



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

FACULDADE DE MEDICINA

Viviane da Silva Martins Lopes Corrêa

**Investigação experimental
sobre o impacto do herbicida atrazina sobre a
interação neuromuscular**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientadora: Profa. Associada Selma Maria Michelin Matheus
Coorientadora: Profa. Associada Ana Angélica H. Fernandes

**Botucatu
2020**

Viviane da Silva Martins Lopes Corrêa

**Investigação experimental
sobre o impacto do herbicida atrazina sobre a
interação neuromuscular**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Cirurgia e Medicina Translacional.

Orientadora: Profa. Associada Selma Maria Michelin Matheus
Coorientadora: Profa. Associada Ana Angélica H. Fernandes

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Correa, Viviane da Silva Martins Lopes.

Investigação experimental sobre o impacto do
herbicida atrazina sobre a interação neuromuscular /
Viviane da Silva Martins Lopes Correa. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Selma Maria Michelin Matheus

Coorientador: Ana Angélica H. Fernandes

Capes: 40102009

1. Herbicidas. 2. Atrazina. 3. Junção neuromuscular.
4. Estresse oxidativo. 5. Vitamina E.

Palavras-chave: Atrazina; Estresse oxidativo; Herbicida;
Junção neuromuscular; Vitamina E.

Dedicatória

Dedico aos meus amados pais, Antonio (em memória) e Adeir, a elaboração desse trabalho e todas as conquistas que obtive em minha vida profissional e acadêmica. Com muito amor e dedicação, não mediram esforços para propiciar oportunidades para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Sempre me ensinaram que o sucesso está na jornada de esforços e não no destino.

Agradecimentos

*Agradeço a **Deus** por oferecer um universo de possibilidades e disponibilizar o brilhante caminho do aprendizado.*

*Aos meus **amados pais**, em especial a **minha mãe** que desde sempre, me incentivou com seu amor, alegria e dedicação total do seu tempo, sinceramente sem ela eu não teria chegado até aqui.*

*Meu **esposo Anderson** pelo apoio, incentivo e companheirismo durante essa etapa. Gratidão por ter proporcionado minha maior riqueza, que são os meus **filhos Gabriel e Guilherme**, que a cada dia me fortalecem com amor e carinho incondicional.*

*Minha família **Martins Lopes**, família **Cardoso** e **demais familiares**, que com muito amor sempre me apoiaram e intercederam por mim. Amo muito cada um de vocês.*

*A minha **orientadora, Professora Dr^a Selma M. M. Matheus**, imensa gratidão pela dedicação, profissionalismo e excelência no ensino e orientação durante toda minha trajetória acadêmica de doutorado.*

*À minha **co-orientadora, Prof^a Dr^a Ana Angélica** pela realização das análises bioquímicas e esclarecimento dos resultados alcançados.*

*Ao professor **Dr^o Antonio Godinho** e ao doutorando **Fabio Anselmo** pelo convite e oportunidade de realização desse trabalho.*

*A minha querida amiga **Juliana Andrioli**, eterna gratidão por doar seu amor, cuidado e dedicar seu tempo nos momentos em que mais precisei.*

*Ao **Fisioterapeuta Dr^o Fabio Maciel**, pela amizade, apoio nos momentos de incerteza e acima de tudo por me fazer acreditar, sempre, que eu seria capaz de vencer.*

*A **equipe Diretiva, Irmãs Apóstolas do Sagrado Coração, Docentes e Funcionários** amigos da **Unisagrado**, que desde o início me apoiaram, se dedicaram e me encorajaram a avançar e conquistar o meu sonho de crescimento profissional. Amo muito cada um de vocês.*

*Aos meus **amigos e pacientes** que confiam em meu trabalho como Fisioterapeuta, incentivam e me motivam a continuar perseverando na busca pelo crescimento profissional.*

Aos amigos Felipe, Ana Paula e Carina pela dedicação e disposição dispensadas nas diversas etapas vividas nesses quatro anos de estudo.

Ao Professor Drº Carlos Roberto Padovani pela orientação e elaboração das análises estatísticas deste trabalho.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica, pelo auxílio técnico e disposição sempre que preciso.

A querida bibliotecária Laudecélia Machado que com muita excelência, paciência e amor me auxiliou nas orientações e correções bibliográficas.

Ao programa de Pós-graduação em Cirurgia e Medicina Translacional, a querida Márcia Fonseca Piagentini Cruz Assistente Administrativa da Pós Graduação, ao Instituto de Biociências, ao CEATOX e a UNIPEX da UNESP de Botucatu.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa pela disponibilidade em estar presente, pelas colaborações e correções fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada.

**“Não importa o que a vida fez de você,
mas o que você faz com o que
a vida fez de você”
(Jean Paul Sartre)**

RESUMO

O herbicida atrazina (AZ) é um dos mais utilizados, e tem promovido várias alterações sobre os sistemas orgânicos do homem e de outros animais. Esta substância tem sido associada ainda a presença de estresse oxidativo, o qual por vezes é revertido pela associação com antioxidantes, como a vitamina E. Há descrições de várias alterações orgânicas entre elas as respiratórias, e o decréscimo da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE). No sistema nervoso periférico a AChE é responsável por hidrolisar a acetilcolina (ACh) liberada do terminal nervoso. Na ausência da AChE, o excesso de ACh pode dessensibilizar os receptores de acetilcolina (nAChR) e ao longo de períodos prolongados alterar a organização pós-sináptica diminuindo a força muscular. Assim, este estudo teve por objetivo analisar o efeito protetor da vitamina E sobre a interação neuromuscular e o estresse oxidativo após uso de AZ no músculo diafragma de ratos. Foram utilizados 52 ratos Wistar, machos (CEUA/IBB protocolo 897/2016), adultos. Os animais receberam por 28 dias via gavagem às seguintes substâncias de acordo com os grupos formados: Grupo C: controle (0,3 ml de óleo de milho); Grupo AZ: tratado com atrazina (100 mg/kg); Grupo AZE: atrazina (100 mg/kg) + vitamina E (200 mg/kg); Grupo E: 200 mg/kg vitamina E. Decorrido o período experimental (28 dias) os animais foram anestesiados, eutanasiados e os músculos diafragmas e os nervos frênicos foram dissecados, removidos e processados seguindo os protocolos: a) análise bioquímica da AChE e de marcadores de estresse oxidativo; b) análise morfológica e morfométrica das fibras musculares (HE) e da quantificação da porcentagem de colágeno (Picrossirius Red); c) análise morfológica e morfométrica do nervo frênico; d) análise morfológica e morfométrica das junções neuromusculares (JNMs) através de microscopia de luz e dos nAChR através da microscopia confocal. Os resultados mostraram que a determinação quantitativa da atividade enzimática da AChE foi maior no grupo controle em relação ao grupo AZ. E os menores valores foram observados no grupo E. Em relação aos marcadores de estresse oxidativo, o grupo AZ apresentou os maiores valores da catalase, do hidróperóxido de lipídeo, e da Capacidade Antioxidante Hidrofílica; e os menores valores da superóxido dismutase. Diminuição no padrão enzimático dessas enzimas foi observado quando houve associação da AZ com vitamina E. Não houve diferenças entre os grupos em relação à glutatona peroxidase, a morfologia e a morfometria do nervo frênico e na porcentagem de colágeno. Já a área e o diâmetro das fibras musculares foram maiores no grupo E. Mas quando houve associação da vitamina E à AZ, houve diminuição desses parâmetros. Já em relação ao diâmetro das JNMs houve aumento no diâmetro máximo quando a vitamina E foi associada a AZ, embora diferenças morfológicas não tenham sido observadas através da microscopia confocal. A partir desses resultados podemos concluir que a AZ, na dose utilizada, promoveu estresse oxidativo nas fibras musculares do diafragma de ratos. O estresse oxidativo gerado ou mesmo a ação direta da AZ não foi suficiente para promover danos morfológicos sobre a interação neuromuscular estudada (fibras musculares, nervo e junções neuromusculares). Já o estresse oxidativo gerado pela administração subcrônica da AZ foi revertido pelo uso da vitamina E.

Palavras-chave: Herbicida. Atrazina. Junção Neuromuscular. Vitamina E. Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

The herbicide atrazine (AZ) is one of the most used and has promoted several changes on the organic systems of man and other animals. This substance has also been associated with the presence of oxidative stress, which is sometimes reversed by the association with antioxidants, such as vitamin E. There are some descriptions about organic alterations as respiratory and a decrease in the enzymatic activity of acetylcholinesterase (AChE). In the peripheral nervous system, AChE is responsible for hydrolyzing acetylcholine (ACh) released from the nervous terminal. In the absence of AChE, excess ACh can desensitize acetylcholine receptors (nAChR) and, over prolonged periods, alter the postsynaptic organization, decreasing muscle strength. Thus, this study aimed to analyze the protective effect of vitamin E on neuromuscular interaction and oxidative stress after use of AZ in the diaphragm muscle of rats. 52 male Wistar rats (CEUA / IBB protocol 897/2016), adults were used. The animals received for 28 days via gavage the following substances according to the groups formed: Group C: control (0.3 ml of corn oil); AZ group: treated with atrazine (100 mg / kg); AZE Group: atrazine (100 mg / kg) + vitamin E (200 mg / kg); Group E: 200 mg / kg vitamin E. After the experimental period (28 days) the animals were anesthetized, euthanized and the diaphragm muscles and phrenic nerves were dissected, removed and processed following the protocols: a) biochemical analysis of AChE and oxidative stress markers; b) morphological and morphometric analysis of muscle fibers (HE) and quantification of the percentage of collagen (Picrossirius Red); c) morphological and morphometric analysis of the phrenic nerve; d) morphological and morphometric analysis of neuromuscular junctions (NMEs) using light microscopy and nAChR using confocal microscopy. The results showed that the quantitative determination of the enzymatic activity of AChE was greater in the control group compared to the AZ group. There was a significant decrease in group E. Regarding oxidative stress markers, group AZ showed the highest values of catalase, lipid hydroperoxide, and hydrophilic antioxidant capacity; and the lowest values of superoxide dismutase. Decrease in these enzymatic profile was observed after the association between AZ with Vitamin E. There were no differences between groups in relation to glutathione peroxidase, morphology and morphometry of the phrenic nerve and in the percentage of collagen. Muscle fiber area and diameter were greater in group E. But when vitamin E was associated with AZ, these parameters decreased. Regarding the diameter of the NMJs, there was an increase in the maximum diameter when vitamin E was associated with AZ, although morphological differences were not observed through confocal microscopy. From these results we can conclude that AZ, in the dose used, promoted oxidative stress in the muscle fibers of the rat diaphragm. The oxidative stress generated or even the direct action of AZ was not enough to promote morphological damage on the studied neuromuscular interaction (muscle fibers, nerve and neuromuscular junctions). The oxidative stress generated by subchronic AZ administration was reversed by the use of vitamin E.

Keywords: Herbicide. Atrazine. Neuromuscular junction. Vitamin E. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da atrazina.....	12
Figura 2 - Esquema da Junção Neuromuscular	15
Figura 3 - Vista caudal do músculo diafragma.	21
Figura 4 - Toracotomia com exposição do nervo frênico direito.....	21
Figura 5 - Gráfico da determinação quantitativa da atividade enzimática da Acetilcolinesterase.....	25
Figura 6 - Gráficos da determinação enzimática de Hidroperóxido de Lipídio, Catalase, Superóxido Dismutase, Glutathione Peroxidase.	26
Figura 7 - Gráfico da porcentagem da Capacidade antioxidante hidrofílica	27
Figura 8 - Fotomicrografias de cortes transversais do músculo diafragma corados com HE e Picrossirus Red. Gráfico das área da fibra muscular, diâmetro da fibra muscular e porcentagem do colágeno	29
Figura 9 - Fotomicrografias de secções transversais do nervo frênico coradas em tetróxido de ósmio.Gráficos da análise morfométrica do nervo frênico	31
Figura 10 - Fotomicrografias das JNMs com esterase inespecífica. Fotomicroscopia Confocal de Varredura a Laser. Gráfico da área e diâmetro máximo das JNMs.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AZ	Atrazina
AZE	Atrazina + vitamina E
BHT	Butilato hidroxitolueno
CAH	Capacidade Antioxidante Hidrofílica
CAT	Catalase
CEATOX	Centro de Assistência Toxicológica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
E	Vitamina E
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
HE	Hematoxilina & Eosina
HP	Hidroperóxido de Lipídio
JNM	Junção Neuromuscular
LH	Hormônio Luteinizante
nAChR	Receptores de Acetilcolina
NBT	nitro blue-tetrazólio
PC	fosfatidilcolina
SOD	Superóxido Dismutase
UNIPEX	Unidade de Pesquisa Experimental

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1	Análise Bioquímica	19
2.1.1	Avaliação da colinesterase.....	19
2.1.2	Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo	19
2.1.3	Determinação da Capacidade antioxidante Hidrofílica (CAH)	20
2.2	Análise Morfológica e Morfométrica	22
2.2.1	Análise das fibras musculares e da porcentagem de colágeno	22
2.2.2	Análise do nervo frênico	22
2.2.3	Análise das junções neuromusculares	23
2.2.4	Análise Estatística	24
3	RESULTADOS	25
3.1	Análise Bioquímica	25
3.1.1	Análise da colinesterase.....	25
3.1.2	Análise dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo.....	25
3.1.3	Determinação da Capacidade antioxidante hidrofílica	27
3.2	Análise Morfológica e Morfométrica	27
3.2.1	Análise das fibras musculares (Hematoxilina e Eosina) e Análise do colágeno (Picrossirius Red).....	27
3.2.2	Análise do nervo frênico.....	30
3.2.3	Análise das junções neuromusculares	32
4	DISCUSSÃO	34
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
6	ANEXO 1 - ARTIGO CIENTÍFICO	49
7	ANEXO 2 – DECLARAÇÃO CEUA/IBB	77

1 INTRODUÇÃO

Em nível mundial, devido a pragas e gramíneas invasoras ocorre diminuição da produção agrícola afetando em torno de 50% da produção anual de grãos. O uso de praguicidas pode reduzir esta perda em cerca de 30% (ZHANG; MA; LI, 2015).

Os praguicidas são substâncias químicas usadas em diferentes culturas na proteção, prevenção, destruição ou controle de organismos, ou ainda doenças prejudiciais às plantações (BÉRANGER *et al.*, 2020). No entanto, muitos estudos têm demonstrado que o uso dos praguicidas, visando uma melhora na produtividade das culturas, pode impactar negativamente a saúde humana e o ambiente, sendo potencialmente ecotóxico (ZHANG; MA; LI, 2015; NICOLOPOULOU-STAMATI *et al.*, 2016).

Sessenta por cento dos praguicidas aplicados na agricultura correspondem a herbicidas (ŽIVKOVIĆ SEMREN; ŽUNEC; PIZENT, 2018). Esse uso trata-se de grave problema ambiental, em pleno século XXI, sendo o principal meio de controle de pragas em todo o mundo (FERNÁNDEZ-VEGA; SANCHO; FERRANDO, 2015). A bioacumulação de poluentes, afeta diretamente a estabilidade do ecossistema, a cadeia alimentar e a vida animal (BOCHNER, 2007; SCHMIDEL *et al.*, 2014).

O mercado mundial do setor agrícola cresceu 93%. No Brasil, esse crescimento foi de 190%, se destacando no contexto internacional (FERREIRA; VIANA JÚNIOR, 2016) o que colocou o País em primeiro lugar no *ranking* mundial de consumo de praguicidas, sendo que, apenas dez empresas controlam mais de 70% desse mercado no país (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). Gaboardi, Candiotto e Ramos (2019) verificaram que as culturas de soja, milho e trigo somam mais de 90% da área colhida na lavoura no Sudoeste do Paraná/ Brasil, o que tem gerado volumes exorbitantes de praguicidas com ingredientes ativos perigosos ao meio ambiente e à saúde humana, conforme classificação do IBAMA. O Brasil é considerado ainda o líder mundial no consumo de praguicidas, correspondendo a 86% do total consumido na América Latina (NIGATU; BRATVEIT; MOEN, 2016). Segundo Lopes e Albuquerque (2018) a região Sul é responsável por, aproximadamente, 30% do consumo de praguicidas, o Paraná se destaca entre os estados brasileiros, com uso de 12 quilos por hectare/ano, diante de uma média brasileira de 4 quilos/hectare/ano de praguicidas.

No sistema moderno agrícola, os compostos químicos correspondem à

comercialização de mais de 1000 ingredientes ativos e a formulação de novos e potentes praguicidas vem crescendo (BRAVO *et al.*, 2005; XING *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2012; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013).

A atrazina (AZ) dentre 83 praguicidas, foi considerada como sendo a maior responsável pela contaminação de águas subterrâneas (ABARIKWU; FAROMBI, 2015), de fontes de águas superficiais e de água potável (MOSQUIN; WHITMORE; CHEN, 2012; DONG; ZHANG; QUAN, 2020). Em um estudo realizado em 22 capitais brasileiras, as substâncias que foram mais encontradas em água potável e de nascente foram a cafeína e a AZ (MACHADO *et al.*, 2016).

A AZ (2-cloro-4-(etilamino)-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) (Figura 1) é um herbicida pertencente ao grupo das s-triazinas, sendo responsável por 30% da produção mundial de praguicidas (ABARIKWU; FAROMBI, 2015) e possui ação sistêmica (LEBARON; MACFARLAND; BURNSIDE, 2008). É comercializada em mais de 100 países (SOUZA *et al.*, 2012; XING *et al.*, 2010; ŽIVKOVIĆ SEMREN; ŽUNEC; PIZENT, 2018), e nos Estados Unidos é amplamente utilizada (SÁNCHEZ *et al.*, 2020).

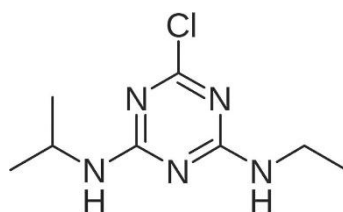


Figura 1 - Estrutura química da Atrazina.

Fonte: Pecev-Marinković *et al.* (2019).

A AZ devido ao seu baixo custo é considerada o praguicida mais utilizado em todo o mundo, em pré-emergência e pós-emergência no controle de folhas largas e gramíneas, nas culturas de milho, soja, cana-de-açúcar e outras (SHELLEY *et al.*, 2012; JESTADI *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2016; MAC LOUGHLIN *et al.*, 2016). A China tem aumentado seu uso nas últimas décadas (FERNÁNDEZ-VEGA; SANCHO; FERRANDO, 2015) sendo o maior produtor de praguicida e um dos maiores utilizadores no mundo, na produção de culturas diversas (HU *et al.*, 2015). Nos EUA a AZ é o praguicida mais utilizado na cultura de milho e na União Europeia foi proibido a partir de 2004 (ŽIVKOVIĆ SEMREN; ŽUNEC; PIZENT, 2018).

Em vários países, os sistemas aquáticos próximos de propriedades agrícolas

têm apresentado em suas amostras a presença de AZ e seus metabólitos (LIU *et al.*, 2016), comprovando sua ameaça significativa tanto para o ecossistema aquático quanto para a saúde humana (JI *et al.*, 2015). Existem evidências ligando à exposição a praguicidas e maior incidência de doenças crônicas humanas, incluindo diabetes (JESTADI *et al.*, 2014), câncer (BELLON; FÉNICHEL, 2016; WIRBISKY *et al.*, 2016; BRASIL *et al.*, 2018; CHEVALIER; PAUL; KAUR; DOGRA; SINGH, 2018) Parkinson (JAMES; HALL, 2015), Alzheimer e esclerose múltipla (XING *et al.*, 2010; PATHAK; DIKSHIT, 2011; SOUZA *et al.*, 2012; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013).

Além disso, várias pesquisas têm relacionado a exposição a AZ ou seus subprodutos a anormalidades pré-natais como nascimentos prematuros, intercorrência menstrual e diminuição da fertilidade em mulheres (HASE *et al.*, 2008; CHEVRIER *et al.*, 2011; CRAGIN *et al.*, 2011). Estudos experimentais com administração diária de AZ durante gestação, lactação e após o desmame de ratas fêmeas mostraram alterações no mecanismo de controle do hormônio luteinizante (LH) e significativa redução na fertilidade (BRECKENRIDGE *et al.*, 2015).

Estudo epidemiológico sugere uma possível correlação da exposição à AZ por: inalação, contaminação tópica, ingestão de água e alimentos contaminados, com o aumento da incidência de neoplasias (CHEN *et al.*, 2015; HOLÁSKOVÁ *et al.*, 2019)

Considerando que nos Estados Unidos foi observada uma sobreposição entre as áreas onde a AZ é muito utilizada, com incidência de obesos que possuem índice de massa corpórea acima de 30, foi realizado um estudo com ratos utilizando exposição crônica de AZ e verificou-se que a AZ contribuiu para o desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina, com diminuição da taxa metabólica basal e acúmulo de gordura abdominal (LIM *et al.*, 2009).

Estudo realizado em lagostas juvenis de água doce expostas a diferentes concentrações de AZ durante 4 semanas descreve desregulação endócrina, com efeitos que consistiram em feminilização, redução do crescimento somático, com menor ganho de peso e de teor de proteína nos músculos (MAC LOUGHLIN *et al.*, 2016).

O herbicida AZ é capaz de exercer uma atividade proliferativa em vários modelos celulares, incluindo proliferação de células cancerígenas nos tecidos do ovário e mama (SIMPKINS *et al.*, 2011).

Ratos submetidos à exposição crônica a AZ exibiram modificação da memória

espacial e alterações na coordenação e na atividade locomotora (BARDULLAS; GIORDANO; RODRIGUEZ, 2011). Os resultados de Lin, Dodd e Filipov (2013) indicam que exposição (24h e 48h) da AZ em roedores induz múltiplas anomalias causando transtornos motores, cognitivos e emocionais.

