

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO:

CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA

Influência do fungicida Mancozebe na microbiota intestinal em um modelo experimental

MARINA FERRI PEZZINI

Tese de Doutorado

PORTO ALEGRE, BRASIL

2022

Marina Ferri Pezzini

Influência do fungicida Mancozebe na microbiota intestinal em um modelo experimental

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Dvora Joveleviths

PORTO ALEGRE, BRASIL

2022

Ficha Catalográfica

CIP - Catalogação na Publicação

Pezzini, Marina Ferri

Influência do fungicida Mancozebe na microbiota intestinal em um modelo experimental / Marina Ferri Pezzini. -- 2022.

89 f.

Orientador: Dvora Joveleviths.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Pesticidas. 2. Microbioma. 3. Mancozebe. 4. Modelo Experimental . I. Joveleviths, Dvora, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedicatória

A concretização deste trabalho resulta de muito apoio e dedicação, portanto, retorno meu conhecimento, dedicando a Elaine e Mauro, meus pais, pelo amor incondicional, pela compreensão, pela educação, por todos os abraços e palavras sábias nos momentos convividos e, em especial, por serem meus pais que amo.

Em especial, ao meu namorado Rafael, por estar sempre ao meu lado nos momentos de conquistas e de dificuldades, nunca deixando com que eu esqueça que a felicidade se encontra nos pequenos gestos.

À minha família e aos meus amigos que, de toda forma, estiveram relacionados a este período de formação e enriquecimento de minha vida profissional.

Por fim, a todas aquelas pessoas que sempre foram motivadas pela pesquisa e por algum motivo ainda não atingiram seus objetivos, saibam que, com esforço e dedicação, conseguirão.

Agradecimentos

Inicio meus agradecimentos por meus pais, que sempre primaram pela minha educação. Obrigada, **Mauro** e **Elaine**, por me oferecerem a oportunidade de estudar, pelo amor e carinho de sempre, e por me mostrarem os verdadeiros valores que norteiam o ser humano para a vida.

Ao **Rafael**, meu namorado, que me estimula todos os dias a sonhar e a me dedicar para atingir meus objetivos pessoais e profissionais.

Um agradecimento especial à minha **família** e aos meus **amigos** pelo incentivo para a realização deste trabalho: a todos o meu mais sincero obrigada.

Com muito carinho e de uma maneira muito especial, à minha Professora e Orientadora Dra. **Dvora Joveleviths**, pelo tempo que trabalhamos juntas, celebrando vitórias, compartilhando dificuldades e pela confiança depositada em mim em todas as etapas deste estudo.

Nelson Uribe Suarez, minha eterna dupla de pós-graduação. Sonhamos, aprendemos, compartilhamos juntos todas as alegrias e dificuldades de realizar um Mestrado/Doutorado. Obrigada por ter feito parte de tudo isso comigo.

Ao meu colega **Pabulo Rompellatto**, o meu mais sincero agradecimento por todo o conhecimento transmitido a mim, pelas dicas e pelo auxílio no desenvolvimento deste estudo.

Ao meu time de hepatotoxicidade, **Juliana, Eduardo, Patrícia, Raquel, Sheila, Camila**, obrigada por participarem de forma direta às etapas que constituíram este trabalho.

Ao Professor Dr. **Mário Reis Álvares-da-Silva**, Dra. **Larisse Longo** e Ms. **Gabriel Guerreiro** por todo o auxílio na condução desta pesquisa.

Um agradecimento às Instituições financeiras **FIPE** e **CAPES** pela contribuição financeira para o desenvolvimento de cada atividade deste projeto.

SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	09
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE TABELAS.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Pesticidas.....	18
2.1.1 Epidemiologia da utilização de Pesticidas.....	21
2.2 Microbiota Intestinal.....	22
2.2.1 Interações Microbiota-Fungicidas.....	24
2.2.2 Eixo Intestino – Fígado.....	26
2.3 Toxicidade Hepática.....	28
2.3.1 Mecanismos de Toxicidade Hepática.....	28
2.3.2 Fatores de Risco à Hepatotoxicidade	30
2.3.3 Testes para Avaliação de Toxicidade.....	33
3. JUSTIFICATIVA.....	39
4. QUESTÃO DE PESQUISA.....	40
5. HIPÓTESE.....	41
6. OBJETIVOS.....	42
6.1 Objetivo Geral.....	42
6.2 Objetivos Específicos.....	42
7. ARTIGOS ORIGINAIS EM INGLÊS.....	43
8. CONCLUSÃO.....	67
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXO A.....	84

RESUMO

Introdução: Nos últimos 40 anos, a agricultura brasileira se desenvolveu de tal forma que o país será um dos grandes fornecedores de alimentos do futuro. Esse setor vem desempenhando um importante papel na economia do Brasil, devido à grande produção de grãos, que é representada por todas as macrorregiões. De fato, para manter tal produção, o setor agrícola utiliza intensivamente insumos químicos como fertilizantes e agrotóxicos, corroborando para que o Brasil seja um dos maiores consumidores de pesticidas do mundo. Os Etilenobisditiocarbamatos (EBDCs), são um grupo de fungicidas que tem sido amplamente utilizado no mundo, sendo o Manganese Ethylenebis (Mancozebe), um dos seus principais representantes. Sua toxicidade já foi evidenciada em diversos estudos. No entanto, sua influência na estrutura e diversidade da microbiota intestinal permanece desconhecida. **Objetivo:** investigar o impacto do Mancozebe na microbiota intestinal utilizando um modelo com roedores. **Material e Métodos:** a proposta foi um estudo experimental com 27 ratos machos Wistar, classificados em 3 grupos de 9 ratos. Grupo Controle (GC) recebeu Solução salina 0,9%, Grupo Intervenção I (MZ1) recebeu 250 mg/kg uma vez por semana e Grupo intervenção II (MZ2) recebeu 500 mg/kg com a mesma frequência. Após 12 semanas de experimento, os animais foram eutanasiados e as fezes presentes no intestino foram coletadas. Após a extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) fecal, a região V4 do gene 16S do ácido ribonucleico ribossômico (rRNA) foi amplificada seguida de sequenciamento em um sistema Ion Torrent PGM™ para avaliação da microbiota bacteriana. **Resultados:** A análise de diversidade alfa e beta demonstrou diferenças significativas entre os grupos Controle e Mancozebe (MZ1 e MZ2), mas não foi observada diferença entre MZ1 e MZ2. Além disso, sete gêneros aumentaram significativamente em abundância após a exposição ao Mancozebe, enquanto que cinco gêneros diminuíram, na análise da microbiota. **Conclusão:** A exposição ao Mancozebe apresentou efeitos

colaterais alterando a estrutura e composição da diversidade bacteriana, provavelmente deve-se ao efeito do fungicida sobre o microbioma intestinal, inviabilizando a proliferação de fungos.

Palavras-chave: pesticidas; microbioma; mancozebe, modelo experimental.

ABSTRACT

Introduction: In the last 40 years, Brazilian agriculture has developed to such an extent that the country will be one of the great food suppliers of the future. This sector has played a major role in the Brazilian economy, because of the high grain production in all macroregions. To keep up this production, the agricultural sector makes intensive use of chemical inputs such as fertilizers and pesticides, thus corroborating the fact that Brazil is one of the greatest pesticide consumers in the world. Ethylenebis dithiocarbamates (EBDCs) are a group of fungicides that have been widely utilized worldwide, and Manganese Ethylenebis (Mancozeb) is one of their main representatives. Its toxicity has already been evidenced in several studies. However, its influence on the structure and diversity of the gut microbiota remains unknown. **Objective:** investigate the impact of Mancozeb on the intestinal microbiota using a rodent model. **Material and Methods:** the proposal was an experimental study with 27 male Wistar rats, divided into 3 groups of 9 rats. Control Group (GC) received 0.9% saline solution, Intervention Group I (MZ1) received 250mg/kg once a week and Intervention Group II (MZ2) received 500mg/kg at the same frequency. After 12 weeks of experiment, animals were euthanized, and feces present in the intestine were collected. After fecal DNA extraction, the V4 region of the 16S rRNA gene was amplified followed by sequencing in an Ion Torrent PGM™ System for intestinal microbiota analysis. **Results:** Alpha and beta diversity analysis showed significant differences between Control and Mancozeb groups (MZ1 e MZ2), but no difference between MZ1 e MZ2 was observed. In addition, seven genera significantly increased in abundance following Mancozeb exposure, while five genera decreased, in microbiota analysis. **Conclusion:** exposure to Mancozeb has harmful effects altering the structure and composition of the microbiota in rats and increasing bacterial diversity regardless of the dose used. The increase in diversity is explained by a potential effect of the fungicide on the intestinal mycobiome.

Keywords: pesticides; microbiome; mancozebe, experimental model.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT - alaninaaminotransferase

AST – aspartatoaminotransferase

CAT – catalase

CS2 – dissulfeto de carbono

CIOMS - Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas

DILI - *Drug Induced Liver Disease*

DM2 – diabetes mellitus tipo 2

DNA – ácido desoxirribonucleico

EBDCs – etilenobisditiocarbamatos

EROs – espécies reativas de oxigênio

ETU – etilenotiouréia

FA – fosfatase alcalina

GC – grupo Controle

GWAS – *Genome Wide Association Studies*

HAS – hipertensão

HIV – vírus da imunodeficiência adquirida

HLA - *Human Leucocyte Antigen*

HILI – *Herbal and Dietary Supplements-induced Liver Injury*

IMC – índice de massa corporal

LD50 – dose letal 50

LPL – lipoproteína lipase

LPS - lipopolissacarídeos

IgA – imunoglobulina A

MDA – metilenodianilina

Mn - manganês

MOP - *Morinda officinalis*

MZ1 – mancozebe 1

MZ2 – mancozebe 2

NAPQI - N-acetil-p-benzoquinonaimina

NASH - esteato-hepatite não alcoólica

OIT - organização Internacional do Trabalho

OMS – organização mundial da saúde

OPAS – organização Pan-Americana da Saúde

rRNA – RNA ribossômico

RUCAM - *Roussel Uclaf Causality Assessment Method*

SIBO - *small intestinal bacterial overgrowth*

SIH - Sistema de Informações Hospitalares

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Toxicológicas e Farmacológicas

SINAM - Sistema de Informação sobre Agravos de Notificação Compulsória

SUS – Sistema único de saúde

TAFILD – *Toxicant Associated Fatty Liver Disease*

TASH – *Toxicant Associated Steatohepatitis*

TARV – terapia antirretroviral

TGI – trato gastrointestinal

TLRs – *Toll-like receptors*

Zn - zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do Mancozebe.....	20
Figura 2: Interação entre a microbiota intestinal e a imunidade inata na patogênese das doenças hepáticas crônicas.....	27
Figura 3: Estresse oxidativo produzido durante o metabolismo de pesticidas e possíveis vias de formação de biomarcadores selecionados.....	34
Figura 4: Micronúcleo em sangue periférico.....	35
Figura 5: Relação de danos ao DNA com scores atribuídos para o ensaio cometa.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características dos diferentes mecanismos de hepatotoxicidade.....30

