



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Suzana da Silva

**Mecanismos de citotoxicidade induzidos pelo fungicida Mancozeb em células
de neuroblastoma humano**

Florianópolis
2023

Suzana da Silva

Mecanismos de citotoxicidade induzidos pelo fungicida Mancozeb em células de neuroblastoma humano

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Farmácia

Orientador(a): Prof.(a) Dirleise Colle, Dr.(a)

Florianópolis

2023

da Silva, Suzana

Mecanismos de citotoxicidade induzidos pelo fungicida Mancozeb em células de neuroblastoma humano / Suzana da Silva ; orientadora, Dirleise Colle, 2023.
91 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Doença de Parkinson. 3. Agrotóxicos. 4. Mancozeb. 5. Estresse Oxidativo. I. Colle, Dirleise. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Suzana da Silva

Mecanismos de citotoxicidade induzidos pelo fungicida Mancozeb em células de neuroblastoma humano

O presente trabalho, em nível de Mestrado, foi avaliado e aprovado, em 11 de agosto de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Fabíola Branco Filippin Monteiro, Dr.(a)
Universidade Federal De Santa Catarina

Prof.(a) Mariana Appel Hort, Dr.(a)
Universidade Federal Do Rio Grande

Prof.(a) Dirleise Colle, Dr.(a)
Universidade Federal De Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Farmácia

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.(a) Dirleise Colle, Dr.(a)
Orientador(a)

Florianópolis, 2023.

Este trabalho é dedicado a todos pesquisadores da área
e aos meus queridos familiares.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e aos meus pais, Sônia e Osmarino, que sempre me incentivaram a estudar e ser uma pessoa melhor, sendo sempre presentes em toda a minha vida, abdicando de coisas para si para poder garantir os meus estudos.

Ao meu amado Maicon, que acompanhou toda a minha trajetória dentro da universidade, desde a graduação, estando sempre ao meu lado, ouvindo as alegrias e também as reclamações, me ajudando sempre, com muito amor. Você é minha fonte de inspiração, como aluno exemplar, e foi meu porto seguro em meio à todas as tempestades que surgiram neste caminho.

Aos meus queridos colegas de laboratório, em especial Carmem, Maurício, Josiane, Melania, Sabrina, Veridiana e Aline, que me acompanharam durante essa trajetória, sendo parceiros de planejamento e resolução de dúvidas de experimentos, estudos, e bolinhos com café, dos quais sempre lembrarei dos momentos de risada e companheirismo, que vivemos ao longo destes 2 anos de mestrado. Vocês foram parte essencial desta conquista!

Ao professor Dr. Marcelo Farina, do departamento de Ciências Biológicas (CCB) por ter gentilmente cedido as dependências do Laboratório de Experimentação em Neuropatologias (LEN) para realização dos meus experimentos, auxiliando também financeiramente para a execução deste trabalho.

Ao professor Dr. Sharbel Weidner Maluf e a sua aluna Natali Silva Cardoso, que auxiliaram na execução da técnica do ensaio cometa para avaliação do dano de DNA.

À professora Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza (CCB) e ao professor Dr. Maicon R. Kviecinsky pela doação dos kits de ELISA para citocinas pró-inflamatórias e auxílio na execução da técnica.

Aos professores, em especial os do PPGFAR, que transmitem a sua sabedoria com amor e carinho, sendo indispensáveis na formação de profissionais de qualidade.

À minha querida orientadora, professora Dra. Dirleise Colle, que desde o início da execução deste projeto foi minha grande aliada, sempre se fazendo presente, mesmo em seu período de licença maternidade. Sua dedicação e parceria sempre será lembrada!

Ao corpo técnico do LAMEB, em especial à Bibiana, Flávia, Willian e Elis que, de forma muito prestativa, ensinam e auxiliam os pesquisadores na utilização dos equipamentos analíticos utilizados nesse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação de Santa Catarina (FAPESC), pelo auxílio financeiro importantíssimo para a execução deste trabalho.

À UFSC, que se tornou minha segunda casa, por ser uma excelente instituição de ensino, sempre garantindo o ensino de qualidade e dando amparo e apoio aos alunos!

E a todos que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho!

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente do sistema nervoso central (SNC). É caracterizada pela morte de neurônios dopaminérgicos na substância negra compacta, culminando em depleção de dopamina no estriado e diminuição das funções motoras. Sua fisiopatologia envolve estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e neuroinflamação. Apesar do envelhecimento ser o principal fator de risco para desenvolver a DP, diversos estudos vêm mostrando uma relação entre exposição ocupacional à agrotóxicos com o aumento no risco de desenvolvimento da DP idiopática. O Mancozeb (MZ) é um agrotóxico pertencente a classe dos etilenobisditiocarbamatos (EBDCs), amplamente utilizado no país devido ao seu grande potencial fungicida e sua baixa toxicidade aguda. Estudos sugerem que o uso de agrotóxicos EBDCs na agricultura poderia contribuir para o desenvolvimento da DP. Entretanto, ainda não existem evidências que suportem esta associação e, apesar da extensa utilização mundial de MZ, existe um número limitado de estudos investigando o efeito neurotóxico do fungicida. O objetivo desse estudo foi avaliar a citotoxicidade induzida pelo fungicida MZ, em culturas de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, que possuem características de neurônios dopaminérgicos, e avaliar alterações celulares relacionadas a DP. As células foram expostas ao MZ (1 – 30 μM) e foram realizados ensaios de viabilidade e morte celular em diferentes tempos de exposição. Além disso, foram avaliados outros parâmetros como a geração de espécies reativas (ER), produção de radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), concentração de glutathiona (GSH), peroxidação lipídica, potencial de membrana mitocondrial (PMM), níveis de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e avaliação de dano ao DNA. A exposição ao MZ, durante 24 horas, induziu diminuição na viabilidade celular, a partir da concentração de 6 μM e induziu morte celular significativa a partir de 15 μM . Esses efeitos citotóxicos do fungicida foram dependentes tanto do tempo de exposição quanto da concentração. Além disso, o MZ (6 μM) induziu aumento significativo na geração de ER após 1 hora de exposição e aumentou a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ após 1 e 3 horas de exposição. Foi também observado um aumento significativo na geração de hidroperóxidos lipídicos (marcador de peroxidação lipídica) e diminuição no conteúdo intracelular de GSH após 3 horas de exposição ao MZ. O tratamento com o antioxidante ácido ascórbico (50 μM) foi capaz de proteger as células do dano causado pelo MZ, sugerindo que um dos principais mecanismo de citotoxicidade envolvidos na perda de viabilidade das células parece ser o estresse oxidativo. A exposição ao MZ também causou diminuição do PMM após 3 horas de exposição, sugerindo um possível envolvimento da disfunção mitocondrial no mecanismo de toxicidade do agrotóxico. Em relação às citocinas, não houve detecção após a exposição ao MZ. Por fim, o MZ (6 μM) induziu dano ao DNA após 24 horas de exposição, sugerindo um efeito genotóxico do fungicida. Os resultados do estudo indicam que a exposição ao MZ induz distúrbios celulares compatíveis com eventos observados na DP, sugerindo uma possível relação entre a exposição ao agrotóxico e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como o Parkinson. Entretanto, esses resultados *in vitro* são preliminares e mais estudos são necessários para melhor estabelecer essa relação, bem como, para elucidar outros mecanismos celulares envolvidos na citotoxicidade do fungicida.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; Agrotóxicos; Mancozeb; Estresse Oxidativo; Disfunção Mitocondrial; Dano de DNA.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disorder of the central nervous system (CNS). It is characterized by the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra compacta, culminating in dopamine depletion in the striatum and decreased motor function. Its pathophysiology involves oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation. Despite aging being the main risk factor for developing PD, several studies have shown a relationship between occupational exposure to pesticides and an increased risk of developing idiopathic PD. Mancozeb (MZ) is a pesticide belonging to the class of ethylenebisdithiocarbamates (EBDCs), widely used in the country due to its great fungicidal potential and its low acute toxicity. Studies suggest that the use of EBDC pesticides in agriculture could contribute to the development of PD. However, there is still no evidence to support this association and, despite the extensive worldwide use of MZ, there is a limited number of studies investigating the neurotoxic effect of the fungicide. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity induced by the fungicide MZ, in cultures of SH-SY5Y human neuroblastoma cells, which have characteristics of dopaminergic neurons, and to evaluate cellular alterations related to PD. Cells were exposed to MZ (1 – 30 μM) and viability and cell death assays were performed at different exposure times. In addition, other parameters were evaluated, such as the generation of reactive species (RE), production of superoxide anion radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$), concentration of glutathione (GSH), lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential (PMM), levels of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) and evaluation of DNA damage. Exposure to MZ, for 24 hours, induced a decrease in cell viability, starting from a concentration of 6 μM and induced significant cell death from 15 μM . These cytotoxic effects of the fungicide were dependent on both exposure time and concentration. Furthermore, MZ (6 μM) induced a significant increase in ER generation after 1 hour of exposure and increased $\text{O}_2^{\cdot-}$ production after 1 and 3 hours of exposure. A significant increase in the generation of lipid hydroperoxides (a marker of lipid peroxidation) and a decrease in the intracellular GSH content after 3 hours of exposure to MZ was also observed. Treatment with the antioxidant ascorbic acid (50 μM) was able to protect cells from damage caused by MZ, suggesting that one of the main cytotoxicity mechanisms involved in the loss of cell viability seems to be oxidative stress. Exposure to MZ also caused a decrease in PMM after 3 hours of exposure, suggesting the possible involvement of mitochondrial dysfunction in the pesticide toxicity mechanism. Regarding cytokines, there was no detection after exposure to MZ. Finally, MZ (6 μM) induced DNA damage after 24 hours of exposure, suggesting a genotoxic effect of the fungicide. The results of the study indicate that exposure to MZ induces cellular disorders compatible with events observed in PD, suggesting a possible relationship between exposure to pesticides and the development of neurodegenerative diseases such as Parkinson's. However, these *in vitro* results are preliminary and further studies are needed to better establish this relationship, as well as to elucidate other cellular mechanisms involved in the cytotoxicity of the fungicide.

Keywords: Parkinson's disease; Pesticides; Mancozeb; Oxidative stress; Mitochondrial Dysfunction; DNA damage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação de formação dos DTCs	20
Figura 2. Fórmula estrutural do Etilenobisditiocarbamato de Manganês complexo com sal de zinco (Mancozeb).	20
Figura 3. Sítios de ação do MZ na célula fúngica.....	21
Figura 4. Metabolismo do MZ nos mamíferos	23
Figura 5. Fisiopatologia envolvida na morte celular na DP	29
Figura 6. Sistemas de defesa antioxidante	31
Figura 7. Efeitos da exposição ao MZ na viabilidade e morte das células SH-SY5Y.	51
Figura 8. Efeitos da exposição temporal ao MZ na viabilidade das células SH-SY5Y	53
Figura 9. Exposição temporal ao MZ e morte celular nas células SH-SY5Y	54
Figura 10. Morfologia das células SH-SY5Y após exposição temporal ao MZ	55
Figura 11. Avaliação da produção de ER em células SH-SY5Y expostas ao MZ	57
Figura 12. Avaliação da produção do radical ânion superóxido em células SH-SY5Y expostas ao MZ.....	58
Figura 13. Avaliação da geração de hidroperóxidos lipídicos em células SH-SY5Y expostas ao MZ.....	60
Figura 14. Avaliação da concentração de GSH em células SH-SY5Y expostas ao MZ	62
Figura 15. Efeito protetor do AA frente à toxicidade induzida pelo MZ.....	63
Figura 16. Efeitos da exposição ao MZ sobre PMM.....	65
Figura 17. Classificação dos danos no DNA nas células SH-SY5Y	67
Figura 18. Avaliação de dano no DNA após exposição ao MZ em células SH-SY5Y	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE	4-hidroxinonenal
AA	Ácido ascórbico
ATP	Adenosina Trifosfato
BHE	Barreira Hematoencefálica
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAT	Catalase
CIATox-SC	Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Santa Catarina
DA	Doença de Alzheimer
DAT	Transportador de dopamina
DCFH-DA	2',7'-Diacetato de diclorofluoresceína
DHE	Dihidroetídio
DMDs	Dimetilditiocarbamatos
DMEM-F12	Meio Eagle modificado por Dulbecco: mistura de nutrientes F12
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
DTCs	ditiocarbamatos
DTNB	Ácido 4-terc-butilbenzóico, 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)
EBDCs	etilenobisditiocarbamatos
EDA	Etileno Diamina
EDI	Etileno Dissocianato
ELISA	Imunoensaio Enzimático
EO	Estresse Oxidativo
ER	Espécies Reativas
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ETD	Etileno Bistiouram Dissulfeto
ETU	Etilenotiouréia
EU	Etilenouréia
FAPESC	Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação de Santa Catarina
FCCP	Carbonilcianeto-p-trifluorometoxifenilhidrazona
GCL	glutamato cisteína ligase

GPx Glutathione Peroxidase
GR glutathione reductase
GRx Glutathione reductase
GSH Glutathione
H₂O₂ Peróxido de hidrogênio
HBSS Hanks' Balanced Salt Solution
IBAMA Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IDT Índice de Dano Total
IL-1 β Interleucina 1 beta
IL-6 Interleucina 6
IP Iodeto de Propídio
IRA Insuficiência Renal Aguda
JC-1 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-iodeto de imidacarbocianina
LMP Low Melting Point
LMR Limites Máximos De Resíduos
LOO \cdot radical peroxila
MAO Monoamina oxidase
MAO-B Monoamina oxidase B
MDTCs Metilditiocarbamatos
Mn Manganês
MPP⁺ 1-metil-4-fenilpiridíniuim
MPTP 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetra-hidropiridina
MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-brometo) il)-2,5-difeniltetrazólio
MZ Mancozeb
NADPH Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NF- κ B *nuclear factor kappa B*
NMP Normal Melting Point
NO Óxido Nítrico
O₂ \cdot^- Ânion Superóxido
OH \cdot Radical hidroxil
ONOO \cdot Peroxinitrito
PARK Loci Gênicos associados a doença de Parkinson
PBDCs Propilenobisditiocarbamatos
PBS Phosphate-buffered saline

PINK-1 Quinase 1 induzida por PTEN
PMM Potencial de membrana mitocondrial
PRx Peroxirredoxinas
PUFAs Ácidos graxos poli-insaturados
RO[•] radical alcoxila
SC Santa Catarina
SFB Soro Fetal Bovino
SINAN Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNC Sistema Nervoso Central
SOD Superóxido Dismutase
TNF- α Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRx Tiorredoxinas
U.A. Unidades arbitrárias
UCH-L1 Ubiquitina carboxi-terminal hidrolase L1
UPS Sistema Ubiquitina-proteassoma

LISTA DE SÍMBOLOS

μ Micro

α Alfa

β Beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	AGROTÓXICOS – ASPECTOS GERAIS	16
1.2	DO DESENVOLVIMENTO DO PRIMEIRO FUNGICIDA AO SURGIMENTO DO MANCOZEB.....	17
1.3	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E MECANISMO DE AÇÃO DO MZ.....	19
1.4	TOXICOLOGIA DOS DITIOCARBAMATOS	22
1.4.1	Manganismo	24
1.5	ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA DE PARKINSON.....	25
1.5.1	Fisiopatologia da DP	26
1.5.1.1	<i>Alterações na genética</i>	27
1.5.1.2	<i>Estresse oxidativo e defesas antioxidantes</i>	28
1.5.1.3	<i>Disfunção mitocondrial</i>	33
1.5.1.4	<i>Neuroinflamação</i>	35
1.6	EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS E A DP	36
2	JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVO GERAL	39
4	METODOLOGIA	40
4.1	REAGENTES	40
4.2	CULTIVO CELULAR:	40
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	40
4.4	ENSAIOS DE VIABILIDADE E MORTE CELULAR	41
4.5	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO	42
4.5.1	Produção de espécies reativas (ER)	42
4.5.2	Produção do radical ânion superóxido (O₂^{•-})	43
4.5.3	Análise da ocorrência de peroxidação lipídica de membrana	44
4.5.4	Determinação do conteúdo de tióis não proteicos (NPSH)	45
4.5.5	Avaliação da proteção do ácido ascórbico na perda de viabilidade causada pela exposição ao MZ	46
4.6	PARÂMETROS DE FUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	46
4.6.1	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)	46
4.7	DOSAGEM DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS.....	47
4.8	AVALIAÇÃO DE DANO AO DNA.....	48

4.9	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	50
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	CITOTOXICIDADE DO MZ EM CÉLULAS SH-SY5Y	51
5.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO TEMPORAL AO MZ EM CÉLULAS SH-SY5Y.....	52
5.3	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MZ SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS EM CÉLULAS SH-SY5Y.....	56
5.4	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MZ SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CÉLULAS SH-SY5Y.....	59
5.5	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MZ SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GSH EM CÉLULAS SH-SY5Y	61
5.6	ANÁLISE DO EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO ASCÓRBICO FRENTE À TOXICIDADE INDUZIDA PELO MZ.....	62
5.7	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL APÓS EXPOSIÇÃO AO MZ EM CÉLULAS SH-SY5Y	64
5.8	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MZ EM MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM CÉLULAS SH-SY5Y	66
5.9	AVALIAÇÃO DE DANO NO DNA INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO AO MZ EM CÉLULAS SH-SY5Y.....	67
6	CONCLUSÃO	70
6.1	PERSPECTIVAS FUTURAS:.....	70
	REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 AGROTÓXICOS – ASPECTOS GERAIS

Os agrotóxicos, anteriormente conhecidos como defensivos agrícolas, são compostos utilizados na agricultura devido às suas propriedades inseticidas, herbicidas, rodenticidas e fungicidas. São substâncias amplamente utilizadas no mundo, e por serem responsáveis por inúmeros casos de intoxicação, são de grande interesse no estudo da toxicologia (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

Desde 2008, o Brasil é considerado o maior consumidor de produtos agrotóxicos do mundo. De acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), no ano de 2021, foram comercializadas 720,87 mil toneladas de agrotóxicos no Brasil. No estado de Santa Catarina (SC) a comercialização destes compostos saltou de 5.395,93 toneladas no ano 2000 para 13.564,45 toneladas em 2021 (aumento de 251%). Os fungicidas são a segunda classe mais utilizada em todo o Brasil, perdendo apenas para os herbicidas, totalizando mais de 128 mil toneladas de ingredientes ativos comercializados. Em SC foram utilizadas 2.762,32 toneladas de fungicidas em 2021 (IBAMA, 2022).

Entre os cinquenta agrotóxicos mais utilizados nas lavouras brasileiras, pelo menos 22 são proibidos em países da União Europeia por serem enquadrados na escala máxima de toxicidade (CARNEIRO *et al.*, 2015). O uso estimulado e indiscriminado desses compostos em nosso país vem acarretando em elevados índices de intoxicações, seja no campo ou em áreas urbanas.

De acordo com o Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos, no Brasil, de 2007 a 2015 foram realizadas 84.206 notificações de intoxicações por agrotóxicos no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), 4.220 dessas notificações são pertencentes ao estado de SC (Ministério da Saúde; 2021). Dados do Centro de Informação e Assistência Toxicológica de Santa Catarina (CIATox-SC) revelaram que no ano de 2021 foram registrados 657 casos de intoxicações pelo uso de agrotóxicos no nosso estado, sendo 258 destas por motivo acidental, 187 em tentativas de suicídio e 96 por exposição ocupacional (HU-UFSC, 2022).

Em relação à população exposta no país, trabalhadores(as) agrícolas são a maioria, seguidos dos estudantes e das donas de casa. Além disso, a maioria dos

casos concentra-se em pessoas do sexo masculino. A faixa etária predominante nas intoxicações por agrotóxicos no Brasil é de 20 a 34 anos e, em SC, de 20 a 59 anos (SINAN, 2018; HU-UFSC, 2020). Considerando o período de 2015 a 2018, a maioria dos casos de intoxicação ocorreu por exposição aguda única, e apenas 1,4% por exposição crônica. Entre as vias de exposição predominaram as vias digestiva, respiratória e cutânea. Vale ressaltar que, neste mesmo período, ocorreram 21 casos de intoxicação por via transplacentária, atingindo uma população com alta vulnerabilidade, sujeita a riscos irreversíveis (SINAN, 2018).

No ano de 2022, 465 notificações de intoxicação exógena por agrotóxico no estado de SC foram registradas no SINAN (SINAN, 2023). Em relação à letalidade dos casos envolvendo a exposição a agrotóxicos em SC, em 2021, correspondeu a 16,8 a cada 1.000 atendimentos de indivíduos expostos a esse grupo de agentes (HU-UFSC, 2022).

Além das intoxicações agudas, outra importante forma de exposição aos agrotóxicos é a exposição ocupacional, que ocorre principalmente no setor agropecuário. Essas exposições ocupacionais geralmente ocorrem de forma crônica, ou seja, em pessoas expostas por períodos prolongados a baixas concentrações desses compostos. Existem diversos estudos na literatura que mostram uma associação entre a exposição crônica à agrotóxicos com o desenvolvimento de diversas doenças, como as doenças neurodegenerativas, câncer, infertilidade, problemas neurocomportamentais, alergias, diabetes e disbiose intestinal (KIM; KABIR; JAHAN, 2017; BURALLI; DULTRA; RIBEIRO, 2020; GAMA; NEVES; PEREIRA, 2022). Além da exposição ocupacional, a contaminação ambiental e alimentar coloca em risco outros grupos além dos agricultores, como os seus familiares, moradores próximos às unidades produtivas, bem como a população em geral, através do consumo de alimentos e/ou água contaminados.

1.2 DO DESENVOLVIMENTO DO PRIMEIRO FUNGICIDA AO SURGIMENTO DO MANCOZEB

Desde o momento em que as plantas foram domesticadas, os homens que tentam cultivá-las têm que elaborar técnicas de prevenção e manejo de pragas. Ao longo do tempo, com o crescimento do número de habitantes e a maior demanda por alimento por parte da população, cada vez mais aumenta-se o número de hectares de

cultivo, aumentando assim a demanda por compostos que protejam e aumentem a produção dessas culturas.

O primeiro fungicida foi descoberto em 1807, por B. Prevost, quando este observou que uma fraca solução de sulfato de cobre prevenia o crescimento de esporos. Em 1885, um fazendeiro na região de Bordeaux na França descreveu efetividade em uma mistura de sulfato de cobre e cal para tratamento foliar de fungos. Essa mistura ficou conhecida como Mistura Bordeaux, e incentivou a investigação de novos compostos para aplicação foliar (KLITTICH *et al.*, 2008).

Em 1915 surgiu o primeiro composto sintetizado em laboratório, considerado fungicida de amplo espectro. Esses fungicidas possuíam estruturas orgânicas, e seu primeiro representante foi o cloro (2-hidroxifenil) mercúrio. Após, foram desenvolvidos para comercialização o 2-metoxietil silicato e os sais de acetato de 2-hidroxifenil mercúrio, além de outros. O desenvolvimento de resistência por parte de alguns fungos, e além disso, o fato de serem estruturas baseadas em mercúrio e apresentarem alta toxicidade ambiental, acabaram levando ao seu desuso após o surgimento de outras alternativas mais seguras (KLITTICH *et al.*, 2008).

Os compostos bisditiocarbamatos, derivados do ácido ditiocarbâmico, eram utilizados como aceleradores do processo de vulcanização da borracha e foram sintetizados a partir de uma monoamina e um dissulfeto de carbono (MCCALLAN *et al.*, 1967). Após algum período, observou-se que esses compostos possuíam propriedades fungicidas e, então, em 1934, Tisdale e Williams conseguiram uma patente do dissulfeto de tetrametiluram, cujo nome comercial é Tiram (GULLINO *et al.*, 2010). A partir de 1940 o Tiram passou a ser comercializado para tratamento de sementes, porém ele não tinha muita efetividade na aplicação foliar, o que estimulou a criação de novos compostos, com maior atividade, que também eram derivados do ácido ditiocarbâmico. O dimetilditiocarbamato de ferro (III) (ferbam) foi desenvolvido e, posteriormente, o dimetilditiocarbamato de zinco (ziram), cuja estrutura era similar ao ferbam, também veio ao mercado (GULLINO *et al.*, 2010).

Em 1940, W. F. Hester da Rohm and Haas, Inc., preparou um ditiocarbamato a partir de uma diamina. Esse composto era o etilenobisditiocarbamato dissódico cujo nome comercial era Nabam. O Nabam é considerado o primeiro da classe dos etilenobisditiocarbamatos (EBDCs). A patente do Nabam foi registrada em 1943. Ele era instável em sua forma sólida e, portanto, era utilizado em forma líquida. Após 13 anos do início de seu uso, descobriu-se que ele não tinha propriedades fungicidas por

si só, era necessário a exposição do Nabam ao ar, para que fosse gerado um composto fitotóxico (GULLINO *et al.*, 2010).

Em 1944, Heuberger e Manns descobriram que ao adicionar sulfato de zinco ao tanque de spray de Nabam, este adquiria uma forma estável, dando origem ao produto comercializado sob o nome de Dithane D-14. O composto originado, também conhecido como Zineb, foi o etilenobisditiocarbamato de zinco. Em 1945 o Zineb passou a ser considerado uma molécula estável e com boas propriedades fungicidas, já sendo utilizado em plantações de batata, ele passou a ser comercializado sob o nome de Dithane Z-78 (GULLINO *et al.*, 2010).

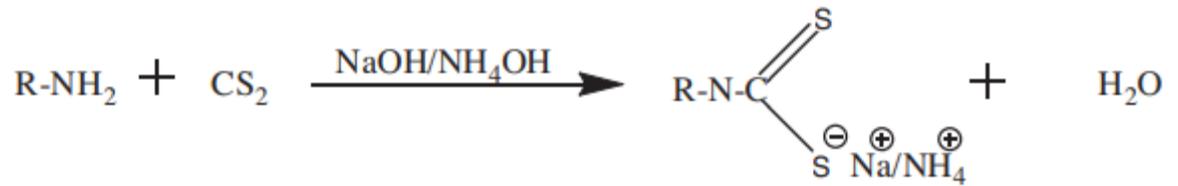
Sempre em busca de melhorias, em 1950 Dupont registrou uma patente sobre o produto etilenobisditiocarbamato de manganês, o Maneb. Este por sua vez era mais ativo que o Nabam e Zineb. Já em 1962, Rohm e Haas registraram o complexo de íons de zinco com Maneb, o Mancozeb (MZ), que posteriormente se tornaria o mais importante de todos os EBDCs (KLITTICH *et al.*, 2008).

