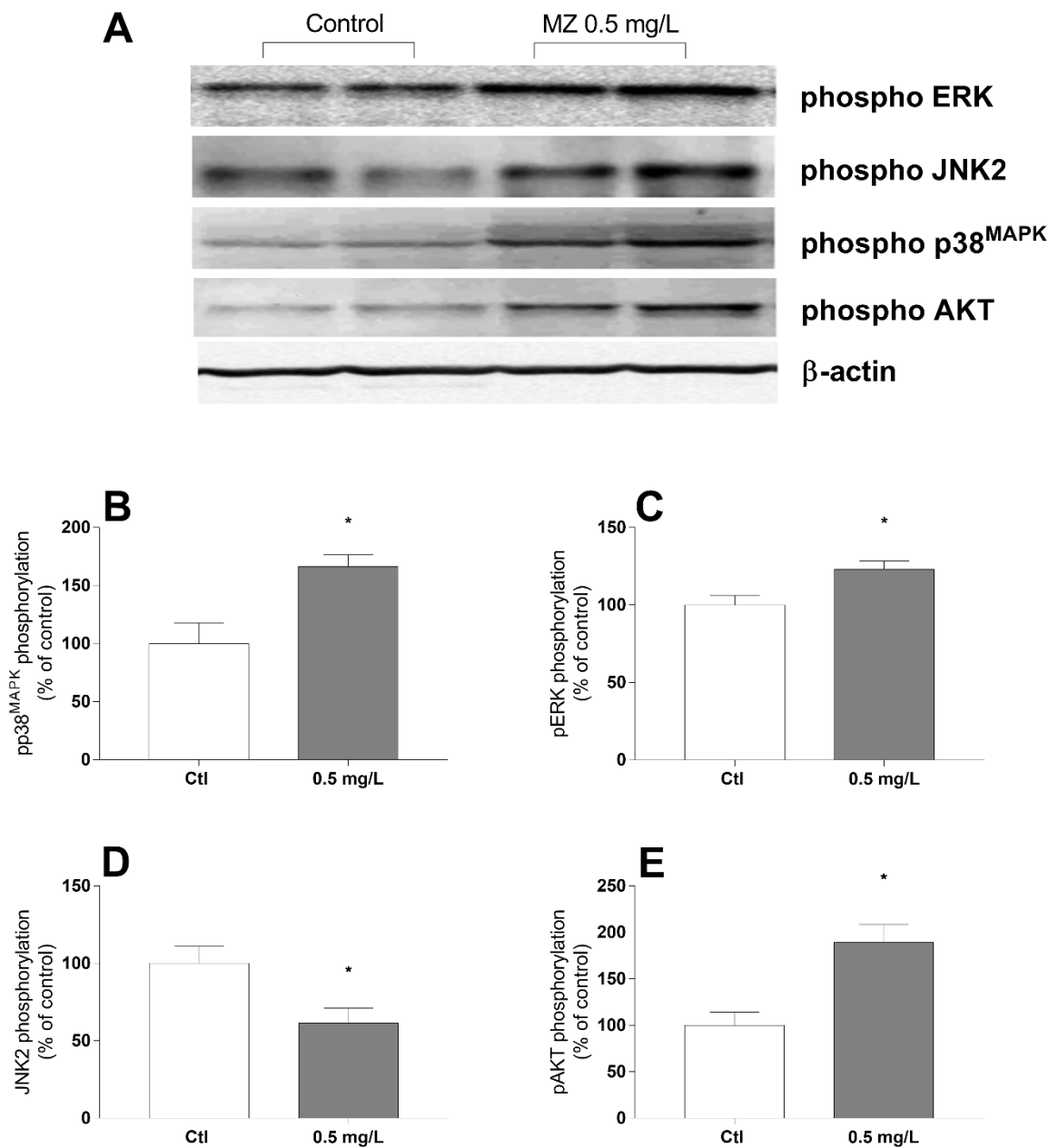
**Figure 9.** Determination of cell death in zebrafish larvae exposed to agrochemical MZ for 24 hours. Apoptotic cells were analyzed in the tail of 7dpf larvae. (A) Representative image of the zebrafish larvae tail. (B) The quantification of acridine orange fluorescence in the tail was performed using ImageJ software. The nonparametric data obtained were submitted to the Mann-Whitney test. Data expressed as median  $\pm$  interquartile range and results considered significant when \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .



**Figure 10.** Determination of acetylcholinesterase enzyme activity in zebrafish larvae exposed to the agrochemical MZ. Zebrafish larvae with 6dpf were treated with MZ at a concentration of 0.5 mg / L for 24 hours and acetylcholinesterase activity was determined. The result was expressed as mean  $\pm$  SEM and represented by percentage in relation to the control; \*\*\* p <0.0002. Statistical analysis was performed using t test.



**Figure 11.** Determination of enzymatic activity in zebrafish larvae exposed to agrochemical MZ. Zebrafish larvae with 6dpf were treated with MZ at a concentration of 0.5 mg / L for 24 hours and superoxide dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B), glutathione S-transferase (GST) (C), glutathione peroxidase (GPx) (D), glutathione reductase (GR) (E) and thioredoxin reductase (Trx-R) (F) were determined. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM and represented by percentage in relation to control; \*  $p < 0.036$ ; \*\*  $p < 0.001$ . Statistical analysis was performed using t test.



**Figure 12.** Phosphorylation of ERK, JNK, p38 and AKT in response to MZ exposure. (A) Representative image of the phosphorylated form of ERK, JNK, p38, and β-actin content. Quantitative analysis of phosphorylation levels of ERK (B) JNK (C) p38 (D) and AKT adjusted by the β-actin content. Data were expressed as percentage in relation to the control of 4 independent experiments. Statistical analysis was performed using t test; \*  $p < 0.05$ .

## References

- Aebi, H., 1984. Catalase in Vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Altenhofen, S., Wiprich, M.T., Nery, L.R., Leite, C.E., Vianna, M.R.M.R., Bonan, C.D., 2017. Manganese(II) chloride alters behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 182, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.11.013>
- Anichtchik, O., Diekmann, H., Fleming, A., Roach, A., Goldsmith, P., Rubinsztein, D.C., 2008. Loss of PINK1 Function Affects Development and Results in Neurodegeneration in Zebrafish. *J. Neurosci.* 28, 8199–8207. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2343-y>
- Bailey, D.C., Todt, C.E., Orfield, S.E., Denney, R.D., Snapp, I.B., Negga, R., Montgomery, K.M., Bailey, A.C., Pressley, A.S., Traynor, W.L., Fitsanakis, V.A., 2016. Caenorhabditis elegans chronically exposed to a Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate fungicide show mitochondrial Complex I inhibition and increased reactive oxygen species. *Neurotoxicology* 56, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.07.011>
- Balardin, R.S., Madalosso, M.G., Stefanello, M.T., Marques, L.N., Debortoli, M.P., 2017. Mancozebe: Muito Além de um Fungicida.
- Basnet, R.M., Zizioli, D., Taweedet, S., Finazzi, D., Memo, M., 2019. Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. *Biomedicines* 7. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES7010023>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cao, F., Souders, C.L., Li, P., Adamovsky, O., Pang, S., Qiu, L., Martyniuk, C.J., 2019a. Developmental toxicity of the fungicide ziram in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 214, 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.105>
- Cao, F., Souders, C.L., Li, P., Pang, S., Liang, X., Qiu, L., Martyniuk, C.J., 2019b. Developmental neurotoxicity of maneb: Notochord defects, mitochondrial dysfunction and hypoactivity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 170, 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.110>
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113, 484–490. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13062-4)
- Chen, S., Liu, Y., Rong, X., Zhou, J., Lu, L., 2017. Neuroprotective Role of the PI3 Kinase/Akt Signaling Pathway in Zebrafish. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 8, 21. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00021>
- Circu, M.L., Aw, T.Y., 2012. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 1767–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.06.019>