Rodriguez *et al.* (2017) verificaram que a AZ é um praguicida potencialmente tóxico para o sistema dopaminérgico. Estudando a exposição aguda em ratos, esses autores verificaram que a AZ induziu a hipoatividade locomotora decorrente da ativação de células em núcleos da base e seus alvos.

Tem sido descrito ainda que praguicidas promovem além de efeitos negativos sobre Sistema Nervoso Central, efeitos sobre o Sistema Nervoso Periférico, como oscilação postural, velocidade de condução nervosa (KIMURA *et al.*, 2005) e alteração da atividade enzimática (AChE) (KORI *et al.*, 2019).

Através de análise histomorfológica comparativa e da atividade da AChE foram encontradas alterações em parâmetros bioquímicos e fisiológicos em larvas e embriões de *zebrafish* tratadas com diferentes concentrações de AZ. Este estudo mostrou que a AZ afetou o desenvolvimento dos sarcômeros e o arranjo das fibras musculares brancas (WANG *et al.*, 2015).

Em outro estudo, observou-se que a AZ influenciou o desenvolvimento da larva do *zebrafish* em diferentes fases, apresentando uma alteração significativa em seu comportamento durante a natação, e a atividade da AChE foi inibida (LIU *et al.*, 2016).

A AChE está presente em sinapses colinérgicas nos sistemas Nervoso Central e Periférico (BLOTNICK-RUBIN; ANGLISTER, 2018). Na junção neuromuscular (JNM) esta enzima tem como principal função hidrolisar rapidamente a acetilcolina (ACh) liberada do terminal nervoso, estando presente na fenda sináptica juntamente com outras proteínas (PETROV; NIKOLSKY; MASSON, 2018). Morfologicamente, as JNM são formadas por três compartimentos (Figura 2): o compartimento pré-sináptico, onde estão presentes a terminação nervosa com as vesículas contendo acetilcolina (ACh) e a célula de Schwann; o compartimento extracelular, preenchido pela lâmina basal; e o compartimento pós-sináptico, que compreende o sarcolema da fibra muscular com as dobras juncionais e o sarcoplasma que proporciona suporte estrutural e metabólico para a região pós-sináptica (ENGEL, 2003; MALOMOUZH, 2012).

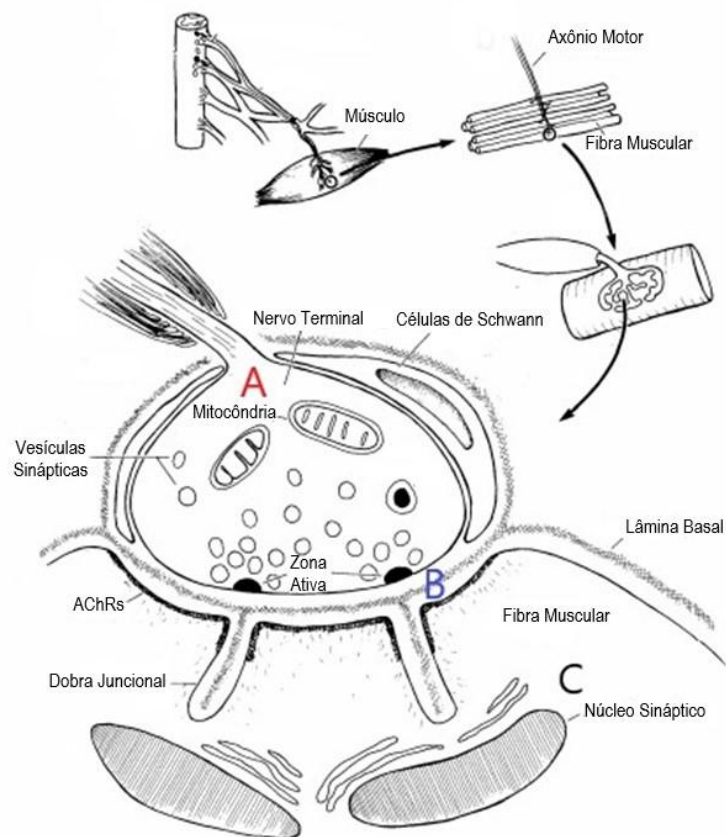


Figura 2 – Esquema da Junção Neuromuscular Adulta. (A) o compartimento pré-sináptico; (B) o compartimento extracelular ou fenda sináptica; (C) o compartimento pós-sináptico. Fonte: Adaptado de Hall e Sanes (1993).

O compartimento extracelular está situado entre a membrana pré- e pós-sináptica e contém a lâmina basal, a qual é contínua com a lâmina basal que envolve a fibra muscular (HALL; SANES, 1993).

O compartimento pós-sináptico é composto pelo sarcoplasma juncional e pelo sarcolema imediatamente justaposto ao terminal nervoso. O sarcolema é pregueado, contendo dobras juncionais, com cerca de 1 μm de profundidade que aumentam a superfície pós-sináptica e, portanto, a eficácia da transmissão sináptica (SANES; LITCHMAN, 1999). Nas dobras juncionais estão presentes duas regiões distintas: o ápice, onde os nAChR estão agrupados em uma densidade de aproximadamente 10^4 moléculas/ μm^2 juntamente com outras proteínas como Rapsina, Utrofina, α -distrobrevina-1 e o fundo, onde estão α -distrobrevina-2, distrofina, moléculas de adesão celular neural (N-CAM) e os canais de Na^+ responsáveis pela geração do potencial de ação (RUFF, 2003; CONTI-FINE; MILANI; KAMINSKI, 2006).

Segundo Bernard *et al.* (2011), a AChE está na fenda sináptica em estreita

justaposição com o terminal nervoso pré-sináptico e nas dobras pós-sinápticas secundárias da fibra muscular, estando virtualmente ausente nas cristas da membrana entre as dobras da membrana pós-sináptica. Este padrão de localização da AChE ocorre a fim de garantir a hidrólise completa da ACh (BLOTNICK-RUBIN; ANGLISTER, 2018).

Para o monitoramento da inibição e reativação da AChE vários são os métodos analíticos utilizados. Estes métodos auxiliam tanto no monitoramento clínico de processos de intoxicação como na quantificação de pesticidas em alimentos, animais ou plantas (monitoramento ambiental) (CAVALCANTI ET AL, 2016).

A atividade da AChE tem sido uma das ferramentas bioquímicas para avaliar e monitorar os efeitos de alguns contaminantes ambientais (SAMANTA *et al.*, 2014)

Os praguicidas podem produzir efeitos fisiológicos adversos, com uma variedade de alterações bioquímicas ao nível celular e molecular. As alterações bioquímicas podem ser utilizadas como marcadores biológicos em estudos epidemiológicos, bem como em estudos toxicológicos em animais. Os biomarcadores mais comuns usados para avaliar os efeitos de praguicidas estão relacionados com os danos no DNA e RNA, a modulação da expressão gênica e o estresse oxidativo (ŽIVKOVIĆ SEMREN; ŽUNEC; PIZENT, 2018).

Lin *et al.* (2018) estudando o cérebro de codornas expostas à AZ durante 45 dias, verificaram que houve estresse oxidativo e disfunção mitocondrial através da indução de desordens pela ativação de receptores nucleares xenobióticos.

Os estudos de Shirisha e Mastan (2013) mostraram que ratos Wistar albinos quando expostos por 7 e 14 dias à AZ (300 mg/kg) apresentaram toxicidade hepática, estresse oxidativo e alteração da atividade antioxidante.

Ratos expostos durante 3, 6 e 9 horas a AZ apresentaram distúrbios metabólicos, toxicidade mitocondrial em ambas as células hepáticas e musculares que afetaram o sistema de fosforilação oxidativa (SAGARKAR *et al.*, 2016).

Novais *et al.* (2014) verificaram que os praguicidas AZ, dimetoato e carbendazim afetam o organismo de *Enchytraeus albidus* presente no solo, gerando estresse oxidativo e inibindo a atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase.

Adeyemi, Martins-Junior e Barbosa Junior (2015) estudando embriões de *zebrafish* verificaram, após exposição por 96 horas a 0.8 mM de arsênico e 0.1mM

de AZ ou mistura de ambos, ha presença de estresse oxidativo. Danos oxidativos também foram encontrados no rim de ratos tratados com AZ (LIU *et al.*, 2014). Esse praguicida também promoveu estresse oxidativo em camarões, o qual foi determinado pelo aumento da concentração de H₂O₂, o qual foi revertido pela inclusão da vitamina E na dieta, que aumentou a atividade das enzimas superóxido dismutase, glutathione-S-transferase e glutathione reductase (GRIBOFF *et al.*, 2014).

Estudo realizado em ratos Wistar, mostraram genotoxicidade induzida por AZ, onde a alteração no DNA foi confirmada pela frequência de micronúcleos nas células do sangue e fígado e através do teste do cometa. Após a administração da vitamina E houve redução desses efeitos nas células do fígado (SINGH *et al.*, 2008).

Mansour *et al.* (2017) avaliaram o dano oxidativo, alterações bioquímicas e histopatológicas em filhotes de ratos, cujas mães foram expostas a uma mistura de três praguicidas (AZ, clorpirifos e endosulfan) com e sem suplementação de vitamina E. Os autores verificaram que os ratos que receberam durante a amamentação a suplementação com vitamina E, tiveram redução do estresse oxidativo exercido pelos praguicidas.

Estudos experimentais recentes evidenciaram que a associação da Vitamina E ao uso de praguicidas promoveu redução do estresse oxidativo (ABOUELGHAR; EL-BERMAWY; SALMAN, 2019; ERDEMLI *et al.*, 2020).

A vitamina E, oferece proteção contra a depleção dos metabólitos de energia, mantendo o status de energia celular adequada, e, assim, diminuindo o efeito neuro e miotóxico que destroem neurônios e fibras musculares por ação excitotóxica dos praguicidas (DETTBARN *et al.*, 2001; DETTBARN; MILATOVIC *et al.*, 2001; MILATOVIC; GUPTA, 2006).

A vitamina E age principalmente como antioxidante, neutralizando os radicais livres e protegendo as membranas celulares contra dano oxidativo (VAN ACKER; KOYMANS; BAST, 1993) também regula a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (CHOW *et al.*, 1999), mantendo a fosforilação oxidativa da mitocôndria (KOTEGAWA *et al.*, 1993; PUNZ *et al.*, 1998).

Os herbicidas estão associados a alterações respiratórias e tem sido relatado como agravante de problemas respiratórios crônicos, contribuindo para a exacerbação da asma, rinite, faringite e pneumonia (RATHINAM *et al.*, 2005; SLAGER *et al.*, 2010; HOPPIN J. A. *et al.*, 2014). Além disso, a interrupção da função colinérgica através da inibição da acetilcolinesterase (AChE) leva ao acúmulo do

neurotransmissor acetilcolina. O excesso de acetilcolina na sinapse resulta em uma super estimulação dos neurônios colinérgicos, que se manifesta nos sinais e sintomas comuns da intoxicação por organofosforados entre eles miose, aumento de secreções, convulsões, convulsões e insuficiência respiratória (MCGARRY *et al.*, 2020).

Desse modo, o músculo diafragma e o nervo frênico, foram alvos desse estudo por fazerem parte das estruturas envolvidas no processo da respiração.

Assim, o objetivo desse estudo foi após administração subcrônica de AZ analisar o efeito protetor da vitamina E sobre o estresse oxidativo e a interação neuromuscular (nervo, músculo e junções neuromusculares) do músculo diafragma de ratos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 52 ratos Wistar, machos, adultos, provenientes do Biotério Central da UNESP de Botucatu, com aproximadamente 80 dias de idade, os quais foram mantidos no biotério do CEATOX sob condições padronizadas de temperatura ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$), fotoperíodo (12h:12h) umidade e ventilação, recebendo água e ração à vontade (CEUA/IBB protocolo 897/2016).

Os 52 animais receberam por 28 dias via gavagem as seguintes substâncias de acordo com os grupos formados (cada grupo com 13 animais):

Grupo C: controle (0,3 ml de óleo de milho);

Grupo AZ: tratado com atrazina (100 mg/kg);

Grupo AZE: tratado com atrazina + vitamina E (100 mg/kg +200 mg/kg);

Grupo E: tratado com vitamina E (200 mg/kg diluído em óleo de milho).

O herbicida AZ utilizado foi Atrazina Nortox 500 SC e a Vitamina E da Purifarma Brasil. O período de exposição dos animais foi determinado conforme protocolo proposto pela Organisation for Economic Co-operation and Development (1997) para estudo de toxicidade, sub-crônica, repetida, oral, em ratos.

Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (2005), para estudos com ratos, por via oral, considera-se para AZ a LOAEL de 10-70 mg/kg. Por outro lado, a Dose Letal 50 da AZ em ratos expostos oralmente foi de 1870 a 3090 mg/kg. A dose escolhida para este estudo foi a de 100 mg/kg, considerada como subcrônica.

Todos os animais foram pesados semanalmente para ajustes das doses (dados não mostrados).

Decorrido o período experimental os animais foram pesados individualmente, a seguir anestesiados com mistura xilazina e ketamina (1:1) i.p. (012 ml/100g peso corporal) e eutanasiados através de decapitação.

Os músculos diafragma foram dissecados e submetidos às seguintes análises.

2.1 Análise Bioquímica

Foram individualizados 100mg do músculo diafragma de cada animal, acondicionados em ependorf e congelados em nitrogênio líquido para as seguintes determinações:

2.1.1 Avaliação da colinesterase

A determinação quantitativa da atividade enzimática da colinesterase muscular foi realizada através de kit específico (Biotécnicina BT1101000) e que teve por princípio químico, as reações desenvolvidas na metodologia espectrofotométrica descrita por Ellman *et al.* (1961).

2.1.2 Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo

- *determinação da atividade de glutathione peroxidase*: a atividade da glutathione peroxidase foi determinada segundo método de Nakamura, Hosoda e Hayashi (1974) na presença de peróxido de hidrogênio;

- *determinação da atividade de superóxido dismutase*: a atividade da superóxido dismutase foi determinada pela técnica de Crouch *et al.* (1981), tendo como base a capacidade da enzima de inibir a redução do nitroblue-tetrazólico (NBT) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino (pH 10);

- *determinação da atividade da catalase*: a atividade da catalase foi determinada utilizando tampão fosfato pH 7.0, 0.5 mL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras foram realizadas à 240 nm de acordo com o que foi descrito por Aebi (1974);

- *determinação de hidroperóxido de lipídio*: foi determinado através da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe^{2+}) na presença de alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato hidroxitolueno (BHT) em metanol, à temperatura ambiente (JIANG; WOOLLARD; WOLFF, 1991).

2.1.3 Determinação da Capacidade antioxidante Hidrofílica (CAH)

A medida da CAH foi determinada fluorometricamente, conforme descrita por Beretta *et al.* (2006) utilizando leitor VICTOR X2 (Perkin Elmer –Boston, MA). A capacidade antioxidante foi quantificada por meio de comparação da área sobre a curva relativa à cinética de oxidação da suspensão fosfatidilcolina (PC), o qual foi usado como referência de matriz biológica. O 2',2 Azobis (2-amino-propano)-dihidroclorado (AAPH) foi usado como iniciador de radical peroxil. Os resultados representam a porcentagem de inibição do 4,4-difluoro-5-(4-fenil 1-3 butadienil)-4-bora-3,4-diaza-s-indaceno-3-ácido undecanóico (BODIPY) 581/591 no material biológico analisado em relação ao que ocorreu na amostra controle do BODIPY 581/591 em lipossoma PC (fosfatidilcolina). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados estão apresentados em porcentagem de proteção.

A porção restante de cada um dos músculos diafragma de cada animal de cada grupo experimental foram individualizadas na região do ponto motor (Figura 3), o nervo frênico direito foi dissecado (Figura 4) e ambos foram processados seguindo os protocolos descritos abaixo.

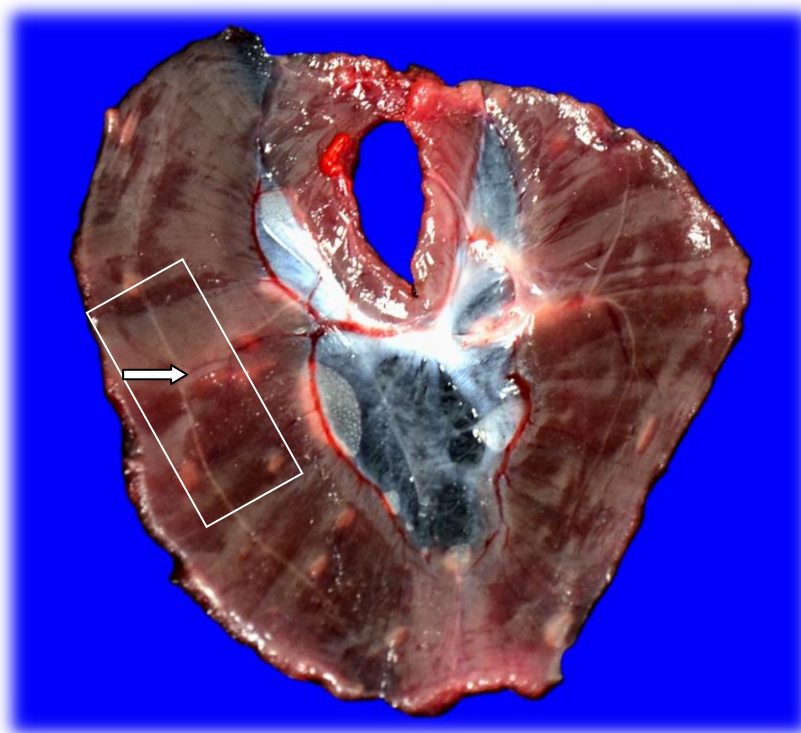


Figura 3 - Vista caudal do músculo diafragma. Ponto motor (seta). Área contendo o ponto motor (retângulo).

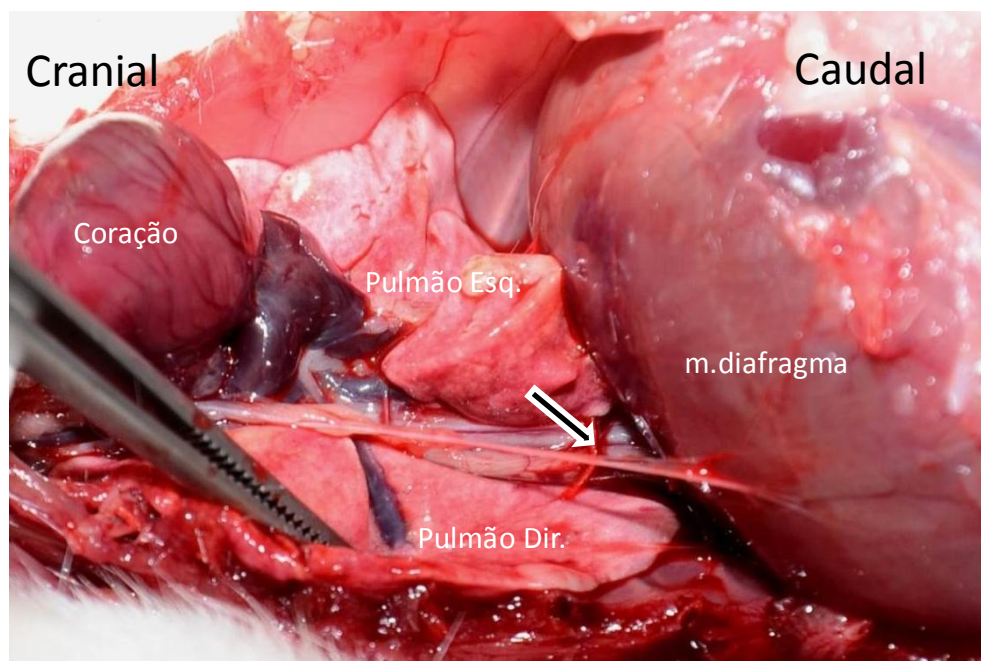


Figura 4 - Toracotomia com exposição do nervo frênico direito (seta). Onde estão indicadas as regiões Cranial e Caudal, o músculo diafragma (m.diafragma) e as vísceras associadas: Coração e Pulmão Direito e Esquerdo.

2.2 Análise Morfológica e Morfométrica

2.2.1 Análise das fibras musculares e da porcentagem de colágeno

Porções musculares do músculo diafragma foram seccionadas em retângulos os quais foram enrolados sobre si mesmo formando uma espécie de tubo envolvidas em talco neutro e congeladas em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C. Posteriormente, foram obtidos cortes histológicos transversais em criostato Leica CM 1800 com espessura de 6µm e confeccionadas 2 lâminas para cada animal de cada grupo experimental. Cada uma delas foi submetida respectivamente à coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e Picrossirus Red. As lâminas confeccionadas foram fotografadas no aumento de 200X através do microscópio Olympus Bx41(câmera SC30).

Para a análise morfométrica das fibras musculares coradas com HE foram utilizadas em torno de 200 fibras musculares selecionadas a partir de 4-5 campos aleatórios, as quais foram submetidas aos cálculos da área e do diâmetro menor das fibras musculares através do software Sigma Scan Pro 5.