Atualmente, o MZ é o fungicida EBDC mais vendido, com ampla utilização no mundo. De acordo com dados do Ibama, em 2021, o MZ foi o terceiro agrotóxico mais comercializado no Brasil, perdendo apenas para o glifosato e 2,4-D. Somente em SC foram comercializadas 1.294,03 toneladas deste ingrediente ativo, fazendo com que o MZ ocupasse a segunda posição na lista de ingredientes ativos de agrotóxicos mais vendidos em nosso estado (IBAMA, 2022). Apesar da maciça utilização do MZ no Brasil, na União Europeia, a licença para utilização do fungicida como princípio ativo de agrotóxicos foi encerrada em janeiro de 2021 (COCCO, 2022). Essa decisão foi baseada em possíveis propriedades carcinogênicas dos fungicidas EBDCs, o que contrasta a classificação da Agência Nacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer*) que classifica os fungicidas EBDCs no Grupo 3 (não classificável quanto à carcinogenicidade humana) (IARC 1992).

1.3 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E MECANISMO DE AÇÃO DO MZ

O MZ é pertencente à classe química dos ditiocarbamatos (DTCs). Os DTCs são formados através de uma reação exotérmica entre dissulfeto de carbono e amônio ou uma amina primária/secundária na presença de hidróxido de sódio ou excesso de amina. São derivados do ácido ditiocarbâmico ($\text{NH}_2\text{CS}_2\text{H}$) (KANCHI; SINGH; BISETTY, 2014).

Figura 1. Reação de formação dos DTCs

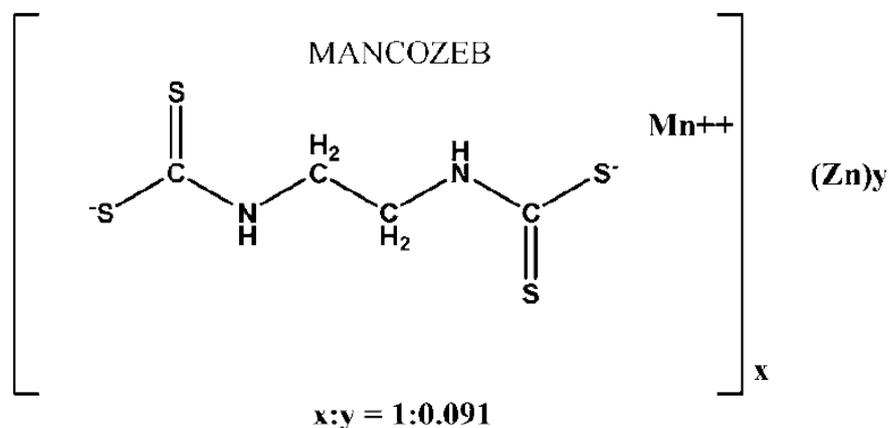


Fonte: Adaptado de KANCHI; SINGH; BISETTY, 2014.

De acordo com o elemento que forma o complexo com o esqueleto organossulfurado, os DTCs são divididos em 4 subclasses.

- Metilditiocarbamatos (MDTCs): Metam-sódico (Na);
- Dimetilditiocarbamatos (DMDs): Ziram (Zn), Ferbam (Fe) e Tiram;
- Propilenobisditiocarbamatos (PBDCs): Propinebe (Zn);
- Etilenobisditiocarbamatos (EBDCs): Maneb (Mn), Zineb (Zn), Nabam (Na), Metiram (Zn), Mancozeb (Mn e Zn).

Figura 2. Fórmula estrutural do Etilenobisditiocarbamato de Manganês complexo com sal de zinco (Mancozeb).



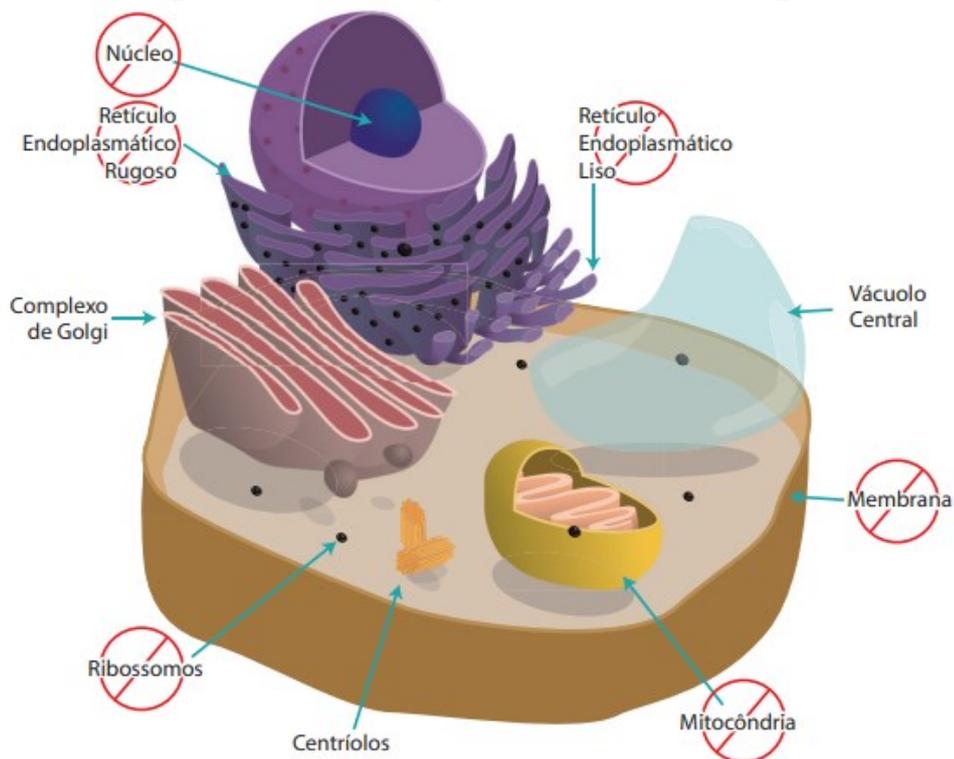
Fonte: Adaptado de GUILLINO *et al.*, 2010.

Os complexos de DTCs com metais pesados são preparados por adição de uma solução do metal pesado a uma solução de amônio ou metal alcalino-DTC. Esses complexos são pouco solúveis em água, e sua solubilidade melhora em solventes orgânicos não polares como clorofórmio, tetracloreto de carbono e éter (KANCHI; SINGH; BISETTY, 2014.)

O MZ, é pertencente à subclasse dos EBDCs, sendo complexado com 20% de manganês e 2-5% de zinco (Figura 2). Sua fórmula é $(C_4H_6N_2S_4Mn)_x (Zn)_y$ e apresenta-se como um pó amarelo-cinza. Possui baixa solubilidade em água e na maioria dos solventes orgânicos. É autorizado para uso no Brasil como fungicida e acaricida (ANVISA, 2022).

O MZ é autorizado para 71 culturas de alimentos no Brasil e possui limites máximos de resíduos (LMR) e tempos de aplicação que variam de acordo com cada cultura. A aplicação é foliar, mas também pode ocorrer a imersão de frutos, como mamão, manga e melão, e também no sulco de plantio, como na cana-de-açúcar (ANVISA, 2022). É comercializado em formulações líquidas ou em pó, com os nomes comerciais Manzate® WR e Dithane® NT.

Figura 3. Sítios de ação do MZ na célula fúngica



Fonte: Adaptado de BALARDIN *et al.*, 2017.

Legenda: A classificação do MZ como fungicida multissítio se dá pela sua ação em múltiplos processos fisiológicos na célula fúngica.

O MZ é um fungicida de amplo espectro com ação multissítio, ou seja, age em diversos passos no metabolismo fúngico (BALARDIN *et al.*, 2017), conforme ilustrado na Figura 3. Estudos mostram que não é a molécula do MZ em si que é tóxica ao

patógeno, mas sim seus subprodutos de degradação que serão abordados na próxima seção (GULLINO *et al.*, 2010).

1.4 TOXICOLOGIA DOS DITIOCARBAMATOS

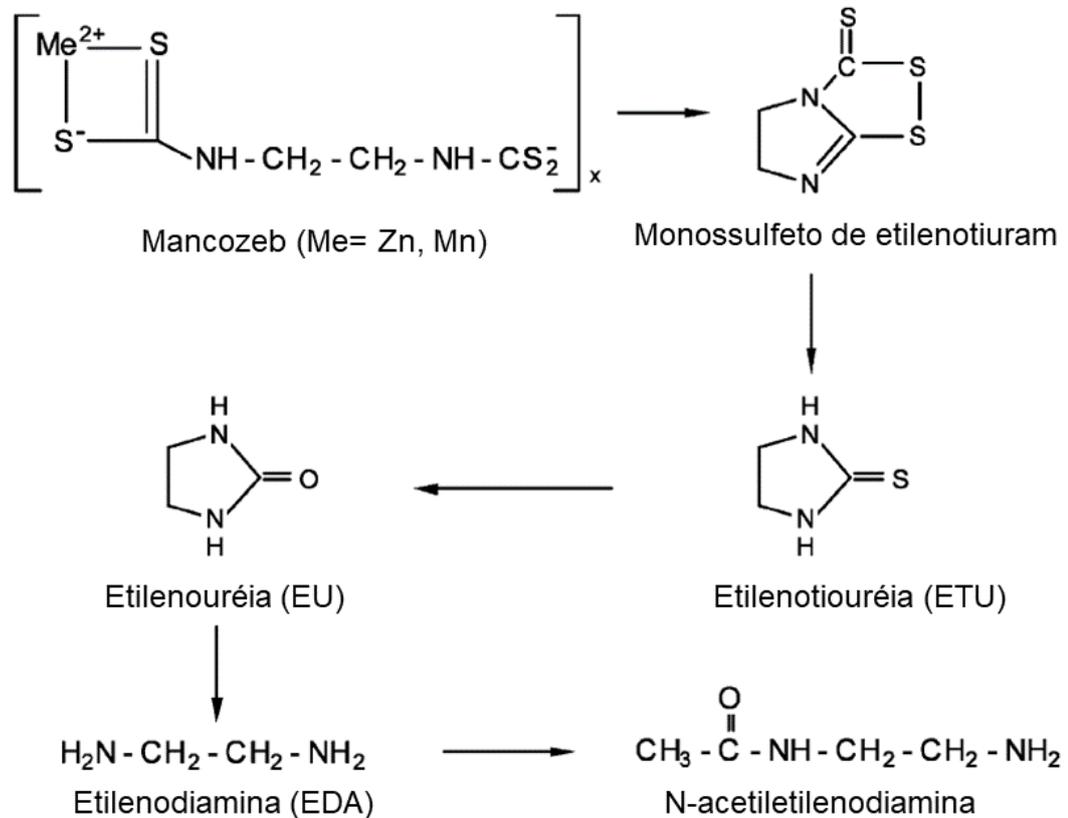
Os DTCs são compostos irritantes das mucosas e da pele. Casos de intoxicação sistêmica em humanos são raros, já que sua absorção é variada e variável entre os compostos desse grupo, mas podem ocorrer após exposição a altas doses, principalmente pela via dérmica e respiratória (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008; ECOBICHON, 2001). Os sintomas da intoxicação incluem fraqueza muscular, tontura, fadiga, dificuldade de andar, tremores e coma. Alguns desses sintomas estão associados à presença do manganês na composição do Maneb e também do MZ, onde o acúmulo deste metal pode dar origem a uma síndrome conhecida como manganismo, que é uma condição com características fenotípicas semelhantes a doença de Parkinson idiopática (PERL E OLANOW, 2007). O manganismo afeta os neurônios dopaminérgicos em regiões como estriado, globo pálido e substância negra (FITSANAKIS *et al.*, 2006; BOUABID *et al.*, 2016).

Os EBDCs são compostos instáveis em meio alcalino ou ácido, e na presença de oxigênio, decompõem-se em água, formando subprodutos diversos, sendo a etilenotiouréia (ETU) um dos subprodutos mais importantes (GULLINO *et al.*, 2010; IPCS, 1988).

A intoxicação pelos EBDCs está relacionada à exposição aos seus produtos de metabolização. Na decomposição metabólica dos EBDCs, inicialmente, há formação de dissulfeto de carbono (CS_2) ou sulfeto de hidrogênio (H_2S). Além destes metabólitos, ainda são produzidos etileno bistiouram dissulfeto (ETD), etileno diisocianato (EDI), etileno diamina (EDA), 2-imidazolina, etilenouréia (EU) e ETU (IPCS, 1988; BALARDIN *et al.*, 2017) (Figura 4).

A ETU é uma tioamida heterocíclica e a sua presença no meio ambiente está associada ao uso dos fungicidas EBDCs, como o MZ, maneb, zineb e metiram (MELLO, 2014). No metabolismo dos mamíferos, cerca de 15-48% do MZ é convertido em ETU, sendo esta excretada pela urina (SOMERVILLE, 1986). Este metabólito está presente como contaminante nas formulações comerciais de EBDCs e também pode ser produzido durante o armazenamento, cozimento ou no próprio alimento contaminado com resíduos de EBDCs (IPCS, 1988; BLAZQUEZ, 1973).

Figura 4. Metabolismo do MZ nos mamíferos



Fonte: Adaptado de COLOSIO et al., 2002.

Legenda: Decomposição metabólica do MZ nos mamíferos em Monossulfeto de etilenotiamina, que sofre reações para se transformar em Etilenotiamina (que possui alta toxicidade), posteriormente em Etilenouréia, Etilendiamina e por fim em N-acetil-etilendiamina.

Alguns efeitos em animais vêm sendo relacionados à exposição à ETU, como disfunção tireoidiana com consequente aumento da glândula tireóide, efeitos teratogênicos e carcinogênicos, além de redução de peso em filhotes, redução da ninhada e do número de filhotes viáveis em roedores (EPA, 1992; GRAHAM *et al.*, 1975; HARDIN *et al.*, 1987; MARANGHI *et al.*, 2013). EBDCs são teratogênicos em ratos, camundongos e hamsters, mas não em gatos (SHERMAN; ZAPP, 1966). Nos ratos e hamsters expostos, malformações cerebrais foram as predominantes (KHERA, 1973; KHERA; IVERSON, 1981). Em humanos a ETU já foi associada a efeitos goitrogênicos em trabalhadores expostos a EBDCs (SMITH, 1984).

Além disso, um caso isolado de intoxicação aguda foi reportado em um homem de 62 anos que desenvolveu insuficiência renal aguda (IRA) após a aplicação

de Maneb, mas o indivíduo possuía diversas comorbidades associadas, então não foi estabelecida uma ligação causal direta (KOIZUMI *et al.*, 1979). Casos de eritema difuso e epidermatite eczematóide das pálpebras e regiões inguinais, foram observados entre os trabalhadores agrícolas expostos ao Maneb e ao Zineb (BABINI, 1966; CRIPA *et al.*, 1990).

Em relação à toxicidade do MZ, o mesmo apresenta classificação toxicológica III, segundo a legislação brasileira; ou seja, é medianamente tóxico. Quanto ao potencial de periculosidade ambiental, pertence à classe II, ou seja, é muito perigoso (Brasil, 1992).

Estudos anteriores, em modelos *in vivo* utilizando roedores, demonstraram que a exposição ao MZ induz hepatotoxicidade (URIBE *et al.*, 2023), está relacionado a surgimento de tumores no fígado, pâncreas, mamas, tireoide e ossos (BELPOGGI *et al.*, 2006), além de causar disfunções endócrinas na tireoide e também disfunção reprodutiva (SKALNY *et al.*, 2021). A maior parte dos estudos relaciona esses efeitos ao metabólito ETU, mas um outro mecanismo de toxicidade associado ao MZ será discutido no próximo item.

1.4.1 Manganismo

Como citado nos itens anteriores, os EBDCs têm metais pesados em sua composição. O MZ e também o Maneb possuem em sua estrutura química o metal manganês (Mn). O Mn é um dos metais mais abundantes nos tecidos de mamíferos, exercendo papel importante em processos essenciais atuando como catalisador, co-fator enzimático e modulador de genes.

O Mn é um elemento necessário para uma variedade de processos fisiológicos, incluindo o desenvolvimento cerebral e esquelético, coagulação do sangue, reprodução, função neuronal, defesa antioxidante e manutenção da integridade imunológica (HORNING *et al.*, 2015). Entretanto, a exposição a altas concentrações de Mn resulta em efeitos deletérios para a saúde. Estudos têm demonstrado uma relação entre a concentração de Mn no cérebro com o desenvolvimento de neuropatologias como a Doença de Alzheimer (DA) e Doença de Parkinson (DP). (TONG *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2019).

O acúmulo de Mn no cérebro é chamado de manganismo, que é uma condição com características fenotípicas semelhantes a DP idiopática (PERL E OLANOW,

2007). O manganismo afeta os neurônios dopaminérgicos em regiões como estriado, globo pálido e substância negra (FITSANAKIS *et al.*, 2006; BOUABID *et al.*, 2016).

Uma síndrome parkinsoniana foi descrita em dois jovens agricultores expostos cronicamente ao Maneb (FERRAZ *et al.*, 1988). Posteriormente, um estudo realizado com 50 trabalhadores da agricultura com exposição crônica observou um aumento significativo da incidência de vários efeitos neurológicos (rigidez de punho, fadiga e queixas de perda de memória) e também aumento de uma variedade de outros sintomas semelhantes a sintomas observados na DP, incluindo tremor, ataxia e bradicinesia (HOUETO; BINDOULA; HOFFMAN, 1995).

Domico e colaboradores mostram que a exposição aguda de culturas primárias de neurônios mesencefálicos (predominantemente neurônios dopaminérgicos) ao MZ causou toxicidade, a qual foi correlacionada com disfunção mitocondrial (DOMICO *et al.*, 2006). Outro estudo mostrou uma maior vulnerabilidade de neurônios dopaminérgicos frente à exposição ao MZ em um modelo *in vivo* com o nematódeo *C. elegans* (NEGGA *et al.*, 2011; BRODY *et al.*, 2013). Em conjunto, esses estudos mostram uma possível toxicidade dopaminérgica do MZ. Entretanto, os mecanismos moleculares neurotóxicos envolvidos na ação do fungicida na DP ainda não estão claros.

1.5 ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva, caracterizada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos que se projetam da substância negra *pars compacta* para o núcleo caudado e putamen, resultando em diminuição nas concentrações do neurotransmissor dopamina nessas regiões, levando a alterações fisiopatológicas nos circuitos dos gânglios da base, que causam uma diminuição dos movimentos voluntários (SAMII; NUTT; RANSOM, 2004; BRAAK *et al.*, 2003). O marcador citopatológico da DP é a presença de corpos de Lewy, que são formados por acúmulos da proteína alfa-sinucleína (GOEDERT; JAKES; SPILLANTINI, 2017).

A primeira publicação sobre a DP foi escrita por James Parkinson, um médico de Londres, em 1817, cujo título era “um ensaio sobre a paralisia agitante” (SAMII; NUTT; RANSOM, 2004). Nesta publicação ele descreveu a presença dos principais sintomas da DP, que são tremor de repouso, rigidez e bradicinesia, além de

alguns sintomas mentais que também foram notados (TYSNES; STORSTEIN, 2017). Hoje, sabe-se que a DP pode apresentar outros sintomas motores e também não-motores (SAMII; NUTT; RANSOM, 2004). Dentre os sintomas não-motores mais frequentemente encontrados, destacam-se disfunção autonômica, distúrbios de sono, declínio cognitivo, depressão e dor (SAMII; NUTT; RANSOM, 2004; GARCÍA *et al.*, 2019).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa do sistema nervoso central (SNC) mais comum, precedida apenas pela Doença de Alzheimer (TYSNES; STORSTEIN, 2017). Estima-se que no ano de 2016, havia aproximadamente 6,1 milhões de pessoas afetadas pela DP no mundo, e esse número tem aumentado rapidamente nas últimas décadas (FEIGIN *et al.*, 2019). A prevalência da DP é de 1-2 para cada 1000 pessoas e a doença afeta cerca de 1% da população acima de 60 anos (VON CAMPENHAUSEN *et al.*, 2005; LAU; BRETELER, 2006). A DP é rara antes dos 50 anos, mas existem casos em que os sintomas se desenvolvem entre 21 e 40 anos e, para estes casos (cerca de 5% dos pacientes com DP), a doença recebe o nome de Doença de Parkinson de início jovem (MUTHANE *et al.*, 1994; GOLBE, 1991). Apesar de afetar ambos os sexos, a DP tem uma incidência menor em mulheres. Por ser uma doença relacionada a idade, sua prevalência e incidência aumentam com o aumento da idade do paciente (PRINGSHEIM *et al.*, 2014).

1.5.1 Fisiopatologia da DP

A fisiopatologia da DP está relacionada basicamente com 3 fatores: Genética, ambiente e as interações entre os mesmos. Apenas 5-10% dos casos de DP possuem uma origem genética e são conhecidos como DP familiar. A maioria dos casos de DP (cerca de 90%) são classificados como DP de origem idiopática ou esporádica, sendo provavelmente resultado de efeitos combinados de múltiplos fatores ambientais, incluindo predisposição, exposição a agrotóxicos, exposição a metais pesados e envelhecimento (CHERIAN; DIVYA, 2020). O envelhecimento é o principal fator de risco para desenvolvimento de DP. A própria idade do paciente está relacionada à uma diminuição na presença de neurônios na substância negra *pars compacta* (MCGEER; MCGEER; SUZUKI, 1977). A perda das células dopaminérgicas causa uma depleção de dopamina no estriado, levando a um desequilíbrio entre as vias diretas (facilitadoras) e indiretas (inibidoras) nos gânglios da base, resultando em

bradicinesia (TINKHAUSER *et al.*, 2017). Apesar de cada indivíduo com DP apresentar sintomas próprios, algumas características fisiopatológicas são comuns à maioria dos pacientes, e envolvem mecanismos bioquímicos como por exemplo, neuroinflamação, estresse oxidativo (EO) e/ou disfunção mitocondrial (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021). Na figura 5 são apresentados os mecanismos fisiopatológicos relacionados à neurodegeneração na DP.

1.5.1.1 Alterações na genética

As formas monogênicas da DP são relativamente raras, mas, durante o diagnóstico, torna-se essencial diferenciar as alterações genéticas da DP idiopática, visto que ao identificar a mutação pode-se estabelecer, com certeza, o diagnóstico de DP. Além disso, pode ser feito um aconselhamento genético para futuras gerações e também podem ser desenvolvidas terapias visando genes específicos (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021).

Cerca de 15% dos pacientes com DP têm um parente de primeiro grau com a doença (PAYAMI *et al.*, 1994). Já foram descritos vários genes e locus gênicos, associados a herança autossômica ou recessiva, são eles: PARK-1 (SNCA), PARK-2 (Parkin), PARK-3, PARK-4, PARK-5 (Ubiquitin C-terminal hydrolase L1), PARK-6, PARK-7 (proteína DJ1), PARK-8 (LRRK-2), PARK-9 (ATP13A2) e PARK-10 (SAMI; NUTT; RANSOM, 2004). Abaixo serão discutidos alguns aspectos sobre alguns desses genes.

O primeiro gene que foi ligado com a DP familiar, foi o PARK-1, que codifica a proteína alfa-sinucleína (POLYMERPOULOS *et al.*, 1997). Ainda não se conhece a função exata dessa proteína, mas sabe-se que ela é um dos componentes presentes nos corpos de Lewy (SPILLANTINI *et al.*, 1997). Alguns estudos apontam para um papel da alfa-sinucleína na liberação de neurotransmissores, como a dopamina (PEREZ *et al.*, 2002; FORTIN *et al.*, 2010) e na regulação da produção de dopamina através de uma interação com a enzima tirosina hidroxilase (PERES *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2008).

O segundo gene foi o PARK-2, que codifica a proteína Parkina, responsável pela degradação de proteínas intracelulares (KITADA *et al.*, 1998). A Parkina, uma ubiquitina-proteína ligase, é responsável pela ubiquitinação da alfa-sinucleína. Esta ligação da ubiquitina promove sinalizações intracelulares para a degradação da

proteína onde ela está ligada (SHIMURA *et al.*, 2001). Estes achados levam a considerar que uma falha no sistema ubiquitina-proteossoma ligase (UPS) é um denominador comum na patogênese da DP (MCNAUGHT *et al.*, 2001).

O terceiro gene foi o PARK-5, que codifica a ubiquitina carboxi-terminal hidrolase L1 (UCH-L1). Essa enzima hidrolisa ligações entre moléculas de ubiquitina e gera moléculas monoméricas necessárias para rotular proteínas anormais, sinalizando-as para degradação pelos proteossomas (LEROY *et al.*, 1998).

O quarto gene, PARK-7, está ligado a uma herança recessiva, e o desenvolvimento de sintomas precoces da DP. Este gene codifica a proteína DJ-1, que está ligada a uma resposta a EO (SAMII; NUTT; RANSOM, 2004). A proteína DJ-1 regula vias antioxidantes, anti-apoptóticas e anti-inflamatórias (KAHLE; WAAK; GASSER, 2009). A depleção de DJ-1 leva a alterações na morfologia mitocondrial, fragmentação, diminuição do potencial de membrana mitocondrial, acumulação de marcadores de autofagia e redução de níveis de ATP (THOMAS *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012). Além disso, a DJ-1 aumenta os níveis celulares de glutatona pelo aumento da expressão da enzima glutamato cisteína ligase (ZHOU; FREED, 2005).

