



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO FUNGICIDA MANCOZEBE NO METABOLISMO
ENERGÉTICO DE CÉLULAS HEPÁTICAS E SEU ESTUDO TRANSLACIONAL
EM MODELO ANIMAL ALTERNATIVO DE *Drosophila melanogaster***

FABIANO CLAUDIO DE OLIVEIRA JUNIOR

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO FUNGICIDA MANCOZEBE NO METABOLISMO
ENERGÉTICO DE CÉLULAS HEPÁTICAS E SEU ESTUDO TRANSLACIONAL
EM MODELO ANIMAL ALTERNATIVO DE *Drosophila melanogaster***

FABIANO CLAUDIO DE OLIVEIRA JUNIOR

Orientador (a): Prof^a Dr^a Karen Cristiane Martinez de Moraes

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Câmpus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas
(Biologia Celular, Molecular e
Microbiologia).

O48a

Oliveira Junior, Fabiano Claudio de

Análise dos efeitos do fungicida mancozebe no metabolismo energético de células hepáticas e seu estudo translacional em modelo animal alternativo de *Drosophila melanogaster* / Fabiano Claudio de Oliveira Junior. -- , 2023

74 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro,

Orientadora: Karen Cristiane Martinez de Moraes

1. Toxicologia. 2. Pesticidas. 3. Esteatose hepática. 4. Cultura de células. 5. *Drosophila melanogaster*. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE DOS EFEITOS DO FUNGICIDA MANCOZEBE NO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CÉLULAS HEPÁTICAS E SEU ESTUDO TRANSLACIONAL EM MODELO ANIMAL ALTERNATIVO DE *Drosophila melanogaster*

AUTOR: FABIANO CLAUDIO DE OLIVEIRA JUNIOR

ORIENTADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Karen Cristiane
Martinez de

Moraes:25703784883

Assinado de forma digital por
Karen Cristiane Martinez de
Moraes:25703784883
Dados: 2023.04.18 16:26:28 -03'00'

Profa. Dra. THAYS DE ANDRADE GUEDES (Participação Virtual)
Departamento de Monitoramento da Biodiversidade Aquática na Área I (Ecotoxicologia) / FURG - Universidade Federal do Rio Grande - RS



Profa. Dra. CINTYA APARECIDA CHRISTOFOLETTI DE FIGUEIREDO (Participação Virtual)
Núcleo Comum da Saúde / UNIARARAS - Fundação Hermínio Ometto - Araras / SP

Signer ID: JSKPSDWU10...



Rio Claro, 18 de abril de 2023

Dedico esse trabalho à minha família, que mesmo estando a mais de 2500 km de distância, nunca deixou de acreditar em mim e de me apoiar nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter colocado no meu caminho pessoas maravilhosas e que me ajudaram a seguir nesta jornada e por ter me dado forças e coragem para continuar mesmo quando tudo parecia desabar.

Agradeço também à minha família, que mesmo distante em termos geográficos nunca deixou de acreditar em mim e de prestar seu apoio em minha jornada.

Agradeço à minha grande amiga Rhavena, que veio junto comigo para Rio Claro terminar seu mestrado. Fomos o apoio um do outro em uma cidade nova onde não conhecíamos mais ninguém. Sou muito grato por seu companheirismo e amizade.

Agradeço à Profa. Dra. Karen pela oportunidade de desenvolver este projeto e pelo aprendizado engrandecedor que obtive sob sua orientação. Agradeço também à toda equipe do Laboratório de Sinalização Celular e Expressão Gênica, com os quais tive o privilégio de desenvolver uma relação de irmandade e companheirismo. Certamente, amadureci e aprendi muito com eles.

Agradeço às equipes do Departamento de Biologia Geral e Aplicada e da Seção Técnica de Pós-Graduação, os quais não mediram esforços para me auxiliar quanto a situações burocráticas adversas.

Agradeço às pessoas que conheci em Rio Claro e que ajudaram a minha estadia na cidade ser mais leve e colorida: Camila, Molica, Ana, Daiane, Victor, Juliana, Renan, Daniel, Luana, Rosani da Lanchonete Badu, Gerson, Diego, Ralyvan, Rafaele, Kátia e tantas outras pessoas que, apesar de não listar, também possuem um pedacinho dentro de mim. Obrigado! Vocês tornaram leves os meus momentos mais difíceis. Levarei todos comigo de volta à Recife.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço também pelo apoio do Instituto de Biociências da UNESP Câmpus de Rio Claro e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2022/06302-8.

RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é atualmente considerada uma epidemia mundial e afeta cerca de 25% da população. Ela é caracterizada quando mais de 5% do peso do fígado corresponde a lipídeos. O uso extensivo de agrotóxicos na agricultura, principalmente no Brasil, tem se tornado um risco para a saúde humana. Essas substâncias podem persistir no meio ambiente, entrar na cadeia de alimentação e estão relacionadas ao desenvolvimento de diferentes patologias, incluindo a DHGNA. O mancozebe (MCZB) encontra-se entre os agrotóxicos mais utilizados no Brasil. Esse fungicida já demonstrou exercer efeitos hepatotóxicos em diferentes organismos. No entanto, seus mecanismos de toxicidade no fígado ainda não são completamente compreendidos. A *Drosophila melanogaster* é um modelo animal utilizado em estudos translacionais de diferentes patologias humanas graças às semelhanças genéticas e fisiológicas com nossa espécie. Além disso, ela também é utilizada em estudos toxicológicos. Com base nisso, nosso estudo propôs avaliar os efeitos do MCZB no metabolismo energético em modelo celular hepático humano e sua validação na *D. melanogaster*, visando estabelecer esse organismo como modelo translacional para estudos relacionados a DHGNA. Os resultados obtidos apontam que o MCZB é capaz de induzir a esteatose nas células hepáticas após 72 horas de exposição. No geral, a mensuração da β -oxidação das células expostas ao agrotóxico mostrou-se semelhante ao controle, sugerindo a participação de outras vias no acúmulo de triglicerídeos (TGs) provocado pelo MCZB. A partir de análises bioinformáticas, uma hipótese envolvendo a ação do PXR, PPAR γ e FXR foi construída a fim de explicar nossos resultados *in vitro*. Nos ensaios translacionais, o agrotóxico mostrou ter potencial em induzir a esteatose nas moscas expostas por 5 dias. Porém, após 7 dias de exposição ao MCZB, houve redução dos níveis de TGs e glicose, o que pode ser consequência do estresse oxidativo ou pelas moscas não estarem se alimentando corretamente em decorrência da intoxicação pelo agrotóxico.

Palavras-chave: DHGNA; metabolismo; agrotóxicos; fígado; cultura de células; *Drosophila melanogaster*

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is currently considered a worldwide epidemic and affects approximately 25% of the population. It is characterized when more than 5% of the liver weight corresponds to lipids. The extensive use of pesticides in agriculture, mainly in Brazil, has become a risk to human health. These substances can persist in the environment, enter the food chain and are related to the development of different pathologies, including NAFLD. Mancozeb (MCZB) is among the most used pesticides in Brazil. This fungicide has already shown to exert hepatotoxic effects in different organisms. However, its toxicity mechanisms in the liver are still not completely understood. The *Drosophila melanogaster* is an animal model used in translational studies of different human pathologies due to their have genetic and physiological similarities with our species. Furthermore, it is also used in toxicological studies. Based on this, our study proposed to evaluate the effects of MCZB on energy metabolism in a human liver cell model and its validation in *D. melanogaster*, aiming to establish this organism as a translational model for studies related to NAFLD. The results obtained so far indicate that MCZB is able of inducing steatosis in liver cells after 72 hours of exposure. In general, the measurement of β -oxidation of cells exposed to the pesticide was similar to the control, suggesting the participation of other pathways in the accumulation of triglycerides (TGs) caused by MCZB. Based on bioinformatics analyses, a hypothesis involving the action of PXR, PPAR γ and FXR was constructed in order to explain our *in vitro* results. In translational assays, the pesticide showed the potential to induce steatosis in flies exposed for 5 days. However, after 7 days of exposure to MCZB, there was a reduction in the levels of TGs and glucose, which may be a consequence of oxidative stress or because the flies are not feeding properly due to intoxication by the pesticide.

Key-Words: NAFLD; metabolism; pesticides; liver; cell culture; *Drosophila melanogaster*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura química do mancozebe.**21
- Figura 2. Tecidos e órgãos correspondentes em relação às suas estruturas e funções entre *Drosophila* e humanos.** Cada cor indica os tecidos e órgãos que apresentam funções similares entre as duas espécies.22
- Figura 3. Ensaio de viabilidade celular (MTT) do co-cultivo de células hepáticas humanas HepG2 e LX-2 na proporção 7:3, respectivamente.** A) Viabilidade celular após exposição de 72 h às diferentes concentrações do solvente DMSO. B) Viabilidade celular após exposição de 72 h às diferentes concentrações do fungicida mancozebe.32
- Figura 4. Quantificação dos níveis intracelulares de triglicerídeos e glicose em co-cultura de células hepáticas humanas sob efeito do mancozebe.** A) Níveis intracelulares de triglicerídeos após 72 h de exposição às diferentes concentrações do fungicida mancozebe. B) Níveis intracelulares de glicose do mesmo ensaio. Os resultados foram submetidos ao teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, onde ** $p < 0,005$ em relação ao controle.34
- Figura 5. Ensaio da β -oxidação em co-culturas de células hepáticas sob efeito do mancozebe.** A) Fotomicrografias de fluorescência. O BODIPY™ 558/568 C12 (à esquerda) representa os ácidos graxos incorporados às células. O BODIPY™ 493/503 (centro) representa as gotículas de lipídeos neutros intracelulares. A sobreposição (à direita) de ambas as fluorescências evidencia a taxa de β -oxidação das células hepáticas após os tratamentos. Os núcleos celulares (azul) foram marcados com DAPI. O grupo tratado com etomoxir (25 μ M) foi utilizado como controle positivo para o bloqueio da β -oxidação. As barras de escala representam 20 μ m. As fotomicrografias mostram as co-culturas celulares nas 8 h posteriores à retirada do C12. B) Quantificação da sobreposição entre os fluoróforos. Quanto mais próximos os valores estão de 1.0, menos oxidação de ácidos graxos está ocorrendo nas células. O tratamento com etomoxir simula o bloqueio da β -oxidação. Os resultados foram

submetidos ao teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, onde $**p < 0,005$; $***p < 0,0005$; $****p < 0,00005$ em relação aos respectivos controles.....35

Figura 6. Quantificação dos níveis de triglicerídeos e glicose da *D. melanogaster* sob dietas obesogênicas de 2% e 5% (p/v) de óleo de coco. A) Níveis de triglicerídeos das moscas após 5 dias sob dieta obesogênica. B) Níveis de glicose das moscas do mesmo ensaio. Os resultados foram submetidos ao teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, onde $*p > 0,05$ em relação ao controle.37

Figura 7. Quantificação dos níveis de triglicerídeos e glicose da *D. melanogaster* sob dieta contendo diferentes concentrações do mancozebe. A) Níveis de triglicerídeos das moscas após exposição de 5 dias à dieta com o MCZB. B) Níveis de glicose das moscas após exposição de 5 dias à dieta com o MCZB. C) Níveis de triglicerídeos após exposição de 7 dias à dieta contendo MCZB. D) Níveis de glicose após exposição de 7 dias à dieta com o MCZB. Os resultados foram submetidos ao teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, onde $*p > 0,05$; $**p < 0,005$; $****p < 0,00005$ em relação ao controle.38

Figura 8. Gráficos PANTHER dos processos biológicos dos genes relacionados à bioatividade do mancozebe. A) Gráfico geral dos processos biológicos. B) Gráfico dos processos celulares. Os genes foram obtidos do banco de dados da EPA (*Environmental Protection Agency*).46

Figura 9. Gráficos PANTHER dos processos biológicos dos genes mais expressos relacionados à bioatividade do mancozebe. A) Gráfico geral dos processos biológicos. B) Gráfico dos processos celulares. Os genes foram obtidos do banco de dados da EPA (*Environmental Protection Agency*) e selecionados a partir dos valores LOGAC50 (>1.00).47

Figura 10. Gráficos PANTHER dos processos biológicos dos genes menos expressos relacionados à bioatividade do mancozebe. A) Gráfico geral dos processos biológicos. B) Gráfico dos processos celulares. Os genes foram obtidos do banco de dados da EPA (*Environmental Protection Agency*) e selecionados a partir dos valores LOGAC50 (<1.00).49

Figura 11. Gráficos PANTHER dos processos biológicos dos genes que não apresentaram seus níveis de expressão significativamente alterados pelo MCZB. A) Gráfico geral dos processos biológicos. B) Gráfico dos processos celulares. Os genes foram obtidos do banco de dados da EPA (Environmental Protection Agency) e selecionados a partir dos valores LOGAC50 (~ 1.00 / $\neq 1.00$)51

Figura 12. Redes de interação entre os genes selecionados dos grupos A, B e C. Foram selecionados genes relacionados ao metabolismo energético, de ácidos graxos e de xenobióticos de cada um dos grupos para visualizar suas interações e vias de sinalização. Cada cor representa um processo biológico, atividade molecular, via de sinalização ou tecido no qual os genes em questão estão relacionados. A análise foi realizada pelo algoritmo STRING utilizando score de alta confiabilidade (≥ 700).52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Elementos ortólogos de genes humanos e de *D. melanogaster* envolvidos em doenças metabólicas e hepáticas.23

Tabela 2 - Lista dos genes selecionados quanto à bioatividade do mancozebe.
Os genes foram obtidos do banco de dados da EPA (*Environmental Protection Agency*). Um total de 209 genes foram selecionados.39

Tabela 3 - GRUPO A. Lista dos genes mais expressos correlatos à bioatividade do MCZB. Os genes foram obtidos do banco de dados da EPA (*Environmental Protection Agency*) e selecionados a partir dos valores LOGAC50 (>1.00).44

Tabela 4 - GRUPO B. Lista dos genes menos expressos correlatos à bioatividade do MCZB. Os genes foram obtidos do banco de dados da EPA (*Environmental Protection Agency*) e selecionados a partir dos valores LOGAC50 (<1.00).45

Tabela 5 - Genes que não apresentaram seus níveis de expressão significativamente alterados pelo mancozebe. Os genes foram obtidos do banco de dados da EPA (*Environmental Protection Agency*) e selecionados a partir dos valores LOGAC50 (~ 1.00 / $=1.00$).50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1	BASES MOLECULARES DA DHGNA: uma breve revisão	16
1.2	AGROTÓXICOS E O METABOLISMO ENERGÉTICO: um agente etiológico para a DHGNA	18
1.3	O MANCOZEBE: um fator de risco para a DHGNA	20
1.4	<i>Drosophila melanogaster</i> : um modelo translacional para o estudo da DHGNA e dos efeitos dos agrotóxicos	22
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1	CULTURA CELULAR	28
3.2	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE / VIABILIDADE CELULAR.....	28
3.3	MENSURAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS E GLICOSE	29
3.4	ANÁLISE DA β -OXIDAÇÃO	29
3.5	VALIDAÇÃO DOS EFEITOS DO MANCOZEBE NO MODELO TRANSLACIONAL DE <i>Drosophila melanogaster</i>	30
3.5.1	Cultura e manutenção das moscas	30
3.5.2	Padronização da dieta obesogênica e exposição ao agrotóxico	30
3.5.3	Mensuração de triglicerídeos e glicose das moscas	31
3.6	ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	31
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	31
4	RESULTADOS	32
4.1	ANÁLISES DE VIABILIDADE CELULAR FRENTE AOS TRATAMENTOS CELULARES	32
4.2	EFEITOS DO MANCOZEBE NOS NÍVEIS DE TRIGLICERÍDEOS E DE GLICOSE NAS CÉLULAS HEPÁTICAS.....	33

4.3	EFEITOS DO MANCOZEBE NA β -OXIDAÇÃO DAS CÉLULAS HEPÁTICAS	34
4.4	PADRONIZAÇÃO DE UMA DIETA OBESOGÊNICA PARA ESTUDOS PRÓ-ESTEATÓTICOS NA <i>D. melanogaster</i>	36
4.5	TOLERÂNCIA AO DMSO E EFEITOS DO MANCOZEBE NOS NÍVEIS DE TRIGLICERÍDEOS E DE GLICOSE NAS MOSCAS	37
4.6	ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	39
4.6.1	PANTHER: análise de processos biológicos	44
4.6.2	STRING: vias de sinalização pela análise de redes de interações.....	51
5	DISCUSSÃO.....	54
6	CONCLUSÕES.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO GERAL

Aproximadamente 2 milhões de pessoas morrem anualmente em decorrência de doenças hepáticas no mundo (ASRANI et al., 2019; SEPANLOU et al., 2020). Estas compreendem desde o acúmulo de gordura no fígado, também chamado de esteatose, as hepatites virais e não-virais, a fibrose, a cirrose e o hepatocarcinoma (HCC) (ASRANI et al., 2019; MAKRI; GOULAS; POLYZOS, 2021; FOERSTER et al., 2022). Entre essas enfermidades, a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) tem ganhado destaque.

Nos dias atuais, a DHGNA é considerada uma epidemia mundial e está presente em ~25% na população mundial. O Oriente Médio e a América Latina são as regiões que mais concentram casos da doença, afetando 31.8% e 30.5% dos indivíduos, respectivamente (MAKRI; GOULAS; POLYZOS, 2021; MENDEZ-SANCHEZ et al., 2021; ISAACS, 2023). No Brasil, avaliações por ultrassonografia estimaram que aproximadamente 18% da população era acometida pela esteatose hepática no início da década passada (COTRIM et al., 2011). Ainda, as taxas de mortalidade por complicações decorrentes da DHGNA giram em torno de 15,44 para cada 1000 pacientes por ano (YOUNOSSI, 2019). Sendo assim, essa patologia se caracteriza como um problema de saúde pública.

A DHGNA é caracterizada quando mais de 5% do peso total do fígado corresponde a lipídeos (RAMOS et al., 2021). Seu desenvolvimento é multifatorial e resultante da complexa interação entre fatores ambientais e genéticos. Atualmente, a hipótese de múltiplos hits é a teoria mais aceita para explicar a origem e progressão da doença (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; NASSIR, 2022). Essa hipótese leva em consideração a participação paralela e sinérgica de fatores como a obesidade, resistência à insulina, *diabetes mellitus* tipo 2, sedentarismo, dietas ricas em carboidratos e/ou gordura, genética e alterações da microbiota intestinal, juntamente ao acúmulo de lipídeos no tecido hepático (BUZZETTI; PINZANI; TSOCHATZIS, 2016; JORNAYVAZ et al., 2022; NASSIR, 2022; RADU et al., 2023). Além disso, a exposição a poluentes ambientais, como os agrotóxicos, também configura um fator etiológico para o desenvolvimento e agravamento da DHGNA (PIROZZI et al., 2016; RIVES et al., 2020; JELLALI et al., 2021; RAJAK et al., 2021).

Inicialmente, a DHGNA é uma doença silenciosa, contudo, à medida que ela progride podem se estabelecer quadros clínicos mais graves como a esteato-hepatite

não alcoólica (EHNA), fibrose e o HCC (MAKRI; GOULAS; POLYZOS, 2021; FOERSTER et al., 2022; POUWELS et al., 2022). Infelizmente, ainda não existe um tratamento específico para a DHGNA. As estratégias atuais consistem no controle dos fatores de risco da doença como a resistência à insulina e a obesidade por meio de mudanças no estilo de vida, prática de atividades físicas e dieta balanceada, medicamentos e/ou procedimentos cirúrgicos (MAKRI; GOULAS; POLYZOS, 2021; NASSIR, 2022; POUWELS et al., 2022; ISAACS, 2023). Ainda, o método mais confiável para o diagnóstico da doença é a biópsia do fígado, a qual apresenta desvantagens como custo elevado, erro amostral e risco de complicações (MAKRI; GOULAS; POLYZOS, 2021; NASSIR, 2022). Tendo isto em vista, estudos que objetivam um melhor detalhamento molecular dos elementos envolvidos na manutenção da DHGNA são requeridos para o desenvolvimento de terapias e métodos de diagnóstico inovadores.