Tabela 2: Estudos experimentais induzindo toxicidade pelo Mancozebe.....38

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 40 anos, a agricultura brasileira tem se desenvolvido de forma que o país será um dos grandes fornecedores de alimentos do futuro. Este setor vem desempenhando um papel essencial na economia brasileira, devido ao Brasil estar na 4ª posição como maior produtor de grãos (arroz, cevada, soja, milho e trigo) mundial, sendo responsável por 7,8% da produção total.¹ Dessa forma, para manter tal produção e aumentar o desenvolvimento do agronegócio, o setor agrícola utiliza intensivamente insumos químicos como fertilizantes e defensivos, corroborando para que o Brasil seja um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo desde 2008, o que desencadeia consequências como a permissão de pesticidas já banidos em outros países e a venda ilegal dos que já foram proibidos por lei.²⁻³

A utilização dos pesticidas tem por objetivo evitar a invasão de pragas nas culturas e proteger a saúde pública do consumidor.⁴ Entre as classes de agrotóxicos mais utilizados, destaca-se o uso de fungicidas, que são adequados para prevenir ou erradicar infecções fúngicas de plantas ou de mudas. Os Etilenobisditiocarbamatos (EBDCs) são um grupo de fungicidas que tem sido amplamente utilizado em todo o mundo desde a década de 1940.⁵⁻⁶

Dentre o grupo dos EBDCs encontram-se: Mancozebe, Manebe, Zinebe e Metiram.⁷ O Manganese Ethylenebis (Mancozebe), segundo a literatura, é classificado de baixa toxicidade, no entanto, tem demonstrado ter efeitos adversos em humanos.⁸ Sua toxicidade sistêmica é induzida pela formação de radicais livres e diminuição de antioxidantes.⁹

A evidência experimental e epidemiológica dos principais efeitos adversos dos EBDCs foi demonstrada por diferentes autores. Innes *et al.* evidenciaram que a exposição crônica (18 meses) ao Mancozebe aumenta a incidência de adenoma e carcinoma hepático em ratos machos e fêmeas.¹⁰

Alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, que incluem anemia, leucopenia e aumento das transaminases hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA) e acetilcolinesterase também foram evidenciados.¹¹⁻¹² A toxicidade dos fungicidas é frequentemente relatada com a formação e aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em produtos de danos oxidativos e/ou alterações nos níveis de antioxidantes e sistemas enzimáticos de eliminação de EROS.¹³⁻¹⁶ A avaliação da genotoxicidade dos pesticidas desencadeia efeitos nocivos crônicos nos seres humanos. Esses efeitos iniciam com dano celular e potencialmente causam o desenvolvimento de teratogênese e câncer,¹⁷⁻¹⁸ sendo o potencial genotóxico o principal fator de risco para efeitos a longo prazo.¹⁸ A toxicidade pelo Mancozebe também tem sido relatada por estudos experimentais, que evidenciaram a suspeita de carcinogenicidade em ratos¹⁹ e a indução de dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA) em células expostas *in vitro* por meio de mecanismos oxidativos.²⁰⁻²¹ A avaliação histológica do fígado raramente é descrita na literatura, entretanto, Pirozzi *et al.* avaliaram graus de esteatose hepática associados à exposição ao Mancozebe, concluindo que o fungicida aumentou a quantidade de gotículas lipídicas intracelulares em um modelo *in vitro*.²²

Estudos *in vivo* e *in vitro* foram realizados demonstrando que os produtos químicos podem influenciar o funcionamento da microbiota intestinal, afetando a composição da microbiota do hospedeiro e o perfil metabólico.²³ Em particular, estudos concluíram que algumas bactérias específicas na microbiota intestinal podem regular metabólitos ou vias metabólicas, afetando ainda mais a saúde do hospedeiro.²⁴⁻²⁸

O Mancozebe é produzido comercialmente há décadas e várias evidências demonstraram seus efeitos toxicológicos. No entanto, nenhum estudo até o momento explorou a influência deste composto na microbiota intestinal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pesticidas

Nos últimos 40 anos a agricultura brasileira tem se desenvolvido de forma que o país será um dos grandes fornecedores de alimentos do futuro. Este setor vem desempenhando um papel essencial na economia brasileira, devido ao Brasil estar na 4ª posição como maior produtor de grãos (arroz, cevada, soja, milho e trigo) mundial, sendo responsável por 7,8% da produção total.¹ O Rio Grande do Sul também destaca-se pela produção de grãos, correspondendo a aproximadamente 35 milhões de toneladas entre os anos de 2018-2020.²⁹

Com a crescente necessidade de produção de alimentos na agricultura, a utilização de pesticidas tem aumentado gradativamente. No entanto, este uso vem ocorrendo irregularmente, sem o controle adequado de órgãos governamentais, gerando riscos de contaminação ambiental, bem como à saúde humana, causados pela exposição a essas substâncias, e classificando o Brasil como um dos maiores consumidores de pesticidas do mundo.²⁻³

Pesticidas são substâncias químicas ou sintéticas, que são utilizadas para controlar pragas e plantas invasoras de diferentes culturas. Esses produtos também podem ser utilizados no combate a transmissores de doenças como dengue, malária, febre amarela, entre outras, entretanto, se não utilizados corretamente podem trazer efeitos tóxicos à saúde.³⁰

Os pesticidas também podem ser classificados de acordo com a sua toxicidade, expressada pela taxa de letalidade: o conceito de dose letal 50 (LD50) é a quantidade de uma substância química que, quando administrada em dose oral única, é expressa em massa da substância por massa de animal, ocasionando o óbito de 50% dos animais expostos em um período de observação de 14 dias.³¹

Toxicidade aguda - LD50 oral para ratos (mg/kg):

Classe 1A: Extremamente tóxico. LD50 < 5 mg/kg.

Classe 1B: Altamente tóxico. LD50 5-50 mg/kg.

Classe 2: Moderadamente tóxico. LD50 50-500 mg/kg.

Classe 3: Baixa toxicidade. LD50 500-5000 mg/kg.

Classe 4: Muito pouco tóxico. LD50 > 5000 mg/kg.

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), os pesticidas são classificados de diferentes formas, sendo a principal de acordo com a sua função: inseticidas, fungicidas, herbicidas e outros.³²

Inseticidas: substâncias químicas ou biológicas utilizadas para controlar insetos-praga (ovos, larvas e adultos) que atacam e prejudicam as lavouras. Pertencem ao grupo químico dos organoclorados (BHC®, DDT® ou Neocid®, Methoxychlor® ou Marlate®), organofosforados (Palation®, Diclórvos®), carbamatos (Carbaril®, Baygon®, Carbofuran®) e os piretróides (Aletrina®, Cypermethrina®, Permethrin®).³²

Herbicidas: produtos fitossanitários utilizados para o controle e proliferação de plantas invasoras. Dentre eles, pode-se citar: bipiridilos (Paraquat®, Diquat®); glifosato - aminoácido glicina (Roundap® ou Glifosato®); triazinas (Atrazina®, Simazine®, Metribuzin®); fenoxiácidos (derivado de ácido fenoxiacético e dinitrofenóis).³²

Fungicidas: defensivos agrícolas que impedem, matam, mitigam ou inibem o crescimento de fungos nas plantas. Pertencem ao grupo: pentaclorofenol, ditiocarbamatos (Mancozeb® ou

Manzate®, Maneb® ou Dithane®, Thiram® ou Arasan®, Zineb®, Ziram® ou Zimate®), organoestanho (acetato de trifenilestanho (Brestan®) e outros.³²

Dentre o grupo dos ditiocarbamatos, os Etilenobisditiocarbamatos (EBDCs) pertencem ao subgrupo que merece destaque pelo fato de serem intensamente utilizados, sendo considerados de baixa toxicidade, o que justifica seu maior uso na agricultura. Todos os EBDCs possuem um agrupamento orgânico comum (C₄H₆N₂S₄), que difere apenas em seu íon metálico, sendo Manebe e Mancozebe (nomes comerciais) os mais utilizados.³³ O mecanismo de ação do Mancozebe na célula fúngica ocorre por meio da inibição da germinação dos esporos dos fungos, por apoptose (morte celular programada e por meio da indução da metacaspase).

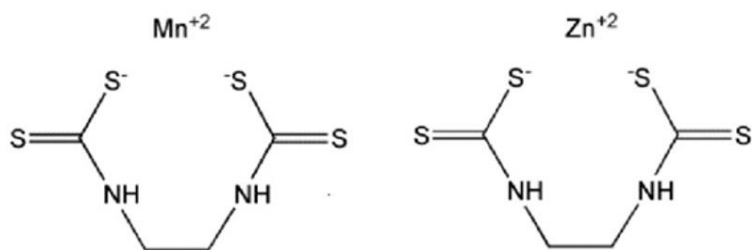


Figura 1 : Fórmula estrutural do Mancozebe³³

Os EBDCs têm sido amplamente utilizados no mundo desde a década de 1940³⁴⁻³⁷ e são os fungicidas mais utilizados na Serra Gaúcha para o cultivo de videiras,³⁸⁻³⁹ além de serem utilizados na plantação de frutos, leguminosas e grãos. Na América Latina, mais de 50% de todos os fungicidas utilizados são do grupo dos EBDCs⁴⁰ e, no Brasil, o volume de EBDCs supera os 40% do total utilizado, representando o principal produto contra fungos.

2.1.1 Epidemiologia da utilização de Pesticidas

Diferentes fontes oficiais de registro para intoxicações por pesticidas tentam estimar o número de casos registrados, embora haja uma grande falta de informações e dados sobre o número real de intoxicações por esses produtos, devido ao sub-registro. Alguns sistemas de registro de intoxicação por pesticidas, como o Sistema Nacional de Informações Toxicológicas e Farmacológicas (SINITOX), o Sistema de Informações Hospitalares - Morbidade Hospitalar do Sistema Único de Saúde (SIH\SUS), a Comunicação de Acidentes de Trabalho (CAT) e Sistema de Informação sobre Agravos de Notificação Compulsória (SINAN), são as principais bases de dados.