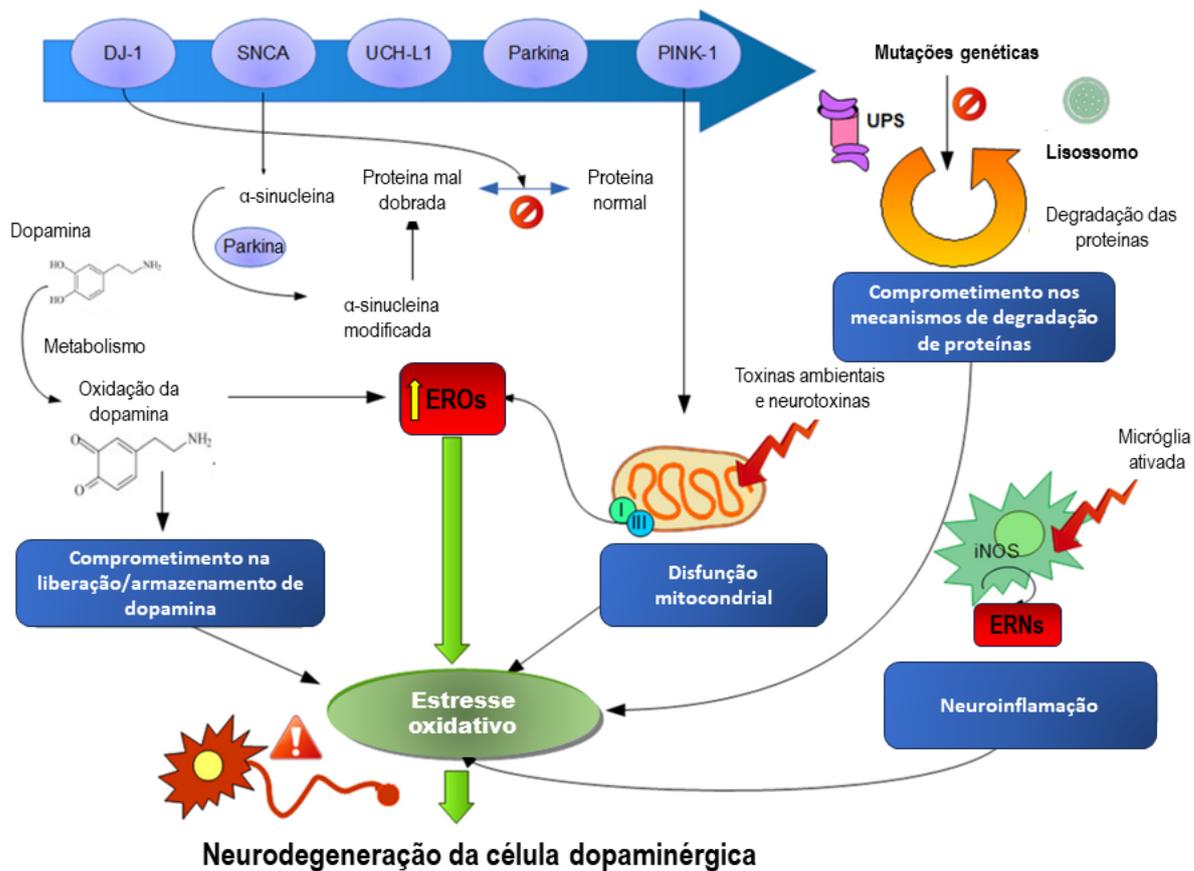
O último gene, PARK-6, está associado a mutações na quinase 1 induzida por PTEN (PINK-1), que está situada na mitocôndria e parece estar associada a um efeito protetor contra a disfunção mitocondrial induzida pelo EO (VALENTE *et al.*, 2004). A PINK-1 faz com que a Parkina se ligue a mitocôndrias despolarizadas, com o objetivo de induzir a autofagia (YOULE; BLIEK, 2012). Além de sua interação com a Parkina, PINK-1 também tem ação neuroprotetora contra o EO através de sua interação com a proteína DJ-1 (TANG *et al.*, 2006).

1.5.1.2 *Estresse oxidativo e defesas antioxidantes*

O cérebro consome cerca de 20% do suprimento de oxigênio do organismo humano e uma porção significativa desse oxigênio é convertida em espécies reativas de oxigênio (EROs). Esta afirmação pode explicar um pouco sobre a relevância que as EROs têm na patogênese da DP (JOHNSON; WILSON-DELFOSSÉ; MIEYAL, 2012). Além disso, o cérebro tem uma menor quantidade de enzimas destruidoras de EROs, e uma riqueza em relação a lipídios insaturados, que podem propagar danos por produtos reativos da peroxidação lipídica (DRINGEN, 2000), tornando este órgão suscetível a danos oxidativos. Dados na literatura indicam que, em estágios iniciais

da DP, o EO já se apresenta como uma característica importante, mesmo antes de ocorrer uma significativa morte de neurônios dopaminérgicos, indicando que a geração “descontrolada” de EROs não parece ser apenas um evento secundário à progressiva neurodegeneração, mas sim é um evento que leva à morte neuronal na DP (Figura 5) (FERRER *et al.*, 2010; TRIST; HARE; DOUBLE, 2019).

Figura 5. Fisiopatologia envolvida na morte celular na DP



Fonte: Adaptado de BLESA *et al.*, 2015.

Legenda: Diferentes vias e suas disfunções resultantes de modificações genéticas em genes relacionados à DP levam a um aumento do EO. Mutações ou a expressão alterada de proteínas resultam em um comprometimento mitocondrial, EO e dobramento proteico incorreto, contribuindo para o EO. O metabolismo da dopamina pode levar a oxidação da mesma em quinonas reativas contribuindo para o aumento dos níveis de EROs. Toxinas ambientais prejudicam a função mitocondrial, aumentam a geração de radicais livres e levam a agregação de proteínas, incluindo α -sinucleína. A disfunção mitocondrial por inibição do complexo I aumenta o EO e causa um declínio na produção de ATP, levando a danos nos componentes intracelulares, culminando em morte celular. Além disso, mecanismos neuroinflamatórios podem contribuir para a cascata de eventos que levam à morte celular. Em resumo, o estresse oxidativo exerce um papel central em todos esses mecanismos celulares, os quais estão implicados na degeneração dos neurônios dopaminérgicos na DP.

A geração de EROs no SNC é proveniente de múltiplas fontes. As EROs podem ser provenientes de vazamento de elétrons da cadeia transportadora de

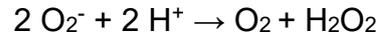
elétrons. O ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são subprodutos das reações das enzimas do complexo I (NADH desidrogenase) e do complexo III mitocondrial (Citocromo C redutase) (RIGOULET *et al.*, 2011). O H_2O_2 é também produzido naturalmente pela ação da enzima monoamina oxidase (MAO). Nos neurônios dopaminérgicos, a dopamina, por exemplo, é oxidada pela MAO-B, com a concomitante produção de H_2O_2 (NAGATSU; SAWADA, 2006). A dopamina também pode ser oxidada em dopamina-*o*-quinona pela ação de enzimas como a tirosinase, cicloxigenase ou por ferro férrico (Fe^{3+}), com a geração de H_2O_2 e O_2^- (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019). Além disso, a auto oxidação da dopamina também pode gerar EROs (H_2O_2 , O_2^- , OH^\bullet), bem como dopamina-*o*-quinonas pro-oxidantes e outras neurotoxinas (SUN *et al.*, 2018). Isso é relevante na DP pois a oxidação da dopamina ocorre primariamente na substância negra, onde a morte de neurônios está relacionada ao EO (JOHNSON; WILSON-DELFOSSE; MIEYAL, 2012).

Além das fontes geradoras das EROs, o SNC também tem um suprimento grande de óxido nítrico (NO), devido a presença da enzima óxido nítrico sintase neuronal (NNOS), levando a produção das espécies reativas de nitrogênio (ERNs). O O_2^- e o NO não são altamente reativos, mas a combinação proveniente dos dois gera o peroxinitrito ($ONOO^-$) que é altamente tóxico (BECKMAN, 2006). Assim como as EROs, o ($ONOO^-$) leva a oxidação de proteínas, lipídios e DNA. A peroxidação lipídica, por sua vez, leva a formação de aldeídos reativos, como o 4-hidroxinonal (4-HNE) que inibe a atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPx) e exacerba o EO (JOHNSON; WILSON-DELFOSSE; MIEYAL, 2012).

Estudos mostram que o Mn presente na estrutura do MZ causa alteração no sistema de defesa antioxidante e geração de espécies reativas (ER) devido a sua natureza redox, resultando em oxidação direta de biomoléculas como lipídios, DNA e proteínas (SPRANGER *et al.*, 1998; CHTOUROU *et al.*, 2011). A geração de ER pelo Mn também pode ocorrer de maneira indireta através da indução de disfunção mitocondrial, a qual desempenha um papel central nas doenças neurodegenerativas como a DP (KAIDERY; THOMAS, 2018).

O sistema de defesa antioxidante tem por objetivo reduzir ou inibir os danos causados pelas ER radiculares e não radiculares em excesso. Esse sistema é dividido em enzimático e não enzimático (BARBOSA *et al.*, 2010). O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e peroxirredoxinas.

A SOD catalisa a transformação do ânion superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, conforme a reação:

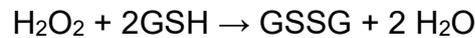


A CAT, por sua vez, catalisa a decomposição de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, conforme a reação:

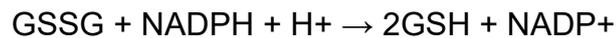


É uma enzima presente em todos os tecidos, em uma concentração mais elevada no fígado.

As enzimas GPx também são responsáveis pela decomposição de H_2O_2 e peróxidos orgânicos, às custas de elétrons doados pela glutatona reduzida (GSH) conforme a reação:

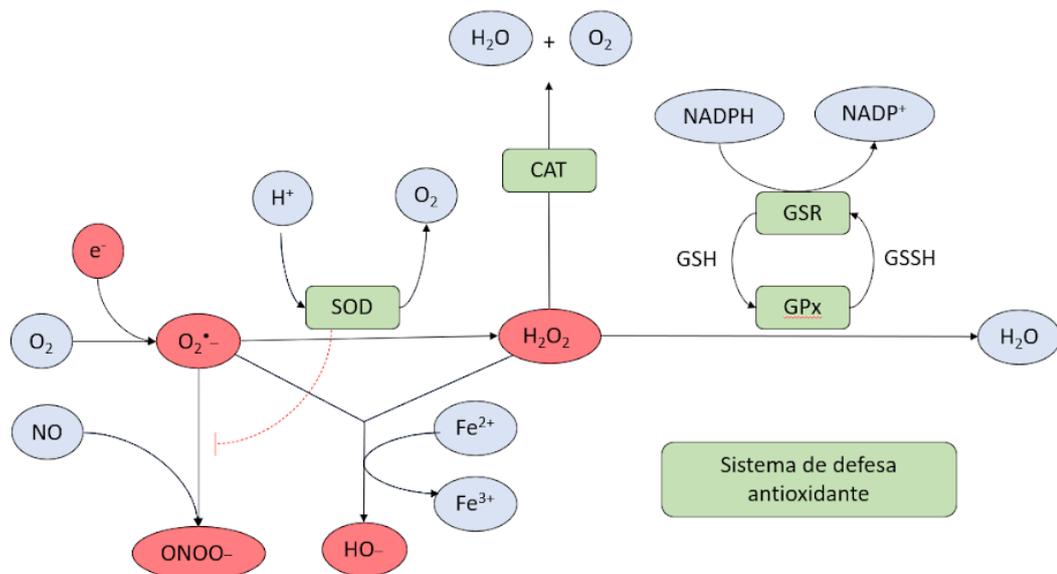


Já a GR catalisa a conversão de glutatona oxidada (GSSG) à GSH, com o objetivo de manter os níveis basais da mesma.



O NADPH consumido na reação é proveniente da via das pentoses fosfato (MANN, 1932, HUBER, ALMEIDA, FÁTIMA, 2008). Um resumo das defesas antioxidantes enzimáticas pode ser observado na figura 6.

Figura 6. Sistemas de defesa antioxidante



Fonte: Adaptado de Gandra *et al.* (2004).

Legenda: Em vermelho as espécies reativas formadas, em azul os metabólitos envolvidos nas reações e em verde os sistemas de defesa antioxidante.

Em relação ao sistema de defesa não enzimático, a glutathiona (GSH) é considerada um dos principais antioxidantes. É um tripeptídeo contendo tiol que, participa da redução do ácido ascórbico e do α -tocoferol, atua na eliminação de xenobióticos e de espécies reativas, além de servir como um cofator redutor das enzimas GPx (JOSEPH; MANNERVIK; ORTIZ, 1997; COUTO; WOOD; BARBER, 2016). Ela é formada pela ligação peptídica entre o ácido glutâmico e a cisteína, catalisada pela enzima glutamato cisteína ligase (GCL), uma enzima chave na via de síntese da GSH. O dipeptídeo formado liga-se ao aminoácido glicina pela ação da glutathiona sintase, formando a GSH (HUBER, ALMEIDA, FÁTIMA, 2008).

O sistema de defesa antioxidante não enzimático também é constituído por compostos de origem dietética, como vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, o β -caroteno e α -tocoferol, precursores das vitaminas A e E, respectivamente, são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes e podem, portanto, apresentar uma atividade protetora frente a danos oxidativos (BIANCHI; ANTUNES, 1999; PRASAD *et al.*, 2007).

Conforme mencionado anteriormente, o cérebro é bastante suscetível à danos oxidativos e na DP o EO exerce um papel central. De fato, o próprio envelhecimento parece estar relacionado a um aumento no EO. Observa-se que em indivíduos saudáveis, em idade avançada, há uma redução nos níveis de GSH e nas atividades da GPx, GR e SOD quando comparados com indivíduos mais jovens também saudáveis (VENKATESHAPPA *et al.*, 2011). Essas deficiências nas defesas antioxidantes podem acarretar em uma redução gradual da capacidade dos neurônios da SN em compensar a produção de EROs à medida que ocorre o envelhecimento, o que poderia explicar a vulnerabilidade desta região a danos oxidativos na DP (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019).

Alterações no funcionamento da SOD já foram associadas a doenças neurodegenerativas como DA, DP e esclerose lateral amiotrófica (ELA) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, 1992). Além disso, estudos demonstram uma redução drástica nos níveis de GSH e na atividade da GPx no SNC de pacientes com DP (SIAN *et al.*, 1994; DAVIES *et al.*, 2014). Essa redução nos níveis de GSH no SNC pode estar associada a alterações no funcionamento da enzima GCL, que é responsável pela síntese de GSH, sendo que essas alterações podem estar relacionadas a mutações no gene DJ-1 (KANG *et al.*, 1999; ZHOU; FREED, 2005). Uma outra hipótese para esta redução seria um desbalanço entre a reciclagem de

GSH e a produção de H₂O₂, ficando a mesma diminuída enquanto realiza decomposição do peróxido (SIAN *et al.*, 1994).

Um outro sistema de defesa contra o EO é o sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), que é uma via principal de degradação e remoção de proteínas danificadas (OLANOW; MCNAUGHT, 2006). Em momentos de EO, o proteassoma tem papel protetor pela eliminação dessas substâncias, impedindo a formação de agregados tóxicos de proteínas oxidadas. Os aminoácidos liberados pelo UPS no momento de degradação, também atuam como sequestradores de EROs, protegendo componentes vitais da célula de processos de oxidação (DAVIES, 2001; DAVIES; GOLDBERG, 1987).

Outra função de importância do UPS é a degradação de mitocôndrias danificadas, diminuindo, portanto, a formação de radicais livres em excesso. O EO pode causar disfunção no UPS, aumentando a vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos no SNC. Defeitos no complexo I mitocondrial, por sua vez, afetam a atividade proteassomal, oxidando componentes do proteassoma e aumentando a produção de proteínas defeituosas.

Em pacientes com DP já foram observadas modificações estruturais no proteassoma, incluindo a perda da subunidade alfa, um componente que estabiliza e regula o complexo proteossomal. Além disso, como discutido anteriormente, mutações nos genes da UCH-L1, por ser um componente do UPS, indicam um papel importante da disfunção desse complexo na patogênese da DP.

1.5.1.3 *Disfunção mitocondrial*

Embora diversas evidências apontem para a presença de EO na DP, ainda não é claro se isso é um evento primário ou uma consequência de outras disfunções celulares. Já está bem descrito na literatura o envolvimento da disfunção mitocondrial na geração de EROs na DP (SCHAPIRA, 2008; BLESÁ *et al.*, 2015). As mitocôndrias têm diversas funções nas células, além de seu papel na geração de energia, elas também estão envolvidas na homeostase do cálcio, na resposta ao estresse e em mecanismos de morte celular (DIAS; JUNN; MOURADIAN, 2013).

A primeira evidência relacionando a disfunção mitocondrial à DP foi em um estudo realizado com usuários de drogas que desenvolveram Parkinson induzido por 1-metil-4-fenil-1,2,5,6-tetra-hidropiridina (MPTP), um subproduto na síntese de

meperidina. Este produto foi comercializado como “heroína”, e usuários de drogas que fizeram uso intravenoso da substância desenvolveram parkinsonismo severo. Em análises pós-morte destes indivíduos foi observada uma perda significativa de neurônios dopaminérgicos na SN (LANGSTON *et al.*, 1983).

O MPTP cruza a barreira hematoencefálica (BHE) e é capturado pelos astrócitos, onde é metabolizado em 1-metil-4-fenilpiridiniuim (MPP+) pela MAO-B e posteriormente é liberado no espaço extracelular. O MPP+ é substrato para o transportador de dopamina (DAT), e consegue entrar nos neurônios dopaminérgicos onde inibe o complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, provocando EO e ativação de mecanismos de morte celular (VILA; PRZEDBORSKI, 2003). A rotenona, outra toxina que, assim como o MPTP, produz toxicidade preferencialmente em neurônios dopaminérgicos, também apresenta como mecanismo primário de toxicidade a inibição do complexo I (BLESA *et al.*, 2015), indicando que uma disfunção nesse complexo mitocondrial parece ser um evento chave na DP.

De fato, diversos estudos demonstram uma diminuição da atividade do complexo I mitocondrial e da atividade da Ubiquinona nos indivíduos com DP na SN (KEENEY *et al.*, 2006; SHULTS *et al.*, 1997; SCHAPIRA *et al.*, 1989) ou em outras regiões como estriado e córtex frontal (MIZUNO *et al.*, 1989; PARKER; PARKS; SWERDLOW, 2008). Deficiências na atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial é considerada uma das principais fontes de EROs na DP, culminando em morte neuronal. Além disso, no item anterior (1.5.1.1) foram abordados aspectos genéticos relacionados a disfunções das proteínas DJ-1 e Parkina, que também afetam as funções normais das mitocôndrias, reforçando o papel da disfunção mitocondrial na DP.

Além disso, há evidências de que o Mn interfere com a homeostase do cálcio mitocondrial, causando perda de potencial de membrana e prejuízos na síntese de ATP, contribuindo para apoptose (FARINA *et al.*, 2013; IJOMONE *et al.*, 2019). Fungicidas EBDCs, contendo Mn na estrutura, como o maneb, causam inibição do complexo III da cadeia transportadora de elétrons e o MZ já foi associado a uma diminuição do complexo I em modelos *in vivo* com *C. elegans* (ZHANG *et al.*, 2003; BAILEY *et al.*, 2016).

1.5.1.4 Neuroinflamação

Diversas evidências têm demonstrado a participação da neuroinflamação na DP, pela ativação da micróglia. A micróglia é composta por células fagocíticas do sistema imune inato do SNC, que são ativadas após injúria do cérebro ou por resposta imunológica (BLOCK; ZECCA; HONG, 2007). A micróglia, quando ativada, é fonte importante de O_2^- e NO, que podem levar a um quadro de EO no SNC. Além disso, elas também podem promover neurodegeneração pela produção de outros compostos tóxicos como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (DUMONT; BEAL, 2011; BLOCK; ZECCA; HONG, 2007, CEULEMANS *et al.*, 2010; CHÉRET *et al.*, 2008).

A micróglia, porém, tem dupla função no SNC, agindo como células neuroproteroras pela eliminação de substâncias endógenas e exógenas, além de possuir altos níveis de GSH e GPx, que protegem contra níveis tóxicos de H_2O_2 (MARTIN; TEISMANN, 2009).

Micróglia ativada, linfócitos T e um aumento de mediadores inflamatórios foram encontrados no cérebro e fluido cérebro espinhal de pacientes com DP (HIRSCH *et al.*, 2006; HUNOT *et al.*, 1999; MOGI *et al.*, 1996). Em modelos *in vitro* e *in vivo* utilizando toxinas, como o MPTP, também foi observado ativação da micróglia (HERRERA *et al.*, 2000; MCNAUGHT; JENNER, 2002).

Na DP, a morte de neurônios dopaminérgicos libera proteínas oxidadas, lipídios e DNA no espaço extracelular, que são reconhecidos como moléculas danosas pela micróglia, causando a sua ativação. Essa ativação da micróglia leva a formação de citocinas, aumento da produção de EROs e ERNs e diminuição da secreção de fatores tróficos responsáveis pela manutenção da viabilidade neuronal. Essa degeneração neuronal causada pela ativação da micróglia, faz com que novamente ela se torne ativa, ocasionando um ciclo neurotóxico vicioso (BLOCK; ZECCA; HONG, 2007).

Estudos recentes associam a exposição ao Mn com uma resposta pró-inflamatória, através da ativação de NF- κ B que culmina com o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias incluindo interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 β (IL-1 β) e TNF- α (LI *et al.*, 2018; POPICHAK *et al.*, 2018). WEIS *et al.*, 2019 demonstrou aumento de IL-6, IL-1 β e TNF- α em macrófagos murinos tratados com MZ. Já um estudo realizado com células periféricas isoladas de sangue humano, tratadas *in vitro* com concentrações não citotóxicas de MZ demonstrou que ele possui um efeito

inibidor da produção de TNF- α (MANDARAPU *et al.*, 2014). Corsini *et al.*, 2005 em seu estudo realizado com amostras de trabalhadores da agricultura, expostos ocupacionalmente ao MZ, também demonstrou uma redução na liberação de TNF- α induzida por LPS.

1.6 EXPOSIÇÃO A AGROTÓXICOS E A DP

A exposição a agrotóxicos já foi associada a diversos problemas de saúde nos humanos. Sabe-se que a exposição até mesmo a baixas concentrações desses toxicantes está ligada ao surgimento de doenças neurodegenerativas como DP, DA e ELA (FRANCO *et al.*, 2010; COLOSIO *et al.*, 2003).

Existem evidências fortes de que os organofosforados, carbamatos, piretróides e inseticidas organoclorados causam neurotoxicidade (COLOSIO *et al.*, 2003). Outro agrotóxico importante neste cenário é o herbicida paraquat (PQ), o qual ganhou atenção considerável pela literatura devido a sua similaridade química ao MPTP, levando a comunidade científica a especular o PQ como uma neurotoxina dopaminérgica. De fato, existem inúmeros estudos epidemiológicos (LIOU *et al.*, 1997; TANNER *et al.*, 2009; TANNER *et al.*, 2011; WEED *et al.*, 2021) e experimentais (THIRUCHELVAM *et al.*, 2000; BASTÍAS-CANDIA; ZOLEZZI; INESTROSA, 2018) que relatam uma associação entre a exposição ao PQ e o desenvolvimento da DP. Um estudo realizado por Ascherio *et al.* (2006) demonstrou que pacientes expostos a pesticidas tem uma prevalência 70% maior de desenvolver DP do que indivíduos do grupo não exposto. Sabe-se também que a exposição prolongada a esses compostos, aumenta o risco de efeitos neurológicos a longo prazo (MORETTO; COLOSIO, 2011).

Em relação à exposição ao MZ, ainda não existem evidências suficientes capazes de sustentar ou descartar uma possível associação com o desenvolvimento da DP. Entretanto, estudos em humanos, culturas de células e animais expostos ao MZ demonstraram um aumento dos níveis de Mn no sangue, células e tecidos, respectivamente (MORA *et al.*, 2018; HOFFMAN; TROMBETTA; HARDEJ, 2016; COSTA-SILVA *et al.*, 2018). O aumento dos níveis de Mn associado ao aumento dos níveis de ETU, foram relacionados ao desenvolvimento de problemas neurocomportamentais em crianças expostas ao MZ em plantações de banana na Costa Rica (MORA *et al.*, 2018).

Além disso, um caso foi relatado na literatura de um homem de 55 anos que ingeriu acidentalmente aproximadamente 5 gramas de fungicida contendo MZ. Ele desenvolveu uma forma severa de parkinsonismo, não responsiva ao tratamento com levodopa (um precursor da dopamina amplamente utilizado na terapia da DP), mas que após 8 meses cursou com melhora espontânea do quadro e ausência de sinais de parkinsonismo (ERRO *et al.*, 2010).

Estudos com o nematódeo *C. elegans* já demonstraram que o sistema dopaminérgico é alvo da exposição aguda e também crônica ao MZ (NEGGA *et al.*, 2011; BRODY *et al.*, 2013). A toxicidade do MZ foi bloqueada quando os vermes foram pré-tratados com um antagonista do transportador da dopamina, o que sugere que o fungicida pode estar entrando nos neurônios dopaminérgicos por este transportador pré-sináptico (MONTGOMERY *et al.*, 2018). Entretanto, ainda não está claro se o MZ tem o mesmo potencial de causar danos nos neurônios dopaminérgicos, como faz o Maneb, ou se ele também é capaz de aumentar o risco para o desenvolvimento de DP (BARLOW *et al.*, 2005; COSTELLO *et al.*, 2009; MECO *et al.*, 1994). Tendo em vista que o mecanismo causador de citotoxicidade do MZ envolve EO e disfunção mitocondrial, não é irracional pensar que os neurônios dopaminérgicos seriam vulneráveis a esta exposição (RICHARDSON *et al.*, 2019). No entanto, estudos são necessários para tentar esclarecer os mecanismos envolvidos na citotoxicidade deste agrotóxico.

2 JUSTIFICATIVA

Estudos epidemiológicos vêm mostrando uma associação entre a exposição ocupacional a agrotóxicos com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a DP (POUCHIEU *et al.*, 2017 TANGAMORNSUKSAN *et al.*, 2018). Esses estudos sugerem que o uso de fungicidas DTCs, como o MZ, na agricultura pode representar uma fonte de Mn para a população (MORA *et al.*, 2018). Altas concentrações de Mn no cérebro têm sido correlacionadas com o desenvolvimento de neuropatologias como a DP (MARTINS *et al.*, 2019). Entretanto, os mecanismos de neurotoxicidade do MZ e a possível relação da exposição a esse agrotóxico com o desenvolvimento de DP foram pouco estudados até o presente momento.