- Colwill, R.M., Creton, R., 2011. Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae. *Rev. Neurosci* 22, 63–73. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.008>
- Costa-Silva, D.G. da, Leandro, L.P., Vieira, P. de B., de Carvalho, N.R., Lopes, A.R., Schimith, L.E., Nunes, M.E.M., de Mello, R.S., Martins, I.K., de Paula, A.A., Cañedo, A.D., Moreira, J.C.F., Posser, T., Franco, J.L., 2018a. N-acetylcysteine inhibits Mancozeb-induced impairments to the normal development of zebrafish embryos. *Neurotoxicol. Teratol.* 68, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.04.003>
- Costa-Silva, D.G. da, Lopes, A.R., Martins, I.K., Leandro, L.P., Nunes, M.E.M., de Carvalho, N.R., Rodrigues, N.R., Macedo, G.E., Saidelles, A.P., Aguiar, C., Doneda, M., Flores, E.M.M., Posser, T., Franco, J.L., 2018b. Mancozeb exposure results in manganese accumulation and Nrf2-related antioxidant responses in the brain of common carp *Cyprinus carpio*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 15529–15540. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1724-9>
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Fitsanakis, V.A., Amarnath, V., Moore, J.T., Montine, K.S., Zhang, J., Montine, T.J., 2002. Catalysis of Catechol Oxidation By Metal-Dithiocarbamate Complexes in Pesticides. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1714–1723.
- Gullino, M.L., Tinivella, F., Garibaldi, A., Kemmitt, G.M., Bacci, L., Sheppard, B., 2010. Mancozeb: Past, Present and Future. *Am. Pathol. Soc.* 94, 1076–1087.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 77, 398–405.
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., Ma, X., 2017. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species, *Cellular Physiology and Biochemistry*. S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000485089>
- Holmgren, A., Björnstedt, M., 1995. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.* 252, 199–208.
- Hotamisligil, G.S., Davis, R.J., 2016. Cell Signaling and Stress Responses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a006072. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006072>
- Iorio, R., Castellucci, A., Rossi, G., Cinque, B., Cifone, M.G., Macchiarelli, G., Cecconi, S., 2015. Mancozeb affects mitochondrial activity, redox status and ATP production in mouse granulosa cells. *Toxicol. Vitr.* 30, 438–445. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.09.018>
- Kasprowska-Liśkiewicz, D., 2017. The cell on the edge of life and death: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* 71, 825–841. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.4672>
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of

embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>

- Kosmehl, T., Hallare, A. V., Braunbeck, T., Hollert, H., 2008. DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 650, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.09.009>
- Kostyuk, V.A., Potapovich, A.I., 1989. Superoxide--driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase. *Biochem. Int.* 19, 1117–24.
- Lacher, S.E., Lee, J.S., Wang, X., Campbell, M.R., Bell, D.A., Slattery, M., 2015. Beyond antioxidant genes in the ancient Nrf2 regulatory network. *Free Radic. Biol. Med.* 88, 452–465. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.044>
- Lee, K., Seo, I., Choi, M.H., Jeong, D., 2018. Roles of mitogen-activated protein kinases in osteoclast biology. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms19103004>
- Manning, B.D., Toker, A., 2017. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169, 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
- Marques, L.N., 2017. MANCOZEBE ASSOCIADO AO PATOSSISTEMA *Phakopsora pachyrhizi* × *Glycine max*: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DAS PLANTAS. Universidade Federal de Santa Maria.
- Martins, I.K., de Carvalho, N.R., Macedo, G.E., Rodrigues, N.R., Ziech, C.C., Vinadé, L., Filho, V.M.B., Menezes, I.A., Franco, J., Posser, T., 2018. *Anacardium microcarpum* promotes neuroprotection dependently of AKT and ERK phosphorylation but does not prevent mitochondrial damage by 6-OHDA. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2131895>
- Melo, K.M., Oliveira, R., Grisolia, C.K., Domingues, I., Pieczarka, J.C., de Souza Filho, J., Nagamachi, C.Y., 2015. Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 13926–38. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4596-2>
- Paganotto Leandro, L., Siqueira de Mello, R., Costa- Silva, D.G. da, Medina Nunes, M.E., Rubin Lopes, A., Kemmerich Martins, I., Posser, T., Franco, J.L., 2021. Behavioral changes occur earlier than redox alterations in developing zebrafish exposed to Mancozeb. *Environ. Pollut.* 268. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115783>
- Pavlovic, V., Cekic, S., Ciric, M., Krtinic, D., Jovanovic, J., 2016. Curcumin attenuates Mancozeb-induced toxicity in rat thymocytes through mitochondrial survival pathway. *Food Chem. Toxicol.* 88, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.029>
- Perez-Rodriguez, V., Souders, C.L., Tischuk, C., Martyniuk, C.J., 2019. Tebuconazole reduces basal oxidative respiration and promotes anxiolytic responses and hypoactivity in early-staged zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 217, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.11.017>

- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Saraiva, M.A., da Rosa Ávila, E., da Silva, G.F., Macedo, G.E., Rodrigues, N.R., de Brum Vieira, P., Nascimento, M.S., Picoloto, R.S., Martins, I.K., de Carvalho, N.R., Franco, J.L., Posser, T., 2018. Exposure of *Drosophila melanogaster* to Mancozeb Induces Oxidative Damage and Modulates Nrf2 and HSP70/83. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/5456928>
- Schnörr, S.J., Steenbergen, P.J., Richardson, M.K., Champagne, D.L., 2012. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. *Behav. Brain Res.* 228, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.016>
- Su, L.J., Zhang, J.H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., Peng, Z.Y., 2019. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>
- Thapa, S., Lv, M., Xu, H., 2017. Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides. *Mini-Reviews Med. Chem.* 17. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170120153930>
- Tilton, F., La Du, J.K., Vue, M., Alzarban, N., Tanguay, R.L., 2006. Dithiocarbamates have a common toxic effect on zebrafish body axis formation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.04.014>
- TILTON, F., LADU, J., TANGUAY, R., 2008. Sulfhydryl systems are a critical factor in the zebrafish developmental toxicity of the dithiocarbamate sodium metam (NaM). *Aquat. Toxicol.* 90, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.08.008>
- Todt, C.E., Bailey, D.C., Pressley, A.S., Orfield, S.E., Denney, R.D., Snapp, I.B., Negga, R., Bailey, A.C., Montgomery, K.M., Traynor, W.L., Fitsanakis, V.A., 2016. Acute exposure to a Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate fungicide leads to mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species production in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology* 57, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.09.011>
- Trang, A., Khandhar, P.B., 2019. Physiology, Acetylcholinesterase, StatPearls. US EPA, O., n.d. 2005 National Air Toxics Assessment.
- Velki, M., Di Paolo, C., Nelles, J., Seiler, T.B., Hollert, H., 2017. Diuron and diazinon alter the behavior of zebrafish embryos and larvae in the absence of acute toxicity. *Chemosphere* 180, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.017>
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77, 325–33.
- Westerfield, M., 2000. *The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*.
- Yinghua, J.U., Taojun, X.U., Zhang, H., Aiming, Y.U., 2014. FOXO1-dependent DNA damage repair is regulated by JNK in lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* 44, 1284–1292. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2269>



Zeke, A., Misheva, M., Reményi, A., Bogoyevitch, M.A., 2016. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 793–835.

## 5. DISCUSSÃO

Os agroquímicos utilizados com a finalidade de aumentar a produtividade de determinados cultivares, controlam pestes que acometem plantações, evitando grandes perdas econômicas. Seu uso excessivo, indiscriminado e a decomposição destes compostos em produtos tóxicos têm graves consequências para o meio ambiente e aos organismos não alvo (Tilton et al., 2008). Muitos estudos têm demonstrado os efeitos tóxicos de uma série de agroquímicos em organismos não-alvo devido ao fato destes organismos estarem sujeitos constantemente à exposição a estes poluentes (Costa-Silva et al., 2018a).

Nesta situação, o agroquímico MZ levanta questões a respeito de seus efeitos danosos aos organismos, como os aquáticos por ser um composto instável em água e decomposto rapidamente através da interação com fatores ambientais (Balardin et al., 2017). Parte dos efeitos toxicológicos do MZ são atribuídos à presença dos metais manganês e zinco em sua formulação, podendo levar ao acúmulo destes metais em tecidos como o cérebro (Costa-Silva et al., 2018b). Além disso, a toxicidade do MZ também pode ser conferida, em parte ao, seu principal produto de degradação, a etileno tiouréia (ETU), cuja genotoxicidade foi reportada em modelos como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila*, rats, lymphoma cells (Dearfield, 1994). A exposição a MZ ainda vem sendo ligada a alterações locomotoras nos indivíduos expostos ao agroquímico (Costa-Silva et al., 2018a). Embora muitos estudos relatem os efeitos do MZ em diferentes organismos, pesquisas envolvendo biomarcadores de estresse oxidativo em larvas de peixes-zebra são escassos na literatura até o momento.

A fim de investigar mecanismos de toxicidade, o peixe-zebra emergiu como um poderoso modelo para estudos toxicológicos capazes de acelerar a avaliação de compostos nocivos à saúde humana e perigosos para o meio ambiente (d'Amora and Giordani, 2018). Com este intuito, investigamos o efeito exercido pelo MZ nas larvas de peixe-zebra e, observamos alterações no padrão comportamental e em biomarcadores de estresse oxidativo, além de desencadear morte celular apoptótica, danificar o material genético e modular diversas vias de sinalizando, destacando o potencial efeito tóxico deste agroquímico em organismos aquáticos.

A exposição ao agroquímico MZ não afetou a mortalidade das larvas de peixe-zebra em nenhuma das concentrações testadas durante os três tempos de exposição. Sendo consideradas concentrações subletais, nosso resultado corrobora os achados de Tilton et al. (2006).

O comportamento exploratório em larvas de peixe-zebra se aperfeiçoa rapidamente no decorrer do seu desenvolvimento. Um ovo fertilizado se desenvolve em larva com olhos, coração batendo e movimentos da cauda após 24 h (Kimmel et al., 1995). Entre o 4-5 dpf, as larvas de peixe-zebra demonstram uma diversidade de comportamentos, como caça, evitação, escototaxia e tigmotaxia (Colwill and Creton, 2011; Schnörr et al., 2012), além de ter um papel importante na alimentação e no comportamento social. Assim, muitos testes comportamentais podem ser realizados no peixe-zebra na fase larval logo na primeira semana após a fertilização (Colwill and Creton, 2011). Neste estudo, nós demonstramos que as larvas de peixe-zebra expostas ao MZ, apresentaram redução da capacidade exploratória. A exposição às concentrações de 0,5 mg/L e 0,75 mg/L mostraram alterações em praticamente todos os parâmetros analisados nos três diferentes tempos de exposição. A redução da distância percorrida, ângulo de giro absoluto, aumento do tempo imóvel e preferência pela região periférica do aparato, indicam que o animal exposto ao fungicida MZ tem seus movimentos prejudicados. Estudos têm demonstrado que outros agroquímicos também são capazes de causar mudanças no perfil comportamental da larva do peixe-zebra (Melo et al., 2015; Perez-Rodriguez et al., 2019; Velki et al., 2017). Esta diminuição no comportamento exploratório mostra que a larva do peixe-zebra exposta ao MZ pode se colocar em situações de risco uma vez na natureza, como maior probabilidade de predação.

Tendo em vista as alterações comportamentais nas larvas de peixe-zebra expostas ao MZ, propomos que estas podem estar relacionadas ao estresse oxidativo ocasionando morte celular, desencadeado pelo fungicida, como já relatado em outros trabalhos no grupo de pesquisa (Costa-Silva et al., 2018b, 2018a; Saraiva et al., 2018). Ao realizar o ensaio de estado estável redox, o qual mensura a formação de espécies reativas de oxigênio, observamos um aumento na produção nas concentrações de 0,25 mg/L e 0,5 mg/L. Sabe-se que uma exposição a altos níveis de manganês está envolvida no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Tuschl et al., 2013) pelo fato do metal manganês causar severos danos mitocondriais (Liu et al., 2019) e inibição de enzimas antioxidantes (Pfalzer and Bowman, 2018).

