

Aline Guimarães Pereira

**EFEITOS DO HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO SOBRE O
ENCÉFALO DE PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do Grau de doutora em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Evelise Maria Nazari

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Yara M. R. Müller

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Pereira, Aline Guimarães

Efeitos do herbicida a base de glifosato sobre o
encéfalo de peixe-zebra (*Danio rerio*) / Aline
Guimarães Pereira ; orientador, Evelise Maria
Nazari, coorientador, Yara Maria Rauh Müller, 2018.
121 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2.
Glifosato. 3. Sistema nervoso central. 4. Peixe
zebra. 5. Alterações mitocondriais. I. Nazari,
Evelise Maria . II. Müller, Yara Maria Rauh . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento. IV. Título.

"Efeitos do herbicida a base de glifosato sobre o encéfalo de peixe-zebra (*Danio rerio*)"

Por

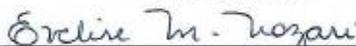
Aline Guimarães Pereira

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (25/PPGBCD/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC,



Prof. Dr. Geison de Souza Izídio
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento

Banca examinadora:



Dr.ª Evelise Maria Nazari (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr. Geison de Souza Izídio (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.ª Patrícia de Souza Brocardo (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Angelo Luis Stappassoli Pinto (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Geison de Souza Izídio
Coordenador do PPG em
Biologia Celular e do Desenvolvimento
CCB/UFSC

Florianópolis, 01 de março de 2018.

Dedico este trabalho aos meus
amores, Guilherme e Anita.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu namorado, marido, amigo e companheiro de vida, Guilherme A. Sauerbronn de Barros, por todo amor, incentivo, paciência, apoio e dedicação. Também, a nossa amada filha, Anita Pereira de Barros, por todo amor com que me presenteia todos os dias. Vocês fazem parte desta trajetória!

À minha orientadora, Prof.^a Evelise M^a Nazari, por me receber em seu laboratório de braços abertos, pela dedicação com que conduz todas as orientações, por ser um exemplo de profissionalismo e pelos 4 anos de agradável convívio. Com certeza será sempre um dos meus exemplos a seguir na carreira docente. Agradeço também à minha coorientadora Prof.^a Yara M^a Rauh Müller que da mesma forma é um exemplo de profissionalismo e dedicação a Universidade;

Aos meus pais, Ney S. Pereira e Gisela Guimarães Pereira, pelo amor e por sempre me incentivarem a seguir adiante. Aos meus queridos irmãos, Gisele e Thiago Guimarães Pereira, pela amizade e carinho da vida inteira. À minha avó, Ceny Fernandez Carvalho Guimarães (*in memoriam*), exemplo de força, dedicação ao trabalho e por todo o amor;

À minha querida sogra, Maria Jacintha Sauerbronn de Mello, por todas as incansáveis vezes que esteve presente, sempre ajudando, confortando e acolhendo. Minha imensa gratidão!

À Prof.^a Alexandra S. Latini pelos ensinamentos e ideias em momentos fundamentais deste trabalho e por sempre estar disposta a ajudar; e a todo o seu grupo, em especial Aline Pertile Remor, Roberta de P. Martins e Gianni Mancini;

Ao Pós-doc e amigo Michael Jaramillo pela colaboração, pelas conversas científicas e por sempre estar disposto a contribuir;

Aos professores Ariane Zamoner, Geison Izídio, Paulo Dias, e a técnica Talita Jeremias, pelas contribuições na avaliação do relatório de qualificação;

Aos membros da banca avaliadora da tese, professores Angelo Piato, Geison Izídio e Patrícia Brocardo por terem aceitado fazer parte deste momento tão importante de minha formação;

Às minhas colegas de laboratório que se tornaram amigas, Eliane Zeni, Carla Davico, Fabiana Ferreira e Heloísa Schramm, por todas as conversas, risadas e bons momentos;

A todos os colegas do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal pelos ótimos momentos vividos no decorrer desta etapa: Claudia, Gilian, Giuliam, Luciane, Madson, Manuela,

Neide, Valquíria, Thaline e Thiciane. Também a todas as alunas de iniciação científica, em especial a Taís e a Cynara;

Aos Prof. do Programa de PG em Biologia Celular e do Desenvolvimento pelas ótimas aulas ministradas;

Aos Laboratórios de Neuroquímica I e IV, coordenados pelas Prof.^a Andreza F. de Bem e Carla Inês Tasca, respectivamente, pelo auxílio material;

À equipe do Laboratório Multiusuário de estudos em Biologia (LAMEB) por toda a dedicação e auxílio durante a utilização dos equipamentos, em especial, à Vanessa, Chirle, Dênis, Bibiana e Emily;

A Deus, por estar sempre presente em todos os momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

*“Só se pode alcançar um grande êxito
quando nos mantemos fiéis a nós
mesmos”.*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Glifosato (N-fosfonometil-glicina) (GLI) é o ingrediente ativo dos herbicidas mais utilizados em todo o mundo. O GLI é aplicado em produtos formulados, denominados herbicidas a base de glifosato (HBG) e tais formulações podem causar efeitos não previstos nos ensaios de toxicidade com o GLI puro. O GLI pertence ao grupo químico dos organofosforados, sendo estes, de uma maneira geral, reconhecidos pela indução de efeitos neurotóxicos. No entanto, apesar dos casos relatados de efeitos neurotóxicos em humanos após a exposição aguda às formulações, este princípio ativo é classificado como não neurotóxico pelas agências reguladoras. Considerando que não há consenso na literatura científica nacional e internacional em relação aos efeitos neurotóxicos dos HBG, o objetivo deste estudo foi investigar a toxicidade de um HBG sobre a integridade funcional das mitocôndrias e do DNA no encéfalo de peixe-zebra *Danio rerio*. Para isso, realizamos o teste *in vitro* para avaliação da toxicidade do GLI puro e do HBG no encéfalo; o teste de toxicidade aguda para a determinação da concentração letal média em 96 h (CL_{50,96 h}) do HBG; e testes *in vivo* após a exposição a diferentes concentrações de HBG (0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L) por 7 e 15 dias. Nossos resultados mostraram que (i) o HBG foi mais tóxico do que o GLI puro no encéfalo de peixe-zebra; que causou uma desregulação mitocondrial caracterizada pela (ii) diminuição da viabilidade celular, (iii) inibição da atividade enzimática dos complexos mitocondriais, (iv) alterações da expressão de genes relacionados aos complexos mitocondriais, (v) hiperpolarização da membrana mitocondrial, associados ao (vi) aumento da produção de espécies reativas. Alterações no consumo de oxigênio mitocondrial não foram encontradas, assim como não foram evidenciadas alterações na integridade do DNA e morte celular no encéfalo de peixe-zebra induzidas pelo HBG. As alterações mitocondriais encontradas foram reconhecidas como uma resposta celular relevante e, com suporte do conjunto de resultados obtidos neste trabalho, consideramos que o HBG induz toxicidade no encéfalo em peixe-zebra. Além disso, este estudo apontou a mitocôndria como um alvo importante da toxicidade do HBG no encéfalo.

Palavras-chave: glifosato; neurotoxicidade; sistema nervoso central; alterações mitocondriais; atividade dos complexos mitocondriais; hiperpolarização mitocondrial; fragmentação do DNA.

ABSTRACT

Glyphosate (N-phosphonomethyl-glycine) (GLY) is the active ingredient of the most widely used herbicides in the worldwide. GLY is applied in formulated products, named glyphosate-based herbicide (GBH) and such formulations could cause effects, which are not predicted in the toxicity assays with pure GLY. This herbicide is classified as an organophosphorus compounds that has been recognized by inducing neurotoxic effects. Although this compound is classified as non-neurotoxic by national and international regulatory agencies, acute exposure to GBH causes neurological symptoms in humans. However, there is no consensus in the scientific literature in relation to neurotoxic effects of GBH. Thus, the aim of this study was to investigate the neurotoxic effects of the GBH in zebrafish *Danio rerio*, focusing on the acute toxicity, activity and transcript level of mitochondrial complexes, mitochondrial membrane potential, reactive species formation, mitochondrial respiration and apoptosis. The acute toxicity test for GBH was performed in 96 h with adults zebrafish; for *in vivo* assay the fish were exposed to GBH (0.065, 1.0 and 10.0 mg GLY/L) for 7 and 15 days; and for *in vitro* assay for cell viability was performed using also pure GLY. Our results showed that (i) GBH is more toxic than pure GLY in the zebrafish brain; that GBH caused mitochondrial dysregulation characterized by (ii) decreased in cell viability, (iii) inhibition of mitochondrial complex enzyme activity, (iv) modulation of the expression of genes related to mitochondrial complexes, (v) hyperpolarization of the mitochondrial membrane, associated with (vi) increased production of reactive species. Changes in mitochondrial oxygen consumption were not found, as no changes in DNA integrity and cell death in zebrafish brain induced by GBH were detected. The mitochondrial alterations found were recognized as a relevant cellular response and, based on the set of results obtained in this study, we consider that GBH induces neurotoxicity in zebrafish. In addition, this study pointed to mitochondria as an important target for GBH toxicity in the brain.

Keywords: glyphosate; neurotoxicity; central nervous system; mitochondrial alterations; activity of mitochondrial complexes; mitochondrial hyperpolarization; DNA fragmentation.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1: Estrutura química do glifosato e do seu principal metabólito, ácido aminometilfosfônico (AMPA).....	5
Figura 2: Cadeia transportadora de elétrons.....	11
Figura 3: Secção sagital de encéfalo de peixe-zebra.....	15
Figura 4: Desenho experimental do teste de toxicidade aguda ao HBG em peixe-zebra.....	20
Figura 5: Desenho experimental dos testes realizados <i>in vivo</i> após 7 e 15 dias de exposição ao HBG em peixe-zebra.....	21
Figura 6: Desenho experimental do teste de viabilidade celular <i>in vitro</i> no encéfalo de peixe-zebra.....	23
Figura 7: Gráfico representativo das curvas de consumo de oxigênio e parâmetros avaliados por respirometria de alta resolução.....	33
Figura 8: Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de GLI puro e do HBG sobre a viabilidade celular no encéfalo de peixe-zebra.....	38
Figura 9: Curvas de sobrevivência e curva dose-resposta em peixes-zebra <i>Danio rerio</i> expostos ao HBG.....	40
Figura 10: Viabilidade celular no encéfalo de peixe-zebra após exposição ao HBG.....	41
Figura 11: Atividade enzimática dos complexos I, II e IV da cadeia transportadora de elétrons após exposição ao HBG.....	43
Figura 12: Perfil de expressão dos genes de referência e do elemento repetitivo no encéfalo de peixe-zebra após exposição ao HBG.....	44
Figura 13: Níveis de transcritos do gene <i>cat</i> no encéfalo de peixe-zebra após exposição ao HBG.....	46
Figura 14: Níveis relativos de transcritos dos genes <i>ndufa6</i> , <i>sdhc</i> , <i>cox1</i> , <i>nrf1</i> e <i>tfam</i> no encéfalo de peixe-zebra após exposição ao HBG.....	48
Figura 15: Efeitos do HBG sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) no encéfalo de peixe-zebra.....	49
Figura 16: Efeitos do HBG sobre a formação de ER no encéfalo de peixe-zebra.....	50

Figura 17: Consumo de oxigênio mitocondrial em homogeneizado de encéfalo de peixe-zebra após exposição à concentração de 0,065 mg GLI/L	52
Figura 18: Teste de Fragmentação do DNA do encéfalo de peixe-zebra após 7 dias de exposição ao HBG.....	54
Figura 19: Teste de Fragmentação do DNA do encéfalo de peixe-zebra após 15 dias de exposição ao HBG.....	56
Figura 20: Fragmentação do DNA das brânquias de peixe-zebra após 7 dias de exposição ao HBG.....	58
Figura 21: Fragmentação do DNA das brânquias de peixe-zebra após 15 dias de exposição ao HBG.....	60
Figura 22: Marcação de TUNEL fluorescente de células apoptóticas na região do bulbo encefálico de peixe-zebra após exposição ao HBG	61
Figura 23: Eritrócitos de peixe-zebra após exposição ao HBG.....	62
Figura 24: Efeitos do HBG sobre as mitocôndrias nas células do encéfalo de peixe-zebra.....	63
Quadro 1: Concentrações de GLI puro e GLI no HBG usadas no teste <i>in vitro</i> e concentrações de GLI no HBG usadas nos testes <i>in vivo</i>	22
Quadro 2: Sequência de iniciadores utilizados na reação de RT-qPCR para as análises dos transcritos dos genes de referência e elemento repetitivo.....	27
Quadro 3: Sequência de iniciadores utilizados na reação de RT-qPCR para as análises dos transcritos dos genes alvo das análises mitocondriais.....	28
Quadro 4: Classificação final da estabilidade dos genes de referência e elemento repetitivo para análises por qPCR no encéfalo de peixe-zebra após exposição ao HBG.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
AChE	Acetilcolinesterase
ADP	Adenosina difosfato
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
<i>βact</i>	<i>Actin, beta 1</i>
BSS	<i>Balanced salt solution</i>
<i>b2m</i>	<i>Beta-2-microglobulin</i>
<i>cat</i>	Catalase
CCCP	Cianeto carbonil m-clorofenil-hidrazona
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CL₅₀	Concentração letal média
CL_{50,96 h}	Concentração letal média em 96 horas
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CoQ	Coenzima Q
<i>cox1</i>	<i>Cytochrome c oxidase I, mitochondrial</i>
Cq	Ciclo de quantificação
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol dicloridrato
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DCFDA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DCIP	2,6- dinitrofenolindofenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EFSA	European Food Safety Authority
<i>ef1a</i>	<i>Eukaryotic translation elongation fator 1 alpha</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis (β-aminoethyl ether)- N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>

EPM	Erro padrão da média
EPSPs	5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase
ERO	Espécie reativa de oxigênio
ER	Espécie reativa
FADH₂	Dinucleótideo de flavina e adenina reduzido
<i>gapdh</i>	<i>Gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GLI	Glifosato
<i>hatn10</i>	<i>Expressed repetitive elements, reference target</i>
HBG	Herbicida a base de glifosato
<i>hprt1</i>	<i>Hypoxanthine phosphoribosyl transferase</i>
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanolsulfônico
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IARC	<i>Internacional Agency for Research on Cancer</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
JC-1	<i>5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide</i>
LAMEB	Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia
MME	Membrana mitocondrial externa
MMI	Membrana mitocondrial interna
Mn-SOD	Manganês superóxido dismutase
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino]-propanosulfônico
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MTT	Brometo de 3-(4,5)-dimetiltiazolil-2,5 difeniltetrazólio
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
<i>ndufa6</i>	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 6</i>
<i>nrf1</i>	<i>Nuclear respiratory fator 1</i>
O₂	Oxigênio molecular
O₂⁻	Radical superóxido
Pi	Fosfato inorgânico
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>

POEA	Polioxi-etilenoamina
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
<i>rpL8</i>	<i>Ribosomal protein L8</i>
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em tempo real, do inglês <i>reverse transcriptase-quantitative real time polymerase chain reaction</i>
<i>sdhc</i>	<i>Succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane</i>
SNC	Sistema nervoso central
$\Delta\psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
<i>tfam</i>	<i>Transcription fator A, mitochondrial</i>
TFK	Tampão fosfato de potássio
TUNEL	<i>Transferase terminal dUTP nick end labeling</i>
US EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 AGROTÓXICOS E A TOXICIDADE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	1
1.2 HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO.....	4
1.3 MITOCÔNDRIA COMO ALVO DE TOXICIDADE.....	9
1.4 PEIXE-ZEBRA: MODELO PARA ESTUDOS DE NEUROTOXICIDADE.....	13
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 MODELO EXPERIMENTAL.....	19
3.2 HERBICIDA.....	19
3.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA DO HBG EM PEIXE-ZEBRA.....	19
3.4 TESTES DE TOXICIDADE DO HBG <i>IN VIVO</i>	20
3.5 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR NO ENCÉFALO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	21
3.6 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS COMPLEXOS I, II E IV DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL.....	23
3.7 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE VIA TRANSCRIPTASE REVERSA EM TEMPO REAL (RT-QPCR).....	25
3.7.1 Extração de RNA.....	25
3.7.2 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	26
3.7.3 Desenho de iniciadores.....	26
3.7.4 Avaliação de genes de referência por RT-qPCR.....	28

3.7.5 Análise dos transcritos dos genes <i>ndufa6</i>, <i>sdhc</i>, <i>cox1</i>, <i>nrf1</i> e <i>tfam</i> por RT-qPCR.....	29
3.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\psi_m$)	29
3.9 QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS (ER).....	30
3.10 QUANTIFICAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL	31
3.11 TESTE DE GENOTOXICIDADE DO HBG	33
3.11.1 Fragmentação do DNA	33
3.11.2 Marcação pelo método de TUNEL	34
3.11.3 Identificação de micronúcleos	36
3.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO <i>IN VITRO</i> AO GLI PURO E AO HBG SOBRE A VIABILIDADE CELULAR.....	37
4.2 TOXICIDADE AGUDA DO HBG.....	38
4.3 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HBG <i>IN VIVO</i> SOBRE A VIABILIDADE CELULAR.....	40
4.4 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HBG SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL	42
4.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA EXPRESSÃO DOS GENES DE REFERÊNCIA NO ENCÉFALO DE PEIXE-ZEBRA APÓS EXPOSIÇÃO AO HBG	43
4.6 EFEITOS DO HBG SOBRE OS NÍVEIS DE TRANSCRITOS PARA AS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL E BIOGÊNESE MITOCONDRIAL	46
4.7 EFEITOS DO HBG SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\psi_m$).....	48
4.8 EFEITOS DO HBG SOBRE A FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS (ER).....	50

4.9 EFEITOS DO HBG SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL	50
4.10 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HBG SOBRE A INTEGRIDADE DO DNA.....	52
4.10.1 Efeitos da exposição ao HBG sobre o DNA do encéfalo.....	53
4.10.2 Efeitos da exposição ao HBG sobre o DNA das brônquias ...	57
4.11 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HBG SOBRE A MORTE CELULAR NO ENCÉFALO	61
4.12 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HBG SOBRE A OCORRÊNCIA DE MICRÔNÚCLEOS NOS ERITRÓCITOS DE PEIXE-ZEBRA.....	62
5. DISCUSSÃO	65
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 AGROTÓXICOS E A TOXICIDADE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Os agrotóxicos, também denominados de defensivos agrícolas ou pesticidas, são usados para controlar organismos vivos considerados indesejáveis para a produção agrícola. Esses possuem em suas composições agentes químicos, físicos ou biológicos, denominados ingredientes ativos, que conferem eficácia por interferirem na atividade biológica normal de organismos alvos de controle (BRASIL, Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989).

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com o tipo de organismo que controlam; com a estrutura química dos ingredientes ativos ou com os efeitos à saúde humana e ao meio ambiente, ou seja, o grau de sua toxicidade (PERES; MOREIRA, 2003). Conforme a classificação pelo tipo de organismo que controlam, os agrotóxicos mais comercializados são: os herbicidas que controlam as plantas indesejadas em um cultivo agrícola ou no ambiente, também chamadas de ervas daninhas, seguido pelos inseticidas e fungicidas que controlam os insetos e fungos, respectivamente (IBGE, 2015).

A partir do ano 2000, principalmente devido à expansão do agronegócio, o consumo total de agrotóxicos no Brasil expandiu de aproximadamente 170.000 toneladas para 500.000 toneladas em 2014, um acréscimo de 135% (BOMBARDI, 2017). No ano de 2008, o Brasil já assumia o posto de maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo (IBGE, 2015), sendo estimada a utilização em território brasileiro de cerca de 20% de todo agrotóxico comercializado mundialmente (BOMBARDI, 2017).

O modelo de cultivo com o uso intensivo de agrotóxicos no Brasil tem gerado um indiscutível impacto sobre a saúde da população humana como um todo, mas, principalmente de camponeses e trabalhadores rurais (BOMBARDI, 2017). Ainda de acordo com BOMBARDI (2017), somados todos os casos de intoxicação notificados junto ao Ministério da Saúde entre 2007 e 2017, têm-se mais de 25.000 intoxicações por agrotóxicos, o que significa uma média de 8 intoxicações diárias. Cabe ressaltar, entretanto, que é estimada a subnotificação na ordem de 1:50, ou seja, para cada caso de intoxicação notificado, tenha-se 50 outros não notificados. Portanto, é possível que

tenham havido 1.250.000 intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola neste período (BOMBARDI, 2017).

Além dos casos de intoxicações e doenças agudas e crônicas, somam-se as tentativas de suicídio e anomalias congênitas secundárias a exposições a agrotóxicos, que culminam em um grande problema de saúde pública (CARNEIRO, 2015; BOMBARDI, 2016; HESS; NODARI, 2015). De modo geral, a exposição aos agrotóxicos, através de uma ou mais vias de acesso como a respiratória, dérmica e/ou digestiva, pode causar distúrbios em diferentes órgãos, incluindo o sistema nervoso central (SNC), endócrino, imune, reprodutivo, renal, digestório, cardiovascular e respiratório em organismos não-alvo, ou seja, todos os organismos exceto aqueles alvo de controle. A este respeito, há evidências crescentes que relacionam a exposição aos agrotóxicos e o aumento da incidência de doenças humanas, incluindo doenças neurológicas, diabetes, envelhecimento cardiovascular, doença renal e câncer (ABDOLLAHI *et al.*, 2004; DE SOUZA *et al.*, 2011; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2012; 2013; SEKHOTHA; MONYEKI; SIBUYI, 2016).

As intoxicações agudas afetam principalmente as pessoas expostas aos agrotóxicos em seu ambiente de trabalho. Os sinais e sintomas mais recorrentes são a irritação da pele e olhos, coceiras, vômitos, cólicas, diarreias, espasmos, dificuldades respiratórias, convulsões e, em casos graves, a morte. Já as intoxicações crônicas podem afetar toda a população, pois são decorrentes da exposição múltipla, isto é, da presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos e no ambiente, geralmente em doses baixas, e seus efeitos podem aparecer muito tempo após a exposição dificultando a correlação com o agente tóxico (INCA, 2015). Dentre os efeitos sistêmicos associados à exposição crônica podem ser citados infertilidade, impotência, abortos, anomalias congênitas, desregulação hormonal, asma, câncer, efeitos sobre o sistema imunológico e SNC (WINCHESTER *et al.*, 2009; HAYDEN *et al.*, 2010; SAMSEL; SENEFF, 2015).

A neurotoxicidade é a capacidade de agentes químicos, físicos ou biológicos causarem alterações estruturais ou funcionais adversas sobre o SNC e, dentre estes agentes, os agrotóxicos destacam-se como os principais causadores de danos (KAUFMAN, 1994). A neurotoxicidade induzida por agrotóxicos pode resultar em uma variedade de doenças neurológicas e psiquiátricas e esta diversidade de efeitos sobre o SNC aumenta a necessidade de avaliar, através de testes biologicamente

apropriados e confiáveis, substâncias relevantes ambientalmente e, sobretudo, potencialmente neurotóxicas (KAMEL; HOPPIN, 2004).

O SNC desempenha um papel importante na regulação fisiológica através do controle e da integração de praticamente todas as funções dos vários sistemas de órgãos. Outros sistemas, como os sistemas circulatório e reprodutivo, fornecem informações ao SNC, que por sua vez controla os seus funcionamentos. Assim, a disfunção neurológica tem um grande impacto que vai além do próprio SNC, sendo que, mesmo pequenas alterações na estrutura e função deste sistema, podem causar efeitos sobre a fisiologia geral (KAUFMAN, 1994).

O SNC tem características próprias que o tornam especialmente susceptível a agentes tóxicos. Estas características incluem uma baixa capacidade regenerativa e uma grande variedade de sistemas de neurotransmissores e neuromoduladores, que podem ser alterados por agentes tóxicos (KAUFMAN, 1994). Além disso, os neurônios possuem altas taxas metabólicas oxidativas, e um grande requerimento de energia, visto que são diferenciadas e que necessitam, portanto, de grandes quantidades de ATP para a correta manutenção dos gradientes iônicos transmembranares e para os processos de neurotransmissão (GERMAN; WHITE; SPARKMAN, 1987). Ainda possuem características celulares próprias como altas taxas de área de superfície de membrana por volume citoplasmático e altos níveis de lipídios insaturados. Em conjunto, tais características estão associadas a uma das primeiras respostas celulares deste sistema após o insulto provocado por agentes tóxicos, que é a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (DE ZWART *et al.*, 1999; ABUJA; ALBERTINI, 2001; CHONG *et al.*, 2005).

Algumas classes de agrotóxicos são reconhecidas por seu potencial neurotóxico, tais como organofosforados, carbamatos, organoclorados e piretróides, uma vez que interferem na neurotransmissão e função dos canais iônicos no SNC (COSTA *et al.*, 2008; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013).

Historicamente, os compostos organofosforados foram introduzidos como agrotóxicos na década de 1970, inicialmente como substitutos dos organoclorados por serem menos persistentes no ambiente, porém com alta toxicidade (PEAKALL *et al.*, 1975; MURPHY, 1986). Foi também a partir dessa época que foram registrados crescentes números de casos de intoxicação por organofosforados, mesmo em doses baixas, tanto em humanos como em outras espécies animais (GALLOWAY; HANDY, 2003; ARAUJO *et*

al., 2007). Dentre os efeitos tóxicos associados aos organofosforados encontram-se neurotoxicidade, imunotoxicidade, carcinogenicidade, desregulação endócrina e alterações no desenvolvimento embrionário (ABRASCO, 2012).