A porcentagem de colágeno no tecido muscular foi calculada a partir de imagens obtidas através da coloração de Picrossirus Red de 5 campos aleatórios de cada animal de cada grupo experimental, onde as áreas em vermelho eram detectadas automaticamente pelo software para a obtenção da porcentagem de colágeno através do software Leica QWin,

2.2.2 Análise do nervo frênico

Os nervos frênicos foram expostos, coletados e em seguida foram submetidos à fixação e coloração com tetróxido de ósmio a 1%. Após 24 horas, os exemplares seguiram a rotina do laboratório da UNIPEX/FMB/UNESP/Botucatu. Foram obtidas secções transversais dos nervos de cerca de 2µm de espessura e confeccionadas lâminas histológicas as quais foram contra-coradas com azul de toluidina. A partir das lâminas obtidas, foi realizada análise morfométrica dos nervos. Para isso, foram obtidas imagens (40 x) através do analisador de imagens Olympus Bx41(câmera SC30), do Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências – UNESP - Campus de Botucatu as quais foram submetidas à análise através do software “Sigma Scan

Pro 5". Através desta análise foi obtido: o número, diâmetro e área das fibras nervosas, os diâmetros e áreas dos axônios, e a partir destes foram calculados a espessura da bainha de mielina e Razão G, utilizando as seguintes fórmulas:

$$\text{Diâmetro médio axônios} = \frac{\sum \text{diâmetro axônios}}{n^{\circ} \text{ axônios}}$$

$$\text{Diâmetro médio fibras} = \frac{\sum \text{diâmetro fibras}}{n^{\circ} \text{ fibras}}$$

$$\text{Espessura da bainha mielina} = \frac{\text{diâmetro da fibra} - \text{diâmetro do axônio}}{2}$$

$$\text{Razão G} = \frac{\text{diâmetro do axônio (média)}}{\text{diâmetro da fibra (média)}}$$

2.2.3 Análise das junções neuromusculares

Fragmentos musculares contendo o ponto motor foram fixados em solução de Karnovsky e foram cortados longitudinalmente em 3 ou 4 fatias. A seguir o material foi submetido à reação de Esterase Inespecífica, para caracterização das JNM adaptada da técnica de Lehrer e Ornstein (1959).

O método de Esterase Inespecífica é baseado na hidrólise do acetato α -naftil pela enzima AChE, sendo que o produto fenólico dessa reação combinado com a pararosanilina marca os sítios que contém a enzima AChE (presente na fenda sináptica) e outros locais que contém ACh (região pré-sináptica e pós-sináptica). Desse modo, ocorre marcação "inespecífica" de sítios esterase positivos, levando a evidenciação das regiões pré e pós-sinápticas e também da fenda sináptica, permitindo uma visualização da morfologia da JNM.

Para a análise morfométrica as lâminas foram fotografadas em fotomicroscópio Olympus Bx41(câmera SC30), do Departamento de Anatomia, Instituto de Biociências – UNESP - Campus de Botucatu, onde utilizando objetiva de 40X, 50 imagens de JNM por animal foram obtidas, totalizando 250 junções para cada grupo experimental. A análise morfométrica da área e do diâmetro máximo foi

realizada através software livre “Image J”.

Para a análise em microscopia confocal 3 animais de cada grupo experimental foram perfundidos via ventrículo esquerdo com PBS, e a seguir com a solução de paraformaldeído a 4,0% em tampão fosfato de sódio 0,1M, PH 7,4. Para escoamento do sangue e do excedente do líquido foi seccionado átrio direito. Após perfusão fragmentos musculares contendo o ponto motor permaneceram por 15 minutos em paraformaldeído 4%, sendo a seguir submetidos ao protocolo para marcação dos receptores de acetilcolina. Que consistiu de lavagem com PBS (14g de fosfato de sódio monobásico, 4,3 g de fosfato de potássio bibásico anidro e 72g de cloreto de sódio em 1L de água destilada, pH 7,5) várias vezes e incubação com glicina 0,1 M por 20 min em agitador orbital. Novas lavagens em PBS e incubação com colagenase 1% (Tipo I-Sigma C-0130) por 20 min no agitador. Novas lavagens em PBS e incubação durante 30 min no agitador de α -bungarotoxina conjugada a rodamina (Rh-BTX – Molecular Probes T1175,1: 1000 em PBS). Novas lavagens com PBS e incubação em 1 hora com Triton X-100 1%(Sigma T9284). Finalmente montagem das lâminas com Vectashield e análise e fotodocumentação em microscópio confocal de Varredura a Laser (Leica -TCS-SPE).

2.2.4 Análise Estatística dos dados

O estudo preliminar das variáveis quanto à aderência à distribuição normal dos dados foi realizado pelo teste de Kolmogorov & Smirnov, definindo por técnicas paramétricas quando a variável mostrou aderência à normalidade (técnica de ANOVA) e não paramétrica (Kruskal-Wallis) quando houve falta da aderência. Devido à aderência dos dados à distribuição normal de probabilidade, todos os procedimentos estatísticos foram realizados por meio de técnicas paramétricas. Assim os dados foram analisados utilizando técnicas da análise ANOVA para o modelo com dois fatores complementando com o teste de comparações múltiplas de Tukey (ZAR, 2009), considerando o nível de 5% de significância. Para essas análises foi utilizado o software estatístico R-Gui versão 3.6.2 (R Development Core Team. 2019).

3 RESULTADOS

Em relação ao peso dos animais (dados não mostrados) não houve diferença entre os grupos.

3.1 Análise Bioquímica

3.1.1 Análise da colinesterase

O grupo E apresentou redução na atividade da colinesterase ($164,50 \pm 60,92$) quando comparado ao grupo C ($1068,15 \pm 498,63$) ($p < 0,05$) e ao grupo AZE ($706,32 \pm 552,12$) ($p < 0,05$). Já o grupo AZ ($910,23 \pm 401,02$) não apresentou diferenças em relação aos grupos C e AZE ($p > 0,05$) (Figura 5).

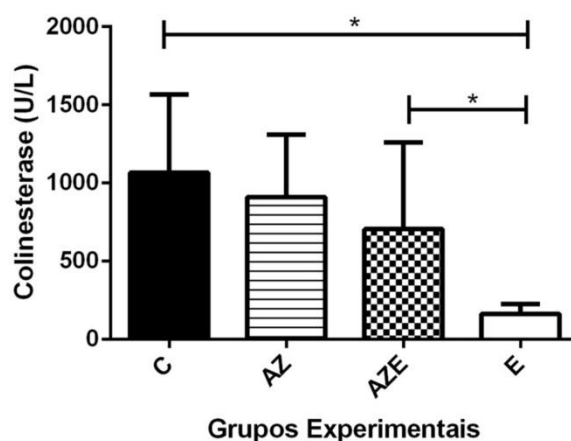


Figura 5 - Gráfico das médias e desvio padrão da média da determinação quantitativa da atividade enzimática da Colinesterase segundo os grupos experimentais, C: controle, AZ: Atrazina, AZE: Atrazina + Vitamina E, E: Vitamina E (* $p < 0,05$).

3.1.2 Análise dos Biomarcadores de Estresse Oxidativo

Através dessas análises foi possível observar que no grupo AZ ($214,29 \pm 17,55$) houve aumento na atividade do hidropéroxido de lipídio quando comparado com os animais do grupo C ($106,80 \pm 24,80$). Já no grupo AZE ($144,92 \pm 38,35$) quando comparado ao AZ houve diminuição desse parâmetro ($p < 0,01$). Em relação ao grupo E ($94,81 \pm 12,14$) houve diminuição da atividade comparado ao grupo AZE ($144,92 \pm 38,35$) ($p < 0,01$) (Figura 6A).

Em relação à catalase a resposta foi semelhante onde no grupo AZ ($30,08 \pm$

5,73) houve aumento na atividade dessa enzima quando comparada ao grupo C ($21,22 \pm 6,72$) ($p < 0,01$). Quando a vitamina E foi associada observou-se diminuição desse parâmetro no grupo AZE ($21,66 \pm 6,96$) ($p < 0,01$) (Figura 6B).

Em relação à quantificação da superóxido dismutase, o grupo AZ ($2,70 \pm 0,11$) apresentou os menores valores quando comparado aos animais do grupo C ($3,40 \pm 0,35$) ($p < 0,05$) e do grupo AZE ($3,48 \pm 0,47$) ($p < 0,05$). Já os animais do grupo E ($5,44 \pm 0,89$) apresentaram os maiores valores frente a essa enzima, quando comparados aos animais do grupo C ($3,40 \pm 0,35$) ($p < 0,01$) e do grupo AZE ($3,48 \pm 0,47$) ($p < 0,01$) (Figura 6C).

A análise da enzima glutatona peroxidase não apresentou diferenças entre os grupos: C ($116,42 \pm 21,13$), AZ ($106,24 \pm 15,98$), E ($96,96 \pm 22,39$), AZE ($118,74 \pm 23,08$) ($p > 0,05$) (Figura 6D).

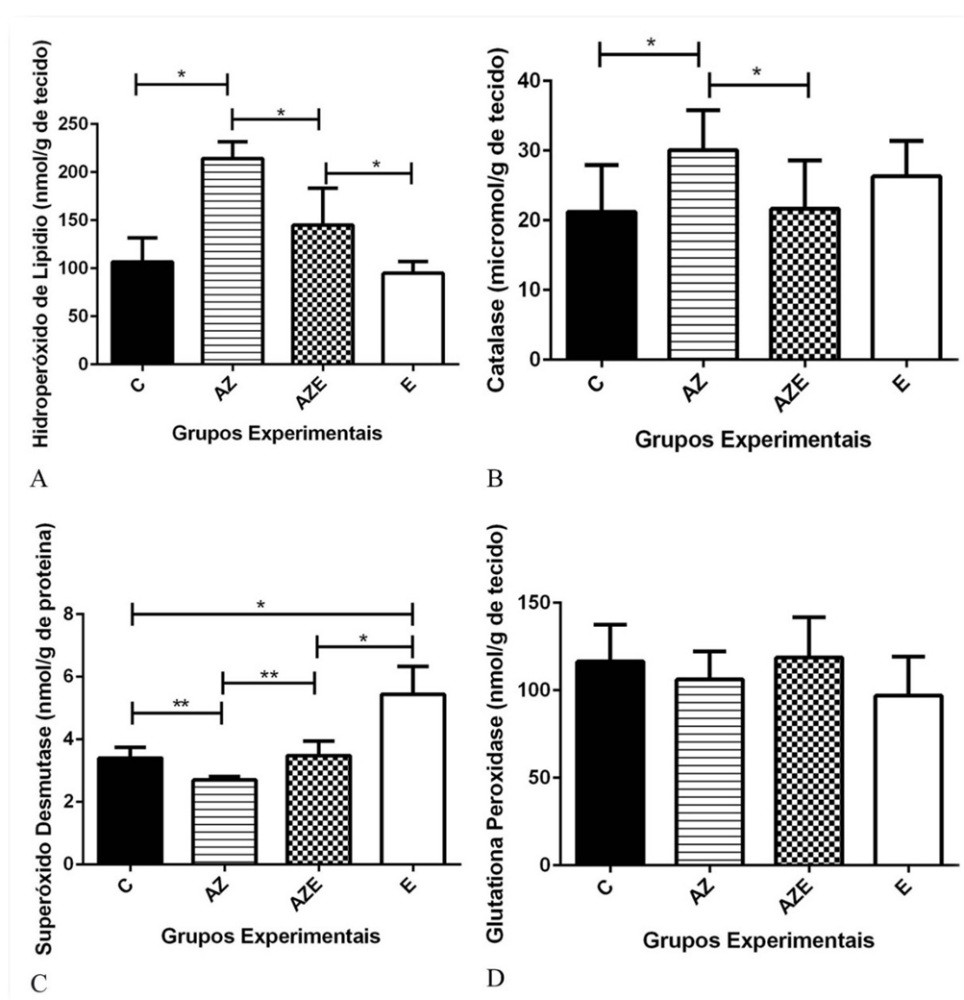


Figura 6 - Gráficos da determinação enzimática de: A- Hidroperóxido de Lipídio, B- Catalase, C- Superóxido Dismutase, D- Glutatona Peroxidase. Valores expressos em médias e desvio padrão da média segundo os grupos experimentais, C: controle, AZ: Atrazina,

AZE: Atrazina + Vitamina E, E: Vitamina E (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$).

3.1.3 Determinação da Capacidade antioxidante hidrofílica

Em relação à avaliação da Capacidade antioxidante hidrofílica os maiores valores foram encontrados no grupo AZ ($60,24 \pm 2,46$) quando comparados ao C ($57,29 \pm 1,06$) ($p < 0,05$). Quando a vitamina E foi associada houve diminuição desse parâmetro no grupo AZE ($54,42 \pm 2,41$) ($p < 0,01$). Entre o grupo C ($57,29 \pm 1,06$) e o grupo E ($55,32 \pm 3,05$) não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Figura 7).

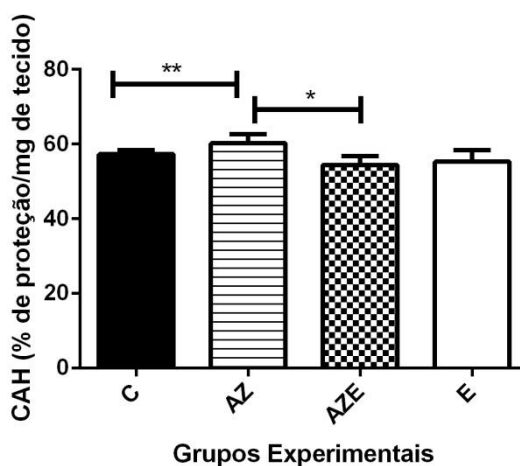


Figura 7 - Gráficos das médias e desvios padrões da média segundo os grupos experimentais, C: controle, AZ: Atrazina, AZE: Atrazina + Vitamina E, E: Vitamina E, da porcentagem da Capacidade antioxidante hidrofílica (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$).

3.2 Análise Morfológica e Morfométrica

3.2.1 Análise das fibras musculares (Hematoxilina e Eosina) e Análise do colágeno (Picrossirius Red)

Quanto à morfologia das fibras musculares, não foi possível notar diferenças entre os grupos, sendo que em todos os grupos as fibras musculares apresentaram características compatíveis com a normalidade: fibras musculares em formato poligonal e com núcleos periféricos (Figura 8A-D).

Em relação à análise morfométrica os dados revelaram que quanto à área

das fibras os animais do grupo E ($1639,46 \pm 321,80$) foram os que apresentaram os maiores valores quando comparado com o grupo C ($1368,77 \pm 149,22$) (* $p < 0,05$). Os animais do grupo AZE ($1145,74 \pm 105,99$) apresentaram os menores valores de área das fibras musculares quando comparado com o grupo E ($1639,46 \pm 321,80$) (** $p < 0,01$) (Figura 8E). O mesmo foi observado em relação ao diâmetro menor das fibras musculares onde os animais do grupo AZE ($31,13 \pm 1,87$) apresentaram os menores em relação aos animais do grupo E ($35,46 \pm 2,76$) (** $p < 0,01$) (Figura 8F).

Os valores do diâmetro menor das fibras musculares tiveram essa mesma resposta onde os animais do grupo E ($35,46 \pm 2,76$) foram os que apresentaram os maiores valores quando comparado com os animais dos grupos C ($32,43 \pm 1,58$) (** $p < 0,01$).

Através da coloração de Picrossirius Red pôde-se evidenciar as fibras colágenas presentes no endomísio e perimísio, as quais foram marcadas em vermelho e as fibras musculares em amarelo. Essa análise foi realizada através de microscopia óptica de luz convencional (Figura 8a-d).

Tanto a análise morfológica quanto a da porcentagem de colágeno não mostraram diferenças entre os grupos estudados (C: $15,18 \pm 4,57$; AZ: $14,07 \pm 1,13$; E: $15,95 \pm 2,30$; AZE: $14,55 \pm 1,11$) ($p > 0,05$) (Figura 8G).

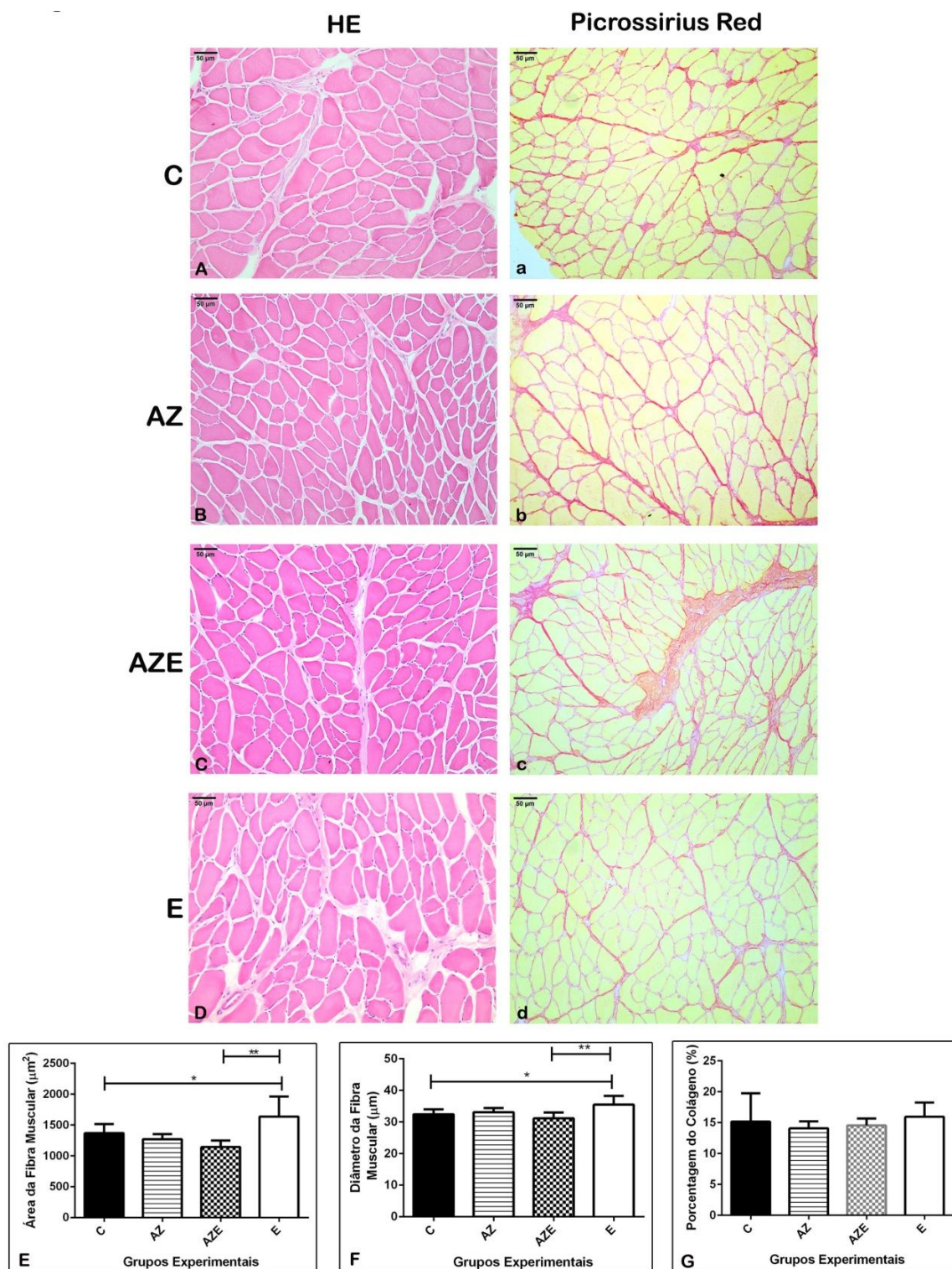


Figura 8 - A-D: Fotomicrografias de cortes transversais do músculo diafragma corados com HE de todos os grupos experimentais em microscopia de luz convencional. a-d: Fotomicrografias de cortes transversais do músculo diafragma corados com Picrossirius Red de todos os grupos experimentais em microscopia de luz convencional. (E-G) Gráfico das médias e desvio padrão da área da fibra muscular, diâmetro menor da fibra muscular e porcentagem do colágeno respectivamente para todos os grupos experimentais, C: controle, AZ: Atrazina, AZE: Atrazina + Vitamina E, E: Vitamina E (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

3.2.2 Análise do nervo frênico

A análise morfológica evidenciou padrão de normalidade entre todos os grupos. Sendo que histologicamente os axônios apresentaram bainha de mielina íntegra sem sinais de degeneração, de edema endoneural e de infiltrado inflamatório (Figura 9A-D). Esses resultados foram confirmados pela morfometria onde não foi observada diferença estatística entre os grupos frente a todos os parâmetros analisados: número de fibras nervosas (C: $428,40 \pm 91,02$; AZ: $439,80 \pm 34,60$; E: $387,60 \pm 50,89$; AZE: $453,80 \pm 56,50$), área das fibras nervosas (C: $42,69 \pm 7,41$; AZ: $43,81 \pm 8,28$; E: $45,21 \pm 11,56$; AZE: $35,86 \pm 6,55$), diâmetro médio das fibras nervosas (C: $6,36 \pm 0,66$; AZ: $6,47 \pm 0,67$; E: $6,41 \pm 0,87$; AZE: $5,67 \pm 0,78$), área dos axônios (C: $15,20 \pm 4,53$; AZ: $13,68 \pm 1,77$; E: $14,53 \pm 5,84$; AZE: $9,84 \pm 2,09$), diâmetro médio dos axônios (C: $3,59 \pm 0,61$; AZ: $3,40 \pm 0,34$; E: $3,33 \pm 0,81$; AZE: $2,69 \pm 0,51$), espessura da bainha (C: $1,39 \pm 0,14$; AZ: $1,54 \pm 0,25$; E: $1,54 \pm 0,19$; AZE: $1,49 \pm 0,16$) e cálculo da razão G (C: $0,56 \pm 0,05$; AZ: $0,53 \pm 0,04$; E: $0,51 \pm 0,08$; AZE: $0,47 \pm 0,04$) ($p > 0,05$) (Figura 9E-K).