A análise da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi realizada com a finalidade de verificar se o MZ interferiria no comportamento da larva do peixe-zebra através do sistema colinérgico, uma vez que a acetilcolina está relacionada ao movimento. Nossos resultados demonstraram um aumento na atividade da AChE em larvas de peixe-zebra expostas ao fungicida MZ. Sabe-se que o sistema colinérgico desempenha um papel fundamental em várias funções vitais, sendo a acetilcolina o principal neurotransmissor desse sistema (Thapa et

al., 2017). Responsável pela regulação da transmissão e dos níveis de acetilcolina disponível na fenda sináptica, a enzima AChE degrada o neurotransmissor em colina e acetato, além de estar envolvida em muitas funções neurais como o controle do sono, comportamentais, aprendizagem, memória e na modulação glutamatérgica e dopaminérgica (Trang and Khandhar, 2019). Estudos demonstram que a AChE é modulada pela exposição ao metal manganês, aumentando ou diminuindo sua atividade, causando assim um desequilíbrio nos sistemas dopaminérgicos e colinérgicos (Babadi et al., 2014; Santos et al., 2012). O aumento observado em sua atividade pode estar relacionado ao metal presente na formulação do agroquímico, este capaz de comprometer a homeostase de cálcio intracelular (Ijomone et al., 2019). Sabendo que o influxo de cálcio é capaz de aumentar a liberação de ACh na fenda sináptica e na junção neuromuscular, conseqüentemente, a atividade da AChE é aumentada, tendo como resultado uma disfunção colinérgica devido à queda nos níveis do neurotransmissor na fenda sináptica, comprometendo o movimento exploratório das larvas após a exposição ao MZ.

Considerando que em nosso estudo a exposição ao MZ aumentou a geração de espécies reativas a oxigênio, também foram analisadas a atividade de alguns antioxidantes enzimáticos e como a catalase, superóxido dismutase, glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, glutathione reductase e tioredoxina reductase (Trx-R), uma vez que estas impedem danos oxidativos a biomoléculas (Pisoschi and Pop, 2015). É conhecido que as enzimas CAT e SOD são consideradas a primeira linha de defesa celular contra efeitos causados pelas espécies reativas de oxigênio (He et al., 2017a), sendo que a SOD atua na dismutação do radical superóxido, gerando peróxido de hidrogênio e a catalase, por sua vez, catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (Lei et al., 2015). O aumento na atividade da SOD, pode estar relacionado ao radical superóxido gerados pela exposição ao MZ. A enzima GPx é responsável pela detoxificação de peróxidos orgânicos e inorgânicos e sua atividade é dependente da glutathione. A enzima GR não atua diretamente na remoção de espécies reativas, mas é responsável pela regeneração de GSH em sua forma reduzida na presença de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) (Ma et al., 2018). Neste estudo, a atividade da GR permaneceu inalterada entre os grupos. A GSH é o agente biológico antioxidante mais abundante e serve de substrato para a GPx. Por outro lado, a enzima Trx-R também é capaz de detoxificar peróxidos, entretanto, ela possui seu próprio mecanismo, este não dependente de GSH (Lu and Holmgren, 2014; Ma et al., 2018). A inibição da atividade das enzimas GPx e Trx-R, como observado em nosso estudo, mostra que estas podem não estar sendo requeridas pela célula, devido a outros mecanismos de detoxificação, como as enzimas CAT e GST. Estas,

podem estar atuando no produto da dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, como visto no estudo de Costa-Silva et al. (2018b).

Neste estudo, demonstramos que o tratamento com o agroquímico MZ induziu apoptose e genotoxicidade, que foram determinados através de biomarcadores de morte celular e dano ao DNA. O mesmo efeito foi observado em larvas de peixe-zebra expostas durante o período embrionário (Costa-Silva et al., 2018a) a compostos ditiocarbamatos como o MZ. Estes, possuem um amplo modo de ação e uma das ações exercidas é a depleção da glutatona, podendo estar relacionada a ativação de vias apoptóticas (Circu and Aw, 2012), além de estar associada ao metal manganês presente em sua na composição, também ativando proteínas envolvidas na morte celular (Altenhofen et al., 2017).

Proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), são responsáveis pela transdução de sinal celular em resposta a diversos estímulos incluindo o estresse oxidativo. A família MAPK compreende três quinases: ERK1/2, JNK1/2 e p38<sup>MAPK</sup>. A ativação dessas proteínas tem como consequência a fosforilação de resíduos de serina e treonina para regular diferentes processos como adesão, divisão, migração e proliferação celular (Lee et al., 2018), além de sua ativação contribuir em processos inflamatórios e apoptose (Hotamisligil and Davis, 2016; Yue and López, 2020). Neste estudo, a exposição ao MZ aumentou a fosforilação das proteínas ERK1/2 e p38<sup>MAPK</sup>, o que pode estar relacionado ao estresse oxidativo, culminando na morte celular, uma vez que estas vias de sinalização estimulam a apoptose via indução de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (Kasprowska-Liśkiewicz, 2017; Su et al., 2019). Sabe-se que a proteína JNK1/2 também regula importantes processos fisiológicos de diferenciação e proliferação celular, função neuronal, desenvolvimento embrionário, além de processos de morte e sobrevivência celular (Zeke et al., 2016). Neste trabalho foi possível observar a inibição da fosforilação da proteína JNK1/2 e, o estudo de Yinghua e colaboradores (2014) mostrou que a proteína quinase JNK interage diretamente com o fator de transcrição FoxO1, este envolvido na modulação de genes relacionados a apoptose e reparo ao DNA (Brown and Webb, 2018). A inibição de JNK1/2 observada neste estudo, pode estar relacionada com a baixa expressão de FoxO1, uma vez que os achados deste estudo mostraram aumento de morte celular via apoptose e severo dano ao DNA. Além da modulação de FoxO1 pela proteína quinase JNK1/2, é descrito na literatura o envolvimento da proteína quinase AKT na modulação deste fator de transcrição (Klotz et al., 2015). Após a ativação da via de sinalização PI3K/AKT, o fator de transcrição FoxO1 é translocado do núcleo para o citoplasma da célula, fosforilado em seus três resíduos conservados e, posteriormente motivos de reconhecimento serão gerados para o sequestro de

FoxO1 do citoplasma pelas proteínas 14-3-3, suprimindo a expressão dos genes alvos do fator de transcrição (Manning and Toker, 2017), como por exemplo, os envolvidos no reparo do DNA. Por outro lado, o aumento da fosforilação da proteína quinase AKT pode ter desencadeado uma resposta adaptativa ao dano oxidativo gerado pelo fungicida MZ, através da translocação do fator de transcrição Nrf2 para o núcleo, iniciando a transcrição de genes envolvidos na resposta antioxidante, como as enzimas de detoxificação de fase II (He et al., 2020), permitindo a sobrevivência das larvas de peixe-zebra até que suas funções sejam restauradas, uma vez que esta está relacionada a sobrevivência, proliferação, crescimento celular, dentre outros processos biológicos como mostrado no estudo de Iorio et al., (2015).