O modo de ação dos organofosforados é semelhante tanto em invertebrados quanto em vertebrados, e se dá pela inibição da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina (ABRASCO, 2012). Sabe-se que os efeitos tóxicos dos compostos organofosforados ocorrem não somente através da inibição da AChE, mas também através de outros alvos moleculares como hormônios, fatores neurotróficos e alterações inflamatórias no tecido nervoso (SÁNCHEZ-SANTED; COLOMINA; HERRERO HERNÁNDEZ, 2016).

1.2 HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO

Os ingredientes ativos com ação herbicida lideram a lista dos agrotóxicos mais comercializados no Brasil. O controle de plantas daninhas é uma prática de elevada importância econômica para a obtenção de altos rendimentos em qualquer cultivo agrícola, e dentre os herbicidas mais amplamente usados, os que contêm o ingrediente ativo glifosato (GLI) perfazem 62,4% do total de herbicidas comercializados no Brasil (IBGE, 2015).

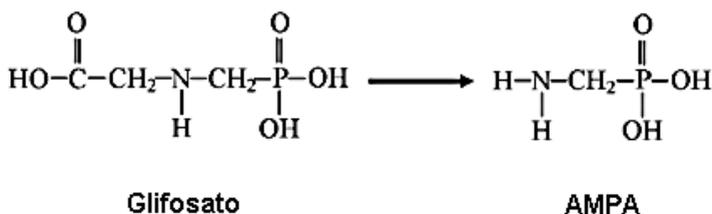
O GLI é um composto organofosforado, de nome químico N-fosfonometil-glicina e fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$, que atua de modo não seletivo e pós-emergente, isto é, mata qualquer tipo de planta e pode ser aplicado após a germinação em culturas de plantas geneticamente modificadas resistentes ao GLI (Figura 1). As formulações a base de GLI são usadas em áreas agrícolas, industriais, urbanas, florestais e no controle de plantas em ambientes aquáticos, sendo considerado o herbicida mais utilizado em todo o mundo e o segundo mais utilizado ao redor de casas e em jardins (IARC, 2015).

No Brasil, atualmente, o uso de herbicidas a base de GLI (HBG) é liberado para 28 culturas diferentes, em diversos modos de aplicação: no pré-plantio dos cultivos, na pós-emergência das plantas infestantes e das culturas geneticamente modificadas tolerantes ao GLI, na pré-colheita como dessecante, e em concentrações baixas, como maturador, principalmente da cultura da cana-de-açúcar (MACHADO, 2016). Estima-se que tais padrões de uso aumentem os níveis de resíduos de GLI nos produtos colhidos, uma vez que este princípio ativo

tem sido detectado em diferentes alimentos (VANDENBERG *et al.*, 2017).

O modo de ação do GLI foi descrito entre as décadas de 1970 e 1980 e, se dá basicamente, pela inibição competitiva da enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase (EPSPs) presente em plantas, fungos e bactérias, mas não em animais. Essa enzima é necessária para a síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais fenilalanina, tirosina e triptofano (KISHORE; SHAH, 1988) e também é responsável pela biossíntese de corismato, um importante intermediário metabólico precursor na biossíntese destes aminoácidos (RUEPPEL *et al.*, 1977; SHARPS, 1984). O principal produto da degradação do GLI é o ácido aminometilfosfônico (AMPA), que por sua vez é degradado em dióxido de carbono e amônia (RUEPPEL *et al.*, 1977; POLLEGIONI; SCHONBRUNN; SIEHL, 2011). Além destes, o GLI pode ser degradado em fosfato e N-metilglicina (sarcosina), um metabólito intermediário, até sua degradação em glicina (DICK; QUINN, 1995).

Figura 1: Estrutura química do glifosato e do seu principal metabólito, ácido aminometilfosfônico (AMPA). Fonte: Adaptado de MARTÍNEZ *et al.* (2018).



O GLI é comercialmente formulado como sal de isopropilamina, amônio, sódio, potássio ou trimetilsulfônio, o que lhe confere maior solubilidade em água. Além do ingrediente ativo, são adicionados à formulação compostos com ação surfactante, sendo geralmente mencionado o polioxietilenoamina (POEA), os quais facilitam a penetração do GLI na cutícula vegetal e aumentam a sua efetividade (COX; SURGAN, 2006; SZÉKÁCS; DARVAS, 2012).

O grande aumento no uso de produtos formulados com GLI ocorreu principalmente com a introdução, em 1996, de variedades de culturas geneticamente modificadas tolerantes a este ingrediente ativo

(SZÉKÁCS; DARVAS, 2012; BONNY, 2016). Devido à sua elevada solubilidade em água e do uso extenso, o GLI e o AMPA são os principais poluentes dos rios e águas superficiais (KOLPINA *et al.*, 2006; HANKE *et al.*, 2010). Além de serem detectados nos produtos agrícolas destinados ao consumo humano e animal (TAKAHASHI; HORIE; AOBA, 2001; BOHN *et al.*, 2014), tanto o GLI como o AMPA têm sido detectados no ar (CHANG; SIMCIK; CAPEL, 2011), assim como em amostras de sangue, urina e no soro materno e fetal (ACQUAVELLA *et al.*, 2004; BOLOGNESI *et al.*, 2009; CONRAD *et al.*, 2017; KONGTIP *et al.*, 2017).

De um modo geral, o GLI é classificado pela Agência de Proteção Ambiental norte-americana (*Environmental Protection Agency* – EPA) como um herbicida de baixa toxicidade aguda em condições normais de uso (US EPA, 1993). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica o GLI como pertence à classe toxicológica IV, ou pouco tóxico (ANVISA, 2017). Desde o ano de 2008, a ANVISA está em processo de reavaliação do GLI, considerando, de acordo com o Diário Oficial da União (DOU, 22/02/2008), a sua grande utilização no Brasil, os relatos de casos de intoxicação ocupacional e acidental, a revisão da dose estabelecida para a ingestão diária aceitável e os possíveis efeitos toxicológicos adversos.

Em relação às agências internacionais reguladoras dos riscos à saúde humana, não há consenso no que diz respeito ao potencial carcinogênico do GLI (TARONE, 2016). No encontro promovido pela Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (*International Agency for Research on Cancer* - IARC) para avaliar a carcinogenicidade de agrotóxicos organofosforados, após extensa revisão de publicações científicas por especialistas, o GLI foi classificado como “provavelmente carcinogênico para humanos”, ou Grupo 2A (GUYTON *et al.*, 2015; IARC, 2015; PORTIER *et al.*, 2016). Subsequentemente à classificação da IARC, uma avaliação realizada pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority* – EFSA) concluiu que é pouco provável que o GLI seja carcinogênico para os seres humanos (EFSA, 2015). Também, em reunião conjunta entre a Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas e a Organização Mundial da Saúde (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO / *World Health Organization* – WHO) sobre os efeitos dos resíduos de pesticidas sobre a saúde, após a avaliação do potencial carcinogênico do GLI presente

nos alimentos, foi concluído que este não apresenta risco carcinogênico via exposição alimentar (FAO; WHO, 2016).

Em humanos, após a exposição acidental ou deliberada aos HBG, foram descritas alterações clínicas como ulcerações orofaríngeas, náuseas e vômitos, acidose metabólica e várias outras complicações graves, como dificuldade respiratória, arritmia cardíaca, choque anafilático, alterações de consciência, coagulação intravascular disseminada e morte (LEE *et al.*, 2000; ZOUAOUI *et al.*, 2013). Entretanto, entre os inibidores enzimáticos usados na agricultura, o GLI tem sido considerado um herbicida seguro e efetivo com o mínimo de toxicidade humana e ambiental, não apresentando risco significativo em condições normais de uso (GREIM *et al.*, 2015; KIER; KIRKLAND, 2013; WILLIAMS *et al.*, 2016; WILLIAMS; KROES; MUNRO, 2000).

De um modo geral, verifica-se também na literatura científica que a toxicidade do GLI, assim como das formulações, é uma questão bastante controversa, pois parece não haver consenso em relação aos efeitos desse herbicida sobre organismos não-alvo.

Alterações na atividade de enzimas antioxidantes, na expressão de genes e em parâmetros hematológicos têm sido descritos como efeitos tóxicos do HBG em peixes, roedores e caranguejos (BENACHOUR; SÉRALINI, 2009; CATTANI *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2017; MODESTO; MARTINEZ, 2010).

Especificamente, a citotoxicidade do HBG em linhagens de células humanas foi reportada pela ativação das caspases 3 e 7, indução à fragmentação do DNA e morte celular (BENACHOUR; SÉRALINI, 2009; GASNIER *et al.*, 2010). Adicionalmente, foi verificado dano ao DNA em células de medula óssea de camundongos (PRASAD *et al.*, 2009) e de eritrócitos de peixes (BRAZ-MOTA *et al.*, 2015; ÇAVAS; KÖNEN, 2007; VERA-CANDIOTI; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2013), conferindo um potencial de genotoxicidade a este herbicida. Além disto, foram evidenciadas após o tratamento com HBG em ouriço do mar, alterações nas proteínas CDK1 e ciclina B relacionadas aos pontos de checagem do ciclo celular (MARC; MULNER-LORILLON; BELLÉ, 2004).

Estudos realizados demonstram ainda que o HBG induz o estresse oxidativo, como resposta bioquímica a este composto. A peroxidação lipídica e alterações na atividade de enzimas antioxidantes induzidas pelo HBG têm sido observadas em várias espécies de peixes (BRAZ-MOTA *et al.*, 2015; MODESTO; MARTINEZ, 2010; SAMANTA *et al.*, 2014), assim como em roedores (CATTANI *et al.*,

2017; DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI *et al.*, 2013; EL-SHENAWY, 2009). Além disso, foram reportadas alterações em análises de transcritos que codificam componentes do sistema antioxidante, além de proteínas de resposta ao estresse e moléculas de sinalização pró-apoptóticas em peixe (WEBSTER; SANTOS, 2015) e ratos (MESNAGE *et al.*, 2015).

Considerando os efeitos diversificados do GLI e do HBG nos organismos, chama a atenção a pouca disponibilidade de estudos que avaliem a toxicidade deste herbicida no SNC, em diferentes modelos de estudo. Adicionalmente, apesar de serem reconhecidos os efeitos neurotóxicos produzidos por compostos organofosforados (BURNS *et al.*, 2013; EATON *et al.*, 2008; JOHNSON *et al.*, 2009), o GLI foi definido pela EPA como um composto não neurotóxico, mesmo em doses muito elevadas (US EPA, 1994). No entanto, as formulações contendo GLI parecem induzir efeitos neurotóxicos. Em um relatório produzido pela EPA sobre os casos de intoxicação aguda por HBG entre 2002 e 2008, foram registrados 271 casos, dos quais 36,2% apresentaram sintomas neurológicos indicativos de toxicidade do HBG sobre o SNC. Dentre os sinais e sintomas relatados estão: tremor, perda de coordenação motora, ataxia e dormência (HAWKINS *et al.*, 2009).

Estudos experimentais mostram os efeitos inibitórios do GLI puro, assim como do HBG, sobre a atividade da AChE, parâmetro comumente usado como biomarcador de neurotoxicidade (BRAZ-MOTA *et al.*, 2015; MENÉNDEZ-HELMAN *et al.*, 2012; MODESTO; MARTINEZ, 2010; SAMANTA *et al.*, 2014; SANDRINI *et al.*, 2013).

Ainda, em relação ao potencial neurotóxico do HBG, NEGGA *et al.* (2011; 2012) relacionaram a toxicidade deste herbicida à morte de neurônios dopaminérgicos e gabaérgicos em *Caenorhabditis elegans*. Em hipocampo de ratos, tanto *in vitro* como *in vivo*, o HBG induziu o aumento dos níveis de glutamato extracelular, e consequentemente, à excitotoxicidade glutamatérgica e estresse oxidativo (CATTANI *et al.*, 2014; 2017).

Estudos de caso relatam os efeitos sobre o SNC após a exposição ao HBG, como a perda de consciência e encefalopatia (MALHOTRA *et al.*, 2010), e quadro de parkinsonismo generalizado acompanhado por alterações estruturais em núcleos neuronais relacionados com os distúrbios do movimento em exames de neuroimagem (BARBOSA *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2011).

Os mecanismos da toxicidade dos HBG sobre o SNC ainda não são completamente compreendidos. Alguns trabalhos mostram o

envolvimento de respostas de estresse oxidativo e indução de neurotoxicidade tanto *in vitro* como *in vivo* (MARTÍNEZ *et al.*, 2018; ROY; CARNEIRO; OCHS, 2016; SOBJAK *et al.*, 2017). Apesar de ser postulado que as mitocôndrias são os principais locais de produção de ERO e que desequilíbrios na condição oxidativa celular desempenham um importante papel em processos neurodegenerativos (FILOSTO *et al.*, 2011; MARTIN, 2012), pouco é conhecido sobre o envolvimento desta organela na fisiopatologia dos efeitos induzidos pelo HBG no SNC.

1.3 MITOCÔNDRIA COMO ALVO DE TOXICIDADE

A mitocôndria é uma organela constituída por duas membranas, a membrana mitocondrial externa (MME) e a membrana mitocondrial interna (MMI). As MME e MMI criam dois compartimentos mitocondriais: um espaço interno denominado matriz e um espaço intermembranas. A MME é facilmente permeável a pequenas moléculas e íons, os quais se movem livremente através de canais transmembranares formados por uma família de proteínas integrais de membrana, chamadas porinas (NELSON; COX, 2014). A MMI é formada por pregas que se invaginam para o interior da matriz mitocondrial, denominadas cristas mitocondriais, que aumentam grandemente a sua área superficial total. A MMI é impermeável à maioria das pequenas moléculas e íons, incluindo prótons (H⁻), e as únicas espécies que atravessam esta membrana o fazem através de transportadores específicos (ALBERTS *et al.*, 2015). Na MMI, estão localizados os cinco complexos enzimáticos responsáveis pela produção de energia, denominados cadeia respiratória ou cadeia transportadora de elétrons (CTE) (NELSON; COX, 2014).

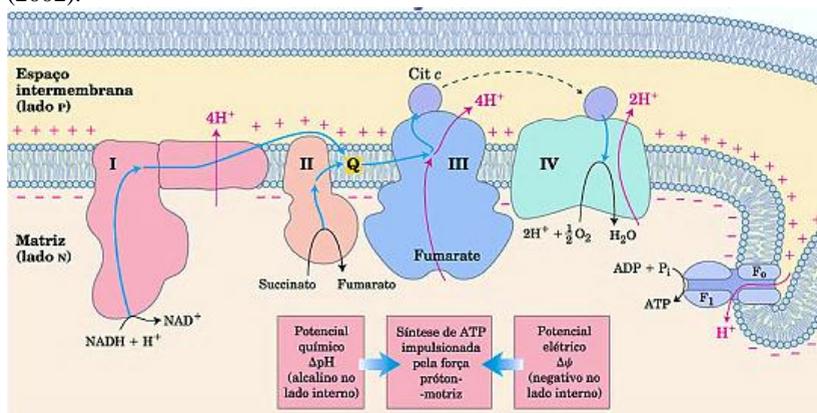
A matriz mitocondrial contém uma mistura altamente concentrada de centenas de enzimas, incluindo aquelas necessárias à oxidação do piruvato e ácidos graxos e ao ciclo do ácido tricarbóxico, além do DNA mitocondrial, ribossomos, RNA transportador e várias enzimas requeridas para a expressão dos genes mitocondriais (ALBERTS *et al.*, 2015).

As células eucarióticas requerem energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) para funcionar normalmente. Classicamente, as mitocôndrias atuam como principais provedores de energia celular, fornecendo a maquinaria que gera ATP, a partir da energia armazenada em NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido) e

FADH₂ (dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido). Além desta função, as mitocôndrias também estão envolvidas em numerosos processos celulares como: homeostase de cálcio intracelular, síntese de esteroides, termogênese adaptativa, geração de ERO e indução de morte celular programada por apoptose (MARTIN, 2012).

As moléculas NADH e FADH₂, são geradas via glicólise no citosol (NADH) e ciclo do ácido tricarboxílico na mitocôndria (NADH e FADH₂), e são oxidadas no complexo I e complexo II da CTE, respectivamente. Os elétrons liberados são então transportados para o complexo III pela coenzima Q (CoQ) e subsequentemente para o complexo IV pelo citocromo *c*. No complexo IV, os elétrons reagem com oxigênio molecular (O₂) para formar água. O transporte de elétrons é energeticamente acoplado à translocação de prótons da matriz mitocondrial, através dos complexos I, III e IV na MMI, para o espaço intermembranas. Este fluxo de prótons resulta em uma força protomotiva através da MMI, que consiste de um gradiente químico (ΔpH) e um gradiente elétrico, ou potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi\text{m}$), no qual a matriz mitocondrial apresenta uma carga negativa. Os prótons podem fluir de volta para a matriz mitocondrial através da FoF1-ATP-sintase (ATPase ou complexo V), culminando na síntese de ATP a partir de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi) (NELSON; COX, 2014; ALBERTS *et al.*, 2015). Junto com o complexo V, os quatro complexos da CTE constituem o sistema da fosforilação oxidativa (GNAIGER, 2014) (Figura 2).

Figura 2: Cadeia transportadora de elétrons. Elétrons doados pela NADH e outros substratos oxidados passam através da cadeia de transportadores de elétrons dispostos na membrana interna. O fluxo de elétrons é acoplado a transferência de prótons através da MMI para o espaço intermembranas, produzindo um gradiente químico (pH) e um gradiente elétrico ($\Delta\psi$). A MMI é impermeável a prótons e estes podem retornar a matriz somente através de canais de prótons específicos (Fo). A força protomotiva é a força motora que impulsiona os prótons de volta à matriz e fornece energia para a síntese de ATP, catalisada pelo complexo F1 associado a Fo (ATPase). Fonte: NELSON e COX (2002).



O complexo V também pode agir de modo reverso, isto é, hidrolisar a ATP e expelir prótons a partir da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, sustentando assim o $\Delta\psi$ quando necessário. Este mecanismo requer que a ATP seja transportada do citosol para a matriz mitocondrial, também por ação de modo reverso do translocador de nucleotídeos de adenosina mitocondrial (FORKINK *et al.*, 2014; NICHOLLS, 1972).

De um modo geral, ERO é o termo usado para descrever uma variedade de moléculas e radicais livres (espécies químicas com um elétron não emparelhado) derivadas do oxigênio molecular. As ERO são geradas como um subproduto da fosforilação oxidativa (TURRENS, 2003). Dois locais da cadeia respiratória, o complexo I e III, são considerados as principais fontes de ERO na mitocôndria em condições fisiológicas (TURRENS, 2003). Estes complexos, I e III, liberam elétrons para o oxigênio, produzindo principalmente radicais superóxido (O_2^-). Os radicais superóxidos são dismutados pela manganês superóxido dismutase (Mn-SOD), gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio. O complexo I gera radicais superóxido apenas em

direção à matriz mitocondrial, mas o complexo III gera em direção à matriz e ao espaço intermembranas. Além disso, os componentes do ácido tricarbóxico, incluindo α -cetoglutarato desidrogenase, geram radicais superóxido na matriz. Esses radicais livres e radicais superóxido gerados pela mitocôndria são transportados para o citoplasma através de canais de ânions dependentes de voltagem (REDDY, 2009).

A produção de ERO é um mecanismo intrínseco de vários processos biológicos, tais como a sinalização celular, através principalmente da regulação de genes sensíveis aos sinais redox, a contração muscular e a produção de respostas do sistema imune (KANEKO *et al.*, 2001), no entanto, se em desequilíbrio, podem promover a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas e do DNA (REDDY, 2009).

A abundância de mitocôndrias em cada tecido varia de acordo com sua demanda energética. Os neurônios, bem como o músculo cardíaco e esquelético apresentam alta densidade de mitocôndrias que suprem suas elevadas demandas energéticas. Logo, quando em estado de privação de energia, apresentam maior vulnerabilidade a danos quando comparados a outros tecidos (FILOSTO *et al.*, 2011). Especialmente as funções do SNC dependem do funcionamento mitocondrial eficiente, visto que vários estudos têm demonstrado que as disfunções mitocondriais desempenham um importante papel na patogênese de doenças neurodegenerativas, assim como estão associadas aos efeitos neurotóxicos induzidos por agrotóxicos (BALTAZAR *et al.*, 2014; FILOSTO *et al.*, 2011; MARTIN, 2012; REDDY, 2009).

As disfunções mitocondriais envolvidas nos processos de neurotoxicidade geralmente incluem alterações no potencial de membrana mitocondrial, aumento da formação de ERO, estresse oxidativo e apoptose (MARTIN, 2012).

A este respeito, a toxicidade de diferentes tipos de agrotóxicos e compostos químicos se dá através da inibição da atividade dos complexos da CTE, como mecanismo de ação primário ou secundário (CHEN *et al.*, 2017). Por exemplo, a inibição do complexo I, também chamado de NADH desidrogenase, ocorre após exposição ao agente tóxico MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), que causa parkinsonismo em humanos e modelos animais. O MPTP promove seus efeitos tóxicos através de interações com proteínas constituintes do complexo I mitocondrial, levando à disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e neurodegeneração dopaminérgica (LANGSTON, 2017). Assim como o complexo I, alterações nos complexos II, III e IV e na

ATPase são descritas após exposições a diferentes toxicantes (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013).

Quando a atividade de algum complexo mitocondrial é inibida pela presença de agentes tóxicos, o processo de transferência de elétrons é interrompido, assim como a produção de ATP, levando a diminuição da capacidade energética celular proveniente da fosforilação oxidativa (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013).

O $\Delta\psi_m$, necessário para a produção de ATP, pode ser considerado um parâmetro funcional mitocondrial importante, sendo que alterações neste parâmetro são observadas em uma grande variedade de células com disfunção na fosforilação oxidativa (ABRAMOV *et al.*, 2010). Também, alterações no $\Delta\psi_m$ e na atividade da CTE podem induzir um aumento na produção de ERO (ESTERAS *et al.*, 2017), além de outras consequências para a célula como o estresse oxidativo e apoptose (ABRAMOV *et al.*, 2010).

Para contrabalançar a produção de ERO, a mitocôndria possui sistemas de defesa antioxidante, como as enzimas Mn-SOD, peroxirredoxinas, o sistema glutatona peroxidase/glutatona redutase, a coenzima Q10 (ubiquinona), creatina e nicotinamida (DROGE, 2002; JAMES *et al.*, 2004).

No entanto, quando os níveis totais de ERO são maiores que a capacidade de defesa antioxidante, as ERO podem causar danos celulares significativos como a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados de membrana, presentes em altas concentrações no SNC, levando a múltiplos produtos tóxicos de peroxidação lipídica, os quais podem amplificar os danos a macromoléculas. Ainda, ERO podem resultar em dano ao DNA, produzindo quebras de fita simples e/ou dupla (ESTERAS *et al.*, 2017; MARTIN, 2012; TURRENS, 2003). Embora sob condições normais haja um balanço entre a formação de ERO e antioxidantes, em vários processos patológicos como na neurotoxicidade, as defesas antioxidantes se tornam insuficientes resultando em estresse oxidativo que pode culminar em apoptose ou morte celular (CHIN *et al.*, 2008; FILOSTO *et al.*, 2011).

1.4 PEIXE-ZEBRA: MODELO PARA ESTUDOS DE NEUROTOXICIDADE

Os peixes, de um modo geral, são bons indicadores de contaminação por poluentes e suas respostas celulares, moleculares e bioquímicas são similares àquelas encontradas em mamíferos (BEGUM,

2004; FONSECA *et al.*, 2008). O peixe-zebra *Danio rerio*, também conhecido como paulistinha, é um modelo amplamente usado na pesquisa biológica, em áreas como a genética, toxicologia, farmacologia e neurociências (BASU; SACHIDANANDAN, 2013; BRADFORD; TORO, 2017).

O peixe-zebra é um pequeno teleósteo de água doce pertencente à família Cyprinidae. O gênero *Danio* apresenta um padrão de coloração com listras horizontais claras e escuras alternadas (SPENCE *et al.*, 2008). A distribuição natural do peixe-zebra é ao sul e sudeste da Ásia, principalmente Índia, Bangladesh e Nepal (SPENCE *et al.*, 2006; 2008). O habitat natural é geralmente descrito como pequenos corpos d'água com uma temperatura entre 24 a 38°C, visibilidade a uma profundidade de ~ 30 cm, com presença de substrato de sedimento e vegetação aquática (ENGESZER *et al.*, 2007).

O peixe-zebra foi descrito pelo médico escocês Francis Hamilton (HAMILTON, 1822) e vem sendo usado em biotério desde os anos de 1950. Na década de 1980, um grupo liderado pelo Dr. George Streisinger da Universidade do Oregon, introduziu o uso do peixe-zebra em experimentos laboratoriais contribuindo para que este animal se tornasse um organismo modelo vertebrado (DAMMSKI; MÜLLER, 2011).

As vantagens do uso do peixe-zebra incluem baixos custos com manutenção quando comparado com roedores, rápido crescimento e comportamento facilmente observado em um ambiente controlado (VARGAS; SIGURGEIRSSON, 2011). Além disso, após o sequenciamento completo do seu genoma, foram descritos genes evolutivamente conservados, que apresentam cerca de 70% de homologia com os de humanos (BARBAZUK *et al.*, 2000; HOWE *et al.*, 2013).