Nosso estudo visa investigar os mecanismos de citotoxicidade do MZ, um dos agrotóxicos mais utilizados no Brasil e no estado de SC, e avaliar o impacto da exposição a esse composto no desenvolvimento da DP, com potencial foco em parâmetros de EO, função mitocondrial e inflamação. A investigação desses parâmetros poderá auxiliar no entendimento dos mecanismos associados à degeneração dopaminérgica induzidos pelo fungicida e poderão representar conhecimento básico para estudos posteriores no tema de toxicidade de agrotóxicos, que busquem compreender melhor a patogênese da DP, visando o desenvolvimento de novas terapias ou estratégias preventivas para a doença.

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do estudo é investigar os mecanismos de toxicidade induzidos pelo fungicida MZ, em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, com potencial foco em parâmetros de EO, função mitocondrial e inflamação.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Avaliar a toxicidade do MZ nas células SH-SY5Y por meio de marcadores de viabilidade e morte celular;
- ii. Investigar se a exposição ao MZ causa alterações em marcadores de EO (geração de ER, níveis de GSH e peroxidação lipídica);
- iii. Avaliar o efeito da exposição ao MZ sobre o potencial de membrana mitocondrial;
- iv. Avaliar se a exposição ao MZ causa alterações nas citocinas inflamatórias, IL-6, IL-1 β e TNF- α ;
- v. Investigar se a exposição ao MZ induz dano ao DNA nas células SH-SY5Y.

4 METODOLOGIA

4.1 REAGENTES

Os compostos MZ, dimetilsulfóxido (DMSO), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-brometo) il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), iodeto de propídio (IP), L-glutamina, 2',7'-Diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), ácido 4-terc-butylbenzóico, 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-iodeto de imidacarbocianina (JC-1) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12* (DMEM-F12) e o soro fetal bovino (SFB) foram adquiridos da empresa Gibco Life Technologies (Carlsbad, CA). O composto Bodipy 581/591 C11 foi adquirido da Thermofischer científico. O ácido ascórbico foi adquirido da Êxodo científica.

4.2 CULTIVO CELULAR:

Para realização dos experimentos *in vitro* foram utilizadas culturas da linhagem de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). A escolha do tipo celular baseia-se no fato de que as células SH-SY5Y apresentam características semelhantes às de neurônios dopaminérgicos, que são o tipo celular afetado pela DP, e, portanto, são consideradas um bom modelo para estudar a doença (XICOY; WIERINGA; MARTENS, 2017).

Essas células foram cultivadas em meio DMEM-F12, suplementado com 10% de SFB, 2 mM de glutamina, 0,28 µg/µL de gentamicina e 250 µg de anfotericina B e mantidas a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de CO₂. A troca de meio ocorria a cada dois dias e, quando as células atingiam uma confluência de 80-90%, eram realizados os repiques utilizando solução de tripsina-EDTA a 0,05%.

Para os experimentos as células foram cultivadas em placas de 6, 12, 24 ou 96 poços, dependendo da necessidade experimental e foram utilizadas entre a 4ª e 10ª passagem.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O MZ foi dissolvido em DMSO puro para preparar uma solução mãe de concentração 30 mM. A dissolução foi realizada no momento do tratamento, com o auxílio de vórtex, por um tempo aproximado de 3 minutos, obtendo-se uma mistura translúcida de coloração alaranjada-marrom. Após, foram feitas diluições sucessivas utilizando DMSO 1:50 (que foi utilizado como veículo) com o objetivo de obter-se alíquotas em diferentes concentrações para a realização dos tratamentos. A concentração final de DMSO nas células não excedeu 0,05%.

Primeiramente, as células foram expostas ao veículo (DMSO 1:50) ou a concentrações crescentes de MZ (1 – 30 μM) durante 24 horas. Após este período, foram realizadas análises de viabilidade e morte celular. Em sequência, com base nos resultados obtidos nessas análises, foram escolhidas as concentrações de 6, 10 e 20 μM para a realização dos experimentos posteriores.

Com as concentrações definidas previamente, foram repetidos os ensaios de viabilidade e morte celular em tempos diferentes (1, 3, 6, 12, 24 e 48 h) de exposição, para avaliar a toxicidade temporal do MZ. Para avaliação dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade do MZ, as células foram expostas ao fungicida nas concentrações de 6, 10 ou 20 μM , durante 1, 3, 6 ou 24 h. A concentração de MZ e o tempo de exposição utilizados variaram dependendo do parâmetro investigado e estão descritos nas seções abaixo.

Em experimentos paralelos, as células foram tratadas com veículo (PBS) ou com o antioxidante ácido ascórbico em uma concentração de 50 μM e, após 15 minutos, foram expostas ao veículo (DMSO) ou ao MZ nas concentrações de 6, 10 e 20 μM . Após 48 h, foram realizados ensaios de viabilidade celular.

Todos os ensaios foram realizados em duplicatas sendo os resultados provenientes de pelo menos 3 experimentos independentes com células em diferentes passagens.

4.4 ENSAIOS DE VIABILIDADE E MORTE CELULAR

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução do MTT. Este ensaio avalia a capacidade das desidrogenases mitocondriais celulares de reduzir o sal tetrazólico MTT, de coloração amarelada, em um composto de coloração azulada, o formazan.

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de $2,2 \times 10^4$ células por poço. Após 48 h do plaqueio, as células foram expostas ao MZ ou ao veículo nas concentrações e tempos mencionados anteriormente. Após o período de exposição, foi retirado o meio da placa e adicionado aos poços 100 μ L de MTT (0,5 mg/mL em solução tampão Hank's, HBSS), que foi incubado por 1 hora a 37°C, ao abrigo da luz. Em seguida, o MTT foi removido e foi adicionado 100 μ L de DMSO puro para a solubilização dos cristais de formazan. Em sequência, foi realizada uma leitura pontual de absorbância no espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200) no comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular foi expressa pela porcentagem do controle (células não tratadas, 100%).

Para avaliar a morte celular, foi utilizado o ensaio de incorporação do IP (ROSA *et al.*, 1997). O IP é um marcador fluorescente de coloração vermelha que consegue penetrar na membrana da célula (se esta estiver permeável) e se intercalar ao DNA. Esta permeabilidade acontece nos estágios finais de apoptose e necrose celular.

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de $2,2 \times 10^4$ células por poço. Após 48 h do plaqueio, as células foram expostas ao MZ ou ao veículo nas concentrações e tempos previamente mencionados. Após o período de exposição, foram adicionados 10 μ L de uma solução de Triton X-100 a 2% nos poços do controle positivo (100 % de morte). Em seguida, foi adicionado, em cada poço, 5 μ L de uma solução de IP 147 μ g/mL e as células foram incubadas por 20 minutos a 37°C. Posteriormente, foi realizada a leitura da fluorescência em 535 nm de excitação e 617 nm de emissão. Os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle positivo (100% de morte celular, células tratadas com Triton X-100 2% por 10 minutos).

4.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.5.1 Produção de espécies reativas (ER)

A produção intracelular de ER foi detectada utilizando o diacetato 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (ALI *et al.*, 1992). A sonda fluorescente DCFH-DA é desacetilada por ação de esterases celulares formando o composto 2',7'-diclorodihidro-fluoresceína (DCFH) que, por sua vez, reage com EROs e ERNs intracelulares para formar o composto fluorescente 2', 7'- diclorofluoresceína (DCF). A DCF emite

fluorescência proporcional à quantidade de ER produzidas nas células. Para este experimento as células foram semeadas em placas de 12 poços, com uma densidade de $25,8 \times 10^4$ células por poço. Após 48 h do plaqueio, as células foram expostas a um tratamento de 1 h com veículo (DMSO), MZ (6 μM) ou peróxido de terc-butila (TBOOH) 50 μM , que foi utilizado como controle positivo do ensaio. Ao final do período de exposição, retirou-se o meio e as células foram lavadas com HBSS a 37°C. Posteriormente foram incubadas com uma solução de DCF 10 μM em HBSS por 30 minutos a 37°C no escuro. Após a incubação, a DCF foi retirada e as células foram lavadas com PBS 0,01 M. Em seguida, foi adicionada uma solução de PBS 0,01 M com tripsina 1X em cada poço e as células foram incubadas por 3 minutos à 37°C, seguido da adição de uma solução de SFB a 1% em HBSS para cessar a reação da tripsina. As células foram então coletadas e centrifugadas a 6 x g durante 3 minutos em temperatura ambiente. Foram realizadas lavagens com HBSS seguidas de centrifugação por 2 vezes. Por fim, as células foram ressuspensas em 200 μL de HBSS e transferidas para tubos de citometria. Foi realizada a análise da fluorescência no citômetro de fluxo BD® FACS Canto II®, no LAMEB-UFSC no canal FITC (515 - 545 nm), avaliando 10 mil eventos por amostra. A análise dos dados provenientes da citometria foi realizada pelo software Floreada.io. A produção de espécies reativas foi expressa pela porcentagem do controle (células tratadas com veículo, DMSO).

4.5.2 Produção do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

A produção do $\text{O}_2^{\cdot-}$ foi determinada pelo ensaio do dihidroetídio (DHE), de acordo com o protocolo previamente descrito (BINDOKAS *et al.*, 1996). O DHE atravessa as membranas celulares com facilidade e é convertido a etídeo, pelo radical superóxido. O etídeo é um composto fluorescente de cor vermelha que se intercala ao DNA, permanecendo no interior das células. Logo, a leitura de fluorescência obtida no ensaio corresponde diretamente à quantidade de ânion superóxido produzida. As células foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de $1,3 \times 10^5$ células por poço. Após 48 h do plaqueio, as células foram tratadas com veículo (DMSO), MZ (6 μM) ou PQ 100 μM (controle positivo) durante 1 e 3 horas. Após os tratamentos, o meio de cultura foi removido por inversão e as células lavadas 1x com HBSS previamente aquecido a 37°C e, posteriormente incubadas com uma solução de DHE na concentração de 10 μM , seguido de incubação por 30 minutos a 37°C. Após a

incubação, as células foram lavadas 1 x com HBSS e a leitura foi realizada em multileitor de placas (Infinite M200 – TECAN) nos comprimentos de onda de 488 nm de excitação e 585 nm de emissão, respectivamente. A produção do $O_2^{\cdot-}$ foi expressa pela porcentagem do controle (células tratadas com veículo).

4.5.3 Análise da ocorrência de peroxidação lipídica de membrana

A produção de hidroperóxidos lipídicos foi determinada utilizando Bodipy 581/591 C11 (C11-BODIPY^{581/591}), conforme descrito previamente por Naguib, 1998. O Bodipy 581/591 C11 é uma sonda fluorescente lipofílica sensível à peroxidação lipídica. Esta sonda apresenta uma estrutura anfipática, na qual um substituinte de ácidos graxos de cadeia longa de 11 carbonos fornece o caráter não polar e facilita a sua incorporação na membrana plasmática. Nela também há uma porção polar, com o segmento fenilbutadieno, que contém ligações duplas suscetíveis a oxidação por radicais peroxil. A oxidação do fluoróforo leva a mudança de sua fluorescência do vermelho para o verde, fornecendo uma indicação de peroxidação de lipídios da membrana, que pode ser medida pela citometria de fluxo (Naguib, 1998).

Para este experimento as células foram plaqueadas em placas de 12 poços, com uma densidade de $25,8 \times 10^4$ células por poço. Após 48 h do plaqueio, as células foram tratadas com veículo (DMSO) ou MZ $6 \mu\text{M}$ durante 3 horas. As células foram também tratadas, durante 2 horas, com cumenohidroperóxido (CuOOH) $25 \mu\text{M}$, que foi utilizado como controle positivo do ensaio. Ao final do período de exposição, retirou-se o meio de cultura e as células foram lavadas com HBSS a 37°C . Posteriormente foram incubadas com uma solução de Bodipy $10 \mu\text{M}$ por 30 minutos a 37°C , no escuro. Após a incubação, a sonda Bodipy foi retirada e as células foram lavadas com PBS $0,01 \text{ M}$. Em seguida, foi adicionada uma solução de PBS $0,01 \text{ M}$ com tripsina 1X em cada poço e as células foram incubadas por 3 minutos à 37°C , seguido da adição de uma solução de SFB a 1% em HBSS para cessar a reação da tripsina. As células foram então coletadas por tripsinização e centrifugadas a $6 \times g$, durante 3 minutos em temperatura ambiente. Foram realizadas lavagens seguidas de centrifugação por 2 vezes. Por fim, as células foram ressuspensas em $200 \mu\text{L}$ de HBSS e transferidas para tubos de citometria. Foi realizada a análise da fluorescência no citômetro de fluxo BD® Facs Canto II® no LAMEB-UFSC nos canais FITC (excitação/emissão de 515/545 nm, sonda oxidada, verde) e PE (excitação/emissão de 564-606 nm, sonda

reduzida, vermelho). A análise dos dados da citometria foi feita através do software Floreada.io e os resultados foram calculados pela razão entre a fluorescência da sonda oxidada sobre a fluorescência da sonda reduzida (FITC/PE). Os resultados foram expressos em porcentagem do controle (células tratadas com veículo).

4.5.4 Determinação do conteúdo de tióis não proteicos (NPSH)

A avaliação da concentração intracelular de GSH foi realizada por meio da determinação da quantidade de tióis não proteicos, conforme previamente padronizado por Ellman, 1959. O método é baseado na ligação do composto DTNB a grupos tióis (SH) presentes em moléculas não proteicas com a liberação do 5,5'tiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (TNB), o qual absorve luz e transmite em um comprimento de onda específico, proporcional a quantidade de NPSH presente na amostra (ELLMAN, 1959). Aproximadamente 95% do conteúdo de NPSH corresponde à GSH (COOPER, 1998).

Para este ensaio as células foram semeadas em placas de 6 poços a uma densidade de $64,5 \times 10^4$ células por poço. Após 48 h do plaqueio, foram realizados os tratamentos com MZ (6 μ M) ou veículo (DMSO). Após 3 horas de exposição ao MZ, o meio foi removido por inversão e os poços lavados com PBS a 37°C. Posteriormente adicionou-se 200 μ L de uma solução de PBS + Triton X-100 0,5% nos poços e as células foram coletadas por raspagem. Foi coletado o conteúdo de 3 poços para cada condição experimental. Reservou-se 20 μ L de amostra para dosagem de proteínas e, ao restante (cerca de 180 μ L), adicionou-se 180 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% gelado, seguido de agitação no vórtex, para a precipitação das proteínas. As amostras foram centrifugadas a 5.000 x g por 10 minutos a 4° C e o conteúdo de NPSH foi dosado no sobrenadante por meio da incubação com DTNB 10 mM em Tampão Fosfato de Potássio – TFK, 1M pH 7,0. A leitura das absorbâncias foi realizada em multileitor de placas (Infinite M200 – TECAN) no comprimento de onda de 412 nm e uma curva de GSH foi utilizada para calcular o conteúdo de NPSH (nmol de NPSH/mg de proteína). Os dados foram expressos como percentual do controle (células tratadas com veículo).

4.5.5 Avaliação da proteção do ácido ascórbico na perda de viabilidade causada pela exposição ao MZ

Para a avaliação da proteção do ácido ascórbico frente ao dano à viabilidade causado pelo MZ foram realizados ensaios de MTT. As células foram expostas à ácido ascórbico em uma concentração de 50 μM e, após 15 minutos, foi adicionado MZ nas concentrações de 6, 10 e 20 μM e veículo, que foram incubados por 48 h. Após foi realizado o ensaio do MTT conforme descrito no item 4.4.

Fotos representativas dos grupos foram adquiridas, em microscopia de campo claro, com o microscópio invertido IX 86 Olympus no LAMEB-UFSC em um aumento de 200x.

4.6 PARÂMETROS DE FUNÇÃO MITOCONDRIAL

4.6.1 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (PMM)

A técnica envolvendo o uso do corante JC-1 foi desenvolvida para detectar o PMM em células saudáveis e apoptóticas em vários tipos de células, como neurônios, miócitos, células endoteliais etc. O JC-1 é um corante catiônico lipofílico (exibindo naturalmente fluorescência verde) que é capaz de entrar na mitocôndria onde se acumula e, de maneira dependente da concentração, começa a formar complexos reversíveis chamados agregados J que exibem excitação e emissão no espectro vermelho (máximo em $\sim 590\text{ nm}$) ao invés do verde. Assim, em células saudáveis com um PMM normal, o corante JC-1 entra e se acumula nas mitocôndrias energizadas e carregadas negativamente e forma espontaneamente J-agregados fluorescentes vermelhos. Em contraste, em células não saudáveis ou apoptóticas, o JC-1 entra nas mitocôndrias em menor grau, pois o interior da mitocôndria é menos negativo devido ao aumento da permeabilidade da membrana e consequente perda de potencial eletroquímico. Nesta condição, o JC-1 não atinge uma concentração suficiente para desencadear a formação de agregados J, mantendo assim sua fluorescência verde original. Com base nessas premissas, a proporção de fluorescência vermelha/verde do corante na mitocôndria pode ser considerada como uma avaliação direta do estado de polarização da mitocôndria. Portanto, uma perda no PMM é indicada por uma

redução na proporção de intensidade de fluorescência vermelha para verde (SIVANDZADE; BHALERAO; CUCULLO, 2019).

Para a realização deste ensaio as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de $2,2 \times 10^4$ células por poço. Após 48 h do plaqueio, as células foram expostas ao veículo (DMSO), ao MZ nas concentrações de 6, 10 e 20 μM ou a 1 μM do composto carbonilcianeto-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), um agente despolarizante utilizado como controle positivo do ensaio. As células foram incubadas com os tratamentos por 3 h, exceto o FCCP, cuja incubação foi de 1 hora. Em seguida, foi realizada 1 lavagem com HBSS a 37°C e as células foram incubadas com uma solução contendo 5 μM de JC-1 por 20 minutos a 37°C . Realizou-se novamente uma lavagem com HBSS para retirar vestígios da sonda que não entrou nas células e a fluorescência foi mensurada nos comprimentos de onda de 488 nm de excitação e 590 nm de emissão, para a fluorescência vermelha, e em 488 nm de excitação e 525 nm de emissão, para a fluorescência verde, respectivamente, em multileitor de placas (Infinite M200 – TECAN). Os resultados foram calculados pela razão entre a fluorescência vermelha/verde e expressos em porcentagem do controle (células tratadas com veículo).

4.7 DOSAGEM DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS

Para este trabalho, foram avaliadas as citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α pelo método de imunoenensaio enzimático (ELISA). O protocolo de ensaio foi realizado conforme a bula do fabricante ThermoFischer Scientific. O método consiste em um ELISA do tipo sanduíche, onde há a presença de um anticorpo de captura, que é adicionado a placa e se adere à superfície. Após lavagens para retirar anticorpos livres, são adicionadas as amostras que podem conter antígenos, que se ligam aos anticorpos de captura nos poços. Realiza-se nova lavagem para retirar antígenos não capturados. Adiciona-se um conjugado específico para o antígeno alvo, e novamente se realiza uma lavagem para retirada de conjugados livres. Por fim, um cromógeno e um substrato são adicionados e se o mesmo for oxidado pela enzima haverá a formação de cor, que é medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

Para este ensaio as células foram plaqueadas em placas de petri numa densidade de 4×10^6 células por placa. Após 48h do plaqueio, as células foram

tratadas com veículo (DMSO) ou MZ (6 μM) durante 3, 6, 24 e 48 horas. O meio de cultivo foi coletado e utilizado para a dosagem das citocinas conforme o kit comercial disponível.

Os resultados foram calculados pela equação da reta proveniente da curva de concentração padrão de cada kit. Os limites de detecção do método foram 2 pg/mL para IL-6 e IL-1 β e 4 pg/mL para TNF- α .

4.8 AVALIAÇÃO DE DANO AO DNA

Para avaliação do dano no DNA nas células SH-SY5Y utilizou-se a técnica do ensaio cometa, descrito por Singh *et al.* (1988) e adaptado por Tice e colaboradores (2000).

As células foram plaqueadas em placas de 6 poços a uma densidade de $64,5 \times 10^4$ células por poço. Após 48 h, foram realizados os tratamentos com MZ 6 μM e veículo (DMSO) e as células foram incubadas por 24 h. Após esse período, foi realizado um processo de tripsinização, seguido de inativação da tripsina e coleta das células. Em seguida, as células foram centrifugadas e posteriormente ressuspendidas em meio DMEM-F12, onde ficaram armazenadas, de 2-8° C, por 24 horas até serem encaminhadas ao laboratório parceiro para análise. Lá foram preparadas as lâminas com uma cobertura de gel de agarose de ponto de fusão normal (Normal Melting Point ou NMP). A agarose foi diluída em água, aquecida em forno de micro-ondas e colocada em cubetas, onde as lâminas foram mergulhadas. Posteriormente, limpou-se um dos lados da lâmina com papel absorvente e as mesmas secaram em temperatura ambiente. Após este período as lâminas foram armazenadas em um local seco. Com as lâminas e amostras prontas para uso, aqueceu-se a agarose de baixo ponto de fusão (Low Melting Point ou LMP) até aproximadamente 37 °C em micro-ondas. Com o auxílio de uma micropipeta misturou-se 95 μL de agarose LMP e 5 μL de suspensão de células e adicionou-se 95 μL dessa mistura sobre as lâminas que já continham agarose NMP e imediatamente cobriu-se com uma lamínula. O material foi colocado horizontalmente em uma câmara úmida na geladeira por aproximadamente 5 minutos, para solidificação da agarose. Após, as lâminas foram colocadas dentro de uma cubeta, com uma solução de lise gelada, por um período mínimo de 2 horas para que depois fosse realizada a etapa de eletroforese dessas lâminas. A solução de lise é composta de 99 ml de solução de lise mãe (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM)

com 10 ml de DMSO e 1 ml de Triton x-100. Nessa etapa ocorre o desdobramento do DNA.

Para realizar a eletroforese preparou-se um tampão alcalino (NaOH, EDTA 200 mM e água destilada em pH 10) cuja temperatura de uso é 4°C. As lâminas foram então retiradas da lise e posicionadas na cuba de eletroforese. O tampão de eletroforese foi adicionado, no qual as lâminas ficaram expostas por 20 minutos, para permitir a expressão de sítios álcali-lábeis. Em seguida foi realizada a eletroforese por 20 minutos em geladeira, sob as condições de 25 V e 300 mA. Após a corrida, as lâminas foram retiradas da cuba e lavadas com tampão de neutralização (Tris 0,4M, pH 7,5) por 3 vezes, com intervalos de 5 minutos entre cada lavagem. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada, por 3 vezes, e deixadas para secar a 37°C, por no mínimo 2 horas. Para a fixação do material, as lâminas foram mergulhadas por 10 minutos em solução fixadora (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco heptahidratado 5% e glicerol 5%). Após a fixação, foram realizadas 3 lavagens com água destilada e as lâminas foram colocadas para secar por 2 horas a 37°C. Uma lâmina de amostra tratada com H₂O₂ 10 µM foi utilizada como controle positivo para este ensaio. As lâminas foram coradas seguindo o método de coloração de prata descrito por Nadin e colaboradores (2001). Para isto, as lâminas foram reidratadas por 5 minutos em água destilada. Fez-se a mistura das soluções A (carbonato de sódio 5%) e B (nitrito de amônio 0,02%, nitrato de prata 0,02%, ácido tungstosilícico 0,1%, formaldeído 0,05%) imediatamente antes do uso. As lâminas foram submersas em cubetas que continham a solução de corante A+B por 15 minutos, sendo levemente agitadas a cada 5 minutos. Após atingir uma coloração acinzentada, as lâminas foram novamente lavadas com água destilada e mergulhadas em uma solução de parada (ácido acético 1%) por 5 minutos. Depois foram lavadas novamente com água destilada e a secagem foi em temperatura ambiente. Após secagem, as lâminas estavam prontas para serem analisadas.

A análise foi feita em duplicata pelo mesmo observador em dias diferentes. Foram avaliadas 50 células por lâmina em microscópio óptico no aumento de 200x. A intensidade do dano de DNA ou índice de dano total (IDT) foi classificada de 0 a 4, sendo 0: ausência de dano, 1: células com dano mínimo, 2: células com danos médios, 3: células com danos intensos e 4: células com danos máximos. Os valores de 0 a 4 dos 100 núcleos celulares analisados para cada condição experimental foram

somados, resultando no valor individual, que pode variar de 0 a 400 unidades arbitrárias. O resultado foi expresso pelo IDT em unidades arbitrárias.

4.9 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação da concentração de proteínas foi realizada conforme o método descrito por Lowry e colaboradores (1951). Para este ensaio uma curva padrão de albumina de soro bovino foi utilizada para o cálculo da concentração de proteínas celular.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad Prism 8.4.3 (Dotmatics 2022). Análises de variância (ANOVA) de uma via foram utilizadas para avaliar as diferenças entre grupos, seguidas do teste de comparações múltiplas de Dunnett. Foram também realizadas ANOVA de duas vias para avaliar as diferenças entre grupos de tratamentos, seguidas do pós-teste de Tukey. Diferenças entre o grupo controle (células tratadas com veículo) e o grupo MZ foram avaliadas através do teste t de Student. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média e as diferenças foram consideradas significativas para $p \leq 0,05$.

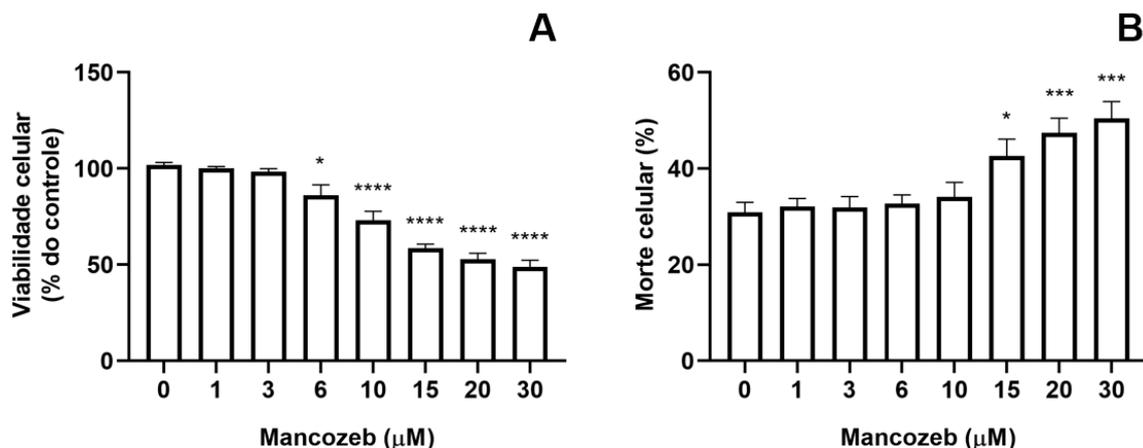
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CITOTOXICIDADE DO MZ EM CÉLULAS SH-SY5Y

Em um momento inicial, avaliou-se o efeito da exposição ao MZ (1- 30 μM), durante 24 horas, na viabilidade das células SH-SY5Y. O objetivo deste primeiro experimento foi avaliar a citotoxicidade do fungicida, para então definir as concentrações que seriam utilizadas nos experimentos posteriores.