## 6. CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo demonstrou pela primeira vez o efeito exercido pelo fungicida MZ sobre as vias de sinalização celular nas larvas de peixe-zebra. Nosso estudo apontou severos danos locomotores após a exposição ao MZ em doses ambientalmente relevantes, causando alterações na homeostase redox da célula, tendo como consequência dano a biomoléculas como o DNA ocasionando morte celular por apoptose. A geração de espécies reativas de oxigênio culminou na ativação de proteínas quinases em resposta a esse desequilíbrio homeostático. Este desbalanço, resultou em mecanismos de defesa, como resposta adaptativa envolvendo enzimas antioxidantes a fim de minimizar os danos causados pelo MZ. Nossos achados podem ajudar a melhor compreender os mecanismos envolvidos na toxicidade deste composto ditiocarbamato em organismos aquáticos.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Ablain, J., Zon, L.I., 2013. Of fish and men: using zebrafish to fight human diseases. *Trends Cell Biol.* 23, 584–586. <https://doi.org/10.1186/s40945-017-0033-9>. Using
- Ahmad, F., Noldus, L.P.J.J., Tegelenbosch, R.A.J., Richardson, M.K., 2012. Zebrafish embryos and larvae in behavioural assays. *Behaviour* 149, 1241–1281. <https://doi.org/10.1163/1568539X-00003020>
- Altenhofen, S., Wiprich, M.T., Nery, L.R., Leite, C.E., Vianna, M.R.M.R., Bonan, C.D., 2017. Manganese(II) chloride alters behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 182, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.11.013>
- Alves, V.M., 2016. FUNGICIDAS PROTETORES NO MANEJO DA FERRUGEM DA SOJA, PROCESSOS FISIOLÓGICOS E PRODUTIVIDADE DA CULTURA. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- ANVISA, 2017. GERÊNCIA GERAL DE TOXICOLOGIA.
- Axelstad, M., Boberg, J., Nellemann, C., Kiersgaard, M., Jacobsen, P.R., Christiansen, S., Hougaard, K.S., Hass, U., 2011. Exposure to the Widely Used Fungicide Mancozeb Causes Thyroid Hormone Disruption in Rat Dams but No Behavioral Effects in the Offspring. *Toxicol. Sci.* 120, 439–446. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr006>
- Babadi, V.Y., Sadeghi, L., Shirani, K., Malekirad, A.A., Rezaei, M., 2014. The Toxic Effect of Manganese on the Acetylcholinesterase Activity in Rat Brains. *J. Toxicol.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/946372>
- Bala, V., Gupta, G., Sharma, V., 2014. Chemical and Medicinal Versatility of Dithiocarbamates: An Overview. *Mini-Reviews Med. Chem.* 14, 1021–1032. <https://doi.org/10.2174/1389557514666141106130146>
- Balardin, R.S., Madalosso, M.G., Stefanello, M.T., Marques, L.N., Debortoli, M.P., 2017. Mancozebe: Muito Além de um Fungicida.
- Bertrand, D., Wallace, T.L., 2020. A Review of the Cholinergic System and Therapeutic Approaches to Treat Brain Disorders, in: *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 1–28. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2020\\_141](https://doi.org/10.1007/7854_2020_141)
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ. J.* 5, 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>



- Bissinger, R., Bhuyan, A.A.M., Qadri, S.M., Lang, F., 2018. Oxidative stress, eryptosis and anemia: a pivotal mechanistic nexus in systemic diseases. *FEBS J.* 1–29.  
<https://doi.org/10.1111/febs.14606>
- Brasil, 1989. LEI Nº 7.802, DE 11 DE JULHO DE 1989 [WWW Document]. URL  
<https://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1989/lei-7802-11-julho-1989-356807-norma-pl.html> (accessed 3.11.21).
- Brown, A.K., Webb, A.E., 2018. Regulation of FOXO Factors in Mammalian Cells. *Curr Top Dev Biol* 127, 165–192. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Calviello, G., Piccioni, E., Boninsegna, A., Tedesco, B., Maggiano, N., Serini, S., Wolf, F.I., Palozza, P., 2006. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.06.001>
- Carneiro, F.F., Augusto, L.G. da S., Rigotto, R.M., Friedrich, K., Búrigo, A.C., 2015. Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.
- Cassal, V.B., Azevedo, L.F. de, Ferreira, R.P., Silva, D.G. da, Simão, R.S., 2014. Agrotóxicos: Uma Revisão De Suas Consequências Para a Saúde Pública. *Rev. Eletrônica em Gestão, Educ. e Tecnol. Ambient.* 18, 437–445.  
<https://doi.org/10.5902/2236117012498>
- CASTILLO, J. DEL, DE MELLO, W.C., MORALES, T., 1967. The Initiation of Action Potentials in the Somatic Musculature of *Ascaris Lumbricoides*. *J. Exp. Biol.* 46.
- CASTILLO, J. DEL, DE MELLO, W.C., MORALES, T., 1963. THE PHYSIOLOGICAL ROLE OF ACETYLCHOLINE IN THE NEUROMUSCULAR SYSTEM OF *ASCARIS LUMBRICOIDES*. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 71, 741–757.
- Chen, P., Bornhorst, J., Aschner, M., 2018. Manganese metabolism in humans. *Front. Biosci. - Landmark* 23, 1655–1679. <https://doi.org/10.2741/4665>
- Circu, M.L., Aw, T.Y., 2012. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 1767–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.06.019>
- Circu, M.L., Aw, T.Y., 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 749–762.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>
- Colwill, R.M., Creton, R., 2011. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Behav. Processes* 86, 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2010.12.003>
- Costa-Silva, D.G. da, Leandro, L.P., Vieira, P. de B., de Carvalho, N.R., Lopes, A.R., Schimith, L.E., Nunes, M.E.M., de Mello, R.S., Martins, I.K., de Paula, A.A., Cañedo,

- A.D., Moreira, J.C.F., Posser, T., Franco, J.L., 2018a. N-acetylcysteine inhibits Mancozeb-induced impairments to the normal development of zebrafish embryos. *Neurotoxicol. Teratol.* 68, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.04.003>
- Costa-Silva, D.G. da, Lopes, A.R., Martins, I.K., Leandro, L.P., Nunes, M.E.M., de Carvalho, N.R., Rodrigues, N.R., Macedo, G.E., Saidelles, A.P., Aguiar, C., Doneda, M., Flores, E.M.M., Posser, T., Franco, J.L., 2018b. Mancozeb exposure results in manganese accumulation and Nrf2-related antioxidant responses in the brain of common carp *Cyprinus carpio*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 15529–15540. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1724-9>
- Cuadrado, A., Nebreda, A.R., 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* 429, 403–417. <https://doi.org/10.1042/BJ20100323>
- Cuenda, A., Rousseau, S., 2007. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1358–1375. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.03.010>
- d'Amora, M., Giordani, S., 2018. The Utility of Zebrafish as a Model for Screening Developmental Neurotoxicity. *Front. Neurosci.* 12, 976. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00976>
- Daenen, K., Andries, A., Mekahli, D., Schepdael, A. Van, Jouret, F., Bammens, B., 2016. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8375186>
- Dani, J.A., Bertrand, D., 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105214>
- Dearfield, K.L., 1994. Ethylene thiourea (ETU). A review of the genetic toxicity studies. *Mutat. Res.* 317, 111–32.
- Domico, L.M., Zeevalk, G.D., Bernard, L.P., Cooper, K.R., 2006. Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. *Neurotoxicology* 27, 816–825. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2006.07.009>
- Easton, A., Guven, K., de Pomerai, D.I., 2001. Toxicity of the dithiocarbamate fungicide mancozeb to the nontarget soil nematode, *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 15–25.
- Ersahin, T., Tuncbag, N., Cetin-Atalay, R., 2015. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol. Biosyst.* 11, 1946–1954. <https://doi.org/10.1039/c5mb00101c>