Segundo fontes do Banco de Dados de Mortalidade da Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 740.000 casos anuais de intoxicação aguda não intencional por pesticidas foram relatados pelas publicações extraídas, resultantes de 7.446 fatalidades e 733.921 casos não fatais. Com base nisso, estima-se que aproximadamente 385 milhões de casos de intoxicação aguda não intencional por pesticidas ocorram anualmente em todo o mundo, incluindo aproximadamente 11.000 mortes. Com base em uma população agrícola mundial de aproximadamente 860 milhões, estima-se que aproximadamente 44% dos agricultores são intoxicados por pesticidas todos os anos. O maior número estimado de casos de intoxicação aguda não intencional por pesticidas está no sul da Ásia, seguido pelo sudeste da Ásia e leste da África em relação à intoxicação aguda não intencional não fatal.⁴¹

De acordo com a Organização Internacional do Trabalho (OIT)/Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 70 mil trabalhadores em países subdesenvolvidos morrem anualmente de intoxicação aguda e crônica por pesticidas e outros 7 milhões desenvolvem alguma doença não fatal.⁴² Embora a intoxicação por pesticidas seja um evento de notificação obrigatória,

as estimativas indicam que apenas 20% dos casos são, de fato, registrados no Sistema Nacional de Notificação Sanitária (SINAN) de acordo com a portaria do Ministério da Saúde 1271\2014.⁴³

2.2 Microbiota Intestinal

O intestino é o maior reservatório de microrganismos do corpo, sendo o lúmen gastrointestinal humano, o habitat fisiológico para diversos micróbios (bactérias, arqueias, fungos e vírus). Inclui dezenas de trilhões de células microbianas pertencentes a várias espécies diferentes que carregam mais de três milhões de genes únicos.⁴⁴⁻⁴⁵ A maioria das espécies bacterianas na microbiota de adultos pertencem aos filos *Firmicutes* (Gram positivos) e *Bacteroidetes* (Gram negativos), enquanto os remanescentes pertencem aos filos *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia*.⁴⁶ O trato gastrointestinal e sua microbiota estão em relação simbiótica. De fato, 85% do total de bactérias, como *Lactobacillus* e *Bifidobacteria*, são organismos comensais, enquanto os outros, como *Clostridium* e *Fusobacterium*, podem potencialmente se tornar patógenos.⁴⁷

O desenvolvimento inicial do microbioma humano inicia-se após o nascimento de um bebê, sendo este, estéril durante a gestação.⁴⁸ Algumas horas após o parto, inicia-se a colonização bacteriana. Em caso de parto normal, o recém-nascido passa pelo canal vaginal, entrando em contato com os microrganismos que fazem parte da microbiota vaginal da mãe, ocorrendo a colonização por *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Staphylococcus*.⁴⁹⁻⁵⁰

A amamentação é outro fator que influencia no tipo de colonização intestinal. Recém-nascidos amamentados com fórmulas infantis para lactentes possuem colonização intestinal composta por gêneros de *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*. Na alimentação à base de leite materno, o principal gênero é *Bifidobacterium* que permite a metabolização de açúcares em

ácidos, conferindo assim proteção contra patógenos intestinais. Os fatores referidos têm um impacto preponderante na evolução do microbioma intestinal.⁴⁸ Durante a infância, a diversidade tende a aumentar e a composição a modificar de forma extremamente rápida, pois ocorre o desmame e se sucede a introdução de alimentos sólidos. Os microrganismos que a criança estará exposta são importantes para a maturação da microbiota. Apesar da constante mudança da composição da microbiota intestinal durante a infância, verifica-se uma estabilização na idade adulta.⁵¹

O papel exato da microbiota permanece amplamente inexplorado, no entanto, sabe-se que a presença de microorganismos no intestino participa da síntese de vitaminas e aminoácidos, catabolismo de macromoléculas, fornecimento de energia, metabolismo de drogas e toxinas e preservação da barreira intestinal. Todos os desequilíbrios ou alterações na composição e/ou função taxonômica da microbiota intestinal são geralmente denominados “disbiose”.⁵² As alterações na homeostase da microbiota foram associadas a condições clínicas tais como doença inflamatória intestinal,⁵³ síndrome do intestino irritável,⁵⁴ câncer e doenças cardiovasculares⁵⁵. Além de estar associada com condições metabólicas como:

Diabetes tipo I e II: a disbiose intestinal tem sido relacionada com os mecanismos desencadeadores da diabetes mellitus tipo 1, evidenciando que boa parte das bactérias nocivas ao organismo encontram-se elevadas ao mesmo tempo que os microrganismos comensais estão em declínio nestes indivíduos. Em associação, os níveis elevados de endotoxinas causados pela disbiose intestinal em indivíduos suscetíveis a diabetes *mellitus* tipo 2, podem causar níveis crônicos de inflamação, afetando a resistência à insulina e ao *diabetes mellitus* (DM2).⁵⁶

Obesidade: a microbiota intestinal possui capacidade de quebrar moléculas alimentares não digeridas em metabólitos como ácidos graxos de cadeia curta, além de sintetizar vitaminas

importantes para a saúde humana. O mecanismo exato pelo qual a microbiota intestinal contribui para a obesidade ainda é incerto. No entanto, foi sugerido que as principais rotas sob influência da microbiota intestinal que poderiam contribuir para o desenvolvimento da obesidade são a oferta de calorias extras, aumento da atividade da lipoproteína lipase (LPL), lipogênese, aumento da permeabilidade intestinal e endotoxemia. Animais obesos têm uma redução de 50% na quantidade de Bacteroides e um aumento proporcional de Firmicutes. Além disso, também se demonstrou que, em uma dieta com baixa quantidade de carboidratos e energia ou com restrição de gordura, os Bacteroidetes aumentaram e os Firmicutes diminuíram. Estes dados sugerem que há uma relação entre a obesidade e a diversidade da microbiota intestinal.⁵⁷

De fato, a microbiota intestinal interage com o hospedeiro, evitando o crescimento excessivo de bactérias patogênicas, bem como modulando o sistema imunológico e a tolerância imunológica das células da mucosa e, por fim, estimulando a produção de imunoglobulina A (IgA) específica para patógenos.⁵⁸ A concentração e a composição das espécies bacterianas são diferentes ao longo do trato gastrointestinal (TGI), com variação interindividual dependendo de fatores como idade, etnia, estilo de vida, medicamentos e hábitos alimentares.⁴⁷ A concentração intestinal, sistêmica e fecal de produtos bacterianos reflete potencialmente a composição da microbiota e pode ser explorada como um marcador diagnóstico não invasivo.

2.2.1 Interações Microbiota – Fungicidas

Vários estudos recentes mostraram que os fungicidas podem influenciar o funcionamento da microbiota intestinal, afetando a sua composição e a sua diversidade. Xu *et al* avaliaram o efeito do epoxiconazol, um antifúngico da classe dos fungicidas azóis em um modelo experimental. Como resultados, os autores evidenciaram uma diminuição da abundância de *Firmicutes* e o aumento da abundância de *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*. Em nível de família, *Lachnospiraceae*

e *Enterobacteriaceae* foram enriquecidas seletivamente após a exposição ao epoxiconazol. Os resultados indicam que a exposição ao fungicida pode induzir a alterações no microbioma intestinal e a uma potencial toxicidade hepática.⁵⁹

Já Jin *et al.* objetivaram identificar a relação entre disbiose e distúrbios metabólicos em peixes na exposição ao fungicida Imazalil. Em nível de filo, a composição de *Proteobacteria* e *Bacteroidetes* foi diminuída, enquanto *Fusobacteria* e *Firmicutes* aumentaram no intestino após exposição a 1000 µg/L do fungicida por 21 dias. Em nível de gênero, 29 espécies de microrganismos foram significativamente alteradas após a exposição ao Imazalil.⁶⁰

No estudo conduzido por Meng *et al.*, foram avaliados os impactos da exposição ao Penconazol na microbiota intestinal e nos perfis metabólicos em camundongos. Em nível de gênero, as abundâncias relativas de sete microbiotas intestinais foram alteradas após a exposição ao Penconazol. Em geral, a exposição ao fungicida causou distúrbios na microbiota intestinal e nos perfis metabólicos dos camundongos.^{28,61}

Por fim, Kong *et al.* tiveram como objetivo explorar a proteção do polissacarídeo extraído de *Morinda officinalis* (MOP), em frangos expostos ao fungicida Tiram (pertencente ao grupo dos ditiocarbamatos), e analisar a associação entre alteração da microbiota intestinal e metabolismo lipídico. Os resultados mostraram que a exposição ao Tiram elevou o índice hepático de forma proeminente, alterou a lesão hepática por exame histopatológico e diagnósticos bioquímicos séricos, assim como aumentou os parâmetros lipídicos no sangue. Além disso, a exposição ao fungicida pôde alterar significativamente a riqueza, diversidade e composição da microbiota fecal de frangos expostos, tal como a abundância relativa de *Firmicutes* e *Proteobacteria* também foi afetada em nível do filo. Algumas populações microbianas, incluindo *Lactobacillus*,

Ruminococcus, *Oscillospira*, *Blautia* e *Butyricicoccus*, diminuíram significativamente em nível de gênero, enquanto *Klebsiella* foi o oposto.⁶²

No geral, esses estudos indicam que a microbiota intestinal pode ser um dos principais alvos da toxicidade induzida por fungicidas e que alterações nela podem ser usadas como indicadores precoces para monitorar o risco à saúde do hospedeiro exposto aos fungicidas. Dentre os efeitos adversos que o Mancozebe pode causar, a disbiose é de primordial relevância para a saúde do hospedeiro, mas suas implicações clínicas ainda não foram caracterizadas.

2.2.2 Eixo Intestino-Fígado

O intestino e o fígado têm uma relação anatômica e funcional. Eles possuem comunicação bidirecional que ocorre por meio do trato biliar, da veia porta e da circulação sistêmica, drenando o sangue proveniente do TGI e garantindo aproximadamente de 70% do suprimento sanguíneo para o fígado, o qual se comunica com o intestino por meio da liberação de ácidos biliares e mediadores bioativos no trato biliar e na circulação sistêmica. No intestino, a microbiota metaboliza ácidos biliares e aminoácidos, assim como substratos advindos da dieta e da exposição ambiental. Dessa forma, o fígado consiste no primeiro local de exposição e remoção de toxinas bacterianas oriundas do intestino, tais como lipopolissacarídeos (LPS), etanol sintetizado por bactérias, metilaminas tóxicas, dentre outros, os quais podem disparar uma cascata inflamatória, contribuindo para a progressão de lesão hepática.⁶³

O papel da microbiota intestinal é polimorfo, funcionando como uma ferramenta imunológica, metabólica e protetora para a saúde do hospedeiro. Na presença da disbiose intestinal, a saúde do hospedeiro fica comprometida, pois a microbiota é incapaz de manter o controle da homeostase local, aumentando a permeabilidade intestinal.⁶³ O rompimento da homeostase

epitelial intestinal ocasiona maior exposição hepática a antígenos exógenos e endógenos que impulsionam os danos por meio da interface do eixo intestino-fígado. ⁶³⁻⁶⁴

A circulação sanguínea impede o fígado de interagir com as bactérias e seus produtos, configurando a barreira vascular intestinal. O dano da barreira epitelial e vascular do intestino é um evento inicial para o desenvolvimento da esteatohepatite não alcoólica (EHNA), causado pela alteração da microbiota devido a uma dieta rica em gordura. Com a quebra da barreira intestinal e vascular, as bactérias e seus produtos contribuem para a inflamação da doença hepática. É descrito que indivíduos com doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) apresentam maior prevalência de supercrescimento bacteriano do intestino delgado (SIBO, do inglês *small intestinal bacterial overgrowth*)^{65- 69} e permeabilidade intestinal aumentada⁷⁰⁻⁷⁵, reforçando a possível participação do eixo intestino-fígado na patogênese da doença (Figura 2).