FIGURA 9

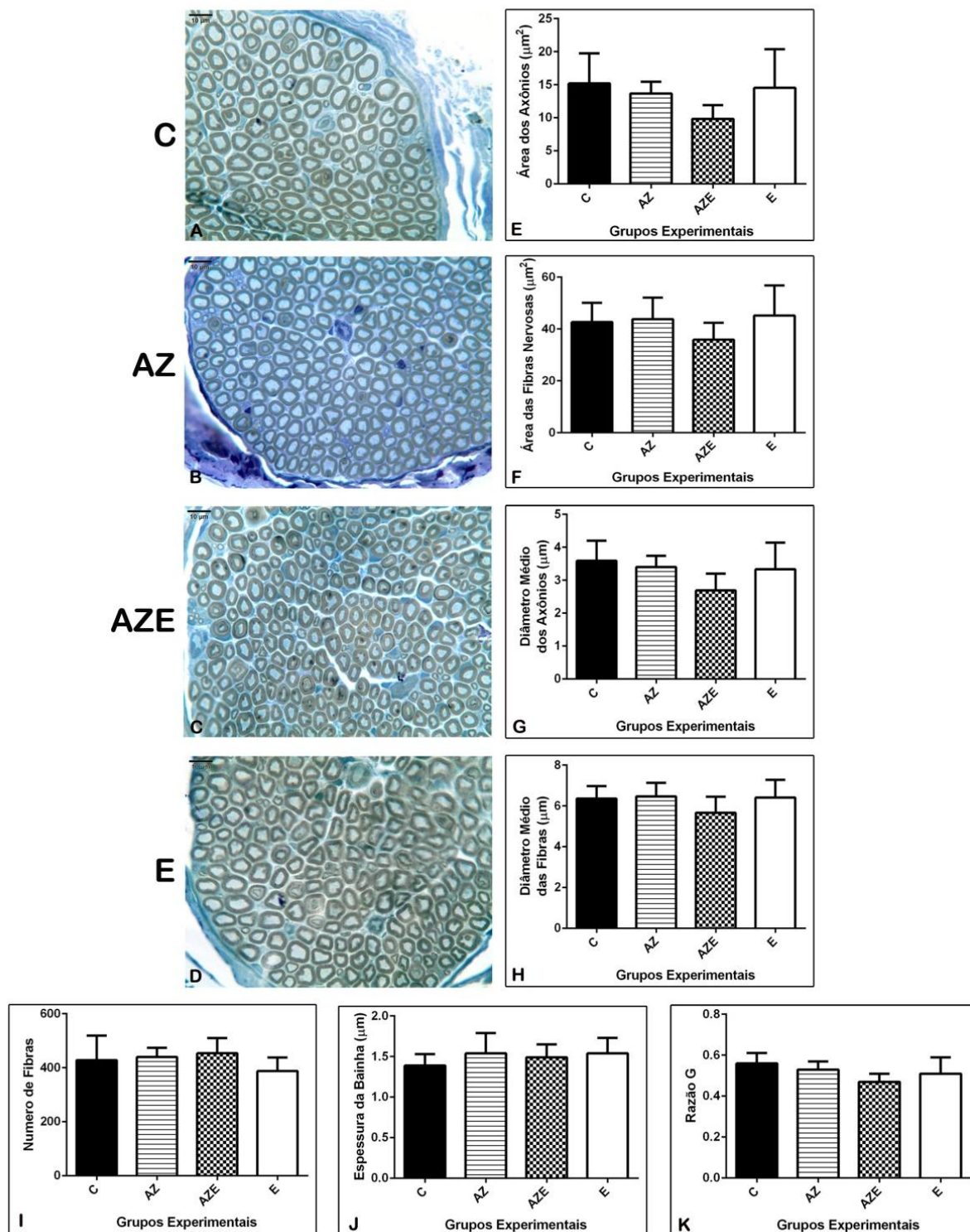


Figura 9 - A-D: Fotomicrografias de secções transversais do nervo frênico coradas em tetróxido de ósmio. Para todos os grupos experimentais A: grupo controle (C); B: Grupo Atrazina (AZ); C: Grupo Atrazina + Vitamina E (AZE); D: Grupo Vitamina E (E). E-K: Gráficos das médias e desvio padrão da análise morfométrica do nervo frênico dos grupos C, AZ, AZE e E. E: Área dos axônios (μm^2); F: Área das fibras nervosas (μm^2); G: diâmetro médio dos axônios (μm); H: diâmetro médio das fibras (μm). I: número de fibras; J: Espessura da bainha de mielina (μm); K: razão G.

3.2.3 Análise das junções neuromusculares

Em relação à morfologia, as JNMs de todos os animais estavam alinhadas transversal ou obliquamente ao maior eixo das fibras musculares, sem alterações morfológicas (Figura 10A-D). A morfometria da área das JNMs não revelou diferença estatística entre os grupos (C: $577,67 \pm 99,6$; AZ $503 \pm 93,91$; E: $518,50 \pm 215$; AZE $537,69 \pm 193$) ($p > 0,05$) (Figura 10E). Em relação ao diâmetro máximo das JNMs houve diminuição desse parâmetro no grupo AZ ($33,71 \pm 4,11$) quando comparado ao grupo AZE ($46,37 \pm 15,49$) ($*p < 0,05$). Os grupos C ($35,25 \pm 4,5$) e E ($35,45 \pm 9,79$) não apresentaram diferenças entre si ($p > 0,05$) (Figura 10F).

Os receptores de acetilcolina marcados com alpha-bungarotoxina associada à rodamina e analisados através da microscopia confocal mostraram que as respostas dos fluoróforos estavam homogêneas e os nAChR em autofluorescência em todos os grupos estudados. Sendo que os mesmos estavam distribuídos em braços contínuos que corriam em várias orientações ao longo da fibra muscular (Figura 10a-d).

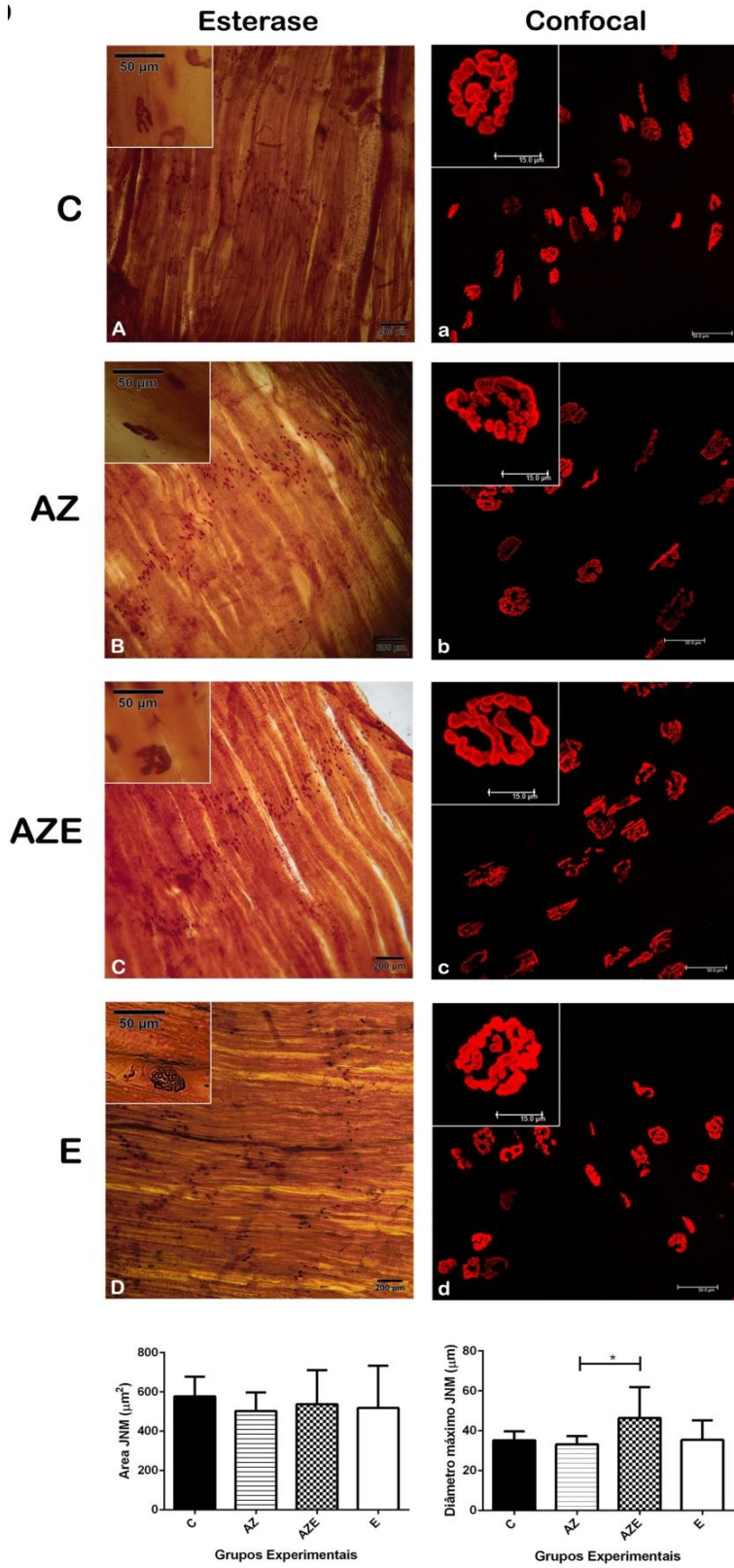


Figura 10 - A-D: Fotomicrografias do músculo diafragma (montagem total) de todos os grupos experimentais. a-d: JNMs marcadas com esterase inespecífica. Detalhe: JNMs. a-d: Fotomicroscopia Confocal de Varredura a Laser. E-F: Gráfico das médias e desvio padrão da área das JNMs (μm^2) e diâmetro máximo das JNMs (μm) para todos os grupos experimentais, C: controle, AZ: Atrazina, AZE: Atrazina + Vitamina E, E: Vitamina E (* $p < 0,05$).

4 DISCUSSÃO

O uso do herbicida AZ tem sido associado a vários problemas de saúde e um grande problema de saúde pública, pois sua detecção ocorre tanto nos ecossistemas quanto em seres humanos, e gera níveis cumulativos em diferentes tipos de órgãos e tecidos (LI *et al.*, 2017).

A exposição a praguicidas pode aumentar o gasto energético nos tecidos na tentativa de eliminar esses compostos tóxicos, alterando o metabolismo e levando a diminuição dos níveis de proteínas teciduais. A mobilização de proteínas ocorre devido a necessidade de sustentar o ciclo do ácido tricarboxílico, através da degradação proteica em aminoácidos, aumentando a síntese de adenosina trifosfato, a fim de atender ao aumento da demanda de energia das células expostas ao estresse tóxico (GANESHWADE *et al.*, 2012).

O metabolismo desse praguicida resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (EL-SHENAWY *et al.*, 2011; GAO *et al.*, 2016; FIGUEIRA; AGUIAR; ROSA, 2017; YOON *et al.*, 2019) modulando o sistema de defesa antioxidante e causando danos oxidativos a todos os componentes celulares, incluindo ácido nucleico, proteínas, lipídios e até morte celular (POGRMIC-MAJKIC *et al.*, 2010; KESHK *et al.*, 2014).

Alterações metabólicas dos tecidos são acompanhadas da geração de EROs, a peroxidação lipídica pode ser um dos mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade induzida pela atrazina, esta relacionada ao aumento da concentração do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que gera processo oxidativo e induz danos peroxidativos aos lipídios da membrana (Singh *et al.*, 2011).

Os resultados desse estudo permitem inferir que a AZ, na dose utilizada, causou estresse oxidativo no músculo diafragma de ratos. Esses resultados são confirmados pelos maiores valores obtidos no grupo AZ em relação ao hidroperóxido de lipídeo (HP), da enzima antioxidante catalase (CAT) e pela determinação da capacidade antioxidante hidrofílica (CAH). Essa determinação permite uma visão mais profunda do envolvimento do estresse oxidativo em várias condições fisiopatológicas, e permite inferir sobre a eficácia de intervenções antioxidantes (FRAGA; OTEIZA; GALLEANO, 2014). A redução de atividade enzimática antioxidante após a exposição à AZ também foi observada por Singh, Sandhir e Kiran (2011), Liu *et al.* (2014), Griboff *et al.* (2014), Hassani *et al.* (2015) e Chaâbane

et al. (2018) estudando praguicidas.

A exposição celular prolongada a ERO leva a uma redução de antioxidantes endógenos naturais como a superóxido dismutase (SOD) (DI VINCENZO *et al.*, 2019), o que está de acordo com os menores valores da SOD observadas no grupo AZ, valores estes menores que do grupo C.

Em relação à vitamina E, os dados mostraram que quando houve sua associação a AZ apresentou redução nos valores do HP, da CAT e da CAH e aumento da SOD, sugerindo uma ação antioxidante dessa vitamina. O papel da vitamina E é conhecido na saúde animal por inativar radicais livres produzidos como produtos da atividade celular normal, bem como evitar formação de vários estressores (CHAÂBANE *et al.*, 2018).

A literatura relata que uma dieta rica em vitaminas previne doenças como câncer e distúrbios cardiovasculares (FIEDOR; BURDA, 2014; MANGGE *et al.*, 2014). Isso ocorre porque os antioxidantes exógenos e endógenos atuam em sinergia para combater os radicais livres (MONTEZANO; TOUYZ, 2014).

A enzima SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 que podem ser convertidos posteriormente em água pela CAT ou pela Glutathione Peroxidase (FRANÇA *et al.*, 2013). A similaridade dos valores encontrados entre todos os grupos em relação à glutathione peroxidase podem ser justificados pelo fato de que a CAT teve grande atuação no processo de estresse oxidativo a qual também tem a função de reduzir o H_2O_2 em água (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006) não necessitando de ação da glutathione.

A AChE é uma das enzimas presentes na fenda sináptica responsável por hidrolisar a ACh liberada do terminal nervoso motor permitindo assim sua ressíntese (MALOMOUZH, 2012; SLATER, 2017). Os resultados deste estudo mostraram que a AZ não inibiu a atividade da AChE (valores do grupo AZ semelhantes ao C). Já a vitamina E promoveu sua diminuição, e a associação com a AZ aproximou seu valor do grupo AZ.

Vários autores descrevem diminuição da atividade da AChE induzida por AZ (XING *et al.*, 2010; SCHMIDEL *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2016; CHAÂBANE *et al.*, 2018). Já Rosini *et al.* (2005) estudando o potencial de drogas para doença de *Alzheimer* verificaram que o ácido lipóico, considerado um potente antioxidante, promoveu inibição da AChE. Mazzanti *et al.* (2009) estudando a associação entre uma droga antioxidante Ebselen com a vitamina E, verificaram também que a

vitamina E inibiu a atividade da AChE no córtex cerebral e no hipocampo.

Em relação à morfologia e morfometria do nervo frênico não foram observadas diferenças entre os grupos de estudo.

Tem sido descrito ainda desordens respiratórias como faringite, bronquite, asma, insuficiência respiratória, pneumonia, dispneia, catarro nasal, sinusite, irritação da faringe e irritação nasal associada ao uso de AZ (Rathinam *et al.*, 2005).

Embora nosso estudo não tenha realizado análises funcionais associadas à capacidade respiratória, os resultados tanto morfológicos quanto morfométricos indicam que o nervo frênico foi preservado.

A razão G é um parâmetro relacionado à velocidade de condução do impulso nervoso. Segundo Mendonça, Barbieri e Mazzer (2003), valores baixos (em torno de 0,4) geralmente indicam degeneração axonal, enquanto valores altos (em torno de 0,7) indicam degeneração ou regeneração da mielina. Os valores obtidos neste estudo em todos os grupos giram em torno de 0,52 confirmando os padrões de normalidade.

Devemos considerar ainda que embora vários autores tenham descrito alterações decorrentes da AZ sobre sistema nervoso central (MA *et al.*, 2015; ZHANG; MA; LI, 2015; KALE; OYESOLA; RAJI, 2018), pouco tem sido estudado sobre a ação deste herbicida sobre o sistema nervoso periférico.

Nenhuma alteração morfológica e morfométrica foi encontrada decorrente da AZ nas fibras musculares e nas JNM, bem como frente a porcentagem de colágeno.

Diferentes respostas podem ocorrer na dependência da espécie animal, concentração do praguicida e duração da exposição ao contaminante (DORNELLES; OLIVEIRA, 2016). Desse modo, cada vez mais a toxicidade dos praguicidas deve ser considerada, referente às suas conformações, acoplamento molecular e as interações decorrentes de sua dinâmica molecular (MLADENOVIĆ *et al.*, 2018).

Sagarkar *et al.* (2016) estudando o efeito da AZ sobre cultura de células musculares, verificaram alterações em genes mitocondriais.

Já os resultados observados no grupo que recebeu apenas vitamina E indicaram aumento de área e proporcionalmente do diâmetro menor das fibras musculares. Sendo que sua associação com a AZ promoveu decréscimo desses valores, mas que foram equivalentes ao do grupo Controle. Em relação à junção neuromuscular não foram observadas diferenças em relação aos grupos estudados

tanto quanto a morfologia como em relação a morfometria das mesmas, embora a associação da vitamina E com AZ tenha aumentado o diâmetro máximo das junções.

Chung *et al.* (2018) em um artigo de revisão sobre a vitamina E, comentam que tanto em estudos experimentais quanto em estudos pré-clínicos, a vitamina E beneficia a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência de mioblastos. Também atua no reparo de membranas, na eficiência mitocondrial, sobre a massa e propriedades musculares contráteis, e ainda na capacidade frente ao exercício.

Eidi *et al.* (2006) estudando a retenção de memória em ratos avaliaram a associação da vitamina E com nicotina e pilocarpina. Verificaram que a vitamina E potencializou as respostas desses fármacos, sugerindo que a vitamina E e o sistema colinérgico têm uma estreita interação.

Grabowiecki *et al.* (2015) em estudos *in vitro* verificaram que a vitamina E impediu a atrofia de mioblastos e contribuiu para a sobrevivência dos miotubos. Há ainda a se considerar que a vitamina E diminui a degradação de proteínas e aumenta sua síntese (ARAGNO *et al.*, 2004; SERVAIS *et al.*, 2007). Os estudos de Bartali *et al.* (2008) e Chung *et al.* (2018) descrevem que a suplementação com vitamina E melhora a função muscular, atenuando o declínio funcional durante o envelhecimento, o que pode ser justificado pela sua ação supressora do estresse oxidativo e da inflamação. No entanto, os efeitos da vitamina E sobre a estrutura muscular pode não ser explicado exclusivamente pela eliminação de radicais livres. Esses efeitos possivelmente refletem interações específicas do alfa-tocoferol com enzimas, proteínas estruturais, lipídios e fatores de transcrição (HASAN *et al.*, 2004).

A vitamina E além de efeito antioxidante, interage especificamente com diferentes estruturas podendo ser considerada um agente potencialmente importante na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, inflamação, distúrbios imunológicos e neurodegenerativos (SZYMAŃSKA; NOWICKA; KRUK, 2017). Ela atenua as ERO reduzindo o oxigênio, bloqueando as enzimas envolvidas na geração de EROs (lipoxigenase, ciclooxigenase, xantina oxidase, monooxigenase), quelando íons metálicos de transição que desencadeiam a produção de ERO e eliminando a peroxidação lipídica, e auxiliando na reciclagem de outros antioxidantes (MIERZIAK; KOSTYN; KULMA, 2014).

Levando-se em consideração que a AZ é um praguicida de estrutura estável, de difícil degradação, e que permanece por longo tempo no ambiente (HE *et al.*,

2019), cuja toxicidade ocorre a longo prazo (SÁNCHEZ *et al.*, 2020). Nosso estudo vem contribuir para que novas estratégias nutricionais associadas ao uso da vitamina E possam proteger o organismo de mamíferos dessa toxicidade. Além disso, o interesse pelas funcionalidades benéficas dessa vitamina está aumentando e continuará atraindo os pesquisadores.

Nossa expectativa frente aos resultados seria ter encontrado uma diminuição da AChE no grupo AZ e uma reversão com o uso da vitamina E. Podemos considerar que, esses resultados foram uma limitação do nosso estudo, pois embora essa análise enzimática tenha sido repetida duas vezes, e sempre realizadas em triplicata, é descrito que essa enzima é bastante sensível ao armazenamento e temperatura, o que pode ter contribuído para os valores encontrados. Acrescido a isso a manifestação dos sintomas relacionados à chamada síndrome colinérgica aguda, resultante da elevação nos níveis de ACh, depende da dose e da via de exposição (OLIVEIRA; BURIOLA, 2009). Além disso, o tempo de exposição e a dose utilizada(subcrônica) podem explicar a ausência de alterações morfológicas observadas neste modelo de estudo.

A partir dessas considerações, podemos concluir que a exposição á AZ neste modelo experimental promoveu estresse oxidativo nas fibras musculares do músculo diafragma de ratos que foi revertido pelo uso da vitamina E. O efeito pró-oxidante da AZ não provocou alteração sobre a interação neuromuscular (fibras musculares, nervo e junções neuromusculares). Já a vitamina E exerceu papel antioxidante sobre o musculo diafragma gerado pela exposição subcrônica á AZ.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARIKWU, S. O.; FAROMBI, E. O. Atrazine induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3-dependent pathway. **Pestic Biochem Physiol**, New York, v. 118, p. 90–98, Feb. 2015.

ABOUELGHAR, G. E.; EL-BERMAWY, Z. A.; SALMAN, H. M. S. Oxidative stress, hematological and biochemical alterations induced by sub-acute exposure to fipronil (COACH®) in albino mice and ameliorative effect of selenium plus vitamin E. **Environ Sci Pollut Res Int**, Berlin, p. 1-15, Dec. 2019.

ADEYEMI, J. A.; MARTINS-JUNIOR, A. C.; BARBOSA JUNIOR, F. Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, New York, v.172-173, p. 7-12, June/July 2015.

AEBI, H. Catalase. *In*: BERGMAYER, H. U. (ed.). **Methods of enzymatic analysis academic**. New York: Academic Press, 1974. P. 673-677.

ARAGNO, M. *et al.* Oxidative Stress Impairs Skeletal Muscle Repair in Diabetic Rats. **Diabetes**, Alexandria, v. 53, p. 1082-1088, Apr. 2004.

BARDULLAS, U.; GIORDANO, M.; RODRIGUEZ, V. M. Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague-Dawley rat. **Neurotoxicol Teratol**, New York, v. 33, n. 2, p. 263-272, Mar./Apr. 2011.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, jan./fev. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v29n1/27866.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2019.