- Friedrich, R.W., Jacobson, G.A., Zhu, P., 2010. Circuit Neuroscience in Zebrafish. *Curr. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.039>
- Fu, D.J., Zhang, L., Song, J., Mao, R.W., Zhao, R.H., Liu, Y.C., Hou, Y.H., Li, J.H., Yang, J.J., Jin, C.Y., Li, P., Zi, X.L., Liu, H.M., Zhang, S.Y., Zhang, Y.B., 2017. Design and synthesis of formononetin-dithiocarbamate hybrids that inhibit growth and migration of PC-3 cells via MAPK/Wnt signaling pathways. *Eur. J. Med. Chem.* 127, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.12.027>
- García-Camero, J.P., Beltrán, F.J., Encinas, A., Rivas, F.J., Oropesa, A.L., 2019. The added value of a zebrafish embryo-larval model in the assessment of wastewater tertiary treatments. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 5, 2269–2279. <https://doi.org/10.1039/c9ew00411d>
- Gerber, P.A., Rutter, G.A., 2017. The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxid. Redox Signal.* 26, 501–518. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6755>
- Gerlai, R., 2016. Learning and memory in zebrafish (*Danio rerio*). *Methods Cell Biol.* 134, 551–586. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2016.02.005>
- Gill, J.G., Piskounova, E., Morrison, S.J., 2016. *Cancer, Oxidative Stress and Metastasis*. Cold Spring Harb. Lab. Press LXXXI.
- Goldoni, A., Klauck, C.R., Da Silva, S.T., Da Silva, M.D., Ardenghi, P.G., Da Silva, L.B., 2014. DNA damage in Wistar rats exposed to dithiocarbamate pesticide mancozeb. *Folia Biol. (Praha)*. 60, 202.
- Gullino, M.L., Tinivella, F., Garibaldi, A., Kemmitt, G.M., Bacci, L., Sheppard, B., 2010. Mancozeb: Past, Present and Future. *Am. Pathol. Soc.* 94, 1076–1087.
- Hammouda, M., Ford, A., Liu, Y., Zhang, J., 2020. The JNK Signaling Pathway in Inflammatory Skin Disorders and Cancer. *Cells* 9, 857. <https://doi.org/10.3390/cells9040857>
- Hanada, M., Feng, J., Hemmings, B.A., 2004. Structure, regulation and function of PKB/AKT - A major therapeutic target. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1697, 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.11.009>
- He, F., Ru, X., Wen, T., 2020. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 4777. <https://doi.org/10.3390/ijms21134777>
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., Ma, X., 2017a. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species, *Cellular Physiology and Biochemistry*. S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000485089>

- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., Ma, X., 2017b. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell. Physiol. Biochem.* <https://doi.org/10.1159/000485089>
- Hemmings, B.A., Restuccia, D.F., 2012. PI3K-PKB / Akt Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, 1–4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011189>
- Higley, M.J., Picciotto, M.R., 2014. Neuromodulation by acetylcholine: Examples from schizophrenia and depression. *Curr. Opin. Neurobiol.* <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.06.004>
- Hotamisligil, G.S., Davis, R.J., 2016. Cell Signaling and Stress Responses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a006072. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006072>
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.-H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliott, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Mortimer, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthavadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M.J., Enright, A., Geisler, R., Plasterk,

- R.H.A., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J.P., Crollius, H.R., Rogers, J., Stemple, D.L., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J.P., Roest Crollius, H., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503.  
<https://doi.org/10.1038/nature12111>
- IBAMA, 2019. Boletim 2019 [WWW Document]. URL  
[https://www.ibama.gov.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=594&Itemid=54](https://www.ibama.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=594&Itemid=54) (accessed 3.11.21).
- Ijomone, O.M., Aluko, O.M., Okoh, C.O.A., Martins, A.C., Aschner, M., 2019. Role for calcium signaling in manganese neurotoxicity. *J. Trace Elem. Med. Biol.*  
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.08.006>
- Iorio, R., Castellucci, A., Rossi, G., Cinque, B., Cifone, M.G., Macchiarelli, G., Cecconi, S., 2015. Mancozeb affects mitochondrial activity, redox status and ATP production in mouse granulosa cells. *Toxicol. Vitro.* 30, 438–445.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.09.018>
- IPEA, 2016. EXPANSÃO DA FRONTEIRA AGRÍCOLA NO BRASIL: DESAFIOS E PERSPECTIVAS.
- Janz, D.M., 2014. Dithiocarbamates. *Encycl. Toxicol.* Third Ed. 2, 212–214.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00139-1>
- Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A.M., Cachat, J.M., Brimmer, M., Chawla, J.S., Craddock, C., Kyzar, E.J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., Gilman, C.P., Pittman, J., Rosemberg, D.B., Gerlai, R., Echevarria, D., Lamb, E., Neuhaus, S.C.F., Weng, W., Bally-Cuif, L., Schneider, H., 2013. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish* 10, 70–86.  
<https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0861>
- Kasprowska-Liškiewicz, D., 2017. The cell on the edge of life and death: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* 71, 825–841.  
<https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.4672>
- Kim, E.K., Choi, E.-J., 2015. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch. Toxicol.* 89, 867–882. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1472-2>
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310.