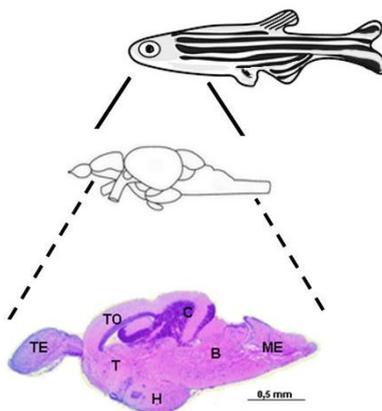
O peixe-zebra é um organismo modelo ideal para estudos em toxicologia, pois as alterações na morfologia, expressão de genes, parâmetros bioquímicos e comportamento são facilmente detectáveis neste teleósteo, tanto em embriões e larvas como em indivíduos adultos (DAI *et al.*, 2014). Além de ter sido amplamente estudado e bem descrito para estudos de toxicidade ambiental, o peixe-zebra apresenta grande sensibilidade a drogas, sendo amplamente usado em estudos farmacológicos (GOLDSMITH, 2004).

Vários estudos demonstram que o SNC é um dos principais alvos de toxicantes, e neste contexto, o peixe-zebra apresenta células neuronais, células gliais, mielina e circuitos neuronais conservados

evolutivamente e semelhantes aos observados em mamíferos (BANDMANN; BURTON, 2010; STEWART *et al.*, 2014). Também são descritos mecanismos de neurotransmissão encontrados em mamíferos, incluindo a presença dos neurotransmissores glutamato, GABA, glicina, histamina, dopamina, norepinefrina, epinefrina, serotonina, melatonina e acetilcolina (RINKWITZ *et al.*, 2011). Sendo assim, tem sido usado como um importante modelo para pesquisas neurológicas e comportamentais (NORTON; BALLY-CUIF, 2010; STEWART *et al.*, 2014).

Além disso, evidencia-se um padrão de desenvolvimento conservado, com estruturas neuroanatômicas homólogas e organização neurofuncional conservadas entre mamíferos e peixes teleósteos (GONZALEZ-VOYER; WINBERG; KOLM, 2009). De acordo com TOLEDO-IBARRA; ROJAS-MAYORQUÍN; GIRÓN-PÉREZ (2013), as regiões neuroanatômicas telencefálicas, tectum optico, tálamo, hipotálamo, cerebelo, bulbo encefálico e medula espinhal são descritas no encéfalo de peixe-zebra (Figura 3).

Figura 3: Representações esquemáticas de exemplar adulto e do encéfalo de peixe-zebra *Danio rerio*. Em destaque secção sagital de encéfalo corado em hematoxilina-eosina (HE) evidenciando as regiões neuroanatômicas. TE: telencefalo; TO: tectum optico; T: tálamo; H: hipotálamo; C: cerebelo; B: bulbo encefálico; ME: medula espinhal. Fonte: do autor.



Nesse contexto, acreditamos que o modelo de toxicidade induzida pelo HBG sobre o encéfalo em peixe-zebra seja uma ferramenta muito importante para investigar os efeitos subletais deste herbicida.

Em geral, os agrotóxicos são reconhecidos por seus efeitos sobre o SNC em estudos realizados tanto em humanos, como em modelos animais (BURNS *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2003). Contudo, poucos estudos têm investigado se os HBG podem levar à neurotoxicidade e ainda, de que forma as células do SNC respondem a este herbicida (AXELRAD; HOWARD; MCLEAN, 2003; NEGGA *et al.*, 2011; TIERNEY *et al.*, 2010).

Embora todos os principais sistemas do corpo possam ser afetados negativamente por substâncias tóxicas, o SNC é particularmente vulnerável a estes compostos. Ao contrário de muitos outros tipos de células, as células neurais têm uma capacidade limitada de regeneração. Além disso, muitas substâncias tóxicas têm afinidade por diferentes tipos celulares neuronais, dependendo da especificidade de cada composto (BOELSTERLI, 2007).

Considerando-se o uso extenso dos HBG, que promovem uma grande exposição ambiental e alimentar aos organismos não-alvo, e os casos de desenvolvimento de sintomas neurotóxicos após intoxicação aguda, propomos como hipótese de trabalho que o HBG induz neurotoxicidade através (i) da indução de danos mitocondriais relacionados aos complexos da cadeia transportadora de elétrons, (ii) diminuição do potencial de membrana mitocondrial e (iii) indução à apoptose.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a toxicidade do HBG sobre a integridade da função mitocondrial e do DNA no encéfalo de peixe-zebra *Danio rerio*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar os efeitos da exposição *in vitro* ao GLI puro e ao HBG sobre a viabilidade celular no encéfalo de peixe-zebra;
2. Determinar a curva dose-resposta e a concentração letal média (CL_{50,96 h}) do HBG em peixe-zebra;
3. Avaliar os efeitos da exposição *in vivo* ao HBG sobre a viabilidade celular no encéfalo de peixe-zebra;
4. Avaliar os efeitos da exposição *in vivo* ao HBG sobre a atividade enzimática dos complexos da CTE mitocondrial no encéfalo de peixe-zebra;
5. Quantificar os níveis de transcritos dos genes que codificam para proteínas presentes na CTE mitocondrial no encéfalo de peixe-zebra, após exposição *in vivo* ao HBG;
6. Quantificar os níveis de transcritos de genes envolvidos na biogênese mitocondrial no encéfalo de peixe-zebra, após exposição *in vivo* ao HBG;
7. Avaliar os efeitos da exposição *in vivo* ao HBG sobre o potencial de membrana mitocondrial no encéfalo de peixe-zebra;
8. Quantificar a formação de ER no encéfalo de peixe-zebra, após exposição *in vivo* ao HBG;
9. Analisar os efeitos do HBG sobre a função bioenergética mitocondrial no encéfalo de peixe-zebra;
10. Avaliar os efeitos genotóxicos do HBG por meio da análise da integridade do DNA no encéfalo e nas brânquias, ocorrência de células apoptóticas no encéfalo e presença de micronúcleos em eritrócitos de peixe-zebra.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MODELO EXPERIMENTAL

Peixes machos e fêmeas adultos da espécie *Danio rerio*, com comprimento corporal médio de 3,3 cm ($\pm 0,09$) e massa corporal média de 0,46 g ($\pm 0,14$), foram obtidos em loja especializada na comercialização de animais aquáticos e mantidos no Biotério Setorial (Bio 004) do Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal/BEG/CCB/UFSC. Os peixes foram acondicionados em aquários de 20 litros (L) de água de clorada e filtrada, em aeração contínua, temperatura controlada de 27°C (± 1), na densidade de armazenamento de 1 grama (g) de peixe/L e alimentados diariamente com alimento comercial para peixes. O período de adaptação dos peixes ao ambiente do biotério foi de no mínimo 7 dias. Todos os experimentos que seguem descritos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (número 5466040416/CEUA/UFSC).

3.2 HERBICIDA

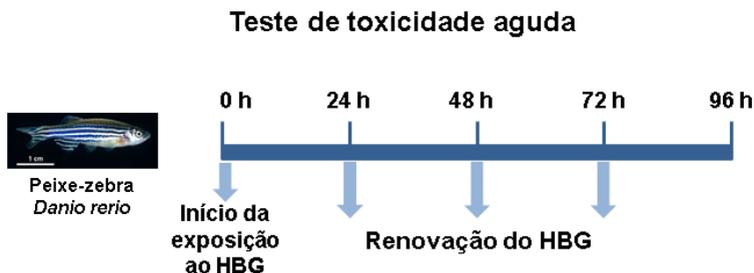
O HBG Scout® (Monsanto do Brasil Ltda) contendo 720,0 g/Kg de GLI foi usado neste trabalho. As diluições foram preparadas considerando a quantidade de GLI contida na formulação, a qual é referida como mg GLI/L em todo o texto. O GLI puro [N-(fosfonometil) glicina 96%, Sigma-Aldrich] foi usado para o teste *in vitro*. O HBG e o GLI puro foram diluídos em água de clorada para a realização dos testes.

3.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA DO HBG EM PEIXE-ZEBRA

O teste para a determinação da concentração letal média (CL₅₀) do HBG em peixe-zebra foi desenvolvido de acordo com os testes de toxicidade aguda em peixes para avaliação de produtos químicos, recomendados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1992). Os peixes foram expostos ao HBG por um período de 96 h em condições semi-estáticas, isto é, com renovação total da solução a cada 24 h (Figura 4). As concentrações de 0,0 (controle); 0,1; 1,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 80,0 e 100,0 mg GLI/L foram preparadas diariamente. Para cada concentração usada foram testados 24 peixes, sendo 8 peixes por ensaio realizado em triplicata. A

mortalidade foi registrada em 12, 24, 48, 72 e 96 h após o início do teste, para a determinação da concentração que matou 50% dos peixes até 96 h ($CL_{50,96\text{ h}}$). A morte dos peixes foi considerada quando os movimentos operculares cessaram, e após a constatação desta, os peixes foram contados e removidos do aquário imediatamente. Os registros da sobrevivência foram utilizados para a determinação da porcentagem de sobrevivência a cada 24 h. O valor da $CL_{50,96\text{ h}}$ e os seus correspondentes limites de confiança de 95% foram calculados usando o programa US EPA Probit 1,5 versão gratuita (US EPA, 1992).

Figura 4: Desenho experimental do teste de toxicidade aguda ao HBG em peixe-zebra. Os peixes foram expostos ao HBG por um período de 96 h. As concentrações de 0,0; 0,1; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 80,0 e 100,0 mg GLI/L foram testadas. As renovações do HBG foram realizadas a cada 24 h.



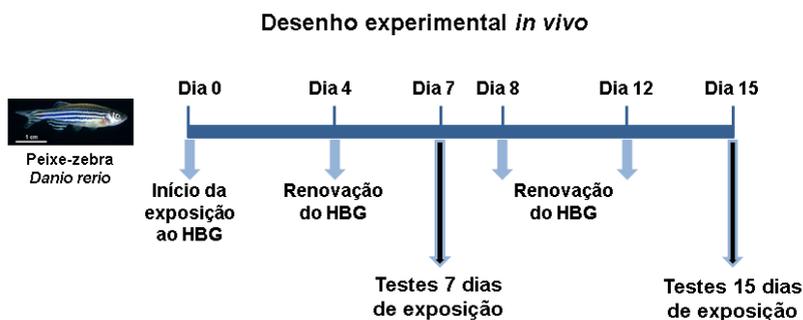
3.4 TESTES DE TOXICIDADE DO HBG *IN VIVO*

Para avaliar os efeitos subletais do HBG sobre o encéfalo de peixe-zebra, os peixes foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, expostos às concentrações de 0,065 mg GLI/L (~ 0,12% $CL_{50,96\text{ h}}$), 1,0 mg GLI/L (~ 2,0% $CL_{50,96\text{ h}}$), 10,0 mg GLI/L (~ 20,0% $CL_{50,96\text{ h}}$); e 0,0 mg GLI/L (grupo controle). A menor concentração de GLI testada segue a determinação do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA/Brasil, que estabelece a concentração de 0,065 mg/L de GLI como a máxima permitida em águas interiores brasileiras (CONAMA, 2005). As concentrações de 1,0 e 10,0 mg GLI/L do HBG foram referenciadas em estudos prévios de toxicidade do GLI e/ou HBG em peixes (MODESTO; MARTINEZ, 2010; SULUKAN *et al.*, 2017; UREN WEBSTER *et al.*, 2014). Os tempos de exposição escolhidos foram de 7 e 15 dias com base nos valores estimados de meia-vida do herbicida em água, que corresponde a um período de 14 dias (GIESY;

DOBSON, 2000). Durante os períodos de exposição, as concentrações do herbicida foram totalmente renovadas nos aquários a cada 4 dias a contar do início dos experimentos, com objetivo de manter as concentrações testadas (Figura 5). Após o período de experimentação, a água dos aquários contendo o HBG foi armazenada em recipiente apropriado para descarte e coletada pelo Setor de Gestão de Resíduos da UFSC.

Este desenho experimental foi usado para a realização dos testes de viabilidade celular, atividade enzimática e níveis de transcritos para as enzimas chave dos complexos I, II e IV da CTE, avaliação do potencial de membrana mitocondrial, quantificação de ER, quantificação do consumo de oxigênio mitocondrial, teste de fragmentação do DNA, identificação de morte celular pelo método de TUNEL e identificação de micronúcleos.

Figura 5: Desenho experimental dos testes realizados *in vivo* após 7 e 15 dias de exposição ao HBG em peixe-zebra. As concentrações de 0,065; 1,0 e 10,0 mg GL/L foram testadas. As renovações do HBG foram realizadas a cada 4 dias.



3.5 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR NO ENCÉFALO *IN VITRO* E *IN VIVO*

O teste do MTT (brometo de 3-(4,5)-dimetilialzolib-2,5 difeniltetrazólio) foi utilizado para avaliar os efeitos do GLI puro e do HBG sobre a viabilidade celular no encéfalo total *in vitro*, após 3 h de

incubação, assim como *in vivo* após a exposição ao HBG por 7 e 15 dias, seguindo a metodologia proposta por MOSMANN (1983).

Os peixes foram eutanasiados por decapitação (CONCEA, 2013) e os encéfalos foram dissecados, pesados e imediatamente mantidos em 1 mL de tampão Krebs gelado (NaCl 122,0 mM, KCl 3,0 mM, MgSO₄ 1,2 mM, KH₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 25,0 mM, glicose 10,0 mM e CaCl₂ 1,3 mM, pH 7,4), saturado com 95% de O₂ e 5% de CO₂, em placas de 24 poços (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Para o teste *in vitro* as amostras foram incubadas por 3 h em diferentes concentrações de GLI puro e de concentrações equivalentes de GLI no HBG diluídos em tampão Krebs e mantidas a 27°C (Quadro 1; Figura 6). Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com tampão Krebs e incubadas com o MTT (0,5 mg/mL, Sigma Aldrich) em placas de 96 poços por 20 min a 27°C. Para cada concentração usada foram testados 6 peixes, sendo 3 peixes por ensaio independente realizados em duplicata.

Quadro 1: Concentrações de GLI puro e GLI no HBG usadas no teste *in vitro* e concentrações de GLI no HBG usadas nos testes *in vivo*.

Concentrações		Testes		
mg/L	Molaridade	<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>
		GLI puro	HBG	HBG
0,0	0,0	x	x	x
0,065	0,38 µM	x	x	x
1,0	6,0 µM	x	x	x
10,0	60,0 µM	x	x	x
160,0	1,0 mM	x	x	
1,6 x 10 ³	10,0 mM	x	x	
4,0 x 10 ³	25,0 mM	x	x	
8,0 x 10 ³	50,0 mM	x	x	

Para os testes *in vivo*, após o período de exposição às concentrações do HBG (Quadro 1) por 7 dias e 15 dias, os encéfalos foram rapidamente dissecados, pesados e mantidos em 1 mL de tampão Krebs gelado. O MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado e as amostras foram incubadas por 20 min a 27°C. Para cada concentração usada foram testados 8 peixes, sendo 4 peixes por ensaio independente realizados em duplicata.

Após, ambas as amostras dos testes *in vitro* e *in vivo* foram lavadas em tampão Krebs para remoção do MTT não reduzido e 200,0 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Nuclear) foi adicionado para solubilizar os cristais de formazan, por 30 min em agitação. Então, duplicatas de

100,0 µL do formazan solubilizado em DMSO, de cada amostra, foram colocados em placas de 96 poços e analisados por espectrofotometria a 570 nm (Multileitora Infinite M200 Tecan; Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia - LAMEB/CCB/UFSC). Como controles positivos foram usados no teste *in vitro* a rotenona 100,0 µM (inibidora do complexo I) e a azida sódica 50,0 mM (inibidora do complexo IV) e nos testes *in vivo* a azida sódica 50,0 mM. Os resultados foram calculados como densidade óptica x 1000/mg de proteína e expressos em porcentagem dos controles. A concentração proteica foi determinada pelo método de LOWRY *et al.* (1951) usando albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich) como padrão.

Figura 6: Desenho experimental do teste de viabilidade celular *in vitro* no encéfalo de peixe-zebra. O tempo de incubação foi de 3 h com diferentes concentrações de GLI puro e de HBG.



3.6 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS COMPLEXOS I, II E IV DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL

A mensuração da atividade enzimática dos complexos I, II e IV foi realizada em homogenatos de encéfalos de peixes após exposição ao HBG, por 7 e 15 dias. A cinética enzimática foi avaliada por 5 min em espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 Tecan, LAMEB), a 37°C e calculada como $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

Os encéfalos foram rapidamente dissecados e homogeneizados em 10 volumes de tampão fosfato de potássio (TFK) 5,0 mM, contendo sacarose 300,0 mM, MOPS (ácido 3-[N-morfolino]-propanosulfônico)

5,0 mM, EGTA (ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid) 1,0 mM, albumina sérica bovina a 0,1%, pH 7,4. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a 3.000 x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi congelado a -80°C. Uma alíquota do sobrenadante foi usada para a determinação da concentração proteica pelo método de LOWRY *et al.* (1951). Foram usados 4 encéfalos por amostra (n = 12 amostras por grupo, sendo 6 amostras por ensaio realizado em duplicata).

A atividade do complexo I foi mensurada através da redução do ferricianeto dependente de β - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) em um comprimento de onda de 420 nm, como descrito por CASSINA e RADI (1996) e modificado por LATINI *et al.*, (2005). Para tal, os sobrenadantes foram descongelados e recongelados por 3 vezes para o rompimento da membrana interna mitocondrial. Primeiramente, em uma placa de 96 poços foi adicionado em cada poço TFK 100,0 mM, pH 7,4, seguido por 10,0 μ L de ferricianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆) 10,0 mM e 2,0 μ L de rotenona 4,0 mM. Após, foi acrescentada a amostra na concentração de 0,1 mg/mL de proteína, e somente no momento da leitura, foi adicionada a NADH na concentração de 0,2 mM no meio para um volume final de 200,0 μ L.

A atividade do complexo II foi mensurada através da oxidação do 2,6- dinitrofenolindofenol (DCIP) lido a 600 nm, de acordo com FISCHER *et al.* (1985) e modificado por LATINI *et al.* (2005). Inicialmente, em uma placa de 96 poços foi adicionado TFK 62,5 mM, pH 7,4, 8,0 μ L de succinato de sódio 200,0 mM, a amostra na concentração de 0,1 mg/mL de proteína, e a placa foi incubada a 37°C por 20 min. Após, foi adicionado 2,0 μ L de rotenona 4,0 mM, 5,0 μ L de azida sódica 100,0 mM, e somente no momento da leitura, foi adicionado 10,0 μ L de DCIP 0,5 mM para um volume final de 200,0 μ L.

O complexo IV foi determinado pela mensuração da oxidação do citocromo *c* lido a 550 nm (RUSTIN *et al.*, 1994 e modificado por LATINI *et al.*, 2005). Foram usados tampão Tris-HCl 200,0 mM, pH 7,4, Triton X-100 a 0,1% e citocromo *c* 30,0 μ M para um volume final de 200,0 μ L. Em uma placa de 96 poços foi adicionado Tris-HCl 200,0 mM, pH 7,4, 2,0 μ L de Triton X-100 a 0,1% e somente no momento da leitura foi adicionado o citocromo *c* 30,0 μ M, para um volume final de 200,0 μ L.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE TRANSCRITOS POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE VIA TRANSCRIPTASE REVERSA EM TEMPO REAL (RT-QPCR)

Para avaliar os níveis de transcritos dos genes *ndufa6*, *sdhc* e *cox1* que codificam proteínas constituintes dos complexos I, II e IV da cadeia respiratória mitocondrial, respectivamente, assim como dos genes *nrf1* e *tfam*, que codificam proteínas envolvidas na biogênese mitocondrial, foi realizada a RT-qPCR em amostras de encéfalo de peixes-zebra após a exposição ao HBG por 7 dias.

Para isto, foi avaliada a estabilidade da expressão de 6 genes (*β -act*, *rpl8*, *gapdh*, *b2m*, *hpri1*, *ef1a*) e do elemento repetitivo (*hatm10*) como normalizadores nas análises de transcritos por RT-qPCR em peixes-zebra expostos a diferentes concentrações do HBG (0,065; 0,65 e 6,5 mg GLI/L).

Iniciadores do gene para a catalase (*cat*) foram usados como gene alvo para avaliar o desempenho da normalização dos genes de referência e do elemento repetitivo analisados por RT-qPCR. O gene *cat* foi escolhido com base na literatura, pois há indicação de alterações no conteúdo de transcritos, bem como na atividade enzimática da catalase, após exposição ao GLI e/ou HBG em peixes (MODESTO; MARTINEZ, 2010; UREN WEBSTER *et al.*, 2014; MOTTIER *et al.*, 2015; TOPAL *et al.*, 2015; MURUSSI *et al.*, 2016; JARAMILLO *et al.*, 2017).

3.7.1 Extração de RNA

Foram usados 2 encéfalos por amostra (n = 3 amostras por grupo), os quais foram rapidamente dissecados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e homogeneizados em 1 mL do reagente Trizol (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante, para a extração do RNA total. Após, as amostras foram tratadas com Dnase I (Thermo Scientific, 1U/ μ L) a 37°C por 30 min e a integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% com GelRed 1:500 (Biotium). A quantificação de RNA total foi determinada por espectrofotometria (Nano espectrofotômetro BIO-5000-BI/Kasuki; Laboratório de Neuroquímica I/UFSC), e as amostras com razões de absorbância de 260/280 e 260/230 \geq 1,8 foram selecionadas e usadas na síntese de DNA complementar (cDNA).

3.7.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA foi usado 1µg de RNA total das amostras de encéfalo (n = 3 amostras por grupo) e o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega). Para a reação de transcrição reversa foi usado 0,5 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), mistura de 0,25 µg de iniciador Oligo(dT)15 e 0,25 µg de *random hexamer*, MgCl₂ 2,5 mM, inibidor de ribonuclease (20 unidades) e transcriptase reversa (160 U). Primeiramente, Oligo(dT)15 e *random hexamer* foram adicionados as amostras de RNA, incubadas por 70°C por 5 min e imediatamente colocadas em gelo por 5min. Após, foi adicionada a mistura com os demais componentes. As reações foram incubadas a 25°C por 5 min, a 42°C por 60 min e a 70°C durante 15 min (Termociclador, MyCycler Thermal Cycler/Bio Rad; Laboratório de Neurogenética do Desenvolvimento/UFSC).

3.7.3 Desenho de iniciadores

Os iniciadores dos 6 genes de referência e do elemento repetitivo estão referenciados em estudos de avaliação e validação de genes de referência em peixe-zebra (Quadro 2). Para analisar os níveis de transcritos dos genes *ndufa6*, *sdhc*, *cox1*, *nrf1* e *tfam*, os iniciadores específicos foram desenhados utilizando o programa Oligo explorer (Quadro 3).

Quadro 2: Sequência de iniciadores utilizados na reação de RT-qPCR para as análises dos transcritos dos genes de referência e elemento repetitivo.

Símbolo	Gene Nome	Sequência de iniciadores (5' – 3')	Produto amplificado (pb)	Eficiência	Referência
<i>cat</i>	<i>Catalase</i>	Senso: AGTTCCTCTGA TTCTGTG Anti-senso: ATGGCGATGTGT GTCTGG	173	1,90	UrenWebster <i>et al.</i> , 2014
<i>βact</i>	<i>Actin, beta 1</i>	Senso: CGAGCTGTCTTC CCATCCA Anti-senso: TCACCAACGTAG CTGTCTTCTG	86	1,92	Lang <i>et al.</i> , 2016
<i>gapdh</i>	<i>Gliceraldehide-3-phosphate dehydrogenase</i>	Senso: CGCTGGCATCTC CCTCAA Anti-senso: TCAGCAACACGA TGGCTGTAG	84	1,91	Lang <i>et al.</i> , 2016
<i>ef1a</i>	<i>Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha</i>	Senso: TACAAATGCGGT GGAATCGAC Anti-senso: GTCAGCCTGAGA AGTACCAGT	246	1,94	Lang <i>et al.</i> , 2016
<i>b2m</i>	<i>Beta-2-microglobulin</i>	Senso: TCTCCATTGAAC TGCTGAAG Anti-senso: ACGCTGCAGGTA TATTCATC	142	1,95	Vanhauwaert <i>et al.</i> , 2014
<i>rpl8</i>	<i>Ribosomal protein L8</i>	Senso: CCGAGACCAAGA AATCCAGAG Anti-senso: CCAGCAACAACA CCAACAAC	91	1,93	UrenWebster <i>et al.</i> , 2014
<i>hprt1</i>	<i>Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1</i>	Senso: GAGGAGCGTTGG ATACAGA Anti-senso: CTCGTTGTAGTC AAGTGCAT	85	1,91	Vanhauwaert <i>et al.</i> , 2014
<i>hatn10</i>	<i>Expressed repetitive elements, reference target</i>	Senso: TGAAGACAGCAG AAGTCAATG Anti-senso: CAGTAAACATGT CAGGCTAAATAA	56	1,96	Vanhauwaert <i>et al.</i> , 2014

pb = pares de bases

Quadro 3: Sequência de iniciadores utilizados na reação de RT-qPCR para as análises dos transcritos dos genes que codificam para proteínas presentes na CTE mitocondrial e envolvidos na biogênese mitocondrial.