A exposição ao MZ nas concentrações de 1 e 3 μM não provocou redução significativa na viabilidade celular. Já as concentrações de 6, 10, 15, 20 e 30 μM foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade das células SH-SY5Y (Figura 7A). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Tsang e Trombetta (2007), que observaram uma significativa redução de viabilidade celular em culturas de astrócitos de ratos, a partir do tratamento com uma concentração de 10 μM de MZ, indicando que o fungicida, em baixas concentrações é capaz de alterar a viabilidade celular.

Figura 7. Efeitos da exposição ao MZ na viabilidade e morte das células SH-SY5Y.



Legenda: As células foram tratadas com concentrações crescentes de MZ (1-30 μM) por um período de 24 horas. **A:** A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle. **B:** A morte celular foi determinada pelo ensaio de incorporação do iodo de propídio. Os resultados foram expressos em porcentagem de morte celular, calculados em relação ao controle positivo de morte (células tratadas com Triton X-100 2%). Os dados representam a média \pm erro padrão da média. Os dados são referentes a experimentos feitos em células em diferentes passagens (N=7). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ indicam diferença estatística em relação ao grupo controle (células tratadas com veículo) através de análise de variância de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett.

Além dos ensaios para avaliação da viabilidade, foram também conduzidos os ensaios de morte celular. A morte celular foi avaliada utilizando o ensaio de incorporação IP. Como se observa na figura 7B, o MZ foi capaz de aumentar significativamente a incorporação do IP, no período de 24 horas, a partir da concentração de 15 μM , indicando que o fungicida induz morte celular. Em conjunto, nossos resultados (Figuras 7A e 7B) mostram que a exposição ao fungicida MZ, durante um período de 24 horas, induz toxicidade nas células SH-SY5Y.

O ensaio do IP é utilizado para avaliar morte celular por necrose ou apoptose tardia, quando ocorre rompimento da membrana celular e o IP é capaz de entrar nas células e se intercalar ao DNA, produzindo fluorescência vermelha que pode ser mensurada. Em relação à capacidade do MZ de induzir morte celular, a literatura vem demonstrando que o fungicida é capaz de induzir apoptose em diferentes tipos celulares (DHANESHWAR; HARDEJ, 2021; KUMAR; SABARWAL; SINGH, 2019; MOHAMMADI-SARDOO *et al.*, 2021).

Baseado nos resultados dos experimentos de avaliação da viabilidade e morte celular, as concentrações de 6 e 10 μM , as quais induziram diminuição da viabilidade no ensaio do MTT, porém sem causar morte celular significativa, e a concentração de 20 μM , que, além de reduzir a viabilidade das células também causou morte celular significativa, foram escolhidas para os experimentos de avaliação da toxicidade temporal do MZ em células SH-SY5Y.

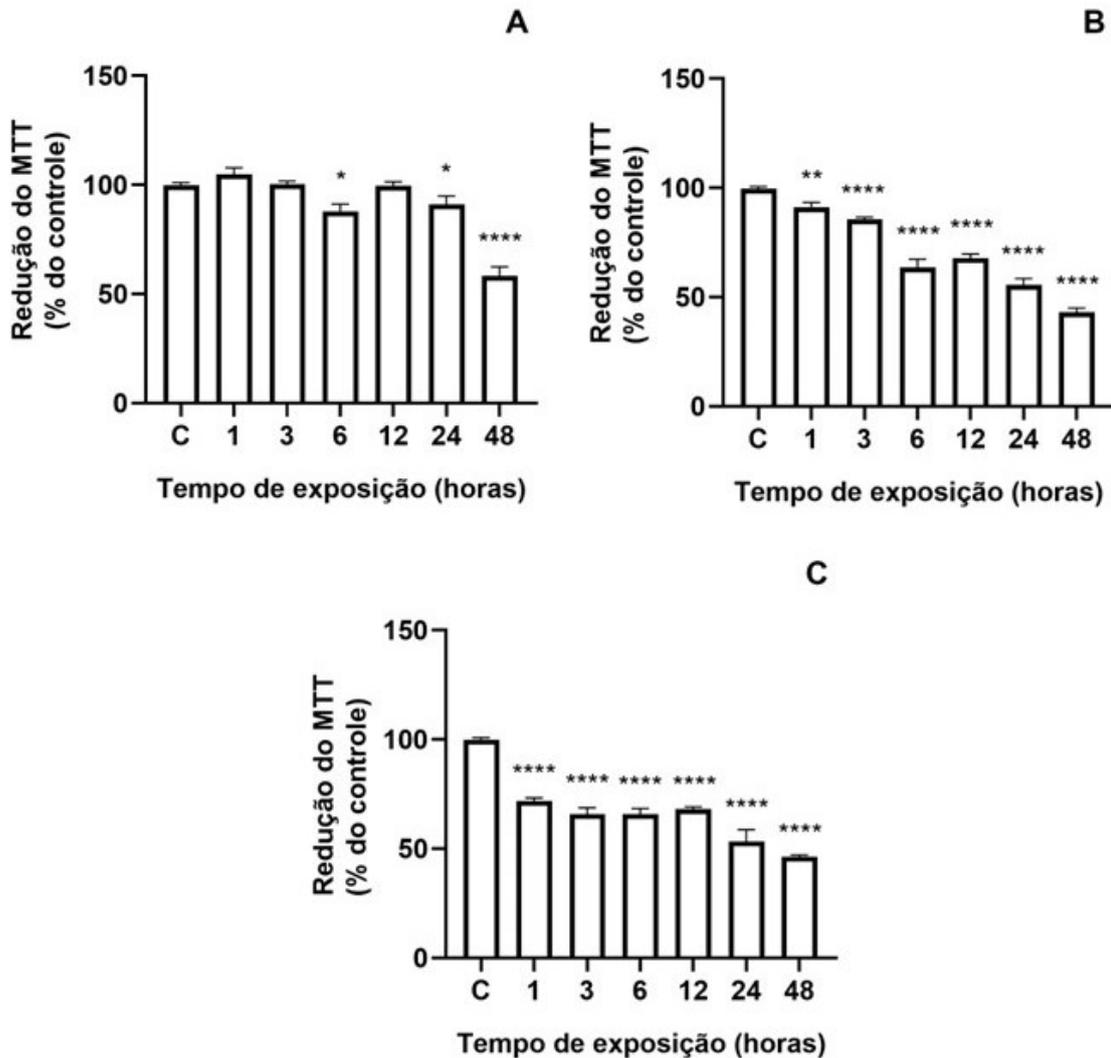
5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO TEMPORAL AO MZ EM CÉLULAS SH-SY5Y

Para avaliar a toxicidade temporal do MZ, as células foram expostas ao veículo ou ao fungicida (6, 10 e 20 μM) durante 1, 3, 6, 12, 24 e 48 horas e novos ensaios de viabilidade e na morte celular foram realizados.

Os ensaios de viabilidade celular mostram que o MZ, na concentração de 6 μM , foi capaz de reduzir significativamente a viabilidade após 6 horas de exposição, seguido de uma recuperação em 12 horas, que precede novamente uma significativa redução na viabilidade após 24 e 48 horas de exposição (Figura 8A). Essa recuperação foi confirmada através de microscopia de luz com contraste de fase (Figura 10A). Já na concentração de 10 μM , observa-se uma significativa redução da viabilidade a partir de 1 hora de exposição, sendo que as células não foram capazes

de recuperar-se do dano (Figura 8B). Resultados semelhantes podem ser observados para a concentração de 20 μM do fungicida (Figura 8C). Os resultados da avaliação da toxicidade temporal do MZ no estudo de Tsang e Trombetta (2007), com astrócitos de ratos, também revelaram uma diminuição significativa na viabilidade celular após uma hora de exposição, com uma concentração de 7,5 μM de MZ.

Figura 8. Efeitos da exposição temporal ao MZ na viabilidade das células SH-SY5Y

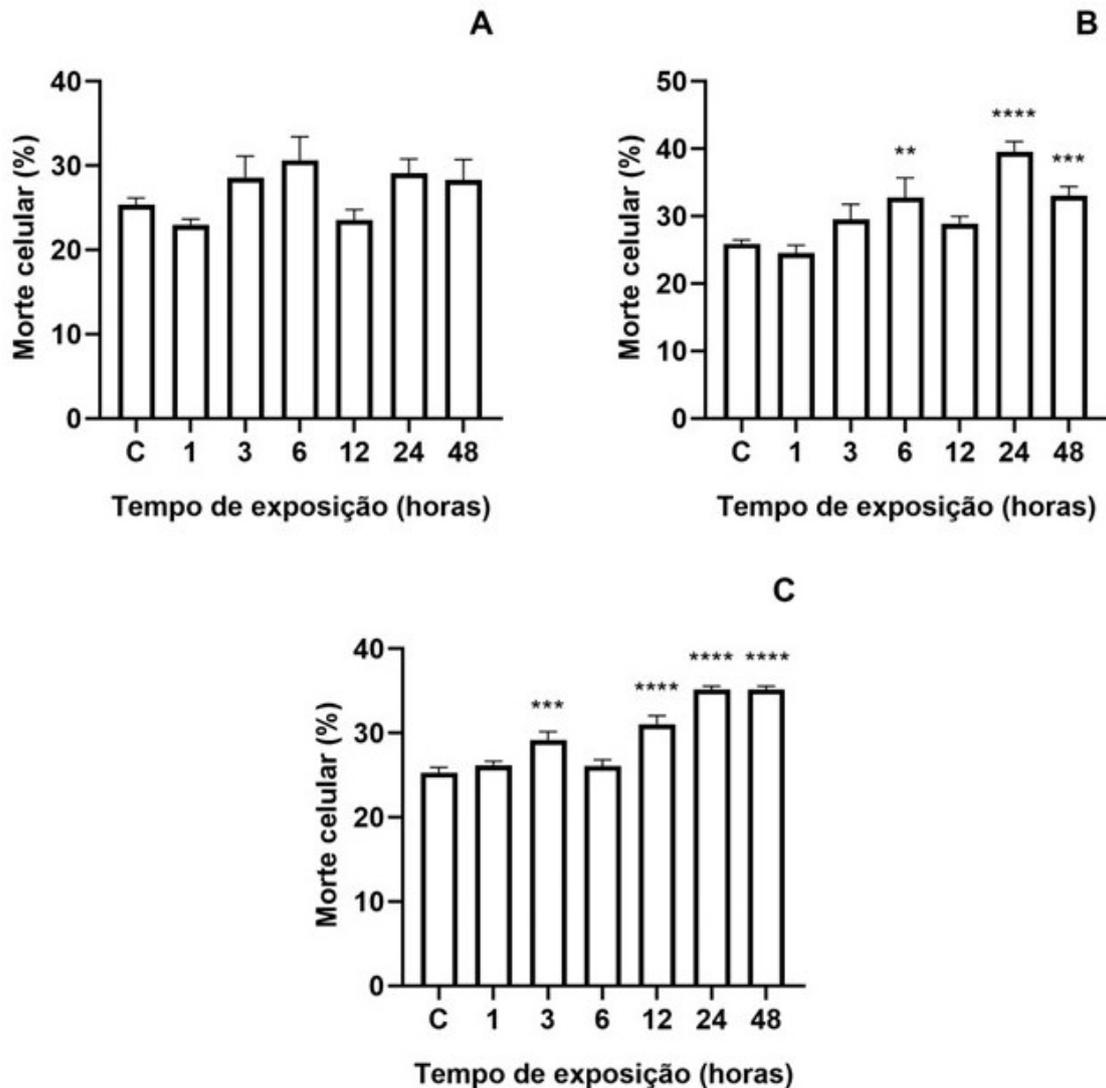


Legenda: As células foram expostas ao veículo ou ao MZ nas concentrações de 6 μM (A), 10 μM (B) e 20 μM (C) durante 1 – 48 horas. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle (células tratadas com veículo). Os dados representam a média \pm erro padrão da média. Os dados são referentes a experimentos realizados com células em diferentes passagens (N=4-11). *p<0,05; ** p<0,01 e **** p<0,0001 indicam diferença estatística em relação ao grupo controle através de análise de variância de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett.

Além da avaliação do efeito da exposição temporal ao fungicida na viabilidade celular, foi também investigado seu efeito na incorporação do IP. Os resultados

mostram que a morte celular provocada pelo MZ varia conforme a concentração e o tempo de exposição (Figura 9).

Figura 9. Exposição temporal ao MZ e morte celular nas células SH-SY5Y

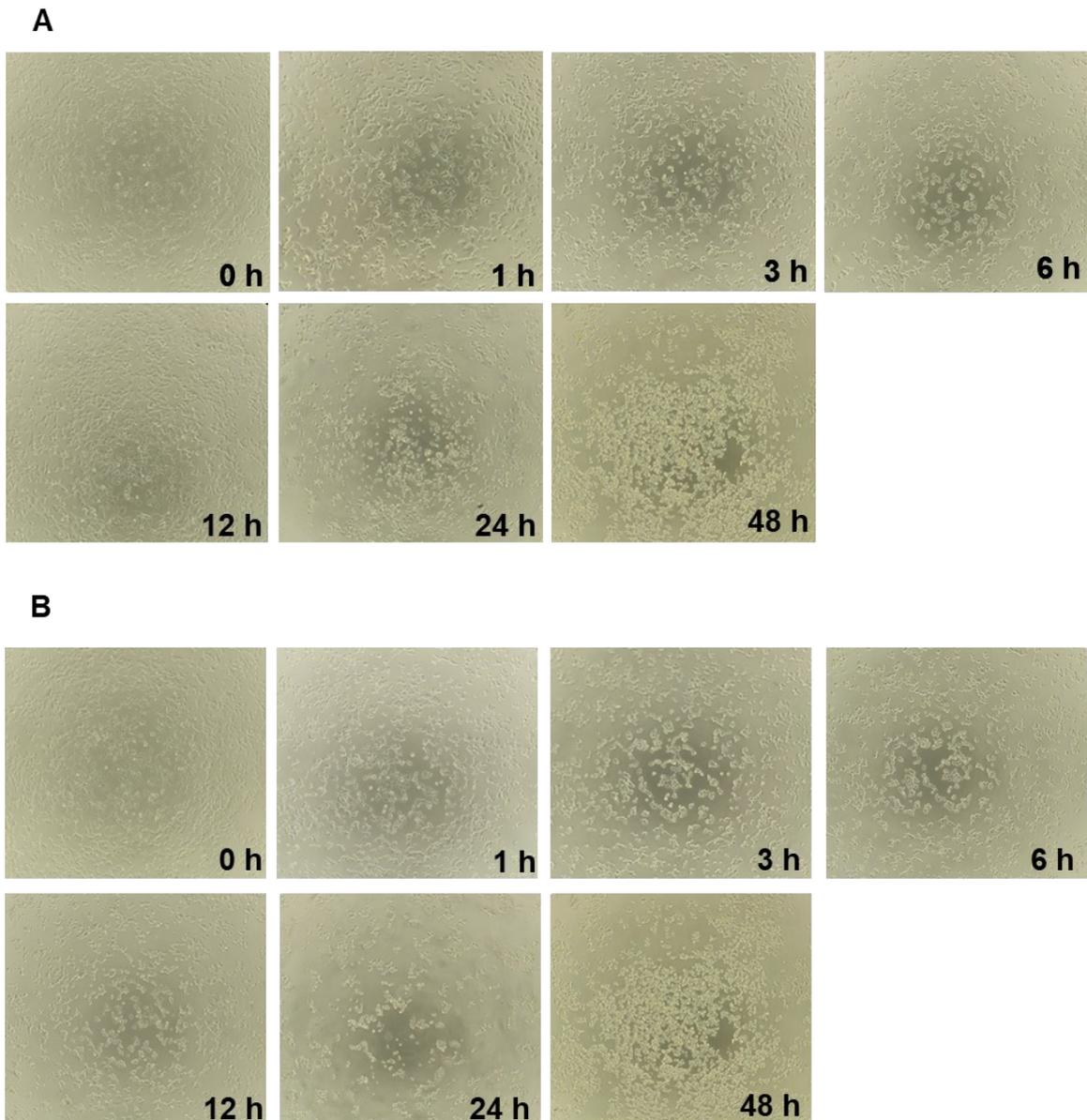


Legenda: As células foram expostas ao veículo ou ao MZ nas concentrações de 6 μM (A), 10 μM (B) e 20 μM (C) durante 1 – 48 horas. A morte celular foi avaliada pelo ensaio de incorporação do iodeto de propídio. Os resultados foram expressos em porcentagem de morte celular, calculados em relação ao controle positivo de morte (células tratadas com Triton X-100 2%). Os dados representam a média ± erro padrão da média. Os dados são referentes a experimentos feitos em células em diferentes passagens (N=7). ** p < 0,01; *** p < 0,001 e **** p < 0,0001 indicam diferença estatística em relação ao grupo controle (células tratadas com veículo) através de análise de variância de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett.

Na concentração de 6 μM, não houve morte significativa em nenhum dos tempos avaliados (Figura 9A), já na concentração de 10 μM, houve uma indução de morte celular após 6 horas de exposição ao MZ. Nesta mesma concentração, após 12 horas de exposição ocorreu uma pequena recuperação das células, a qual foi

precedida de um aumento significativo na incorporação do IP em 24 e 48 h (Figura 9B). E, por fim, a exposição ao MZ 20 μM já induz morte celular significativa após 3 horas de exposição, seguida de uma recuperação em 6 h e, novamente, um aumento significativo na incorporação do IP em 12, 24 e 48 h (Figura 9C). Esses dados indicam que a toxicidade do MZ nas células SH-SY5Y é dependente do tempo de exposição e da concentração.

Figura 10. Morfologia das células SH-SY5Y após exposição temporal ao MZ



Legenda: As células foram expostas ao MZ nas concentrações de 6 μM (A) e 10 μM (B) durante 1 - 48 horas. Fotos representativas das células foram adquiridas em microscopia de contraste de fase nos diferentes tempos de exposição. Aumento de 200x.

Para complementar os resultados das figuras 8 e 9, imagens das células, em microscopia de contraste de fase, foram adquiridas após a exposição ao MZ nas concentrações de 6 e 10 μM nos tempos de 1 - 48 h. É possível observar que a exposição ao fungicida (6 μM) causa uma diminuição no número de prolongamentos celulares, tornando as células com morfologia mais esférica. Essas alterações já começam a aparecer a partir da concentração de 3 μM , apesar de não ter sido observada diminuição significativa na viabilidade celular (Figura 10A). Já no tempo de exposição de 12 horas, as células apresentam uma morfologia semelhante às células que não foram expostas ao MZ, indicando uma “recuperação”, que é precedida novamente por alterações morfológicas nos tempos de 24 e 48 h. Já o MZ na concentração de 10 μM começa a causar alterações após 1 h de exposição (Figura 10B).

Um resultado interessante que observamos nos ensaios para avaliação da citotoxicidade do MZ é que, após a exposição ao fungicida nas concentrações de 6 e 10 μM ocorre uma “recuperação” das células nos tempos de exposição de 6 e 12 h, respectivamente. Essa recuperação pode estar relacionada à ativação de mecanismos de defesas celulares após a exposição ao fungicida. Dados na literatura mostram que o fungicida maneb é capaz de aumentar o conteúdo de GSH em culturas primárias de neurônios mesencefálicos, em células PC12 (BARLOW *et al.*, 2005) e também em células SH-SY5Y (ROEDE *et al.*, 2011). Este aumento no conteúdo de GSH foi atribuído a um aumento na síntese do tripeptídeo pela ativação da enzima GCL, uma enzima chave na síntese da GSH (BARLOW *et al.*, 2005). De fato, Roede *et al.* (2011) mostrou que o maneb causa aumento na translocação nuclear do fator de transcrição Nrf2, o qual está relacionado à regulação de genes de enzimas antioxidantes e da GCL (ROEDE *et al.*, 2011). Apesar desses mecanismos não terem sido avaliados em nosso estudo, não podemos descartar que tais eventos possam também ocorrer na exposição ao MZ, tendo em vista a similaridade química de ambos os fungicidas.

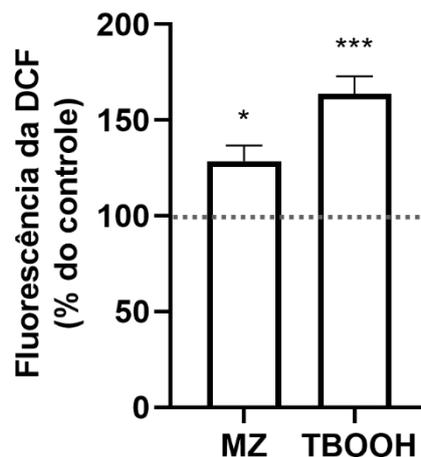
5.3 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MZ SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS EM CÉLULAS SH-SY5Y

Após os estudos de toxicidade do MZ, investigamos os possíveis mecanismos envolvidos no efeito tóxico do fungicida nas células SH-SY5Y. Conforme resultados obtidos nos experimentos anteriores, escolhemos para os experimentos seguintes a

concentração de 6 μM , a qual, apesar de diminuir a viabilidade das células, não induziu morte celular significativa. Como o EO é um mecanismo envolvido na DP e na toxicidade de agrotóxicos EBDCs, a geração de espécies reativas (ER) foi avaliada através da sonda DCFH-DA. O TBOOH foi utilizado como um controle positivo do ensaio.

A figura 11 mostra que a exposição ao MZ, durante 1 hora, aumentou significativamente a geração de ER. Esse resultado se assemelha ao obtido por Domico *et al* (2007) que demonstrou um aumento de ER em cultivos primários de neurônios mesencefálicos, com uma concentração de 30 μM , após 30 minutos de exposição e também com os resultados de Quds *et al.* (2023) que observou um aumento significativos de EROs e ERNs em culturas de eritrócitos humanos expostas ao MZ.

Figura 11. Avaliação da produção de ER em células SH-SY5Y expostas ao MZ



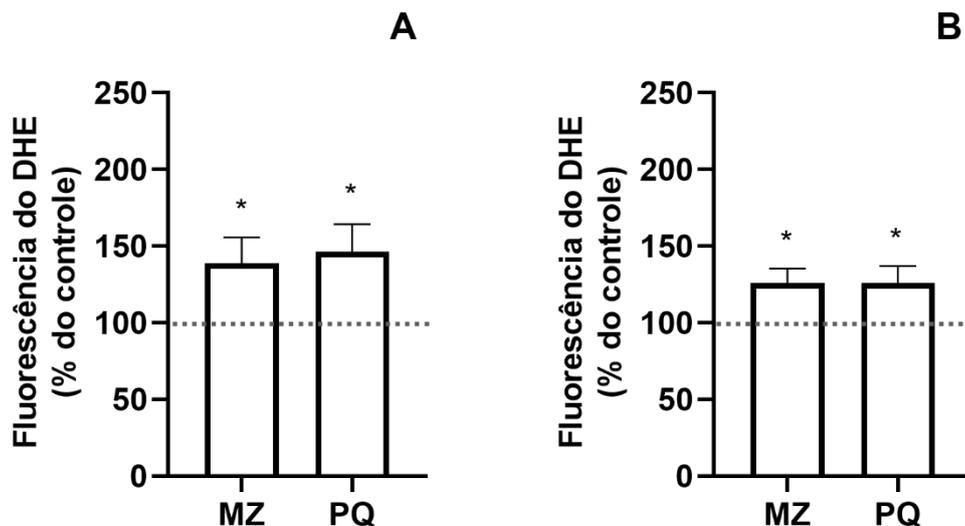
Legenda: As células foram tratadas com MZ 6 μM e TBOOH 50 μM por 1 h. A produção de ER foi avaliada utilizando a sonda DCFH-DA por citometria de fluxo no canal FITC. Os resultados foram expressos em relação a porcentagem de fluorescência do controle (células tratadas com veículo). A linha tracejada no gráfico representa o 100% do controle. Os dados representam a média \pm erro padrão da média. Os dados são referentes a experimentos feitos em células em diferentes passagens (N=4). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ indicam diferença estatística em relação ao grupo controle através de teste t de Student.

Em seguida, fomos investigar a geração de radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) nas células após a exposição ao MZ. Para isso, foram realizados experimentos com a concentração de 6 μM do fungicida em 2 intervalos de tempo. Como controle positivo do ensaio, foi utilizado o PQ em uma concentração de 100 μM , o qual tem como mecanismo primário de toxicidade a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (RAPPOLD *et al.*, 2011). A

exposição ao MZ durante 1 e 3 horas causou um aumento significativo na geração de $O_2^{\cdot-}$ (Figura 12A e B), indicando que, o aumento observado na geração de ER (Figura 11) corresponde, pelo menos em parte, ao $O_2^{\cdot-}$.

O ânion superóxido é formado pela redução da molécula de O_2 por um único elétron. Pode ser formado na própria cadeia respiratória pela ação da NADH desidrogenase ou como intermediário da reação catalisada por algumas oxidases, entre elas a xantina oxidase (TURRENS, 2003; WHITE *et al.*, 1996). Ele pode levar a formação de outras EROs, como H_2O_2 que atravessa as membranas celulares e pode gerar o HO^{\cdot} , que é altamente reativo. Pode também reagir com NO e gerar o $ONOO^{\cdot-}$ (PRYOR; SQUADRITO, 1995). Nossos resultados mostram que o MZ é capaz de aumentar a geração de $O_2^{\cdot-}$, entretanto, os mecanismos envolvidos nesse efeito ainda precisam ser elucidados.