Considerando-se os agentes etiológicos da patogenia, os agrotóxicos, também conhecidos como pesticidas, devem ser considerados. No Brasil, a legislação vigente tem flexibilizado a utilização desses compostos em escalas comparativamente maiores que muitos países, principalmente quando comparado à União Europeia (EU) (FRIEDRICH et al., 2018; BRAGA et al., 2020). Considerando-se a vasta produção agrícola e utilização dos agrotóxicos no país, além do recorrente número de casos de contaminações de trabalhadores rurais (CAMPOS et al., 2016; BERNIERI et al., 2019; BURALLI et al., 2020; LOVISON SASSO et al., 2021), torna-se de grande interesse social avaliar os efeitos deletérios desses compostos. O mancozebe, um dos agrotóxicos mais utilizados mundo, por exemplo, é conhecido por ser um importante disruptor endócrino e por seus efeitos hepatotóxicos e sistêmicos (DALL'AGNOL et al., 2021; MOLICA; BARRETO; MORAES, 2021). Ainda, esse agrotóxico já foi demonstrado agravar a DHGNA *in vitro* (PIROZZI et al., 2016). O número crescente de casos da DHGNA, a qual pode ter como etiologia a exposição aos agrotóxicos (LAZARUS et al., 2020; JELLALI et al., 2021; RAJAK et al., 2021; RAMOS et al., 2021), demanda pelo melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos em sua patogênese.

Atualmente, as pesquisas a respeito da DHGNA apresentam limitações e a maioria dos estudos se utilizam de modelos animais e/ou celulares, os quais possuem alto custo operacional, de padronização, além de questões éticas (REIMER et al.,

2019; SORET et al., 2021), que podem atrasar o avanço dos estudos sobre a doença. Nesse cenário, a *Drosophila melanogaster* surge como uma ferramenta alternativa com melhor custo-benefício para a identificação de moléculas e vias de sinalização que possam subsidiar o desenvolvimento de novas terapias. Dentre as vantagens da utilização desse modelo, estão o baixo custo operacional e de padronização, além das semelhanças genéticas e metabólicas com os humanos, o que faz desses insetos um modelo translacional para o estudo de anomalias humanas (UGUR; CHEN; BELLEN, 2016; YAMAGUCHI; YOSHIDA, 2018). Nas páginas seguintes, serão abordados conceitos correlatos a DHGNA.

1.1 BASES MOLECULARES DA DHGNA: uma breve revisão

No contexto celular, os ácidos graxos (AGs) podem seguir diferentes rotas metabólicas dependendo da necessidade da célula. Por exemplo, eles podem ser incorporados à estrutura das membranas, armazenados, oxidados para obtenção de energia ou ainda servirem como mediadores da sinalização celular (CHEN et al., 2019; RAMOS et al., 2021). Em um indivíduo saudável, esses processos ocorrem de maneira equilibrada e garantem a homeostase do organismo. Contudo, perturbações na dinâmica intracelular entre a síntese e a oxidação dos AGs, por exemplo, podem resultar em patologias (CHEN et al., 2019). Ainda, estudos recentes também têm demonstrado a atuação da epigenética e da microbiota intestinal na manutenção do equilíbrio dinâmico do metabolismo hepático e seus impactos no desenvolvimento de doenças como a DHGNA (GHOSHAL; GOEL; QUIGLEY, 2020; RAMOS et al., 2021; SONG; ZHANG, 2022).

Na DHGNA, o acúmulo intra-hepático de lipídeos, principalmente na forma de triglicerídeos (TGs), inicia-se como consequência do desequilíbrio entre a absorção de ácido graxos livres (AGLs), síntese pela lipogênese *de novo* (LDN) e oxidação lipídica (MAKRI; GOULAS; POLYZOS, 2021; NASSIR, 2022). A absorção de AGLs da corrente sanguínea ocorre através de proteínas transportadoras de ácido graxo (FATPs), da ácido graxo translocase CD36, de proteínas de ligação a AGs (FABPs) ou por difusão passiva (NASSIR, 2022). A LDN, processo mais realizado no fígado, é estimulada pela presença de insulina. Esta, é responsável por ativar a via glicolítica e a síntese de enzimas lipogênicas (SHIMANO, 2001; TESSARI et al., 2009). O citrato, um produto intermediário da fosforilação oxidativa, é utilizado pela enzima ATP citrato

liase (ACLY) para a produção de acetil-CoA. Este, desencadeia a síntese *de novo* de AGs. Em uma reação de carboxilação, a enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), transforma o acetil-CoA em malonil-CoA. Em mamíferos, a isoforma ACC1 é a principal reguladora da LDN hepática. Por outro lado, altas concentrações de malonil-CoA inibem a ACC1 e a proteína carnitina-palmitoil transferase 1 (CPT1). A CPT1 localiza-se na membrana mitocondrial externa e é responsável pelo transporte de AGs para o interior da mitocôndria, onde são oxidados pela β -oxidação. A inibição dessa enzima pelo malonil-CoA garante a continuação das reações de esterificação que conduzem a produção de TGs (TESSARI et al., 2009; NASSIR, 2022).

Durante a síntese de lipídeos, a enzima ácido graxo sintetase (FASN) utiliza as moléculas de acetil-CoA e malonil-CoA como substrato para a produção de palmitato (16:0). Este, pode ser convertido a diferentes AGs pela intermediação da enzima estearoil-CoA desaturase 1 (SCD1) (MASHEK, 2013; NELSON; COX, 2021). Posteriormente, a enzima acil-CoA sintetase de cadeia longa (ACSL), responsável por adicionar um grupo acetil-CoA às moléculas lipídicas, regula a incorporação desses AGs em vias de degradação por reações energéticas de oxidação; conversão para armazenamento intracelular; e utilização na síntese de membranas ou sinalização celular (MASHEK, 2013).

Alguns fatores de transcrição, como as proteínas de ligação ao elemento regulador de colesterol 1c (SREBP1c), proteínas de ligação do elemento de resposta a carboidratos (ChREBP), os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs), entre outros, estão intimamente envolvidos na regulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico hepático, especialmente àqueles envolvidos na LDN (SONG; XIAOLI; YANG, 2018; WANG et al., 2020; RAMOS et al., 2021). A resistência à insulina, por exemplo, parece ser responsável por aumentar a LDN hepática na DHGNA pela ativação dos fatores de transcrição SREBP1c e ChREBP (SMITH et al., 2020).

O excedente conteúdo lipídico produzido pela LDN é primariamente armazenado na forma de TGs em gotículas de lipídeos (GLs) (MASHEK, 2013; NASSIR, 2022). A acumulação lipídica desregulada nos hepatócitos pode acarretar quadros de lipotoxicidade. Esta, está intimamente ligada à progressão da DHGNA à EHNA e é definida como a desregulação do ambiente lipídico e/ou da composição lipídica intracelular, as quais podem desencadear a maior produção de lipídeos

tóxicos, tais como as ceramidas, lisofosfatidilcolina, diacilglicerol, entre outros (SHARMA et al., 2015; PIERANTONELLI; SVEGLIATI-BARONI, 2019). Eles são responsáveis por ativar processos relacionados ao dano celular e que tem como consequência a disfunção mitocondrial e lisossomal, produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e o estresse do retículo endoplasmático, além da ativação de vias inflamatórias e de morte celular (PIERANTONELLI; SVEGLIATI-BARONI, 2019; GENG et al., 2021; FROMENTY; RODEN, 2023). Juntos, esses mecanismos não só favorecem o estabelecimento da EHNA, como também sua progressão para quadros ainda mais graves como a cirrose e o HCC (PIERANTONELLI; SVEGLIATI-BARONI, 2019; LEQUOY et al., 2020; BARRIOS-MAYA; RUIZ-RAMÍREZ; EL-HAFIDI, 2021). Por outro lado, apesar de caracterizar a DHGNA, a acumulação de TGs por si só não é tóxica para a célula e representa um mecanismo de proteção contra a lipotoxicidade pela conversão dos lipídeos tóxicos em uma molécula inócua (YAMAGUCHI et al., 2007; BARRIOS-MAYA; RUIZ-RAMÍREZ; EL-HAFIDI, 2021). Por fim, os desbalanços na homeostase acarretam danos fisiológicos.

1.2 AGROTÓXICOS E O METABOLISMO ENERGÉTICO: um agente etiológico para a DHGNA

Os agrotóxicos, também conhecidos como pesticidas, agroquímicos ou praguicidas, são substâncias amplamente utilizadas na agricultura para o controle de pragas visando aumentar a produtividade agrícola (CARVALHO, 2017). Os agrotóxicos mais utilizados no mundo são os organofosforados, organoclorados, carbamatos e piretróides. Eles podem ser classificados como herbicidas, inseticidas ou fungicidas de acordo com seu organismo-alvo (SHARMA et al., 2020). Contudo, esses produtos têm sido apontados por sua toxicidade em organismos não-alvo, persistência no meio ambiente, além da sua capacidade de bioacumular nos tecidos dos seres vivos (CAPITÃO et al., 2017; SHARMA et al., 2020; WANG et al., 2022). Aliado a isso, a utilização em larga escala dessas substâncias não apenas as tornam um problema ecológico reconhecido, como também um risco à saúde humana (SHARMA et al., 2020; MOLICA; BARRETO; MORAES, 2021).

A população humana é cotidianamente exposta aos agrotóxicos pela cadeia alimentar. Nos dias atuais, já não é novidade a detecção de resíduos destes químicos na água e nos alimentos que consumimos (KIM; KABIR; JAHAN, 2017; DJEKKOUN

et al., 2021). Porém, apesar desse consumo não causar sintomas de intoxicação aguda, a exposição aos agrotóxicos tem sido associada a uma ampla gama de efeitos adversos à saúde (KIM; KABIR; JAHAN, 2017; DJEKKOUN et al., 2021; RAVULA; YENUGU, 2022). Por exemplo, estudos recentes apontam que a exposição do organismo aos agrotóxicos configura um fator de risco para o desenvolvimento da DHGNA por alterarem o metabolismo energético, de carboidratos e de lipídeos (HE et al., 2020; JELLALI et al., 2021; RAJAK et al., 2021; SANG et al., 2022; QI et al., 2023; TAYLOR et al., 2023).

Em relação ao metabolismo de lipídeos, inicialmente os agrotóxicos podem causar disbiose intestinal, alterar o perfil de secreção de sais biliares e provocar a disfunção na barreira intestinal. Assim, o padrão de absorção de lipídeos pelo intestino é modificado (JIN et al., 2018; HE et al., 2020). Ainda, essas substâncias também podem alterar o perfil de secreção de hormônios e promover a resistência à insulina, a qual representa um fator de risco para o desenvolvimento da DHGNA (KARAMI-MOHAJERI; ABDOLLAHI, 2011; HE et al., 2020). De fato, a literatura científica dispõe de estudos que comprovam a capacidade desses produtos em induzir quadros de esteatose no fígado de diferentes organismos e em modelos celulares (SUN et al., 2013; XIANG et al., 2018; JELLALI et al., 2021; YANG et al., 2021).

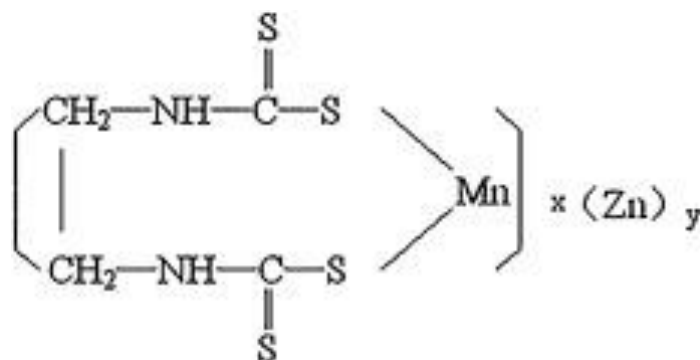
No contexto hepático, os agrotóxicos são capazes de aumentar os níveis de AGs intracelulares ao regular positivamente a LDN através da ativação dos fatores de transcrição correlatos a expressão das enzimas lipogênicas (XIANG et al., 2018; LI et al., 2022). Além disso, eles também podem aumentar os níveis séricos de TGs, o que estaria relacionado com a maior captação hepática dessas moléculas (JIN et al., 2018). Os agrotóxicos também são conhecidos pela ativação de receptores nucleares, a exemplo do receptor pregnano X (PXR), o qual é responsável por regular vias de desintoxicação de xenobióticos desempenhadas pelo fígado (XIANG et al., 2018; LASCH et al., 2021). Um dos alvos do PXR é o receptor ativado por proliferador de peroxissomo gama (PPAR γ). Este, está envolvido na regulação das proteínas relacionadas à captação hepática de AGLs e no armazenamento de TGs na forma de GLs. Aliado a isso, a ativação do PXR pode diminuir os níveis da enzima CPT1 e interferir na β -oxidação, tendo como consequência o maior acúmulo intracelular de lipídeos (XIANG et al., 2018; WANG et al., 2020).

Os efeitos dos agrotóxicos no metabolismo hepático não se limitam ao metabolismo de lipídeos. Além de também perturbarem o metabolismo de carboidratos (HE et al., 2020), esses agroquímicos são capazes de aumentar o estresse oxidativo e a produção de EROs no órgão. A metabolização dessas substâncias pelo citocromo P450 pode ser uma fonte primária de EROs (ANDROUTSOPOULOS et al., 2013; RIVES et al., 2020). Em adição, esse aumento também pode ocorrer em decorrência da redução da competência do sistema antioxidativo da célula. Muitos agrotóxicos mostram-se capazes de alterar os níveis de enzimas que neutralizam as EROs, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) (KARAMI-MOHAJERI; ABDOLLAHI, 2011; RIVES et al., 2020). Em conjunto, essas alterações modificam a sinalização celular e conduzem à ativação de vias metabólicas com desfechos adversos, como a esteatose (LICHTENSTEIN et al., 2020, 2021).

1.3 O MANCOZEBE: um fator de risco para a DHGNA

O mancozebe (MCZB) (Figura 1) é um fungicida etileno-bis-ditiocarbamato e atualmente amplamente utilizado na agricultura (MOLICA; BARRETO; MORAES, 2021). Seu modo de ação consiste na interação com grupos sulfidrilas das enzimas dos fungos, o que está relacionado aos seus efeitos no metabolismo de lipídeos e na respiração celular nestes organismos (PIROZZI et al., 2016). Atualmente, o MCZB encontra-se banido pela União Europeia (*EU Pesticides Database*, 2023). Apesar disso, no Brasil, este agrotóxico encontra-se na terceira posição entre os dez ingredientes ativos mais vendidos de acordo com o Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil de 2020 (IBAMA, 2022). Ainda, ele está presente em 86 produtos formulados comercializados no país. Sua aplicação na agricultura abrange as culturas de grãos, frutas e vegetais (MAPA, 2021).

Figura 1. Estrutura química do mancozebe.



Fonte: Pirozzi et al. (2016)

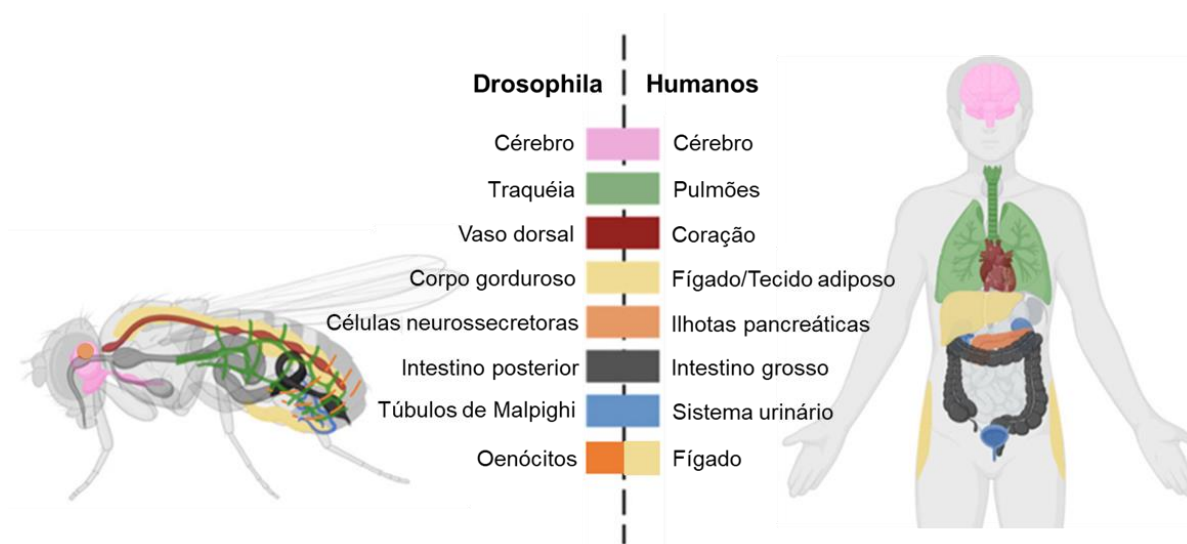
Apesar de sua utilização, é de conhecimento científico que o MCZB é capaz de exercer efeitos sistêmicos adversos nos diferentes tecidos de animais e humanos. Esse fungicida possui dois principais produtos de degradação: o manganês e o etilenotiouréia; os quais podem estar relacionados com sua toxicidade (COSTA-SILVA et al., 2018). O tecido hepático encontra-se entre os mais afetados pelo MCZB (DALL'AGNOL et al., 2021). Sua hepatotoxicidade parece ocorrer pelo aumento da produção de EROs, redução da atividade de enzimas do sistema antioxidativo e pela regulação de vias de morte celular. Entre as vias de sinalização ativadas pelo MCZB, destacam-se as vias MAPK e AMPK. Por este motivo, é suspeitado que esse fungicida também possua potencial carcinogênico (ZHANG et al., 2022). Ainda, alguns estudos relatam que o MCZB induza à esteatose (PIROZZI et al., 2016), interfira na atividade de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial (PIROZZI et al., 2016; SARAIVA et al., 2021; ZIECH et al., 2022), ative vias inflamatórias, além de causar danos no material genético das células hepáticas (SABER; ABO-ELMAATY; ABDEL-GHANY, 2019; GÖK; DEVECI, 2022). Juntos, esses achados sugerem que a exposição do organismo ao MCZB seja um fator etiológico à DHGNA.

Infelizmente, embora existam estudos que mostram os efeitos deletérios do MCZB no fígado, a literatura científica ainda carece de estudos mais detalhados acerca dos impactos deste agrotóxico no metabolismo energético hepático e como eles poderiam estar relacionados com o desenvolvimento da DHGNA. Grande parte dos estudos existentes até o momento em relação aos efeitos do MCZB no fígado focam no estresse oxidativo e dano celular/tecidual.

1.4 *Drosophila melanogaster*: um modelo translacional para o estudo da DHGNA e dos efeitos dos agrotóxicos

A *Drosophila melanogaster*, também conhecida como mosca-das-frutas, é um modelo científico de estudos muito utilizado por possuir baixo custo operacional, fácil manejo e manutenção e pelo seu rápido ciclo de vida aliado a uma alta geração de progênie (YAMAGUCHI; YOSHIDA, 2018). Ainda, por compartilhar semelhanças metabólicas e genéticas com nossa espécie, este modelo tem sido particularmente importante para o entendimento de processos patológicos que afetam a saúde humana nos diferentes sistemas orgânicos (UGUR; CHEN; BELLEN, 2016; YAMAGUCHI; YOSHIDA, 2018). O genoma da *D. melanogaster* apresenta-se extensivamente estudado e muitos de seus genes são considerados homólogos aos nossos. Cerca de 75% dos genes correlatos a doenças encontram-se compartilhados entre humanos e moscas-das-frutas, o que reforça seu uso em estudos translacionais (MUSSELMAN; KÜHNLEIN, 2018; YAMAGUCHI; YOSHIDA, 2018; DOW; SIMONS; ROMERO, 2022).