BARTALI, B. *et al.* Serum micronutrient concentrations and decline in physical function among older persons. **JAMA**, Chicago, v. 299, n. 3, p. 308-315, Jan. 2008.

BÉRANGER, R. *et al.* Multiple pesticides in mothers' hair samples and children's measurements at birth: Results from the French national birth cohort (ELFE). **Int J Hyg Environ Health**, Jena, Germany, v. 223, n. 1, p. 22-33, Jan. 2020.

BERETTA, G. *et al.* Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. **Anal Biochem**, San Diego, v. 354, n. 2, p. 290-298, July 2006.

BERNARD, V. *et al.* Distinct localization of Collagen Q and PriMA forms of Acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. **Mol Cell Neurosci**, San Diego, v. 46, n. 1, p. 272–281, Jan. 2011.

BLOTNICK-RUBIN, E.; ANGLISTER, L. Fine Localization of Acetylcholinesterase in the Synaptic Cleft of the Vertebrate Neuromuscular Junction. **Front Mol Neurosci**, Lausanne, Switzerland, v. 11, n. 123, p. 1-11, Apr. 2018.

BOCHNER, R. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas SINITOX e as intoxicações humanas por agrotóxicos no Brasil. **Cien Saude Colet**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 73-89, 2007.

BRASIL, V. L. M. *et al.* Pesticides as risk factors for head and neck cancer: A review. **J Oral Pathol Med**, Oxford, v. 47, n. 7, p. 641-651, Aug. 2018.

BRAVO, M. S. *et al.* Efectos del herbicida 2-cloro-2,6-bis-etilamina-s-triazina, sobre algunos tejidos de *colossoma macropomum* cuvier 1818 (pisces: characidae). **Bol. Inst. Oceanogr. Venez. (Impresa)**, Venezuela, v. 44, n. 1, p. 51-57, 2005.

BRECKENRIDGE, C. B. *et al.* Effect of Age, Duration of Exposure, and Dose of Atrazine on Sexual Maturation and the Luteinizing Hormone Surge in the Female Sprague-Dawley Rat. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, Hoboken, v. 104, n. 5, p. 204–217, Oct. 2015.

CHAÂBANE, M. *et al.* Penconazole alters redox status, cholinergic function and lung's histoarchitecture of adult rats: Reversal effect of vitamin E. **Biomed Pharmacother**, Paris, v. 102, p. 645-652, June 2018.

CHEN, J. *et al.* Effects of atrazine on the proliferation and cytotoxicity of murine lymphocytes with the use of carboxyfluorescein succinimidyl ester-based flow cytometric approaches. **Food Chem Toxicol**, Exeter, v. 76, p. 61-69, Feb. 2015.

CHEVALIER, N.; PAUL-BELLON, R.; FÉNICHEL, P. Comment on “Effects of Atrazine on Estrogen Receptor α - and G Protein-Coupled Receptor 30-Mediated Signaling and Proliferation in Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts”. **Environ Health Perspect**, Research Triangle Park, v. 124, n. 4, p. A64-A65, Apr. 2016.

CHEVRIER, C. *et al.* Urinary biomarkers of prenatal atrazine exposure and adverse birth outcomes in the PELAGIE birth cohort. **Environ Health Perspect**, Research Triangle Park, v. 119, n. 7, p. 1034-1041, July 2011.

CHOW, C. K. *et al.* Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. **Free Radic Biol Med**, Tarrytown, v. 27, n. 5-6, p. 580–587, Sept. 1999.

CHUNG, E. *et al.* Potential roles of vitamin E in age-related changes in skeletal muscle health. **Nutr Res**, Tarrytown, v. 49, p. 23-36, Jan. 2018.

CONTI-FINE, B. M.; MILANI, M.; KAMINSKI, H.J. Myasthenia gravis: past, present, and future. **J Clin Invest**, Ann Arbor, v. 116, n. 11, p. 2843–2854, Nov. 2006.

CRAGIN, L. A. *et al.* Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking water. **Environ Res**, Amsterdam, v. 111, n. 8, p. 1293-1301, Nov. 2011.

CROUCH, R. K. *et al.* The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, Alexandria, v. 30, n. 3, p. 235-241, Mar. 1981.

DETTBARN, W. D. *et al.* Oxidative stress, acetylcholine and excitotoxicity. *In*: MARWAH, J.; KANTHASAMY, A. (ed.). **Antioxidants and Free Radicals in Health and Disease**. Scottsdale: Prominent Press, 2001. P. 183-211.

DETTBARN, W. D.; MILATOVIC, D.; GUPTA, R. C. Oxidative stress in anticholinesterase-induced excitotoxicity. *In*: GUPTA, R. C. (ed.). **Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2006. P. 511–532.

DI VINCENZO, A. *et al.* Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Metabolic Properties of Tocopherols and Tocotrienols: Clinical Implications for Vitamin E Supplementation in Diabetic Kidney Disease. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 20, n. 20, p. 1-13, Oct. 2019.

DONG, W.; ZHANG, Y.; QUAN, X. Health Risk Assessment of Heavy Metals and Pesticides: A Case Study in the Main Drinking Water Source in Dalian, China. **Chemosphere**, Oxford, v. 242, Mar. 2020.

DORNELLES, M. F.; OLIVEIRA, G. T. Toxicity of atrazine, glyphosate, and quinclorac in bullfrog tadpoles exposed to concentrations below legal limits. **Environ Sci Pollut Res Int**, Berlin, v. 23, n. 2, p. 1610-1620, Jan. 2016.

EIDI, A. *et al.* Effect of vitamin E on memory retention in rats: possible involvement of cholinergic system. **Eur Neuropsychopharmacol**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 101-106, Feb. 2006.

EL-SHENAWY, N.S. *et al.* Mitigating Effect of Ginger against Oxidative Stress Induced by Atrazine Herbicides in Mice Liver and Kidney. **J Biofertil Biopestic**. 2(2), 1-7, 2011.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 88-95, July 1961.

ENGEL, A. G. The neuromuscular junction. *In*: ENGEL, A. G.; FRANZINIARMSTRONG, C. **Myology**: basic and clinical. 3rd. ed. New York: International Edition, 2003. V. 1. P. 325-372.

ERDEMLI, M. E. *et al.* Protective effects of melatonin and vitamin E in acetamidiprid-induced nephrotoxicity. **Environ Sci Pollut Res**, Berlin, p. 1-12, Jan. 2020.

FERNÁNDEZ-VEGA, C.; SANCHO, E.; FERRANDO, M. D. Energy reserves mobilization in the yellow eel as herbicide exposure effect. **Chemosphere**, Oxford, v. 135, p. 94–100, Sept. 2015.

FERREIRA, M. J. M.; VIANA JUNIOR, M. M. A expansão do agronegócio no semiárido cearense e suas implicações para a saúde, o trabalho e o ambiente. **Interface: comunicação, saúde, educação**, Botucatu, v. 20, n. 58, p. 649-660, 2016.

FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. **Nutrients**, Basel, v. 6, n. 2, 466-488, Jan. 2014.

FIGUEIRA, F. H.; AGUIAR, L. M.; ROSA, C. E. Embryo-larval exposure to atrazine reduces viability and alters oxidative stress parameters in *Drosophila melanogaster*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, New York, v.191, p. 78-85, Jan. 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Pesticide residues in food 2005: Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Rome: FAO, 2005.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I.; GALLEANO, M. In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 840, n. 2, p. 931-934, Feb. 2014.

FRANÇA, B. K. *et al.* Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **J Port Gastreterol**, Lisboa, v. 20, n. 5, p. 199-206, set. 2013.

GABOARDI, S. C.; CANDIOTTO, L. Z. P.; RAMOS, L. M. Perfil do uso de agrotóxicos no sudoeste do Paraná (2011-2016). **Rev. NERA**, Presidente Prudente, v. 22, n. 46, p. 13-40, jan./abr.2019.

GANESHWADE, R. *et al.* Toxicity of endosulfan on freshwater fish *Channa striatus*. **Trends in Fisheries Res**, Solapur, v. 1, n. 1, p. 29-31, 2012.

GAO, S. *et al.*, 2016. Oral Exposure to Atrazine Induces Oxidative Stress and Calcium Homeostasis Disruption in Spleen of Mic. **Oxid Med Cell Longev**, 2016, 1-9, 2016.

GRABOWIECKI, Y. V. *et al.* Regulation of a Notch3-Hes1 Pathway and Protective Effect by a Tocopherol-Omega Alkanol Chain Derivative in Muscle Atrophy. **J Pharmacol Exp Ther**, Bethesda, v. 352, p. 23-32, Jan. 2015.

GRIBOFF, J. *et al.* Oxidative stress response induced by atrazine in *Palaemonetes* 42anicutate: the protective effect of vitamin E. **Ecotoxicol Environ Saf**, Amsterdam, v. 108, p. 1-8, Oct. 2014.

HALL, Z. W.; SANES, J. R. Synaptic structure and development: the neuromuscular junction. **Cell**, Cambridge, v. 72, Suppl. P. 99-121, Jan. 1993.

HASAN, M. Y. *et al.* alpha-Tocopherol modifies lead induced functional changes at murine neuromuscular junction. **Free Radic Res**, London, v. 38, n. 12, p. 1321-1328, Dec. 2004.

HASE, Y. *et al.* Atrazine binds to F1F0-ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. **Biochem Biophys Res Commun**, San Diego, v. 366, n. 1, p. 66-72, Feb. 2008.

HASSANI, S. *et al.* Protective effects of curcumin and vitamin E against chlorpyrifos-induced lung oxidative damage. **Hum Exp Toxicol**, London, v. 34, n. 6, p. 668-676, 2015.

HE, H. *et al.* A Review on Recent Treatment Technology for Herbicide Atrazine in Contaminated Environment. **Int J Environ Res Public Health**, Basel, v. 16, n. 5129, p. 1-17, 2019.

HOLÁSKOVÁ, I. *et al.* Long-term Immunotoxic Effects of Oral Prenatal and Neonatal Atrazine Exposure. **Toxicol Sci**, Cary, NC, v. 168, n. 2, p. 497-507, Apr. 2019.

HOPPIN, J.A. *et al.* Respiratory disease in United States farmers. **Occup Environ Med**, 71(7), 484–491, 2014.

HU, R. *et al.* Long- and short-term health effects of pesticide exposure: a cohort study from China. **PloS One**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. 1-13, June 2015.

JAMES, K. A.; HALL, D. A. Groundwater Pesticide Levels and the Association With Parkinson Disease. **Int J Toxicol**, Thousand Oaks, v. 34, n. 3, p. 266-273, May 2015.

JESTADI, D. B. *et al.* Effects of Short Term Exposure of Atrazine on the Liver and Kidney of Normal and Diabetic Rats. **J Toxicol**, Cairo, Egypt, v. 2014, p. 1-7, 2014.

JI, Y. *et al.* Heat-activated persulfate oxidation of atrazine: Implications for remediation of groundwater contaminated by herbicides. **Chem Eng J**, Lausanne, v. 263, p. 45–54, 2015.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, Chicago, v. 26, n. 10, p. 853-856, Oct. 1991.

KALE, O. E.; OYESOLA, T. O.; RAJI, F. S. Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, offers chemoprevention against reproductive and neurobehavioural abnormalities induced by atrazine in male Wistar rats. **Environ Toxicol Pharmacol**, Amsterdam, v. 58, p. 84-97, Mar. 2018.

KAUR, G.; DOGRA, N.; SINGH, S. Health Risk Assessment of Occupationally Pesticide-Exposed Population of Cancer Prone Area of Punjab. **Toxicol Sci**, Cary, NC, v. 165, n. 1, p. 157-169, Sept. 2018.

KESHK, W. A. *et al.* Modulatory effects of curcumin on redox status, mitochondrial function, and caspase-3 expression during 43anacula-induced toxicity. **J Biochem Mol Toxicol**, New York, v. 28, n. 8, p. 378-385, Aug. 2014.

KIMURA, K. *et al.* Effects of pesticides on the peripheral and central nervous system in tobacco farmers in Malaysia: studies on peripheral nerve conduction, brain-evoked potentials and computerized posturography. **Ind Health**, Kawasaki, 43, n. 2, p. 285-294, Apr. 2005.

- KORI, R. K. *et al.* Cholinesterase inhibition and its association with hematological, biochemical and oxidative stress markers in chronic pesticide exposed agriculture workers. **J Biochem Mol Toxicol**, New York, v. 33, n. 9, p. 1-10, Sept. 2019.
- KOTEGAWA, M. *et al.* Effect of alpha-tocopherol on high energy phosphate metabolite levels in rat heart by ³¹P-NMR using a Langendorff perfusion technique. **J Mol Cell Cardiol**, London, v. 25, n. 9, p. 1067-1074, Sept. 1993.
- LEBARON, H. M.; MACFARLAND, J. E.; BURNSIDE, O. C. (ed.). **The triazine herbicides: 50 years revolutionizing agriculture**. Amsterdam: Elsevier, 2008.
- LEHRER, G. M.; ORNSTEIN, L. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. **J Biophys Biochem Cytol**, Baltimore, v. 6, p. 399-406, Dec. 1959.
- LI, P. *et al.* Isoflavones Induce BEX2-Dependent Autophagy to Prevent ATR-Induced Neurotoxicity in SH-SY5Y Cells. **Cell Physiol Biochem**, Basel, New York, v. 43, n. 5, p. 1866-1879, 2017.
- LIM, S. *et al.* Chronic exposure to the herbicide, atrazine, causes mitochondrial dysfunction and insulin resistance. **PLoS One**, San Francisco, v. 4, n. 4, p. 1-11, 2009.
- LIN, J. *et al.* Atrazine triggers mitochondrial dysfunction and oxidative stress in quail (*Coturnix C. coturnix*) cerebrum via activating xenobiotic-sensing nuclear receptors and modulating cytochrome P450 systems. **J Agric Food Chem**, Washington, DC, v. 66, n. 25, p. 6402-6413, June 2018.
- LIN, Z.; DODD, C. A.; FILIPOV, N. M. Differentiation state-dependent effects of in vitro exposure to atrazine or its metabolite diaminochlorotriazine in a dopaminergic cell line. **Life Sci**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 81-90, Jan. 2013.
- LIU, W. *et al.* Effects of atrazine on the oxidative damage of kidney in Wister rats. **Int J Clin Exp Med**, Madison, v. 7, n. 10, p. 3235-3243, 2014.
- LIU, Z. *et al.* Atrazine and its main metabolites alter the locomotor activity of larval zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, Oxford, v. 148, p. 163-170, Apr. 2016.
- LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde debate**, rio de Janeiro, v. 42, n. 117, abr./jun. 2018.
- MA, K. *et al.* Neurotoxicity effects of atrazine-induced SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells via microglial activation. **Mol Biosyst**, Cambridge, v. 11, n. 11, p. 2915-2924, Nov. 2015.
- MAC LOUGHLIN, C. *et al.* Effects of atrazine on growth and sex differentiation, in juveniles of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Ecotoxicol Environ Saf**, Amsterdam, v. 131, p. 96–103, Sept. 2016.

MACHADO, K. C. *et al.* A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Sci Total Environ**, Amsterdam, v. 572, p. 138–146, Dec. 2016.

MALOMOUZH, A. I. NON-Cholinergic Signaling Pathways at Vertebrate Neuromuscular Junctions. *In*: CSERI, J. (ed.). **Skeletal muscle**: from myogenesis to clinical relations. Kazan: InTech, 2012. P. 380.

MANGGE, H. *et al.* Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. **World J Cardiol**, Pleasanton, v. 6, 6, p. 462–477, June 2014.

MANSOUR, S. *et al.* Adverse Effects to Suckling Mice Following Indirect Exposure to a Pesticide Mixture and Ameliorative Effect of α -Tocopherol Coadministration. **J Bachs**, Kızılay, v. 1, n. 3, p. 71-78, 2017.

MAZZANTI, C. M. *et al.* Pre-treatment with ebselen and vitamin E modulate acetylcholinesterase activity: interaction with demyelinating agents. **Int J Dev Neurosci**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 73-80, Feb. 2009.

MCGARRY, K.G. *et al.* Characterization of Cholinesterases From Multiple Large Animal Species for Medical Countermeasure Development Against Chemical Warfare Nerve Agents. **Toxicol Sci**, Cary, v. 174, n. 1, p. 124-132, Mar 2020.

MENDONÇA, A. C.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. **J Neurosci Methods**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 183-190, Oct. 2003.

MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 19, p. 16240-16265, 2014.

MILATOVIĆ, D. *et al.* Alterations in cytochrome c oxidase activity and energy metabolites in response to kainic acid-induced status epilepticus. **Brain Res**, Amsterdam, v. 912, n. 1, p. 67-78, Aug. 2001.

MLADENOVIĆ, M. *et al.* The Targeted Pesticides as Acetylcholinesterase Inhibitors: Comprehensive Cross-Organism Molecular Modelling Studies Performed to Anticipate the Pharmacology of Harmfulness to Humans In Vitro. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 9, p. 1-37, Aug. 2018.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive Oxygen Species, Vascular Nox, and Hypertension: Focus on Translational and Clinical Research. **Antioxid Redox Signal**, Larchmont, v. 20, n. 1, p. 164–182, Jan. 2014.

MOSQUIN, P.; WHITMORE, R. W.; CHEN, W. Estimation of upper centile concentrations using historical atrazine monitoring data from community water systems. **J Environ Qual**, Madison, v. 41, n. 3, p. 834-844, 2012.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicol Appl Pharmacol**, New York, v. 268, n. 2, p. 157–177, Apr. 2013.

NAKAMURA, W.; HOSODA, S.; HAYASHI, K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 358, n. 2, p. 251-261, Aug. 1974.

NICOLOPOULOU-STAMATI, P. *et al.* Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. **Front Public Health**, Lausanne, v. 4, p. 1-8, July 2016.

NIGATU, A. W.; BRÅTVEIT, M.; MOEN, B. E. Self-reported acute pesticide intoxications in Ethiopia. **BMC Public Health**, London, v. 16, p. 1-8, 2016.

NOVAIS, S. C. *et al.* Antioxidant and neurotoxicity markers in the model organism *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta): mechanisms of response to atrazine, dimethoate and carbendazim. **Ecotoxicology**, Boston, v. 23, n. 7, p. 1220-1233, Sept. 2014.

OLIVEIRA, M. L. F. de; BURIOLA, A. A. Gravidade das intoxicações por inseticidas inibidores das colinesterases no noroeste do estado do Paraná, Brasil. **Rev Gaucha Enferm**, Porto Alegre, v. 30, n. 4, p. 648-655, 2009.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD guidelines for the testing of chemicals**: test n°. 424: neurotoxicity study in rodents. [Paris]: OECD, 1997.

PATHAK, R. K.; DIKSHIT, A. K. Atrazine and Human Health. **IJE**, Rosemead, v. 1, n. 1, p. 14-23, 2011.

PECEV-MARINKOVIĆ, E. *et al.* Optimization and validation of the kinetic spectrophotometric method for quantitative determination of the pesticide atrazine and its application in infant formulae and cereal-based baby food. **J Sci Food Agric**, Chichester, West Sussex, v. 99, n. 12, p. 5424-5431, Sept. 2019.

PETROV, K. A.; NIKOLSKY, E. E.; MASSON, P. Autoregulation of Acetylcholine Release and Micro-Pharmacodynamic Mechanisms at Neuromuscular Junction: Selective Acetylcholinesterase Inhibitors for Therapy of Myasthenic Syndromes. **Front Pharmacol**, [Lausanne], v. 9, n. 766, p. 1-8, July 2018.

POGRMIC-MAJKIC, K. *et al.* Upregulation of peripubertal rat Leydig cell steroidogenesis following 24 h in vitro and in vivo exposure to atrazine. **Toxicol Sci**, Cary, v. 118, n. 1, p. 52-60, Nov. 2010.

PUNZ, A. *et al.* Effect of alpha-tocopherol pretreatment on high energy metabolites in rabbit skeletal muscle after ischemia-reperfusion. **Clin Nutr**, Edinburgh, v. 17, n. 2, p. 85-87, Apr. 1998.

RATHINAM, X. *et al.* Farmers and Formulations--Rural Health Perspective. **Med J Malaysia**, Kuala Lumpur, v. 60, n. 1, p. 118-124, Mar. 2005.

R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. R: **A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation, 2019. <https://www.R-project.org/>.

RODRIGUEZ, V. M. *et al.* Behavioral effects and neuroanatomical targets of acute atrazine exposure in the male Sprague-Dawley rat. **Neurotoxicology**, Amsterdam, v. 58, p. 161-170, Jan. 2017.

ROSINI, M. *et al.* Rational Approach To Discover Multipotent Anti-Alzheimer Drugs. **J Med Chem**, Washington, DC, v. 48, n. 2, 360-363, 2005.

RUFF, R. L. Neurophysiology of the neuromuscular junction: overview. **Ann NY Acad Sci**, New York, v. 998, p. 1-10, Sept. 2003.

SAGARKAR, S. *et al.* Atrazine exposure causes mitochondrial toxicity in liver and muscle cell lines. **Indian J Pharmacol**, Mumbai, v. 48, n. 2, p. 200–207, Mar./Apr. 2016.

SAMANTA, P. *et al.* Evaluation of Metabolic Enzymes in Response to Excel Mera 71, a Glyphosate-Based Herbicide, and Recovery Pattern in Freshwater Teleostean Fishes. **Biomed Res Int**, New York, v. 2014, p. 1-6, June 2014.

SÁNCHEZ, O. F. *et al.* Profiling epigenetic changes in human cell line induced by atrazine exposure. **Environ Pollut**, Barking, Essex, England, v. 258, 2020.

SANES, J. R.; LICHTMAN, J. W. Development of the vertebrate neuromuscular junction. **Annu Rev Neurosci**, Palo Alto, v. 22, p. 389-442, 1999.