Figura 12. Avaliação da produção do radical ânion superóxido em células SH-SY5Y expostas ao MZ



Legenda: As células foram tratadas com MZ 6 μ M e Paraquat (PQ) 100 μ M durante 1 hora (A) ou 3 horas (B). A produção do radical ânion superóxido foi avaliada utilizando o ensaio do dihidroetídio. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle (células tratadas com veículo). Os dados representam a média \pm erro padrão da média. A linha tracejada nos gráficos representa o 100% do controle. Os dados são referentes a experimentos feitos em células em diferentes passagens (N=6-7). * $p < 0,05$ indica diferença estatística em relação ao grupo controle através de teste t de Student.

Conforme citado anteriormente, (ver item 1.5.1.2), várias vias metabólicas levam a produção das EROs no SNC, dentre elas o metabolismo da dopamina, disfunção mitocondrial, mutações genéticas que degradam proteínas importantes,

neuroinflamação e a presença de toxinas ambientais, como é o caso de alguns agrotóxicos.

Estudos anteriores já associaram a presença do Mn com alterações no sistema de defesa antioxidante e geração de espécies reativas (ER) devido a sua natureza redox e também pela indução de disfunção mitocondrial (SPRANGER *et al.*, 1998; CHTOUROU *et al.*, 2011; KAIDERY; THOMAS, 2018). A exposição aos EBDCs, em modelos *in vivo* e *in vitro*, já foi associada a geração de EROs e/ou aumento da resposta inflamatória que potencializa a formação de EROs (AMARA *et al.*, 2015; JABALLI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2023; DOMICO *et al.*, 2006).

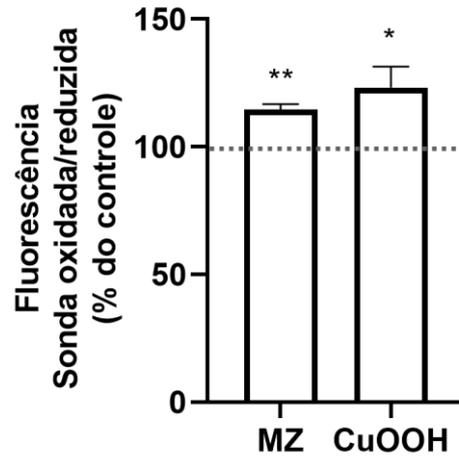
DOMICO *et al.*, 2006 observou um aumento significativo de fluorescência da DCF, em células mesencefálicas, a partir de 5 minutos de exposição a uma concentração de 30 μM de MZ. Além disso, também observaram um aumento significativo na formação de H_2O_2 , medido no momento após o tratamento com 30 μM de MZ. Esses dados da literatura, em conjunto com nossos resultados, mostram que o agrotóxico MZ é capaz de aumentar a geração de ER, um fenômeno que está associado à indução de EO e morte neuronal em doenças neurodegenerativas como a DP.

5.4 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MZ SOBRE A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CÉLULAS SH-SY5Y

A avaliação da geração de hidroperóxidos lipídicos foi realizada como uma medida da peroxidação lipídica, através da sonda Bodipy 581/591 C11. De acordo com a figura 13, a exposição ao MZ 6 μM , durante 3 horas, causou aumento significativo na geração de hidroperóxidos lipídicos, indicando que o fungicida é capaz de induzir peroxidação lipídica nas células SH-SY5Y.

As membranas de células e organelas, devido ao seu grande conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), são altamente suscetíveis ao dano pelas EROs, processo conhecido como peroxidação lipídica (XIAO *et al.*, 2017). Isso ocorre quando um radical livre remove elétrons dos lipídios e produz intermediários também reativos que culminam em uma cadeia de reações (SPITELLER; AFZAL, 2014). Essa peroxidação danifica os lipídios diretamente e pode sinalizar para morte celular programada da célula (ŁUCZAJ; GęGOTEK; SKRZYDLEWSKA, 2017).

Figura 13. Avaliação da geração de hidroperóxidos lipídicos em células SH-SY5Y expostas ao MZ



Legenda: As células foram tratadas com veículo (DMSO 0,5%, MZ 6 μM por 3 h ou CuOOH 25 μM por 2 h). A produção de hidroperóxidos lipídicos foi avaliada utilizando a sonda Bodipy 581/591 C11 por citometria de fluxo nos canais FITC (sonda oxidada) e PE (sonda reduzida). Os resultados foram expressos em relação a porcentagem do controle (células tratadas com veículo). Os dados representam a média \pm erro padrão da média. A linha tracejada no gráfico representa o 100% do controle. Os dados são referentes a experimentos feitos em células em diferentes passagens (N=3). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indicam diferença estatística em relação ao grupo controle através de teste t de Student.

A presença de $\text{O}_2^{\cdot-}$ na célula, conforme discutido anteriormente, pode levar a formação de ONOO^{\cdot} . Esse radical, por sua vez, pode gerar processos citotóxicos, incluindo peroxidação lipídica e dano de DNA (PRYOR; SQUADRITO, 1995). Sabendo, portanto, que a presença de espécies reativas está relacionada com o processo de peroxidação lipídica, nossos resultados que revelam aumento das espécies reativas já com 1 hora de exposição ao MZ, demonstram que as ERs podem estar contribuindo para esse aumento da peroxidação lipídica após 3 h de exposição.

Jia e Misra (2007) observaram a geração de lipoperóxidos, nas células SH-SY5Y após o tratamento com Zineb, um outro representante da classe dos EBDCs, em uma concentração de 100 μM por 16 h. Aumento de lipoperóxidos também foi observado em células V79 tratadas com o Maneb nas concentrações de 100 e 200 μM por 1 hora, e esse aumento foi prevenido quando as células foram tratadas com o antioxidante N-acetilcisteína (GROSICKA-MACIĄG *et al.*, 2011). Além disso, um estudo conduzido com eritrócitos humanos também observou um aumento na concentração de peróxidos lipídicos após tratamento das células com MZ por 24 h (QUDS *et al.*, 2023), corroborando os resultados obtidos em nosso estudo.

5.5 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MZ SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GSH EM CÉLULAS SH-SY5Y

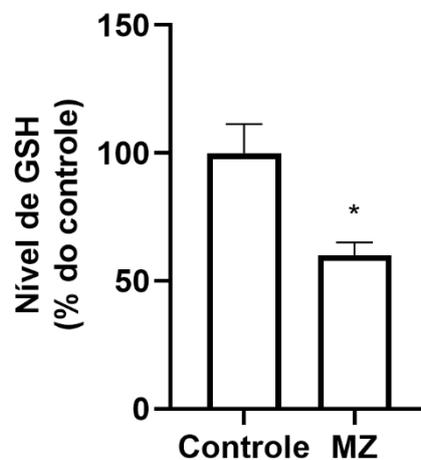
Sabendo que a depleção de GSH pode ocorrer como uma consequência do aumento na geração de ER, foi avaliado o conteúdo intracelular de GSH após exposição ao MZ 6 μM , durante 3 horas. Após a realização do ensaio do NPSH, observou-se que, nas células tratadas com o MZ, houve uma redução significativa na concentração de GSH intracelular (Figura 14).

Por ser uma importante molécula envolvida na biotransformação e eliminação de xenobióticos, bem como na defesa contra o EO, acreditamos que a sua diminuição está relacionada a seu consumo pelas células como um mecanismo de defesa frente ao EO causado pelo MZ, já que, conforme observamos anteriormente (Figura 11 e 12), há um aumento na geração de ERs e radical ânion superóxido, a partir de 1 h de exposição ao fungicida.

A GSH é essencial na manutenção da homeostase redox celular evitando a ocorrência de EO que, por sua vez, leva a morte celular. O papel da GSH neste contexto envolve principalmente sua ação como um cofator para as enzimas GPx., que são responsáveis pela decomposição de H_2O_2 e peróxidos orgânicos, às custas dos elétrons doados pela GSH. Como mencionado anteriormente, as enzimas GPx catalisam a redução de peróxidos em seus álcoois correspondentes às custas da oxidação de duas moléculas de GSH, formando glutathiona oxidada (GSSG) e água. A GSSG é reduzida a duas moléculas de GSH novamente pela enzima GR com a utilização de NADPH como agente redutor e, desta forma, a atividade das enzimas GPx é mantida (BRIGELIUS-FLOHÉ; MAIORINO, 2013). Quando ocorre depleção de GSH, a ação das enzimas GPx fica comprometida, e, como consequência, as células ficam ainda mais suscetíveis a danos oxidativos. No SNC de pacientes com DP há uma redução drástica na atividade total da GPx e nos níveis de GSH (SIAN *et al.*, 1994; DAVIES *et al.*, 2014). Essa redução dos níveis de GSH no SNC pode estar associada à prejuízos no funcionamento da enzima GCL, que é responsável por catalisar a reação limitante na via de síntese da GSH (KANG *et al.*, 1999; ZHOU; FREED, 2005). Além disso, um desequilíbrio entre a reciclagem de GSH, mediada pela ação da enzima GR e a produção de peróxidos também pode estar relacionado a esta diminuição (SIAN *et al.*, 1994).

Em seu estudo com células PC12 e células mesencefálicas, Barlow et al. (2005), relatou uma significativa redução dos níveis de GSH após o tratamento com doses baixas (0,0376-3,76 mM) de Maneb. O mesmo aconteceu no estudo de Grosicka-Maciąg *et al.* (2011), cuja concentração de Maneb era 100 μ M com 1 h de exposição. Nosso resultado se assemelha ao encontrado por Quds *et al.* (2023) que também observou uma diminuição significativa dos níveis de glutathiona em eritrócitos humanos tratados com MZ.

Figura 14. Avaliação da concentração de GSH em células SH-SY5Y expostas ao MZ



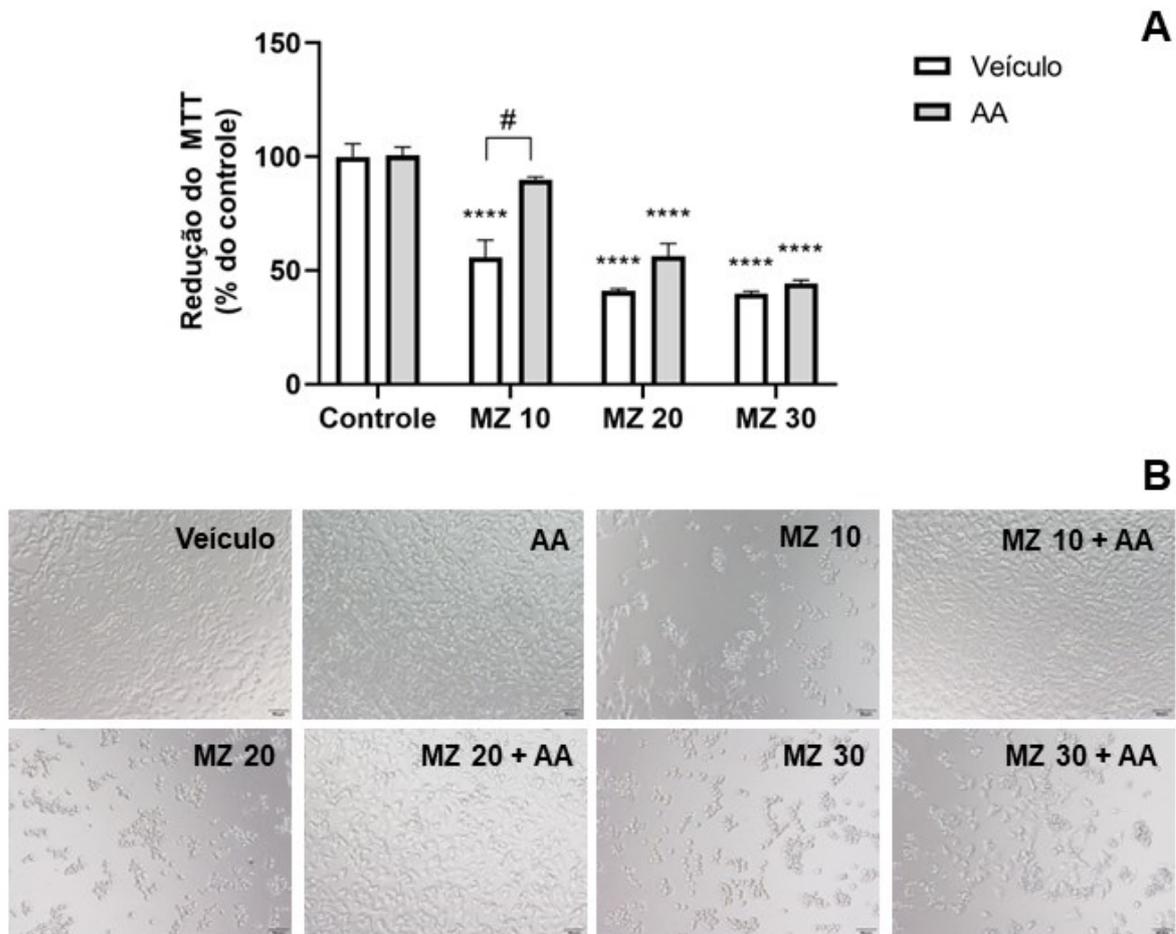
Legenda: As células foram expostas ao veículo (DMSO 0,05%) ou ao MZ 6 μ M por 3 horas. Os níveis de GSH foram avaliados pelo ensaio do NPSH. Os dados representam a média \pm erro padrão da média. Os dados são referentes a experimentos feitos em células em diferentes passagens). * $p < 0,05$ indica diferença estatística em relação ao grupo controle (células tratadas com veículo) através de teste t de Student.

5.6 ANÁLISE DO EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO ASCÓRBICO FRENTE À TOXICIDADE INDUZIDA PELO MZ

Conforme os resultados anteriores, observou-se que o MZ é capaz de induzir alterações em marcadores de EO (aumento na geração de ERs e radical ânion superóxido, peroxidação lipídica, depleção de GSH). Não é errado pensar que uma substância conhecida pelo seu potencial antioxidante, como o ácido ascórbico, poderia vir a proteger as células frente ao dano oxidativo induzido pelo MZ. Para analisar esta hipótese foi realizado um ensaio de viabilidade, onde as células SH-SY5Y foram pré-tratadas por 15 minutos com ácido ascórbico (AA), seguido da

exposição ao MZ nas concentrações de 10, 20 e 30 μM , por 48 h. Os resultados obtidos são mostrados na figura 15.

Figura 15. Efeito protetor do AA frente à toxicidade induzida pelo MZ



Legenda: As células foram tratadas com AA (50 μM) e/ou MZ nas concentrações de 10, 20 e 30 μM durante 48 horas. (A) A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução do MTT. Os resultados foram expressos em porcentagem do controle (células tratadas com veículo). Os dados representam a média \pm erro padrão da média. Os dados são referentes a experimentos feitos em células em diferentes passagens (N=3). **** $p < 0,0001$ indica diferença estatística em relação ao grupo controle; # $p < 0,001$ indica diferença estatística entre o grupo tratado com MZ 10 μM e o grupo tratado com AA + MZ 10 μM através de análise de variância de duas vias, seguida pelo pós teste de Tukey. (B) Imagens representativas das células em microscopia de campo claro. Aumento de 200x.

De acordo com os resultados obtidos, conseguimos mostrar que o AA foi capaz de proteger totalmente a perda de viabilidade induzida pelo MZ na concentração de 10 μM . Por outro lado, nas concentrações maiores de MZ, não se observou uma proteção significativa do AA (Figura 15A). Nas imagens representativas (Figura 15B) é possível observar que o AA conseguiu preservar as características das células expostas ao MZ 10 μM , o que não ocorreu nas concentrações de 20 e 30 μM do fungicida, concentrações que induzem um dano mais severo, onde a proteção do

AA parece não conseguir se sustentar. Baseado nesses resultados podemos afirmar que o EO está envolvido no mecanismo de toxicidade do MZ.

O ácido ascórbico, popularmente conhecido como vitamina C, é uma importante molécula antioxidante, que, em pH fisiológico, se apresenta predominantemente na forma ionizada, o ascorbato. O ascorbato é um excelente agente redutor e é capaz de doar elétrons para espécies reativas radicalares incluindo $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , radical alcoxila (RO^{\cdot}) e radical peroxila (LOO^{\cdot}) (DU; CULLEN; BUETTNER, 2012; NJUS *et al.*, 2020), impedindo que essas ERs causem danos oxidativos a biomoléculas. Em nosso estudo o AA, através de seu efeito *scavenger*, foi capaz de proteger as células frente a toxicidade induzida pelo MZ. De maneira semelhante, em um estudo prévio realizado por Pavlovic *et al.*, 2015, também foi observado que o tratamento com ácido ascórbico foi capaz de reduzir significativamente a citotoxicidade do MZ (0,2 e 2 $\mu\text{g/mL}$) em culturas de timócitos de ratos, além de reduzir os níveis EROs e aumentar o PMM.

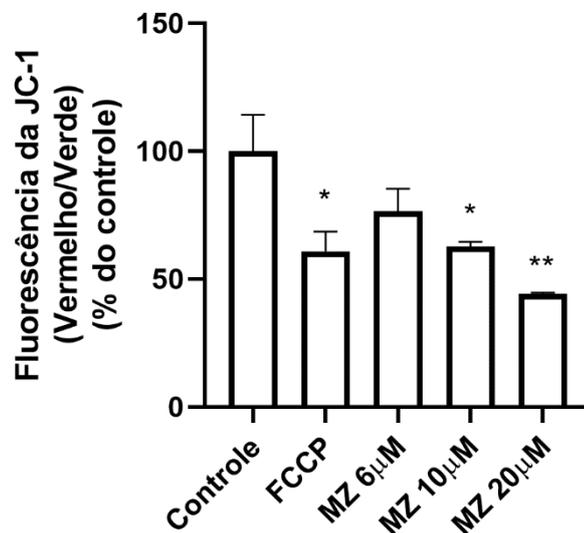
5.7 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL APÓS EXPOSIÇÃO AO MZ EM CÉLULAS SH-SY5Y

Considerando que a disfunção mitocondrial é um importante mecanismo envolvido na morte de neurônios dopaminérgicos na DP (FARINA *et al.*, 2013; IJOMONE *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2003; BAILEY *et al.*, 2016) e sua relação com o EO, decidimos investigar se a exposição ao MZ afetava a função mitocondrial das células SH-SY5Y. Para isso, a avaliação do PMM foi realizada através da leitura da fluorescência da sonda JC-1. A formação dos agregados J (maior aumento da fluorescência vermelha em relação a verde) está relacionada a uma manutenção do PMM e a diminuição na sua formação (menor aumento da fluorescência vermelha em relação a verde) está relacionada a perda do PMM. Na figura 16, podemos observar que a exposição ao MZ, durante 3 horas, nas concentrações de 10 e 20 μM , induziu uma diminuição significativa na razão da fluorescência vermelha sobre a verde, indicando uma diminuição no PMM. Já o MZ na concentração de 6 μM não foi capaz de alterar significativamente o PMM, após 3 horas de exposição.

Pavlovic *et al.*, 2015 também observou uma redução do PMM em timócitos de ratos tratados com concentrações de 0,2, 2 e 5 $\mu\text{g/mL}$ de MZ. Além disso, observou que o co-tratamento com AA protegeu da perda do potencial de membrana induzido

pelo MZ (Pavlovic *et al.*, 2015). Em outro estudo, com culturas de células granulosas de ovário de camundongos, o MZ (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) causou uma redução no PMM e aumento na geração de EROs, com consequente alteração no estado redox celular e diminuição na produção de ATP (IORIO *et al.*, 2015). O tratamento com MZ (5 e 10 μM por 48 h) também induziu a rápida formação de EROs e redução do PMM em células de carcinoma gástrico humano (KUMAR; SABARWAL; SINGH, 2019). Esses dados indicam que o fungicida MZ, além de causar EO, também parece afetar a função mitocondrial.

Figura 16. Efeitos da exposição ao MZ sobre PMM.



Legenda: As células foram expostas ao veículo (DMSO 0,05), ao MZ nas concentrações de 6, 10 e 20 μM por 3 h ou com FCCP (controle positivo) por 1 hora. O PMM foi avaliado por meio do fluorocromo JC-1 e os resultados foram calculados pela razão da fluorescência vermelha/fluorescência verde e expressos em porcentagem do controle (células tratadas com veículo). Os dados representam a média \pm erro padrão da média e são referentes a experimentos feitos em células em diferentes passagens (N=3). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indicam diferença estatística em relação ao grupo controle através de análise de variância de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett.

Ao longo da vida de uma célula, as mitocôndrias usam substratos oxidáveis para produzir um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial que é usado para produzir ATP. Este gradiente eletroquímico impulsiona a síntese de ATP. O PMM é um indicador do estado energético das mitocôndrias e é crítico para a manutenção da cadeia transportadora de elétrons e, consequentemente, para a geração de ATP (PALMEIRA; ROLO, 2011). Uma redução no PMM resulta em diminuição da capacidade energética das células e na geração de EROs (MEYER *et al.*, 2013). Além disso, durante o processo de apoptose, o PMM diminui, pois o processo

está associado à abertura dos poros de permeabilidade mitocondrial e perda do gradiente eletroquímico. Assim, o PMM é um parâmetro essencial de função mitocondrial que pode ser usado como um indicador da saúde celular, uma vez que as mitocôndrias estão inerentemente envolvidas no processo apoptótico das células (LY; GRUBB; LAWEN, 2003). No presente estudo não foram avaliados marcadores de apoptose, mas não podemos descartar uma possível associação entre a perda do PMM induzida pelo MZ e a ativação dessa via de morte celular. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar esses mecanismos e para melhor compreender o papel da disfunção mitocondrial como um evento envolvido na toxicidade do MZ.

5.8 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO MZ EM MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM CÉLULAS SH-SY5Y

Como mencionado anteriormente, além do EO e da disfunção mitocondrial, a inflamação é outro mecanismo importante envolvido na morte neuronal na DP. Por conta disso, resolvemos investigar se a exposição ao MZ poderia aumentar a liberação das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α nas células. Os ensaios realizados pelo método ELISA não conseguiram identificar a presença das citocinas pesquisadas, pois o resultado obtido ao final da técnica demonstrou valores considerados abaixo dos limites de detecção dos kits.

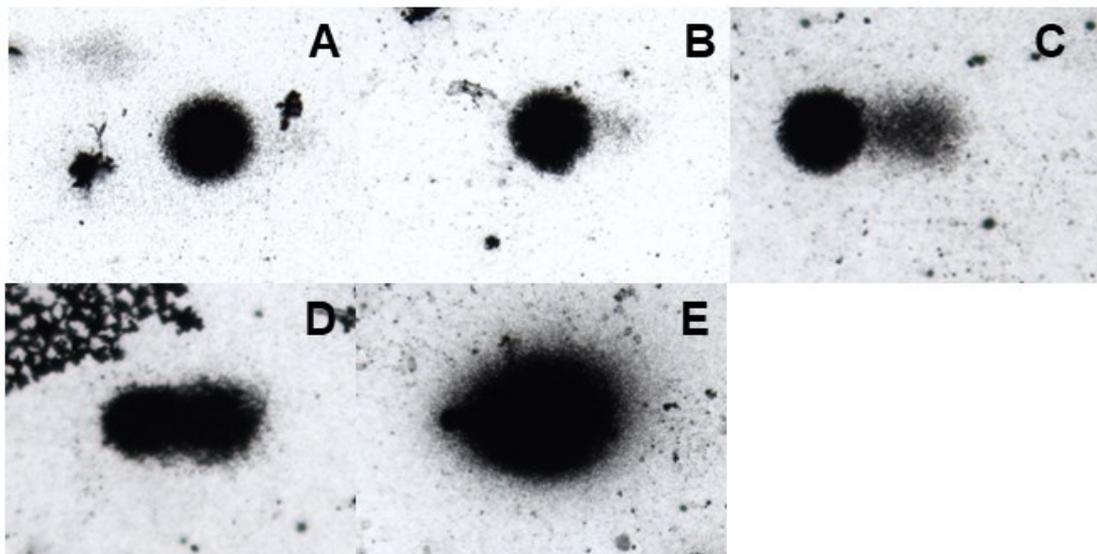
Um estudo anterior realizado por WEIS *et al.*, 2019 demonstrou aumento de IL-6, IL-1 β e TNF- α em macrófagos murinos tratados com MZ. O estudo realizado por Gök e Deveci (2022) demonstrou um aumento de TNF- α nos hepatócitos e células de Kupffer de ratos Wistar tratados oralmente com MZ por 4 semanas. Já um estudo realizado com células mononucleares de sangue periférico humano, tratadas *in vitro* com concentrações não citotóxicas de MZ demonstrou que ele possui um efeito inibidor na produção de TNF- α (MANDARAPU *et al.*, 2014). Um outro estudo realizado com amostras de trabalhadores da agricultura expostos ocupacionalmente ao MZ também demonstrou uma redução na liberação de TNF- α induzida por LPS (CORSINI *et al.*, 2005). Essa redução se deve ao fato de que o MZ, modulando a geração de EROs induzidas por LPS, impediu a degradação da proteína I κ B e a translocação nuclear do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), o que, por sua vez, resultou na diminuição da produção de TNF- α (CORSINI *et al.*, 2006).

5.9 AVALIAÇÃO DE DANO NO DNA INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO AO MZ EM CÉLULAS SH-SY5Y

A genotoxicidade é um efeito já descrito para os agrotóxicos pertencentes a classe dos EBDCs (SOLONESKI *et al.*, 2002; GONZÁLEZ *et al.*, 2003, CALVIELLO *et al.*, 2006; LORI *et al.*, 2021; YAHIA *et al.*, 2019, MARQUES *et al.*, 2016). Muitos compostos que apresentam risco de carcinogenicidade são também descritos como genotóxicos. Considerando uma escassez de estudos avaliando a genotoxicidade do MZ no SNC, resolvemos investigar se a exposição ao MZ poderia causar danos no DNA das células SH-SY5Y, através do ensaio cometa, que é uma metodologia extensivamente utilizada em estudos de genotoxicidade de toxicantes ambientais em exposições ocupacionais em humanos, bem como em modelos experimentais (VALVERDE; ROJAS, 2009; MØLLER; STOPPER; COLLINS, 2019).