- <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Klotz, L.-O., Sánchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., Urbánek, P., Steinbrenner, H., Monsalve, M., 2015. Redox regulation of FoxO transcription factors. *Redox*.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.019>
- Kokel, D., Bryan, J., Laggner, C., White, R., Cheung, C.Y.J., Mateus, R., Healey, D., Kim, S., Werdich, A.A., Haggarty, S.J., MacRae, C.A., Shoichet, B., Peterson, R.T., 2010. Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. *Nat. Chem. Biol.* 6, 231–237. <https://doi.org/10.1038/nchembio.307>
- Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 333–343.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004>
- Kumar, A., Dhull, D.K., Gupta, V., Channana, P., Singh, A., Bhardwaj, M., Ruhel, P., Mittal, R., 2017. Role of Glutathione-S-transferases in neurological problems. *Expert Opin. Ther. Pat.* 27, 299–309. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1254192>
- Kwakye, G.F., McMinimy, R.A., Aschner, M., 2017. Disease-toxicant interactions in Parkinson's disease neuropathology. *Neurochem. Res.* 42, 1772–1786.  
<https://doi.org/10.1186/s40945-017-0033-9>. Using
- Lazzari, F.M., Souza, A.S., 2017. REVOLUÇÃO VERDE: IMPACTOS SOBRE OS CONHECIMENTOS TRADICIONAIS GREEN REVOLUTION: IMPACTS ON TRADITIONAL KNOWLEDGE. *Congr. Int. Direito e Contemp.*
- Lee, K., Seo, I., Choi, M.H., Jeong, D., 2018. Roles of mitogen-activated protein kinases in osteoclast biology. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms19103004>
- Legay, C., 2018. Congenital myasthenic syndromes with acetylcholinesterase deficiency, the pathophysiological mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*  
<https://doi.org/10.1111/nyas.13595>
- Lei, X.G., Zhu, J.H., Cheng, W.H., Bao, Y., Ho, Y.S., Reddi, A.R., Holmgren, A., Arnér, E.S.J., 2015. Paradoxical roles of antioxidant enzymes: Basic mechanisms and health implications. *Physiol. Rev.* 96, 307–364. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2014>
- Levin, E.D., Cerutti, D.T., 2009. Behavioral Neuroscience of Zebrafish, in: *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. CRC Press/Taylor & Francis, pp. 293–310.  
<https://doi.org/10.1201/noe1420052343.ch15>
- Li, J., O, W., Li, W., Jiang, Z.-G., Ghanbari, H.A., 2013. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 24438–75.  
<https://doi.org/10.3390/ijms141224438>

- Li, L., Yang, X., 2018. The Essential Element Manganese, Oxidative Stress, and Metabolic Diseases: Links and Interactions. *Oxid. Med. Cell. Longev.*  
<https://doi.org/10.1155/2018/7580707>
- Liu, K., Jing, M.J., Liu, C., Yan, D.Y., Ma, Z., Wang, C., Deng, Y., Liu, W., Xu, B., 2019. Effect of trehalose on manganese-induced mitochondrial dysfunction and neuronal cell damage in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 125, 536–547.  
<https://doi.org/10.1111/bcpt.13316>
- Liu, Y., Wang, Y.L., He, S. wen, Chen, M.H., Zhang, Z., Fu, X.P., Fu, B. Bin, Liao, B.Q., Lin, Y.H., Qi, Z.Q., Wang, H.L., 2017. Protective effects of resveratrol against mancozeb induced apoptosis damage in mouse oocytes. *Oncotarget* 8, 6233–6245.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.14056>
- Loewi, O., 1921. Über humorale übertragbarkeit der Herznervenwirkung - I. Mitteilung. *Pflugers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere* 189, 239–242.  
<https://doi.org/10.1007/BF01738910>
- López-Fernández, O., Yáñez, R., Rial-Otero, R., Simal-Gándara, J., 2016. Kinetic modelling of mancozeb hydrolysis and photolysis to ethylenethiourea and other by-products in water. *Water Res.* 102, 561–571. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.006>
- Lu, J., Holmgren, A., 2014. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med.* 66, 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036>
- Lushchak, V.I., 2014. Free radicals , reactive oxygen species , oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 224, 164–175.
- Ma, H., Wang, M., Gai, Y., Fu, H., Zhang, B., Ruan, R., Chung, K.-R., Li, H., 2018. Thioredoxin and Glutaredoxin Systems Required for Oxidative Stress Resistance, Fungicide Sensitivity, and Virulence of *Alternaria alternata*. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Macedo, G.E., 2017. Ação de *Senecio brasiliensis* (SPRENG) Less sobre a taxa de eclosão e modulação de marcadores de toxicidade em larvas de *Drosophila melanogaster*.
- Maciąg, M., Michalak, A., Skalicka-Woźniak, K., Zykubek, M., Ciszewski, A., Budzyńska, B., 2020. Zebrafish and mouse models for anxiety evaluation – A comparative study with xanthotoxin as a model compound. *Brain Res. Bull.* 165, 139–145.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.09.024>
- Manning, B.D., Toker, A., 2017. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169, 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
- MAPA, 2019. ATO N° 48, DE 19 DE JUNHO DE 2019 - ATO N° 48, DE 19 DE JUNHO DE 2019.

- Maranghi, F., De Angelis, S., Tassinari, R., Chiarotti, F., Lorenzetti, S., Moracci, G., Marcoccia, D., Gilardi, E., Di Virgilio, A., Eusepi, A., Mantovani, A., Olivieri, A., 2013. Reproductive toxicity and thyroid effects in Sprague Dawley rats exposed to low doses of ethylenethiourea. *Food Chem. Toxicol.* 59, 261–271.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.048>
- Marques, L.N., 2017. MANCOZEBE ASSOCIADO AO PATOSSISTEMA *Phakopsora pachyrhizi* × *Glycine max*: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DAS PLANTAS. Universidade Federal de Santa Maria.
- Martínez-Limón, A., Joaquin, M., Caballero, M., Posas, F., de Nadal, E., 2020. The p38 pathway: From biology to cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.*  
<https://doi.org/10.3390/ijms21061913>
- Melo, K.M., Oliveira, R., Grisolia, C.K., Domingues, I., Pieczarka, J.C., de Souza Filho, J., Nagamachi, C.Y., 2015. Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 13926–38. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4596-2>
- Miranda-Contreras, L., Dávila-Ovalles, R., Benítez-Díaz, P., Peña-Contreras, Z., Palacios-Prü, E., 2005. Effects of prenatal paraquat and mancozeb exposure on amino acid synaptic transmission in developing mouse cerebellar cortex. *Dev. Brain Res.* 160, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.08.001>
- Mohammadi-Sardoo, M., Mandegary, A., Nabiuni, M., Nematollahi-Mahani, S.-N., Amirheidari, B., 2018. Mancozeb induces testicular dysfunction through oxidative stress and apoptosis: Protective role of N-acetylcysteine antioxidant. *Toxicol. Ind. Health* 34, 798–811. <https://doi.org/10.1177/0748233718778397>
- Montgomery, K., Corona, C., Frye, R., Barnett, R., Bailey, A., Fitsanakis, V.A., 2018. Transport of a manganese/zinc ethylene-bis-dithiocarbamate fungicide may involve pre-synaptic dopaminergic transporters. *Neurotoxicol. Teratol.* 68, 66–71.  
<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2018.05.004>
- Motarjemi, Y., Lelieveld, H., 2013. Food safety management : a practical guide for the food industry.
- Nandi, A., Yan, L.J., Jana, C.K., Das, N., 2019. Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019.  
<https://doi.org/10.1155/2019/9613090>
- Negga, R., Rudd, D.A., Davis, N.S., Justice, A.N., Hatfield, H.E., Valente, A.L., Fields, A.S., Fitsanakis, V.A., 2011. Exposure to Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate and glyphosate