SCHMIDEL, A. J. *et al.* Subchronic atrazine exposure changes defensive 47anicula profile and disrupts brain acetylcholinesterase activity of zebrafish. **Neurotoxicol Teratol**, New York, v. 44, p. 62–69, July/Aug. 2014.

SERVAIS, S. *et al.* Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation: links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? **Free Radic Biol Med**, Tarrytown, v. 42, n. 5, p. 627–635, Mar. 2007.

SHELLEY, L. K. *et al.* Toxicity of atrazine and nonylphenol in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects on general health, disease susceptibility and gene expression. **Aquat Toxicol**, Amsterdam, v. 124–125, p. 217–226, Nov. 2012.

SHIRISHA, K.; MASTAN, M. Effect of Antioxidant status on liver following Atrazine exposure and its protection by *Andrographis 47aniculate*. **IOSR J Pharm Biol Sci**, Ghaziabad, v. 7, n. 1, p. 36-41, July/Aug. 2013.

SIMPKINS, J. W. *et al.* Atrazine and Breast Cancer: A Framework Assessment of the Toxicological and Epidemiological Evidence. **Toxicol Sci**, Cary, NC, v. 123, n. 2, p. 441–459, Oct. 2011.

SINGH, M. *et al.* Protective effects of vitamin E against atrazine-induced genotoxicity in rats. **Mutat Res**, Amsterdam, v. 654, n. 2, p. 145-149, July 2008.

SINGH, M.; SANDHIR, R.; KIRAN, R. Effects on antioxidant status of liver following atrazine exposure and its attenuation by vitamin E. **Exp Toxicol Pathol**, [Munich], v.

63, n. 3, p. 269-276, Mar. 2011.

SLATER, C. R. The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 18, n. 10, p. 1-18, Oct. 2017.

SOUZA, P. M. S. *et al.* Desenvolvimento de nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 132-137, 2012.

SLAGER, R.E. *et al.* Rhinitis Associated with Pesticide Use Among Private Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. **J Toxicol Environ Health A**, 73(20), 1382–1393, 2010.

SZYMAŃSKA, R.; NOWICKA, B.; KRUK, J. Vitamin E – Occurrence, Biosynthesis by Plants and Functions in Human Nutrition. **Mini Rev Med Chem**, Hilversum, The Netherlands, v. 17, n. 12, p. 1039-1052, 2017.

VAN ACKER, S. A.; KOYMANS, L. M.; BAST, A. Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity. **Free Radic Biol Med**, Tarrytown, v. 15, n. 3, p. 311–328, Sept. 1993.

WANG, H. *et al.* Effects of Atrazine on the Development of Neural System of Zebrafish, *Danio rerio*. **Biomed Res Int**, New York, v. 2015, p. 1-11, 2015.

WIRBISKY, S. E. *et al.* Embryonic atrazine exposure alters zebrafish and human miRNAs associated with angiogenesis, cancer, and neurodevelopment. **Food Chem Toxicol**, Exeter, v. 98, pt A, p. 25-33, Mar. 2016.

XING, H. *et al.* Alterations in Mrna expression of acetylcholinesterase in brain and muscle of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. **Ecotoxicol Environ Saf**, Amsterdam, v. 73, n. 7, p.1666–1670, Oct. 2010.

YOON, D. S. *et al.* Effects of atrazine on life parameters, oxidative stress, and ecdysteroid biosynthetic pathway in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. **Aquat Toxicol**, Amsterdam, v. 213, Aug. 2019.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2009.

ZHANG, B.; MA, K.; LI, B. Inflammatory reaction regulated by microglia plays a role in atrazine-induced dopaminergic neuron degeneration in the substantia nigra. **J Toxicol Sci**, Sapporo, v. 40, n. 4, p. 437-450, Aug. 2015.

ŽIVKOVIĆ SEMREN, T.; ŽUNEC, S.; PIZENT, A. Oxidative stress in triazine pesticide toxicity: a review of the main biomarker findings. **Arh Hig Rada Toksikol**, Zagreb, Croatia, v. 69, p. 109-125, 2018.

6 ANEXO 1 – ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido na revista: **Ecotoxicology and Environmental Safety** (Co-Editors-in-Chief: Richard Handy, Bing Yan) Fator de impacto: **4.640**

Após exposição subcrônica ao herbicida Atrazina, vitamina E reduz estresse oxidativo no músculo diafragma de ratos

Viviane da Silva Martins Lopes Corrêa^{ab}, Carina Guidi Pinto^{ab}, Ana Paula Silveira Leite^{ab}, Felipe Cantore Tibúrcio^{ab}, Fabio Anselmo^c, Antonio Francisco Godinho^c, Ana Angélica Henrique Fernandes^d, Selma Maria Michelin Matheus^{ab}

^aUniversidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Anatomia, Rua Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, 250, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, Brasil - CEP 18618-689 - Telefone: (14) 3880-0025 - uscestetica@gmail.com, carina_guidi@hotmail.com, apsleitebio@hotmail.com, felipe_cantore@hotmail.com, selma.matheus@unesp.br

^bUniversidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Rua Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, 250, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, Brasil - CEP 18618-689 - Telefone: (14) 3880-0025

^cUniversidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), Rua Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, 250, CEATOX, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, Brasil - CEP 18618-689 - Telefone: 14 3880-0673 - anselmof_unesp@yahoo.com.br, af.godinho@unesp.br

^dUniversidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Departamento de Química e Bioquímica, Rua Dr. Antonio Celso Wagner Zanin, 250, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, Brasil - CEP 18618-689. - Telefone: 14 3880-0600 - anaangelica@ibb.unesp.br

Resumo

O herbicida atrazina (AZ) é um dos mais utilizados, e tem promovido várias alterações sobre os sistemas orgânicos do homem e de outros animais. Esta substância tem sido associada ainda a presença de estresse oxidativo, o qual por vezes é revertido pela associação com antioxidantes, como a vitamina E. A vitamina E age principalmente neutralizando os radicais livres e protegendo as membranas celulares contra dano oxidativo, também regula a produção de espécies reativas de oxigênio, mantendo a fosforilação oxidativa da mitocôndria. Considerando que não há relatos na literatura em relação ao efeito da AZ sobre a interação neuromuscular de mamíferos, o objetivo desse trabalho foi avaliar após exposição subcrônica à AZ o efeito protetor da vitamina E sobre o estresse oxidativo e a interação neuromuscular no músculo diafragma de ratos. Foram utilizados 52 ratos Wistar, machos adultos (CEUA/IBB protocolo 897/2016). Os animais receberam por 28 dias via gavagem às seguintes substâncias de acordo com os grupos formados: Grupo C: controle (0,3 ml de óleo de milho); Grupo AZ: tratado com atrazina (100 mg/kg); Grupo AZE: atrazina (100 mg/kg) + vitamina E (200 mg/kg); Grupo E: 200 mg/kg vitamina E. Decorrido o período experimental (28 dias) os animais foram anestesiados e a seguir eutanasiados por decapitação. Os nervos frênicos direito foram coletados e submetidos a análise morfológica e morfométrica. Os músculos diafragmas foram reduzidos a fragmentos contendo o ponto motor e processados para: a) análise bioquímica de estresse oxidativo; b) análise morfológica e morfométrica das fibras musculares (HE) e da quantificação da porcentagem de colágeno (Picrossirius Red); c) análise morfológica e morfométrica das junções neuromusculares (JNMs) através de microscopia de luz e dos nAChR através da microscopia confocal. Os resultados mostraram em relação aos marcadores de estresse oxidativo, que o grupo AZ apresentou os maiores valores da catalase, do hidroperóxido de lipídeo, e da Capacidade Antioxidante Hidrofílica; e os menores valores da superóxido dismutase. Quando associada à vitamina E houve inversão desses valores. Não houve diferenças entre os grupos em relação à glutatona peroxidase, a morfologia e a morfometria do nervo frênico e na porcentagem de colágeno. Já a área e o diâmetro das fibras musculares foram maiores no grupo E. Mas quando houve associação da vitamina E à AZ, houve diminuição desses parâmetros. Já em relação ao diâmetro das JNMs houve aumento no diâmetro máximo quando a vitamina E foi associada a AZ, embora diferenças morfológicas não tenham sido observadas através da microscopia confocal. A partir desses resultados podemos concluir que a exposição à atrazina neste modelo experimental promoveu estresse oxidativo nas fibras musculares do diafragma de ratos. O efeito pró-oxidante da AZ não provocou alteração sobre a interação neuromuscular (fibras musculares, nervo e junções neuromusculares). A vitamina E exerceu papel antioxidante gerado pela exposição subcrônica à AZ.

Palavras-chave: Atrazina; Vitamina E; Estresse oxidativo.

1. Introdução

Os praguicidas são substâncias químicas usadas em diferentes culturas na proteção, prevenção, destruição ou controle de organismos ou doenças prejudiciais às plantações (Béranger *et al.*, 2020).

Existem evidências ligadas à exposição dos praguicidas e a incidência de doenças crônicas humanas, incluindo diabetes (Jestadi *et al.*, 2014), câncer (Wirbisky *et al.*, 2016; Chevalier *et al.*, 2016; Kaur *et al.*, 2018; Brasil *et al.*, 2018), Parkinson (James & Hall, 2015), Alzheimer e esclerose múltipla (Xing *et al.*, 2010; Pathak & Dikshit, 2011; Souza *et al.*, 2012; Mostafalou & Abdollahi, 2013).

Sinais e sintomas comuns da intoxicação por organofosforados incluem miose, aumento de secreções, convulsões, convulsões e insuficiência respiratória (Mcgarry *et al.*, 2020).

Os biomarcadores mais comuns usados para avaliar os efeitos de praguicidas estão relacionados com os danos no DNA e RNA, a modulação da expressão gênica, modificações epigenéticas e o estresse oxidativo (Živković *et al.*, 2018; Sánchez *et al.*, 2020).

A atrazina (AZ) (2-cloro-4-(etilamino)-6-isopropilamino-s-triazina) é um herbicida pertencente ao grupo das s-triazinas, sendo responsável por 30% dos praguicidas produzidos mundialmente (Abarikwu & Farombi, 2015).

Em vários países, os sistemas aquáticos próximos de propriedades agrícolas têm apresentado em suas amostras a presença de AZ e seus metabólitos (Liu *et al.*, 2016), o que representa uma ameaça significativa para o ecossistema aquático e a saúde humana (Ji *et al.*, 2015). Tem sido descrito ainda desordens respiratórias como faringite, bronquite, asma, insuficiência respiratória, pneumonia, dispneia, catarro nasal, sinusite, irritação da faringe e irritação nasal associada ao uso de AZ

(Rathinam *et al.*, 2005).

Estudo entre agricultores expostos a pesticidas, incluindo a AZ em comparação com controles não agrícolas, demonstraram aumentos nos biomarcadores para estresse oxidativo e danos ao DNA (Lerro *et al.*, 2017).

O uso do herbicida AZ além de danos ao DNA e da formação de espécies reativas de oxigênio, provoca interrupções na homeostase do cálcio, diminui a atividade antioxidante da glutathione, provocando assim, imunotoxicidade no organismo de outros mamíferos como camundongos (Gao *et al.*, 2016).

A vitamina E age principalmente como antioxidante, neutralizando os radicais livres e protegendo as membranas celulares contra danos oxidativos (Van acker *et al.*, 1993), também regula a produção de espécies reativas de oxigênio (Chow *et al.*, 1999) mantendo a fosforilação oxidativa da mitocôndria (Kotegawa *et al.*, 1993; Punz *et al.*, 1998).

A associação da vitamina E e a AZ tem mostrado resultados positivos sobre o estresse oxidativo (Singh *et al.*, 2011) e também o uso da vitamina E associado a outros praguicidas atuou como antioxidante (Mansour *et al.*, 2017; Abouelghar *et al.*, 2019; Erdemli *et al.*, 2020).

Os herbicidas estão associados a alterações respiratórias e tem sido relatado como agravante de problemas respiratórios crônicos, contribuindo para a exacerbação da asma, rinite, faringite e pneumonia (Rathinam *et al.*, 2005; Slager *et al.*, 2010; Hoppin *et al.*, 2014).

Considerando que o músculo diafragma atua como um fole nos movimentos respiratórios sob inervação do nervo frênico o objetivo desse estudo foi após administração subcrônica de AZ analisar o efeito protetor da vitamina E sobre o estresse oxidativo e a interação neuromuscular (nervo, músculo e junções

neuromusculares) no músculo diafragma de ratos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Foram utilizados 52 ratos Wistar, machos, adultos, (CEUA 897/2016) e foram mantidos sob condições padronizadas de temperatura ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$), fotoperíodo (12h:12h) umidade e ventilação, recebendo água e ração à vontade. Os animais foram divididos em quatro grupos (n=13 em cada grupo), de acordo com as substâncias que receberam diariamente via gavagem: Controle (C) 0,3 ml de óleo de milho; Atrazina (AZ) (atrazina:100 mg/kg); Atrazina + vitamina E (AZE) (atrazina + vitamina E :100 mg/kg +200 mg/kg), Vitamina E (E) (vitamina E : 200 mg/kg). Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (2005), para estudos com ratos, por via oral, considera-se para AZ a LOAEL de 10-70 mg/kg. Por outro lado, a Dose Letal 50 da AZ em ratos expostos oralmente foi de 1870 a 3090 mg/kg. A dose escolhida para este estudo foi a de 100 mg/kg, considerada como subcrônica.

Decorridos 28 dias os animais foram pesados (dados não mostrados), anestesiados e decapitados. Fragmentos do músculo diafragma foram dissecados e submetidos às seguintes análises:

2.2. Avaliação do estresse oxidativo

- *determinação da atividade de glutathione peroxidase*: determinada segundo método de Nakamura *et al.* (1974);
- *determinação da atividade de superóxido dismutase*: determinada pela técnica de Crouch *et al.* (1981);
- *determinação da atividade da catalase*: como descrito por Aebi (1974);
- *determinação de hidroperóxido de lipídio*: de acordo com Jiang *et al.* (1991).
- *determinação da Capacidade antioxidante Hidrofílica (CAH)*: de acordo com

Beretta *et al.* (2006).

2.3. Análise morfológica e morfométrica das fibras musculares (HE) e Porcentagem de colágeno (Picrossirus Red)

Porções musculares foram congelados em nitrogênio líquido, a seguir foi realizada microtomia em criostato (6 μm), e confeccionadas 2 lâminas as quais foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e Picrossirus Red.

Foram realizados cálculos da área e do diâmetro das fibras musculares (HE) através do software Sigma Scan Pro 5, a partir de 200 fibras musculares selecionadas de 4-5 campos aleatórios.

Para a porcentagem de colágeno (Picrossirus Red) foi utilizado o software Leica QWin a partir de imagens obtidas de 5 campos aleatórios de cada animal de cada grupo experimental.

2.4. Análise morfológica e morfométrica do nervo frênico

Os nervos frênicos direitos foram coletados, fixados e corados com tetróxido de ósmio a 1% e incluídos em historesina. Após microtomia (2 μm) as lâminas obtidas foram contra-coradas com azul de toluidina e submetidas à análise morfométrica (software "Sigma Scan Pro 5"): do número, diâmetro e área das fibras nervosas, dos diâmetros e áreas dos axônios, e o cálculo da espessura da bainha de mielina e da Razão G.

2.5. Análise das junções neuromusculares (JNM)

Fragmentos musculares do músculo diafragma foram fixados em solução de Karnovsky, cortados longitudinalmente em 3 ou 4 fatias, e submetidos à reação de Esterase Inespecífica (Lehrer; Ornstein, 1959). Foi realizada análise da área e do

diâmetro máximo das JNMs (Image J) a partir de cinquenta imagens de JNM por animal, totalizando 250 junções para cada grupo experimental.

Para a análise em microscopia confocal os fragmentos musculares foram fixados com paraformaldeído 2%, e submetidos ao protocolo para marcação dos receptores de acetilcolina: várias lavagens com PBS, incubação com glicina 0,1 M por 20 min em agitador orbital, novas lavagens em PBS, incubação durante 30 min com α -bungarotoxina conjugada a rodamina (Rh-BTX – Molecular Probes T1175,1:1000 em PBS). Novas lavagens com PBS e incubação em 1 hora com Triton X-100 1% (Sigma T9284), montagem das lâminas com Vectashield e análise e fotodocumentação em microscópio confocal de Varredura a Laser (Leica -TCS-SPE).

2.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando técnica da análise de variância para o modelo com dois fatores complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey (ZAR, 2009), considerando o nível de 5% de significância. Para essas análises foi utilizado o software estatístico R-Gui versão 3.6.2 (R Foundation For Statistical Computing. 2019).

3. Resultados

3.1. Avaliação do estresse oxidativo

Através dessas análises foi possível observar que no grupo AZ (214,29 \pm 17,55) houve aumento na atividade do hidropéroxido de lipídio quando comparado com os animais do grupo C (106,80 \pm 24,80). Já no grupo AZE (144,92 \pm 38,35) quando comparado ao AZ houve diminuição desse parâmetro ($p < 0,01$). Em relação ao grupo E (94,81 \pm 12,14) houve diminuição quando da atividade comparado ao grupo AZE (144,92 \pm 38,35) ($p < 0,01$) (Fig. 1A).

Em relação à catalase a resposta foi semelhante onde no grupo AZ ($30,08 \pm 5,73$) houve aumento na atividade dessa enzima quando comparada ao grupo C ($21,22 \pm 6,72$) ($p < 0,01$). Quando a vitamina E foi associada observou-se diminuição desse parâmetro no grupo AZE ($21,66 \pm 6,96$) ($p < 0,01$) (Fig. 1B).

Em relação à quantificação da superóxido dismutase, o grupo AZ ($2,70 \pm 0,11$) apresentou os menores valores quando comparado aos animais do grupo C ($3,40 \pm 0,35$) ($p < 0,05$) e do grupo AZE ($3,48 \pm 0,47$) ($p < 0,05$). Já os animais do grupo E ($5,44 \pm 0,89$) apresentaram os maiores valores frente a essa enzima, quando comparados aos animais do grupo C ($3,40 \pm 0,35$) ($p < 0,01$) e do grupo AZE ($3,48 \pm 0,47$) ($p < 0,01$) (Fig. 1C).

A análise da enzima glutathiona peroxidase não apresentou diferenças entre os grupos: C ($116,42 \pm 21,13$), AZ ($106,24 \pm 15,98$), E ($96,96 \pm 22,39$), AZE ($118,74 \pm 23,08$) ($p > 0,05$) (Fig. 1D).

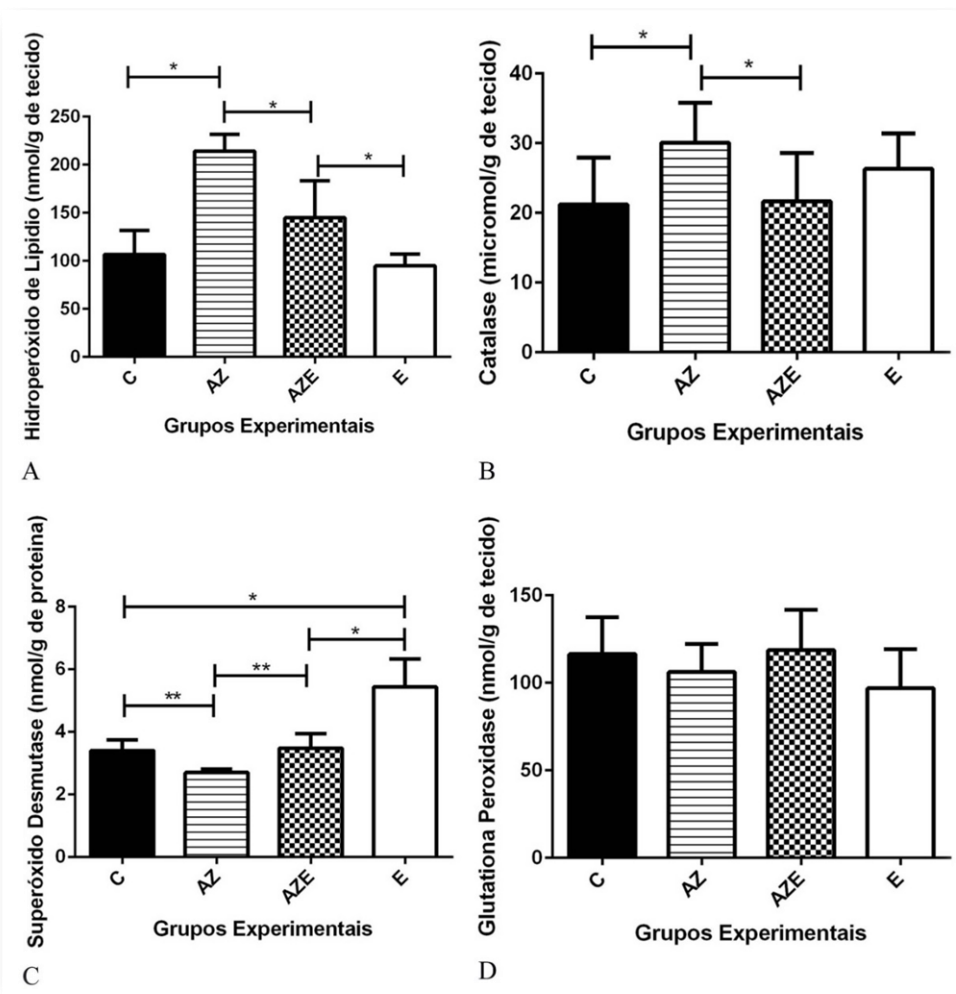


Fig. 1: Gráficos das médias e desvios padrões da determinação enzimática de: A- Hidroperóxido de Lipídio, B- Catalase, C- Superóxido Dismutase, D- Glutaciona Peroxidase. Valores expressos em médias e desvio padrão da média segundo os grupos experimentais, C: controle, AZ: Atrazina, AZE: Atrazina + Vitamina E, E: Vitamina E (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$).