Figura 2. Tecidos e órgãos correspondentes em relação às suas estruturas e funções entre *Drosophila* e humanos. Cada cor indica os tecidos e órgãos que apresentam funções similares entre as duas espécies.



Fonte: adaptado de Jiang et al. (2022)

Estes insetos apresentam tecidos e órgãos com funções semelhantes aos encontrados nos seres humanos (Figura 2) (JIANG et al., 2022). O corpo gorduroso

(CG) e os oenócitos, por exemplo, desempenham função semelhante ao metabolismo hepático (MORAES; MONTAGNE, 2021). O CG (Figura 2) localiza-se espalhado ao longo de todo o corpo da *D. melanogaster* e é o principal responsável pelo armazenamento energético na forma de glicogênio e TGs, semelhantemente ao que ocorre no fígado e no tecido adiposo (MUSSELMAN; KÜHNLEIN, 2018; TOPRAK et al., 2020; HEIER et al., 2021). Por outro lado, os oenócitos se localizam como grupamentos celulares sob a região abdominal da cutícula externa (Figura 2). Estas células são consideradas semelhantes aos hepatócitos e são especializadas na biossíntese de lipídeos cuticulares e feromônios, além de desempenharem funções correlatas ao metabolismo hepático. Ainda, os oenócitos são conhecidos por acumularem lipídeos em GLs durante o jejum, num processo semelhante à esteatose (GUTIERREZ et al., 2006; MUSSELMAN; KÜHNLEIN, 2018; TOPRAK et al., 2020). Ambas as estruturas, juntamente ao trato digestório, também desempenham funções de desintoxicação inerentes ao tecido hepático (MORAES; MONTAGNE, 2021).

O metabolismo de lipídeos desses drosofilídeos apresenta semelhanças ao metabolismo humano (MORAES; MONTAGNE, 2021); A Tabela 1 apresenta vários genes encontrados em ambas as espécies, corroborando a existência de rotas metabólicas similares entre elas. A LDN, por exemplo, a qual ocorre em ambos CG e oenócitos, além do intestino, começa com a ACC catalizando o acetil-CoA em malonil-CoA. Em seguida, a FASN utiliza o malonil-CoA e o acetil-CoA para a síntese de palmitato, que posteriormente dará origem a outros AGs de cadeia longa (TOPRAK et al., 2020; HEIER et al., 2021). Na *D. melanogaster*, existe um único gene que codifica a ACC e três que codificam a FASN (FASN1, FASN2 e FASN3). Enquanto a ACC é onipresente nos tecidos que realizam a LDN, a FASN1 é notavelmente expressa no CG, ao passo que as FASN2 e FASN3 são particularmente expressas nos oenócitos (PARVY et al., 2012; GARRIDO et al., 2015; MORAES; MONTAGNE, 2021).

Tabela 1 - Elementos ortólogos de genes humanos e de *D. melanogaster* envolvidos em doenças metabólicas e hepáticas.

Humanos	<i>D. melanogaster</i>	Função na <i>D. melanogaster</i>
ChREBP MondoA SREBPs LXR	Mondo SREBP EcR	Regula o consumo de açúcar Regula genes da síntese de AGs Receptor para o hormônio esteróide ecdisona

PPARs	Eip75B	Intermediário na sinalização de hormônios esteróides
PNPLA3	Brummer	Executa a quebra de TGs
Perilipinas	Lsd1	Envolve as GLs
	Lsd2	
Apolipoproteínas	apoLpp	Realiza o transporte lipídico pela hemolinfa
	apoLTP	Realiza carga lipídica em Lpp nos enterócitos
	MTP	Realiza carga lipídica em Lpp no GC
mTOR	TOR	Regula o crescimento em resposta a nutrientes
Insulina	DILPs	Regula o crescimento e o metabolismo
IGF1		
IGF2		
IGFBP	Imp-L2	Modula a atividade dos DILPs
InR	InR	Receptor para os DILPs
IGF-R		
IRS1	Chico	Regula o crescimento corporal e envelhecimento
Glucagon	AKH	Regula a resposta ao açúcar na dieta
Leptina	Unpaired2	Assim como a leptina, o Udp2 é um ligante para o receptor da via JAK/STAT
ACC1	ACC	Enzima limitadora para a síntese de AGs
ACC2		
FASN	FASN1	Onipresente na síntese de AGs do organismo
	FASN2	Restrita à síntese de AGs nos oenócitos
	FASN3	Restrita à síntese de AGs nos oenócitos

Fonte: adaptado de Moraes e Montagne (2021)

Outro aspecto relevante no metabolismo energético das *D. melanogaster* é a existência de classes de hormônios semelhantes aos encontrados nos mamíferos. Nas *Drosophilas* são encontrados peptídeos semelhantes à insulina (DILPs) (Tabela 1), que como o próprio nome sugere, são peptídeos que apresentam uma sequência de aminoácidos semelhante à insulina humana e possuem função análoga a mesma (MATTILA; HIETAKANGAS, 2017; TOPRAK, 2020; MORAES; MONTAGNE, 2021). Ou seja, os DILPs agem na regulação do índice glicêmico na hemolinfa das moscas e induzem a captação da glicose pelas células, além de serem reguladores centrais

do metabolismo lipídico (MATTILA; HIETAKANGAS, 2017; OH et al., 2019). Além disso, esses drosofilídeos também compartilham dos mesmos fatores de transcrição que regulam a expressão das proteínas envolvidas no metabolismo de lipídeos e carboidratos, tais como os SREBP e ChREBP (denominado *Mondo* nas moscas) (Tabela 1), que também se correlacionam ao estabelecimento e desenvolvimento da DHGNA (MORAES; MONTAGNE, 2021).

Nos últimos anos, a *D. melanogaster* vem sendo cada vez mais utilizada como modelo em estudos translacionais correlatos a patologias tão distintas como o câncer (MUNNIK et al., 2022), a obesidade, doenças metabólicas (MUSSELMAN; KÜHNLEIN, 2018; MESHRIF; EL HUSSEINY; ELBRENESE, 2022), neurológicas (MCGURK; BERSON; BONINI, 2015; OGUNSUYI et al., 2021; CONTRERAS; KLÄMBT, 2023), renais (DOW; SIMONS; ROMERO, 2022), cardíacas (SQUIDI; JAGLA, 2021), entre outras. Indiscutivelmente, ela vem auxiliando na caracterização e validação de moléculas relevantes dentro de um contexto aplicado e biotecnológico (XIAO et al., 2021; DENECKE et al., 2022; MUNNIK et al., 2022).

Na área da toxicologia, a *D. melanogaster* se mostra um modelo interessante para a validação dos efeitos dos agrotóxicos no organismo (SARAIVA et al., 2021; TASMAN; RANDS; HODGE, 2021; GUPTA et al., 2023). Por atualmente disporem de linhagens com diferentes graus de resistência a agentes tóxicos (ABDU-ALLAH et al., 2020; SIGRIST-FLORES et al., 2021), é possível compreender com melhor detalhamento como essas substâncias agem nos sistemas orgânicos. Aliado a isso, o metabolismo de xenobióticos dessas moscas também se encontra bastante conservado e elas compartilham as mesmas enzimas envolvidas nessa via como o citocromo P450, a glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), por exemplo (YANG et al., 2007; HUANG et al., 2019). Essas características reforçam a utilização desse modelo em estudos que buscam entender os mecanismos por trás da toxicidade dos agrotóxicos e suas consequências no organismo.

Nessa linha, Saraiva et al. (2018) conduziram um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos da exposição ao fungicida MCZB nas moscas-das-frutas por meio da dieta. Eles avaliaram a sobrevivência, performance locomotora e alguns parâmetros bioquímicos específicos. Em resumo, seus resultados mostraram que a disfunção locomotora e a mortalidade aumentavam de maneira tempo-dose-

dependente. Também foi constatado aumento do estresse oxidativo, produção de EROs e de alterações nas atividades de enzimas do sistema antioxidativo. Além disso, também foi observada elevação dos níveis de manganês (Mn), um dos produtos da degradação do MCZB, de maneira dose-dependente. Considerando esses achados, os autores relacionaram o estresse e dano oxidativos e a disfunção locomotora à toxicidade associada a acumulação de Mn nas moscas.

Em outro exemplo, Leão et al. (2019) demonstraram em seu estudo que a exposição da *D. melanogaster* ao herbicida Palace® (uma mistura dos princípios ativos 2,4-D e picloram) aumentou a taxa de mortalidade em indivíduos adultos de maneira dose-dependente. Os autores também observaram efeitos adversos no desenvolvimento e comportamento das moscas, sendo este último possivelmente relacionado à disfunção mitocondrial.

A literatura é rica em estudos dos efeitos de agrotóxicos em *Drosophila*, reforçando o uso deste inseto como modelo translacional de estudo, mais uma vez (MEHDI; QAMAR, 2013; LI; LIU; WANG, 2020; MANDI et al., 2020; SARAIVA et al., 2021; DENECKE et al., 2022; GUPTA et al., 2023). Sendo assim, pode-se concluir que os estudos conduzidos com diferentes agrotóxicos e que utilizam a *D. melanogaster* como modelo tem ajudado a comunidade científica a compreender os mecanismos de toxicidade dessas substâncias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos do fungicida mancozebe no metabolismo energético de células hepáticas e validar os resultados na *Drosophila melanogaster* como modelo translacional.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Avaliar o efeito citotóxico do agrotóxico MCZB em co-culturas de células hepáticas (HepG2:LX-2, 7:3) em ensaios de MTT e estabelecer condições de trabalho;
- 2- Mensurar a produção de triglicerídeos e glicose nas culturas celulares incubadas com o agrotóxico MCZB em ensaios bioquímicos;
- 3- Avaliar os efeitos do MCZB na β -oxidação através de AGs marcados com fluoróforos.
- 4- Avaliar os efeitos do MCZB na produção de triglicerídeos e glicose na *D. melanogaster*, utilizando análises bioquímicas.
- 5- Verificar as informações disponíveis em bases de dados sobre expressões gênicas correlatas a bioatividade do MCZB para inferir possíveis mecanismos moleculares, utilizando-se plataformas online, para enriquecer as análises apresentadas no presente estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA CELULAR

Células de linhagens de hepatócitos HepG2 (ATCC® HB-8065™) e células estreladas hepáticas LX-2 (gentilmente cedidas pelo Dr. S. Friedeman; XU et al. [2005]) foram cultivadas e mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) contendo 10% de soro bovino fetal (SBF), na presença de 5% de CO₂ e a 37°C. Para os experimentos, as células foram co-cultivadas na proporção de 7:3, respectivamente, seguindo protocolo padronizado em nosso laboratório (DE OLIVEIRA DA SILVA et al., 2018). A escolha da co-cultura deve-se a capacidade metabólica do modelo na investigação do metabolismo lipídico.

3.2 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE / VIABILIDADE CELULAR

As análises de citotoxicidade foram realizadas pela técnica de MTT (*Thiaroly Blue Tetrazolium Bromide*) (MOSMANN, 1983). Para isso, 6×10^3 células na proporção 7:3 (HepG2:LX-2) foram cultivadas nas condições descritas em “3.1” em microplacas de 96 poços e em quintuplicatas. Diferentes concentrações do MCZB puro (0,5 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM e 25 µM) foram testadas e incubadas junto ao grupo controle (sem o agrotóxico) por um intervalo de 72 horas. Após 48 horas, o meio de cultura era substituído por meio fresco nas mesmas condições do ensaio. Passada as 72 horas do ensaio, adicionou-se o MTT na concentração de 0,5 mg/mL em cada poço da microplaca. As células então foram incubadas por pelo menos 6 horas até a metabolização do composto e a formação dos cristais de *formazan*. Em seguida, os cristais foram dissolvidos pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO) às culturas na proporção 1:1. Os resultados foram avaliados em leitor de microplaca Infinite M200 Pro™ Plate Reader (Tecan, Crailsheim, Germany) sob absorvância $\lambda = 570$ nm.

Por apresentar caráter hidrofóbico, o MCZB foi diluído em DMSO para a viabilização dos ensaios. Assim, ensaios de MTT também foram realizados para diferentes concentrações do DMSO puro (0,25%, 0,5%, 1% e 2%) diluído no meio de cultura. Com isso, buscou-se utilizar as concentrações que mantivessem ~70 a 80% das células viáveis.

3.3 MENSURAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS E GLICOSE

Para a mensuração dos níveis de triglicerídeos e glicose celular, $4,4 \times 10^5$ células foram co-cultivadas em garrafas de 25 cm² nas condições descritas anteriormente na presença ou ausência do MCZB e nas concentrações estabelecidas através do ensaio do MTT (0,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M). Em seguida, as células foram coletadas, lavadas em solução tampão PBS/EDTA e centrifugadas a 3000 rpm por 4 min. Então, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi ressuspensionado em 100 mL de PBS/EDTA. As amostras foram processadas utilizando os kits de reagentes comerciais Triglicérides e Glicose Liquiform (LabTest), seguindo as orientações do fornecedor. As mensurações do valor da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro Thermo Biomate 3 UV-Vis (*Thermo Fischer Scientific*) sob $\lambda = 505$ nm. Os ensaios foram feitos em quadruplicatas.

3.4 ANÁLISE DA β -OXIDAÇÃO

A análise da β -oxidação foi realizada através de uma metodologia *pulse-chase* com a utilização de AGs marcados com fluoróforos, adaptando-se a metodologia descrita em Rambold et al. (2015). Para isso, 3×10^4 células foram co-cultivadas na presença ou ausência do MCZB (0,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M) em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares estéreis e previamente tratadas. Neste ensaio, o Etomoxir (*Merck*) na concentração de 25 μ M foi utilizado como controle positivo para o bloqueio da β -oxidação. Faltando 16 horas para completar as 72 horas de incubação, o BODIPY[™] 558/568 C12 (4,4-Difluoro-5-(2-Thienyl)-4-Bora-3a,4a-Diazas-Indacene-3-Dodecanoic Acid) (*Thermo Fisher Scientific*) foi adicionado às culturas na concentração de 1 μ M. Passadas as 16 horas subsequentes, os meios de cultura foram substituídos, sem o C12, e as células foram incubadas por mais 1 ou 8 horas.

Após o término de cada período de incubação, as lamínulas foram fixadas em solução de paraformaldeído a 1,41% por 4 minutos, seguidas por três lavagens de 5 minutos com 0,5x PBS. Na sequência, os núcleos celulares foram marcados com DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dicloridrato) na concentração de 3,33 ng/mL por 4 minutos e as gotículas de lipídeos neutros foram marcadas com BODIPY[™] 493/503 (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diazas-Indacene) (*Thermo Fisher*

Scientific) na concentração de 0,5 µg/mL por 20 minutos. As lamínulas foram dispostas em lâminas contendo N-propilgalato e analisadas em microscópio de fluorescência BX 51 OLYMPUS.

As fotomicrografias de fluorescência foram tratadas e quantificadas utilizando o software ImageJ, juntamente ao plugin JACoP. A sobreposição entre o BODIPY™ 558/568 C12 e o BODIPY™ 493/503 foi avaliada pelo coeficiente de Pearson.

3.5 VALIDAÇÃO DOS EFEITOS DO MANCOZEBE NO MODELO TRANSLACIONAL DE *Drosophila melanogaster*

3.5.1 Cultura e manutenção das moscas

D. melanogaster da linhagem Oregon-R foram cultivadas em tubos de vidro tampados com algodão envolto em gaze não-cirúrgica sob dieta padrão (8% p/v levedo de cerveja; 2% p/v extrato de levedura; 2% p/v peptona; 5,1% p/v sacarose; 0,05% p/v MgSO₄ (H₂O)₇; 0,05% p/v CaCl₂ (H₂O)₂; 0,8% p/v ágar; 5% v/v nipagin), descrita em Sanhueza et al. (2021), e mantidas em BOD a 25°C com umidade relativa de 60% e ciclo de 12 horas claro/escuro. Os repiques dos estoques foram feitos semanalmente.

3.5.2 Padronização da dieta obesogênica e exposição ao agrotóxico

Para essas análises, *D. melanogaster* foram cultivadas em dietas diferenciais. Para mimetizar condições simuladoras de condições pró-esteatóticas, grupos de 20 moscas adultas machos foram cultivadas em dietas obesogênicas à base de óleo de coco (dieta padrão contendo 2% ou 5% p/v de óleo de coco) por 5 dias nas condições descritas em “3.5.1”. Ao final do ensaio, os indivíduos foram coletados e processados para a análise dos níveis de triglicerídeos e glicose como descrito em “3.5.3”. Os machos foram escolhidos para a realização dos ensaios por apresentarem menor influência hormonal no metabolismo comparado às fêmeas.

Para a análise dos efeitos do MCZB no metabolismo das moscas, 35 machos foram cultivados sob dieta padrão contendo as concentrações do agrotóxico estabelecidas na cultura celular (0,5 µM, 5 µM, 10 µM) por 5 ou 7 dias. Terminados os ensaios, os indivíduos foram coletados e processados para a mensuração dos níveis de triglicerídeos e glicose, como descritos em “3.5.3”. As moscas também foram

testadas de modo qualitativo quanto a tolerância às concentrações de 0,25%, 0,5% e 1% do DMSO. Todos os ensaios foram feitos em quadruplicatas.

3.5.3 Mensuração de triglicerídeos e glicose das moscas

Para a mensuração dos níveis de triglicerídeos e de glicose nas moscas submetidas aos ensaios descritos em “3.5.2”, 5 moscas foram coletadas aleatoriamente de cada tratamento e trituradas em 250 μ L de PBS/EDTA. As amostras então foram processadas utilizando os kits de reagentes comerciais Triglicérides e Glicose Liquiform (LabTest), seguindo as orientações do fornecedor. As mensurações do valor da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro Thermo Biomate 3 UV-Vis (*Thermo Fischer Scientific*) sob $\lambda = 505$ nm.

3.6 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

Para as análises de bioinformática, dados públicos sobre níveis da expressão de genes importantes modulados pelo agrotóxico mancozebe e depositados em banco de dados da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*EPA - Environmental Protection Agency*; disponível em: <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/invitrodb/DTXSID0034695>) foram utilizados. Na sequência, o valor do LOGAC50 foi considerado para a divisão dos grupos. Os genes com valores LOGAC50 <1.00 foram incluídos no grupo dos menos expressos e os genes com valores LOGAC50 >1.00 foram incluídos no grupo dos mais expressos. Em seguida, os algoritmos PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) e STRING (<https://string-db.org/>) foram utilizados, seguindo tutoriais dos próprios algoritmos. Essas análises permitiram elencar e classificar importantes proteínas moduladas pelo agrotóxico, assim como vislumbrar redes de interações entre putativos elementos alterados pelo MCZB, possibilitando maiores discussões de nossos resultados.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

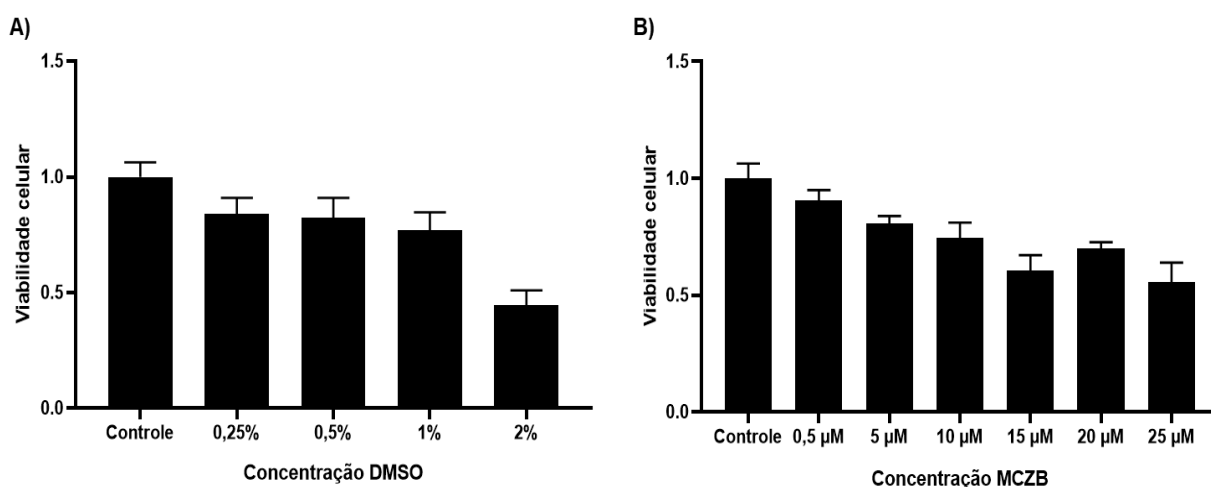
Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad, versão 8.0 (Prism Inc.). Foi realizado o teste One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, com valor de significância $p < 0,05$ (*).