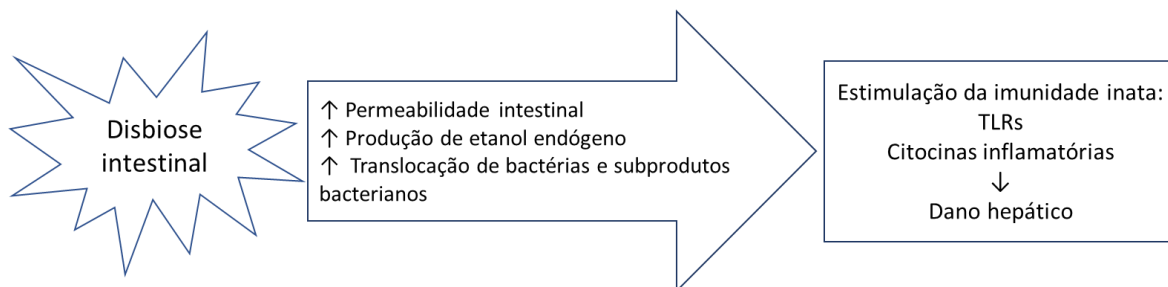


Figura 2: Interação entre a microbiota intestinal e a imunidade inata na patogênese das doenças hepáticas crônicas. Abreviaturas: TLRs: *Toll-like receptors*. Fonte: Bibbó *et al.* 2018 ⁶³

O interesse em investigar o papel da disbiose intestinal como um determinante de saúde e doença ganhou maior impulso na última década. De fato, a alteração na microbiota intestinal exerce um papel fundamental na patogênese e progressão das doenças hepáticas crônicas, por promover a desregulação da imunidade inata em resposta à atividade pró-inflamatória persistente.

2.3 Toxicidade Hepática

Hepatotoxicidade é o dano causado ao fígado por substâncias químicas, medicamentos, suplementos, chás de ervas, entre outros. Na literatura, os termos mais utilizados são: DILI (*Drug Induced Liver Disease*: lesão hepática induzida por drogas), HILI (*Herbal and Dietary Supplements-induced Liver Injury*: dano hepático induzido por suplementos dietéticos e à base de ervas),⁷⁶ TAFLD (*Toxicant Associated Fatty Liver Disease*: doença hepática associada a substâncias tóxicas),⁷⁷ TASH (*Toxicant Associated Steatohepatitis*: esteatohepatite associada a tóxicos).⁷⁷ Entretanto, não há um consenso sobre a definição de um termo específico para toxicidade induzida por agrotóxicos.

2.3.1 Mecanismos de Toxicidade Hepática

Existem diferentes tipos de mecanismos de hepatotoxicidade que podem ser causados por agentes exógenos ao organismo e podem ser divididos em três grandes categorias de toxicidade: intrínseca (direta), idiossincrática e indireta.

Toxicidade intrínseca é caracterizada por hepatócitos comprometidos por um efeito físico-químico direto ou por meio de alterações nas vias metabólicas, podendo desencadear uma reação citotóxica, por exemplo, causado pelo álcool, ou colestática, causada por metilenodianilina (MDA).⁷⁸ A lesão hepática induzida por agentes químicos pode ser causada por drogas que possuam toxicidade direta e previsível no fígado, células biliares, endoteliais, sinusoidais e células estreladas. Essa categoria de lesão hepática é tipicamente dose-dependente, ocorrendo quando uma dose limite ou o nível de exposição é alcançado.

A toxicidade idiossincrática causa danos imprevisíveis, incluindo mecanismos de hipersensibilidade (alérgicos) e formas não relacionadas à hipersensibilidade (não alérgicas). É a

principal causa do desenvolvimento de hepatotoxicidade farmacológica.⁷⁸⁻⁷⁹ Esta categoria é denominada idiossincrática, pois é amplamente independente da dose, via ou duração da exposição à medicação e, principalmente, relacionada às características únicas do hospedeiro. DILI idiossincrática refere-se a uma reação hepatotóxica a uma droga que ocorre em uma pequena proporção de indivíduos que são expostos ao fármaco, sendo inesperado por suas ações farmacológicas conhecidas. Acredita-se ser precipitado pela interação de vários fatores críticos, incluindo as propriedades toxicológicas da droga em conjunto com fatores seletivos relacionados ao hospedeiro e condições ambientais.⁸⁰

A toxicidade indireta é causada pela ação do fármaco e não por suas propriedades tóxicas ou idiossincráticas. O dano indireto pode ser a indução de uma nova doença ou a exacerbação de uma preexistente.⁸¹ Existem diferentes fatores que contribuem para a toxicidade hepática, incluindo a exposição a altas concentrações de um fármaco, grande atividade metabólica e a presença de diferentes enzimas responsáveis pela geração de metabólitos reativos, especialmente espécies reativas de oxigênio (EROS).⁸² A hepatotoxicidade indireta reflete lesão associada a ações conhecidas de uma droga. Essas podem exacerbar uma doença hepática crônica preexistente como a esteatose hepática ou provocar o agravamento de uma doença inflamatória hepática subjacente. As características de cada categoria estão ilustradas na Tabela 1.

Até o momento, não há descrição na literatura de um termo específico para o mecanismo de hepatotoxicidade desenvolvido por pesticidas.

	Intrínstico (Direto)	Indireto	Idiosincrático
Dose-relacionada	Sim	Não (geralmente)	Não (com algumas exceções)
Latência	Pequena (poucos dias)	Normalmente atrasada (semanas a meses)	Variável (dias a meses), pode ocorrer após o tratamento ou Descontinuação
Taxa de Ocorrência	Alta	Intermediária	Baixa
Previsível	Sim	Ocasionalmente	Não
Drogas implícitas	Acetaminofeno, ácido nicotínico, aspirina, cocaína, muitas quimioterapias para câncer, fialuridina, amiodarona, metotrexato (intravenoso), plantas contendo alcaloides pirrolizidínicos	Corticosteroides em altas doses; alguns agentes antineoplásicos: inibidores do checkpoint imunológico, inibidores da proteína quinase, anticorpos monoclonais (por exemplo, anti-TNF, anti-CD20), daclizumab	Isoniazida, clavulanato de amoxicilina, antibióticos macrolídeos fluoroquinolonas, estatinas, flucloxacilina, diclofenac; certos suplementos de ervas e dietéticos (HDS), e. extrato de chá verde, <i>Polygonum multiflorum</i>
Mecanismos Patológicos	Danos no fígado ocorrem se as concentrações do metabólito nas células do fígado excederem o limite tóxico	Efeitos não intencionais das ações do medicamento no fígado (por exemplo, aumento da autorreatividade imune induzida pelo medicamento ou redução da sensibilidade à insulina podem causar hepatite imunomediada e fígado gorduroso, respectivamente)	Resposta imune adaptativa a um fármaco original ou seu metabólito pode contribuir. Danos mitocondriais e esteatose hepática também podem ser observados

Tabela 1: Características dos diferentes mecanismos de hepatotoxicidade. Adaptado de Hoofnagle JH, *et al.* ⁸¹

2.3.2 Fatores de Risco à Hepatotoxicidade

Na literatura, foram estudados alguns fatores de risco para o desenvolvimento de hepatotoxicidade devido a diferentes etiologias:

Idade e gênero: a sensibilidade aos xenobióticos varia com a idade, considerado-se um fator de risco; a idade avançada aumenta a sensibilidade.⁸² A idade, segundo o Conselho de Organizações Internacionais de Ciências Médicas (CIOMS), no “Método de avaliação de causalidade *Roussel Uclaf Causality Assessment Method*” (RUCAM) classifica os pacientes com

mais 55 anos de idade como fator de risco. Por outro lado, o gênero feminino é o mais propenso a desenvolver hepatotoxicidade devido a diferenças hormonais.⁸³⁻⁸⁴

Varição genética: polimorfismos de nucleotídeo único em vários genes e regiões denominadas *Human Leucocyte Antigen* (HLA) demonstraram ter um risco aumentado para DILI. A Associação genômica do Reino Unido (GWAS) identificou o genótipo HLA-B*5701 como o principal determinante da DILI com flucloxacilina. Já a Associação genômica europeia e americana demonstrou evidências de que os genótipos HLA DRB1*15:01 e DQB1*0602 desempenham papel na suscetibilidade à amoxicilina-clavulanato na DILI. O genótipo HLA-B*35:02 tem sido associado ao aumento do risco de minociclina em DILI, com uma frequência de portadores de 16% em casos de DILI em comparação com 0,6% no controle populacional.⁸⁵ A genotipagem de HLA pode aumentar potencialmente a precisão e a confiança no diagnóstico de DILI.⁸⁶

Álcool: considera-se um dos fatores de risco mais estudados para doença hepática. O consumo de álcool pode agravar ou aumentar a toxicidade associada à exposição ocupacional. O álcool, por meio de seu efeito indutor no sistema P450, leva à geração de radicais livres tóxicos que aumentam a probabilidade de dano hepático grave.⁸⁷ O uso de álcool e a gestação foram incluídos na lista de fatores de risco do CIOMS/RUCAM. O álcool também é um indutor do CYP2E1 que desempenha um papel muito importante na formação de N-acetil-p-benzoquinoneimina (NAPQI), um metabólito reativo responsável pela hepatotoxicidade do acetaminofeno; corroborando com a informação de alguns autores, que apontaram o álcool como preditor negativo de DILI.⁸⁸ Há também uma maior incidência de DILI grave quando o álcool está associado com anabolizantes esteroides.⁸⁹

Doenças hepáticas pré-existentes: as comorbidades prévias podem aumentar o risco de DILI, um exemplo são os pacientes com doença hepática gordurosa metabólica (MAFLD), na qual

há um aumento no desenvolvimento de esteato-hepatite associada a tóxicos (TASH). Há evidências de que pacientes com MAFLD preexistente aumenta o risco lesão hepática aguda induzida por fármacos.⁹⁰ Em outras doenças, como hepatite viral, pode haver desenvolvimento de algum grau de dano hepático, como fibrose ou esteatose, levando à piora do prognóstico devido à exposição a produtos químicos.⁹¹ Uma grande porcentagem de pacientes, com comorbidades prévias e que necessitam utilizar diferentes drogas para controlá-las, têm uma suscetibilidade maior à hepatotoxicidade, pois os fármacos atuam sinergicamente com outros fatores de risco, levando à progressão da doença hepática.⁸⁹ Outros estudos relataram uma alta taxa de doença hepática em pacientes com síndrome metabólica, esteato-hepatite não alcoólica (NASH), hipertensão arterial sistêmica (HAS) e vírus da imunodeficiência humana (HIV); esse último relacionado à terapia antirretroviral (TARV).⁹²⁻⁹³

Diabetes e obesidade: a prevalência de comorbidades metabólicas (diabetes mellitus, esteatose hepática, obesidade e síndrome metabólica) tem aumentado gradativamente. Resultados de pesquisas pré-clínicas e clínicas indicam que as características das comorbidades metabólicas também são fatores que afetam o fenótipo e a progressão de DILI. Evidências limitadas sugerem que um índice de massa corporal (IMC) mais alto e comorbidades metabólicas (síndrome metabólica, diabetes mellitus tipo 2, obesidade e doença hepática gordurosa não alcoólica) contribuem para a apresentação clínica e o desenvolvimento de DILI.⁹⁴⁻⁹⁵ O acúmulo de gordura hepática pode reduzir a suscetibilidade à lesão tecidual se o fígado for exposto a estímulos prejudiciais (isquemia/reperfusão, endotoxinas bacterianas).⁹⁶ No entanto, há poucos resultados de estudos clínicos que investiguem os efeitos das comorbidades metabólicas no risco de DILI.⁹⁷