Na figura 17 estão representadas as classes de danos no DNA analisadas no ensaio cometa, que variam de 0 (ausência de dano) até o dano 4 (dano total). As imagens de células SH-SY5Y foram capturadas em microscopia eletrônica para uma melhor representação visual de como foi realizada a análise.

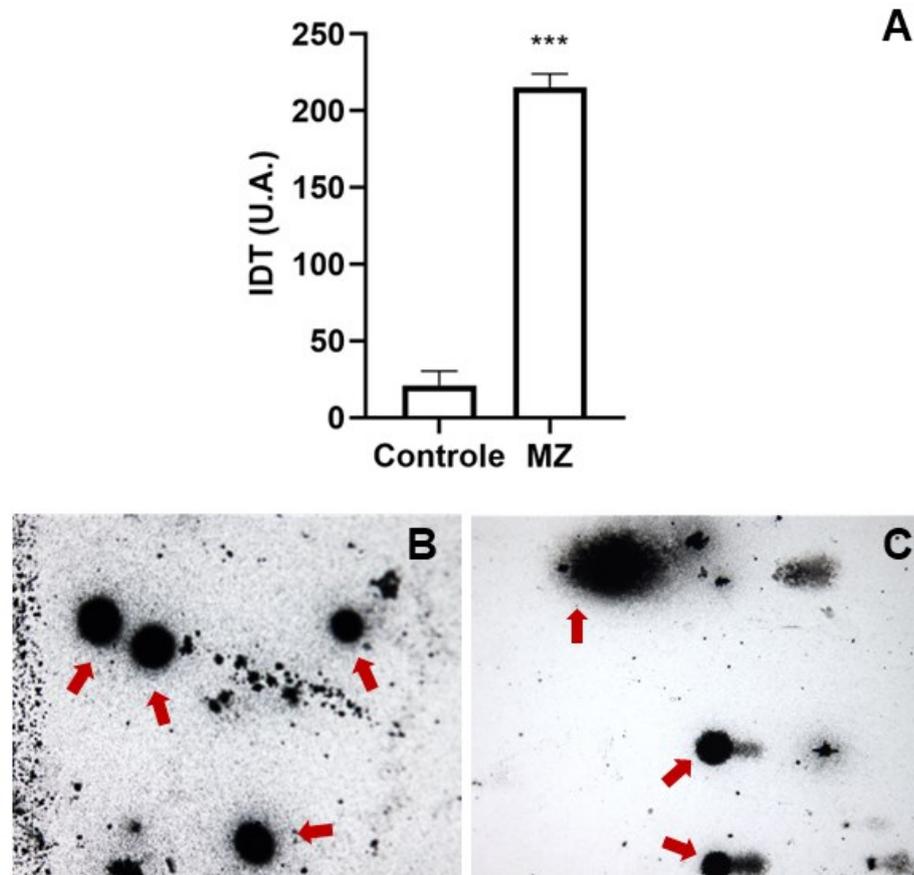
Figura 17. Classificação dos danos no DNA nas células SH-SY5Y



Legenda: Figura representativa mostrando as classes de dano ao DNA, após a corrida de eletroforese em gel de célula única e coloração com prata. Fotos de microscopia eletrônica adquiridas no aumento de 630x. A: dano 0 (sem danos); B: dano 1 (dano mínimo); C: dano 2 (dano médio); D: dano 3 (dano intenso); E: dano 4 (dano máximo).

Na figura 18A, podemos observar que a exposição ao MZ (6 μ M) por 24 h foi capaz de aumentar significativamente o índice de dano total no DNA nas células SH-SY5Y. Imagens representativas mostrando os padrões de dano no DNA em células expostas ao veículo ou ao MZ são apresentadas nas figuras 18 B e C.

Figura 18. Avaliação de dano no DNA após exposição ao MZ em células SH-SY5Y



Legenda: O ensaio cometa foi utilizado para avaliar o dano no DNA nas células SH-SY5Y. As células foram tratadas com veículo (DMSO 0,05%) ou MZ (6 μ M) por 24 h. (A) Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (U.A.) e referem-se ao índice de dano total (IDT), que é a soma dos valores dos danos encontrados nas 100 células avaliadas. Os dados representam a média \pm erro padrão da média e são referentes a experimentos feitos em células em diferentes passagens (N=3). *** $p < 0,001$ indica diferença estatística em relação ao grupo controle através de teste t de Student. (B) Foto representativa das células controle. As setas indicam os núcleos celulares com dano = 0. (C) Foto representativa das células expostas ao MZ. As setas indicam danos 4, 2 e 3 (de cima para baixo). Aumento de 630x.

Ao contrário dos outros parâmetros avaliados nesse trabalho, que não tem ainda uma grande quantidade de trabalhos publicados avaliando os efeitos da exposição ao MZ, a genotoxicidade pós-exposição ao composto, por sua vez, já possui diversos dados na literatura, tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* em animais

e plantas (CALVIELLO *et al.*, 2006; LORI *et al.*, 2021; YAHIA *et al.*, 2019, MARQUES *et al.*, 2016 e ARYA *et al.*, 2017) porém, estudos que avaliam a genotoxicidade no SNC são escassos. Alguns estudos correlacionam esse dano ao DNA com a indução de EO pelo fungicida (CALVIELLO *et al.*, 2006; SRIVASTAVA *et al.*, 2012). De fato, dano oxidativo no DNA pode ocorrer devido à exposição ao MZ, uma vez que o mesmo induz aumento na geração de ER (Figura 11 e 12), tornando biomoléculas como DNA, lipídios e proteínas suscetíveis à danos oxidativos.

6 CONCLUSÃO

De acordo com as nossas análises *in vitro*, a exposição ao fungicida MZ induziu citotoxicidade em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Tal efeito citotóxico foi protegido pelo tratamento com o composto antioxidante ácido ascórbico.

Além disso, a exposição ao MZ foi capaz de aumentar a geração de espécies reativas, diminuiu as concentrações de GSH intracelulares e causou peroxidação lipídica. Em conjunto, esses resultados revelam que o mecanismo primário de toxicidade do MZ parece estar relacionado ao estresse oxidativo.

Além do EO, outro mecanismo que parece estar envolvido na toxicidade do MZ é a disfunção mitocondrial, uma vez que a exposição ao fungicida causou redução no potencial de membrana mitocondrial. E, por fim, os resultados também revelaram o efeito genotóxico do MZ nas células SH-SY5Y. Não foram detectadas as citocinas pró-inflamatórias através do nosso modelo experimental.

Diante do exposto, os resultados deste estudo indicam que a exposição ao MZ induz distúrbios celulares compatíveis com eventos observados na DP, sugerindo uma possível relação entre a exposição ao agrotóxico e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a DP. Entretanto, nossos resultados *in vitro* são preliminares e mais estudos são necessários para melhor estabelecer essa relação, bem como, para elucidar outros mecanismos celulares envolvidos na citotoxicidade do fungicida.

6.1 Perspectivas Futuras:

Para trabalhos posteriores pode-se analisar melhor o papel da disfunção mitocondrial como mecanismo de citotoxicidade do MZ, através de alguns ensaios como a avaliação da produção de ânion superóxido intra-mitocondrial e a determinação da atividade dos complexos I, II, III e IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.

Além disso, para avaliar a possível relação entre a exposição ao MZ com o desenvolvimento da DP, podem ser realizados estudos *in vivo* utilizando modelos de roedores. Após a exposição ao MZ pode-se avaliar parâmetros comportamentais relacionados à função motora, bem como a análise de marcadores dopaminérgicos como o número de neurônios dopaminérgicos na substância negra por análise imuno-

histoquímica da enzima tirosina hidroxilase (TH) e níveis de dopamina e seus metabólitos no estriado.

REFERÊNCIAS

- ALI, S.F., et al. (1992). Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology**, [S.L.], v.13 n. 3, p. 637-648, 1992.
- AMARA, Ibtissem Ben *et al.* Maneb disturbs expression of superoxide dismutase and glutathione peroxidase, increases reactive oxygen species production, and induces genotoxicity in liver of adult mice. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 22, n. 16, p. 12309-12322, 23 abr. 2015. Springer Science and Business Media LLC.
- ANVISA. **Agrotóxicos**: monografias autorizadas. Monografias autorizadas. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/m-n-o/4419json-file-1>. Acesso em: 07 out. 2022.
- ARYA, Shashi Kiran *et al.* Malathion and dithane induce DNA damage in *Vicia faba*. **Toxicology And Industrial Health**, [S.L.], v. 33, n. 11, p. 843-854, 26 set. 2017. SAGE Publications.
- Babini G. A case of erythroderma caused by zinc dithiocarbamate. **Arch Ital Dermatol Venereol Sessuol** 34:230-238 (1966).
- BAILEY, Denise C. *et al.* *Caenorhabditis elegans* chronically exposed to a Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate fungicide show mitochondrial Complex I inhibition and increased reactive oxygen species. **Neurotoxicology**, [S.L.], v. 56, p. 170-179, set. 2016. Elsevier BV.
- BALARDIN, Ricardo Silveiro *et al.* **Mancozebe**: muito além de um fungicida. Porto Alegre: Bookman, 2017.
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira; COSTA, Neuza Maria Brunoro; ALFENAS, Rita de Cássia Gonçalves; PAULA, Sérgio Oliveira de; MINIM, Valéria Paula Rodrigues; BRESSAN, Josefina. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 629-643, ago. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52732010000400013>
- BARLOW, Brian K. *et al.* Modulation of Antioxidant Defense Systems by the Environmental Pesticide Maneb in Dopaminergic Cells. **Neurotoxicology**, [S.L.], v. 26, n. 1, p. 63-75, jan. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2004.07.004>.
- BASTÍAS-CANDIA, Sussy; ZOLEZZI, Juan M.; INESTROSA, Nibaldo C. Revisiting the Paraquat-Induced Sporadic Parkinson's Disease-Like Model. **Molecular Neurobiology**, [S.L.], v. 56, n. 2, p. 1044-1055, 3 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-018-1148-z>.
- BECKMAN, Joseph S. Peroxynitrite versus Hydroxyl Radical: the role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury. **Annals Of The New York Academy Of**

Sciences, [S.L.], v. 738, n. 1, p. 69-75, 17 dez. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb21791.x>.

BELPOGGI, Fiorella *et al.* Results of Long-Term Experimental Studies on the Carcinogenicity of Ethylene-bis-Dithiocarbamate (Mancozeb) in Rats. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 982, n. 1, p. 123-136, 24 jan. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04928.x>.

BIANCHI, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Gregg. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 123-130, ago. 1999. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52731999000200001>.

BINDOKAS, Vp *et al.* Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. **The Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 1324-1336, 15 fev. 1996. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.16-04-01324.1996>.

BLAZQUEZ, Carlos H.. Residue determination of ethylenethiourea (2-imidazolidinethione) from tomato foliage, soil, and water. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 330-332, maio 1973. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf60187a051>.

BLESA, Javier *et al.* Oxidative stress and Parkinson's disease. **Frontiers In Neuroanatomy**, [S.L.], v. 9, 8 jul. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnana.2015.00091>.

BLOCK, Michelle L.; ZECCA, Luigi; HONG, Jau-Shyong. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 57-69, jan. 2007. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2038>.

BLOEM, Bastiaan R; OKUN, Michael s; KLEIN, Christine. Parkinson's disease. **The Lancet**, [S.L.], v. 397, n. 10291, p. 2284-2303, jun. 2021. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)00218-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(21)00218-x).

BOUABID, Safa *et al.* Manganese neurotoxicity: behavioral disorders associated with dysfunctions in the basal ganglia and neurochemical transmission. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 136, n. 4, p. 677-691, 28 dez. 2015. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.13442>.

BRAAK, Heiko *et al.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology Of Aging**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 197-211, mar. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00065-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00065-9).

BRASIL, 1992. **PORTARIA Nº 03, DE 16 DE JANEIRO DE 1992. Disponível em:** https://bvsm.sau.de.gov.br/bvs/sau.delegis/svs1/1992/prt0003_16_01_1992.html#:~:text=Classe%20I%20Produtos%20Extremamente%20T%C3%B3xicos,Classe%20IV%20Produtos%20Pouco%20T%C3%B3xicos.> Acesso em 20 de Julho de 2023.

BRIGELIUS-FLOHÉ, Regina; MAIORINO, Matilde. Glutathione peroxidases. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - General Subjects**, [S.L.], v. 1830, n. 5, p. 3289-3303, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>.

BRODY, A. Harrison *et al.* Mancozeb-induced behavioral deficits precede structural neural degeneration. **Neurotoxicology**, [S.L.], v. 34, p. 74-81, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2012.10.007>.

BURALLI, Rafael Junqueira; DULTRA, Amana Freitas; RIBEIRO, Helena. Respiratory and Allergic Effects in Children Exposed to Pesticides—A Systematic Review. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 17, n. 8, p. 2740, 16 abr. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph17082740>.

CALVIELLO, G *et al.* DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [S.L.], v. 211, n. 2, p. 87-96, 1 mar. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2005.06.001>

CARNEIRO, Fernando Ferreira et al (Org.). Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015

CEULEMANS, An-Gaëlle *et al.* The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. **Journal Of Neuroinflammation**, [S.L.], v. 7, n. 1, 1 nov. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-7-74>.

CHÉRET, Cyril *et al.* Neurotoxic Activation of Microglia Is Promoted by a Nox1-Dependent NADPH Oxidase. **The Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 28, n. 46, p. 12039-12051, 12 nov. 2008. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3568-08.2008>.

CHERIAN, Ajith; DIVYA, K. P. Genetics of Parkinson's disease. **Acta Neurologica Belgica**, [S.L.], v. 120, n. 6, p. 1297-1305, 19 ago. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13760-020-01473-5>.

CHTOUROU, Yassine *et al.* Manganese Induces Oxidative Stress, Redox State Unbalance and Disrupts Membrane Bound ATPases on Murine Neuroblastoma Cells In Vitro: protective role of silymarin. **Neurochemical Research**, [S.L.], v. 36, n. 8, p. 1546-1557, 30 abr. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-011-0483-5>.

COCCO, Pierluigi. Time for Re-Evaluating the Human Carcinogenicity of Ethylenedithiocarbamate Fungicides? A Systematic Review. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 2632, 24 fev. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph19052632>.

COLOSIO, C *et al.* Neurobehavioral Effects of Pesticides: state of the art. **Neurotoxicology**, [S.L.], v. 24, n. 4-5, p. 577-591, ago. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0161-813x\(03\)00055-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0161-813x(03)00055-x).

COOPER, AJL. Role of astrocytes in maintaining cerebral glutathione homeostasis and in protecting the brain against xenobiotics and oxidative stress. In: The role of glutathione in the nervous system. Washington (DC): Taylor and Francis; 1998. p. 91–115.

CORSINI, Emanuela *et al.* Immunomodulatory effects of the fungicide Mancozeb in agricultural workers. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [S.L.], v. 208, n. 2, p. 178-185, out. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2005.02.011>.

CORSINI, Emanuela *et al.* Molecular mechanisms underlying mancozeb-induced inhibition of TNF-alpha production. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [S.L.], v. 212, n. 2, p. 89-98, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2005.07.002>.

COSTA-SILVA, Dennis Guilherme *et al.* Mancozeb exposure results in manganese accumulation and Nrf2-related antioxidant responses in the brain of common carp *Cyprinus carpio*. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 25, n. 16, p. 15529-15540, 22 mar. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-1724-9>.

COSTELLO, S. *et al.* Parkinson's disease and Residential Exposure to Maneb and Paraquat From Agricultural Applications in the Central Valley of California. **American Journal Of Epidemiology**, [S.L.], v. 169, n. 8, p. 919-926, 3 mar. 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwp006>.

COUTO, Narciso; WOOD, Jennifer; BARBER, Jill. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 95, p. 27-42, jun. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>.

CRIPPA, M. *et al.* Dyshidrotic eczema and sensitization to dithiocarbamates in a florist. **Contact Dermatitis**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 203-204, set. 1990. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0536.1990.tb04796.x>.

DAVIES, K J; GOLDBERG, A L. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 262, n. 17, p. 8227-8234, jun. 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)47553-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0021-9258(18)47553-9).

DAVIES, Katherine M. *et al.* Copper pathology in vulnerable brain regions in Parkinson's disease. **Neurobiology Of Aging**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 858-866, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.034>.

DAVIES, Kelvin J.A. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. **Biochimie**, [S.L.], v. 83, n. 3-4, p. 301-310, mar. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0300-9084\(01\)01250-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0300-9084(01)01250-0).

DHANESHWAR, Amanda; HARDEJ, Diane. Disruption of mitochondrial complexes, cytotoxicity, and apoptosis results from Mancozeb exposure in transformed human colon cells. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 84, p. 103614, maio 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2021.103614>.

DIAS, Vera; JUNN, Eunsung; MOURADIAN, M. Maral. The Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **Journal Of Parkinson'S Disease**, [S.L.], v. 3, n. 4, p. 461-491, 2013. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/jpd-130230>.

DOMICO, Lisa M. *et al.* Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. **Neurotoxicology**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 816-825, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2006.07.009>.

DOMICO, Lisa M. *et al.* Acute neurotoxic effects of mancozeb and maneb in mesencephalic neuronal cultures are associated with mitochondrial dysfunction. **Neurotoxicology**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 816-825, set. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2006.07.009>.

DRINGEN, Ralf. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress In Neurobiology**, [S.L.], v. 62, n. 6, p. 649-671, dez. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0301-0082\(99\)00060-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0301-0082(99)00060-x).

DU, Juan; CULLEN, Joseph J.; BUETTNER, Garry R.. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Reviews On Cancer**, [S.L.], v. 1826, n. 2, p. 443-457, dez. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.06.003>.

DUMONT, Magali; BEAL, M. Flint. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 51, n. 5, p. 1014-1026, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.026>.

ECOBICHON, Donald J.. Pesticide use in developing countries. **Toxicology**, [S.L.], v. 160, n. 1-3, p. 27-33, mar. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0300-483x\(00\)00452-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00452-2).

ELLMAN, George L.. Tissue sulfhydryl groups. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, [S.L.], v. 82, n. 1, p. 70-77, maio 1959. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).

EPA, 1992. Disponível em <<http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/ethyl-th.html>>. Acessado em 02/12/2023.

FARINA, Marcelo *et al.* Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. **Neurochemistry International**, [S.L.], v. 62, n. 5, p. 575-594, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2012.12.006>.

FEIGIN, Valery L. *et al.* Global Burden of Neurological Disorders: from global burden of disease estimates to actions. **Neuroepidemiology**, [S.L.], v. 52, n. 1-2, p. 1-2, 23 nov. 2018. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000495197>.

FERRAZ, H. B. *et al.* Chronic exposure to the fungicide maneb may produce symptoms and signs of CNS manganese intoxication. **Neurology**, [S.L.], v. 38, n. 4, p. 550-550, 1 abr. 1988. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.38.4.550>.

FERRER, Isidre *et al.* Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: preclinical parkinson disease. *Journal Of Neural Transmission*, [S.L.], v. 118, n. 5, p. 821-839, 23 set. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-010-0482-8>.

FITSANAKIS, Vanessa A. *et al.* The effects of manganese on glutamate, dopamine and γ -aminobutyric acid regulation. *Neurochemistry International*, [S.L.], v. 48, n. 6-7, p. 426-433, maio 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2005.10.012>.

FORTIN, Doris L. *et al.* The behavior of α -synuclein in neurons. *Movement Disorders*, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 21-26, 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mds.22722>.

FRANCO, Rodrigo *et al.* Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: relevance to parkinson's disease. *Chemico-Biological Interactions*, [S.L.], v. 188, n. 2, p. 289-300, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.06.003>.

GAMA, Jessica; NEVES, Bianca; PEREIRA, Antonio. Chronic Effects of Dietary Pesticides on the Gut Microbiome and Neurodevelopment. *Frontiers In Microbiology*, [S.L.], v. 13, p. 1-2, 30 jun. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2022.931440>.

GANDRA, Paulo Guimarães *et al.* DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PARA AVALIAÇÃO DO EXERCÍCIO FÍSICO. *Quimica Nova*, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 980-985, set. 2004.

GARCÍA, D. Santos *et al.* Non-motor symptoms burden, mood, and gait problems are the most significant factors contributing to a poor quality of life in non-demented Parkinson's disease patients: results from the coppadis study cohort. *Parkinsonism & Related Disorders*, [S.L.], v. 66, p. 151-157, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.07.031>.

GOEDERT, Michel; JAKES, Ross; SPILLANTINI, Maria Grazia. The Synucleinopathies: twenty years on. *Journal Of Parkinson'S Disease*, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 51-69, 6 mar. 2017. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/jpd-179005>.

GÖK, Ertuğrul; DEVECI, Engin. Histopathological, immunohistochemical and biochemical alterations in liver tissue after fungicide-mancozeb exposures in Wistar albino rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, [S.L.], v. 37, n. 4, p. 1-2, 2022. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/acb370404>.

GOLBE, Lawrence I.. Young-onset Parkinson's disease. *Neurology*, [S.L.], v. 41, n. 21, p. 168-168, fev. 1991. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.41.2 part 1.168>.

GONZÁLEZ, Marina *et al.* Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, [S.L.], v. 534, n. 1-2, p. 145-154, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5718\(02\)00257-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00257-7).

GRAHAM, S.L. *et al.* Effects of prolonged ethylene thiourea ingestion on the thyroid of the rat. *Food And Cosmetics Toxicology*, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 493-499, out. 1975. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0015-6264\(75\)90001-2](http://dx.doi.org/10.1016/0015-6264(75)90001-2).

GROSICKA-MACIĄG, Emilia *et al.* Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against maneb induced oxidative and apoptotic injury in Chinese hamster V79 cells. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 1020-1025, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.01.009>.

GULLINO, Maria Lodovica *et al.* Mancozeb: past, present, and future. **Plant Disease**, [S.L.], v. 94, n. 9, p. 1076-1087, set. 2010. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis-94-9-1076>.

HARDIN, B *et al.* Evaluation of 60 chemicals in a preliminary developmental toxicity test. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, v. 7, p. 29-48, 1987 DOI: [10.1002/tcm.1770070106](http://dx.doi.org/10.1002/tcm.1770070106)

HERRERA, A.J. *et al.* The Single Intranigral Injection of LPS as a New Model for Studying the Selective Effects of Inflammatory Reactions on Dopaminergic System. **Neurobiology Of Disease**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 429-447, ago. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/nbdi.2000.0289>.

HIRSCH, E. C. *et al.* The Role of Glial Reaction and Inflammation in Parkinson's Disease. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 991, n. 1, p. 214-228, 24 jan. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07478.x>.

HOFFMAN, Lisa; TROMBETTA, Louis; HARDEJ, Diane. Ethylene bisdithiocarbamate pesticides Maneb and Mancozeb cause metal overload in human colon cells. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 41, p. 78-88, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2015.11.002>.

HORNING, K J *et al.*, Manganese Is Essential for Neuronal Health. **Annual Review Of Nutrition**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 71-108, 17 jul. 2015. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-nutr-071714-034419>.

HOUETO, P; BINDOULA, G; HOFFMAN, J R. Ethylenebisdithiocarbamates and ethylenethiourea: possible human health hazards.. **Environmental Health Perspectives**, [S.L.], v. 103, n. 6, p. 568-573, jun. 1995. Environmental Health Perspectives. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.95103568>.

HUBER, Paula C.; ALMEIDA, Wanda P.; FÁTIMA, Ângelo de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422008000500046>.

HUNOT, Stéphane *et al.* FcεR2/CD23 Is Expressed in Parkinson's Disease and Induces, In Vitro, Production of Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor-α in Glial Cells. **The Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 19, n. 9, p. 3440-3447, 1 maio 1999. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.19-09-03440.1999>.

HU-UFSC (2020) Relatório anual 2019 – CiaTox. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/221426/CIATox%20SC%20-%20RELATORIO%20ANUAL%202019.pdf?sequence=3&isAllowed=y>& Acesso em 02/10/2022.

HU-UFSC (2022) Relatório anual 2021 – CiaTox. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/238378>. Acesso em 24/07/2023.

IARC. 1992. Preamble. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 54:13–32.

IBAMA (2021). Vendas de agrotóxicos e afins no Brasil no período de 2000 a 2021. Disponível em: <<https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>> Acesso em 02/10/2022.

IJOMONE, Omamuyowwi M. *et al.* Role for calcium signaling in manganese neurotoxicity. **Journal Of Trace Elements In Medicine And Biology**, [S.L.], v. 56, p. 146-155, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijtemb.2019.08.006>.

IORIO, Roberto *et al.* Mancozeb affects mitochondrial activity, redox status and ATP production in mouse granulosa cells. **Toxicology In Vitro**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 438-445, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2015.09.018>.

IPCS (International Program on Chemical Safety). Environmental health criteria 78 dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea and propylenethiourea: a general introduction. Disponível em <<https://inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc78.htm>> Acesso em 06/10/2022.

IPCS (International Program on Chemical Safety). MANCOZEB First draft prepared by A. Kocalski Office of Pesticide Programs, US Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA. Disponível em: <<https://inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v93pr11.htm>> Acesso em 06/10/2022.

JABALLI, Imen *et al.* Increasing maneb doses induces reactive oxygen species overproduction and nephrotoxicity in adult mice. **Toxicology Mechanisms And Methods**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 382-393, 21 mar. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15376516.2017.1300617>.

JIA, Zhenquan; MISRA, Hara P.. Reactive oxygen species in in vitro pesticide-induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: role of nfkb and caspase-3. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 288-298, jan. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.047>.

JOHNSON, William M.; WILSON-DELFOSSÉ, Amy L.; MIEYAL, John. J.. Dysregulation of Glutathione Homeostasis in Neurodegenerative Diseases. **Nutrients**, [S.L.], v. 4, n. 10, p. 1399-1440, 9 out. 2012. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu4101399>.

JOSEPH, P. D.; MANNERVIK, B.; ORTIZ DE MONTELLANO, P. Molecular Toxicology. 1.ed. Oxford University Press: New Yourk, 1997. p. 152-186.

KAHLE, Philipp J.; WAAK, Jens; GASSER, Thomas. DJ-1 and prevention of oxidative stress in Parkinson's disease and other age-related disorders. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 47, n. 10, p. 1354-1361, nov. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.08.003>.

KAIDERY, Navneet Ammal; THOMAS, Bobby. Current perspective of mitochondrial biology in Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, [S.L.], v. 117, p. 91-113, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2018.03.001>.