Gene		Sequência de iniciadores (5' – 3')	Produto amplificado (pb)	Eficiência
Símbolo	Nome			
<i>ndufa6</i>	<i>NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 6</i>	Senso: AGGTGTGGAAGCAGAGGA Anti-senso: GAATTGGAGAGGAAGTCAGC	83	1,94
<i>sdhc</i>	<i>Succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane</i>	Senso: AGAGGAACAGGCATAGCAC Anti-senso: GTAACACCAACGCAGCAAG	64	1,94
<i>cox1</i>	<i>Cytochrome c oxidase I, mitochondrial</i>	Senso: TGAACCTAGCCAACCAGGAG Anti-senso: GGGTGGAAGAAGTCAGAAGC	205	1,94
<i>nrf1</i>	<i>Nuclear respiratory factor 1</i>	Senso: CGACATTAGCAGAAGCGACT Anti-senso: GACTGGAATTTGGACGAGAC	122	1,96
<i>tfam</i>	<i>Transcription fator A, mitochondrial</i>	Senso: GCTAATCTGCTGGTCAAGTC Anti-senso: GTATGCTGT CAGGGGTCTC	132	1,95

pb = pares de bases

3.7.4 Avaliação de genes de referência por RT-qPCR

A estabilidade dos genes de referência foi determinada utilizando RT-qPCR e a plataforma RefFinder que integra os principais programas computacionais (geNorm, Normfinder, BestKeeper, e o método Ct delta). Primeiramente, a eficiência de cada candidato a gene de referência foi testada por RT-qPCR usando uma série de diluições (1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64) a partir do cDNA das amostras de encéfalo. As reações de qPCR foram realizadas com o kit GoTaq Mix qPCR Master (Promega) e o equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems; LAMEB/UFSC). As reações qPCR consistiram de 5,0 µL GoTaq Master Mix 2X, 0,3 µM de iniciador, 0,1 µL CXR Reference Dye, 1,0 µL de cDNA diluído (1/10) e água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), num volume total de 10,0 µL. As condições dos ciclos de qPCR foram as seguintes: desnaturação a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 seg, anelamento e extensão a 60°C durante 1 min. No final dos ciclos, os produtos de qPCR foram submetidos a uma curva de *melting* (95°C

durante 15 seg, 60°C durante 30 seg e 95°C durante 30 seg). Todas as amostras de cDNA foram corridas em duplicata técnica e o controle negativo de cada gene (sem adição de amostra) foi incluído em cada placa de qPCR para determinar a ausência de contaminação.

As eficiências foram calculadas utilizando a equação $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ (PFAFFL, 2001; RASMUSSEN, 2001) e os valores de eficiências de amplificação de 1,9 - 2,1 foram considerados aceitáveis para cada gene de referência. A especificidade dos iniciadores foi avaliada por análise da curva de *melting* e pela eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de amplificação de RT-qPCR visualizados com GelRed (Biotium). Os valores de Cq foram usados para as análises pela plataforma RefFinder.

Os ciclos da reação de RT-qPCR foram realizados de acordo com o método descrito acima. O $\Delta\Delta Cq$ foi calculado para cada amostra, e a expressão gênica relativa determinada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVACK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando os genes de referência ou combinações de genes entre os genes avaliados.

3.7.5 Análise dos transcritos dos genes *ndufa6*, *sdhc*, *cox1*, *nrf1* e *tfam* por RT-qPCR

Para analisar os transcritos dos genes envolvidos na cadeia transportadora de elétrons e na biogênese mitocondrial, foi utilizado o cDNA diluído (1/10) das amostras de encéfalo de peixes-zebra após exposição as diferentes concentrações do HBG após 7 dias. A especificidade dos iniciadores, a eficiência da amplificação, e o RT-qPCR foram realizados conforme descrito no ítem 3.7.4. O controle negativo de cada gene foi incluído em cada placa de qPCR para determinar a ausência de contaminação. O $\Delta\Delta Cq$ foi calculado para cada amostra, e a expressão gênica relativa determinada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVACK; SCHMITTGEN, 2001).

3.8 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\psi_m$)

A sonda JC-1 (5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide, ThermoFisher Scientific) foi utilizada para a avaliação de alterações do $\Delta\psi_m$, de acordo com as instruções do fabricante. Quando administrada a células vivas, JC-1 acumula na mitocôndria onde emite fluorescência vermelha ou verde,

dependendo do potencial de membrana mitocondrial (REERS; SMITH; CHEN, 1991).

Após o período de exposição ao HBG, as amostras de encéfalo foram dissecadas e homogeneizadas em 250,0 µL de tampão BSS (do inglês *balanced salt solution*) [NaCl 136,0 mM, KCl 5,4 mM, MgCl₂ 1,4 mM, NaH₂PO₄ 1,0 mM, CaCl₂ 1,2 mM, HEPES 10,0 mM (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanolsulfônico), glicose 9,0 mM, pH 7,4] para a obtenção das células de acordo com TRENTIN *et al.* (2003), com pequenas modificações. Após 3 min da homogeneização, 100,0 µL do sobrenadante com as células foi coletado e tratado com JC-1 (2,0 µM, concentração final) a 27°C por 20 min ao abrigo da luz. Então as células foram centrifugadas a 1,000 x g, por 2 min, e o precipitado foi suspenso em 220,0 µL de BSS e 100,0 µL de cada amostra foi adicionado em placas de 96 poços, em duplicatas, e analisadas por espectrometria (Spectramax Paradigm; pico de excitação de 488 nm e picos de emissão de 529 nm e 590 nm, verde e vermelho, respectivamente). A taxa de fluorescência vermelha/verde foi calculada e expressa como porcentagem do controle. Como controle da reação foi usado o disruptor do potencial de membrana mitocondrial CCCP (cianeto carbonil m-clorofenil-hidrazona), o qual foi adicionado às células antes do tratamento com JC-1, na concentração final de 50,0 µM a 27°C por 5 min. Uma alíquota de 20,0 µL do controle positivo foi reservada em um microtubo e o marcador nuclear fluorescente DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol) foi adicionado, por 5 min. Após, as células foram visualizadas em uma lâmina ao microscópio de fluorescência (aumento de 100 X; Microscope Olympus BX41, LAMEB). Para cada concentração usada foram testados 10 - 12 peixes, sendo 5 - 6 peixes por ensaio realizado em duplicata.

3.9 QUANTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS (ER)

A quantificação de ER foi realizada usando a sonda DCFDA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato, Sigma-Aldrich). DCFDA é uma sonda não-fluorescente e permeável às células. DCFDA é convertido intracelularmente a DCF (2',7'-diclorofluoresceína), o qual é altamente fluorescente quando oxidado. O protocolo foi realizado conforme as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich).

Após o período de exposição ao HBG, as amostras de encéfalo foram dissecadas e homogeneizadas em BSS de acordo com VANDRESEN-FILHO *et al.* (2015). As células foram tratadas com

DCFDA 10,0 μM (concentração final) a 27°C por 30 min ao abrigo da luz. Então, as células foram centrifugadas a 1,000 x g por 2 min, o precipitado foi suspenso em 220,0 μL de BSS, e 100,0 μL de cada amostra foi adicionado em placas de 96 poços, em duplicatas técnicas. Uma alíquota de 20,0 μL de cada amostra foi reservada para a quantificação do conteúdo proteico. A formação de DCF oxidado foi avaliada por espectrometria, com pico de excitação de 488 nm e pico de emissão de 525 nm. Para cada concentração usada foram testados 10 peixes, sendo 5 peixes por ensaio realizado em duplicata. As quantificações foram corrigidas pelo conteúdo de proteína e expressas como porcentagens do controle. A concentração proteica foi determinada pelo método de LOWRY *et al.* (1951) usando albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich) como padrão.

3.10 QUANTIFICAÇÃO DO CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL

Para testar os efeitos do HBG após 7 dias de exposição sobre o consumo de oxigênio mitocondrial nas amostras de encéfalo, foi realizada a análise da respiração mitocondrial em um oxígrafo de alta resolução (Oxygraph-2k Oroboros® Instruments, Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo/LABOX/UFSC), a 28°C, em câmaras contendo 2 mL, de acordo com HIOLSKI *et al.* (2014).

Foram usados 2 encéfalos por amostra homogeneizados em 10 volumes de tampão fosfato de potássio 5,0 mM, contendo sacarose 300,0 mM, MOPS 5,0 mM, EGTA 1,0 mM e albumina sérica bovina 0,1%, pH 7,4, e imediatamente adicionados nas câmaras do oxígrafo. Para cada grupo avaliado foram usados 14 peixes, sendo 2 encéfalos por amostra, em 7 ensaios independentes. Este teste consistiu da inibição de alvos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, através da adição de compostos inibidores e desacopladores, e avaliação do impacto sobre o consumo de oxigênio mitocondrial. Os compostos oligomicina, FCCP (carbonil cianeto trifluoro-metoxi fenilhidrazona), antimicina-A e rotenona foram sucessivamente injetados nas câmaras do oxígrafo. Os parâmetros avaliados foram:

(i) a respiração basal, mensurada através do consumo de oxigênio sem a adição de substratos ou inibidores da respiração;

(ii) a eficiência na síntese de ATP, representada pelo consumo de oxigênio ocasionado pela transferência de elétrons através da cadeia respiratória e calculada, após a adição de oligomicina no meio, pela

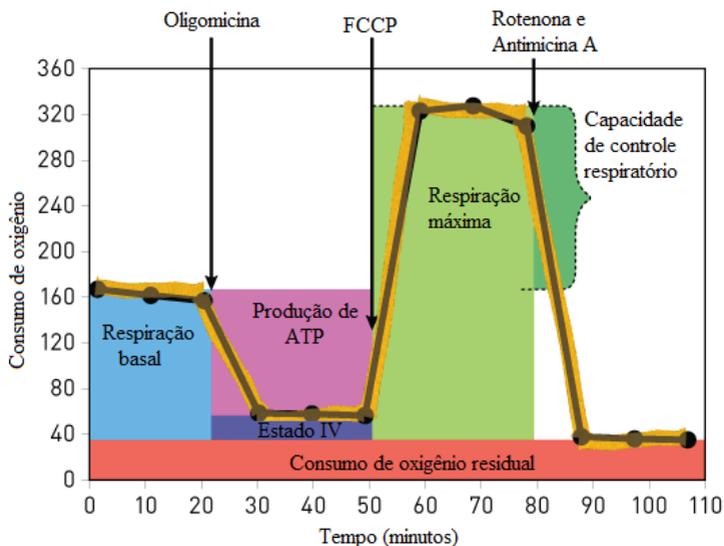
diferença entre o consumo de oxigênio durante a respiração basal e o estado IV da respiração mitocondrial. O estado IV da respiração mitocondrial está representado pelo consumo de oxigênio ocasionado pela transferência de elétrons através da cadeia respiratória durante a inibição da síntese de ATP (NELSON; COX, 2014);

(iii) a respiração máxima, representada pelo consumo de oxigênio observado após a adição do desacoplador mitocondrial FCCP. Este composto desacopla a transferência de elétrons da fosforilação oxidativa por dissipar os prótons que formam o gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial (NELSON; COX, 2014). Este parâmetro indica a capacidade máxima mitocondrial em transferir elétrons (GNAIGER, 2001);

(iv) o consumo de oxigênio residual ou extramitocondrial, indicado pelo consumo de oxigênio não proveniente da respiração mitocondrial, observado após a adição de rotenona, que inibe o complexo I, e antimicina-A, inibidor do complexo III da cadeia respiratória (Figura 7).

As concentrações finais dos compostos nas câmaras foram: 1,0 μM de oligomicina, 5,0 μM de FCCP e 1,0 μM de rotenona + 1,0 μM de antimicina A. Os dados de concentração e fluxo de oxigênio foram coletados por meio do programa DatLab 4.3 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria).

Figura 7: Gráfico representativo das curvas de consumo de oxigênio e parâmetros avaliados por respirometria de alta resolução (GLASER, 2014).



3.11 TESTE DE GENOTOXICIDADE DO HBG

Para os testes de genotoxicidade foram usadas amostras de encéfalo, brânquias e sangue após a exposição às concentrações de 0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L do HBG. O teste de fragmentação do DNA foi realizado após 7 e 15 dias de exposição no encéfalo e nas brânquias; o método de TUNEL foi realizado após 7 dias de exposição e o teste do micronúcleo foi realizado após 15 dias de exposição ao HBG.

3.11.1 Fragmentação do DNA

O teste de fragmentação do DNA foi utilizado para caracterizar a integridade estrutural do DNA, nas brânquias e no encéfalo, após a exposição ao HBG por 7 e 15 dias. A extração do DNA nos tecidos foi realizada seguindo a metodologia proposta por HOFSTETTER *et al.* (1997).

Após a eutanásia, as brânquias e o encéfalo foram rapidamente dissecados e congelados em nitrogênio líquido. Após, os tecidos foram descongelados e homogeneizados em um volume de 0,5 mL de tampão TKM contendo Tris 10,0 mM, KCl 10,0 mM, EDTA 2,0 mM, MgCl₂

4,0 mM, pH 7,6. Para cada concentração usada foram testados 6 peixes, sendo 3 peixes por ensaio realizado em duplicatas independentes. Para as brânquias foram utilizados 1,0 mL do tampão TKM. Após a homogeneização, foram adicionados 0,5 mL do tampão TKM contendo Triton X-100 a 2,5% e as amostras foram centrifugadas a 12,000 x g, por 4 min, a temperatura ambiente. O precipitado foi suspenso em 0,3 mL de tampão TKM contendo SDS (dodecil sulfato de sódio) a 0,75% e incubado a 55°C por 5 min. Após, foi adicionado 0,13 mL de NaCl 6,0 M e centrifugado a 12,000 x g por 5 min. O sobrenadante contendo o DNA foi precipitado usando 0,7 mL de etanol absoluto gelado e centrifugado a 12,000 x g por 5 min. O precipitado foi ressuspensão em 0,7 mL de etanol 70% gelado e centrifugado a 12,000 x g por 5 min. O precipitado foi secado e ressuspensão em 0,1 mL de água livre de DNase.

As concentrações e pureza do DNA das amostras foram determinadas por espectrofotometria (Nano espectrofotômetro BIO-5000-BI/Kasuaki; Laboratório Neuroquímica I/UFSC), utilizando as razões de densidade óptica de 260/280 e 260/230 \geq 1,8. A integridade e fragmentação do DNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 1,8% (Kasvi) utilizando um marcador de peso molecular de DNA (100 pb, Promega). A concentração de 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DNA de cada amostra foi adicionada nos poços do gel de agarose contendo GelRed (1:500, Biotium). Os géis foram visualizados e fotodocumentados utilizando o Fotodocumentador ChemiDoc MP (Bio-Rad; LAMEB/UFSC). Foram consideradas amostras com fragmentação de DNA quando as bandas de DNA com tamanhos de 180, 360, 540 e 720 pares de bases (pb) foram visualizadas no gel de agarose (ARUSCAVAGE; HELLWIG; BASS, 2010; MATASSOV *et al.*, 2004). O DNA íntegro e as bandas de interesse foram quantificadas e expressas por densidade óptica usando o programa ImageJ. Os dados foram apresentados pela média de densidade óptica \pm erro padrão da média (EPM).

3.11.2 Marcação pelo método de TUNEL

A avaliação da ocorrência e localização de células apoptóticas em secções sagitais das amostras de encéfalo, após a exposição ao HBG por 7 dias, foi realizada utilizando-se o kit *DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

Após o período de exposição, os encéfalos foram fixados em solução de Bouin, composta por uma mistura de 30 volumes de ácido pícrico, 10 volumes de formol a 40% e 2 volumes de ácido acético. Posteriormente ao período de 12 h de fixação, a solução de Bouin foi removida através de lavagens sucessivas em etanol a 70% por 4 a 6 h cada. O material depois de fixado e devidamente lavado foi conservado em etanol a 70%.

Para a inclusão em parafina, foi realizada a desidratação em série crescente de etanol (70% - 100%) por 1h em cada concentração e a diafanização em dois banhos de xilol puro, por 5 min cada, ou até que a peça estivesse translúcida. Após, foram realizados três banhos em parafina a 60°C de 1 h cada, sendo os encéfalos orientados para realização de secções sagitais (6,0 µm de espessura) em micrótomo rotativo Olympus CUT 2020A. As secções foram dispostas em lâminas histológicas preparadas com gelatina a 0,5%, de modo que cada lâmina fosse montada com secções dos grupos controle e tratados (0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L), destinadas as análises pelo método de TUNEL.

Para a realização do método de TUNEL, as secções foram desparafinizadas em xilol puro e re-hidratadas em série decrescente de etanol (100% - 70%). Para conservação do tecido, as secções foram embebidas em solução de NaCl a 0,85% por 5 min. A permeabilização das membranas celulares foi realizada através de um banho de 5 min de tampão fosfato salina (PBS) a 0,1 M, pH 7,4, e por um banho de 30 seg de proteinase K diluída em tampão Tris 10,0 mM, pH 8,0 (1:1000). Após, as secções foram imersas por 5 min em PBS e fixados em formaldeído a 4%. Para reação de equilíbrio, as secções foram banhadas em tampão de equilíbrio 5 min e incubadas com a enzima de marcação (*TdTreaction mix – Equilibrate Buffer Nucleotide Mix + rTdTEnzyme*) a 37°C em câmara úmida por 60 min, cobertos por parafilme. Para terminar a reação de marcação, foi utilizada uma solução de NaCl e citrato de sódio diluída em água ultrapura por 15 min, seguido de um banho em PBS 0,1 M, pH 7,4, por 5 min. As células apoptóticas foram identificadas pela fluorescência verde a 520 nm. Para cada concentração usada foram testados 3 peixes, sendo analisadas 4 secções de cada peixe. As micrografias foram obtidas no microscópio invertido Olympus IX83 e Digitalizador de lâminas AXIO SCAN (aumentos de 40 X e 25 X, respectivamente; LAMEB) das seguintes regiões neuroanômicas: telencéfalo, tectum optico, tálamo, hipotálamo, cerebelo, bulbo encefálico e medula espinhal. A localização e quantificação das células marcadas pela técnica de TUNEL foram realizadas através do método

estereológico utilizando-se a gráticula de Weibel (FREERE; WEIBEL, 1967).

3.11.3 Identificação de micronúcleos

A identificação de micronúcleos foi realizada em eritrócitos de peixe-zebra após exposição ao HBG por 15 dias.

Os micronúcleos se formam espontaneamente pela extrusão de cromossomos inteiros ou seus fragmentos durante a divisão celular, sendo que o aumento na sua frequência é usado para monitorar o potencial genotóxico de agentes tóxicos ambientais. O teste foi realizado pela contagem de eritrócitos com presença de micronúcleos de peixes previamente expostos de acordo com HOOFTMAN e RAAT (1982). Para tal, o sangue dos peixes foi coletado após a eutanásia e realizado o esfregaço deste em lâminas de vidro. Após secar por 12 h à temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em metanol por 10 min e em seguida coradas em Giemsa 5%, por 25 min. As lâminas foram lavadas em água destilada por 3 vezes e secadas à temperatura ambiente. A observação da frequência de micronúcleos nos eritrócitos foi realizada ao microscópio de luz Olympus CBA (100X), sendo analisadas 1.500 células por peixe (n = 6 peixes por grupo).

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

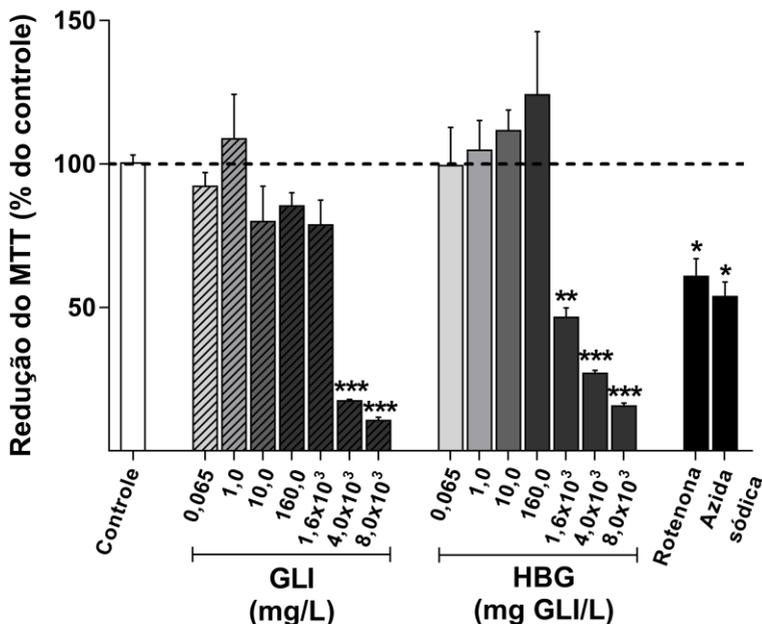
Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Dunnett's. O teste t de Student foi realizado quando apropriado. Diferenças entre os grupos foram considerados significativas quando $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistica® versão 13.0 para Windows. Os gráficos foram construídos utilizando-se o software GraphPad Prism 7®.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO *IN VITRO* AO GLI PURO E AO HBG SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

O teste *in vitro* foi realizado a fim de reconhecer os efeitos do GLI puro e HBG sobre a viabilidade celular no encéfalo de peixe-zebra. Assim, após 3 h de incubação com o GLI puro, a diminuição significativa da viabilidade celular ocorreu a partir da concentração de $4,0 \times 10^3$ mg/L (25,0 mM) ($F_{(16,85)} = 16,36$; $P = 0,0001$), enquanto a incubação com o HBG induziu a diminuição significativa a partir de $1,6 \times 10^3$ mg GLI/L (10,0 mM) ($P = 0,0027$). As concentrações de 0,065 mg GLI/L (0,38 μ M; $P = 0,99$ e $P = 0,99$); 1,0 mg GLI/L (6,0 μ M; $P = 0,99$ e $P = 0,99$); 10,0 mg GLI/L (60,0 μ M; $P = 0,67$ e $P = 0,98$) e 160,0 mg GLI/L (1,0 mM; $P = 0,92$ e $P = 0,47$) de GLI e de GLI contido no HBG não induziram a redução da viabilidade celular, respectivamente (Figura 8). A concentração de $1,6 \times 10^3$ mg/L de GLI também não induziu a redução da viabilidade celular ($P = 0,60$). O tratamento com o HBG apresentou um maior potencial citotóxico quando comparado ao GLI puro, uma vez que induziu a diminuição da viabilidade celular a partir da concentração de $1,6 \times 10^3$ mg GLI/L (10,0 mM).

Figura 8: Efeito do tratamento *in vitro* com diferentes concentrações de GLI puro e do HBG após 3 h de incubação sobre a viabilidade celular no encéfalo de peixe-zebra. Foram usados como controles positivos a rotenona 100,0 µM e a azida sódica 50,0 mM. Os resultados estão apresentados como porcentagens em relação ao controle. As barras representam a média ± EPM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados ao controle (n = 6 peixes por grupo).



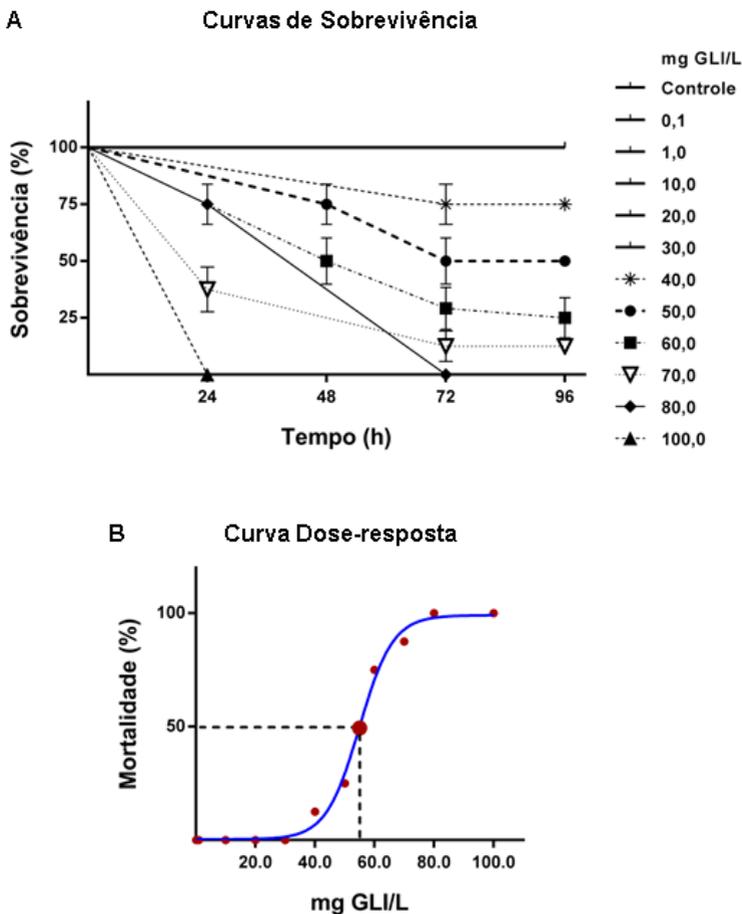
Uma vez que o tratamento com o HBG apresentou um maior potencial citotóxico, quando comparado ao tratamento com o GLI puro, e que apresenta maior relevância por ser usado no meio ambiente, este foi selecionado para os demais ensaios biológicos.

4.2 TOXICIDADE AGUDA DO HBG

As concentrações testadas < 30,0 mg GLI/L não causaram a morte dos peixes nos intervalos de tempo até 96 h. No entanto, a partir da concentração de 30,0 mg GLI/L os peixes apresentaram comportamento de hipolocomoção, mantendo-se no fundo do aquário durante a maior parte do tempo. As curvas de sobrevivência mostram que os peixes expostos às concentrações de 40,0 e 50,0 mg GLI/L

apresentaram a porcentagem de sobrevivência de 87,5% e 75,0%, respectivamente. Nas concentrações de 60,0 e 70,0 mg GLI/L, a porcentagem de sobrevivência obtida foi de 25,0% e 12,5%, respectivamente. A mortalidade de 100% dos peixes foi observada em duas situações, em 72 h na concentração de 80,0 mg GLI/L e em 24 h na concentração de 100,0 mg GLI/L. O teste Log-rank revelou que de um modo geral as curvas de sobrevivência são diferentes ($\chi^2 = 177,1$; $df = 1$; $p < 0,0001$), quando considerados as diferentes concentrações e tempos avaliados. Adicionalmente, analisando a curva dose-resposta, observa-se que o HBG induziu a mortalidade dos peixes-zebra de forma dose-dependente. A $CL_{50,96 \text{ h}}$ foi calculada em $53,75 (\pm 3,30)$ mg GLI/L (Figura 9).