Uso de outros medicamentos: interações medicamentosas. As isoenzimas de citocromo P450 são responsáveis pelo metabolismo oxidativo na maioria dos fármacos e xenobióticos

relacionados ao ambiente de trabalho.⁸² Alguns medicamentos - como os antiepilépticos de primeira geração, conhecidos por sua capacidade de indução enzimática - podem causar a formação de metabólitos quimicamente reativos a outras substâncias químicas, o que aumenta o risco de toxicidade hepática.⁹⁸ Alguns solventes orgânicos podem induzir um efeito sinérgico para o desenvolvimento de hepatite aguda grave.⁹⁹

2.3.3 Testes para Avaliação de Toxicidade

Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo, um desequilíbrio entre EROs e defesas antioxidantes em sistemas biológicos,¹⁰⁰ pode desempenhar um papel importante nessas relações.¹⁰¹ O excesso de EROs, como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, promove a oxidação de lipídios, proteínas e DNA, levando a alterações genéticas ou epigenéticas, inflamação, dano celular, mutagênese e carcinogênese.¹⁰²⁻¹⁰⁴ As defesas antioxidantes incluem componentes enzimáticos e não enzimáticos mensurados em soro, eritrócitos ou plasma, para uso como marcadores indiretos do dano celular promovido pelo estresse oxidativo em humanos.¹⁰⁵ Moléculas biológicas oxidadas de proteínas, lipídios e DNA também são utilizadas como marcadores de estresse oxidativo.¹⁰⁶ Pesticidas podem induzir ao estresse oxidativo diretamente ou durante sua biotransformação, levando à produção de metabólitos reativos que geram EROs.¹⁰⁷ A Figura 2 ilustra hipoteticamente a geração de EROs por pesticidas, ação do sistema antioxidante e modificações biológicas que podem ser rastreadas como biomarcadores de estresse oxidativo, que têm sido amplamente investigadas em trabalhadores agrícolas expostos cronicamente a pesticidas.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ No entanto, poucos estudos evidenciaram alterações nesses marcadores de estresse oxidativo associados a diferentes tipos de pesticidas. Embora os marcadores não tenham especificidade, alguns estudos sugeriram associações diferenciais dependendo do tipo de pesticida.¹¹¹⁻¹¹²

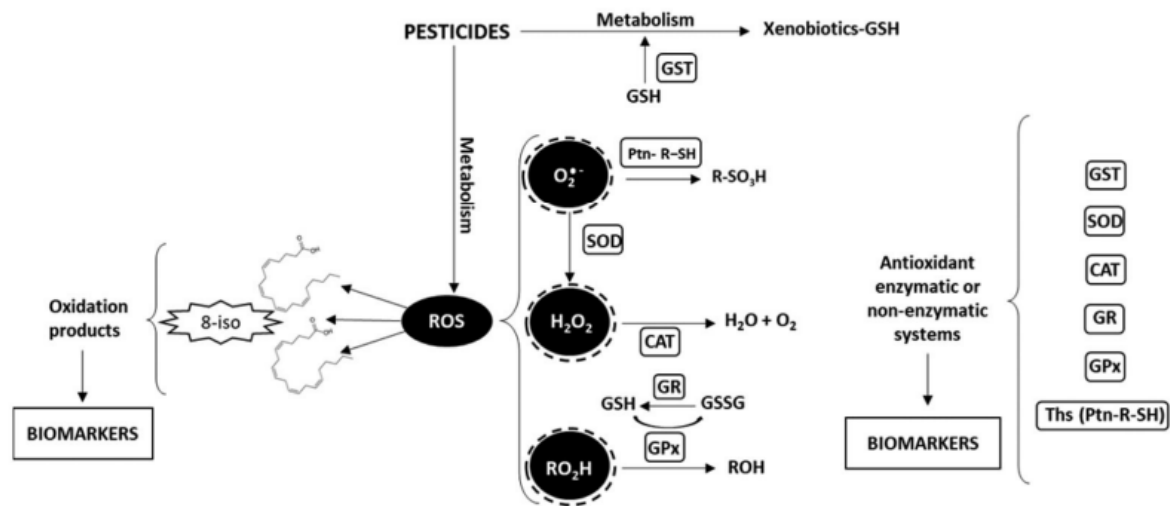


Figura 3. Estresse oxidativo produzido durante o metabolismo de pesticidas e possíveis vias de formação de biomarcadores selecionados.

Genotoxicidade

A definição de genotoxicidade é dada por meio de agentes ou substâncias que possuem a capacidade de danificar o DNA e os cromossomos da célula após sua interação. Tal alteração pode ser em sua estrutura ou função. Uma vez translocada para o núcleo, tornam-se capazes de ser transmitidas entre um gene e outro, denominando-se mutações. As mutações gênicas são mudanças ocasionais que ocorrem nos genes, ou seja, é o procedimento pelo qual um gene sofre uma mudança estrutural. As mutações envolvem a adição, eliminação ou substituição de um ou poucos nucleotídeos da fita de DNA. Essas são a principal fonte de variabilidade genética em uma população, e desencadeiam o surgimento de doenças nos indivíduos e seus descendentes.¹¹³ O potencial mutagênico de um produto pode ser alterado por fatores exógenos, como os aditivos químicos e pesticidas, e também por fatores endógenos, como vitaminas, compostos fenólicos e alcaloides.¹¹⁴ Na avaliação da genotoxicidade, pode-se utilizar a análise de micronúcleos e ensaio cometa. A análise de micronúcleos tem como objetivo avaliar a capacidade de uma substância em

romper cromossomos (clastogenicidade) ou afetar a formação de placa em metáfase e/ou fuso mitótico, capaz de conduzir uma distribuição desigual dos cromossomos durante a divisão celular.¹¹⁵

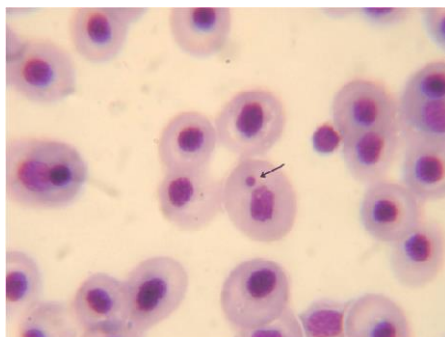


Figura 4 – Micronúcleo em sangue periférico.¹¹⁶

A avaliação de ensaio cometa é utilizada para analisar as possíveis lesões genômicas que evoluem para mutações. Esse método possui uma alta sensibilidade para detectar danos ao DNA,¹¹⁷ podendo ser também utilizado em estudo de reparação de DNA, biomonitoramento ambiental e provas de genotoxicidade.¹¹⁸ A técnica baseia-se na detecção de fragmentos de DNA que, após a indução por eletroforese, migram se distanciando do centro nuclear a uma velocidade maior que a do DNA intacto, formando uma estrutura semelhante a uma cauda de cometa.¹¹⁹

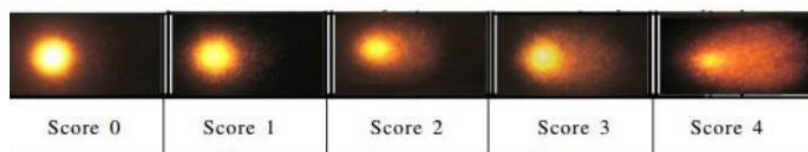


Figura 5 - Relação de danos ao DNA com escores atribuídos para o ensaio cometa – Score 0 (sem danos); Score 1 (dano pequeno); Score 2 (Dano médio); Score 3 (dano grave); Score 4 (dano gravíssimo) - Fonte: Silva e Cruz, 2012¹²⁰

Análise Bioquímica

O dano hepático em pessoas expostas a pesticidas ou a qualquer outro produto químico pode ser avaliado utilizando-se as enzimas AST e ALT, incluindo a análise de lesão hepática por fosfatase alcalina, bilirrubina e duas frações. Entretanto, esses biomarcadores não são específicos para a doença hepática tóxica.¹²¹ Devido às características clínicas e histopatológicas similares na lesão hepática em pacientes com hepatotoxicidade associada à exposição a substâncias químicas e à exposição a diferentes fármacos químicos, vem se utilizando os mesmos critérios bioquímicos para lesão hepática aguda e crônica em DILI.

Histologia

O dano hepático pode ser estabelecido mediante a avaliação histológica do fígado para a presença de esteatose, esteatohepatite não alcoólica, fibrose, entre outros. Entretanto, há poucos estudos na literatura que analisaram a histologia hepática na exposição a substâncias tóxicas como pesticidas. A exposição tóxica a diferentes substâncias está presente principalmente em doenças hepáticas ocupacionais, que muitas vezes podem ocorrer de maneira insidiosa com fenótipos atípicos de lesão hepática tóxica, que incluem esteatose, TASH, fibrose, cirrose e hepatocarcinoma.¹²² Evidenciou-se esteatose relacionada à exposição a solventes orgânicos e outros produtos químicos como primeira manifestação histológica da doença hepática gordurosa nessa situação e, posteriormente, evoluindo para infiltrado inflamatório, aumento de hepatócitos e em alguns casos, fibrose e cirrose. Esses achados são indistinguíveis da gordura do fígado.¹²³⁻¹²⁴ Já a fibrose pode estar presente após a exposição crônica a diferentes tóxicos por meio do desenvolvimento de hepatite crônica, necrose subaguda e lesão por esteatohepatite.¹²⁵

Marcadores de Exposição

A avaliação do monitoramento biológico tem se tornado uma importante ferramenta na prevenção sanitária, com a intenção de prevenir o desenvolvimento de qualquer patologia relacionada com a exposição a produtos químicos, incluindo aos pesticidas.¹²⁶ Essa ferramenta se define como a medição e quantificação de substâncias químicas e de seus metabólitos em tecidos, fluidos corporais, secreções, ar exalado ou em qualquer combinação, para avaliar a exposição e o risco à saúde.¹²⁷ A decomposição metabólica do Mancozebe tem como resultado a formação de dissulfeto de carbono (CS₂), etilenotiouréia (ETU), manganês (Mn) e Zinco (Zn), sendo o ETU o principal metabólito urinário para a avaliação da exposição ao Mancozebe.¹²⁸

Uma revisão sistemática realizada por Dallagnol *et al.*¹²⁹ demonstrou danos sistêmicos incluindo estresse oxidativo, genotoxicidade, elevação de enzimas hepáticas, parâmetros laboratoriais alterados e anemia em estudos experimentais, induzindo toxicidade através do Mancozebe (Tabela 2).