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISES DE VIABILIDADE CELULAR FRENTE AOS TRATAMENTOS CELULARES

As análises de viabilidade celular foram realizadas inicialmente com DMSO visto a sua utilização como solvente do mancozebe. Essas análises foram necessárias para certificar os possíveis efeitos deletérios do agrotóxico nas culturas celulares, descartando o efeito do solvente *per se*. As análises demonstraram que o solvente reduziu consideravelmente a viabilidade celular nas culturas na concentração de 2%. Nesta concentração, menos que 50% das células permaneceram viáveis após as 72 horas do ensaio. Além disso, as células mostraram-se morfológicamente alteradas, sugerindo a presença de mecanismos de estresse celular, quando observadas ao microscópio. Esse achado evidencia o efeito deletério intrínseco do solvente. Nas demais concentrações testadas, a viabilidade permaneceu acima dos 70% desejados para trabalho (Figura 3A) e as células permaneceram morfológicamente normais. Com isso, foi estabelecido o limite de concentração de DMSO que poderia ser utilizado no trabalho para 1%.

Figura 3. Ensaio de viabilidade celular (MTT) do co-cultivo de células hepáticas humanas HepG2 e LX-2 na proporção 7:3, respectivamente. A) Viabilidade celular após exposição de 72 h às diferentes concentrações do solvente DMSO. B) Viabilidade celular após exposição de 72 h às diferentes concentrações do fungicida mancozebe.



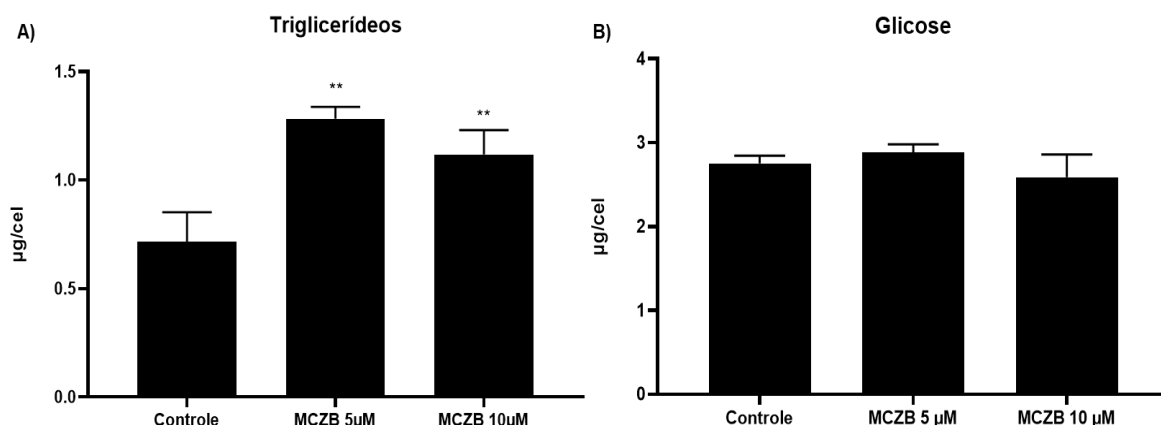
Nos ensaios de viabilidade sob efeito do MCZB, as concentrações do DMSO utilizadas não ultrapassaram o valor de 0,1%, de modo a assegurar que o solvente

teria efeito mínimo sobre as células. Deste modo, foi possível avaliar os efeitos próprios do agrotóxico na viabilidade celular. Entre as concentrações utilizadas, foi possível observar queda da viabilidade celular para <70% a partir dos 15 μM (Figura 3B). Apesar disso, as células não se mostraram morfologicamente tão alteras quanto nas concentrações maiores (20 μM e 25 μM). As células permaneceram satisfatoriamente viáveis nas três menores concentrações testadas. Sendo assim, as concentrações de 0,5 μM , 5 μM e 10 μM do agrotóxico foram selecionadas para dar continuidade a este trabalho.

4.2 EFEITOS DO MANCOZEBE NOS NÍVEIS DE TRIGLICERÍDEOS E DE GLICOSE NAS CÉLULAS HEPÁTICAS

Com as concentrações de trabalho do MCZB estabelecidas, as células hepáticas foram avaliadas quanto aos níveis de TGs, um indicador pró-esteatótico, assim como para os níveis de glicose. Este último, serviu como indicador de possíveis processos envolvendo o metabolismo de carboidratos. Os resultados obtidos para as concentrações de 5 μM e 10 μM apontam para a indução do acúmulo de TGs pelas células hepáticas (Figura 4A). As células aparentam apresentar maior acúmulo de TGs com 5 μM do agrotóxico, apesar de não haver diferença estatística quando comparado à concentração de 10 μM . Não foram observadas diferenças referentes aos níveis celulares de glicose (Figura 4B).

Figura 4. Quantificação dos níveis intracelulares de triglicerídeos e glicose em co-cultura de células hepáticas humanas sob efeito do mancozebe. A) Níveis intracelulares de triglicerídeos após 72 h de exposição às diferentes concentrações do fungicida mancozebe. B) Níveis intracelulares de glicose do mesmo ensaio. Os resultados foram submetidos ao teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, onde $**p < 0,005$ em relação ao controle.

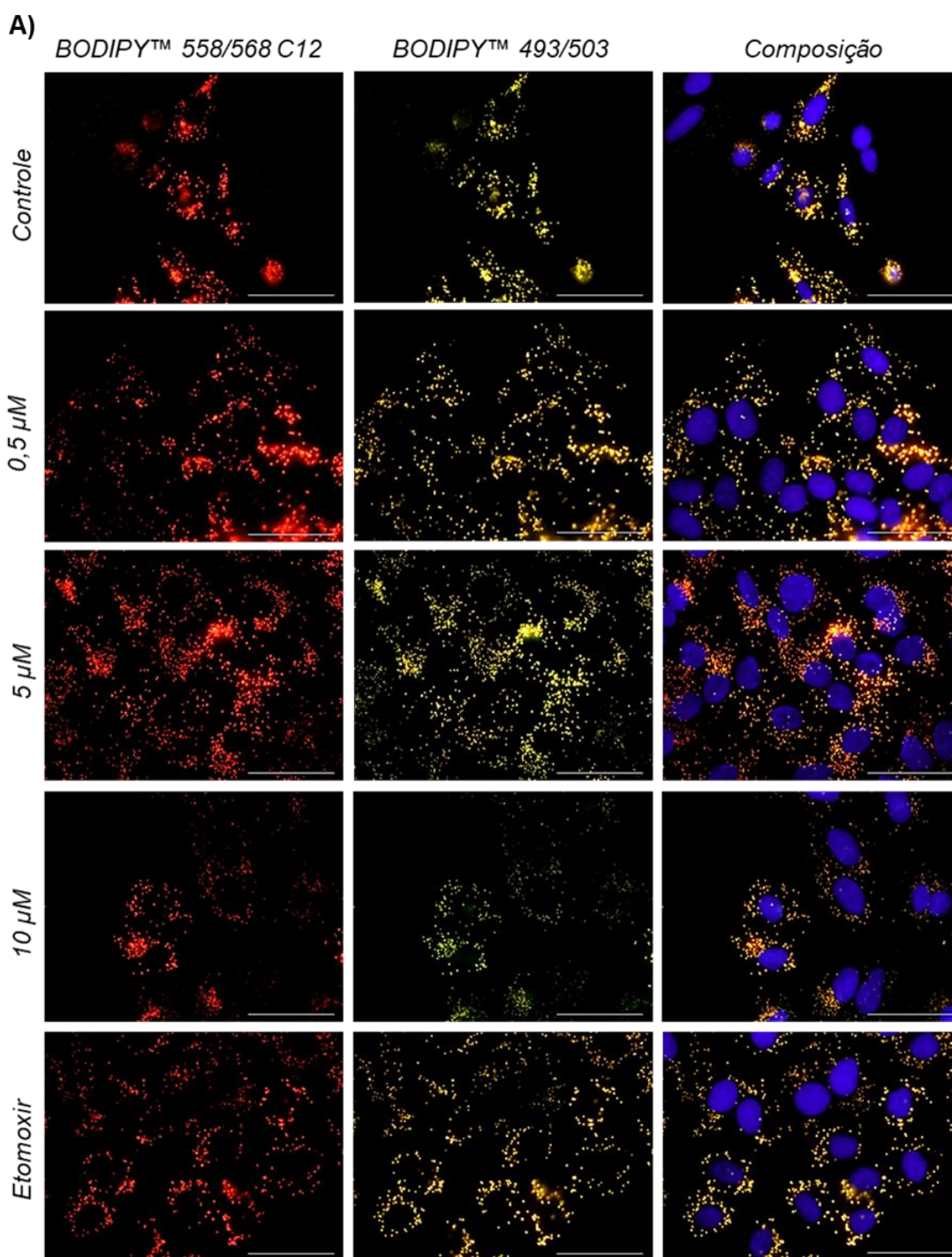


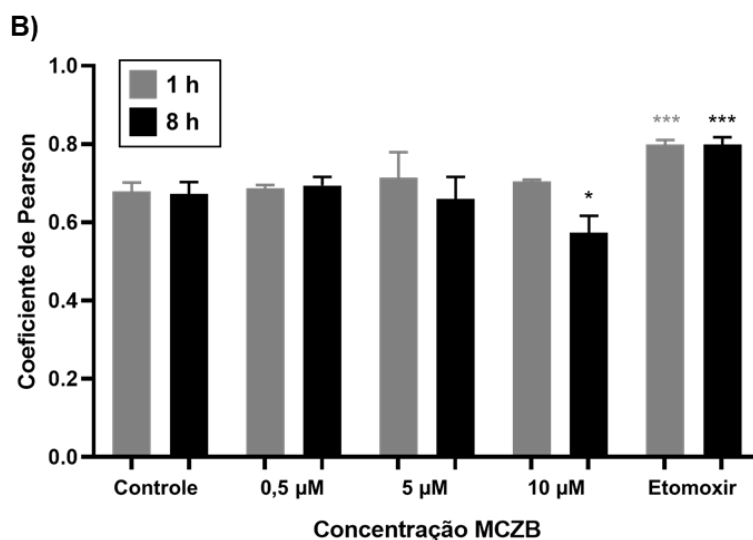
4.3 EFEITOS DO MANCOZEBE NA β -OXIDAÇÃO DAS CÉLULAS HEPÁTICAS

Buscando-se uma explicação para as alterações metabólicas observadas nas células incubadas com o MCZB, a β -oxidação foi mensurada para determinar se o acúmulo de TGs nas células seria causado através da sua inibição pelo agrotóxico. Para isso, avaliou-se o índice de sobreposição de gotículas lipídicas expostas a diferentes fluoróforos; quanto maior for a sobreposição do BODIPY™ 558/568 C12 sobre o BODIPY™ 493/503, menos β -oxidação estaria ocorrendo na célula, visto que isso indicaria que o C12 estaria sendo mobilizado para armazenamento em gotículas de lipídeos neutros. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5. Após a análise conjunta dos mesmos, as gotículas de lipídeos foram quantificadas e seus índices de sobreposição foram evidenciados utilizando-se o coeficiente de Pearson (Figura 5B). A interpretação dos resultados aponta que na concentração de 10 μ M existe uma redução no índice de sobreposição das gotículas lipídicas, inferindo-se um aumento no processo oxidativo, o que reforça possíveis mecanismos de toxicidade.

Figura 5. Ensaio da β -oxidação em co-culturas de células hepáticas sob efeito do mancozebe.

A) Fotomicrografias de fluorescência. O BODIPY™ 558/568 C12 (à esquerda) representa os ácidos graxos incorporados às células. O BODIPY™ 493/503 (centro) representa as gotículas de lipídeos neutros intracelulares. A sobreposição (à direita) de ambas as fluorescências evidencia a taxa de β -oxidação das células hepáticas após os tratamentos. Os núcleos celulares (azul) foram marcados com DAPI. O grupo tratado com etomoxir (25 μ M) foi utilizado como controle positivo para o bloqueio da β -oxidação. As barras de escala representam 20 μ m. As fotomicrografias mostram as co-culturas celulares nas 8 h posteriores à retirada do C12. B) Quantificação da sobreposição entre os fluoróforos. Quanto mais próximos os valores estão de 1.0, menos oxidação de ácidos graxos está ocorrendo nas células. O tratamento com etomoxir simula o bloqueio da β -oxidação. Os resultados foram submetidos ao teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, onde ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,00005$ em relação aos respectivos controles.

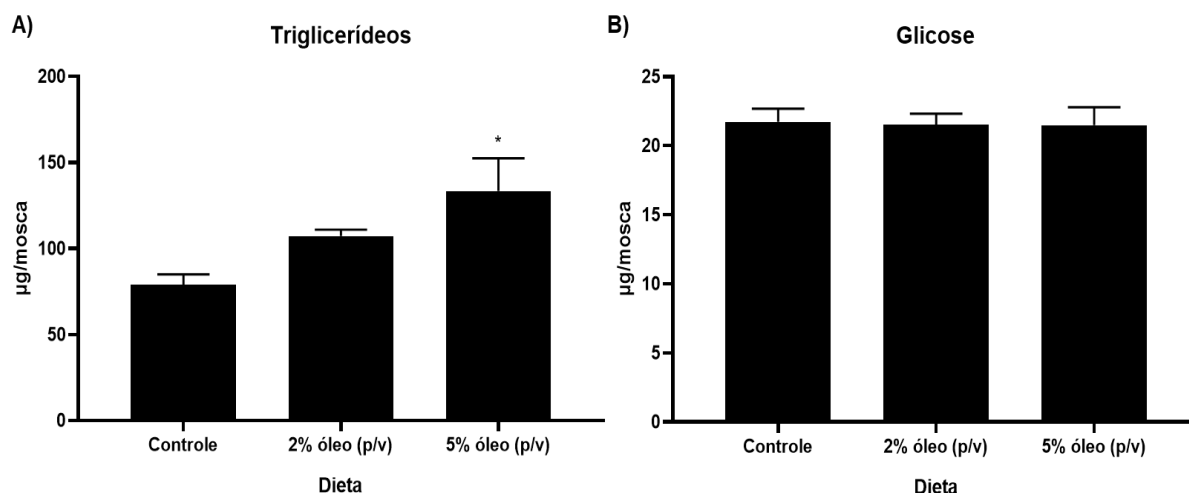




4.4 PADRONIZAÇÃO DE UMA DIETA OBESOGÊNICA PARA ESTUDOS PRÓ-ESTEATÓTICOS NA *D. melanogaster*

Para estabelecer um modelo de condições pró-esteatóticas utilizando a *D. melanogaster*, o óleo de coco foi adicionado à dieta padrão de acordo com a metodologia descrita em Sanhueza et al. (2021). Duas concentrações foram testadas frente ao seu potencial em induzir o acúmulo de TGs nas moscas: 2% (p/v) e 5% (p/v). Após as análises serem realizadas, não se observou aumento significativo dos TGs na concentração de 2% (p/v) de óleo de coco. Por outro lado, na concentração de 5% (p/v) os níveis de TGs das moscas aumentaram significativamente após os 5 dias de ensaio (Figura 6A). Contudo, não houve diferença entre os níveis de glicose em ambas as dietas quando comparadas ao controle (Figura 6B). Desse modo, com base nos resultados encontrados, a dieta obesogênica com 5% (p/v) de óleo de coco foi escolhida como nosso modelo pró-esteatótico para ensaios futuros em nosso laboratório.

Figura 6. Quantificação dos níveis de triglicerídeos e glicose da *D. melanogaster* sob dietas obesogênicas de 2% e 5% (p/v) de óleo de coco. A) Níveis de triglicerídeos das moscas após 5 dias sob dieta obesogênica. B) Níveis de glicose das moscas do mesmo ensaio. Os resultados foram submetidos ao teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, onde $*p > 0,05$ em relação ao controle.



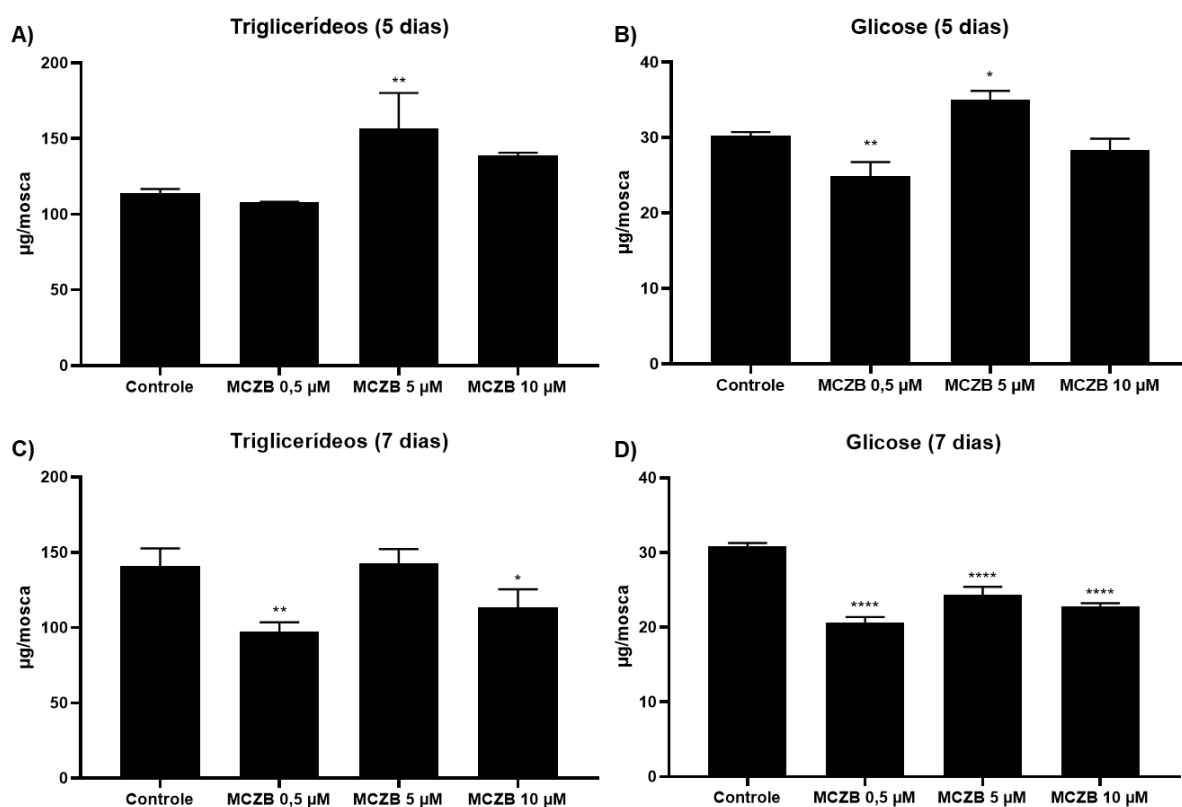
4.5 TOLERÂNCIA AO DMSO E EFEITOS DO MANCOZEBE NOS NÍVEIS DE TRIGLICERÍDEOS E DE GLICOSE NAS MOSCAS

As *D. melanogaster* se mostraram especialmente sensíveis à presença do DMSO puro. A viabilidade das moscas tratadas com 1% DMSO foi consideravelmente prejudicada. Os adultos morreram em poucos dias de exposição e as larvas não se desenvolveram ou não completaram a metamorfose. As moscas tratadas com 0,5% DMSO apresentaram queda significativa na viabilidade quando comparado ao controle. Aqui, o desenvolvimento dos insetos foi expressivamente menor. Por outro lado, as moscas cultivadas sob 0,25% DMSO se mantiveram semelhantes ao grupo controle, tanto em relação à sobrevivência dos adultos, quanto ao ciclo completo de desenvolvimento. Sendo assim, nos ensaios em que o agrotóxico foi utilizado junto às *D. melanogaster*, procurou-se manter a concentração de DMSO inferior à 0,25%.