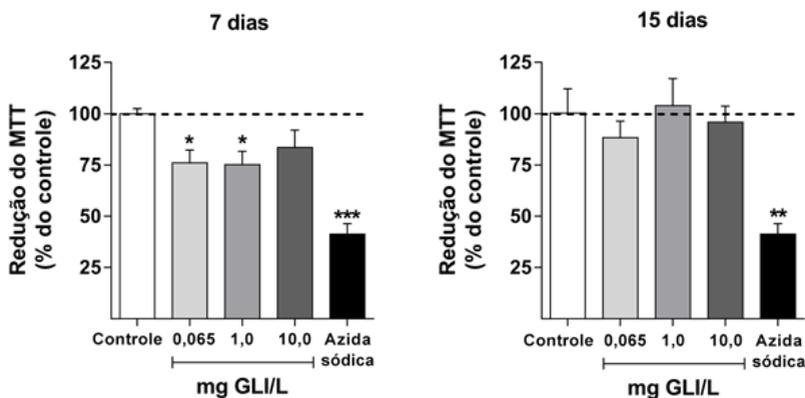
Figura 9: Curvas de sobrevivência e curva dose-resposta em peixes-zebra *Danio rerio* expostos ao HBG. (A) Os pontos na curva indicam a porcentagem média de sobrevivência nos intervalos de tempo de 24, 48, 72 e 96 h em cada concentração testada. (B) Os pontos na curva indicam a porcentagem média de mortalidade para cada concentração de GLI no HBG durante o teste de toxicidade aguda de 96 h, sendo que o ponto em destaque indica a $CL_{50,96\text{ h}}$ (n = 24 peixes por concentração).



4.3 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO *IN VIVO* AO HBG SOBRE A VIABILIDADE CELULAR APÓS 7 E 15 DIAS

Os peixes expostos às concentrações de 0,065 e 1,0 mg GLI/L por 7 dias apresentaram redução na viabilidade celular quando comparados ao controle [$F_{(4,35)} = 13,82$; $P = 0,04$ e $P = 0,03$, respectivamente] (Figura 10). O grupo exposto à concentração de 10,0 mg GLI/L, neste mesmo tempo, não apresentou diferença em relação ao controle ($P = 0,22$). Após o período de 15 dias de exposição, os grupos expostos ao HBG não apresentaram diferença significativa na viabilidade celular quando comparados ao controle [$F_{(4,35)} = 9,12$; 0,065 mg GLI/L ($P = 0,83$); 1,0 mg GLI/L ($P = 0,99$); 10,0 mg GLI/L ($P = 0,99$)]. O grupo controle positivo da técnica, tratado com azida sódica, apresentou diferença estatística em relação ao controle ($P = 0,002$). Estes resultados indicam que o HBG induziu alterações da viabilidade celular nas menores concentrações testadas somente após 7 dias de exposição.

Figura 10: Viabilidade celular no encéfalo de peixe-zebra após 7 e 15 dias de exposição às concentrações de 0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L. Os resultados estão apresentados como porcentagens do controle. As barras representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados ao grupo controle (n = 8 peixes por grupo).

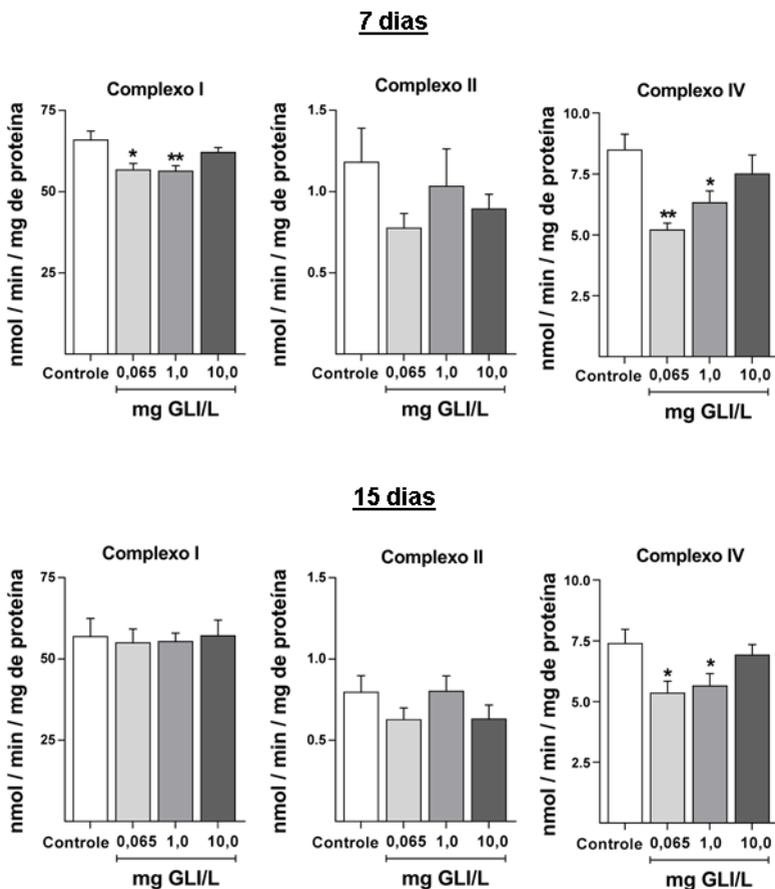


4.4 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HBG SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL APÓS 7 E 15 DIAS

Após 7 dias de exposição ao HBG, as concentrações de 0,065 e 1,0 mg GLI/L causaram a inibição significativa da atividade enzimática do complexo I [$F_{(3,44)} = 4,97$; $P = 0,01$ e $P = 0,009$, respectivamente] e do complexo IV [$F_{(3,44)} = 6,09$; $P = 0,001$ e $P = 0,04$, respectivamente]. Em relação à atividade enzimática do complexo II, não foram evidenciadas diferenças entre os grupos expostos ao HBG e controle [$F_{(3,44)} = 1,08$; $P = 0,38$] (Figura 11).

Quando avaliados os efeitos do HBG após 15 dias de exposição, não foram encontradas diferenças nas atividades dos complexos I [$F_{(3,44)} = 0,05$; $P = 0,98$] e II [$F_{(3,44)} = 1,22$; $P = 0,32$]. Inibição significativa da atividade enzimática do complexo IV foi observada nos grupos expostos às concentrações de 0,065 e 1,0 mg GLI/L [$F_{(3,44)} = 3,74$; $P = 0,01$ e $P = 0,04$, respectivamente]. Os resultados obtidos nestes experimentos indicam que os complexos I e IV da cadeia respiratória mitocondrial apresentaram maior inibição nos grupos expostos às menores concentrações de HBG testadas após o período de 7 dias de exposição, sendo que após o período de 15 dias, somente a inibição do complexo IV foi observada.

Figura 11: Atividade enzimática dos complexos I, II e IV da cadeia transportadora de elétrons após 7 e 15 dias de exposição ao HBG (0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L). As barras representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ comparados ao grupo controle (n = 12 amostras por grupo).



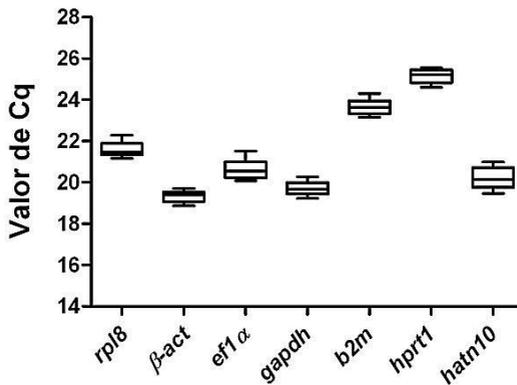
4.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA EXPRESSÃO DOS GENES DE REFERÊNCIA NO ENCÉFALO DE PEIXE-ZEBRA APÓS EXPOSIÇÃO AO HBG

Foram testados 6 genes de referência (*rpl8*, *β -act*, *ef1a*, *gapdh*, *b2m*, *hprt1*) e 1 elemento repetitivo (*hatn10*) por RT-qPCR, em

amostras de encéfalo de peixes-zebra após a exposição a diferentes concentrações de HBG (0,065; 0,65 e 6,5 mg GLI/L) por 7 dias.

Os valores de Cq foram usados para determinar o perfil de expressão dos genes de referência e do elemento repetitivo, os quais apresentaram valores entre 19,33 (β -act) e 25,16 (*hprt1*). A menor variação na expressão foi observada no gene β -act (desvio padrão (DP) = 0,26). Os genes com a expressão mais elevada, indicados pelos valores de Cq mais baixos, foram β -act (19,33) e *gapdh* (19,71) (Figura 12).

Figura 12: Perfil de expressão dos genes de referência e do elemento repetitivo no encéfalo de peixe-zebra após a exposição ao HBG. Os resultados estão apresentados como média \pm DP para cada gene [*rpl8* (21,61 \pm 0,35); β -act (19,33 \pm 0,26); *ef1 α* (20,63 \pm 0,48); *gapdh* (19,71 \pm 0,32); *b2m* (23,65 \pm 0,36); *hprt1* (25,16 \pm 0,34); *hatn10* (20,24 \pm 0,55)] (n = 3 amostras por grupo).



Na classificação final da estabilidade dos genes de referência e elemento repetitivo, de acordo com os métodos BestKeeper, Normfinder, Genorm e Delta CT, avaliados pela plataforma RefFinder, os genes mais estáveis foram *rpl8* e β -act (1^o e 2^o lugares), enquanto os menos estáveis foram *ef1 α* e *hprt1* (5^o e 6^o lugares). O elemento repetitivo foi avaliado como o alvo de referência menos estável para estudos de normalização (7^o lugar) (Quadro 4).

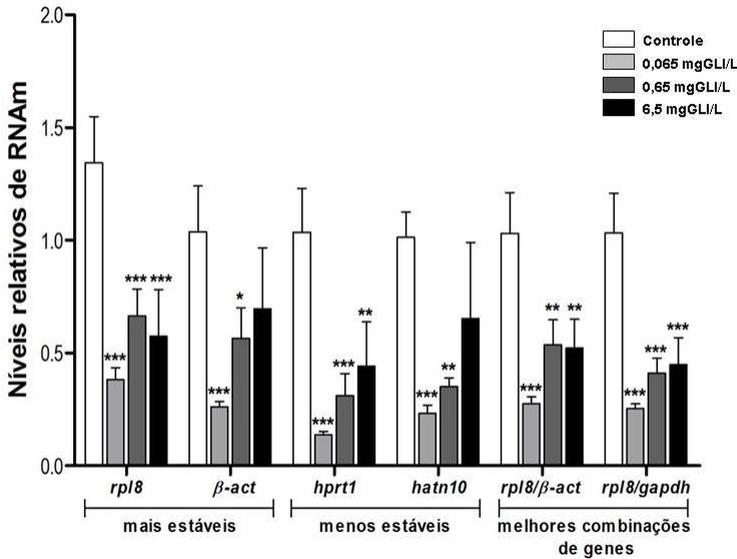
Quadro 4: Classificação final da estabilidade dos genes de referência e elemento repetitivo para análises por qPCR no encéfalo de peixe-zebra após exposição ao HBG (n = 3 amostras por grupo).

Classificação	Método				Classificação final
	BestKeeper	Normfinder	Genorm	Delta CT	
1	<i>β-act</i>	<i>rpl8</i>	<i>β-act</i> / <i>rpl8</i>	<i>rpl8</i>	<i>rpl8</i>
2	<i>gapdh</i>	<i>β-act</i>		<i>β-act</i>	<i>β-act</i>
3	<i>rpl8</i>	<i>gapdh</i>	<i>b2m</i>	<i>gapdh</i>	<i>gapdh</i>
4	<i>hpri1</i>	<i>b2m</i>	<i>gapdh</i>	<i>b2m</i>	<i>b2m</i>
5	<i>b2m</i>	<i>ef1a</i>	<i>ef1a</i>	<i>ef1a</i>	<i>ef1a</i>
6	<i>ef1a</i>	<i>hatn10</i>	<i>hatn10</i>	<i>hatn10</i>	<i>hpri1</i>
7	<i>hatn10</i>	<i>hpri1</i>	<i>hpri1</i>	<i>hpri1</i>	<i>hatn10</i>

Quando o gene de referência mais estável, *rpl8*, foi usado como normalizador (Figura 13), os níveis de transcritos do gene *cat* diminuíram em todos os grupos expostos ao HBG quando comparados ao grupo controle [$F_{(3,8)} = 17,25$; $P < 0,001$]; bem como quando utilizadas como normalizadores as melhores combinações de genes *rpl8* / *β-act* [$F_{(3,8)} = 16,07$; $P < 0,001$] e *rpl8* / *gapdh* [$F_{(3,8)} = 23,22$; $P < 0,001$]; e o gene menos estável *hpri1* [$F_{(3,8)} = 17,63$; $P < 0,001$]. Quando utilizados como normalizadores os genes *β-act* [$F_{(3,8)} = 7,78$; $P < 0,001$] e *hatn10* [$F_{(3,8)} = 9,41$; $P < 0,001$], o grupo exposto a maior concentração de HBG testada (6,5 mg GLI/L) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle.

Estes resultados indicam que os níveis de transcritos do gene *cat* foram similares em ambas às condições: usando o gene mais estável (*rpl8*), bem como as melhores combinações de genes (*rpl8* / *β-act* e *rpl8* / *gapdh*) como normalizadores no RT-qPCR. Além disso, estes resultados indicam que o HBG induziu diminuição dos níveis de transcritos do gene *cat* no encéfalo de peixe-zebra após 7 dias de exposição.

Figura 13: Níveis de transcritos do gene *cat* no encéfalo de peixe-zebra após exposição ao HBG. A variabilidade da expressão do gene *cat* é mostrada para cada gene de referência testado, usado como normalizador. Os dois primeiros grupos de barras mostram os dois genes de referência mais estáveis (*rpl8* e β -*act*); terceiro e quarto mostram os dois genes de referência menos estáveis (*ef1a* e *hprt1*); quinto e sexto mostram as duas melhores combinações de genes de referência, de acordo com a plataforma RefFinder. As barras representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparado ao grupo controle (n = 3 amostras por grupo).



O gene *rpl8* foi considerado o gene de referência mais estável nas amostras de encéfalo de peixe-zebra, e portanto, foi utilizado para normalizar os níveis de expressão dos genes *ndufa6*, *sdhc*, *cox1*, *nrf1* e *tfam*.

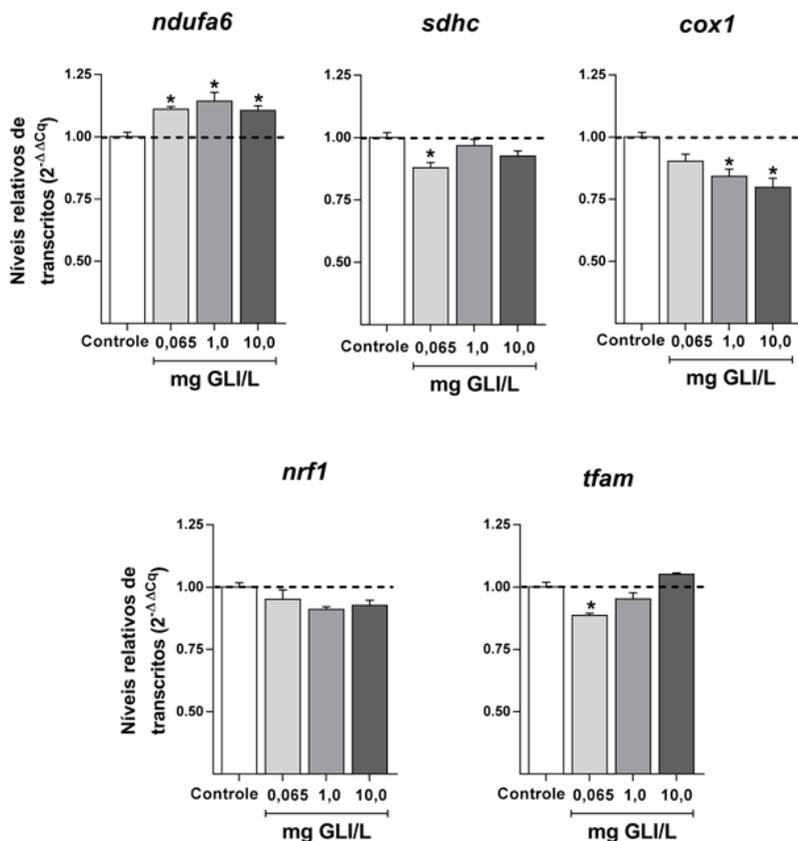
4.6 EFEITOS DO HBG SOBRE OS NÍVEIS DE TRANSCRITOS PARA AS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA CADEIA RESPIRATÓRIA MITOCONDRIAL E NA BIOGÊNESE MITOCONDRIAL

Uma vez que as atividades dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial foram mais afetados após 7 dias de exposição ao HBG no

encéfalo de peixe-zebra, este período foi escolhido para os ensaios de RT-qPCR. Os conteúdos de transcritos dos genes que codificam para as proteínas transferidoras de elétrons, *ndufa6*, *sdhc* e *cox1*, e para as proteínas envolvidas na biogênese mitocondrial, *tfam* e *nrf1*, estão apresentados na Figura 14.

O aumento significativo no conteúdo de RNAm de *ndufa6* foi observado em todas as concentrações testadas (0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L) quando comparadas ao controle [$F_{(3,8)} = 7,60$; $P = 0,02$, $P = 0,04$ e $P = 0,04$, respectivamente]. Quando analisado o conteúdo de transcritos para *sdhc* e *tfam*, observa-se a diminuição significativa nos níveis de transcritos somente no grupo exposto a concentração de 0,065 mg GLI/L em relação ao controle [*sdhc*: $F_{(3,8)} = 6,08$; $P = 0,04$; *tfam*: $F_{(3,8)} = 3,53$; $P = 0,01$]. Quando analisados os conteúdos de transcritos para *cox1*, observa-se a diminuição significativa nos grupos expostos as concentrações de 1,0 e 10,0 mg GLI/L comparados ao grupo controle [$F_{(3,8)} = 9,28$; $P = 0,04$ e $P = 0,03$, respectivamente]. Em relação ao conteúdo de transcritos do gene *nrf1*, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados e controle [$F_{(3,8)} = 1,11$; $P = 0,40$].

Figura 14: Níveis relativos de transcritos dos genes *ndufa6*, *sdhc*, *cox1*, *nrf1* e *tfam* no encéfalo de peixe-zebra após 7 dias de exposição ao HBG (0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L). Os resultados foram normalizados pela quantificação da expressão do gene de referência *rpl8*. As barras representam a média \pm EPM. *ndufa6*, *sdhc*, *cox1* e *tfam*: * $P < 0,05$ comparados ao grupo controle (n = 3 amostras por grupo).

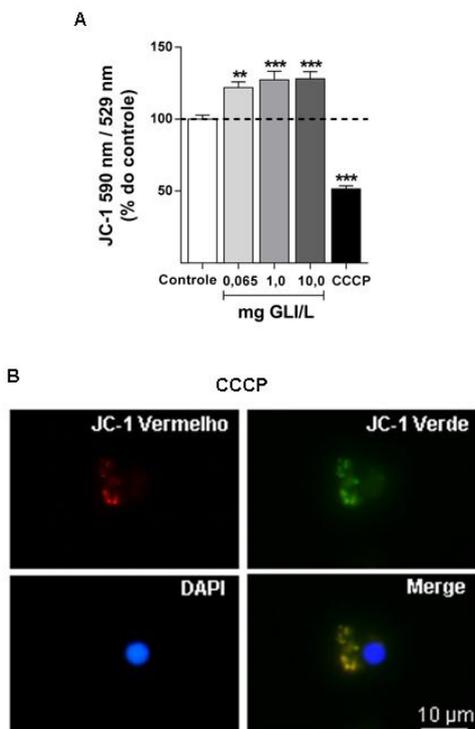


4.7 EFEITOS DO HBG SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\psi_m$)

O $\Delta\psi_m$, um aspecto importante da funcionalidade desta organela, foi avaliado quanto aos efeitos do HBG no encéfalo de peixe-zebra após 7 dias de exposição.

O aumento do $\Delta\psi_m$ foi observado no encéfalo de peixe-zebra em todas as concentrações testadas (0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L) comparado ao controle [$F_{(4,50)} = 51,03$; $P < 0,0001$], indicando que o HBG induziu a hiperpolarização da membrana mitocondrial (Figura 15A). Fotos representativas de uma célula do controle da reação tratada com o inibidor CCCP e marcada com a sonda JC-1 (Figura 15B), mostrando o aumento da intensidade de fluorescência verde, o que indica a despolarização da membrana mitocondrial.

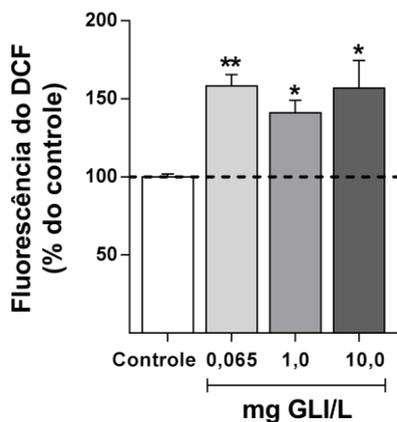
Figura 15: Efeitos do HBG sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) no encéfalo de peixe-zebra após 7 dias de exposição (A). O CCCP foi usado como controle da reação. Os resultados estão apresentados como porcentagens do controle. As barras representam a média \pm EPM. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados ao grupo controle (n = 10 - 12 peixes por grupo). (B) Fotografias de uma célula tratada com CCCP. No sentido horário da esquerda para a direita, J-agregados de fluorescência vermelha; monômero de fluorescência verde; a sobreposição e núcleo corado com DAPI de fluorescência azul.



4.8 EFEITOS DO HBG SOBRE A FORMAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS (ER)

Considerando os efeitos diversificados do HBG sobre as mitocôndrias, investigamos se estes efeitos estavam associados com alterações na formação de ER no encéfalo, após 7 dias de exposição. Nossos resultados mostraram que o HBG induziu o aumento do conteúdo de ER em todas as concentrações testadas (0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L) comparados ao controle [$F_{(3,16)} = 6,65$; $P < 0,01$] (Figura 16).

Figura 16: Efeitos do HBG sobre a formação de ER no encéfalo de peixe-zebra após 7 dias de exposição. Os resultados estão apresentados como porcentagens do controle. As barras representam a média \pm EPM. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados ao grupo controle (n = 10 peixes por grupo).



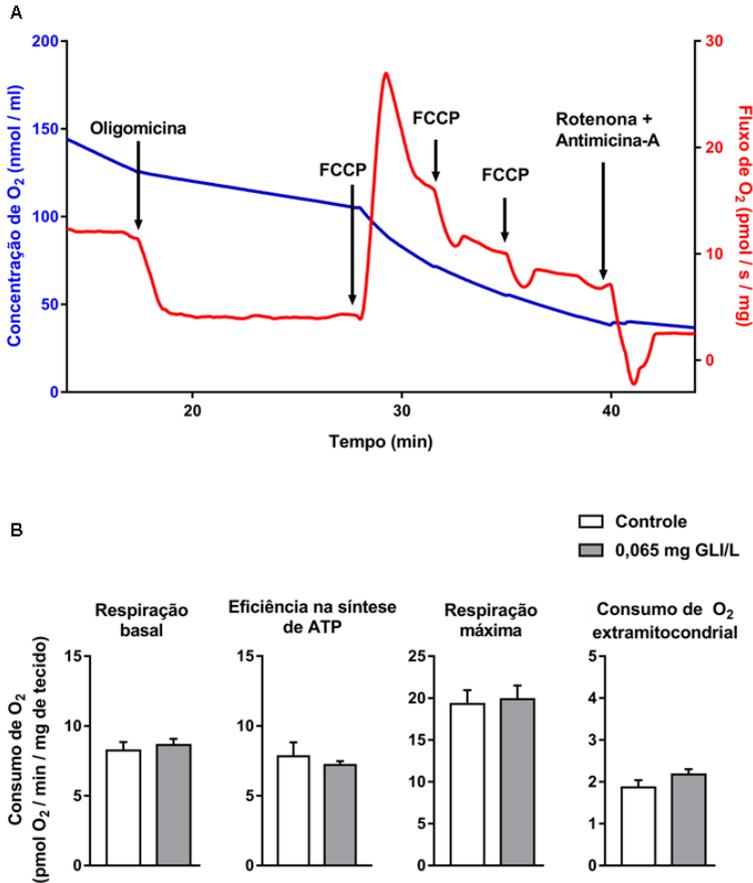
4.9 EFEITOS DO HBG SOBRE O CONSUMO DE OXIGÊNIO MITOCONDRIAL

O consumo de oxigênio mitocondrial foi avaliado após 7 dias de exposição a concentração de 0,065 mg GLI/L do HBG no encéfalo de peixe-zebra. Esta concentração foi selecionada para este teste, pois foi capaz de induzir efeitos em vários parâmetros avaliados neste trabalho. Além disso, é considerada a de maior relevância ambiental, uma vez que é permitida na água para o consumo humano e animal (Resolução CONAMA nº 357/2005).

A Figura 17A mostra uma corrida de respirometria em homogeneizados de encéfalo de peixe-zebra do grupo controle. Foram usados o inibidor oligomicina, seguido por 3 injeções sucessivas do desacoplador FCCP e, finalmente, os inibidores rotenona e antimicina-A.