Characteristics of the studies used in the review Studies on animals					
Author (year)	Country	No.	Group	Method	Results
Yahia, 2015 ²⁹	Algeria	24 male Wistar rats	Exposure: 8 weeks Control Group Group 1: 500 mg/kg/day Group 2: 1000 mg/kg/day		Statistical Data Regarding The Control Group ² Group 1: Increased Urea ($p<0.01$), creatinine ($p<0.05$), WBC ($p<0.05$), AST ($p<0.05$), ALT ($p<0.001$), AP ($p<0.001$) and TB. Reduction of RBC, Hb, HCT ($p<0.001$) Group 2: Increased Urea ($p<0.01$), creatinine ($p<0.01$), WBC ($p<0.01$), AST ($p<0.05$) ALT ($p<0.001$) AP ($p<0.001$) TB Reduction of Proteins and lipids ($p<0.001$), WBC, Hb, HCT ($p<0.001$)
Yahia, 2014 ⁹	Algeria	8 adult rats	Exposure: 4 weeks Control group Group 1: 800 mg/kg/day Group 2: 1200 mg/kg/day		Statistical Data Regarding The Control Group ³ Group 1: Increased liver weight ($p<0.05$), AP, ALT ($p<0.05$), AST ($p<0.05$), Reduction of GSH ($p<0.05$) Group 2: Increased liver weight ($p<0.05$), AP ($p<0.05$), ALT ($p<0.05$), AST ($p<0.05$), Reduction of GSH ($p<0.05$)
Atamaniuk, 2013 ³⁰	Ukraine		Fish Control Group Group 0.9 mg/L ⁻¹ Group 1.5 mg/L ⁻¹ Group 3 mg/L ⁻¹		Increased SOD ⁴ 70-79%; catalase 23-52% and GPx 49% Carbonylated proteins: 92- 125% increase ($1.31 \pm 0.24 \text{ nmol mg}^{-1}$)
Ahmed, 2017 ²³	Saudi Arabia	30 healthy adult male albino rats	Exposure: 4 weeks Control group Group 1: 250 mg/Kg/day Group 2: 500 mg/Kg/day		Increased AST ⁵ , albumin, acetylcholinesterase, TC, HDL and LDL, mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin. Increased weight of the liver, kidney, brain and testicles. Reduction of blood nitrogen urea, creatinine and triglycerides. Reduction of count of erythrocytes, leukocytes and total weight of the animal.
Goldoni, 2014 ³¹	Brazil	20 adults male Wistar rats	Control Group: 0.9% NaCl (n = 10) Exposed Group: 40 mg/Kg (n = 10)	MO cells for micronuclei	% of MN ⁶ Control Group: 3.2 ± 0.7 Exposed Group: 7.2 ± 1.1 ($p=0.004$)
Pirozzi, 2016 ²⁷	Italy	HepG2 cell line	Exposure: 24 hrs (0.1; 1; 10; 100; 500 ppm) Exposure 48 hrs (1; 10; 100)		Reduction of cell viability by 50% [1-100 ppm] MTT test: death of all cells [100 ppm] (48h) Increased nr. of fat droplets [0.1- 100 ppm] x treatment with isolated fatty acid

²White blood cells; ALT: alanine aminotransferase; AP: alkaline phosphatase; TB: total bilirubins. RBC: red blood cells; Hb: hemoglobin; HCT: hematocrit. ³AP: alkaline phosphatase; GSH: hepatic glutathione. ⁴SOD: superoxide dismutase; GPx: glutathione peroxidase. ⁵AST: aspartate aminotransferase; CT: total cholesterol; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein. ⁶MN: micronuclei.

Tabela 2: Estudos experimentais induzindo toxicidade pelo Mancozebe.

3. JUSTIFICATIVA

O Mancozebe é produzido comercialmente há décadas e várias evidências demonstraram seus efeitos toxicológicos. No entanto, até o momento, nenhum estudo explorou a influência deste composto na microbiota bacteriana intestinal.

4. QUESTÃO DE PESQUISA

Exposição crônica ao Mancozebe pode alterar a microbiota bacteriana?

5. HIPÓTESE

A exposição crônica do Mancozebe pode alterar a microbiota bacteriana em um modelo experimental.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do fungicida Mancozebe na microbiota intestinal bacteriana por meio de um modelo experimental.

6.2 Objetivos Específicos

Caracterizar a diversidade, a estrutura e a composição da microbiota bacteriana nos três grupos experimentais.

Caracterizar a relação dose-dependente dos grupos expostos ao fungicida.

Identificar alterações da microbiota bacteriana do controle em relação aos grupos de exposição ao fungicida (MZ1 e MZ2).

Determinar quais grupos taxonômicos bacterianos estão relacionados à exposição ao Mancozebe.

Identificar quantos e quais táxons bacterianos são compartilhados e quais são únicos em cada grupo experimental.

7. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

Changes in the gut microbiota of rats after exposure to the fungicide Mancozeb

Marina Ferri Pezzini ^{a,b1}, Pabulo Henrique Rampelotto ^{a,c1}, Juliana Dall'Agnol ^b, Gabriel Tayguara Silveira Guerreiro ^{a,b}, Larisse Longo ^{a,b}, Nelson D. Suarez Uribe ^b, Mário Reis Álvares-da-Silva ^{a,b,d}, Dvora Joveleviths ^{a,b}

^a Experimental Laboratory of Hepatology and Gastroenterology, Center for Experimental Research, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre 90035-007, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Post Graduate Program in Gastroenterology and Hepatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90035-007, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Brazil

^d Division of Gastroenterology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre 90035-007, Rio Grande do Sul, Brazil

¹ These authors contributed equally to the manuscript.

HIGHLIGHTS

- Mancozeb changed the structure and composition of the gut microbiota in rats
- Mancozeb increased the bacterial diversity regardless of the dose used
- Mancozeb significantly increased the abundance of seven microbial taxa
- Mancozeb significantly decreased the abundance of five microbial taxa
- Mancozeb reduced the microbial co-occurrence network complexity

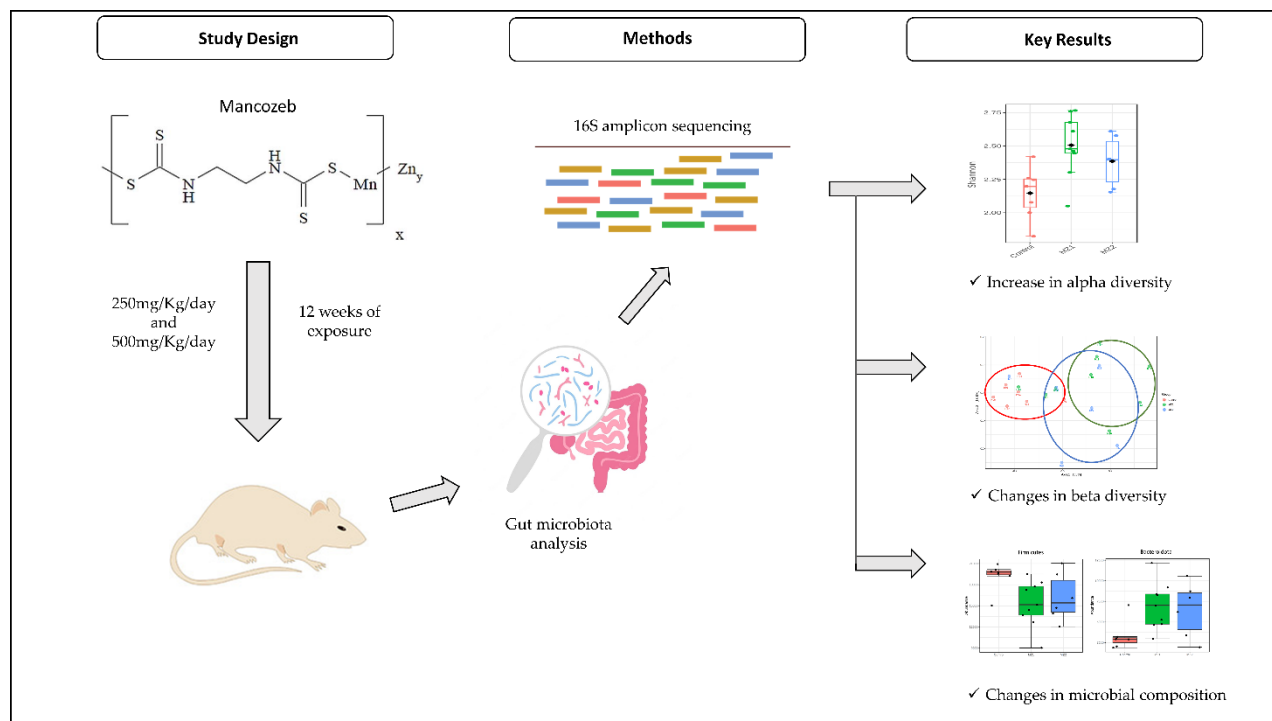
ABSTRACT

Mancozeb is a fungicide commonly used in pest control programs, especially to protect vineyards. Its toxicity has already been evidenced in several studies. However, its influence on the structure and diversity of the gut microbiota remains unknown. In this work, the adverse impact of Mancozeb on the intestinal microbiota was investigated using a rodent model. Adult male Sprague Dawley rats were randomized into three groups: Control (standard diet), MZ1 (Mancozeb dose: 250mg/Kg/day), and MZ2 (Mancozeb dose: 500mg/Kg/day). After 12 weeks of the experiment, animals were euthanized, and feces present in the intestine were collected. After fecal DNA extraction, the V4 region of the 16S rRNA gene was amplified followed by sequencing in an Ion S5™ System. Alpha and beta diversity analysis showed significant differences between Control and Mancozeb groups (MZ1 e MZ2), but no difference between MZ1 e MZ2 was observed. Co-occurrence analyses revealed that the topological properties of the microbial networks were significantly lower in both groups exposed to Mancozeb when compared to Control. In addition, seven genera significantly increased in abundance following Mancozeb exposure, while five genera decreased. In conclusion, the exposure to Mancozeb presented side effects by changing the

structure and composition of the microbiota in rats, increasing bacterial diversity regardless of the dose used, and reducing the microbial co-occurrence network complexity.

Keywords: Pesticide; Toxicity; Experimental model; Microbiome; 16S rRNA; Network analysis

GRAPHICAL ABSTRACT



1. Introduction

Mancozeb is a metal-containing ethylene bis-dithiocarbamate (EBDC) fungicide widely used in agriculture to control a broad variety of fungal infections (Gullino et al., 2010). It is a combination of two other dithiocarbamates Maneb and Zineb, being a complex mixture of the full manganese and zinc-complexed compound and its major metabolite, ethylene thiourea. As one of the most used fungicides in commercial use for several decades, Mancozeb is authorized on many crops, particularly vines, cereals, fruit, and vegetables. Due to the number of people potentially exposed to fungicide, it has been a major concern for ecotoxicology and public health. In humans, the risk of acute intoxication by high doses of Mancozeb is small and is mainly a concern for agricultural and industrial workers. However, the population at large can be exposed to Mancozeb and other fungicides through residues in food. In general, human exposure occurs by consuming contaminated plants, drinking water, and occupational exposure (Dall'Agnol et al., 2021).