Para a análise translacional e comparativa entre os resultados celulares e sistêmicos, as *D. melanogaster* foram expostas ao MCZB através da dieta durante 5 ou 7 dias. Nos ensaios com 5 dias de exposição, os níveis de TGs aumentaram significativamente na concentração de 5 µM, semelhantemente ao que ocorreu nas células hepáticas (Figura 7A). Porém, apesar da concentração de 10 µM visualmente também aparentar elevação de TGs, não houve significância estatística em relação ao controle. Em relação aos níveis de glicose, este mostrou-se alterado nas

concentrações de 0,5 μM e 5 μM (Figura 7B). Na primeira, houve queda do índice glicêmico, que pode ser interpretada como mecanismo correlato a sobrevivência celular e/ou toxicidade, que resultam em maior gasto energético. Na segunda, o contrário pôde ser observado. O índice glicêmico aumentado juntamente ao índice de TGs marca a presença de alterações metabólicas importantes.

Figura 7. Quantificação dos níveis de triglicerídeos e glicose da *D. melanogaster* sob dieta contendo diferentes concentrações do mancozebe. A) Níveis de triglicerídeos das moscas após exposição de 5 dias à dieta com o MCZB. B) Níveis de glicose das moscas após exposição de 5 dias à dieta com o MCZB. C) Níveis de triglicerídeos após exposição de 7 dias à dieta contendo MCZB. D) Níveis de glicose após exposição de 7 dias à dieta com o MCZB. Os resultados foram submetidos ao teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, onde * $p > 0,05$; ** $p < 0,005$; **** $p < 0,00005$ em relação ao controle.



Com 7 dias de ensaio ambos TGs (Figura 7C) e glicose (Figura 7D) apresentaram decréscimo de seus níveis nas moscas, principalmente quando comparados ao ensaio anterior. Em um primeiro momento, esses resultados podem sugerir uma maior demanda energética nas moscas, que pode ser consequente a mecanismos de sobrevivência e/ou toxicidade.

4.6 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

Considerando-se a seleção de informações disponíveis em: <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/invitrodb/DTXSID0034695>, foram selecionados 209 genes relacionados à bioatividade do MCZB (Tabela 2). Inicialmente, os genes correlatos à bioatividade do MCZB foram separados manualmente em grupos: Grupo A – os mais expressos (LOGAC50 >1.00; Tabela 3), onde foram incluídos 43 genes; e Grupo B – os menos expressos (LOGAC50 <1.00; Tabela 3), onde foram incluídos 159 genes. Essas informações foram utilizadas nas análises de bioinformática.

Tabela 2 - Lista dos genes selecionados quanto à bioatividade do mancozebe. Os genes foram obtidos do banco de dados da EPA (*Environmental Protection Agency*). Um total de 209 genes foram selecionados.

SÍMBOLO	NOME
AHR	Receptor de hidrocarboneto arílico
FOS	Homólogo do oncogene viral do osteossarcoma murino FBJ
CREB3	Proteína 3 de ligação ao elemento responsivo ao cAMP
EGR1	Resposta de crescimento inicial 1
HIF1A	Fator 1 induzível por hipóxia, subunidade alfa (fator de transcrição hélice-alça-hélice básico)
MTF1	Fator de transcrição regulador de metal 1
NFE2L2	Fator nuclear, eritroide 2 tipo 2
POU2F1	POU classe 2 <i>homeobox</i> 1
PAX6	<i>Paired box</i> 6
NR1I2	Subfamília de receptores nucleares 1, grupo I, membro 2
SOX1	SRY (região determinante do sexo Y)- <i>box</i> 1
VDR	Receptor de vitamina D (1,25-dihidroxitamina D3)
XBP1	Proteína de ligação <i>X-box</i> 1
PPARG	Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
HLA-DRA	Complexo principal de histocompatibilidade, classe II, DR alfa
F3	Fator de coagulação III (tromboplastina, fator tecidual)
VCAM1	Molécula de adesão celular vascular 1
CYP2C18	Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 18
CYP2C19	Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 19
CYP2C9	Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 9
Cyp3a23/3a1	Citocromo P450, família 3, subfamília A, polipeptídeo 23/polipeptídeo 1
ABL1	ABL proto-oncogene 1, tirosina quinase não receptora
ACP1	Fosfatase ácida 1, solúvel
AKT1	Homólogo 1 do oncogene viral V-akt de timoma murino
AKT2	Homólogo 2 do oncogene viral V-akt de timoma murino
AKT3	Homólogo 3 do oncogene viral V-akt de timoma murino

PRKAA1	Proteína quinase, ativada por AMP, subunidade catalítica alfa 1
AURKA	Aurora-quinase A
BACE1	Enzima 1 de clivagem de APP de sítio beta
BTK	Bruton agamaglobulinemia tirosina quinase
CASP5	Caspase 5, cisteína peptidase relacionada à apoptose
CDK2	Quinase dependente de ciclina 2
CDK6	Quinase dependente de ciclina 6
CSNK1A1	Caseína quinase 1, alfa 1
CSNK1D	Caseína quinase 1, delta
CSNK2A1	Caseína quinase 2, polipeptídeo alfa 1
CSF1R	Receptor do fator 1 estimulador de colônias
DUSP3	Fosfatase 3 de dupla especificidade
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ELANE	Elastase, expresso por neutrófilos
EPHA1	Receptor EPH A1
EPHA2	Receptor EPH A2
EPHB2	Receptor EPH B2
FGFR1	Receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos
FGFR3	Receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos
FYN	Proto-oncogene FYN, tirosina quinase da família Src
GSK3B	Glicogênio sintase quinase 3 beta
HDAC3	Histona desacetilase 3
HDAC6	Histona desacetilase 6
IGF1R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1
CHUK	Quinase ubíqua hélice-alça-hélice conservada
INSR	Receptor de insulina
JAK2	Janus quinase 2
LCK	Proto-oncogene LCK, tirosina quinase da família Src
LYN	Proto-oncogene LYN, tirosina quinase da família Src
MAPK1	Proteína quinase 1 ativada por mitógeno
MAPK11	Proteína quinase 11 ativada por mitógeno
MAPK3	Proteína quinase 3 ativada por mitógeno
MAPKAPK2	MAPK proteína quinase ativada 2
MAPKAPK5	MAPK proteína quinase ativada 5
MARK1	MAP/microtúbulos quinase reguladora de afinidade 1
MET	Proto-oncogene MET, receptor de tirosina quinase
MMP13	Matriz metalopeptidase 13 (colagenase 3)
MMP3	Matriz metalopeptidase 3 (estromelisina 1, progelatinase)
MMP9	Matriz metalopeptidase 9 (gelatinase B, 92 kDa gelatinase, 92 kDa tipo IV colagenase)
RPS6KA5	Proteína ribossômica S6 quinase, 90 kDa, polipeptídeo 5
NEK2	Quinase 2 relacionada a NIMA
PAK4	Quinase 4 ativada pela proteína p21 (Cdc42/Rac)
PDE10A	Fosfodiesterase 10A
PDE4A	Fosfodiesterase 4A, cAMP-específica
PDE5A	Fosfodiesterase 5A, cGMP-específica
PIK3CA	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase, subunidade alfa catalítica

PRKACA	Proteína quinase, dependente de cAMP, catalítica, alfa
PPM1A	Proteína fosfatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependente, 1A
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
PTPN1	Proteína tirosina fosfatase, não receptora tipo 1
PTPN11	Proteína tirosina fosfatase, não receptora tipo 11
PTPN12	Proteína tirosina fosfatase, não receptora tipo 12
PTPN13	Proteína tirosina fosfatase, tipo não receptor 13 (fosfatase associada a APO-1/CD95 [Fas])
PTPN14	Proteína tirosina fosfatase, não receptora tipo 14
PTPN2	Proteína tirosina fosfatase, não receptora tipo 2
PTPN4	Proteína tirosina fosfatase, não receptora tipo 4 (megacariócito)
PTPN6	Proteína tirosina fosfatase, não receptora tipo 6
PTPN9	Proteína tirosina fosfatase, não receptora tipo 9
PTPRB	Proteína tirosina fosfatase, tipo receptor, B
PTPRC	Proteína tirosina fosfatase, tipo receptor, C
PTPRF	Proteína tirosina fosfatase, tipo receptor, F
PTPRM	Proteína tirosina fosfatase, tipo receptor, M
SGK1	Quinase 1 regulada por soro/glicocorticóide
SIRT1	Sirtuína 1
SIRT2	Sirtuína 2
SRC	SRC proto-oncogene, tirosina quinase não receptora
SYK	Tirosina quinase do baço
TEK	TEK tirosina quinase, endotelial
NTRK1	Tirosina quinase neurotrófica, receptor, tipo 1
FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1
KDR	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
FLT4	Tirosina quinase 1 relacionada ao fms
PTGS2	Prostaglandina-endoperóxido sintase 2 (prostaglandina G/H sintase e ciclooxigenase)
Ache	Acetilcolinesterase
Comt	Catecol-O-metiltransferase
DYRK1A	Quinase 1A regulada por fosforilação de tirosina-(Y) de dupla especificidade
Htr4	5-hidroxitriptamina (serotonina) receptor 4
Bdkrb2	Receptor de bradicinina, beta 2
HTR2A	Receptor 2A de 5-hidroxitriptamina (serotonina), acoplado à proteína G
HTR7	Receptor 7 de 5-hidroxitriptamina (serotonina), acoplado a adenilato ciclase
TACR2	Receptor de taquicinina 2
NPY1R	Receptor Y1 do neuropeptídeo Y
OPRM1	Receptor opioide, mu 1
OPRL1	Receptor de opiáceos tipo 1
PTAFR	Receptor do fator ativador de plaquetas
Adra2a	Adrenoceptor alfa 2A
Crhr1	Receptor 1 do hormônio liberador de corticotropina
Tacr3	Receptor de taquicinina 3
Sstr1	Receptor 1 da somatostatina

Avpr1a	Receptor de arginina vasopressina 1A
Gria1	Receptor de glutamato, ionotrópico, AMPA 1
Grin1	Receptor de glutamato, ionotrópico, N-metil D-aspartato 1
TSPO	Proteína translocadora (18kDa)
AR	Receptor de andrógeno
NR1I3	Subfamília de receptores nucleares 1, grupo I, membro 3
NR1H4	Subfamília de receptores nucleares 1, grupo H, membro 4
NR3C1	Subfamília de receptores nucleares 3, grupo C, membro 1 (receptor de glicocorticóide)
RARA	Receptor de ácido retinóico, alfa
THRA	Receptor de hormônio da tireoide, alfa
SLC6A2	Família de transportadores de solutos 6 (transportadores de neurotransmissores), membro 2
ABCB1	Cassete de ligação ao ATP, subfamília B (MDR/TAP), membro 1
ABCB11	Cassete de ligação ao ATP, subfamília B (MDR/TAP), membro 11
ABCC2	Cassete de ligação ao ATP, subfamília C (CFTR/MRP), membro 2
ABCC3	Cassete de ligação ao ATP, subfamília C (CFTR/MRP), membro 3
ABCG2	Cassete de ligação ao ATP, subfamília G (BRANCO), membro 2 (grupo sanguíneo júnior)
ACLY	ATP citrato liase
ACOX1	Acil-CoA oxidase 1, palmitoil
ADK	Adenosina quinase
AFP	Alfa fetoproteína
APOA5	Apolipoproteína A-V
BAX	Proteína X associada ao BCL2
BCL2	CLL/linfoma de células B 2
BCL2L11	BCL2- <i>like</i> 11 (facilitador da apoptose)
BID	Agonista de morte do domínio de interação BH3
CASP3	Caspase 3, cisteína peptidase relacionada à apoptose
CASP8	Caspase 8, cisteína peptidase relacionada à apoptose
CAT	Catalase
CCND1	Ciclina D1
CDKN1A	Inibidor 1A da quinase dependente de ciclina (p21, Cip1)
CFLAR	CASP8 e regulador de apoptose semelhante a FADD
CYP1A1	Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 1
CYP1A2	Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 2
CYP2B6	Citocromo P450, família 2, subfamília B, polipeptídeo 6
CYP2C8	Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 8
CYP2E1	Citocromo P450, família 2, subfamília E, polipeptídeo 1
CYP3A4	Citocromo P450, família 3, subfamília A, polipeptídeo 4
CYP3A5	Citocromo P450, família 3, subfamília A, polipeptídeo 5
CYP3A7	Citocromo P450, família 3, subfamília A, polipeptídeo 7
CYP4A11	Citocromo P450, família 4, subfamília A, polipeptídeo 11
CYP4A22	Citocromo P450, família 4, subfamília A, polipeptídeo 22
CYP7A1	Citocromo P450, família 7, subfamília A, polipeptídeo 1
DDIT3	Transcrito 3 induzível por danos no DNA
EGF	fator de crescimento epidérmico
EZR	Ezrina

FABP1	Proteína de ligação a ácidos graxos 1, fígado
FAS	Receptor de morte de superfície celular Fas
FASN	Ácido graxo sintase
FMO3	Flavina contendo monooxigenase 3
FOXO1	<i>Forkhead box O1</i>
FOXO3	<i>Forkhead box O3</i>
GADD45A	Interrupção do crescimento e induzível por danos ao DNA, alfa
GADD45B	Interrupção do crescimento e induzível por danos ao DNA, beta
GADD45G	Interrupção do crescimento e induzível por danos no DNA, gama
GCLC	Glutamato-cisteína ligase, subunidade catalítica
GSTA2	Glutationa S-transferase alfa 2
GSTM3	Glutationa S-transferase mu 3 (cérebro)
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos (hepapoietina A; fator de dispersão)
HMGCS2	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase 2 (mitocondrial)
HSPA1A	Proteína 1A de choque térmico 70 kDa
ICAM1	Molécula de adesão intercelular 1
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (somatomedina C)
IGFBP1	Proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL6	Interleucina 6
IL6R	Receptor de interleucina 6
JUN	Proto-oncogene Jun
KRT19	Queratina 19
LIPC	Lipase, hepática
LPL	Lipoproteína lipase
MMP10	Matriz metalopeptidase 10 (estromelina 2)
MYC	Homólogo do oncogene viral da mielocitomatose aviária V-myc
NFKB1	Fator nuclear do potencializador do gene do polipeptídeo kappa <i>light</i> em células B 1
PDK4	Piruvato desidrogenase quinase, isoenzima 4
PEG10	Expresso paternalmente 10
PPP2R4	Ativador de proteína fosfatase 2A, subunidade reguladora 4
SDHB	Complexo succinato desidrogenase, subunidade B, ferro enxofre (lp)
SLC22A1	Família de transportadores de solutos 22 (transportadores de cátions orgânicos), membro 1
SLCO1B1	Família de transportadores de ânions orgânicos portadores de solutos, membro 1B1
STAT3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (fator de resposta de fase aguda)
SULT2A1	Família sulfotransferase, citosólica, 2A, preferencialmente dehidroepiandrosterona (DHEA), membro 1
TGFA	Fator transformador de crescimento, alfa
THRSP	Responsivo ao hormônio tireoidiano
TNFRSF1A	Superfamília de receptores do fator de necrose tumoral, membro 1A
UGT1A1	Família UDP glucuronosiltransferase 1, polipeptídeo A1
UGT1A6	Família UDP glucuronosiltransferase 1, polipeptídeo A6
SLC10A1	Família de transportadores de solutos 10 (cotransportador de sódio/ácido biliar), membro 1
NR1H3	Subfamília de receptores nucleares 1, grupo H, membro 3

USF1	Fator de transcrição upstream 1
IRF1	Fator regulador de interferon 1
TCF7	Fator de transcrição 7 (específico de células T, HMG-box)
Tpo	Tireóide peroxidase
ESRRA	Receptor alfa relacionado ao estrogênio
ESR2	Receptor de estrogênio 2 (ER beta)
PGR	Receptor de progesterona

4.6.1 PANTHER: análise de processos biológicos

O algoritmo PANTHER, *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships* (disponível em: <http://www.pantherdb.org/>), é uma plataforma desenvolvida para classificar proteínas e seus genes em grupos elencando elementos de filogenia, variações genéticas e função. A base de dados PANTHER está integrada à outras fontes de informações, como a *Gene Ontology Consortium*, *UniProt*, *Alliance of Genome Resources*, entre outras (THOMAS et al., 2022). Dentre suas aplicações, seus usuários podem executar a anotação de sequências de proteínas em pequena e larga escala e a anotação de variantes genéticas, navegar por proteomas completos ou famílias de proteínas por função, além de analisar listas de genes (THOMAS et al., 2022), esta última executada neste trabalho. Visto o objetivo do presente estudo em avaliar os efeitos do MCZB no metabolismo energético, foi dado maior enfoque em genes correlatos ao metabolismo de ácidos graxos e da glicose, especialmente aqueles que possuem relação com a DHGNA.

Tabela 3 - GRUPO A. Lista dos genes mais expressos correlatos à bioatividade do MCZB. Os genes foram obtidos do banco de dados da EPA (*Environmental Protection Agency*) e selecionados a partir dos valores LOGAC50 (>1.00).

GENES GRUPO A			
AHR	VCAM1	PRKACA	Grin1
EGR1	AKT3	PTPN14	NR1H4
HIF1A	BACE1	PTPN6	RARA
MTF1	CSNK1D	NTRK1	AR
PAX6	EPHA1	Comt	TCF7
NR1I2	EPHB2	Htr4	UGT1A1
SOX1	FGFR3	OPRM1	JUN
VDR	CHUK	PTAFR	ESRRA
PPARG	LCK	Adra2a	ESR2
HLA-DRA	MAPK11	Crhr1	PGR
F3	MMP13	Sstr1	

Tabela 4 - GRUPO B. Lista dos genes menos expressos correlatos à bioatividade do MCZB. Os genes foram obtidos do banco de dados da EPA (*Environmental Protection Agency*) e selecionados a partir dos valores LOGAC50 (<1.00).