Em relação ao consumo de oxigênio nos parâmetros avaliados da respiração basal [$t = 0,52$; $P = 0,30$], eficiência na síntese de ATP [$t = 0,61$; $P = 0,27$], respiração máxima [$t = 0,26$; $P = 0,39$] e consumo de oxigênio extramitocondrial ou residual [$t = 0,24$; $P = 0,40$], não foram encontradas diferenças entre os grupos 0,065 mg GLI/L e controle, quando realizado o teste t de Student (Figura 17B).

Figura 17: Consumo de oxigênio mitocondrial em homogeneizado de encéfalo de peixe-zebra após 7 dias de exposição a concentração de 0,065 mg GLI/L. (A) Corrida de respirometria de alta resolução em homogeneizados do encéfalo de peixe-zebra do grupo controle para avaliar a resposta mitocondrial frente aos inibidores (oligomicina, rotenona e antimicina-A) e ao desacoplador FCCP (cianeto trifluoro-metoxi fenilhidrazona). (B) A respiração basal, eficiência na síntese de ATP, respiração máxima e consumo de oxigênio extramitocondrial estão apresentados pela média \pm EPM (n = 7 amostras por grupo).



4.10 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HBG SOBRE A INTEGRIDADE DO DNA

Após os ensaios realizados quanto aos parâmetros mitocondriais, avaliamos se as alterações encontradas como diminuição da viabilidade

celular, alterações na atividade e níveis de transcritos dos complexos mitocondriais, hiperpolarização da membrana mitocondrial, e especialmente, aumento na formação de ER, levaram ao aumento da ocorrência de morte celular, mesmo que tais alterações não tenham impactado o consumo de oxigênio mitocondrial no grupo exposto a menor concentração testada (0,065 mg GLI/L).

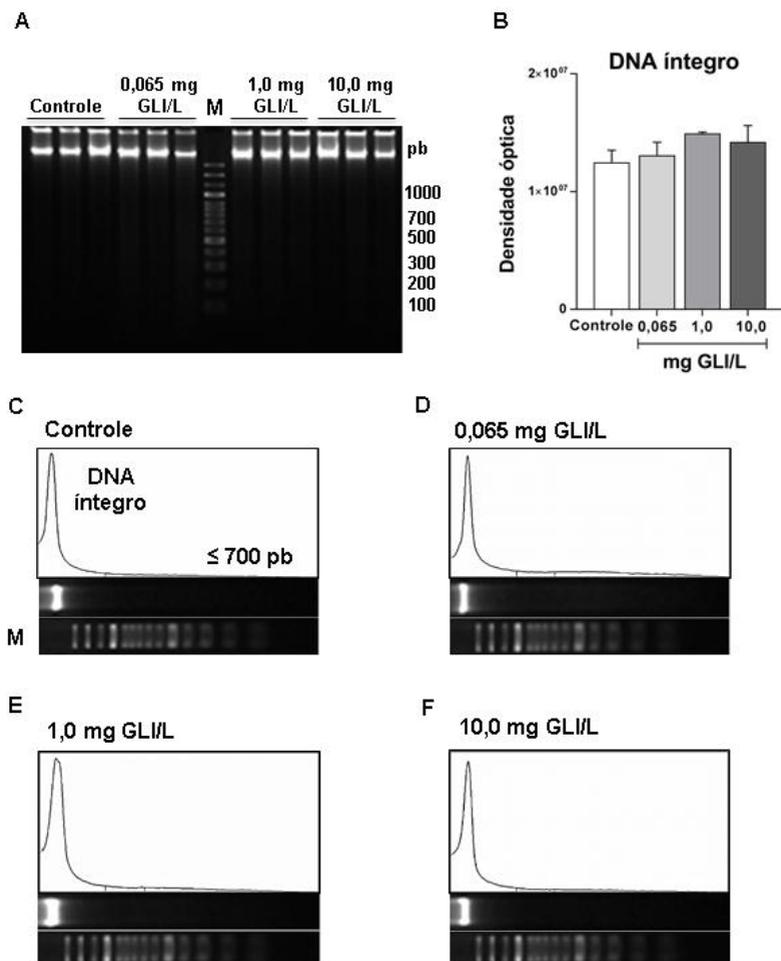
Para isso, avaliamos a integridade do DNA, pois sua perda é um forte indicativo de morte celular (apoptótica ou necrótica), através do teste de fragmentação do DNA, após 7 e 15 dias de exposição ao HBG (0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L), no encéfalo. Também foi analisada a integridade do DNA nas brânquias nos mesmos grupos experimentais, as quais foram consideradas controle positivo da exposição, uma vez que o tecido branquial está diretamente exposto ao HBG diluído na água.

4.10.1 Efeitos da exposição ao HBG sobre o DNA de amostras de encéfalo

Em todos os tratamentos realizados não foi observada a fragmentação do DNA no gel de agarose das amostras de encéfalo após 7 dias de exposição (Figura 18A). As quantificações expressas por densidade óptica do DNA íntegro não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos tratados e controle [$F_{(3,20)} = 1,51$; $P = 0,28$] (Figura 18B). Do mesmo modo, os mapas de densitometria não revelaram diferenças aparentes no padrão de fragmentação do DNA (Figura 18C-F).

Estes resultados indicam que o HBG não alterou a integridade do DNA no encéfalo de peixe-zebra dos grupos expostos, após 7 dias de exposição.

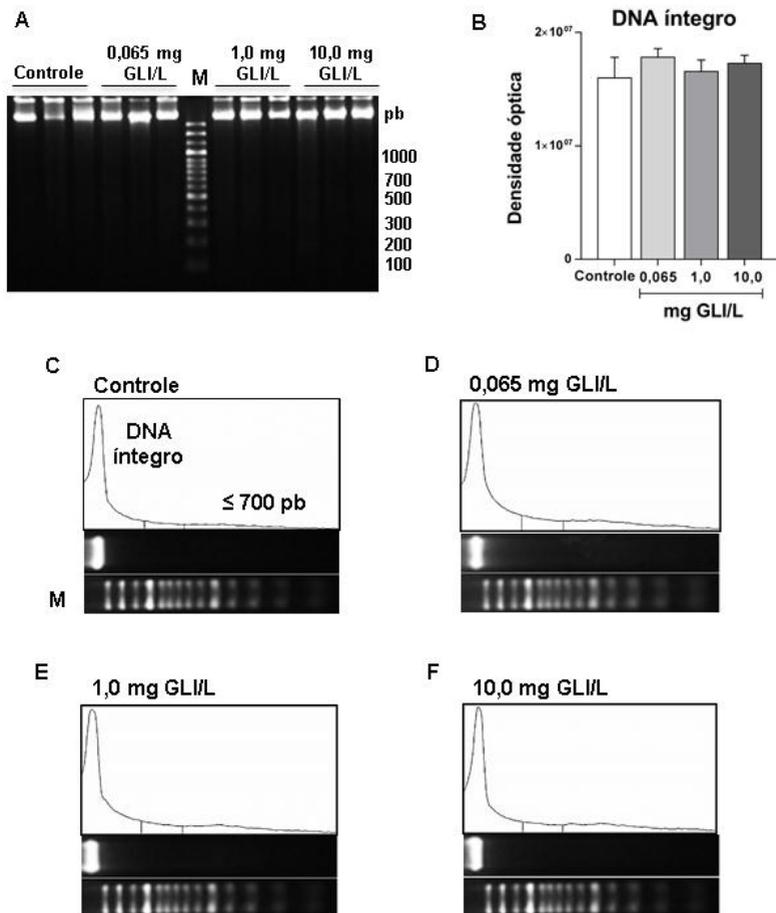
Figura 18: Teste de Fragmentação do DNA do encéfalo de peixe-zebra após 7 dias de exposição às concentrações de 0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L. (A) Eletroforese em gel de agarose. (B) Análise quantitativa da intensidade total de pixels do DNA íntegro expressa em densidade óptica. (C-F) Mapas de densidade óptica representativos para cada grupo, obtidos pela análise do programa ImageJ, e suas respectivas áreas: DNA íntegro e fragmentos ≤ 700 pb. Os dados representam a média da intensidade óptica \pm EPM (n = 6 peixes por grupo).



Como não foram evidenciadas bandas de fragmentação do DNA após 7 dias de exposição ao HBG, também investigamos se um período maior de exposição (15 dias) ao HBG poderia induzir ao aumento da fragmentação do DNA no encéfalo de peixe-zebra.

No entanto, após 15 dias de exposição ao HBG não foi observada fragmentação do DNA em todos os grupos analisados (Figura 19A). As análises estatísticas das quantificações expressas por densidade óptica do DNA íntegro não apresentaram diferenças entre os grupos tratados e controle (Figura 19B) [$F_{(3,20)} = 0,31$; $P = 0,81$]. Além disso, não foram observadas diferenças nos padrões dos mapas de densitometria [(1) DNA íntegro e (2) fragmentos de DNA ≤ 700 pb] entre os grupos avaliados (Figuras 19C-F).

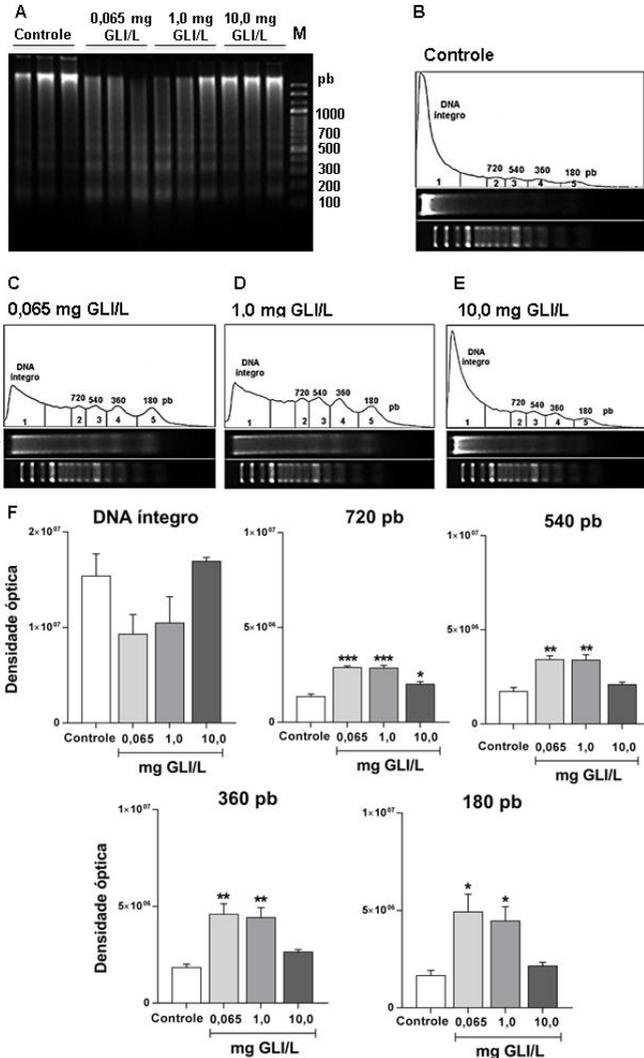
Figura 19: Teste de Fragmentação do DNA do encéfalo de peixe-zebra após 15 dias de exposição ao HBG (0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L). (A) Eletroforese em gel de agarose. (B) Análise quantitativa da intensidade total de pixels do DNA íntegro expressa em densidade óptica. (C-F) Mapas de densidade óptica representativos para cada grupo, obtidos pela análise do programa ImageJ, e suas respectivas áreas: DNA íntegro; fragmentos de DNA ≤ 700 pb. Os dados representam a média da intensidade óptica \pm EPM (n = 6 peixes por grupo).



4.10.2 Efeitos da exposição ao HBG sobre o DNA das brânquias

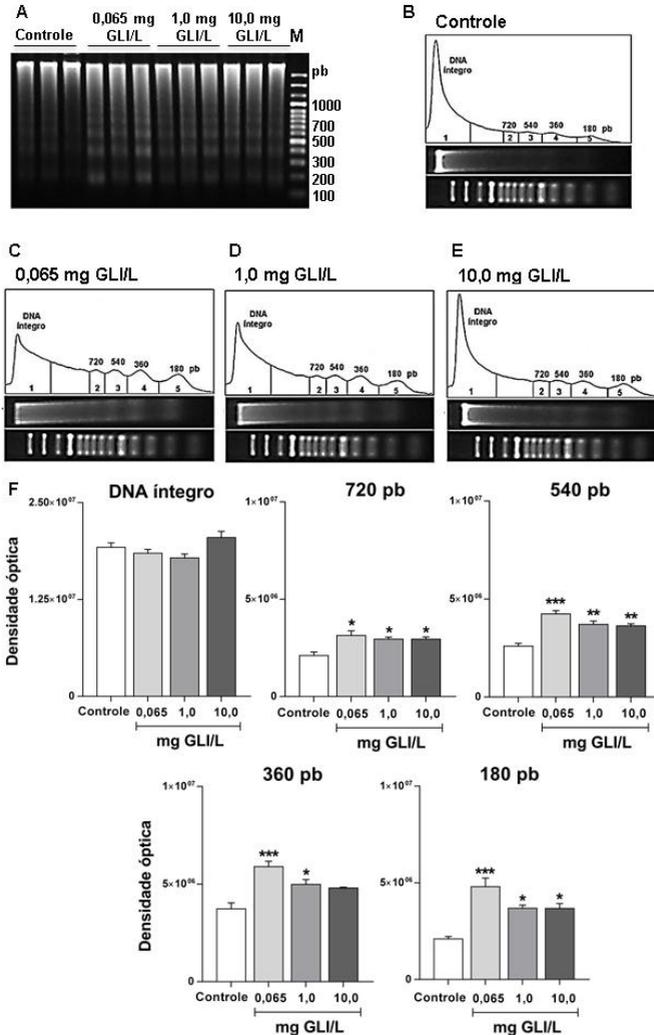
Após 7 dias de exposição ao HBG, foi observada a fragmentação do DNA, principalmente nos grupos expostos às menores concentrações (0,065 e 1,0 mg GLI/L) em comparação ao grupo controle (Figura 20A). Quando analisados os mapas (Figura 20B-E) e as quantificações por densidade óptica (Figura 20F) observa-se um aumento da fragmentação do DNA nos grupos expostos às menores concentrações em comparação ao grupo controle. Os grupos controle e 10,0 mg GLI/L (Figura 20B e E), não apresentaram diferença aparente no perfil de densidade óptica da fragmentação do DNA. Quando quantificadas e analisadas estatisticamente as densidades ópticas do DNA íntegro, não foram encontradas diferenças entre os grupos tratados e controle [$F_{(3,20)} = 3,19$; $P = 0,08$] (Figura 20F). Todos os grupos tratados apresentaram diferenças significativas em relação ao controle quando quantificadas as densidades ópticas dos fragmentos de DNA com 720 pb, indicando uma maior quantidade de DNA fragmentado nestes grupos [$F_{(3,20)} = 30,92$; $P < 0,0001$]. Quando quantificadas as densidades ópticas dos fragmentos de DNA com 540, 360 e 180 pb, nota-se um mesmo padrão de resultados, em que as menores concentrações testadas apresentaram um aumento significativo de fragmentação do DNA em relação ao grupo controle [(540 pb: $F_{(3,20)} = 16,24$; $P = 0,0009$); (360 pb: $F_{(3,20)} = 11,70$; $P = 0,002$); (180 pb: $F_{(3,20)} = 7,24$; $P = 0,01$)]. Estes resultados indicam um maior efeito do HBG sobre o DNA das brânquias nos grupos expostos às menores concentrações testadas após 7 dias de exposição.

Figura 20: Fragmentação do DNA das brânquias de peixe-zebra após 7 dias de exposição ao HBG (0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L). (A) Eletroforese em gel de agarose. DNA fragmentado disposto nas bandas entre 700 a 100 pb. (B-E) Mapas de densidade óptica representativos para cada grupo, e suas respectivas áreas [(1) DNA íntegro; (2) Fragmentos de DNA com 720 pb; (3) 540 pb; (4) 360 pb; (5) 180 pb]. (F) Análises quantitativas das densidades ópticas. Os dados representam a média da intensidade óptica \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparados ao grupo controle (n = 6 peixes por grupo).



Após 15 dias, observa-se a fragmentação do DNA das brânquias em todos os grupos expostos ao HBG (0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L) em relação ao grupo controle (Figura 21A). Os grupos expostos às menores concentrações (Figura 21C e D) apresentaram semelhança aparente com a ocorrência de picos menores de DNA íntegro e maiores de DNA fragmentado, quando comparados ao controle. Quando observados os picos de DNA íntegro, o padrão observado no mapa representativo do grupo de 10,0 mg GLI/L não apresentou diferença em relação ao controle. Porém, em relação aos picos de DNA fragmentado, foram evidenciadas diferenças em relação ao controle (Figura 21B e E). Quando quantificadas as bandas de DNA íntegro, não foi observada diferença entre os grupos expostos ao HBG em relação ao controle [$F_{(3,20)} = 3,46$; $P = 0,07$] (Figura 21F). Quando quantificadas as bandas de fragmentos de DNA com 720, 540, 360 e 180 pb observa-se um mesmo padrão de aumento de densidade óptica nos grupos expostos ao HBG em relação ao grupo controle [(720 pb: $F_{(3,20)} = 7,22$; $P = 0,01$); (540 pb: $F_{(3,20)} = 20,09$; $P = 0,0004$); (360 pb: $F_{(3,20)} = 13,60$; $P = 0,001$); (180 pb: $F_{(3,20)} = 16,19$; $P = 0,0009$)]. Estes resultados indicam que o HBG induziu a um aumento na quantidade de DNA fragmentado nas brânquias em todos os grupos avaliados, após 15 dias de exposição.

Figura 21: Fragmentação do DNA das brânquias de peixe-zebra após 15 dias de exposição ao HBG (0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L). (A) Eletroforese em gel de agarose. (B-E) Mapas de densidade óptica representativos para cada grupo, obtidos pela análise do programa ImageJ, e suas respectivas áreas [(1) DNA íntegro; (2) fragmentos de DNA com 720 pb; (3) 540 pb; (4) 360 pb; (5) 180 pb]. (F) Análises quantitativas das densidades ópticas. Os dados representam a média da intensidade óptica \pm EPM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados ao grupo controle (n = 6 peixes por grupo).

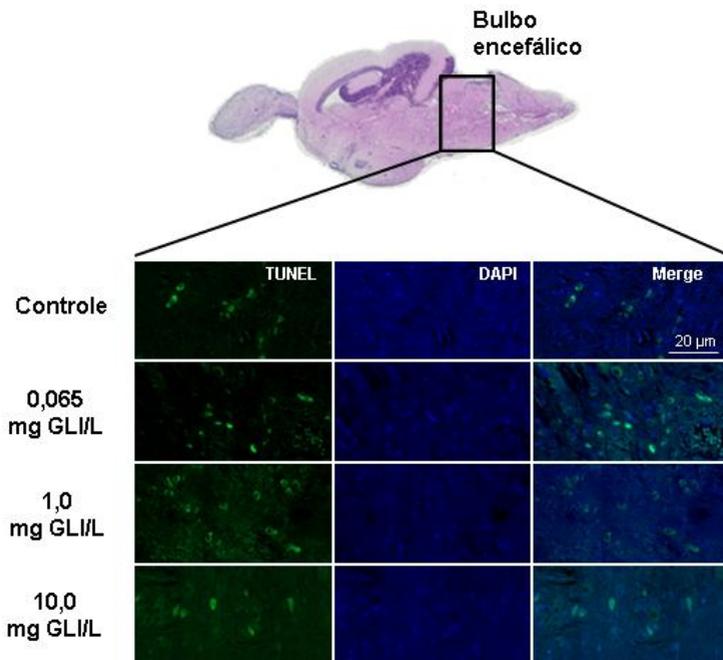


4.11 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HBG SOBRE A MORTE CELULAR NO ENCÉFALO

Foram analisadas as regiões neuroanatômicas do telencéfalo, tectum optico, tálamo, hipotálamo, cerebelo, bulbo encefálico e medula espinhal em secções sagitais de encéfalos de peixe-zebra após 7 dias de exposição ao HBG.

Em relação à localização, a região neuroanatômica do bulbo encefálico foi a que apresentou maior ocorrência de marcação fluorescente de TUNEL (Figura 22), mas sem diferenças significativas em relação às outras regiões analisadas. Em relação à quantificação, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados (0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L) e controle, em cada região avaliada.

Figura 22: Marcação de TUNEL fluorescente de células apoptóticas na região do bulbo encefálico de peixe-zebra após 7 dias de exposição ao HBG (0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L). Vista sagital do bulbo encefálico dos grupos controle e tratados (n = 3 peixes por grupo, sendo analisadas 4 secções de cada peixe).

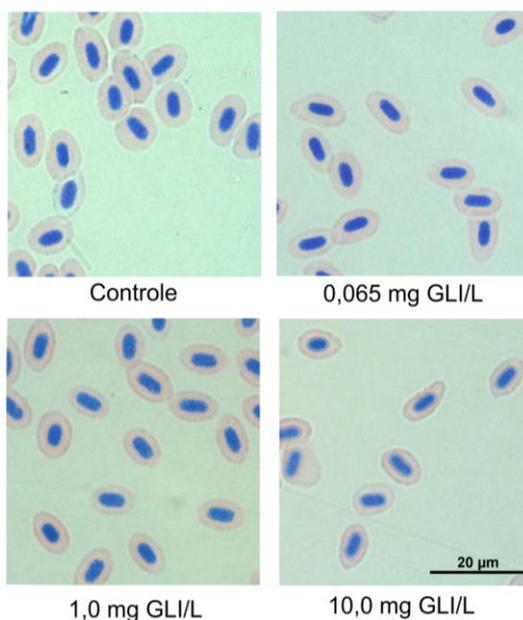


4.12 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO HBG SOBRE A OCORRÊNCIA DE MICRONÚCLEOS NOS ERITRÓCITOS DE PEIXE-ZEBRA

Para identificar a ocorrência de danos ao DNA nos eritrócitos de peixe-zebra expostos ao HBG, foi avaliada a presença de micronúcleos após 15 dias de exposição.

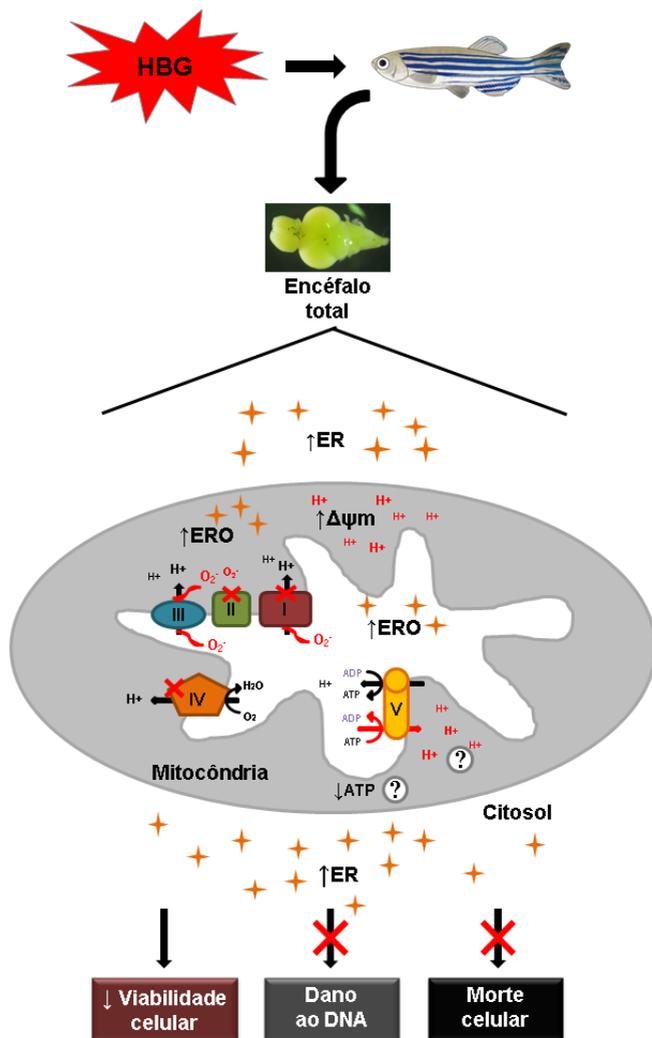
A análise da identificação e frequência de micronúcleos mostrou que o HBG não induziu a esse tipo de dano ao DNA em eritrócitos de peixes-zebra expostos as concentrações de 0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L, quando comparados ao grupo controle (Figura 23).

Figura 23: Eritrócitos de peixe-zebra após 15 dias de exposição ao HBG (0,065; 1,0 e 10,0 mg GLI/L) (n = 6 peixes por grupo).



A Figura 24 representa o resumo gráfico dos principais resultados obtidos na presente tese.

Figura 24: Efeitos do HBG sobre as mitocôndrias nas células do encéfalo de peixe-zebra. O HBG induziu a inibição parcial dos complexos I, II e IV da cadeia transportadora de elétrons (CTE), sendo que estas alterações estavam associadas à hiperpolarização do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e ao aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), avaliadas através da quantidade total de espécies reativas celulares (ER). O HBG induziu a diminuição da viabilidade celular, porém não induziu ao dano do DNA e a morte celular no encéfalo de peixe-zebra.



5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho doutoral demonstraram que a exposição a concentrações ambientalmente relevantes de HBG provocaram alterações mitocondriais, diminuição da viabilidade celular, assim como aumento de ER nas células do encéfalo de peixe-zebra, podendo estas alterações predispor ao desenvolvimento da neurotoxicidade.