Os resultados referentes a avaliação da Capacidade antioxidante hidrofílica estão apresentados em porcentagem de proteção. Os maiores valores foram encontrados no grupo AZ ($60,24 \pm 2,46$) quando comparados ao C ($57,29 \pm 1,06$) ($p < 0,05$). Quando a vitamina E foi associada houve diminuição desse parâmetro no grupo AZE ($54,42 \pm 2,41$) ($p < 0,01$). Entre o grupo C ($57,29 \pm 1,06$) e o grupo E ($55,32 \pm 3,05$) não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Fig. 2).

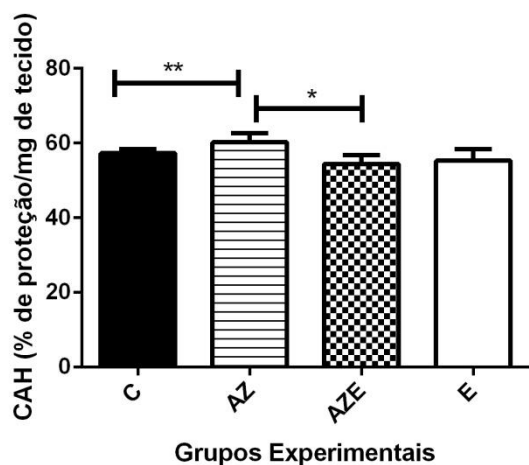


Fig. 2: Gráficos das médias e desvios padrões da média segundo os grupos experimentais, C: controle, AZ: Atrazina, AZE: Atrazina + Vitamina E, E: Vitamina E, da porcentagem da Capacidade antioxidante hidrofílica (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$).

3.2. Análise morfológica e morfométrica das fibras musculares (HE) e Porcentagem de colágeno (Picrossirus Red)

Quanto à morfologia das fibras musculares, não foi possível notar diferenças entre os grupos, sendo que em todos os grupos as fibras musculares apresentaram características compatíveis com a normalidade: fibras musculares em formato poligonal e com núcleos periféricos (Fig. 3A-D).

Em relação à análise morfométrica os dados revelaram que quanto à área das fibras os animais do grupo E ($1639,46 \pm 321,80$) foram os que apresentaram os maiores valores quando comparado com o grupo C ($1368,77 \pm 149,22$) (* $p < 0,05$). Os animais dos grupos AZE ($1145,74 \pm 105,99$) apresentaram os menores valores de área das fibras musculares quando comparado com o grupo E ($1639,46 \pm 321,80$) (** $p < 0,01$) (Fig. 3E). Os valores do diâmetro menor das fibras musculares tiveram essa mesma resposta onde os animais do grupo E ($35,46 \pm 2,76$) foram os que apresentaram os maiores valores quando comparados com os animais dos grupos C ($32,43 \pm 1,58$) (** $p < 0,01$). Os animais dos grupos AZE ($31,13 \pm 1,87$) apresentaram os menores valores de diâmetro menor das fibras musculares em relação aos

animais do grupo E ($35,46 \pm 2,76$) (** $p < 0,01$) (Fig. 3F).

Através da coloração de Picrossirius Red pôde-se evidenciar as fibras colágenas presentes no endomísio e perimísio, as quais foram marcadas em vermelho e as fibras musculares em amarelo. Essa análise foi realizada através de microscopia óptica de luz convencional (Fig. 3a-d). Tanto a análise morfológica quanto a da porcentagem de colágeno não mostrou diferenças entre os grupos estudados (C: $15,18 \pm 4,57$; AZ: $14,07 \pm 1,13$; E: $15,95 \pm 2,30$; AZE: $14,55 \pm 1,11$) ($p > 0,05$) (Fig. 3G).

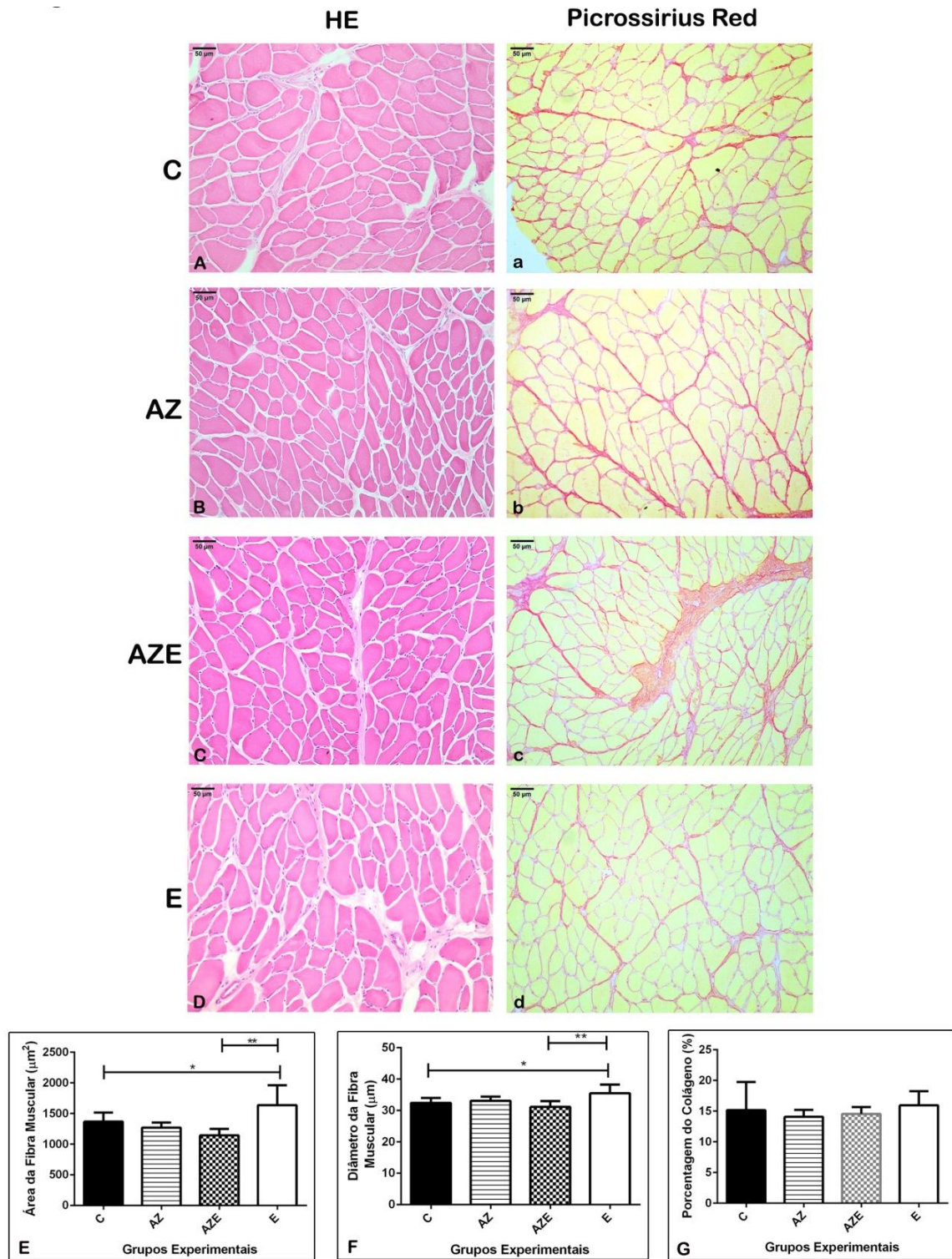


Fig. 3: (A-D) Fotomicrografias de cortes transversais do músculo diafragma corados com HE de todos os grupos experimentais em microscopia de luz convencional. (A-D) Fotomicrografias de cortes transversais do músculo diafragma corados com Picrossirius Red de todos os grupos experimentais em microscopia de luz convencional. (E-G) Gráfico das médias e desvio padrão das médias da área da fibra muscular, diâmetro menor da fibra muscular e porcentagem do colágeno respectivamente para todos os grupos experimentais, C: Controle, AZ: Atrazina, AZE: Atrazina + Vitamina E, E: Vitamina E (* p < 0,05; **p < 0,01).

3.3. Análise morfológica e morfométrica do nervo frênico

A análise morfológica evidenciou padrão de normalidade entre todos os grupos. Sendo que histologicamente os axônios apresentaram bainha de mielina íntegra sem sinais de degeneração, de edema endoneural e de infiltrado inflamatório (Fig. 4A-D). Esses resultados foram confirmados pela morfometria onde não foi observada diferença estatística entre os grupos frente a todos os parâmetros analisados: número de fibras nervosas (C: $428,40 \pm 91,02$; AZ: $439,80 \pm 34,60$; E: $387,60 \pm 50,89$; AZE: $453,80 \pm 56,50$), área das fibras nervosas (C: $42,69 \pm 7,41$; AZ: $43,81 \pm 8,28$; E: $45,21 \pm 11,56$; AZE: $35,86 \pm 6,55$), diâmetro médio das fibras nervosas (C: $6,36 \pm 0,66$; AZ: $6,47 \pm 0,67$; E: $6,41 \pm 0,87$; AZE: $5,67 \pm 0,78$), área dos axônios (C: $15,20 \pm 4,53$; AZ: $13,68 \pm 1,77$; E: $14,53 \pm 5,84$; AZE: $9,84 \pm 2,09$), diâmetro médio dos axônios (C: $3,59 \pm 0,61$; AZ: $3,40 \pm 0,34$; E: $3,33 \pm 0,81$; AZE: $2,69 \pm 0,51$), espessura da bainha (C: $1,39 \pm 0,14$; AZ: $1,54 \pm 0,25$; E: $1,54 \pm 0,19$; AZE: $1,49 \pm 0,16$) e cálculo da razão G (C: $0,56 \pm 0,05$; AZ: $0,53 \pm 0,04$; E: $0,51 \pm 0,08$; AZE: $0,47 \pm 0,04$) ($p > 0,05$) (Fig. 4E-K).

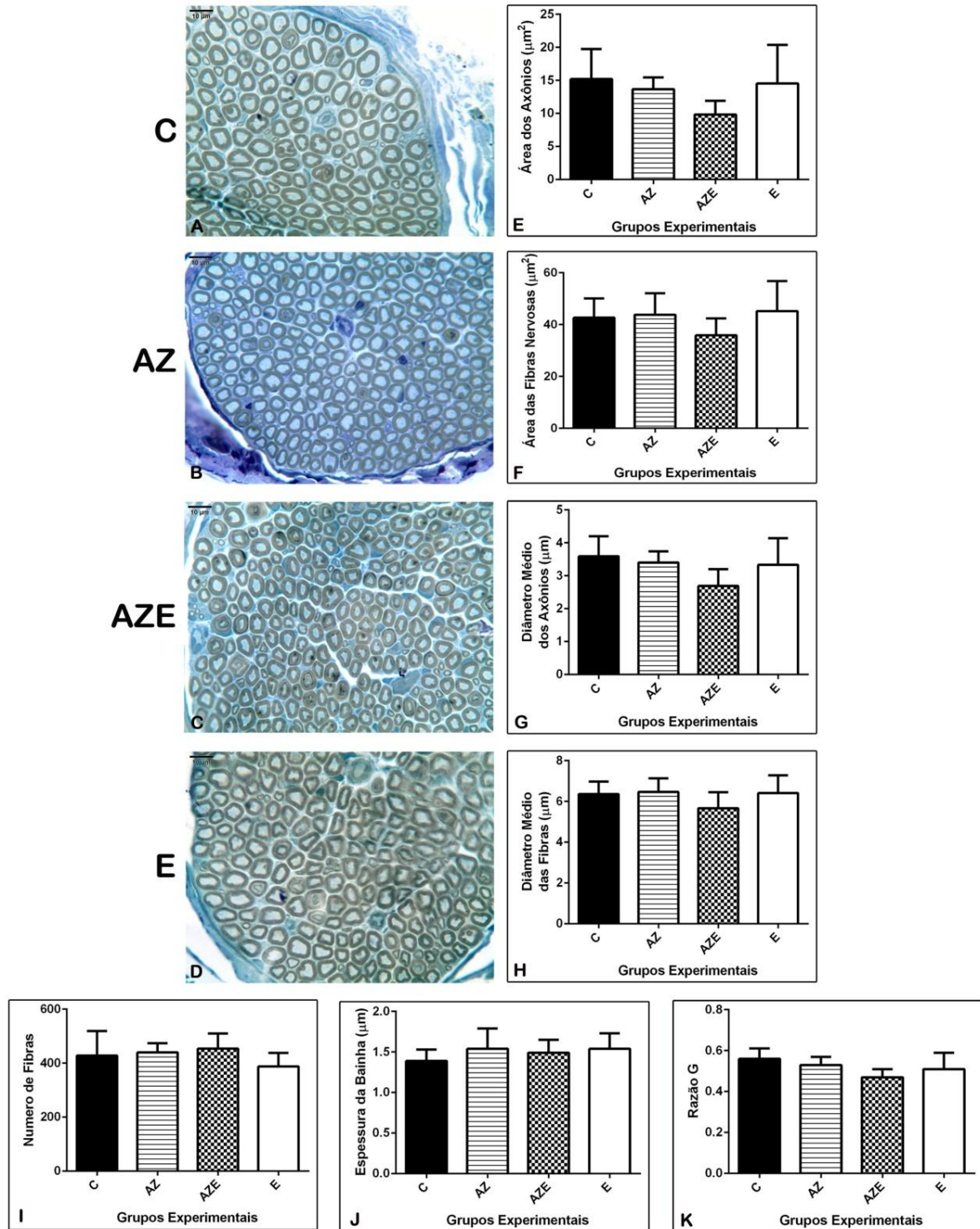


Fig. 4: A-D: Fotomicrografias de seções transversais do nervo frênico coradas em tetróxido de ósmio. Para todos os grupos experimentais A: grupo controle (C); B: Grupo Atrazina (AZ); C: Grupo Atrazina + Vitamina E (AZE); D: Grupo Vitamina E (E). E-K: Gráficos das médias e desvio padrão da média da análise morfométrica do nervo frênico dos grupos C, E, AZ e AZE. E: Área dos axônios (μm^2); F: Área das fibras nervosas (μm^2); G: diâmetro médio dos axônios (μm); H: diâmetro médio das fibras (μm). I: número de fibras; J: Espessura da bainha de mielina (μm); K: razão G.

3.4. Análise das junções neuromusculares (JNM)

Em relação à morfologia, as JNMs de todos os animais estavam alinhadas transversal ou obliquamente ao maior eixo das fibras musculares, sem alterações morfológicas (Fig. 5A-D). A morfometria da área das JNMs não revelou diferença estatística entre os grupos (C: $577,67 \pm 99,6$; AZ $503 \pm 93,91$; E: $518,50 \pm 215$; AZE $537,69 \pm 193$) ($p > 0,05$) (Fig. 5E). Em relação ao diâmetro máximo das JNMs houve diminuição desse parâmetro no grupo AZ ($33,71 \pm 4,11$) quando comparado ao grupo AZE ($46,37 \pm 15,49$) ($*p < 0,05$). Os grupos C ($35,25 \pm 4,5$) e E ($35,45 \pm 9,79$) não apresentaram diferenças entre si ($p > 0,05$) (Fig. 5F).

Os receptores de acetilcolina marcados com alpha-bungarotoxina associada à rodamina e analisados através da microscopia confocal mostraram que as respostas dos fluoróforos estavam homogêneas e os nAChR em autofluorescência em todos os grupos estudados. Sendo que os mesmos estavam distribuídos em braços contínuos que corriam em várias orientações ao longo da fibra muscular (Fig. 5a-d).

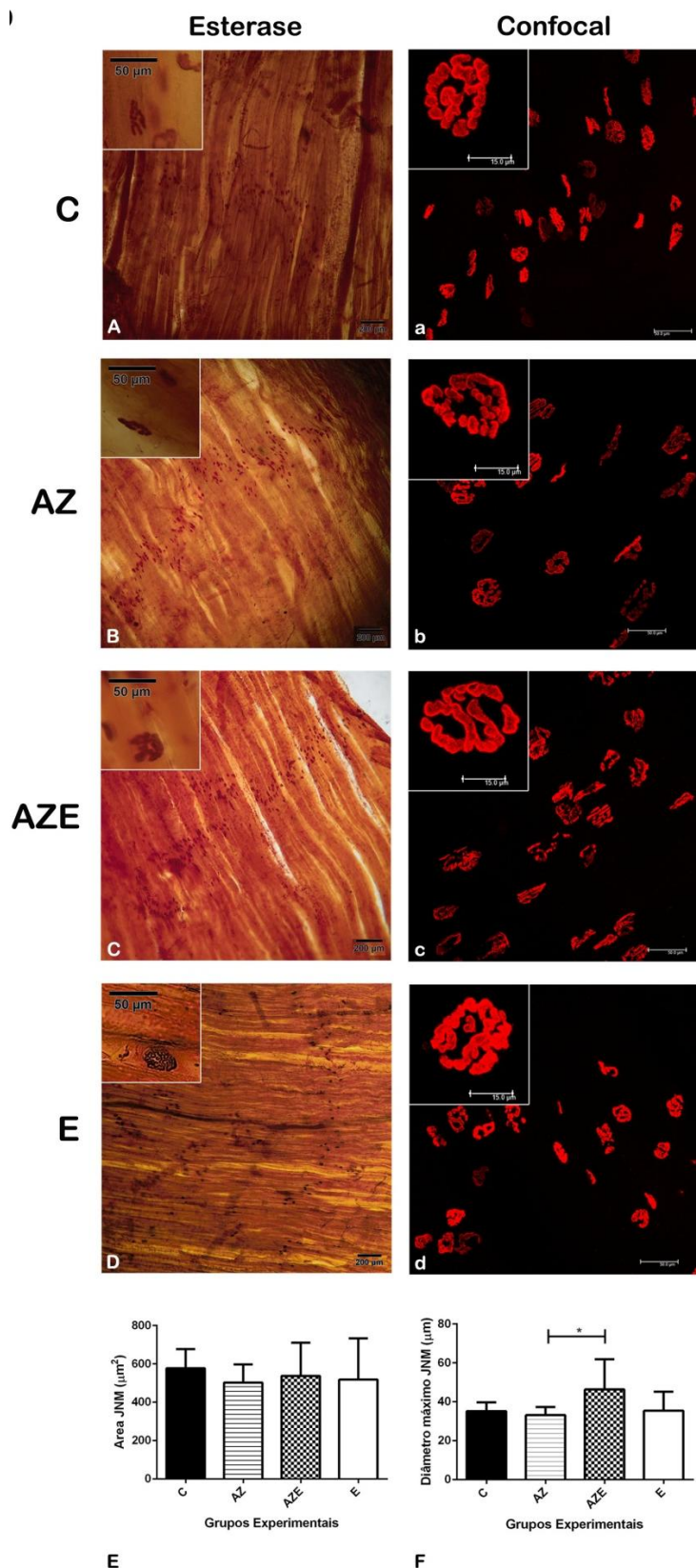


Fig. 5: A-D: Fotomicrografias do músculo diafragma (montagem total) de todos os grupos experimentais. A-D: JNMs marcadas com esterase inespecífica. Detalhe: JNMs. a-d: Fotomicroscopia Confocal de Varredura a Laser. E-F: Gráfico das médias e desvio padrão da média da área das JNMs (μm²) e diâmetro máximo das JNMs(μm) para todos os grupos experimentais, C: controle, AZ: Atrazina, AZE: Atrazina + Vitamina E, E: Vitamina E (*p < 0,05).

4. Discussão

O metabolismo dos praguicidas incluindo a atrazina resulta na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (El-Shenawy *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2016) modulando o sistema de defesa antioxidante e causando danos oxidativos a todos os componentes celulares, incluindo ácido nucleico, lipídios e proteínas (Pogrmic-Majkic *et al.*, 2010; Keshk *et al.*, 2014). A toxicidade gerada promove uma demanda de gasto energético sobre os tecidos afetados visando sua eliminação. Essa demanda pode levar à degradação proteica, havendo produção de aminoácidos, aumentando a síntese de adenosina trifosfato devido à necessidade de sustentar o ciclo do ácido tricarboxílico (Ganeshwade, 2012).

Alterações metabólicas dos tecidos são acompanhadas da geração de EROs, a peroxidação lipídica pode ser um dos mecanismos moleculares envolvidos na toxicidade induzida pela atrazina, está relacionada ao aumento da concentração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que gera processo oxidativo e induz danos peroxidativos aos lipídios da membrana (Singh *et al.*, 2011).

Os resultados desse estudo colaboram com essas descrições, permitindo inferir que a AZ, na dose utilizada, causou estresse oxidativo no músculo diafragma de ratos. Esses resultados são confirmados pelos maiores valores obtidos no grupo AZ em relação ao hidroperóxido de lipídeo (HP), da enzima antioxidante catalase (CAT) e pela determinação da capacidade antioxidante hidrofílica (CAH). Essa determinação permite uma visão do envolvimento do estresse oxidativo em várias condições fisiopatológicas, e permite inferir sobre a eficácia de intervenções antioxidantes (Fraga *et al.*, 2014). A redução de atividade enzimática antioxidante após a exposição à atrazina também foi observada por Singh *et al.* (2011), Liu *et al.* (2014), Griboff *et al.* (2014), Hassani *et al.* (2015) e Chaâbane *et al.* (2018)

estudando praguicidas.

A exposição celular prolongada a ERO leva a uma redução da atividade de antioxidantes endógenos naturais como a superóxido dismutase (SOD) (Di Vincenzo *et al.*, 2019), o que está de acordo com os menores valores da atividade da enzima SOD observadas no grupo AZ, valores estes menores que do grupo C.

Em relação à vitamina E, os dados mostraram que quando houve sua associação a AZ houve redução nos valores do HP, da CAT e da CAH e aumento da SOD, sugerindo uma ação antioxidante dessa vitamina. O papel da vitamina E é conhecido na saúde animal por inativar radicais livres produzidos como produtos da atividade celular normal, bem como evitar formação de vários estressores (Chaâbane *et al.*, 2018).