Mancozeb has been shown to cause adverse health effects in both humans and experimental animals. In humans, Mancozeb exposure was strongly associated with an increased incidence of thyroid disease in female spouses of pesticide applicators (Goldner et al., 2010), a mild immunomodulating effect on vineyard workers (Corsini et al., 2005), and a moderate association between mancozeb exposure and neural tube defects in newborns from farmer families was observed (Nordby et al., 2005). Ethylene Thiourea (ETU), the main metabolite in Mancozeb, is classified as carcinogenic (Stadler et al., 2022). Higher ETU levels are also associated with adverse neurodevelopmental outcomes (van Wendel de Joode et al., 2016; Mora et al., 2018). In addition, occupational exposure to several fungicides has been linked to a higher risk for neurodegenerative diseases (Kamel and Hoppin, 2004; Parrón et al., 2011; Brouwer et al., 2017). The toxicity of Mancozeb has also been evidenced in several studies with different experimental models. In rats, Mancozeb has caused general toxicity, thyroid hormone dysfunctions, oxidative stress, alterations in biochemical and hematological parameters, as well as neurotoxic and reprotoxic effects (Axelstad et al., 2011; Ahmed et al., 2017; Bianchi et al., 2020). In addition, Mancozeb exposure is a risk factor for spontaneous abortion, maternal mortality, and defects in fetal development in rats and rabbits (Runkle et al., 2015). Moreover, it is strongly linked to mutagenic and carcinogenic risks due to its ability to induce genotoxic alterations in human ovarian cells (Yahia et al., 2019). In *Caenorhabditis elegans*, Mancozeb is lethal at doses experienced by farmers and sub-lethal doses lead to degeneration of neurons (Negga et al., 2011), behavioral dysfunction (Harrison Brody et al., 2013), inhibition of larval growth (Ruan et al., 2009), and induction of heat shock responses (Easton et al., 2001). Toxicological effects on Mancozeb have also been extensively reported in zebrafish (Vieira et al., 2020; Leandro et al., 2021; Wang et al., 2021) and in different *in vitro* cultured cell lines (Paro et al., 2012; Srivastava et al., 2012; Palmerini et al., 2018; Lori et al., 2021).

Among the adverse effects that Mancozeb may cause, dysbiosis is of primary relevance for host health, but its clinical implications were not yet characterized. Dysbiosis is a condition in which the gut bacteria become imbalanced, leading to a wide range of diseases including inflammatory bowel disease (IBD), obesity, allergic disorders, Type 1 diabetes mellitus, autism, obesity, and colorectal cancer in both human and animal models (DeGruttola et al., 2016; Belizário and Faintuch, 2018). Several recent studies have shown that fungicides can disrupt the functioning of the gut microbiota, affecting its composition and diversity (Xu et al., 2014; Jin et al., 2017; Meng et al., 2019; Yuan et al., 2019; Kong et al., 2020; Meng et al., 2021). In addition, specific bacteria in the gut can regulate metabolites and metabolic pathways, further affecting the health of the host (Liu et al., 2017; Djekkoun et al., 2021). Overall, these studies indicate that the gut microbiota may be one of the primary targets of fungicide-induced toxicity and that changes in the gut microbiota may be used as early indicators for monitoring the health risk of the host exposed to fungicides.

Although Mancozeb has been commercially produced for decades and several pieces of evidence have demonstrated its toxicological effects, no study so far explored the influence of this compound on the gut microbiota. In this work, the adverse impact of Mancozeb on the intestinal microbiota was investigated using a rodent model.

2. Material and methods

2.1. Animals

Twenty-seven adult (60-days-old) male Wistar rats weighing 280–300 g were included in this study. The animals were divided into groups of three rats per polypropylene cage with sawdust-covered floors and habituated to the maintenance room for two weeks before the start of the experiment. Rats were maintained on a standard 12 h light/dark cycle in a temperature-controlled environment ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). All experiments and procedures involving the use of animals were approved by the Institutional Ethics Committee (Protocol number: 2020-0235). The procedures for the use of scientific animals were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th ed. (National Research Council, 2011).

2.2. Study design

After acclimatization to the environment, the animals were randomized by weight into a control group ($n = 9$; Control) that received a saline solution (0.9% NaCl) administered by gavage, once a week, for 12 weeks and two intervention groups ($n = 18$) that received a dose of Mancozeb (Dithane® NT). Intervention group I ($n = 9$; MZ1) received a dose of Mancozeb the (250mg/Kg/day) and intervention Group II ($n = 9$; MZ2) received a dose of Mancozeb the 500mg/Kg/day. The animals were weighed weekly during the experimental period. Animals in the study received a standard rodent diet (Nuvilab CR-1; Quimtia, Colombo, Brazil) with an energy value of 2.93 kcal/g. The diet consisted of 55.0% carbohydrates, 22.0% protein, 4.5% fat, and 18.5% of other nutrients such as fibers and vitamins. The diet offered to the animals was replaced two days a week. All animals received water and food *ad libitum* during the experimental period. After 12 weeks of the experiment, all the animals were euthanized by cardiac exsanguination. Feces present in the intestine were collected aseptically, frozen in liquid nitrogen, and stored in a freezer at -80°C until the proposed evaluations were carried out.

2.3. Mancozeb administration

During the 12 weeks of experimental, all animals received gavage once a week, according to the experimental group. The control group received gavage with saline solution (0.9% NaCl). The MZ1 group received a dose of 250mg/Kg/day of Mancozeb dissolved in saline solution (0.9% NaCl) and MZ2 group received a dose of 500mg/Kg/day of Mancozeb. The maximum dose defined for this model was 500 mg/kg, based on the lethal dose of Mancozeb. That dose corresponds to 1/10 of the lethal dose (Ahmed et al., 2017). This model proposed to mimitize the exposure of winegrowers who apply the fungicide between October and December annually, with a total of approximately 12 weeks of exposure.

2.4. DNA extraction and 16S rRNA sequencing

The genomic material was obtained from approximately 200 mg of fecal sample with an appropriate commercial kit (QIAmp DNA Stool Mini kit, Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. At the end of the DNA extraction, an average of 5-10 μg of genomic material was obtained. The hypervariable V4 region from rRNA gene was amplified through PCR

using genomic DNA (approximately 50 ng per reaction) and the following primer pair: 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). To pool different samples in the same reaction, we used the primer-fusion method, and each sample had a distinct barcode attached to the corresponding PCR product. The amplification was performed using Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR was conducted under the following conditions: 95°C for 600 s and thereafter 30 cycles of 95°C for 30 s, 57°C for 30 s and 72°C for 60 s with a final extension of 72°C for 60 s. The products were verified through electrophoresis in an agarose gel, purified with AMPure XP PCR Purification Kit (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), quantified using Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and subjected to emulsion PCR using Ion Chef™ System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After, the resulting enriched beads were sequenced in Ion S5™ System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using Ion 510™ Chip Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Of the 27 samples, five (H02, H03, H10, H15, H21) could not be sequenced and, therefore, were not included in the study. The raw data of high-throughput sequencing is available at the NCBI GenBank Sequence Read Archive (SRA) under accession number PRJNA858855.

2.5. Bioinformatics analysis

The sequence data exported from the Ion S5™ System was processed using a custom pipeline in Mothur v.1.47.0 (Schloss et al., 2009). Initially, sequences were depleted of barcodes and primers (where no mismatch was allowed), and then a quality filter was applied to eliminate low-quality reads. Quality control was conducted by trimming the low-quality reads, those with incorrect length, those containing an ambiguous base, or containing homopolymers longer than 8 bp. All potentially chimeric sequences were identified and removed using VSEARCH (Rognes et al., 2016).

After these initial quality filtering and trimming steps, the remaining sequences were clustered into operational taxonomic units (OTUs) based on a 99% identity level and were classified against the SILVA v138 reference database at 97% similarity. Sequences that could not be classified (i.e., “unknown” sequences), as well as sequences identified as eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts were removed prior to further analysis. After all filtering steps, the resulting OTU table was composed of 763,944 sequences, with an average of 34,724 sequences per sample (Table S1). The resulting OTU table was rarefied to the smallest library size. Subsequent analyses of the sequence dataset were performed in R v. 4.0.0 (using vegan, phyloseq, ggplot2, and MicrobiomeAnalystR packages).

2.6. Microbial community and statistical analysis

Alpha diversity was assessed using the number of observed taxa as well as the Simpson and Shannon indexes. For overall comparison of significant differences among bacterial communities (i.e., beta diversity), principal coordinates analysis (PCoA) was performed. A matrix using the Bray–Curtis dissimilarity metric was calculated for each pair of samples. To achieve statistical confidence for the sample grouping observed by PCoA, the ANOSIM multivariate test was

performed on the distance matrix. Venn dendrogram was generated using InteractiVenn (Heberle et al., 2015).

To identify differentially abundant taxa at the phylum, family, and genus level, the linear discriminant effect size (LEfSe) method was performed (Segata et al., 2011). The algorithm performs a nonparametric factorial Kruskal–Wallis sum rank test and linear discriminant analysis (LDA) to determine statistically significant different features among taxa and estimates the effect size of the difference. Differences were considered significant for a logarithmic LDA score threshold of ± 2.0 and $P < 0.05$.

2.7. Network Analysis

Co-occurrence network analyses were performed using SparCC from the raw count OTU table (Friedman and Alm, 2012). Ten interactions were used to estimate the median correlation of each pairwise and the statistical significance of the correlations was calculated by bootstrapping with 100 iterations. SparCC correlations with a magnitude of 0.8 and statistical significance ($p < 0.05$) were incorporated into the network analyses. The nodes in the reconstructed networks represent the genera, whereas the edges (that is, connections) correspond to correlation between nodes. To describe the topology of the resulting network, four main centrality measures (i.e., Modularity, Clustering Coefficient, Graph Density, and Degree Centrality) were calculated, and the network was visualized using the interactive platform Gephi (Bastian et al., 2009).

3. Results

3.1. Animal body weight

The body weight of animals exposed to both doses of Mancozeb was significantly lower when compared to Control (Figure S1) ($P = 0.006$). However, no difference was observed between MZ1 and MZ2.

3.2. Microbial diversity

The number of observed taxa, Simpson, and Shannon indexes were used to evaluate the impact of Mancozeb on the alpha diversity of the gut microbiota (Fig. 1). All indices were significantly higher in both treatment groups when compared to Control ($P = 0.03$, $P = 0.01$, and $P = 0.01$ for observed taxa, Simpson, and Shannon, respectively); however, no difference was observed between MZ1 and MZ2.