Em relação às hipóteses estabelecidas neste trabalho e considerando os rigores metodológicos adotados, a hipótese de que o HBG induz neurotoxicidade através (i) da indução de danos mitocondriais, relacionados aos complexos da CTE, foi aceita, uma vez que evidenciamos alterações na atividade e níveis de transcritos, principalmente dos complexos I e IV da CTE, no encéfalo de peixe-zebra. Em relação ao $\Delta\psi_m$, rejeitamos a hipótese de que o HBG induz a (ii) diminuição do $\Delta\psi_m$, uma vez que nossos resultados mostraram que este herbicida induziu a hiperpolarização do $\Delta\psi_m$. Também rejeitamos a hipótese de que (iii) o HBG induz apoptose, pois através das técnicas usadas neste trabalho, não foram evidenciados dano ao DNA, bem como a ocorrência de morte celular programada por apoptose, no encéfalo de peixe-zebra.

O teste de toxicidade aguda é a primeira abordagem para avaliar o grau tóxico e a segurança ambiental de substâncias químicas (RAND *et al.*, 1995). O peixe-zebra *D. rerio*, um modelo amplamente utilizado na área da toxicologia, vem sendo usado na avaliação da toxicidade de HBG, em diferentes parâmetros biológicos (SANDRINI *et al.*, 2013; UREN WEBSTER *et al.*, 2014; VELASQUES; SANDRINI; DA ROSA, 2016). Contudo, não há dados disponíveis sobre a toxicidade aguda deste herbicida nesta espécie. Sendo assim, este estudo provê os primeiros dados sobre a $CL_{50,96\ h}$ para peixe-zebra adulto a qual foi determinada em 53,75 (\pm 3,30) mg GLI/L do HBG. Valores semelhantes foram encontrados para $CL_{50,96\ h}$ em truta (*Salmo gairdneri*), tanto em condições de laboratório como em condições ambientais, 54,8 e 52,0 mg/L de HBG, respectivamente (HILDEBRAND; SULLIVAN; SULLIVAN, 1982). Não há na literatura parâmetros de classificação de toxicidade que permitam avaliar se a concentração encontrada neste trabalho está ou não dentro dos limites de toxicidade para peixes. Deste modo, os dados obtidos poderão contribuir no futuro para o estabelecimento de tais parâmetros.

Geralmente, diferenças no estágio de vida do peixe, tamanho do corpo, parâmetros físico-químicos da água, taxa de absorção e mecanismos de detoxificação entre espécies, bem como as diferenças na composição das formulações testadas podem criar diferenças nas CL₅₀ obtidas a partir de testes de toxicidade aguda (BUCHER; HOFER, 1993; RAND *et al.*, 1995; SAHA *et al.*, 1999; TSUI; CHU, 2003). Em relação às formulações testadas, estas diferenças dependem da quantidade de princípio ativo, assim como de compostos adjuvantes ditos “inertes”.

No caso dos HBG, dentre os compostos inertes estão os surfactantes que têm sido descritos como tóxicos para peixes (FOLMAR; SANDERS; JULIN, 1979; GIESY; DOBSON; SOLOMON, 2000; HOWE *et al.*, 2004). Além disso, a toxicidade induzida pelas formulações pode ser atribuída ao efeito sinérgico do GLI e dos compostos inertes contidos nas formulações (FRONTERA *et al.*, 2011; PEIXOTO, 2005), sendo que tais efeitos não são previstos em testes de toxicidade com componentes isolados.

Neste contexto, avaliamos os efeitos do HBG e do GLI puro *in vitro* em amostras de encéfalo de peixe-zebra quanto à viabilidade celular. No encéfalo *in vitro*, o HBG apresentou uma maior toxicidade do que o GLI puro. Além disso, mostramos que as concentrações mais baixas usadas no ensaio *in vitro* (0,065 e 1,0 mg GLI/L) com o HBG, após 3 h de incubação, não alteraram a viabilidade celular, porém estas concentrações após 7 dias de exposição *in vivo*, induziram a diminuição da viabilidade celular.

De um modo geral, a exposição à HBG em peixes induz efeitos tóxicos em órgãos como as brânquias e o fígado (BRAZ-MOTA *et al.*, 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2015; TOPAL *et al.*, 2015). As brânquias são o principal órgão multifuncional e vital do peixe em contato direto com o meio aquático (JIRAUNGKOORSKUL *et al.*, 2003) e suas mudanças podem ser úteis para avaliar os efeitos da contaminação por toxicantes. Isto acontece porque este órgão é o principal local de entrada para compostos tóxicos dissolvidos na água devido a sua grande área superficial em contato com o ambiente externo (PERRY; LAURENT, 1993). Sendo assim, alterações morfofuncionais nas brânquias podem reduzir a eficiência das trocas gasosas e causar comprometimento respiratório, levando a hipóxia e a efeitos sobre outros órgãos, assim como efeitos sistêmicos (ROCHA *et al.*, 2015).

Em nosso estudo, as alterações induzidas pelo HBG sobre as células do SNC após 7 dias de exposição *in vivo* podem ser secundárias a alterações sistêmicas, sendo que o contato direto deste composto com

as células *in vitro*, nas mesmas concentrações, não promoveu a diminuição da viabilidade celular após 3 h de incubação. Nestas concentrações foram evidenciadas alterações na integridade do DNA das brânquias, após 7 e 15 dias de exposição ao HBG, comprovando os efeitos deste herbicida sobre este órgão no modelo usado. A exposição sistêmica e prolongada *in vivo* pode ter induzido efeitos citotóxicos não observados *in vitro* com HBG, assim como pode ter permitido que respostas de equilíbrio pro-viabilidade tenham sido estimuladas na maior concentração testada (10,0 mg GLI/L) após 7 dias de exposição, assim como após o período de 15 dias de exposição em todas as concentrações testadas nos testes de viabilidade celular no encéfalo.

O metabolismo do MTT é utilizado para a avaliação da atividade das desidrogenases mitocondriais e sua inibição pode indicar alterações na atividade mitocondrial (SOOD *et al.*, 2015). Desta forma, a diminuição significativa da redução do MTT, como observado no ensaio *in vivo*, indica que a exposição ao HBG alterou a atividade mitocondrial em encéfalo de peixe-zebra nos grupos expostos às menores concentrações após 7 dias. Além disso, considerando que alguns agrotóxicos exercem seus efeitos tóxicos através de interações com proteínas constituintes dos complexos mitocondriais por alterar suas atividades (KOOPMAN *et al.*, 2013; NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012; RUGARLI; LANGER, 2012), avaliamos a atividade e níveis de transcritos para algumas enzimas chave dos complexos da CTE, em nosso modelo. Nosso estudo mostrou que o HBG induziu alterações na atividade dos complexos I e IV da CTE, assim como dos níveis de transcritos para as enzimas constituintes dos complexos I, II e IV em encéfalo de peixe-zebra, principalmente dos grupos expostos às menores concentrações. Estas alterações mitocondriais podem estar relacionadas com o comprometimento da viabilidade celular no SNC, também verificada nos grupos expostos às menores concentrações *in vivo*.

Um estudo pioneiro conduzido por OLORUNSOGO; BABABUNMI; BASSIR (1979), enfocando os efeitos do GLI sobre a mitocôndria, mostrou que este composto pode desacoplar a fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas de fígado de rato *in vivo*, embora em doses muito elevadas. Alterações na respiração mitocondrial foram observadas também em mitocôndrias isoladas de fígado de rato *in vitro* incubadas com HBG (PEIXOTO, 2005), indicando que estes compostos podem induzir a toxicidade através de alterações na função mitocondrial.

Alterações nos níveis de transcritos dos genes envolvidos no metabolismo mitocondrial foram verificadas em análise do transcriptoma de fígado e rins de ratos tratados cronicamente com concentrações muito baixas de HBG (50,0 ng GLI/L) (MESNAGE *et al.*, 2015). Os níveis de transcritos de 7 genes que codificam subunidades do complexo I (NADH desidrogenase) apresentaram alterações, sendo que 6 estavam inibidos. Além destes, também foi verificada inibição dos níveis de transcritos de genes relacionados ao complexo II (succinato desidrogenase - *sdhc*) e do gene *tfam* (MESNAGE *et al.*, 2015), assim como observado em nosso estudo, principalmente nos grupos expostos às menores concentrações testadas. UGARTE (2014) sugere que o GLI poderia inibir o complexo II da CTE através da interação com o sítio de ligação do substrato da succinato desidrogenase mitocondrial. Embora alguns poucos estudos tenham apontado a mitocôndria como um possível alvo da toxicidade de HBG e do GLI puro, mostramos aqui, pela primeira vez, alterações na atividade dos complexos mitocondriais induzidas pelo HBG no SNC.

A integridade funcional da CTE é requerida para manter o $\Delta\psi_m$, sendo este, por sua vez, necessário para sustentar a produção de ATP, além de ter crucial importância para outras funções como a fusão mitocondrial, importação de proteínas, troca de metabólitos com o citosol e indução de apoptose (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012; RUGARLI; LANGER, 2012). Neste sentido, $\Delta\psi_m$ pode ser considerado um importante parâmetro funcional mitocondrial (FORKINK *et al.*, 2014). Inibições da CTE induzidas por toxicantes reduzem o efluxo de prótons através da MMI e estão geralmente associados à despolarização do $\Delta\psi_m$ (KOOPTMAN *et al.*, 2010). Contudo, condições de inibição parcial do complexo I têm sido ligadas a hiperpolarização do $\Delta\psi_m$ (BARRIENTOS; MORAES, 1999; FORKINK *et al.*, 2014). Demonstramos neste trabalho que a exposição ao HBG por 7 dias induziu a hiperpolarização da $\Delta\psi_m$ no encéfalo de peixe-zebra. A partir destes dados sugerimos que a diminuição da atividade e dos níveis de transcritos dos complexos da CTE, pode ter induzido a hiperpolarização do $\Delta\psi_m$.

A hiperpolarização do $\Delta\psi_m$ foi observada em neurônios, células gliais e células tronco indiferenciadas com uma disfunção genética do complexo I (ABRAMOV *et al.*, 2010), assim como em fibroblastos com uma mutação na subunidade NDUFS4 do complexo I (VALSECCHI *et al.*, 2012). O $\Delta\psi_m$ em neurônios com deficiência do complexo I parece ser sustentado pela ação de modo reverso do complexo V

(JONCKHEERE; SMEITINK; RODENBURG, 2012), que ocorre quando este complexo hidrolisa ATP e expulsa prótons da matriz mitocondrial através da MMI, sustentando assim o $\Delta\psi_m$. A diminuição dos níveis de ATP pode ser um indicativo de que a hiperpolarização do $\Delta\psi_m$ possa estar sendo mantida pela ação de modo reverso do complexo V em nosso estudo. Dados complementares em relação aos níveis de ATP poderiam elucidar esta hipótese, sobretudo investigar os efeitos do HBG sobre o complexo V.

A correlação entre os níveis de inibição do complexo I mostra que inibições parciais podem induzir a hiperpolarização, enquanto grandes inibições estão associadas com despolarização do $\Delta\psi_m$, aumentos na produção de ER e apoptose (ABRAMOV *et al.*, 2010; BARRIENTOS; MORAES, 1999; ESTERAS *et al.*, 2017; FORKINK *et al.*, 2014). Neste contexto, a mitocôndria é uma organela essencial na produção de ATP, o qual é primordial para a excitabilidade e sobrevivência dos neurônios, e alterações no processo de redução do oxigênio e síntese de ATP irá favorecer a formação de ERO. A fim de complementar nosso estudo sobre os efeitos do HBG no encéfalo de peixe-zebra, investigamos a formação de ER usando a sonda DCFDA, a qual é frequentemente usada para determinar os efeitos oxidantes de insultos celulares. Esta técnica é fácil e extremamente sensível para a detecção de alterações do estado oxidativo celular (ERUSLANOV; KUSMARTSEV, 2010), sendo usada para medir as concentrações totais de H_2O_2 , ânion superóxido, como também óxido nítrico (RAO *et al.*, 1992; DAGHASTANLI *et al.*, 2008). Assim, através deste ensaio, consideramos a acumulação de fluorescência proporcional à quantidade total de produtos de ER nas células. Nossos resultados mostraram que o HBG provocou um aumento da formação de ER no encéfalo em todas as concentrações testadas. O estresse oxidativo e respostas antioxidantes compensatórias promovidos pela exposição ao HBG no SNC, fígado, rins e músculos têm sido descritas em peixes (LUSHCHAK *et al.*, 2009; SINHORIN *et al.*, 2014; VELASQUES; SANDRINI; DA ROSA, 2016; UREN WEBSTER; SANTOS, 2015). Verificamos a diminuição dos níveis de transcritos do gene catalase (JARAMILLO *et al.*, 2017), evidenciando que o aumento da formação de ER induzido pelo HBG é acompanhado pela alteração deste parâmetro de resposta antioxidante.

De uma maneira geral, as ER são um estímulo para que as células iniciem respostas moleculares antioxidantes e ativem vias de sinalização de sobrevivência celular que podem alterar vias apoptóticas (BICKERS; ATHAR, 2006). Contudo, dependendo do equilíbrio entre a produção e

remoção pelos sistemas antioxidantes, as ER podem induzir danos a uma variedade de moléculas, levando a perda de função e de integridade mitocondrial e celular e morte celular (KOOPMAN *et al.*, 2010).

Considerando os resultados obtidos, os grupos expostos as menores concentrações (0,065 e 1,0 mg GLI/L) apresentaram maiores efeitos do que o exposto à maior concentração (10,0 mg GLI/L). No entanto, as alterações nos níveis de transcritos dos genes envolvidos nos complexos I e IV e *cat*; a hiperpolarização do $\Delta\psi_m$; assim como o aumento da formação de ER foram observados no grupo exposto à maior concentração. Sendo assim, sugerimos que as células do encéfalo do grupo exposto à maior concentração tenham ativado mecanismos de defesa que foram capazes de manter a viabilidade celular e atividade dos complexos mitocondriais, talvez em tempos mais breves, de forma que estas alterações não foram encontradas neste grupo.

As alterações na viabilidade celular, atividade e níveis de transcritos dos complexos mitocondriais, hiperpolarização do $\Delta\psi_m$, assim como o aumento da formação de ER podem estar associados com alterações na função mitocondrial, avaliada pelo consumo de oxigênio. Para esta avaliação escolhemos o grupo que foi exposto à menor concentração testada (0,065 mg GLI/L), pois este apresentou alterações em todos os parâmetros mencionados acima. Apesar de esperarmos encontrar alterações no consumo de oxigênio mitocondrial induzidas pelo HBG no SNC de peixe-zebra, estas não foram evidenciadas. Mecanismos mitocondriais compensatórios, tais como alterações na dinâmica e biogênese mitocondriais, podem promover o equilíbrio do consumo de oxigênio mitocondrial. Neste sentido, os níveis de transcritos para o gene *tfam*, que codifica um fator de transcrição mitocondrial essencial na biogênese mitocondrial (UITTENBOGAARD; CHIARAMELLO, 2014; GÜNTHER *et al.*, 2004), apresentaram diminuição significativa no grupo exposto à menor concentração testada, sendo que tal diminuição pode ter ocorrido devido ao maior requerimento destes transcritos para serem traduzidos a proteína. Estudos adicionais como a avaliação do conteúdo proteico de *tfam* por *Western blotting* poderiam sustentar esta hipótese.

Considerando que um dos efeitos das ER são os danos ao DNA e consequente ativação de vias de morte celular, avaliamos se o HBG induziu a morte celular no encéfalo do peixe-zebra. A fragmentação do DNA é um dos critérios usados para definir a morte celular (por necrose ou apoptose). Durante a apoptose, o DNA é clivado por endonucleases que fragmentam a cromatina em unidades nucleossômicas, as quais são

múltiplas de oligômeros de 180 pb e aparecem como bandas de DNA após eletroforese em um gel de agarose (MATASSOV *et al.*, 2004). Embora alguns estudos *in vitro* tenham apontado a apoptose e necrose como efeitos induzidos pelos HBG e GLI puro (BENACHOUR; SÉRALINI, 2009; HEU *et al.*, 2012; LUO *et al.*, 2017; MARTINI; GABRIELLI; VILA, 2012), neste estudo não foram evidenciadas a fragmentação do DNA após a exposição ao HBG no encéfalo. Contudo, a perda de integridade do DNA foi observada nas brânquias, as quais foram usadas como controle positivo da exposição ao HBG. Estes resultados podem provavelmente estar relacionados ao grau de intensidade da exposição, pois as brânquias estão diretamente expostas ao HBG.

Levando em consideração que a fragmentação do DNA em gel de agarose é um método pouco sensível quando a ocorrência de morte celular não é intensa, também usamos o ensaio de TUNEL por fluorescência para detectar células apoptóticas em diferentes regiões encefálicas e avaliar se alguma região específica apresentou maior sensibilidade à exposição ao HBG. Nessas análises não encontramos um aumento na ocorrência de células TUNEL positivas nas regiões analisadas. O fato da apoptose não ter sido induzida pela exposição ao HBG não significa que este composto não tenha apresentado efeito tóxico sobre as células do encéfalo. A redução na viabilidade celular e ausência de apoptose nos sugerem que células não funcionais permaneçam no tecido e comprometam a homeostase do mesmo. Estudos futuros poderão elucidar de modo mais específico a toxicidade do HBG sobre a apoptose no encéfalo.

Apesar do crescente número de publicações identificando o potencial genotóxico do HBG em diferentes órgãos de espécies de peixes (CAVAS; KONEN, 2007; CAVALCANTE *et al.*, 2008; GUILHERME *et al.*, 2012; GHISI; CESTARI, 2013; KOPPE-GRISOLIA, 2002), há escassos estudos que avaliaram no encéfalo se o HBG é capaz de induzir efeitos sobre a integridade do DNA. A partir de nossos resultados, considerando as limitações das técnicas utilizadas, não encontramos evidências de que o HBG, nas concentrações testadas neste estudo, possa induzir efeitos genotóxicos sobre as células no encéfalo de peixe-zebra. No entanto, a ausência de tais evidências pode ser um indicativo de que o HBG nas células do SNC não atinja de modo direto o DNA.

No teste de micronúcleo em eritrócitos do peixe-zebra, não encontramos alterações induzidas pelo HBG após 15 dias de exposição.

Também em outras espécies de peixes expostos ao HBG a avaliação da frequência de micronúcleos não evidenciou aumentos significativos (CAVALCANTE *et al.*, 2008; GHISI; CESTARI, 2013). Entretanto, ÇAVAS e KÖNEN (2007) revelaram aumentos na frequência de micronúcleos, anormalidades nucleares, bem como quebras de cadeia de DNA em peixe-dourado (*Carassius auratus*). Devem ser consideradas as diferenças entre as espécies avaliadas, tempo de exposição e concentrações testadas de HBG e, em peixe-zebra, nossos resultados não mostraram efeitos genotóxicos do HBG em eritrócitos nas concentrações e tempos testados.

De um modo geral, as respostas celulares frente a um desafio promovido por um composto químico são dependentes, além das propriedades físico-químicas do composto, da dose e duração da exposição. Contudo, uma resposta tóxica não é necessariamente provocada em doses excessivamente elevadas de um composto (BOELSTERLI, 2007). Mesmo em doses muito baixas produtos químicos potencialmente tóxicos podem desencadear mecanismos biológicos para responder ao estresse promovido pelo composto (CALABRESE; BLAIN, 2005). Em muitos casos, as respostas envolvem mecanismos enzimáticos adaptativos que podem promover a depuração e eliminação do agente tóxico, diminuindo a exposição interna global, e conseqüentemente atenuando a resposta tóxica. Como também, dependendo do tempo de exposição, esses mecanismos adaptativos podem entrar em colapso e levar à toxicidade celular, tecidual ou sistêmica (BOELSTERLI, 2007).

Em nossos resultados evidenciamos que o HBG induziu alterações em diferentes parâmetros avaliados e que principalmente as menores concentrações testadas (0,065 e 1,0 mg GLI/L) apresentaram efeitos mais pronunciados do que a maior concentração avaliada (10,0 mg GLI/L). Tais evidências sugerem um possível efeito hormético do HBG no encéfalo de peixe-zebra, pois parece haver um limiar de estimulação das respostas adaptativas que pode ter sido atingido quando os peixes foram expostos a maior concentração. Estudos adicionais que avaliem as respostas citoprotetoras associadas aos efeitos do HBG, no modelo estudado, poderão contribuir com a compreensão dos mecanismos celulares envolvidos frente à exposição às diferentes concentrações avaliadas no encéfalo. A resposta adaptativa a níveis baixos de um agente tóxico é considerada a hipótese primária sobre a qual a ocorrência de hormese está baseada (BRITO *et al.*, 2017). Nos campos da biologia e da medicina, a hormese é definida como uma

resposta adaptativa das células e organismos a um estresse moderado e seus mecanismos envolvem proteínas e fatores de transcrição que regulam a expressão de genes que codificam proteínas citoprotetoras (MATTSON, 2008).

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho foi possível verificar que a exposição ao HBG provocou efeitos tóxicos sobre a mitocôndria no encéfalo de peixe-zebra, pois induziu a diminuição da viabilidade celular, da atividade dos complexos I e IV da CTE e alterou os níveis de transcritos dos genes *ndufa6*, *sdhc*, *cox1* e *tfam*. Tais alterações na atividade e níveis de transcritos dos complexos da CTE induziram a hiperpolarização do $\Delta\psi_m$, e estavam associadas ao aumento da formação de ER no encéfalo de peixe-zebra (Figura 24). Porém, tais alterações não foram associadas à diminuição da respiração mitocondrial, avaliada no grupo exposto a 0,065 mg GLI/L, assim como ao dano do DNA e aumento da ocorrência de morte celular no encéfalo.

Também evidenciamos que principalmente a menor concentração testada (0,065 mg GLI/L), regulamentada no Brasil para o consumo humano, deve ser revista pelos órgãos reguladores na intenção de prevenir a neurotoxicidade induzida por exposições crônicas, as quais ainda não foram devidamente investigadas.

Ainda, podemos sugerir que a mitocôndria é um possível alvo da toxicidade do HBG no SNC. De um modo geral, com suporte do conjunto de resultados obtidos neste trabalho, concluímos que as alterações encontradas são indicativos de toxicidade do HBG no SNC de peixe-zebra.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI, M., *et al.* Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**, 10 (6), 141–147, 2004.

ABRAMOV, A. Y. *et al.* Mechanism of neurodegeneration of neurons with mitochondrial DNA mutations. **Brain**, 133, 3, 797–807, 2010.

ABRASCO – Associação Brasileira de Saúde Coletiva. Dossiê ABRASCO - **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde - Parte 2 - Agrotóxicos, Saúde, Ambiente e Sustentabilidade.** AUGUSTO, L. G. S. *et al.* Rio de Janeiro: ABRASCO, 140, 2012.

ABUJA, P.M.; ALBERTINI, R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. **Clinica Chimica Acta**, 306, 1–17, 2001.

ACQUAVELLA, J. F. *et al.* Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: Results from the farm family exposure study. **Environmental Health Perspectives**, 112, 3, 321–326, 2004.

ALBERTS, B., *et al.* **Molecular biology of the cell**, 6th ed. New York: Garland Science, 2015.

ANVISA, 2017. **Glifosato prossegue sob análise na Anvisa.** http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/glifosato-prossegue-sob-analise-na-anvisa/219201/pop_up?inheritRedirect=false. Acesso em: 07/02/18.

ARAÚJO, A. J. *et al.* Multiple exposure to pesticides and impacts on health: a cross-section study of 102 rural workers, Nova Friburgo, Rio de Janeiro State, Brazil. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, 12, 1, 115-130, 2007.

ARUSCAVAGE, P. J.; HELLWIG, S.; BASS, B. L. Small DNA pieces in *C. elegans* are intermediates of DNA fragmentation during apoptosis. **PLoS ONE**, 5, 6, 1–7, 2010.

AXELRAD, J. C.; HOWARD, C. V.; MCLEAN, W. G. The effects of acute pesticide exposure on neuroblastoma cells chronically exposed to diazinon. **Toxicology**, 185, 1–2, 67–78, 2003.

BALTAZAR, M. T. *et al.* Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases-A mechanistic approach. **Toxicology Letters**, 230, 2, 85–103, 2014.

BANDMANN, O., BURTON, E.A. Genetic zebrafish models of neurodegenerative diseases. **Neurobiology of Disease**, 58–65, 2010.

BARBAZUK, W.B. *et al.* The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Research**, 1351–1358, 2000.

BARBOSA, E. *et al.* Parkinsonism after glycine-derivate exposure. **Movement Disorders Journal**, 16, 565–8, 2001.

BARRIENTOS, A.; MORAES, C. T. Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. **Journal of Biological Chemistry**, 274, 23, 16188–16197, 1999.

BASU, S.; SACHIDANANDAN, C. Zebrafish: A multifaceted tool for chemical biologists. **Chemical Reviews**, 113, 10, 7952–7980, 2013.

BEGUM, G. Carbofuran insecticide induced biochemical alterations in liver and muscle tissues of the fish *Clarias batrachus (Linnaeus)* and recovery response. **Aquatic Toxicology**, 66, 83–92, 2004.

BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G.-E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. **Chemical Research in Toxicology**, 22, 1, 97–105, 2009.

BICKERS, D. R.; ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **Journal of Investigative Dermatology**, 126, 12, 2565–2575, 2006.

BOELSTERLI, U.A. **Mechanistic toxicology: The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets.** CRC Press Taylor and Francis Group, Second Edition, 2007.

BOHN, T. *et al.* Compositional differences in soybeans on the market: glyphosate accumulates in Roundup Ready GM soybeans. **Food Chemistry**, 153, 207–215, 2014.

BOLOGNESI, C. *et al.* Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five Colombian regions: Association to occupational exposure to glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, A 72, 986–997, 2009.

BOMBARDI, L. M. **Pequeno ensaio cartográfico sobre o uso de agrotóxicos no Brasil**. São Paulo: Laboratório de Geografia Agrária - USP. Blurb, 30p., 2016.