GENES GRUPO B					
NFE2L2	HDAC6	PTPRC	ABCB11	CYP4A11	JUN
POU2F1	IGF1R	PTPRF	ABCC2	CYP4A22	KRT19
XBP1	INSR	PTPRM	ABCC3	CYP7A1	LIPC
VCAM1	JAK2	SIRT1	ABCG2	DDIT3	LPL
F3	LYN	SIRT2	ACLY	EGF	MMP10
CYP2C18	MAPK1	SRC	ACOX1	EGR1	MYC
CYP2C19	MAPK3	TEK	ADK	EZR	NFKB1
CYP2C9	MAPKAPK2	NTRK1	AFP	FABP1	PKD4
ABL1	MAPKAPK5	FLT1	APOA5	FAS	PEG10
ACP1	MARK1	KDR	BAX	FASN	PPP2R4
AKT1	MET	FLT4	BCL2	FMO3	SDHB
AKT2	MMP9	Ache	BCL2L11	FOXO1	SLC22A1
PRKAA1	RPS6KA5	DYRK1A	BID	FOXO3	SLCO1B1
AURKA	NEK2	HTR7	CASP3	GADD45A	STAT3
BTK	PAK4	TACR2	CASP8	GADD45B	SULT2A1
CASP5	PDE10A	NPY1R	CAT	GADD45G	TGFA
CDK2	PDE4A	OPRL1	CCND1	GCLC	THRSP
CDK6	PIK3CA	Tacr3	CDKN1A	GSTA2	TNFRSF1A
CSNK2A1	PTEN	Avpr1a	CFLAR	GSTM3	UGT1A1
CSF1R	PTPN1	Gria1	CYP1A1	HGF	UGT1A6
DUSP3	PTPN11	TSPO	CYP1A2	HMGCS2	SLC10A1
ELANE	PTPN12	NR1I3	CYP2B6	HSPA1A	USF1
EPHA2	PTPN13	NR3C1	CYP2C8	ICAM1	IRF1
FGFR1	PTPN2	NR1I2	CYP2E1	IGF1	Tpo
FYN	PTPN4	AR	CYP3A4	IGFBP1	
GSK3B	PTPN9	SLC6A2	CYP3A5	IL6	
HDAC3	PTPRB	ABCB1	CYP3A7	IL6R	

Com as análises realizadas no PANTHER foi possível observar os principais processos biológicos nos quais os genes analisados estão envolvidos. Os genes que não foram classificados pelo PANTHER foram excluídos das análises. Os resultados são apresentados nas Figuras 8, 9, 10 e 11. De forma geral, os principais processos biológicos relacionados aos genes selecionados do banco de dados foram: processos celulares (22%), regulação biológica (17,3%), processos metabólicos (15,8%), resposta ao estímulo (13,3%) e sinalização (11,1%) (Figura 8A). Ao considerarmos os processos celulares, estes estão relacionados principalmente a processos

A)

PANTHER GO-Slim Biological Process
Total # Genes: 206 Total # process hits: 676

0.9%, 0.1%, 0.9%, 17.3%, 22.5%, 5.9%, 0.1%, 2.5%, 0.9%, 2.7%, 15.8%, 4.7%, 0.6%, 0.6%, 13.3%, 11.1%, 0.9%

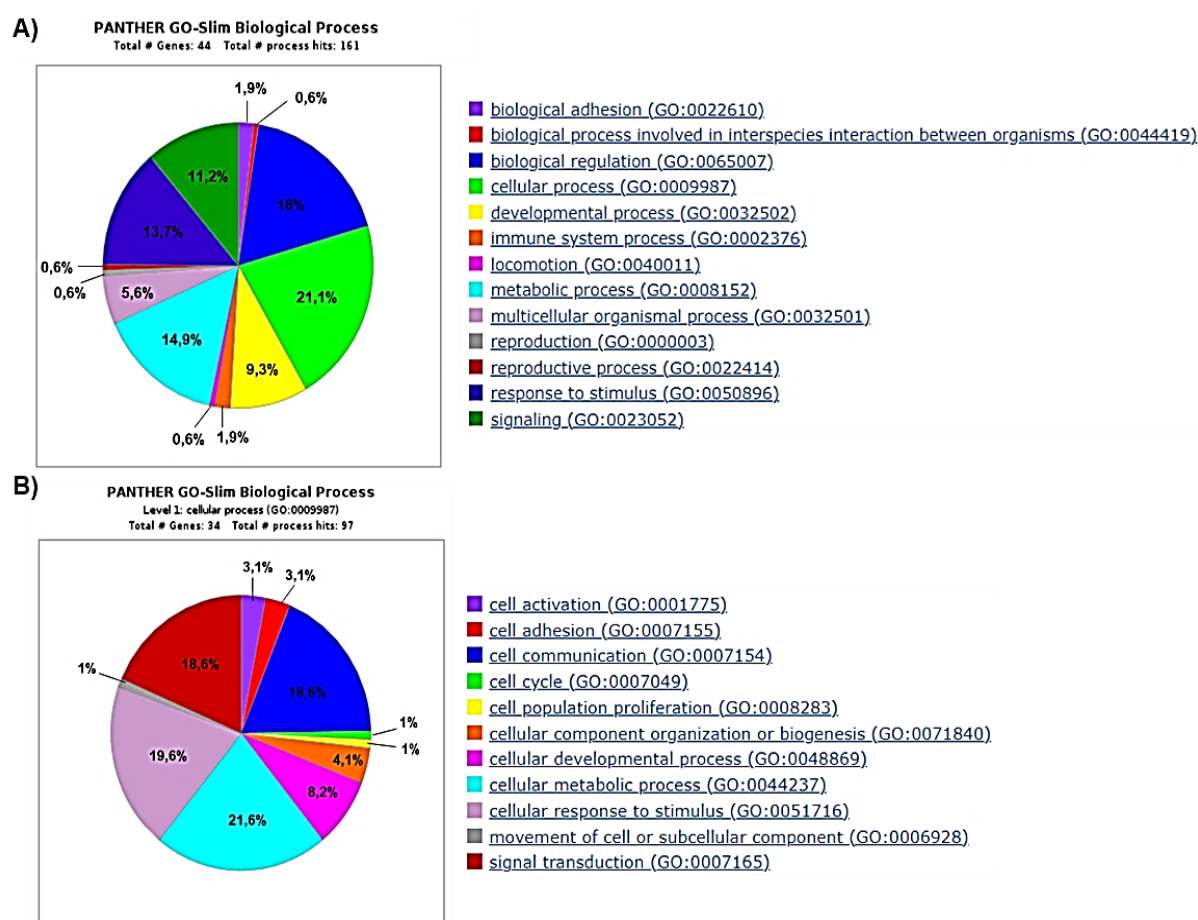
B)

PANTHER GO-Slim Biological Process
Level 2: cellular process (GO:0009987)
Total # Genes: 152 Total # process hits: 459

1.1%, 0.7%, 0.9%, 1.3%, 18.3%, 2.6%, 3.1%, 0.2%, 2%, 5%, 0.7%, 5%, 22.9%, 18.1%, 0.2%, 0.2%, 1.1%, 1.3%, 1.5%, 15.9%

Ao analisarmos os genes incluídos apenas no Grupo A (genes mais expressos), estes mostraram-se estar relacionados principalmente a processos celulares (21,1%), regulação biológica (18%), processos metabólicos (14,9%), resposta ao estímulo (13,7%) e sinalização (11,2%) (Figura 9A). Os processos celulares, por sua vez, envolvem sobretudo processos metabólicos celulares (21,6%), resposta celular ao estímulo (19,6%), comunicação celular (18,6%) e transdução de sinal (18,6%) (Figura 9B). Em comparação aos genes listados no grupo anterior, apenas o PPAR γ , o FXR α e o PXR estão representados nos processos metabólicos celulares. Por outro lado, a presença de genes envolvidos em vias de diferenciação, proliferação celular e apoptose, como o FGFR3, JUN e o HIF1 α , por exemplo, pode indicar a ativação de vias carcinogênicas pelo agrotóxico.

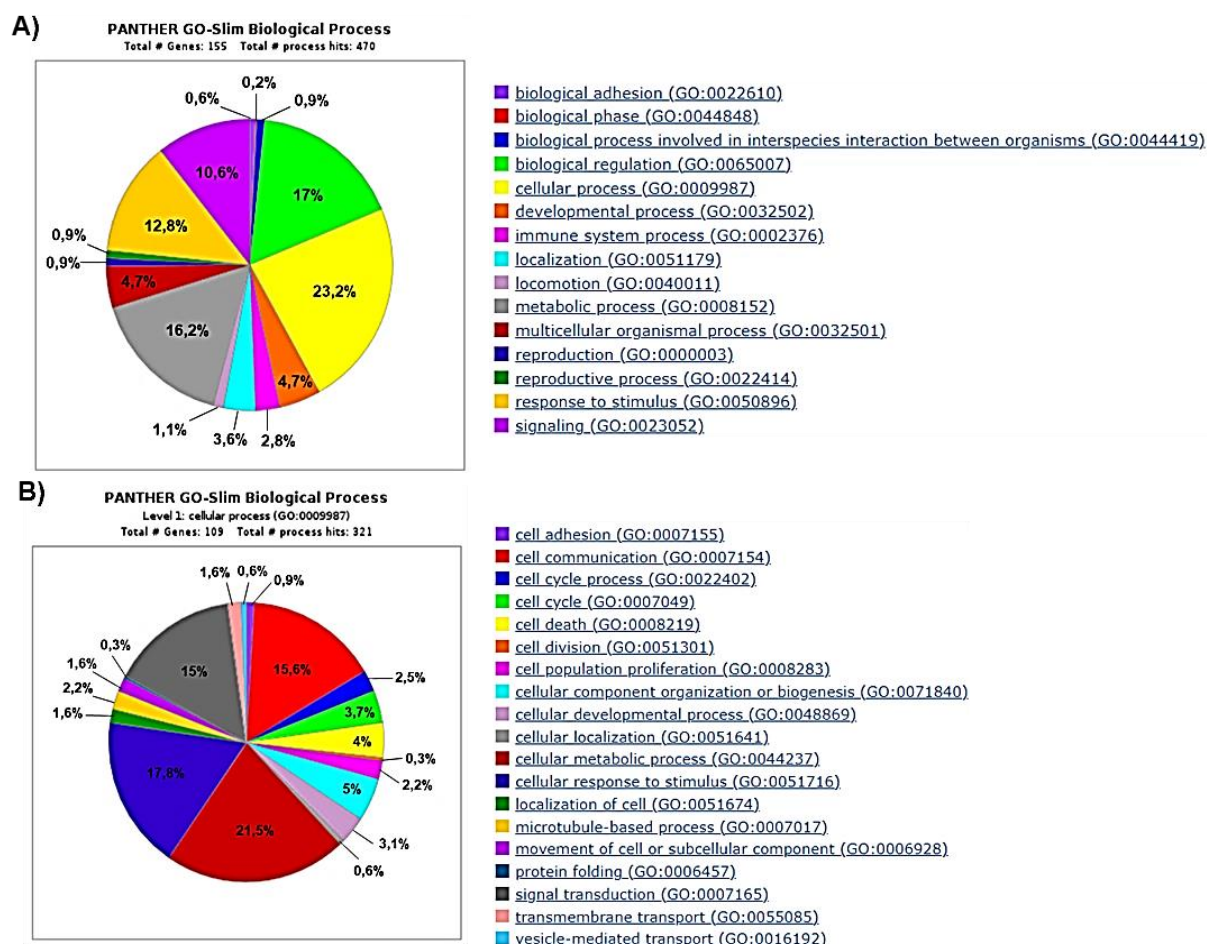
Figura 9. Gráficos PANTHER dos processos biológicos dos genes mais expressos relacionados à bioatividade do mancozebe. A) Gráfico geral dos processos biológicos. B) Gráfico dos processos celulares. Os genes foram obtidos do banco de dados da EPA (*Environmental Protection Agency*) e selecionados a partir dos valores LOGAC50 (>1.00).



Em relação aos processos biológicos identificados no Grupo B (genes menos expressos), também observamos que os processos celulares (23,2%), regulação biológica (17%), processos metabólicos (16,2%), resposta ao estímulo (12,8%) e sinalização (10,6%), se configuram como os principais processos biológicos em que os genes participam (Figura 10A). Entre os processos celulares, destacam-se os processos metabólicos celulares (21,5%), resposta celular ao estímulo (17,8%), comunicação celular (15,6%) e transdução de sinal (15%) (Figura 10B). Aqui, o PDK4, ACLY, FASN, ACOX1, APOA5, INSR e a SDHB encontram-se representados entre os genes envolvidos nos processos metabólicos celulares e estão relacionados ao metabolismo da glicose e de ácidos graxos. Ainda, genes importantes do metabolismo de xenobióticos, como o PXR e as enzimas do complexo P450, além de enzimas do sistema antioxidativo da célula, como a CAT, estão presentes.

A presença do PXR (e de outros genes não considerados neste estudo) em ambos os Grupos A e B ocorre em decorrência do banco de dados sumarizar os dados de diferentes estudos que utilizam diferentes modelos biológicos, os quais podem apresentar respostas metabólicas e níveis de expressão variáveis ao agrotóxico. Ao considerar os genes citados, é possível inferir uma provável modulação do metabolismo energético pelo MCZB, principalmente quando comparamos com os resultados do Grupo A. Por exemplo, a inibição do ACLY e da FASN, duas enzimas importantes na síntese de ácidos graxos, poderia estar relacionada com a limitação da via lipogênica.

Figura 10. Gráficos PANTHER dos processos biológicos dos genes menos expressos relacionados à bioatividade do mancozebe. A) Gráfico geral dos processos biológicos. B) Gráfico dos processos celulares. Os genes foram obtidos do banco de dados da EPA (*Environmental Protection Agency*) e selecionados a partir dos valores LOGAC50 (<1.00).



Cerca de 20 genes não foram incluídos em nenhum dos grupos A e B, formando um terceiro grupo (Grupo C). Estes genes, portanto, consistiriam naqueles que não tiveram sua expressão significativamente alterada pelo MCZB (Tabela 4), ou seja, não foram inibidos, nem ativados pelo agrotóxico. Ao analisar esse grupo no PANTHER, mais uma vez os processos celulares (20,3%), regulação biológica (17,4%) e processos metabólicos (17,4%) mostraram-se como os principais processos biológicos relacionados aos genes analisados (Figura 11A). Entre os processos celulares, os genes estão relacionados principalmente aos processos metabólicos celulares (19,2%) (Figura 11B). Aqui, mais uma vez o PXR se faz presente, mostrando que esse receptor nuclear possui respostas e níveis de expressão variáveis dependendo do modelo de estudo utilizado. Sua atividade em nosso modelo funcional hepático, portanto, pode ser levada em consideração. Além disso, o LXR α , outro

receptor nuclear importante no desenvolvimento da esteatose e que é responsável por regular enzimas importantes no metabolismo de ácidos graxos, como a FASN, também está presente neste grupo.

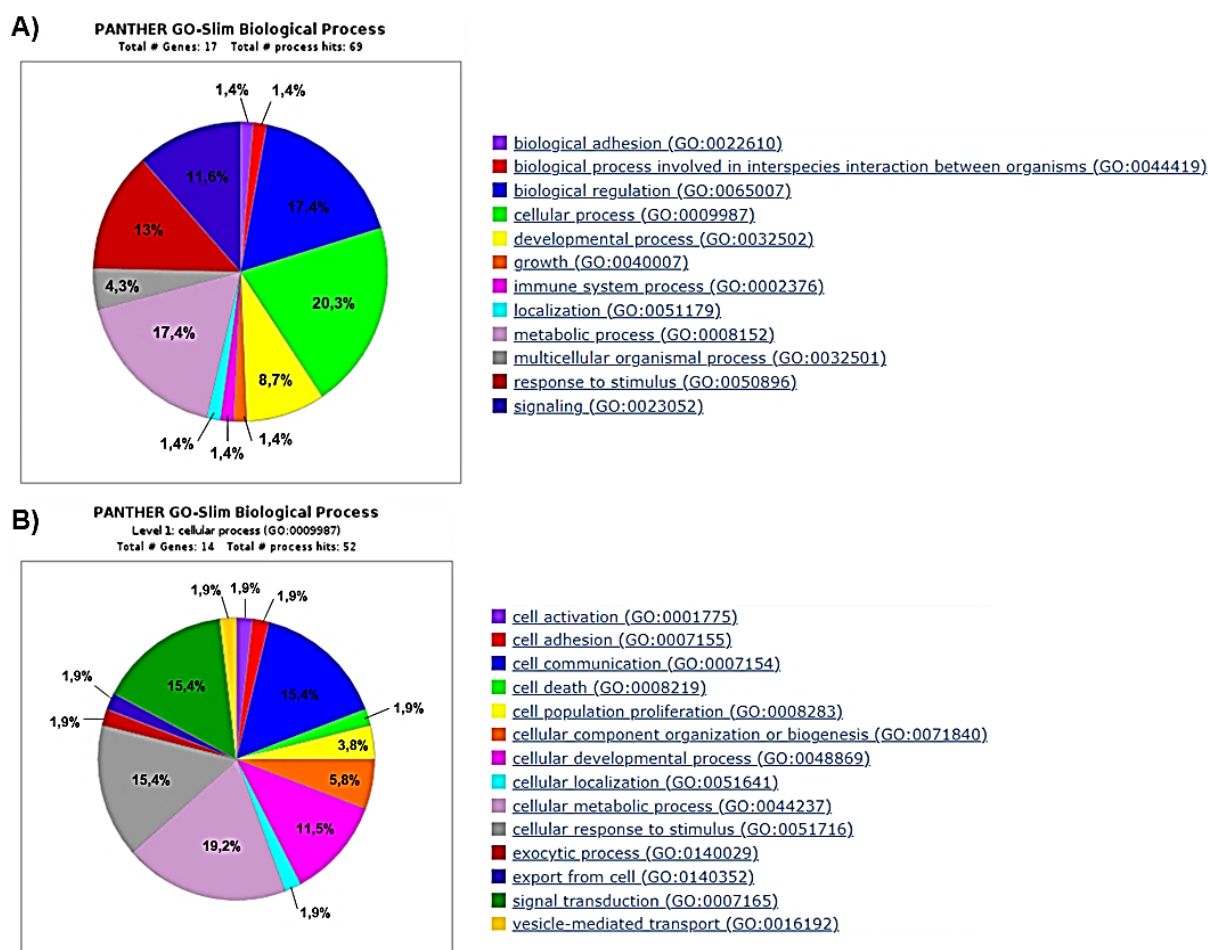
Em síntese, as análises dos genes selecionados do banco de dados da EPA (*Environmental Protection Agency*) demonstraram que a maioria dos genes possivelmente afetados pelo MCZB estão relacionados aos processos celulares (GO: 0009987), principalmente nos processos metabólicos celulares (GO: 0044237). Os genes PPAR γ e FXR, importantes na regulação do metabolismo energético e do metabolismo de ácidos graxos da célula, apresentam sua expressão aumentada. Por outro lado, genes envolvidos na via lipogênica como o ACLY e FASN apresentaram sua expressão diminuída. Ainda, o LXR α , um receptor nuclear expresso no fígado e importante para a homeostase do metabolismo de ácidos graxos, não apresentou sua expressão alterada pelo agrotóxico. Esses achados reforçam que o agrotóxico MCZB altere de maneira importante o metabolismo energético hepático. Desse modo, em um primeiro momento, esses genes poderiam ser elencados para nortear estudos futuros a respeito da ação do MCZB no metabolismo de ácidos graxos em nosso modelo celular, os quais objetivariam a avaliação da expressão destes, assim como de genes relacionados.

Tabela 5 - Genes que não apresentaram seus níveis de expressão significativamente alterados pelo mancozebe. Os genes foram obtidos do banco de dados da EPA (*Environmental Protection Agency*) e selecionados a partir dos valores LOGAC50 (~ 1.00 / $\neq 1.00$).

SÍMBOLO	NOME
FOS	Homólogo do oncogene viral do osteossarcoma murino FBJ
CREB3	Proteína 3 de ligação ao elemento responsivo ao cAMP
NR1I2	Receptor nuclear subfamília 1, grupo I, membro 2
Cyp3a23/3a1	Citocromo P450, família 3, subfamília a, polipeptídeo 23/polipeptídeo 1
CSNK1A1	Caseína quinase 1, alfa 1
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
MMP3	Matriz metalopeptidase 3 (estromelina 1, progelatinase)
PDE5A	Fosfodiesterase 5A, cGMP-específico
PPM1A	Proteína fosfatase, dependente de Mg ²⁺ /Mn ²⁺ , 1A
SGK1	Quinase 1 regulada por soro/glicocorticoide
SYK	Tirosina quinase de baço
PTGS2	Prostaglandina-endoperoxídeo sintase 2 (prostaglandina G/H sintase e ciclooxigenase)
Bdkrb2	Receptor de bradicinina, beta 2

HTR2A	Receptor 2A de 5-hidroxitriptamina (serotonina), acoplado à proteína G
Grin1	Receptor de glutamato, ionotrópico, N-metil D-aspartato 1
AR	Receptor de andrógeno
THRA	Receptor do hormônio tireoidiano, alfa
NR1H3	Receptor nuclear subfamília 1, grupo H, membro 3
CYP3A4	Citocromo P450, família 3, subfamília A, polipeptídeo 4
ESRRA	Receptor alfa relacionado ao estrogênio

Figura 11. Gráficos PANTHER dos processos biológicos dos genes que não apresentaram seus níveis de expressão significativamente alterados pelo mancozebe. A) Gráfico geral dos processos biológicos. B) Gráfico dos processos celulares. Os genes foram obtidos do banco de dados da EPA (*Environmental Protection Agency*) e selecionados a partir dos valores LOGAC50 (~ 1.00 / $\neq 1.00$).