KANCHI, S.; SINGH, P.; BISETTY, K.. Dithiocarbamates as hazardous remediation agent: a critical review on progress in environmental chemistry for inorganic species studies of 20th century. **Arabian Journal Of Chemistry**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 11-25, jan. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.026>.

KANG, Y *et al.* Brain gamma-glutamylcysteine synthetase (GCS) mRNA expression patterns correlate with regional-specific enzyme activities and glutathione levels. **Journal of Neuroscience Research**, v. 58, n. 3, p. 436–441, nov. 1999.

KEENEY, P. M. *et al.* Parkinson's Disease Brain Mitochondrial Complex I Has Oxidatively Damaged Subunits and Is Functionally Impaired and Misassembled. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 26, n. 19, p. 5256-5264, 10 maio 2006. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.0984-06.2006>.

KHERA, K. S.. Ethylenethiourea: teratogenicity study in rats and rabbits. **Teratology**, [S.L.], v. 7, n. 3, p. 243-252, jun. 1973. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/tera.1420070305>.

KHERA, K. S.; IVERSON, F.. Effects of pretreatment with SKF-525A, N-methyl-2-thioimidazole, sodium phenobarbital, or methyl cholanthrene on ethylenethiourea-induced teratogenicity in rats. **Teratology**, [S.L.], v. 24, n. 2, p. 131-137, out. 1981. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/tera.1420240204>.

KIM, Ki-Hyun; KABIR, Ehsanul; JAHAN, Shamin Ara. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 575, p. 525-535, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>.

KITADA, Tohru *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**, [S.L.], v. 392, n. 6676, p. 605-608, abr. 1998. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/33416>.

KLITTICH, Carla J.. Milestones in Fungicide Discovery: chemistry that changed agriculture. **Plant Health Progress**, [S.L.], v. 9, n. 1, jan. 2008. Scientific Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/php-2008-0418-01-ry>.

KOIZUMI A. *et al.*, Acute renal failure and maneb (manganous ethylenebisdithiocarbamate) exposure. **J Am Med Assoc** 242:2583-2585 (1979).

KUMAR, Kunal; SABARWAL, Akash; SINGH, Rana P.. Mancozeb selectively induces mitochondrial-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cells through ROS generation. **Mitochondrion**, [S.L.], v. 48, p. 1-10, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2018.06.003>.

KUMAR, Kunal; SABARWAL, Akash; SINGH, Rana P.. Mancozeb selectively induces mitochondrial-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cells through ROS generation. **Mitochondrion**, [S.L.], v. 48, p. 1-10, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2018.06.003>.

LANGSTON, J. William *et al.* Chronic Parkinsonism in Humans Due to a Product of Meperidine-Analog Synthesis. **Science**, [S.L.], v. 219, n. 4587, p. 979-980, 25 fev. 1983. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.6823561>.

LAU, Lonneke MI de; BRETELER, Monique Mb. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, [S.L.], v. 5, n. 6, p. 525-535, jun. 2006. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(06\)70471-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(06)70471-9).

LEROY, Elisabeth *et al.* The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. **Nature**, [S.L.], v. 395, n. 6701, p. 451-452, out. 1998. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/26652>.

LI, Shao-Jun *et al.* Sodium P -aminosalicylic acid inhibits sub-chronic manganese-induced neuroinflammation in rats by modulating MAPK and COX-2. **Neurotoxicology**, [S.L.], v. 64, p. 219-229, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2017.06.012>.

LIM, J.; LUDERER, U.. Oxidative Damage Increases and Antioxidant Gene Expression Decreases with Aging in the Mouse Ovary. **Biology Of Reproduction**, [S.L.], v. 84, n. 4, p. 775-782, 8 dez. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.110.088583>.

LIOU, H. H. *et al.* Environmental risk factors and Parkinson's disease. **Neurology**, [S.L.], v. 48, n. 6, p. 1583-1588, jun. 1997. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.48.6.1583>.

LIU, Chaoyang *et al.* Exposure to dithiocarbamate fungicide maneb in vitro and in vivo: neuronal apoptosis and underlying mechanisms. **Environment International**, [S.L.], v. 171, p. 107696, jan. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2022.107696>.

LIU, Dongmei *et al.* Silencing α -Synuclein Gene Expression Enhances Tyrosine Hydroxylase Activity in MN9D Cells. **Neurochemical Research**, [S.L.], v. 33, n. 7, p. 1401-1409, 21 mar. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-008-9599-7>.

LORI, Gabriele *et al.* Toxicological Comparison of Mancozeb and Zoxamide Fungicides at Environmentally Relevant Concentrations by an In Vitro Approach. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 18, n. 16, p. 8591, 14 ago. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph18168591>.

ŁUCZAJ, Wojciech; GĘGOTEK, Agnieszka; SKRZYDLEWSKA, Elżbieta. Antioxidants and HNE in redox homeostasis. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 111, p. 87-101, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.033>.

LY, J. D.; GRUBB, D. R.; LAWEN, A.. The mitochondrial membrane potential ($\delta\psi_m$) in apoptosis: an update. **Apoptosis**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 115-128, 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1022945107762>.

MANDARAPU, Rajesh *et al.* Proliferation and: math xmlns. **Journal Of Toxicology**, [S.L.], v. 2014, p. 1-8, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/308286>.

MANN, Philip Jocelyn George. The reduction of glutathione by a liver system. **Biochemical Journal**, [S.L.], v. 26, n. 3, p. 785-790, 1 jan. 1932. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj0260785>

MARANGHI, Francesca *et al.* Reproductive toxicity and thyroid effects in Sprague Dawley rats exposed to low doses of ethylenethiourea. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 59, p. 261-271, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.048>.

MARQUES, Ana *et al.* Evidences of DNA and chromosomal damage induced by the mancozeb-based fungicide Mancozan® in fish (*Anguilla anguilla* L.). **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 133, p. 52-58, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.03.004>.

MARTIN, Heather L.; TEISMANN, Peter. Glutathione—a review on its role and significance in Parkinson's disease. **The Faseb Journal**, [S.L.], v. 23, n. 10, p. 3263-3272, 19 jun. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.08-125443>.

MARTINS, Airtton Cunha *et al.* New Insights on the Role of Manganese in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 16, n. 19, p. 3546, 22 set. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph16193546>.

MCCALLAN, S.E.A. History of fungicides. In: Fungicides, an advanced treatise. 1. Ed. New. York, **Academic Press**, 1967. p.1-37.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G.; SUZUKI, J. S.. Aging and Extrapyramidal Function. **Archives Of Neurology**, [S.L.], v. 34, n. 1, p. 33-35, 1 jan. 1977. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archneur.1977.00500130053010>.

MCNAUGHT, Kevin St. P.; JENNER, Peter. Altered Glial Function Causes Neuronal Death and Increases Neuronal Susceptibility to 1-Methyl-4-Phenylpyridinium- and 6-Hydroxydopamine-Induced Toxicity in Astrocytic/Ventral Mesencephalic Co-Cultures. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 73, n. 6, p. 2469-2476, 18 jan. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0732469.x>.

MCNAUGHT, Kevin St. P.; JENNER, Peter. Altered Glial Function Causes Neuronal Death and Increases Neuronal Susceptibility to 1-Methyl-4-Phenylpyridinium- and 6-Hydroxydopamine-Induced Toxicity in Astrocytic/Ventral Mesencephalic Co-Cultures. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 73, n. 6, p. 2469-2476, 18 jan. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0732469.x>.

MECO, G *et al.* Parkinsonism after chronic exposure to the fungicide maneb (manganese ethylene-bis-dithiocarbamate). **Scandinavian Journal Of Work, Environment & Health**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 301-305, ago. 1994. Scandinavian Journal of Work, Environment and Health. <http://dx.doi.org/10.5271/sjweh.1394>.

MELLO, Denise Carvalho. **DETERMINAÇÃO DOS FUNGICIDAS DITIOCARBAMATOS ETILENOBISDITIOCARBAMATOS (EBDC) E PROPINEBE EM ALIMENTOS POR HPLC-UV**. 2014. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MEYER, Joel N. *et al.* Mitochondria as a Target of Environmental Toxicants. **Toxicological Sciences**, [S.L.], v. 134, n. 1, p. 1-17, 29 abr. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kft102>.

MIZUNO, Yoshikuni *et al.* Deficiencies in Complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 163, n. 3, p. 1450-1455, set. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291x\(89\)91141-8](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291x(89)91141-8).

MOGI, Makio *et al.* Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor- α levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, [S.L.], v. 211, n. 1, p. 13-16, jun. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12706-3](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(96)12706-3).

MOHAMMADI-SARDOO, Mohaddeseh *et al.* Cytotoxicity of mancozeb on Sertoli-germ cell co-culture system: role of mapk signaling pathway. **Toxicology And Industrial Health**, [S.L.], v. 37, n. 11, p. 674-684, 13 out. 2021. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/07482337211044028>.

MØLLER, Peter; STOPPER, Helga; COLLINS, Andrew R. Measurement of DNA damage with the comet assay in high-prevalence diseases: current status and future directions. **Mutagenesis**, [S.L.], p. 1-2, 11 jul. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gez018>.

MONTGOMERY, Kara *et al.* Transport of a manganese/zinc ethylene-bis-dithiocarbamate fungicide may involve pre-synaptic dopaminergic transporters. **Neurotoxicology And Teratology**, [S.L.], v. 68, p. 66-71, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2018.05.004>.

MORA, Ana María *et al.* Prenatal Mancozeb Exposure, Excess Manganese, and Neurodevelopment at 1 Year of Age in the Infants' Environmental Health (ISA) Study. **Environmental Health Perspectives**, [S.L.], v. 126, n. 5, p. 057007, 21 maio 2018. Environmental Health Perspectives. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp1955>.

MORETTO, A.; COLOSIO, C.. Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: the example of parkinson's disease. **Neurotoxicology**, [S.L.], v. 32, n. 4, p. 383-391, ago. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2011.03.004>.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, [S.L.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez. 1983. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

MUTHANE, Uday B. *et al.* Early onset Parkinson's disease: are juvenile- and young-onset different?. **Movement Disorders**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 539-544, 1994. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mds.870090506>.

NAGATSU, T.; SAWADA, M.. Molecular mechanism of the relation of monoamine oxidase B and its inhibitors to Parkinson's disease: possible implications of glial cells.

Oxidative Stress And Neuroprotection, [S.L.], p. 53-65, 2006. Springer Vienna. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-211-33328-0_7.

NAGUIB, Yousry M.A.. A Fluorometric Method for Measurement of Peroxyl Radical Scavenging Activities of Lipophilic Antioxidants. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 265, n. 2, p. 290-298, dez. 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1998.2931>.

NEGGA, Rekek *et al.* Exposure to Glyphosate- and/or Mn/Zn-Ethylene-bis-Dithiocarbamate-Containing Pesticides Leads to Degeneration of γ -Aminobutyric Acid and Dopamine Neurons in *Caenorhabditis elegans*. **Neurotoxicity Research**, [S.L.], v. 21, n. 3, p. 281-290, 16 set. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12640-011-9274-7>.

NJUS, David *et al.* Ascorbic acid: the chemistry underlying its antioxidant properties. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 159, p. 37-43, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.013>.

OGA, Seizi; CAMARGO, Marcia Maria de Almeida; BATISTUZZO, José Antonio de Oliveira. **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 677 p.

OLANOW, C. Warren; MCNAUGHT, Kevin St. P.. Ubiquitin–proteasome system and Parkinson's disease. **Movement Disorders**, [S.L.], v. 21, n. 11, p. 1806-1823, 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mds.21013>.

PALMEIRA, Carlos M.; ROLO, Anabela P.. Mitochondrial Membrane Potential ($\Delta\Psi$) Fluctuations Associated with the Metabolic States of Mitochondria. **Mitochondrial Bioenergetics**, [S.L.], p. 89-101, 3 out. 2011. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_6.

PARKER, W. Davis; PARKS, Janice K.; SWERDLOW, Russell H.. Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. **Brain Research**, [S.L.], v. 1189, p. 215-218, jan. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2007.10.061>.

PAVLOVIC, V *et al.* The Effect of Ascorbic Acid on Mancozeb-Induced Toxicity in Rat Thymocytes. **Folia Biologica**, Praha, v. 61, n. 3, p. 116-123, 2015.

PAYAMI, Haydeh *et al.* Increased risk of Parkinson's disease in parents and siblings of patients. **Annals Of Neurology**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 659-661, out. 1994. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410360417>.

PEREZ, Ruth G. *et al.* A Role for α -Synuclein in the Regulation of Dopamine Biosynthesis. **The Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 22, n. 8, p. 3090-3099, 15 abr. 2002. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.22-08-03090.2002>.

PERL, Daniel P.; OLANOW, C. Warren. The Neuropathology of Manganese-Induced Parkinsonism. **Journal Of Neuropathology & Experimental Neurology**, [S.L.], v. 66, n. 8, p. 675-682, ago. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1097/nen.0b013e31812503cf>.

POLYMEROPOULOS, Mihael H. *et al.* Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. **Science**, [S.L.], v. 276, n. 5321, p. 2045-2047, 27 jun. 1997. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>.

POPICHAK, Katriana A. *et al.* Glial-neuronal signaling mechanisms underlying the neuroinflammatory effects of manganese. **Journal Of Neuroinflammation**, [S.L.], v. 15, n. 1, 21 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-018-1349-4>.

POUCHIEU, Camille *et al.* Pesticide use in agriculture and Parkinson's disease in the AGRICAN cohort study. **International Journal Of Epidemiology**, [S.L.], v. 47, n. 1, p. 299-310, 9 nov. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ije/dyx225>.

PRASAD, Ananda s *et al.* Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 85, n. 3, p. 837-844, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/85.3.837>.

PRINGSHEIM, Tamara *et al.* The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**, [S.L.], v. 29, n. 13, p. 1583-1590, 28 jun. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mds.25945>.

PRYOR, W. A.; SQUADRITO, G. L.. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. **American Journal Of Physiology-Lung Cellular And Molecular Physiology**, [S.L.], v. 268, n. 5, p. 699-722, 1 maio 1995. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.1995.268.5.l699>.

QUDES, Ruhul *et al.* Mancozeb-induced cytotoxicity in human erythrocytes: enhanced generation of reactive species, hemoglobin oxidation, diminished antioxidant power, membrane damage and morphological changes. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 193, p. 105453, jun. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105453>.

RANG, H. P. *et al.* **Rang & Dale farmacologia**. 8 Rio de Janeiro: Elsevier, 2016, 760 p. (485-486)

RAPPOLD, Phillip M. *et al.* Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 108, n. 51, p. 20766-20771, 5 dez. 2011. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1115141108>.

RICHARDSON, Jason R. *et al.* Neurotoxicity of pesticides. **Acta Neuropathologica**, [S.L.], v. 138, n. 3, p. 343-362, 13 jun. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-019-02033-9>.

RIGOULET, Michel *et al.* Mitochondrial ROS Generation and Its Regulation: mechanisms involved in h₂O₂ signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 459-468, fev. 2011. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2010.3363>.

ROEDE, James R. *et al.* Maneb and Paraquat-Mediated Neurotoxicity: involvement of peroxiredoxin/thioredoxin system. **Toxicological Sciences**, [S.L.], v. 121, n. 2, p. 368-375, 14 mar. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfr058>.

ROSA, Roser *et al.* The Mechanism for Hexachlorocyclohexane-Induced Cytotoxicity and Changes in Intracellular Ca²⁺ Homeostasis in Cultured Cerebellar Granule Neurons Is Different for the γ - and δ -Isomers. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [S.L.], v. 142, n. 1, p. 31-39, jan. 1997. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/taap.1996.7968>.

SAÚDE, Ministério da. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília: Ms, 2018. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_populacoes_expostas_agrotoxicos.pdf. Acesso em: 07 out. 2022.

SAMII, Ali; NUTT, John G; RANSOM, Bruce R. Parkinson's disease. **The Lancet**, [S.L.], v. 363, n. 9423, p. 1783-1793, maio 2004. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)16305-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(04)16305-8).

SCHAPIRA, A.H.V. *et al.* MITOCHONDRIAL COMPLEX I DEFICIENCY IN PARKINSON'S DISEASE. **The Lancet**, [S.L.], v. 333, n. 8649, p. 1269, jun. 1989. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)92366-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(89)92366-0).

SCHAPIRA, Anthony Hv. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 97-109, jan. 2008. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(07\)70327-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(07)70327-7).

Sherman H, Zapp JA. Three generation reproduction study, Manzate Dr (88% maneb). Report submitted to the WHO from Haskell Laboratory. Geneva:World Health Organization, 1966.

SHIMURA, Hideki *et al.* Ubiquitination of a New Form of α -Synuclein by Parkin from Human Brain: implications for parkinson's disease. **Science**, [S.L.], v. 293, n. 5528, p. 263-269, 13 jul. 2001. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1060627>.

SHULTS, Clifford W. *et al.* Coenzyme Q10 levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects. **Annals Of Neurology**, [S.L.], v. 42, n. 2, p. 261-264, ago. 1997. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410420221>.

SIAN, Jeswinder *et al.* Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. **Annals Of Neurology**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 348-355, set. 1994. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410360305>.

SINAN. **Sistema de Informações de Agravos de Notificação**. 2018. Disponível em: <https://portalsinan.saude.gov.br/>. Acesso em: 07 out. 2022.

SINAN. **Sistema de Informações de Agravos de Notificação**. 2023. Disponível em: <https://portalsinan.saude.gov.br/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

SINGH, Narendra P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, [S.L.], v. 175, n. 1, p. 184-191, mar. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).

SIVANDZADE, Farzane; BHALERAO, Aditya; CUCULLO, Luca. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. **Bio-Protocol**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-13, 5 jan. 2019. Bio-Protocol, LLC. <http://dx.doi.org/10.21769/bioprotoc.3128>.

SKALNY, Anatoly *et al.* Endocrine-disrupting activity of mancozeb. **Arhiv Za Farmaciju**, [S.L.], v. 71, n. 6, p. 491-507, 2021. Centre for Evaluation in Education and Science (CEON/CEES). <http://dx.doi.org/10.5937/arhfarm71-34359>.

SMITH, D M. Ethylene thiourea: thyroid function in two groups of exposed workers.. **Occupational And Environmental Medicine**, [S.L.], v. 41, n. 3, p. 362-366, 1 ago. 1984. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/oem.41.3.362>.

SOLONESKI, Sonia *et al.* Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro. **Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, [S.L.], v. 514, n. 1-2, p. 201-212, fev. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5718\(01\)00337-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1383-5718(01)00337-0).

SOMERVILLE, L.. The metabolism of fungicides. **Xenobiotica**, [S.L.], v. 16, n. 10-11, p. 1017-1030, jan. 1986. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/00498258609038980>.

SPILLANTINI, Maria Grazia *et al.* α -Synuclein in Lewy bodies. **Nature**, [S.L.], v. 388, n. 6645, p. 839-840, ago. 1997. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/42166>.

SPITELLER, Gerhard; AFZAL, Mohammad. The Action of Peroxyl Radicals, Powerful Deleterious Reagents, Explains Why Neither Cholesterol Nor Saturated Fatty Acids Cause Atherogenesis and Age-Related Diseases. **Chemistry - A European Journal**, [S.L.], v. 20, n. 46, p. 14928-14945, 15 out. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201404383>.

SPRANGER, Matthias *et al.* Manganese Augments Nitric Oxide Synthesis in Murine Astrocytes: a new pathogenetic mechanism in manganism?. **Experimental Neurology**, [S.L.], v. 149, n. 1, p. 277-283, jan. 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/exnr.1997.6666>.

SRIVASTAVA, Amit Kumar *et al.* RETRACTED: mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. **Life Sciences**, [S.L.], v. 90, n. 21-22, p. 815-824, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.12.013>.

SUN, Yingying *et al.* Kinetic Modeling of pH-Dependent Oxidation of Dopamine by Iron and Its Relevance to Parkinson's Disease. **Frontiers In Neuroscience**, [S.L.], v. 12, p. 1-2, 26 nov. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2018.00859>.

TANG, Beisha *et al.* Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. **Human Molecular Genetics**, [S.L.], v. 15, n. 11, p.

1816-1825, 21 abr. 2006. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddl104>.

TANGAMORNSUKSAN, Wimonchat *et al.* Paraquat exposure and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Archives Of Environmental & Occupational Health**, [S.L.], v. 74, n. 5, p. 225-238, 25 nov. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19338244.2018.1492894>.

TANNER, Caroline M. *et al.* Occupation and Risk of Parkinsonism. **Archives Of Neurology**, [S.L.], v. 66, n. 9, p. 1-2, 1 set. 2009. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2009.195>.

TANNER, Caroline M. *et al.* Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. **Environmental Health Perspectives**, [S.L.], v. 119, n. 6, p. 866-872, jun. 2011. Environmental Health Perspectives. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1002839>.

THIRUCHELVAM, M *et al.* Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for parkinson's disease?. **Brain Research**, [S.L.], v. 873, n. 2, p. 225-234, ago. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02496-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02496-3).

THOMAS, Kelly Jean *et al.* DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. **Human Molecular Genetics**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 40-50, 11 out. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq430>.

TICE, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental And Molecular Mutagenesis**, [S.L.], v. 35, n. 3, p. 206-221, 6 jun. 2000. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(2000\)35:33.0.co;2-j](http://dx.doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:33.0.co;2-j).

TINKHAUSER, Gerd *et al.* Beta burst dynamics in Parkinson's disease OFF and ON dopaminergic medication. **Brain**, [S.L.], v. 140, n. 11, p. 2968-2981, 10 out. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awx252>.

TONG, Yawei *et al.* High Manganese, A Risk for Alzheimer's Disease: high manganese induces amyloid- β related cognitive impairment. **Journal Of Alzheimer'S Disease**, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 865-878, 16 set. 2014. IOS Press. <http://dx.doi.org/10.3233/jad-140534>.

TRIST, Benjamin G.; HARE, Dominic J.; DOUBLE, Kay L.. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. **Aging Cell**, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 1-2, 20 ago. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/accel.13031>.

TSANG, Mm; TROMBETTA, Ld. The protective role of chelators and antioxidants on mancozeb-induced toxicity in rat hippocampal astrocytes. **Toxicology And Industrial Health**, [S.L.], v. 23, n. 8, p. 459-470, set. 2007. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0748233708089039>.

TURRENS, J. F.. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal Of Physiology**, [S.L.], v. 552, n. 2, p. 335-344, 15 out. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>.

TYSNES, Ole-Bjørn; STORSTEIN, Anette. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal Of Neural Transmission**, [S.L.], v. 124, n. 8, p. 901-905, 1 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>.

URIBE, N.D. Suarez *et al.* Study of liver toxicity and DNA damage due to exposure to the pesticide Mancozeb in an experimental animal model – A pilot model. **European Review For Medical And Pharmacological Sciences**, [S.L.], v. 27, n. 13, p. 6374-6383, jul. 2023. Verduci Editore s.r.l.. <http://dx.doi.org/10.26355/eurrev.202307.32997>.

VALENTE, Enza Maria *et al.* Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1. **Science**, [S.L.], v. 304, n. 5674, p. 1158-1160, 21 maio 2004. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1096284>.

VALVERDE, M; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutation Research/Reviews In Mutation Research**, [S.L.], v. 681, n. 1, p. 93-109, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.11.001>.

VENKATESHAPPA, C. *et al.* Increased Oxidative Damage and Decreased Antioxidant Function in Aging Human Substantia Nigra Compared to Striatum: implications for parkinson's disease. **Neurochemical Research**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 358-369, 5 out. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11064-011-0619-7>.

VILA, Miquel; PRZEDBORSKI, Serge. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 4, n. 5, p. 365-375, maio 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1100>.

VON CAMPENHAUSEN, Sonja *et al.* Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. **European Neuropsychopharmacology**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 473-490, ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2005.04.007>.

WANG, Xinglong *et al.* Parkinson's disease-associated DJ-1 mutations impair mitochondrial dynamics and cause mitochondrial dysfunction. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 121, n. 5, p. 830-839, 12 abr. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07734.x>.

WEED, Douglas L. *et al.* Does paraquat cause Parkinson's disease? A review of reviews. **Neurotoxicology**, [S.L.], v. 86, p. 180-184, set. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2021.08.006>.

WEIS, Grazielle Castagna Cezimbra *et al.* Immunomodulatory effect of mancozeb, chlorothalonil, and thiophanate methyl pesticides on macrophage cells. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 182, p. 109420, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109420>.

WHITE, C R *et al.* Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. **Proceedings Of The National Academy**

Of Sciences, [S.L.], v. 93, n. 16, p. 8745-8749, 6 ago. 1996. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.16.8745>.

XIAO, Mengqing *et al.* Pathophysiology of mitochondrial lipid oxidation: role of 4-hydroxynonenal (4-hne) and other bioactive lipids in mitochondria. **Free Radical Biology And Medicine**, [S.L.], v. 111, p. 316-327, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.363>.

XICOY, Helena; WIERINGA, Bé; MARTENS, Gerard J.M.. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. **Molecular Neurodegeneration**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-2, 24 jan. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>.

XING, Kui-Yi; LOU, Marjorie F.. Effect of Age on the Thioltransferase (Glutaredoxin) and Thioredoxin Systems in the Human Lens. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, [S.L.], v. 51, n. 12, p. 6598, 1 dez. 2010. Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO). <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.10-5672>.

YAHIA, Doha *et al.* Mancozeb fungicide-induced genotoxic effects, metabolic alterations, and histological changes in the colon and liver of Sprague Dawley rats. **Toxicology And Industrial Health**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 265-276, abr. 2019. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0748233719834150>.

YOULE, Richard J.; BLIEK, Alexander M. van Der. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. **Science**, [S.L.], v. 337, n. 6098, p. 1062-1065, 31 ago. 2012. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1219855>.

ZHANG, Jing *et al.* Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate and selective dopaminergic neurodegeneration in rat: a link through mitochondrial dysfunction. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 84, n. 2, p. 336-346, 9 jan. 2003. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01525.x>.

ZHOU, Wenbo; FREED, Curt R.. DJ-1 Up-regulates Glutathione Synthesis during Oxidative Stress and Inhibits A53T α -Synuclein Toxicity. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 280, n. 52, p. 43150-43158, dez. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m507124200>.