BOMBARDI, L. M. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia**. São Paulo: FFLCH - USP, 296p., 2017.

BONNY, S. Genetically modified herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides: Overview and impact. **Environmental Management**, 57, 1, 31–48, 2016.

BRADFORD, Y.M. *et al.* Zebrafish Models of Human Disease: Gaining Insight into Human Disease at ZFIN. **Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) Journal**, 58, 4–16, 2017.

BRAZ-MOTA, S. *et al.* Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. **Chemosphere**, 135, 53–60, 2015.

BRITO, I.P.F.S. *et al.* Hormetic effects of glyphosate on plants. **Pest Management Science**, 1064-70, 2017.

BUCHER, F., HOFER, R. Histopathological effects of sublethal exposure to phenol on two variously pre-stressed populations of bullhead (*Cottus gobio*). **Environmental Contamination Toxicology**, 51, 309-316, 1993.

BURNS, C.J. *et al.* Pesticide Exposure and Neurodevelopmental Outcomes: Review of the Epidemiologic and Animal Studies. **Journal**

of **Toxicology and Environmental Health**, Part B, 16, 3–4, 127–283, 2013.

CALABRESE, E.J., BLAIN, R. The occurrence of hormetic dose responses in the toxicological literature, the hormesis database: an overview. **Toxicology Applied Pharmacology**, 202, 289–301, 2005.

CARNEIRO, F. F. *et al.* **Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro; São Paulo: EPSJV; Expressão Popular. 2015.

CASSINA, A., RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 328, 309–316, 1996.

CATTANI, D. *et al.* Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. **Toxicology**, 320, 34–45, 2014.

CATTANI, D. *et al.* Developmental exposure to glyphosate-based herbicide and depressive-like behavior in adult offspring: Implication of glutamate excitotoxicity and oxidative stress. **Toxicology**, February, 2017.

CAVALCANTE, D.G.S.M., MARTINEZ, C.B.R., SOFIA, S.H. Genotoxic effects of roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis**, 655, 41–46, 2008.

ÇAVAS, T.; KÖNEN, S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. **Mutagenesis**, 22, 4, 263–268, 2007.

CHANG, F.; SIMCIK, M. F.; CAPEL, P. D. Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. **Environmental toxicology and Chemistry/SETAC**, 30, 3, 548–55, 2011.

CHEN, T. *et al.* Effects of commonly used pesticides in China on the mitochondria and ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, 18, 12, 2017.

CHIN, M.H. *et al.* Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis revealed by proteomic and transcriptomic analyses of the striata in two mouse models of Parkinson's disease. **Journal Proteome Research**, 7, 2, 666–677, 2008.

CHONG, Z.Z., LI, F., MAIESE, K. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. **Progress in Neurobiology**, 75, 207–246, 2005.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução N° 357**. Publicada no DOU n° 053, de 18/03/2005, 58-63, 2005.

CONRAD, A. *et al.* Glyphosate in German adults - Time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, 220, 1, 8–16, 2017.

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA**. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Brasília/DF, Brazil, 1–54, 2013.

COSTA, L.G. *et al.* Neurotoxicity of pesticides: a brief review. **Frontiers in Bioscience**, 13, 1240–1249, 2008.

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified Inert Ingredients in Pesticides: Implications for Human and Environmental Health. **Environmental Health Perspectives**, 114, 12, 1803–1806, 2006.

DAGHASTANLI, N.A., ITRI, R., BAPTISTA, M.S. Singlet oxygen reacts with 2,7-dichlorodihydrofluorescein and contributes to the formation of 2,7-dichlorofluorescein. **Photochem. Photobiol.**, 84, 1238–1243, 2008.

DAI, Y.-J. *et al.* Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry/SETAC**, 33, 1, 11–7, 2014.

DAMMSKI, A.P., MÜLLER, B.R. Zebrafish - Manual de criação em biotério. **Zebrafish**, 107, 2011.

DE LIZ OLIVEIRA CAVALLI, V.L. *et al.* Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. **Free Radical Biology and Medicine**, 65, 335–346, 2013.

DE SOUZA, A. *et al.* Evaluation of the impact of exposure to pesticides on the health of the rural population: Vale do Taquari, State of Rio Grande do Sul (Brazil). **Ciência e Saúde Coletiva**, 16, 8, 3519–3528, 2011.

DE ZWART, L.L. *et al.* Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biol. Med.**, 26, 202–226, 1999.

DICK, R.E.; QUINN, J.P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 43, 545–550, 1995.

DOS SANTOS, A.P.R. *et al.* A glyphosate-based herbicide induces histomorphological and protein expression changes in the liver of the female guppy *Poecilia reticulata*. **Chemosphere**, 168, 2016.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, 82, 47-95, 2002.

EATON, D. L. *et al.* Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. **Critical Reviews in Toxicology**, 38, 2, 1–125, 2008.

EFSA – European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. **European Food Safety Authority Journal**, 13, 11, 1–107, 2015.

EL-SHENAWY, N. S. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 28, 3, 379–385, 2009.

ENGESZER, R.E. *et al.* Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, 4, 21–U126, 2007.

ERUSLANOV, E., KUSMARTSEV, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. **Methods Molecular Biology**, 594, 57–72, 2010

ESTERAS, N. *et al.* Mitochondrial hyperpolarization in iPSC-derived neurons from patients of FTDP-17 with 10+16 MAPT mutation leads to oxidative stress and neurodegeneration. **Redox Biology**, 12, March, 410–422, 2017.

FAO; WHO – Food and Agriculture Organizations of the United Nations. **Joint FAO / WHO Meeting on Pesticide Residues**, May, 9–13, 2016.

FILOSTO, M. *et al.* The role of mitochondria in neurodegenerative diseases. **Journal of Neurology**, 258, 10, 1763–1774, 2011.

FISCHER, J.C. *et al.* Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clinica Chimica Acta**, 153, 23–36, 1985.

FOLMAR, L.C.; SANDERS, H.O.; JULIN, A.M. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 8, 3, 269–278, 1979.

FONSECA, M.B. *et al.* The 2,4-Dherbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology Environmental Safety**, 69, 416–420, 2008.

FORKINK, M. *et al.* Mitochondrial hyperpolarization during chronic complex i inhibition is sustained by low activity of complex II, III, IV and V. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, 1837, 8, 1247–1256, 2014.

FRONTERA, J.L. *et al.* Effects of glyphosate and polyoxyethylenamine on growth and energetic reserves in the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (*Decapoda, Parastacidae*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 61, 4, 590–598, 2011.

GALLOWAY, T.; HANDY, R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. **Ecotoxicology**, 12, 1-4, 345-363, 2003.

GASNIER, C. *et al.* Dig1 protects against cell death provoked by glyphosate-based herbicides in human liver cell lines. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology** (London, England), 5, 1, 29, 2010.

GERMAN, D.C.; WHITE, C.L.; SPARKMAN, D.R. Alzheimer's disease: Neurofibrillary tangles in nuclei that project to the cerebral cortex. **Neuroscience**, 21, 2, 305–312, 1987.

GHISI, N.C., CESTARI, MM. Genotoxic effects of the herbicide Roundup in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. **Environmental Monitoring and Assessment**, 185, 3201–3207, 2012.

GNAIGER, E. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control: an Introduction to OXPHOS Analysis. **Mitochondrial Physiology Network**, 3^a ed., 2012.

GOLDSMITH, P. Zebrafish as a pharmacological tool: The how, why and when. **Current Opinion in Pharmacology**, 504–512, 2004.

GONZALEZ-VOYER, A.; WINBERG, S.; KOLM, N. Brain structure evolution in a basal vertebrate clade: evidence from phylogenetic comparative analysis of cichlid fishes. **BMC Evolutionary Biology**, 9:238, 2009.

GREIM, H. *et al.* Evaluation of carcinogenic potential of the herbicide glyphosate, drawing on tumor incidence data from fourteen chronic/carcinogenicity rodent studies. **Critical Reviews in Toxicology**, 45, 3, 85–208, 2015.

GUILHERME, S. *et al.* DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 743, 1–2, 1–9, 2012.

GÜNTHER, C. *et al.* Possible association of mitochondrial transcription factor A (TFAM) genotype with sporadic Alzheimer disease. **Neuroscience Letters**., 21, 369(3), 219-23. 2004.

GUYTON, K.Z. *et al.* Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **The Lancet Oncology**, 2015, 15, 1–2, 2015.

HANKE, I. *et al.* Relevance of urban glyphosate use for surface water quality. **Chemosphere**, 81, 3, 422–429, 2010.

HAYDEN, K.M. *et al.* Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD. **Neurology**, May 1, 74(19), 1524-30, 2010.

HAWKINS, M. *et al.* US EPA. **Office of prevention, pesticides and toxic substances**, 2009.

HESS, S.C.; NODARI, R.O. **Parecer técnico N. 01/2015**. Florianópolis, 23/05/2015. Glifosato. 1–9, 2015.

HEU, C. *et al.* A step further toward glyphosate-induced epidermal cell death: Involvement of mitochondrial and oxidative mechanisms. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 34, 2, 144–153, 2012.

HILDEBRAND, L. D.; SULLIVAN, D. S.; SULLIVAN, T. P. Experimental studies of rainbow trout populations exposed to field applications of Roundup herbicide. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 11, 1, 93–98, 1982.

HIOLSKI, E.M. *et al.* Chronic low-level domoic acid exposure alters gene transcription and impairs mitochondrial function in the CNS. **Aquatic Toxicology**, 155, 151–159, 2014.

HOFSTETTER, J. R. *et al.* Genomic DNA from mice: A comparison of recovery methods and tissue sources. **Biochemical and Molecular Medicine**, 62, 2, 197–202, 1997.

HOWE, K. *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, 496, 498–503, 2013

IARC – International Agency for Research on Cancer. **Monograph on Glyphosate**.

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112-10.pdf>.

Acesso em: 09/02/2018. 2015.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável: Brasil**. Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. Coordenação de Geografia. – Rio de Janeiro : IBGE, 352p, 2015.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. **Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos**. Ministério da Saúde, Governo Federal / Brasil, http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15.pdf. Acesso em 09/02/2018. 2015

GIESY, S. DOBSON, K.S.E.A. Ecotoxicological risk assesment for Roundup herbicide. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 167, 35-120, 2000.

FISCHER, J.C. *et al.* Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clinica Chimica Acta**, 153, 23–36, 1985.

JAMES, A.M., SMITH, R.A., MURPHY, M.P. Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 423, 47-56, 2004.

JARAMILLO, M.L. *et al.* Evaluation of reference genes for reverse transcription-quantitative PCR assays in organs of zebrafish exposed to glyphosate-based herbicide, Roundup. **Animal**, 1–11, 2017.

JIRAUNGKOORSKUL, W. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology**, 18, 260–267, 2003.

JOHNSON, F.O. *et al.* Developmental chlorpyrifos and methyl parathion exposure alters radial-arm maze performance in juvenile and adult rats. **Toxicological Sciences**, 109, 1, 132–142, 2009.

JONCKHEERE, A.I.; SMEITINK, J.A.M.; RODENBURG, R.J.T. Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 35, 2, 211–225, 2012.

KAMEL, F.; HOPPIN, J.A. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. **Environmental Health Perspectives**, 112, 9, 950–958, 2004.

KANEKO, T.; BABA, N.; MATSUO, M. Structure-activity relationship of antioxidants for inhibitors of linoleic acid hydroperoxide- induced toxicity in cultured human umbilical vein endothelial cells. **Cytotechnology**, 35, 43-55, 2001.

KIER, L. D.; KIRKLAND, D. J. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. **Critical Reviews in Toxicology**, 43, 4, 283–315, 2013.

KISHORE, G.M.; SHAH, D.M. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. **Annual Review of Biochemistry**, 57, 627-663, 1988.

KOLPINA, D.W. *et al.* Urban contributions of glyphosate and its degradate AMPA to streams in the United States. **Science of the Total Environment**, 354, 191–197, 2006.

KONGTIP, P. *et al.* Glyphosate and paraquat in maternal and fetal serums in Thai women. **Journal Agromedicine**, 22(3), 282-289, 2017.

KOOPMAN, W.J.H. *et al.* Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. **Antioxidants and Redox Signaling**, 12, 1431–1470, 2010.

KOOPMAN, W.J.H. *et al.* OXPHOS mutations and neurodegeneration. **The EMBO Journal**, 32, 9-29, 2013.

KOPPE-GRISOLIA, C. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin and various pesticides. **Mutation Research**, 518, 145-150, 2002.

LANGSTON, J. W. The MPTP story. **Journal of Parkinson's Disease**, 7, S11–S19, 2017.

LATINI, A. *et al.* Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. **Molecular Genetics and Metabolism**, 86, 1–2, 188–99, 2005.

LEE, H. L. *et al.* Clinical presentations and prognostic factors of a glyphosate-surfactant herbicide intoxication: a review of 131 cases. **Academic Emergency Medicine: Official Journal of the Society for Academic Emergency Medicine**, 7, 8, 906–10, 2000.

LI, M. H. *et al.* Metabolic profiling of goldfish (*Carassius auratus*) after long-term glyphosate-based herbicide exposure. **Aquatic Toxicology**, 188, May, 159–169, 2017.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$ Method. **Methods**, 25, 402–408. 2001.

LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 193, 2, 265–275, 1951.

LUO, L. *et al.* *In vitro* cytotoxicity assessment of Roundup (glyphosate) in L-02 hepatocytes. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 1–8, 2017.

LUSHCHAK, O.V. *et al.* Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, 76, 7, 932–937, 2009.

MACHADO, M.O. Glifosato: a emergência de uma controvérsia científica global. Orientadora, Julia Silvia Guivant; Adilson Francelino Alves. Tese de Doutorado, Programa Interdisciplinar em Ciências Humanas - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 315 p., 2016.

MALHOTRA, R.C. *et al.* Glyphosate-surfactant herbicide-induced reversible encephalopathy. **Journal of Clinical Neuroscience**, 17, 11, 1472–3, 2010.

MARC, J.; MULNER-LORILLON, O.; BELLÉ, R. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. **Biology of the Cell**, 96, 3, 245–249, 2004.

MARTIN, L.J. Biology of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, 107, 335–415, 2012.

MARTÍNEZ, M.A. *et al.* Neurotransmitter changes in rat brain regions following glyphosate exposure. **Environmental Research**, 161, September, 212–219, 2018.

MARTINI, C.N.; GABRIELLI, M.; VILA, M.D.C. A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. **Toxicology in Vitro**, 26, 6, 1007–1013, 2012.

MATASSOV, D. *et al.* Measurement of apoptosis by DNA fragmentation. **Methods in Molecular Biology**, 282, 1–17, 2004.

MATTSON, M.P. Hormesis defined. **Ageing Research Reviews**, 7, 1, 1–7, 2008.

MENÉNDEZ-HELMAN, R.J. *et al.* Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 88, 1, 6–9, 2012.

MESNAGE, R. *et al.* Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food and Chemical Toxicology**, 2015.

MESNAGE, R. *et al.* Multiomics reveal non-alcoholic fatty liver disease in rats following chronic exposure to an ultra-low dose of Roundup herbicide. **Scientific Reports**, 7, 1–15, 2017.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere**, 81, 6, 781–787, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, 1–2, 55–63, 1983.

MOSTAFALOU, S., ABDOLLAHI, M. Concerns of environmental persistence of pesticides and human chronic diseases. **Clinical Experimental Pharmacology and Physiology**, 2 (3), 2012.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 268, 2, 157–177, 2013.

MURPHY, S.D. Toxic effects in pesticides. En: Klaasen, C.D.; Ambdur, M.O.; Doull, J., editors. **Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons**. New York: Macmillan, 543-553, 1986.

NEGGA, R. *et al.* Exposure to Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate and glyphosate pesticides leads to neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. **Neurotoxicology**, 32, 3, 331–41, 2011.

NEGGA, R. *et al.* Exposure to glyphosate- and/or Mn/Zn-ethylene-bis-dithiocarbamate- containing pesticides leads to degeneration of gamma-aminobutyric acid and dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. **Neurotoxicity Research**, 21, 281–290. 2012.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 3ª edição. São Paulo, SP: Sarvier, 2002.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NICHOLLS, D.G. Rat liver mitochondria were prepared and stored at 0° in 0.25 M sucrose. Oxygen uptake was determined. **FEBS Letters**, 25, 1, 61–64, 1972.

NORTON, W.; BALLY-CUIF, L. Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. **BMC Neuroscience**, 11, 2010.

NUNNARI, J.; SUOMALAINEN, A. Mitochondria: In sickness and in health. **Cell**, 148, 6, 1145–1159, 2012.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. **Fish, acute toxicity test. Guideline for the testing of chemicals**, July, 1–9, 1992.

OLIVEIRA, I.J.L. *et al.* Neuroprotective effect of GMP in hippocampal slices submitted to an *in vitro* model of ischemia. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 22, 3, 335–344, 2002.

OLORUNSOGO, O., BABABUNMI, E., BASSIR, O. Effect of glyphosate on rat liver mitochondria *in vivo*. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, 22, 357–364, 1979.

PEAKALL, T.J. *et al.* Organochlorine residues in Alaskan peregrines. **Pesticides Monitoring Journal**, 8, 255–260, 1975.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere**, 61, 8, 1115–1122, 2005.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ ed., 2003.

PERRY, S.F., LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: Rankin, J.C., Jensen, F.B. (Eds.), **Fish Ecophysiology**, London: Chapman & Hall, 231–264, 1993.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, 29, 9, 2001.

POLLEGIONI, L.; SCHONBRUNN, E.; SIEHL, D. Molecular basis of glyphosate resistance: Different approaches through protein engineering. **FEBS Journal**, 278, 16, 2753–2766, 2011.

PORTIER, C. J. *et al.* Differences in the carcinogenic evaluation of glyphosate between the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the European Food Safety Authority (EFSA). **Journal Epidemiology Community Health**, 1–5, 2016.

PRASAD, S. *et al.* Clastogenic effects of glyphosate in bone marrow cells of swiss albino mice. **Journal of Toxicology**, 5, 2009.

RAND, G.; WELLS, P.; MCCARTY, L. Introduction to aquatic toxicology. In: **Fundamentals of aquatic toxicology effects, environmental fate, and risk assessment**. North Palm Beach, Florida, USA: Taylor and Francis Publishers, 1995. p.3–67.

RAO, K. *et al.* Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. **Journal Leukocyte Biology**, 51, 496–500, 1992.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S.; Wittwer, C.; Nakagawara, K. (Eds.). **Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications**. Heidelberg: Springer Press, 21–34, 2001.

REDDY, P.H. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases: mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease. **CNS Spectrums Journal**, 14, 8, 1–12, 2009.

REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, 30, 4480–4486, 1991.

RINKWITZ, S.; MOURRAIN, P.; BECKER, T.S. Zebrafish: An integrative system for neurogenomics and neurosciences. **Progress in Neurobiology**, 231–243. 2011.

ROCHA, T.L. *et al.* Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 40, 1, 175–186, 2015.

ROY, N.M.; CARNEIRO, B.; OCHS, J. Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 42, 45–54, 2016.

RUEPPEL, M.L. *et al.* Metabolism and Degradation of Glyphosate in Soil and Water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 25, 517-528, 1977.

RUGARLI, E.I.; LANGER, T. Mitochondrial quality control: A matter of life and death for neurons. **EMBO Journal**, 31, 6, 1336–1349, 2012.

RUSTIN, P. *et al.* Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clinica Chimica Acta**, 228, 35-51, 1994.

SAHA, N.C.; BHUNIA, F.; KAVIRAJ, A. Toxicity of phenol to fish and aquatic ecosystems. **Bulletin of Environmental Contamination Toxicology**, 63, 195-202, 1999.

SAMANTA, P. *et al.* Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 107, 120–125, 2014.

SAMSEL, A.; SENEFF, S. Glyphosate, pathways to modern diseases III: Manganese, neurological diseases, and associated pathologies. **Surgical Neurology International**, 6:45, 2015.

SÁNCHEZ-SANTED, F.; COLOMINA, M.T.; HERNÁNDEZ, E.H. Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. **Cortex**, 74, 417–426, 2016.

SANDRINI, J. Z. *et al.* Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: *In vitro* studies. **Aquatic Toxicology**, 130–131, 171–173, 2013.

SHARPS, E.S. A radiometric assay for 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Analytical Biochemistry**, 140, 183–189, 1984.

SINHORIN, V.D.G. *et al.* Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma sp.*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 106, 181–187, 2014.

SEKHOTHA, M.M.; MONYEKI, K.D.; SIBUYI, M.E. Exposure to Agrochemicals and Cardiovascular Disease: A Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Feb, 13(2), 229, 2016.

SOBJAK, T.M. *et al.* Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. **Chemosphere**, 182, 267–275, 2017.

SOOD, P.K. *et al.* Neuroprotective role of lazarooids against aluminium chloride poisoning. **Neurochemical Research**, 40, 8, 699–1708, 2015.

SPENCE, R. *et al.* "The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh". **Journal of Fish Biology**, 69(5), 1435-1448, 2006.

SPENCE, R. *et al.* The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, 83, 1, 13–34, 2008.

STEWART, A.M. *et al.* Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, May, 37(5), 264–278, 2014.

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

SZÉKÁCS, A.; DARVAS, B. **Forty years with glyphosate**. In: *Herbicides – Properties, Synthesis and Control of Weeds* (Hasaneen, M. N. A. E.-G., Ed.), InTech, Rijeka, Croatia, 247-284, 2012.

TAKAHASHI, M.; HORIE, M.; AOBA, N. Analysis of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, in agricultural products by HPLC. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi**, 42, 304–308, 2001.

TANNER, C. M. *et al.* Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. **Environmental Health Perspectives**, 119(6), 866-872, 2011.

TARONE, R.E. On the International Agency for Research on Cancer classification of glyphosate as a probable human carcinogen. **European Journal of Cancer Prevention**, 1, 2016.

TIERNEY, K.B. *et al.* Olfactory toxicity in fishes. **Aquatic Toxicology**, 96, 1, 2–26, 2010.

TOLEDO-IBARRA, G.A.; ROJAS-MAYORQUÍN, A.E.; GIRÓN-PÉREZ, M.I. Influence of the Cholinergic System on the Immune Response of Teleost Fishes: Potential Model in Biomedical Research. **Clinical and Developmental Immunology**, 2013.

TOPAL, A. *et al.* Effects of glyphosate on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Transcriptional and enzymatic analyses of antioxidant defence system, histopathological liver damage and swimming performance. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 111, 206–214, 2015.

TSUI, M.T.K.; CHU, L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, 52, 7, 1189–1197, 2003.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, 552, 2, 335–344, 2003.

UGARTE, R. Interaction between glyphosate and mitochondrial succinate dehydrogenase. **Computational and Theoretical Chemistry**, 1043, 54–63, 2014.

UITTENBOGAARD, M.; CHIARAMELLO, A. Mitochondrial biogenesis: a therapeutic target for neurodevelopmental disorders and neurodegenerative diseases. **Current Pharmaceutical Design**, 20, 35, 5574–93, 2014.

UREN WEBSTER, T.M. *et al.* Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science and Technology**, 48, 2, 1271–1279, 2014.

UREN WEBSTER, T.M.; SANTOS, E.M. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. **BMC Genomics**, 16:32, 2015.

US EPA – United States Environmental Protection Agency. **Probit analysis program used for calculating LC/EC values**. Version 1.5. Cincinnati: Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory US EPA, 1992.

US EPA – United States Environmental Protection Agency. **Glyphosate - Reregistration Eligibility Decision (RED)**, 1993.

VALSECCHI, F. *et al.* Metabolic consequences of NDUFS4 gene deletion in immortalized mouse embryonic fibroblast. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1817(10), 1925–36, 2012.

VANDENBERG, L. N. *et al.* Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? **Journal of Epidemiology and Community Health**, May, 1-6, 2017.

VANDRESEN-FILHO, S. *et al.* Cerebral cortex, hippocampus, striatum and cerebellum show differential susceptibility to quinolinic acid-induced oxidative stress. **Neurological Sciences**, Aug, 36(8), 1449-56, 2015.

VARGAS, R.; SIGURGEIRSSON, B. The zebrafish brain in research and teaching: a simple *in vivo* and *in vitro* model for the study of spontaneous neural activity. **Advances in Physiology Education**, 35, 188–196, 2011.

VELASQUES, R.R.; SANDRINI, J.Z.; DA ROSA, C.E. Roundup® in Zebrafish: Effects on Oxidative Status and Gene Expression. **Zebrafish**, 13(5), 432–441, 2016.

VERA-CANDIOTI, J.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M.L. Single-cell gel electrophoresis assay in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), as bioassay for agrochemical-induced genotoxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 98, 368–373, 2013.

WANG, G. *et al.* Parkinsonism after chronic occupational exposure to glyphosate. **Parkinsonism and Related Disorders**, 17, 6, 486–487, 2011.

WEBSTER, T.M.U.; SANTOS, E.M. Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. **BMC Genomics**, 16, 1, 1–14, 2015.

WILLIAMS, G.M.; KROES, R.; MUNRO, I.C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 31, 2 I, 117–165, 2000.

WILLIAMS, G.M. *et al.* A review of the carcinogenic potential of glyphosate by four independent expert panels and comparison to the IARC assessment. **Critical Reviews in Toxicology**, Nov, 46, 3–20, 2016.

WINCHESTER, P., *et al.* Agrichemicals in surface water and birth defects in the United States. **Acta Paediatrica**, 98(4), 2009.

ZHANG, J. *et al.* Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: A link through mitochondrial dysfunction. **Journal of Neurochemistry**, 84, 2, 336–346, 2003.

ZOUAOUI, K. *et al.* Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication. **Forensic Science International**, 226, 20–25, 2013.