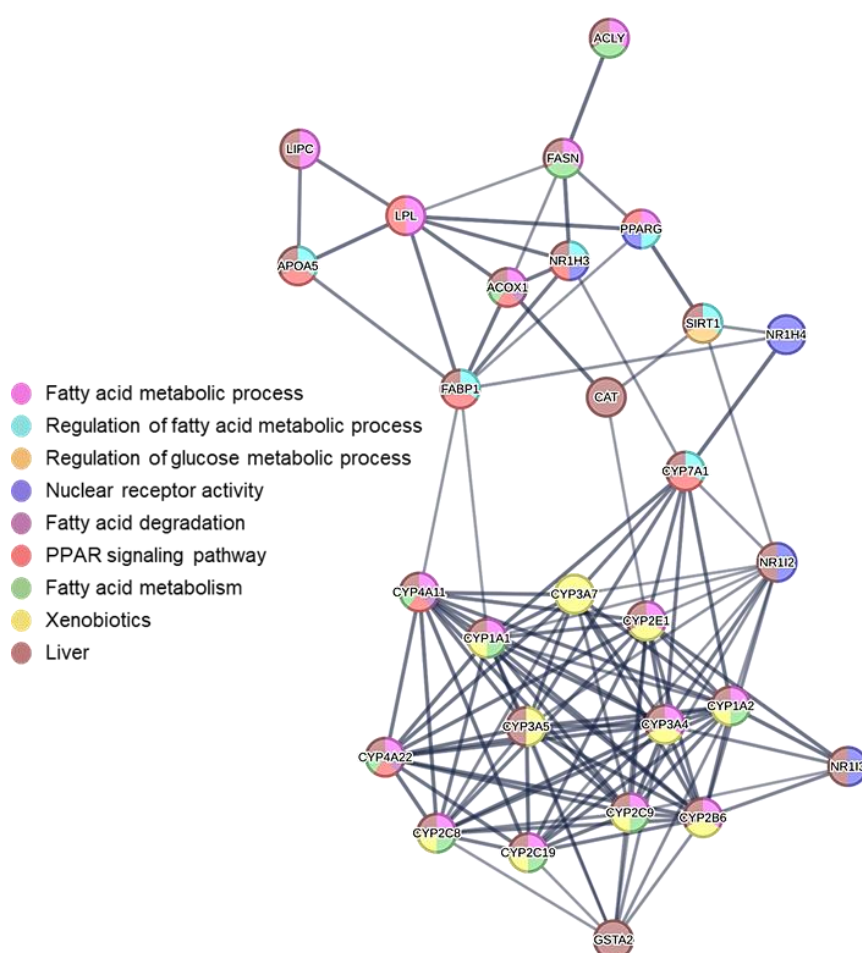


4.6.2 STRING: vias de sinalização pela análise de redes de interações

Na sequência, genes associados ao metabolismo energético, ao metabolismo de ácidos graxos e ao metabolismo de xenobióticos foram selecionados dos 3 grupos (A, B e C) para verificar possíveis redes de interações entre seus produtos gênicos. A análise no STRING foi executada utilizando score de alta confiabilidade ($\leq 0,700$). O

STRING é um banco de dados integrado que permite ao seu usuário verificar redes de interações entre proteínas com base em informações previamente curadas e disponíveis online. A partir dessa ferramenta, é possível entender as funções e processos moleculares em que as proteínas estão envolvidas, além de visualizar as vias de sinalização as quais elas podem estar inseridas e com quais proteínas elas interagem, por exemplo (SZKLARCZYK et al., 2023). A partir dessa análise, foi possível visualizar as interações entre genes dos 3 grupos. Os resultados são apresentados na Figura 12.

Figura 12. Redes de interação entre os genes selecionados dos grupos A, B e C. Foram selecionados genes relacionados ao metabolismo energético, de ácidos graxos e de xenobióticos de cada um dos grupos para visualizar suas interações e vias de sinalização. Cada cor representa um processo biológico, atividade molecular, via de sinalização ou tecido no qual os genes em questão estão relacionados. A análise foi realizada pelo algoritmo STRING utilizando score de alta confiabilidade (≥ 700).



Os genes selecionados mostraram forte interação entre si. Foi possível observar dois principais agrupamentos, onde o primeiro inclui genes principalmente envolvidos na via de sinalização do PPAR e o segundo inclui genes da via de xenobióticos. Ambos os grupos parecem estar conectados pelo FXR (NR1H4). O PPAR γ (PPARG) mostrou interagir com proteínas envolvidas em processos metabólicos de ácidos graxos, como a FASN. Enquanto o PXR (NR1I2) mostrou interagir principalmente com proteínas do complexo citocromo P450, reforçando seu papel no metabolismo de xenobióticos. Por outro lado, o LXR α (NR1H3), assim como o PPAR γ , também mostrou interação com a FASN, porém de maneira mais forte, visto que a intercessão entre as duas proteínas se apresenta mais evidente. Em conjunto, esses resultados também reforçam a atuação do MCZB no metabolismo energético, especialmente no metabolismo de ácidos graxos, onde o agrotóxico parece causar um desbalanço entre os processos metabólicos.

5 DISCUSSÃO

Diferentes agrotóxicos já foram relatados pela sua capacidade em induzir o acúmulo de TGs no fígado. Os inseticidas no geral são capazes de perturbar a homeostase do metabolismo lipídico e de carboidratos ao afetar a atividade das proteínas envolvidas nesses processos, incluindo os receptores nucleares e fatores de transcrição (YANG; PARK, 2018). Esses efeitos não se limitam apenas a essa categoria de agrotóxico, tanto os herbicidas, quanto os fungicidas também se mostram como importantes agentes desreguladores do metabolismo hepático (TAYEB et al., 2013; LUCKERT et al., 2018; KNEBEL et al., 2019; LIAN et al., 2022). O MCZB, nosso objeto de estudo, é um fungicida de conhecida hepatotoxicidade (ZHANG et al., 2022). Porém, os mecanismos por trás da atuação desse agrotóxico ainda são pouco compreendidos. Por este motivo, objetivamos avaliar os efeitos desse fungicida no metabolismo energético em dois modelos de estudos distintos.

Em nosso estudo, o MCZB induziu o acúmulo de TGs intracelulares em nosso modelo funcional hepático nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M, enquanto não mostrou influência nos níveis de glicose. Nossos resultados indicam que esse agrotóxico é capaz de perturbar o metabolismo de lipídeos hepático e pode predispor ao quadro de esteatose no fígado. Pirozzi et al. (2016), utilizando o MCZB em um modelo celular da DHGNA, também demonstraram que os hepatócitos acumularam mais lipídeos intracelulares entre concentrações que variaram de 0,1 ppm a 100 ppm do agrotóxico. Sendo assim, ao levar os resultados de nossos estudos em consideração, a exposição ao fungicida não só poderia ser um fator desencadeador da esteatose, como também poderia agravá-la.

Para entender os processos biológicos por trás do acúmulo de TGs observado, os níveis da β -oxidação foram mensurados em nosso modelo celular. A β -oxidação é um processo realizado no interior das mitocôndrias e nos peroxissomos, onde os AGs são utilizados para a produção de acetil-CoA (REDDY; HASHIMOTO, 2003; HOUTEN et al., 2016). Portanto, a inibição desse processo poderia estar relacionada à elevação dos níveis de AGs intracelulares. Nossos resultados não evidenciaram a inibição da β -oxidação nas células sob o efeito do MCZB. Na verdade, constatou-se o seu aumento nas células tratadas com 10 μ M do agrotóxico, enquanto as demais concentrações apresentaram níveis semelhantes ao controle. Esses achados

sugerem que outras vias metabólicas poderiam estar envolvidas no acúmulo de TGs observados.

Os receptores nucleares são fatores de transcrição envolvidos na ativação de vias metabólicas em resposta a diferentes agentes, dentre eles os agrotóxicos. Alguns desses receptores nucleares estão intimamente envolvidos no metabolismo de xenobióticos e no desenvolvimento da DHGNA (CAVE et al., 2016). O fungicida ciproconazol, por exemplo, possivelmente induz a esteatose em células hepáticas humanas *in vitro* através da ativação do receptor nuclear PXR (LUCKERT et al., 2018). Esse mecanismo também foi observado em outros fungicidas, como o tebuconazol e o propiconazol (KNEBEL et al., 2019). Além de ativar o metabolismo de xenobióticos como resposta a agentes tóxicos, o PXR também está envolvido na regulação do metabolismo lipídico.

Considerando nossos resultados, a ativação do PXR, inicialmente, poderia explicar a elevação dos níveis de TGs promovida pelo MCZB observada, visto que sua ativação pode induzir a maior absorção de AGs pelas células hepáticas através da elevação dos níveis da translocase CD36 (BAY; EL-MASRI, 2022). Porém, ela não explicaria a manutenção dos níveis da β -oxidação apontada em nosso estudo, pois sua ativação também está relacionada à inibição desta via (BITTER et al., 2015; BAY; EL-MASRI, 2022). Dessa forma, é sensato considerar a participação de outras vias de sinalização que poderiam estar contornando a inibição da β -oxidação pelo PXR, possivelmente como uma tentativa de reverter a esteatose. Essas vias poderiam, por exemplo, incluir a ativação paralela de outros receptores nucleares.

As análises bioinformáticas foram realizadas com o objetivo de nortear acerca dos possíveis processos metabólicos que poderiam estar ocorrendo em nosso modelo celular quanto a exposição ao MCZB. As análises do PANTHER dos genes selecionados do banco de dados da EPA mostraram que os genes estavam majoritariamente envolvidos em processos celulares (GO: 0009987), principalmente nos processos metabólicos celulares (GO: 0044237), onde apresentaram-se genes chaves no processo da esteatose como o LXR α , FASN, ACLY, PPAR γ , FXR, além de genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos. Além disso, a análise de redes de interação (STRING) evidenciou interações putativas entre seus produtos gênicos, indicando que o agrotóxico possivelmente teria influência sobre eles. Esses achados sugerem que o MCZB exerça efeitos sobre a bioatividade desses genes e cause um

desbalanço no metabolismo energético celular. Com base nisso, a hipótese a seguir foi construída para nortear futuros estudos com o agrotóxico em nosso modelo celular.

Os receptores nucleares correlatos a DHGNA que apresentam sua expressão aumentada de acordo com o banco de dados foram o PXR, FXR e o PPAR γ . A ativação do PXR está relacionada com a ativação do PPAR γ (XIANG et al., 2018). Apesar de ser mais expresso no tecido adiposo, o PPAR γ também é expresso no fígado e sua ativação nas células hepáticas está ligada ao desenvolvimento da esteatose (CAVE et al., 2016; WANG et al., 2022). Por outro lado, a ativação do FXR está ligada a diminuição da via lipogênica, aumento da β -oxidação hepática e atenuação da esteatose. Os genes ACLY e FASN, envolvidos na lipogênese *de novo*, apresentaram sua expressão diminuídas de acordo com o banco de dados, indicando a atenuação da via lipogênica, que pode estar ligado à ação do FXR. Além disso, o FXR também atua regulando o PPAR α , outro fator de transcrição associado à ativação da β -oxidação e na redução do processo de esteatose hepática (CAVE et al., 2016). Ao considerar nossos ensaios *in vitro*, as atividades desses três fatores nucleares poderiam, em um primeiro momento, explicar nossos resultados. Enquanto o PXR e o PPAR γ atuariam induzindo a esteatose nas células, o FXR atuaria de maneira a tentar neutralizar o acúmulo de TGs através da manutenção da β -oxidação.

Apesar das análises bioinformáticas realizadas ajudarem a lançar luz nos processos metabólicos intrínsecos a bioatividade do MCZB nas células hepáticas, é importante considerar que o banco de dados sumariza os dados de expressões gênicas de estudos distintos, os quais utilizam-se de seus próprios modelos e metodologias. Por este motivo, um mesmo gene pode apresentar expressões gênicas diferentes, como foi observado com o PXR. Além disso, nosso modelo celular consiste em duas linhagens celulares hepáticas: hepatócito (HepG2) e célula estrelada hepática (LX-2), as quais podem interagir e levar a ativação de vias ainda não descritas sob a exposição ao MCZB. Sendo assim, futuros ensaios para aferir os níveis de expressão gênica dos receptores nucleares, assim como de genes chaves do metabolismo energético, especialmente àqueles relacionados ao metabolismo de ácidos graxos, poderiam auxiliar na elucidação das vias de sinalização adversas induzidas pelo MCZB nas células hepáticas, sobretudo em nosso modelo celular.

Em relação ao nosso modelo translacional, um resultado semelhante ao encontrado no modelo celular hepático foi observado com 5 dias de exposição ao

MCZB através da dieta. Especificamente na concentração de 5 μ M, os níveis de TGs aumentaram consideravelmente. Esse aumento também foi observado para os níveis de glicose nesta concentração. Em nossos ensaios com 7 dias de exposição, constatamos redução nos níveis de glicose e de TGs nas moscas, principalmente quando comparado aos níveis observados com 5 dias de exposição ao agrotóxico.

Em conjunto, nossos resultados evidenciam que o MCZB é capaz de perturbar o metabolismo energético nas moscas. Saraiva et al. (2021) também constataram que a exposição de *D. melanogaster* machos ao MCZB através da dieta impactava o metabolismo energético das moscas. Os autores demonstraram que o MCZB era capaz de aumentar os níveis de TGs e reduzir os níveis de glicose após 15 dias de exposição às concentrações de 5 e 10 mg/mL do agrotóxico. Vale destacar que as concentrações utilizadas no estudo citado foram muito superiores às utilizadas em nosso estudo. É possível que em concentrações mais baixas, como as que nós utilizamos, as moscas consigam contornar os efeitos pró-esteatóticos do MCZB, como observamos em nosso ensaio com 7 dias. Além disso, nossa linhagem de *D. melanogaster* (Oregon-R) é diferente da linhagem utilizada por esses autores (Harwich). É de conhecimento científico que linhagens diferentes de *D. melanogaster* reagem de forma diferente a agentes tóxicos (SIGRIST-FLORES et al., 2021), portanto, essa característica também pode explicar as diferenças de respostas metabólicas ao MCZB observadas entre nossos estudos.

É importante ressaltar que o MCZB demonstrou ter o potencial de induzir um quadro pró-esteatótico nas nossas moscas após 5 dias de exposição. Uma primeira hipótese para justificar a regressão dos níveis de TGs após 7 dias de exposição poderia ser construída em torno do estresse oxidativo. Sabe-se, por exemplo, que o MCZB possui como alvo proteínas da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (PIROZZI et al., 2016; SARAIVA et al., 2021; ZIECH et al., 2022). O comprometimento da atividade mitocondrial está relacionado com o aumento da produção de EROs, que por sua vez também se relaciona com os níveis das enzimas do sistema antioxidativo (CHEN et al., 2020; RIVES et al., 2020). Visto que a atividade das enzimas do sistema antioxidativo se utilizam de reações que demandam gasto energético (ZHANG et al., 2019), pode-se supor que as reservas energéticas das moscas estejam sendo encaminhadas para a defesa antioxidativa do organismo. Estudos anteriores demonstraram que o MCZB induz o aumento da atividade das enzimas catalase (CAT)

e glutathione-S-transferase (GST), enquanto a superóxido dismutase (SOD) foi inibida nas *D. melanogaster* expostas (SARAIVA et al., 2018; ZIECH et al., 2022). Entretanto, não podemos descartar a possibilidade das moscas não estarem se alimentando corretamente por estarem intoxicadas, o que também demandaria a utilização das reservas energéticas.

Em síntese, neste trabalho demonstramos que o MCZB, o terceiro ingrediente ativo mais comercializado no Brasil atualmente, pode ser um fator de contribuição para o desenvolvimento de quadros pró-esteatóticos no fígado. Visto a recorrência de casos de contaminação de trabalhadores rurais com os agrotóxicos, nosso estudo acende mais um alerta para os riscos da manipulação dessas substâncias e a importância da adoção de medidas preventivas, como o uso correto dos equipamentos de proteção individual (EPIs), por exemplo. Ainda, a *Drosophila melanogaster* mostrou-se um modelo animal alternativo com potencial para estudos translacionais que visam os efeitos de agrotóxicos no metabolismo energético e sua relação com as doenças hepáticas. Sendo assim, a *D. melanogaster* torna-se uma ferramenta poderosa a ser explorada nesta linha de pesquisa.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

1. O MCZB mostrou ter potencial em desregular o metabolismo energético e induzir a quadros pró-esteatóticos em ambos os modelos utilizados nesse estudo.
2. No modelo celular, a inibição da β -oxidação não parece ser o mecanismo pelo qual o MCZB induz a esteatose nas células.
3. Com base nos achados obtidos a partir das análises dos genes selecionados do banco de dados, uma hipótese pôde ser construída para explicar nossos resultados *in vitro*: a atuação dos receptores nucleares PXR e PPAR γ poderia estar relacionada ao acúmulo de TGs intracelulares, enquanto o FXR promoveria a manutenção dos níveis da β -oxidação a fim de atenuar o processo de esteatose.
4. Duas hipóteses podem explicar a redução dos níveis de TGs e glicose após 7 dias de exposição ao MCZB em nossas *D. melanogaster* (Oregon-R): (1) maior demanda energética para as reações de defesa pelo sistema antioxidativo contra a maior produção de EROs; (2) As moscas não estão se alimentando corretamente devido a intoxicação pelo MCZB.

REFERÊNCIAS

ABDU-ALLAH, G. A. M. et al. Dietary antioxidants impact DDT resistance in *Drosophila melanogaster*. **PLOS ONE**, v. 15, n. 8, p. e0237986, 1 ago. 2020.

ANDROUTSOPOULOS, V. P. et al. A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. **Toxicology**, v. 307, p. 89–94, 10 maio 2013.

ASRANI, S. K. et al. Burden of liver diseases in the world. **Journal of hepatology**, v. 70, n. 1, p. 151–171, 1 jan. 2019.

BARRIOS-MAYA, M.-A.; RUIZ-RAMÍREZ, A.; EL-HAFIDI, M. Endogenous liver protections against lipotoxicity and oxidative stress to avoid the progression of non-alcoholic fatty liver to more serious disease. **Current Molecular Medicine**, v. 22, n. 5, p. 401–420, 15 ago. 2021.

BAY, C.; EL-MASRI, H. A. A biologically based model to quantitatively assess the role of the nuclear receptors liver X (LXR), and pregnane X (PXR) on chemically induced hepatic steatosis. **Toxicology Letters**, v. 359, p. 46–54, 15 abr. 2022.

BERNIERI, T. et al. Occupational exposure to pesticides and thyroid function in Brazilian soybean farmers. **Chemosphere**, v. 218, p. 425–429, 1 mar. 2019.

BITTER, A. et al. Pregnane X receptor activation and silencing promote steatosis of human hepatic cells by distinct lipogenic mechanisms. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 11, p. 2089–2103, 1 nov. 2015.

BRAGA, A. R. C. et al. Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food** **2020 1:6**, v. 1, n. 6, p. 312–314, 17 jun. 2020.

BURALLI, R. J. et al. Occupational exposure to pesticides and health symptoms among family farmers in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 54, p. 133–133, 12 dez. 2020.

BUZZETTI, E.; PINZANI, M.; TSOCHATZIS, E. A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Metabolism: clinical and experimental**, v. 65, n. 8, p. 1038–1048, 1 ago. 2016.

CAMPOS, É. et al. Exposure to pesticides and mental disorders in a rural population of Southern Brazil. **NeuroToxicology**, v. 56, p. 7–16, 1 set. 2016.

CAPITÃO, A. et al. Obesogens in the aquatic environment: an evolutionary and toxicological perspective. **Environment International**, v. 106, p. 153–169, 1 set. 2017.

CARVALHO, F. P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**, v. 6, n. 2, p. 48–60, 1 maio 2017.

CAVE, M. C. et al. Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 9, p. 1083–1099, 1 set. 2016.