- pesticides leads to neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology* 32, 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.02.002>
- Nishimura, Y., Murakami, S., Ashikawa, Y., Sasagawa, S., Umemoto, N., Shimada, Y., Tanaka, T., 2015. Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing. *Congenit. Anom. (Kyoto)*. 55, 1–16. <https://doi.org/10.1111/cga.12079>
- Norton, W., 2013. Towards developmental models of psychiatric disorders in zebrafish. *Front. Neural Circuits*. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00079>
- Odularu, A.T., Ajibade, P.A., 2019. Dithiocarbamates: Challenges, control, and approaches to excellent yield, characterization, and their biological applications. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8260496>
- Olson, H., Betton, G., Robinson, D., Thomas, K., Monro, A., Kolaja, G., Lilly, P., Sanders, J., Sipes, G., Bracken, W., Dorato, M., Van Deun, K., Smith, P., Berger, B., Heller, A., 2000. Concordance of the Toxicity of Pharmaceuticals in Humans and in Animals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32, 56–67. <https://doi.org/10.1006/rtph.2000.1399>
- Palmér, T., Ek, F., Enqvist, O., Olsson, R., Åström, K., Petersson, P., 2017. Action sequencing in the spontaneous swimming behavior of zebrafish larvae - Implications for drug development. *Sci. Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03144-7>
- Perez-Rodriguez, V., Souders, C.L., Tischuk, C., Martyniuk, C.J., 2019. Tebuconazole reduces basal oxidative respiration and promotes anxiolytic responses and hypoactivity in early-staged zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 217, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.11.017>
- Pfalzer, A., Bowman, A., 2018. Manganese Toxicity in Neurological Disease. *Curr Env. Heal. Rep* 4, 223–228. <https://doi.org/10.1007/s40572-017-0136-1>. Relationships
- Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Richardson, J.R., Fitsanakis, V., Westerink, R.H.S., Kanthasamy, A.G., 2019. Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathol.* 138, 343–362. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02033-9>
- Robaczewska, J., Kedziora-Kornatowska, K., Kozakiewicz, M., Zary-Sikorska, E., Pawluk, H., Pawluszak, W., Kedziora, J., 2016. Role of glutathione metabolism and glutathione-related antioxidant defense systems in hypertension. *J. Physiol. Pharmacol.* 67, 331–7.
- Runkle, J., Flocks, J., Economos, J., Dunlop, A.L., 2017. A systematic review of Mancozeb as a reproductive and developmental hazard. *Environ. Int.*

- <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.11.006>
- Salim, S., 2016. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 360, 201–205. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.237503>
- Santos, D., Milatovic, D., Andrade, V., Batoreu, M.C., Aschner, M., Marreilha dos Santos, A.P., 2012. The inhibitory effect of manganese on acetylcholinesterase activity enhances oxidative stress and neuroinflammation in the rat brain. *Toxicology* 292, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.11.017>
- Saraiva, M.A., da Rosa Ávila, E., da Silva, G.F., Macedo, G.E., Rodrigues, N.R., de Brum Vieira, P., Nascimento, M.S., Picoloto, R.S., Martins, I.K., de Carvalho, N.R., Franco, J.L., Posser, T., 2018. Exposure of *Drosophila melanogaster* to Mancozeb Induces Oxidative Damage and Modulates Nrf2 and HSP70/83. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/5456928>
- Schnörr, S.J., Steenbergen, P.J., Richardson, M.K., Champagne, D.L., 2012. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. *Behav. Brain Res.* 228, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.12.016>
- Soreq, H., 2001. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 294–302. <https://doi.org/10.1038/35067589>
- Srivastava, A.K., Ali, W., Singh, R., Bhui, K., Tyagi, S., Al-Khedhairy, A.A., Srivastava, P.K., Musarrat, J., Shukla, Y., 2012. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. *Life Sci.* 90, 815–824. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.12.013>
- Su, L.J., Zhang, J.H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., Peng, Z.Y., 2019. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>
- Thapa, S., Lv, M., Xu, H., 2017. Acetylcholinesterase: A Primary Target for Drugs and Insecticides. *Mini-Reviews Med. Chem.* 17. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170120153930>
- Tilton, F., La Du, J.K., Vue, M., Alzarban, N., Tanguay, R.L., 2006. Dithiocarbamates have a common toxic effect on zebrafish body axis formation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.04.014>
- TILTON, F., LADU, J., TANGUAY, R., 2008. Sulfhydryl systems are a critical factor in the zebrafish developmental toxicity of the dithiocarbamate sodium metam (NaM). *Aquat. Toxicol.* 90, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.08.008>
- Todt, C.E., Bailey, D.C., Pressley, A.S., Orfield, S.E., Denney, R.D., Snapp, I.B., Negga, R.,

- Bailey, A.C., Montgomery, K.M., Traynor, W.L., Fitsanakis, V.A., 2016. Acute exposure to a Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate fungicide leads to mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species production in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology* 57, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2016.09.011>
- Trang, A., Khandhar, P.B., 2019. Physiology, Acetylcholinesterase, StatPearls.
- Tuschl, K., Mills, P.B., Clayton, P.T., 2013. Manganese and the Brain, in: *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc., pp. 277–312. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410502-7.00013-2>
- Velki, M., Di Paolo, C., Nelles, J., Seiler, T.B., Hollert, H., 2017. Diuron and diazinon alter the behavior of zebrafish embryos and larvae in the absence of acute toxicity. *Chemosphere* 180, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.017>
- Voorhees, J.R., Remy, M.T., Erickson, C.M., Dutca, L.M., Brat, D.J., Pieper, A.A., 2019. Occupational-like organophosphate exposure disrupts microglia and accelerates deficits in a rat model of Alzheimer’s disease. *npj Aging Mech. Dis.* 5, 3. <https://doi.org/10.1038/s41514-018-0033-3>
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., Hekimi, S., 2018. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* 217, 1915–1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>
- Westerfield, M., 2000. *The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*.
- Wolman, M., Granato, M., 2012. Behavioral genetics in larval zebrafish: Learning from the young. *Dev. Neurobiol.* 72, 366–372. <https://doi.org/10.1002/dneu.20872>
- Wortzel, I., Seger, R., 2011. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer* 2, 195–209. <https://doi.org/10.1177/1947601911407328>
- Yarza, R., Vela, S., Solas, M., Ramirez, M.J., 2016. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling as a therapeutic target for Alzheimer’s disease. *Front. Pharmacol.* 6, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00321>
- Yinghua, J.U., Taojun, X.U., Zhang, H., Aiming, Y.U., 2014. FOXO1-dependent DNA damage repair is regulated by JNK in lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* 44, 1284–1292. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2269>
- Yue, J., López, J.M., 2020. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. *Int. J. Mol. Sci.* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21072346>
- Zeke, A., Misheva, M., Reményi, A., Bogoyevitch, M.A., 2016. JNK Signaling: Regulation

and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 793–835.