A literatura relata que uma dieta rica em vitaminas previne várias doenças (Fiedor & Burda, 2014; Mangge *et al.*, 2014). Isso ocorre porque os antioxidantes exógenos e endógenos atuam em sinergia para combater os radicais livres (Montezano & Touyz, 2014).

A enzima SOD catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 que podem ser convertidos posteriormente em água pela Catalase ou pela Glutathione Peroxidase (França *et al.*, 2013). A similaridade dos valores encontrados entre todos os grupos em relação à glutathione peroxidase podem ser justificados pelo fato de que a CAT teve grande atuação no processo de estresse oxidativo a qual também tem a função de reduzir o peróxido de hidrogênio em água (Barreiros *et al.*, 2006) não necessitando de ação da glutathione.

Vários autores têm descrito alterações decorrentes da AZ sobre sistema nervoso central (Kale *et al.*, 2018; Ma *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015), mas pouco tem sido estudado sobre a ação deste herbicida sobre o sistema nervoso periférico.

Complicações respiratórias são descritas como decorrentes da ação de praguicidas (Eddleston *et al.*, 2006; Bird *et al.*, 2016). Embora nosso estudo não tenha realizado análises funcionais associadas à capacidade respiratória, os resultados tanto morfológicos quanto morfométricos indicam que o nervo frênico foi preservado.

A razão G é um parâmetro relacionado à velocidade de condução do impulso nervoso. Segundo Mendonça *et al.* (2003), valores baixos (em torno de 0,4) geralmente indicam degeneração axonal, enquanto valores altos (em torno de 0,7) indicam degeneração ou regeneração da mielina. Os valores obtidos neste estudo em todos os grupos giram em torno de 0,52 confirmando os padrões de normalidade.

Nenhuma alteração morfológica e morfométrica foi encontrada decorrente da AZ nas fibras musculares e nas junções neuromusculares, bem como frente a porcentagem de colágeno, sendo que dependendo da espécie animal, da concentração do praguicida e da duração da exposição ao contaminante, diferentes respostas podem ocorrer frente a essa toxicidade (Dornelles & Oliveira, 2016).

Desse modo, cada vez mais a toxicidade dos praguicidas deve ser considerada, referente às suas conformações, acoplamento molecular e as interações decorrentes de sua dinâmica molecular (Mladenović *et al.*, 2018).

Sagarkar *et al.* (2016) estudando o efeito da AZ sobre cultura de células musculares, verificaram alterações em genes mitocondriais.

Em nosso estudo, os resultados observados no grupo que recebeu apenas vitamina E indicaram aumento de área e proporcionalmente do diâmetro menor das fibras musculares. Sendo que sua associação com a AZ promoveu decréscimo desses valores, mas que foram equivalentes ao do grupo Controle.

Grabowieck *et al.* (2015) em estudos *in vitro* verificaram que a vitamina E impediu a atrofia de mioblastos e contribuiu para a sobrevivência dos miotubos. Um artigo de revisão sobre a vitamina E, descreve que tanto em estudos experimentais quanto em estudos pré-clínicos, a vitamina E beneficia a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência de mioblastos. Também atua no reparo de membranas, na eficiência mitocondrial, sobre a massa e propriedades musculares contráteis, e ainda na capacidade frente ao exercício (Chung *et al.*, 2018).

Há ainda a se considerar que a vitamina E diminui a degradação de proteínas e aumenta sua síntese (Aragno *et al.*, 2004; Servais *et al.*, 2007). Os estudos de Bartali *et al.* (2008) e Chung *et al.* (2018) descrevem que a suplementação com vitamina E melhora a função muscular, atenuando o declínio funcional durante o envelhecimento, o que pode ser justificado pela sua ação supressora do estresse oxidativo e da inflamação. No entanto, os efeitos da vitamina E sobre a estrutura muscular pode não ser explicado exclusivamente pela eliminação de radicais livres. Esses efeitos possivelmente refletem interações específicas do alfa-tocoferol com enzimas, proteínas estruturais, lipídios e fatores de transcrição (Hasan *et al.*, 2004).

Em relação à junção neuromuscular não foram observadas diferenças em relação aos grupos estudados tanto quanto a morfologia como em relação a morfometria das mesmas, embora a associação da vitamina E com AZ tenha aumentado o diâmetro máximo das junções.

Eidi *et al.* (2006) estudando a retenção de memória em ratos avaliaram a associação da vitamina E com nicotina e pilocarpina. Verificaram que a vitamina E potencializou as respostas desses fármacos, sugerindo que a vitamina E e o sistema colinérgico têm uma estreita interação.

Por outro lado, a vitamina E além de efeito antioxidante, interage

especificamente diferentes estruturas, podendo ser considerada um agente potencialmente importante na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, inflamação, distúrbios imunológicos e neurodegenerativos (Szymańska *et al.*, 2017). Ela atenua as EROs reduzindo o oxigênio, bloqueando as enzimas envolvidas na geração de ERO (lipoxigenase, cicloxigenase, xantina oxidase, monoxigenase), quelando íons metálicos de transição que desencadeiam a produção de EROs e eliminando a peroxidação lipídica, e auxiliando na reciclagem de outros antioxidantes (Mierziak *et al.*, 2014).

Nosso estudo é inovador considerando o efeito da AZ sobre a interação neuromuscular, embora não tenham sido encontrados efeitos de toxicidade resultante da exposição subcrônica da AZ no modelo experimental utilizado, o que pode estar relacionado ao tempo de exposição e a dose utilizada (subcrônica).

Levando-se em consideração que a AZ é um praguicida de estrutura estável, de difícil degradação, e que permanece por longo tempo no ambiente (He *et al.*, 2019), cuja toxicidade ocorre a longo prazo (Sánchez *et al.*, 2020), nosso estudo vem contribuir para que novas estratégias nutricionais associadas ao uso da vitamina E possam proteger o organismo de mamíferos dessa toxicidade. Além disso, o interesse pelas funcionalidades benéficas dessa vitamina está aumentando e continuará atraindo os pesquisadores.

5. Conclusões

A partir dessas considerações, podemos concluir que a AZ, na dose utilizada, promoveu estresse oxidativo nas fibras musculares do diafragma de ratos. O efeito pró-oxidante da AZ no modelo experimental utilizado não provocou alteração sobre a interação neuromuscular (fibras musculares, nervo e junções neuromusculares). Já a vitamina E exerceu papel antioxidante gerado pela exposição subcrônica à AZ.

6. Referências

- ABARIKWU, S. O.; FAROMBI, E. O. 2015. Atrazine induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3-dependent pathway. **Pestic Biochem Physiol**, New York, v. 118, p. 90–98, Feb..
- ABOUELGHAR, G. E. *et al.* Oxidative stress, hematological and biochemical alterations induced by sub-acute exposure to fipronil (COACH®) in albino mice and ameliorative effect of selenium plus vitamin E. **Environ Sci Pollut Res Int**, Berlin, p. 1-15, Dec. 2019.
- AEBI, H. Catalase. *In*: BERGMAYER, H. U. (ed.). **Methods of enzymatic analysis academic**. New York: Academic Press, 1974. p. 673-677.
- ARAGNO, M. *et al.* Oxidative Stress Impairs Skeletal Muscle Repair in Diabetic Rats. **Diabetes**, Alexandria, v. 53, p. 1082-1088, Apr. 2004.
- BARREIROS, A. L. B. S. *et al.* Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, jan./fev. 2006.
- BARTALI, B. *et al.* Serum micronutrient concentrations and decline in physical function among older persons. **JAMA**, Chicago, v. 299, n. 3, p. 308-315, Jan. 2008.
- BÉRANGER, R. *et al.* Multiple pesticides in mothers' hair samples and children's measurements at birth: Results from the French national birth cohort (ELFE). **Int J Hyg Environ Health**, Jena, Germany, v. 223, n. 1, p. 22-33, Jan. 2020.
- BERETTA, G. *et al.* Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. **Anal Biochem**, San Diego, v. 354, n. 2, p. 290-298, July 2006.
- BIRD, S. B. *et al.* Pharmacotherapy to protect the neuromuscular junction after acute organophosphorus pesticide poisoning. **Ann N Y Acad Sci**, New York, v. 1374, n. 1, p. 86-93, June 2016.
- BRASIL, V. L. M. *et al.* Pesticides as risk factors for head and neck cancer: A review. **J Oral Pathol Med**, Oxford, v. 47, n. 7, p. 641-651, Aug. 2018.
- CHAÂBANE, M. *et al.* Penconazole alters redox status, cholinergic function and lung's histoarchitecture of adult rats: Reversal effect of vitamin E. **Biomed Pharmacother**, Paris, v. 102, p. 645-652, June 2018.
- CHEVALIER, N. *et al.* Comment on "Effects of Atrazine on Estrogen Receptor α - and G Protein-Coupled Receptor 30-Mediated Signaling and Proliferation in Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts". **Environ Health Perspect**, Research Triangle Park, v. 124, n. 4, p. A64-A65, Apr. 2016.
- CHOW, C. K. *et al.* Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. **Free Radic Biol Med**, Tarrytown, v. 27, n. 5-6, p. 580–587, Sept. 1999.

CHUNG, E. *et al.* Potential roles of vitamin E in age-related changes in skeletal muscle health. **Nutr Res**, Tarrytown, v. 49, p. 23-36, Jan. 2018.

CROUCH, R. K. *et al.* The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, Alexandria, v. 30, n. 3, p. 235-241, Mar. 1981.

DI VINCENZO, A. *et al.* Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Metabolic Properties of Tocopherols and Tocotrienols: Clinical Implications for Vitamin E Supplementation in Diabetic Kidney Disease. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 20, n. 20, p. 1-13, Oct. 2019.

DORNELLES, M. F.; OLIVEIRA, G. T. Toxicity of atrazine, glyphosate, and quinclorac in bullfrog tadpoles exposed to concentrations below legal limits. **Environ Sci Pollut Res Int**, Berlin, v. 23, n. 2, p. 1610-1620, Jan. 2016.

EDDLESTON, M. *et al.* Respiratory Failure in Acute Organophosphorus Pesticide Self-Poisoning. **QJM**, [Oxford], v. 99, 8, p. 513–522, Aug. 2006.

EIDI, A. *et al.* Effect of vitamin E on memory retention in rats: possible involvement of cholinergic system. **Eur Neuropsychopharmacol**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 101-106, Feb. 2006.

EL-SHENAWY, N.S. *et al.* Mitigating Effect of Ginger against Oxidative Stress Induced by Atrazine Herbicides in Mice Liver and Kidney. **J Biofertil Biopestic**. 2(2), 1-7, 2011.

ERDEMLI, M. E. *et al.* Protective effects of melatonin and vitamin E in acetamiprid-induced nephrotoxicity. **Environ Sci Pollut Res**, Berlin, p. 1-12, Jan. 2020.

FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. **Nutrients**, Basel, v. 6, n. 2, 466-488, Jan. 2014.

FRAGA, C. G. *et al.* In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdam, v. 840, n. 2, p. 931-934, Feb. 2014.

FRANÇA, B. K. *et al.* Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **J Port Gastroenterol**, Lisboa, v. 20, n. 5, p. 199-206, set. 2013.

GANESHWADE, R. *et al.* Toxicity of endosulfan on freshwater fish *Channa striatus*. **Trends in Fisheries Res**, Solapur, v. 1, n. 1, p. 29-31, 2012.

GAO, S. *et al.* Oral Exposure to Atrazine Induces Oxidative Stress and Calcium Homeostasis Disruption in Spleen of Mic. **Oxid Med Cell Longev**, 1-9, 2016.

GRABOWIECKI, Y. V. *et al.* Regulation of a Notch3-Hes1 Pathway and Protective Effect by a Tocopherol-Omega Alkanol Chain Derivative in Muscle Atrophy. **J Pharmacol Exp Ther**, Bethesda, v. 352, p. 23–32, Jan. 2015.

GRIBOFF, J. *et al.* Oxidative stress response induced by atrazine in *Palaemonetes*

- argentinus: the protective effect of vitamin E. **Ecotoxicol Environ Saf**, Amsterdam, v. 108, p. 1-8, Oct. 2014.
- HASAN, M. Y. *et al.* alpha-Tocopherol modifies lead induced functional changes at murine neuromuscular junction. **Free Radic Res**, London, v. 38, n. 12, p. 1321-1328, Dec. 2004.
- HASSANI, S. *et al.* Protective effects of curcumin and vitamin E against chlorpyrifos-induced lung oxidative damage. **Hum Exp Toxicol**, London, v. 34, n. 6, p. 668-676, 2015.
- HE, H. *et al.* A Review on Recent Treatment Technology for Herbicide Atrazine in Contaminated Environment. **Int J Environ Res Public Health**, Basel, v. 16, n. 5129, p. 1-17, 2019.
- HOPPIN, J.A. *et al.* Respiratory disease in United States farmers. **Occup Environ Med**, 71(7), 484–491, 2014.
- JAMES, K. A.; HALL, D. A. Groundwater Pesticide Levels and the Association With Parkinson Disease. **Int J Toxicol**, Thousand Oaks, v. 34, n. 3, p. 266-273, May 2015.
- JESTADI, D. B. *et al.* Effects of Short Term Exposure of Atrazine on the Liver and Kidney of Normal and Diabetic Rats. **J Toxicol**, Cairo, Egypt, v. 2014, p. 1-7, 2014.
- JI, Y. *et al.* Heat-activated persulfate oxidation of atrazine: Implications for remediation of groundwater contaminated by herbicides. **Chem Eng J**, Lausanne, v. 263, p. 45–54, 2015.
- JIANG, Z. Y. *et al.* Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, Chicago, v. 26, n. 10, p. 853-856, Oct. 1991.
- KALE, O. E. *et al.* Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, offers chemoprevention against reproductive and neurobehavioural abnormalities induced by atrazine in male Wistar rats. **Environ Toxicol Pharmacol**, Amsterdam, v. 58, p. 84-97, Mar. 2018.
- KAUR, G. *et al.* Health Risk Assessment of Occupationally Pesticide-Exposed Population of Cancer Prone Area of Punjab. **Toxicol Sci**, Cary, NC, v. 165, n. 1, p. 157-169, Sept. 2018.
- KESHK, W. A. *et al.* Modulatory effects of curcumin on redox status, mitochondrial function, and caspase-3 expression during atrazine-induced toxicity. **J Biochem Mol Toxicol**, New York, v. 28, n. 8, p. 378-385, Aug. 2014.
- KOTEGAWA, M. *et al.* Effect of alpha-tocopherol on high energy phosphate metabolite levels in rat heart by ³¹P-NMR using a Langendorff perfusion technique. **J Mol Cell Cardiol**, London, v. 25, n. 9, p. 1067-1074, Sept. 1993.

- LEHRER, G. M.; ORNSTEIN, L. A diazo coupling method for the electron microscopic localization of cholinesterase. **J Biophys Biochem Cytol**, Baltimore, v. 6, p. 399-406, Dec. 1959.
- LERRO, C.C. et al. A Longitudinal Study of Atrazine and 2,4-D Exposure and Oxidative Stress Markers Among Iowa Corn Farmers. **Environ Mol Mutagen**, 58(1), 30-38, 2017.
- LIU, W. et al. Effects of atrazine on the oxidative damage of kidney in Wister rats. **Int J Clin Exp Med**, Madison, v. 7, n. 10, p. 3235-3243, 2014.
- LIU, Z. et al. Atrazine and its main metabolites alter the locomotor activity of larval zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, Oxford, v. 148, p. 163-170, Apr. 2016.
- MA, K. et al. Neurotoxicity effects of atrazine-induced SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells via microglial activation. **Mol Biosyst**, Cambridge, v. 11, n. 11, p. 2915-2924, Nov. 2015.
- MANGGE, H. et al. Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. **World J Cardiol**, Pleasanton, v. 6, 6, p. 462–477, June 2014.
- MANSOUR, S. et al. Adverse Effects to Suckling Mice Following Indirect Exposure to a Pesticide Mixture and Ameliorative Effect of α -Tocopherol Coadministration. **J Bachs**, Kızılay, v. 1, n. 3, p. 71-78, 2017.
- MCGARRY, K.G. et al. Characterization of Cholinesterases From Multiple Large Animal Species for Medical Countermeasure Development Against Chemical Warfare Nerve Agents. **Toxicol Sci**, 174(1), 124-132, 2020.
- MENDONÇA, A. C. et al. Directly applied low intensity direct electric current enhances peripheral nerve regeneration in rats. **J Neurosci Methods**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 183-190, Oct. 2003.
- MIERZIAK, J. et al. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 19, p. 16240-16265, 2014.
- MLADENović, M. et al. The Targeted Pesticides as Acetylcholinesterase Inhibitors: Comprehensive Cross-Organism Molecular Modelling Studies Performed to Anticipate the Pharmacology of Harmfulness to Humans In Vitro. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 9, p. 1-37, Aug. 2018.
- MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive Oxygen Species, Vascular Noxs, and Hypertension: Focus on Translational and Clinical Research. **Antioxid Redox Signal**, Larchmont, v. 20, n. 1, p. 164–182, Jan. 2014.
- MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicol Appl Pharmacol**, New York, v. 268, n. 2, p. 157–177, Apr. 2013.
- NAKAMURA, W. et al. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase.

Biochim Biophys Acta, Amsterdam, v. 358, n. 2, p. 251-261, Aug. 1974.

PATHAK, R. K.; DIKSHIT, A. K. Atrazine and Human Health. **IJE**, Rosemead, v. 1, n. 1, p. 14-23, 2011.

POGRMIC-MAJKIC, K. *et al.* Upregulation of peripubertal rat Leydig cell steroidogenesis following 24 h in vitro and in vivo exposure to atrazine. **Toxicol Sci**, Cary, v. 118, n. 1, p. 52-60, Nov. 2010.

PUNZ, A. *et al.* Effect of alpha-tocopherol pretreatment on high energy metabolites in rabbit skeletal muscle after ischemia-reperfusion. **Clin Nutr**, Edinburgh, v. 17, n. 2, p. 85–87, Apr. 1998.

RATHINAM, X. *et al.* Farmers and Formulations--Rural Health Perspective. **Med J Malaysia**, Kuala Lumpur, v. 60, n. 1, p. 118-124, Mar. 2005.

R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. R: **A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation, 2019. <https://www.R-project.org/>.

SAGARKAR, S. *et al.* Atrazine exposure causes mitochondrial toxicity in liver and muscle cell lines. **Indian J Pharmacol**, Mumbai, v. 48, n. 2, p. 200–207, Mar./Apr. 2016.

SÁNCHEZ, O. F. *et al.* Profiling epigenetic changes in human cell line induced by atrazine exposure. **Environ Pollut**, Barking, Essex, England, v. 258, 2020.

SERVAIS, S. *et al.* Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation: links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? **Free Radic Biol Med**, Tarrytown, v. 42, n. 5, p. 627–635, Mar. 2007.

SINGH, M. *et al.* Effects on antioxidant status of liver following atrazine exposure and its attenuation by vitamin E. **Exp Toxicol Pathol**, [Munich], v. 63, n. 3, p. 269-276, Mar. 2011.

SOUZA, P. M. S. *et al.* Desenvolvimento de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 132-137, 2012.

SLAGER, R.E. *et al.* Rhinitis Associated with Pesticide Use Among Private Pesticide Applicators in the Agricultural Health Study. **J Toxicol Environ Health A**, 73(20), 1382–1393, 2010.

SZYMAŃSKA, R. *et al.* Vitamin E - Occurrence, Biosynthesis by Plants and Functions in Human Nutrition. **Mini Rev Med Chem**, Hilversum, The Netherlands, v. 17, n. 12, p. 1039-1052, 2017.

VAN ACKER, S. A. *et al.* Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity. **Free Radic Biol Med**, Tarrytown, v. 15, n. 3, p. 311–328, Sept. 1993.

WIRBISKY, S. E. *et al.* Embryonic atrazine exposure alters zebrafish and human miRNAs associated with angiogenesis, cancer, and neurodevelopment. **Food Chem Toxicol**, Exeter, v. 98, pt A, p. 25-33, Mar. 2016.

XING, H. *et al.* Alterations in mRNA expression of acetylcholinesterase in brain and muscle of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. **Ecotoxicol Environ Saf**, Amsterdam, v. 73, n. 7, p.1666–1670, Oct. 2010.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2009.

ZHANG, B. *et al.* Inflammatory reaction regulated by microglia plays a role in atrazine-induced dopaminergic neuron degeneration in the substantia nigra. **J Toxicol Sci**, Sapporo, v. 40, n. 4, p. 437-450, Aug. 2015.

ŽIVKOVIĆ SEMREN, T. *et al.* Oxidative stress in triazine pesticide toxicity: a review of the main biomarker findings. **Arh Hig Rada Toksikol**, Zagreb, Croatia, v. 69, p. 109-125, 2018.

7 ANEXO 2 – DECLARAÇÃO CEUA/IBB



Declaração 02/2016-CEUA
ATRB/WRS



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins e a pedido da Profa. Dra. Selma Maria Michelin Matheus que o protocolo CEUA/IBB sob o número 897 intitulado *“Estudo experimental dos efeitos da exposição repetida ao herbicida atrazina sobre a atividade neurocomportamental, biomarcadores do estresse oxidativo e sistemas de neurotransmissores”*, sob sua coordenação e do Dr. Antonio Francisco Godinho, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências em 09/09/2016. Conforme documentação apresentada, a referida pesquisa tem como co-executora a Srta. Viviane da Silva Martins Lopes Corrêa, aluna de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia, cuja tese apresenta o título: *“Investigação experimental sobre o impacto do herbicida atrazina sobre a interação neuromuscular”*. Dessa forma, como se trata do mesmo protocolo experimental, o certificado 897 é extensivo à aluna supracitada.

Por ser verdade, firmo o presente.

Botucatu, 10 de Outubro de 2016

Prof. Adj. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
IBB/UNESP