CHEN, L. et al. Regulation of glucose and lipid metabolism in health and disease. **Science China Life Sciences**, v. 62, n. 11, p. 1420–1458, 31 out. 2019.

CHEN, Z. et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 152, p. 116–141, 20 maio 2020.

CONTRERAS, E. G.; KLÄMBT, C. The Drosophila blood-brain barrier emerges as a model for understanding human brain diseases. **Neurobiology of disease**, v. 180, 1 maio 2023.

COSTA-SILVA, D. G. 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, v. 25, n. 16, p. 15529–15540, 1 jun. 2018.

COTRIM, H. P. et al. Nonalcoholic fatty liver disease in Brazil. Clinical and histological profile. **Annals of Hepatology**, v. 10, n. 1, p. 33–37, 1 jan. 2011.

DALL'AGNOL, J. C. et al. Systemic effects of the pesticide mancozeb – A literature review. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 11, p. 4113–4120, 2021.

DE OLIVEIRA DA SILVA, B. et al. Altered global microRNA expression in hepatic stellate cells LX-2 by angiotensin-(1–7) and miRNA-1914-5p identification as regulator of pro-fibrogenic elements and lipid metabolism. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 98, p. 137–155, 1 maio 2018.

DENECKE, S. et al. Characterization of a novel pesticide transporter and P-glycoprotein orthologues in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 289, n. 1975, 2022.

DJEKKOUN, N. et al. Chronic oral exposure to pesticides and their consequences on metabolic regulation: role of the microbiota. **European Journal of Nutrition**, v. 60, n. 8, p. 4131–4149, 10 abr. 2021.

DOW, J. A. T.; SIMONS, M.; ROMERO, M. F. *Drosophila melanogaster*: a simple genetic model of kidney structure, function and disease. **Nature Reviews Nephrology** **2022 18:7**, v. 18, n. 7, p. 417–434, 11 abr. 2022.

EU Pesticides Database. **European Commision**. Disponível em: <<https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/active-substances/details/277>>. Acesso em: 19 jan 2023.

FOERSTER, F. et al. NAFLD-driven HCC: Safety and efficacy of current and emerging treatment options. **Journal of Hepatology**, v. 76, n. 2, p. 446–457, 1 fev. 2022.

FRIEDRICH, K. et al. AGROTÓXICOS: mais venenos em tempos de retrocessos de direitos. **OKARA: Geografia em debate**, v. 12, n. 2, p. 326, 12 ago. 2018.

FROMENTY, B.; RODEN, M. Mitochondrial alterations in fatty liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 78, n. 2, p. 415–429, 1 fev. 2023.

GARRIDO, D. et al. Fatty Acid Synthase Cooperates with Glyoxalase 1 to Protect against Sugar Toxicity. **PLOS Genetics**, v. 11, n. 2, p. e1004995, 2015.

GENG, Y. et al. How does hepatic lipid accumulation lead to lipotoxicity in non-alcoholic fatty liver disease? **Hepatology International** **2021 15:1**, v. 15, n. 1, p. 21–35, 6 fev. 2021.

GHOSHAL, U. C.; GOEL, A.; QUIGLEY, E. M. M. Gut microbiota abnormalities, small intestinal bacterial overgrowth, and non-alcoholic fatty liver disease: An emerging paradigm. **Indian Journal of Gastroenterology**, v. 39, n. 1, p. 9–21, 14 abr. 2020.

GÖK, E.; DEVECI, E. Histopathological, immunohistochemical and biochemical alterations in liver tissue after fungicide-mancozeb exposures in Wistar albino rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 37, n. 4, 27 jun. 2022.

GUPTA, H. P. et al. Adult exposure of atrazine alone or in combination with carbohydrate diet hastens the onset/progression of type 2 diabetes in *Drosophila*. **Life sciences**, v. 316, 1 mar. 2023.

GUTIERREZ, E. et al. Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. **Nature**, v. 445, n. 7125, p. 275–280, 29 nov. 2006.

HE, B. et al. Pesticides-induced energy metabolic disorders. **Science of The Total Environment**, v. 729, p. 139033, 10 ago. 2020.

HEIER, C. et al. The Drosophila model to interrogate triacylglycerol biology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1866, n. 6, p. 158924, 1 jun. 2021.

HOUTEN, S. M. et al. The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. **Annual Review of Physiology**, v. 78, p. 23–44, 10 fev. 2016.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: <http://ibama.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=594&Itemid=5>. Acesso em: 27 maio 2022.

ISAACS, S. Nonalcoholic fatty liver disease. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 52, n. 1, p. 149–164, 1 mar. 2023.

HUANG, K. et al. RiboTag translomic profiling of Drosophila oenocytes under aging and induced oxidative stress. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 1–19, 16 jan. 2019.

JELLALI, R. et al. Investigation of steatosis profiles induced by pesticides using liver organ-on-chip model and omics analysis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 152, p. 112155, 1 jun. 2021.

JIANG, H. et al. Drosophila as a toolkit to tackle cancer and its metabolism. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 4463, 25 ago. 2022.

JIN, C. et al. Insights into a possible mechanism underlying the connection of carbendazim-induced lipid metabolism disorder and gut microbiota dysbiosis in mice. **Toxicological Sciences**, v. 166, n. 2, p. 382–393, 1 dez. 2018.

JORNAYVAZ, R. et al. The role of gut-liver axis in gut microbiome dysbiosis associated NAFLD and NAFLD-HCC. **Biomedicines**, v. 10, n. 3, p. 524, 23 fev. 2022.

KARAMI-MOHAJERI, S.; ABDOLLAHI, M. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: A systematic review. **Human and Experimental Toxicology**, v. 30, n. 9, p. 1119–1140, 11 set. 2011.

KIM, K. H.; KABIR, E.; JAHAN, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of The Total Environment**, v. 575, p. 525–535, 1 jan. 2017.

KNEBEL, C. et al. Pregnane X receptor mediates steatotic effects of propiconazole and tebuconazole in human liver cell lines. **Archives of Toxicology**, v. 93, n. 5, p. 1311–1322, 1 maio 2019.

LASCH, A. et al. More than additive effects on liver triglyceride accumulation by combinations of steatotic and non-steatotic pesticides in HepaRG cells. **Archives of Toxicology**, v. 95, n. 4, p. 1397–1411, 1 abr. 2021.

LAZARUS, J. V. et al. NAFLD - sounding the alarm on a silent epidemic. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 17, n. 7, p. 377–379, 1 jul. 2020.

LEÃO, M. B. et al. Toxicological evaluation of the herbicide Palace® in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 82, n. 22, p. 1172–1185, 17 nov. 2019.

LEQUOY, M. et al. Hepatocellular carcinoma in the context of non-alcoholic steatohepatitis (NASH): Recent advances in the pathogenic mechanisms. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 41, n. 1, 1 mar. 2020.

LI, M. et al. Lipid metabolic disorder induced by pyrethroids in nonalcoholic fatty liver disease of *Xenopus laevis*. **Environmental Science and Technology**, v. 56, n. 12, p. 8463–8474, 21 jun. 2022.

LIAN, C. Y. et al. Trehalose prevents glyphosate-induced hepatic steatosis in roosters by activating the Nrf2 pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. **Veterinary Research Communications**, p. 1–11, 20 out. 2022.

LICHTENSTEIN, D. et al. An adverse outcome pathway-based approach to assess steatotic mixture effects of hepatotoxic pesticides in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 139, p. 111283, 1 maio 2020.

LICHTENSTEIN, D. et al. An eight-compound mixture but not corresponding concentrations of individual chemicals induces triglyceride accumulation in human liver cells. **Toxicology**, v. 459, p. 152857, 1 jul. 2021.

LOVISON SASSO, E. et al. Occupational exposure of rural workers to pesticides in a vegetable-producing region in Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 20, p. 25758–25769, 1 maio 2021.

LUCKERT, C. et al. Adverse outcome pathway-driven analysis of liver steatosis in vitro: A case study with cyproconazole. **Chemical Research in Toxicology**, v. 31, n. 8, p. 784–798, 20 ago. 2018.

MAKRI, E.; GOULAS, A.; POLYZOS, S. A. Epidemiology, pathogenesis, diagnosis and emerging treatment of nonalcoholic fatty liver disease. **Archives of medical research**, v. 52, n. 1, p. 25–37, 1 jan. 2021.

MANDI, M. et al. Potential risk of organophosphate exposure in male reproductive system of a non-target insect model *Drosophila melanogaster*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 74, p. 103308, 1 fev. 2020.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 11 jun. 2021.

MASHEK, D. G. Hepatic fatty acid trafficking: Multiple forks in the road. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 6, p. 697–710, 1 nov. 2013

MATTILA, J.; HIETAKANGAS, V. Regulation of carbohydrate energy metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 207, n. 4, p. 1231–1253, 1 dez. 2017.

MCGURK, L.; BERSON, A.; BONINI, N. M. *Drosophila* as an *in vivo* model for human neurodegenerative disease. **Genetics**, v. 201, n. 2, p. 377–402, 1 out. 2015.

MEHDI, S. H.; QAMAR, A. Paraquat-induced ultrastructural changes and DNA damage in the nervous system is mediated via oxidative-stress-induced cytotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **Toxicological Sciences**, v. 134, n. 2, p. 355–365, 1 ago. 2013.

MENDEZ-SANCHEZ, N. et al. The Latin American Association for the Study of the Liver (ALEH) position statement on the redefinition of fatty liver disease. **The lancet. Gastroenterology & hepatology**, v. 6, n. 1, p. 65–72, 1 jan. 2021.

MESHRIFF, W. S.; EL HUSSEINY, I. M.; ELBREENSE, H. *Drosophila melanogaster* as a low-cost and valuable model for studying type 2 diabetes. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology**, v. 337, n. 5, p. 457–466, 1 jun. 2022.

MOLICA, L. R.; BARRETO, I. I.; MORAES, K. C. M. Phytosanitary and hepatic diseases in Brazil: A public health challenge in Brazil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e15910917835–e15910917835, 23 jul. 2021.

MORAES, K. C. M.; MONTAGNE, J. *Drosophila melanogaster*: A powerful tiny animal model for the study of metabolic hepatic diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 1577, 16 set. 2021.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

MUNNIK, C. et al. *Drosophila melanogaster*: A platform for anticancer drug discovery and personalized therapies. **Frontiers in Genetics**, v. 13, p. 1979, 8 ago. 2022.

MUSSELMAN, L. P.; KÜHNLEIN, R. P. *Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease. **Journal of Experimental Biology**, v. 121, n. Suppl_1, 1 mar. 2018.

NASSIR, F. NAFLD: Mechanisms, treatments, and biomarkers. **Biomolecules**, v. 12, n. 6, p. 824, 13 jun. 2022.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 8th ed. W. H. Freeman, 2021.

OGUNSUYI, O. B. et al. Solanum vegetable-based diets improve impairments in memory, redox imbalance, and altered critical enzyme activities in *Drosophila melanogaster* model of neurodegeneration. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. e13150, 1 mar. 2021.

OH, Y. et al. A glucose-sensing neuron pair regulates insulin and glucagon in *Drosophila*. **Nature**, v. 574, n. 7779, p. 559–564, 23 out. 2019.

PARVY, J. P. et al. *Drosophila melanogaster* acetyl-CoA-carboxylase sustains a fatty acid-dependent remote signal to waterproof the respiratory system. **PLOS Genetics**, v. 8, n. 8, p. e1002925, ago. 2012.

PIERANTONELLI, I.; SVEGLIATI-BARONI, G. Nonalcoholic fatty liver disease: Basic pathogenetic mechanisms in the progression from NAFLD to NASH. **Transplantation**, v. 103, n. 1, p. E1–E13, 1 jan. 2019.

PIROZZI, A. V. A. et al. Mancozeb, a fungicide routinely used in agriculture, worsens nonalcoholic fatty liver disease in the human HepG2 cell model. **Toxicology Letters**, v. 249, p. 1–4, 13 maio 2016.

POUWELS, S. et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss. **BMC Endocrine Disorders**, v. 22, n. 1, p. 1–9, 1 dez. 2022.

QI, L. et al. Glyphosate based-herbicide disrupts energy metabolism and activates inflammatory response through oxidative stress in mice liver. **Chemosphere**, v. 315, 1 fev. 2023.

RADU, F. et al. The link between NAFLD and metabolic syndrome. **Diagnostics (Basel, Switzerland)**, v. 13, n. 4, 7 fev. 2023.

RAJAK, S. et al. Environmental toxicants and NAFLD: A neglected yet significant relationship. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 67, n. 8, p. 3497–3507, 12 ago. 2021.

RAMBOLD, A. S.; COHEN, S.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Fatty acid trafficking in starved cells: Regulation by lipid droplet lipolysis, autophagy, and mitochondrial fusion dynamics. **Developmental Cell**, v. 32, n. 6, p. 678–692, 23 mar. 2015.

RAMOS, L. F. et al. Non-alcoholic fatty liver disease: molecular and cellular interplays of the lipid metabolism in a steatotic liver. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 1, p. 25–40, 2021.

RAVULA, A. R.; YENUGU, S. Effect of a mixture of pyrethroids at doses similar to human exposure through food in the Indian context. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 36, n. 9, p. e23132, 1 set. 2022.

REDDY, J. K.; HASHIMOTO, T. Peroxisomal β -oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor α : An adaptive metabolic system. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 193–230, 28 nov. 2003.

REIMER, K. C. et al. New drugs for NAFLD: lessons from basic models to the clinic. **Hepatology International**, v. 14, n. 1, p. 8–23, 4 dez. 2019.

RIVES, C. et al. Oxidative stress in NAFLD: Role of nutrients and food contaminants. **Biomolecules**, v. 10, n. 12, p. 1702, 21 dez. 2020.

SABER, T. M.; ABO-ELMAATY, A. M. A.; ABDEL-GHANY, H. M. Curcumin mitigates mancozeb-induced hepatotoxicity and genotoxicity in rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 183, p. 109467, 15 nov. 2019.

SANG, H. et al. Association between organochlorine pesticides and nonalcoholic fatty liver disease in the National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2004. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 8 jul. 2022.

SANHUEZA, S. et al. *Lampaya Medicinalis* Phil. decreases lipid-induced triglyceride accumulation and proinflammatory markers in human hepatocytes and fat body of *Drosophila melanogaster*. **International Journal of Obesity**, v. 45, n. 7, p. 1464–1475, 24 abr. 2021.

SARAIVA, M. A. et al. Exposure of *Drosophila melanogaster* to mancozeb induces oxidative damage and modulates Nrf2 and HSP70/83. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

SARAIVA, M. A. et al. Mancozeb impairs mitochondrial and bioenergetic activity in *Drosophila melanogaster*. **Heliyon**, v. 7, n. 1, 1 jan. 2021.

SEPANLOU, S. G. et al. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global

Burden of Disease Study 2017. **The Lancet. Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 3, p. 245, 1 mar. 2020.

SHARMA, A. et al. Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 201, p. 110812, 15 set. 2020.

SHARMA, M. et al. The riddle of nonalcoholic fatty liver disease: Progression from nonalcoholic fatty liver to nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of Clinical and Experimental Hepatology**, v. 5, n. 2, p. 147–158, 1 jun. 2015.

SHIMANO, H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 6, p. 439–452, 1 nov. 2001.

SIGRIST-FLORES, S. C. et al. Variation in resistance to oxidative stress in Oregon-(R)R-flare and Canton-S strains of *Drosophila melanogaster*. **Toxicology Research**, v. 10, n. 4, p. 817–823, 27 ago. 2021.

SMITH, G. I. et al. Insulin resistance drives hepatic de novo lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 3, p. 1453–1460, 2 mar. 2020.

SONG, Q.; ZHANG, X. The role of gut-liver axis in gut microbiome dysbiosis associated NAFLD and NAFLD-HCC. **Biomedicines**, v. 10, n. 3, p. 524, 23 fev. 2022.

SONG, Z.; XIAOLI, A. M.; YANG, F. Regulation and metabolic significance of *de novo* lipogenesis in adipose tissues. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1383, 29 set. 2018.

SORET, P. A. et al. *In vitro* and *in vivo* models of non-alcoholic fatty liver disease: A critical appraisal. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 1, p. 1–18, 1 jan. 2021.

SOUIDI, A.; JAGLA, K. *Drosophila* heart as a model for cardiac development and diseases. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 3078, 8 nov. 2021.

SUN, L. et al. Chronic exposure to paclobutrazol causes hepatic steatosis in male rockfish *Sebastiscus marmoratus* and the mechanism involved. **Aquatic Toxicology**, v. 126, p. 148–153, 15 jan. 2013.

SZKLARCZYK, D. et al. The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D638–D646, 6 jan. 2023.

TASMAN, K.; RANDS, S. A.; HODGE, J. J. L. The power of *Drosophila melanogaster* for modeling neonicotinoid effects on pollinators and identifying novel mechanisms. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 527, 21 abr. 2021.

TAYEB, W. et al. Alteration of lipid status and lipid metabolism, induction of oxidative stress and lipid peroxidation by 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide in rat liver. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 23, n. 6, p. 449–458, jul. 2013.

TAYLOR, R. et al. Myclobutanil-mediated alteration of liver-gut FXR signaling in mice. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 191, n. 2, 17 fev. 2023.

TESSARI, P. et al. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 19, n. 4, p. 291–302, 1 maio 2009.

THOMAS, P. D. et al. PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all. **Protein Science**, v. 31, n. 1, p. 8–22, 1 jan. 2022.

TOPRAK, U. The role of peptide hormones in insect lipid metabolism. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 434, 7 maio 2020.

TOPRAK, U. et al. A journey into the world of insect lipid metabolism. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 2, p. e21682, 1 jun. 2020.

UGUR, B.; CHEN, K.; BELLEN, H. J. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. **Disease Models & Mechanisms**, v. 9, n. 3, p. 235–244, 1 mar. 2016.

WANG, J. X. et al. Tissue-specific accumulation, transformation, and depuration of fipronil in adult crucian carp (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 232, p. 113234, 1 mar. 2022.

WANG, Y. et al. PPARs as metabolic regulators in the liver: Lessons from liver-specific PPAR-null mice. **International Journal of Molecular Sciences** 2020, v. 21, n. 6, p. 2061, 17 mar. 2020.

XIANG, D. et al. Effects of pyrethroid pesticide cis-bifenthrin on lipogenesis in hepatic cell line. **Chemosphere**, v. 201, p. 840–849, 1 jun. 2018.

XIAO, G. et al. Zinc antagonizes iron-regulation of tyrosine hydroxylase activity and dopamine production in *Drosophila melanogaster*. **BMC Biology**, v. 19, n. 1, p. 1–16, 1 dez. 2021.

XU, L. et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. **Gut**, v. 54, n. 1, p. 142–151, jan. 2005.

YAMAGUCHI, K. et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 45, n. 6, p. 1366–1374, 1 jun. 2007.

YAMAGUCHI, M.; YOSHIDA, H. *Drosophila* as a model organism. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1076, p. 1–10, 2018.

YANG, D. et al. Thiamethoxam induces nonalcoholic fatty liver disease in mice via methionine metabolism disturb via nicotinamide N-methyltransferase overexpression. **Chemosphere**, v. 273, p. 129727, 1 jun. 2021.

YANG, J. et al. A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism. **Physiological Genomics**, v. 30, n. 3, p. 223–231, 20 ago. 2007.

YANG, J. S.; PARK, Y. Insecticide exposure and development of nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 39, p. 10132–10138, 3 out. 2018.

YOUNOSSI, Z. M. Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective. **Journal of hepatology**, v. 70, n. 3, p. 531–544, 1 mar. 2019.

ZHANG, L. et al. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. **Redox Biology**, v. 26, p. 101284, 1 set. 2019.

ZHANG, Y. et al. Transcriptomics and metabolomics revealed the molecular mechanism of the toxic effect of mancozeb on liver of mice. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 243, p. 114003, 15 set. 2022.

ZIECH, C. C. et al. Pre-imaginal exposure to mancozeb induces morphological and behavioral deficits and oxidative damage in *Drosophila melanogaster*. **Drug and Chemical Toxicology**, 2022.