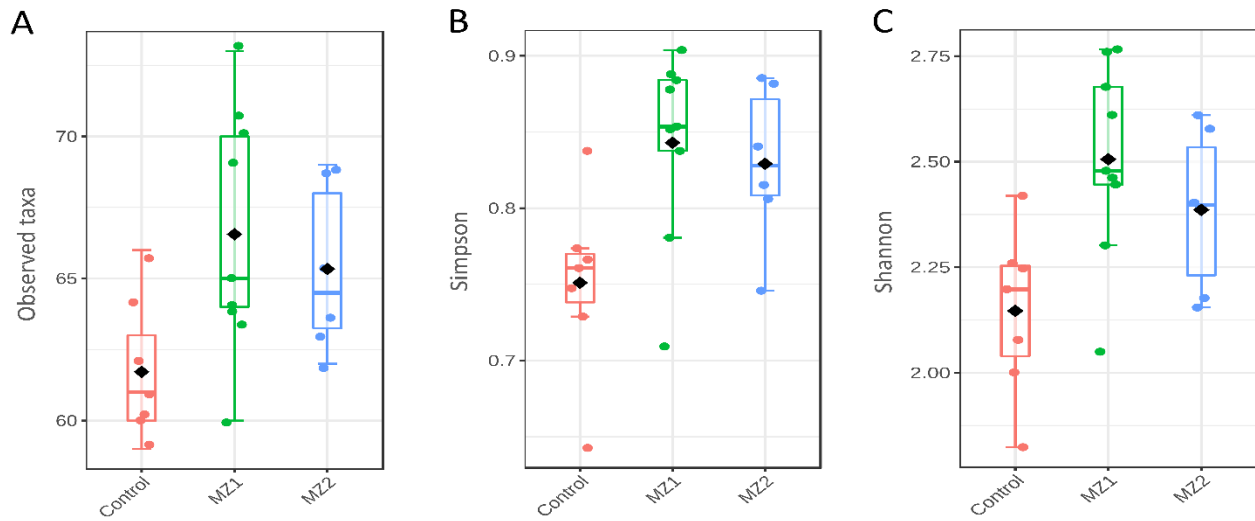


Figure 1. Alpha diversity analysis according to different metrics. Observed (A), Simpson (B), Shannon (C). Statistical confidence for the sample grouping was accessed using permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA).

Principal coordinates analysis (PCoA) analysis based on Bray–Curtis metric was used to determine the clustering of samples and to better understand similarities and differences among the bacterial community structures (Fig. 2). The analysis showed a separation between Control and the treatment groups, which was confirmed by ANOSIM ($P = 0.01$).

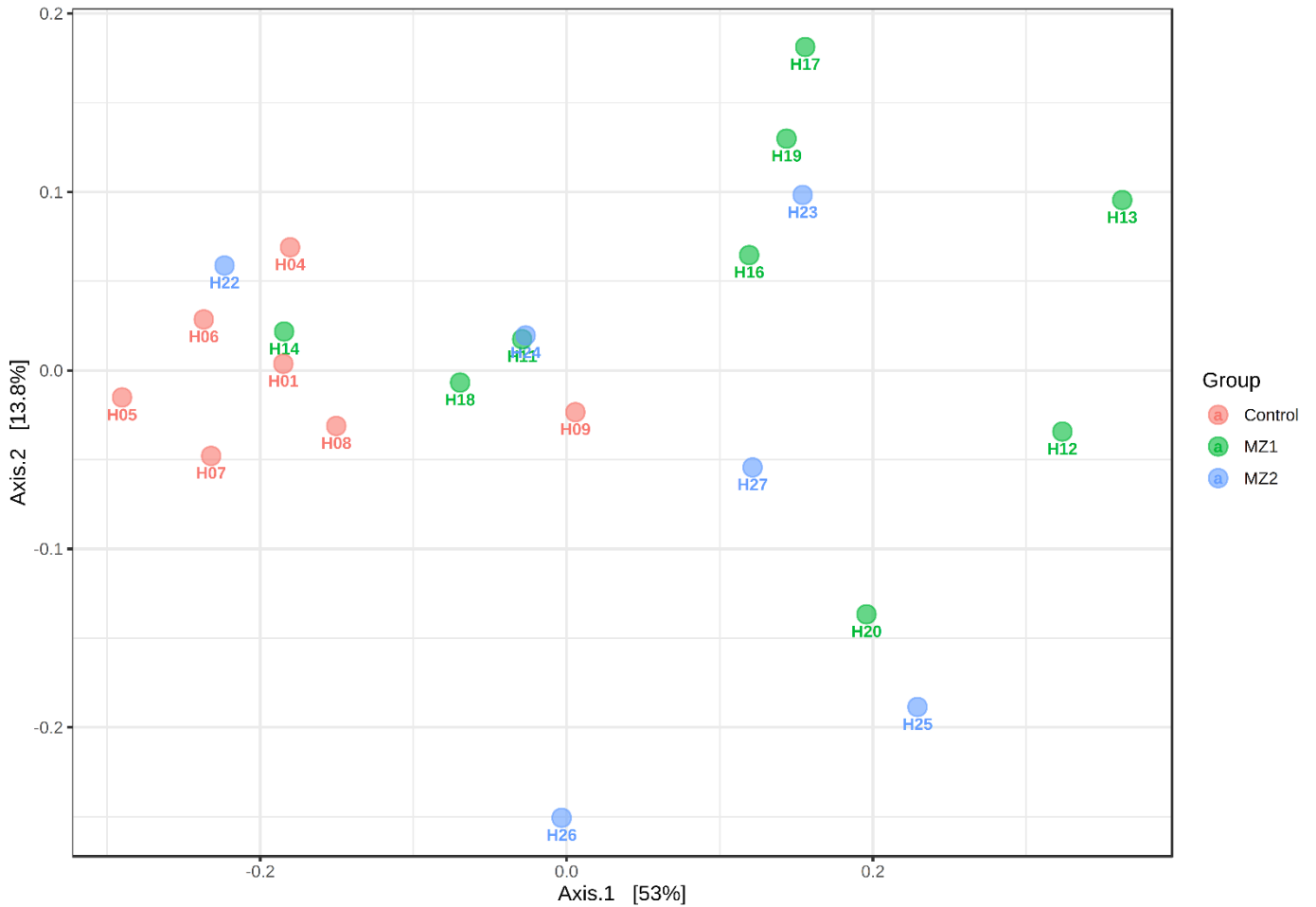


Figure 2. Principal coordinates analysis (PCoA) of the bacterial community structures based on Bray–Curtis distance. Samples were colored according to the treatment group: Control, MZ1, and MZ2.

3.3. Microbial composition

In terms of composition 103 genera, 64 families, and 10 phyla were observed. Among them, Firmicutes (73%), Bacteroidetes (24%), Cyanobacteria (1%), and Campylobacterota (1%) were the most abundant phyla in all samples (Figure S2A). The other phyla together summed 1% in abundance. In total, three phyla were differentially abundant among groups according to Lefse analysis (Fig. Firmicutes and Campylobacterota were differentially abundant in Control (Fig. 3A), while Bacteroidota was differentially abundant in MZ1 and MZ2 (Fig. 3B).

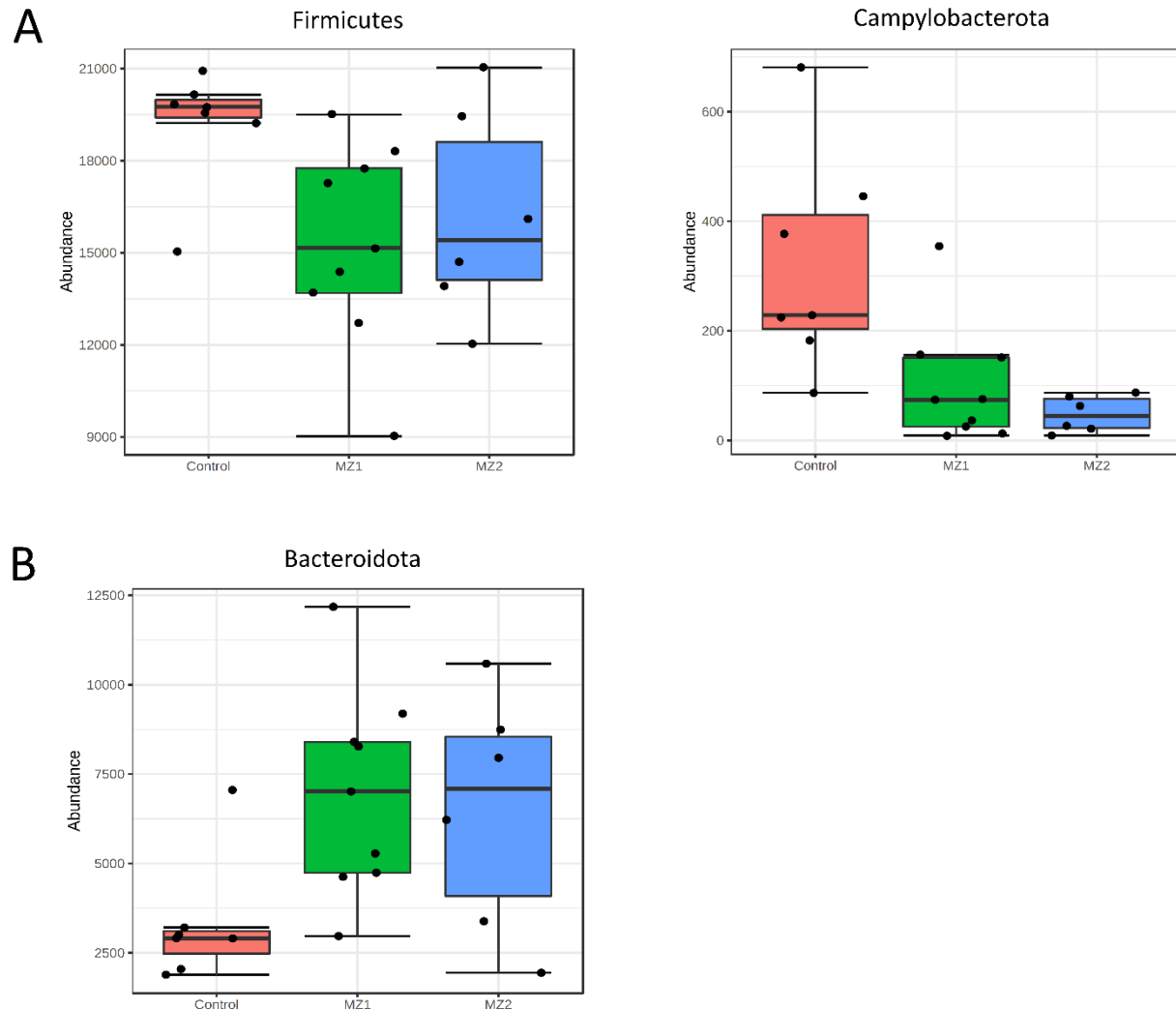


Figure 3. Lefse analysis at the phylum level. Phyla taxa differentially abundant in Control (A) and MZ1/MZ2 (B). Statistical confidence was assessed using the Kruskal-Wallis test. Taxa were ranked by LDA score. Differences were considered significant with a logarithmic LDA score threshold of ± 2.0 and $P < 0.05$

Among the 64 families, 13 presented an abundance higher than 2% (Supplementary Fig. 2B), with 10 being differentially abundant among samples (Fig. 4). Lactobacillaceae, Helicobacteraceae, an unclassified member of Clostridia, and an unclassified member of Oscillospirales were differentially abundant in Control (Fig. 4A); Bacteroidaceae, Oscillospiraceae, and Muribaculaceae were differentially abundant in MZ1 and MZ2 (Fig. 4B); Ruminococcaceae and unclassified families of Bacteroidales and Bacillales were differentially abundant only in MZ1 (Fig. 4C). No taxa family was differentially abundant only in MZ2.

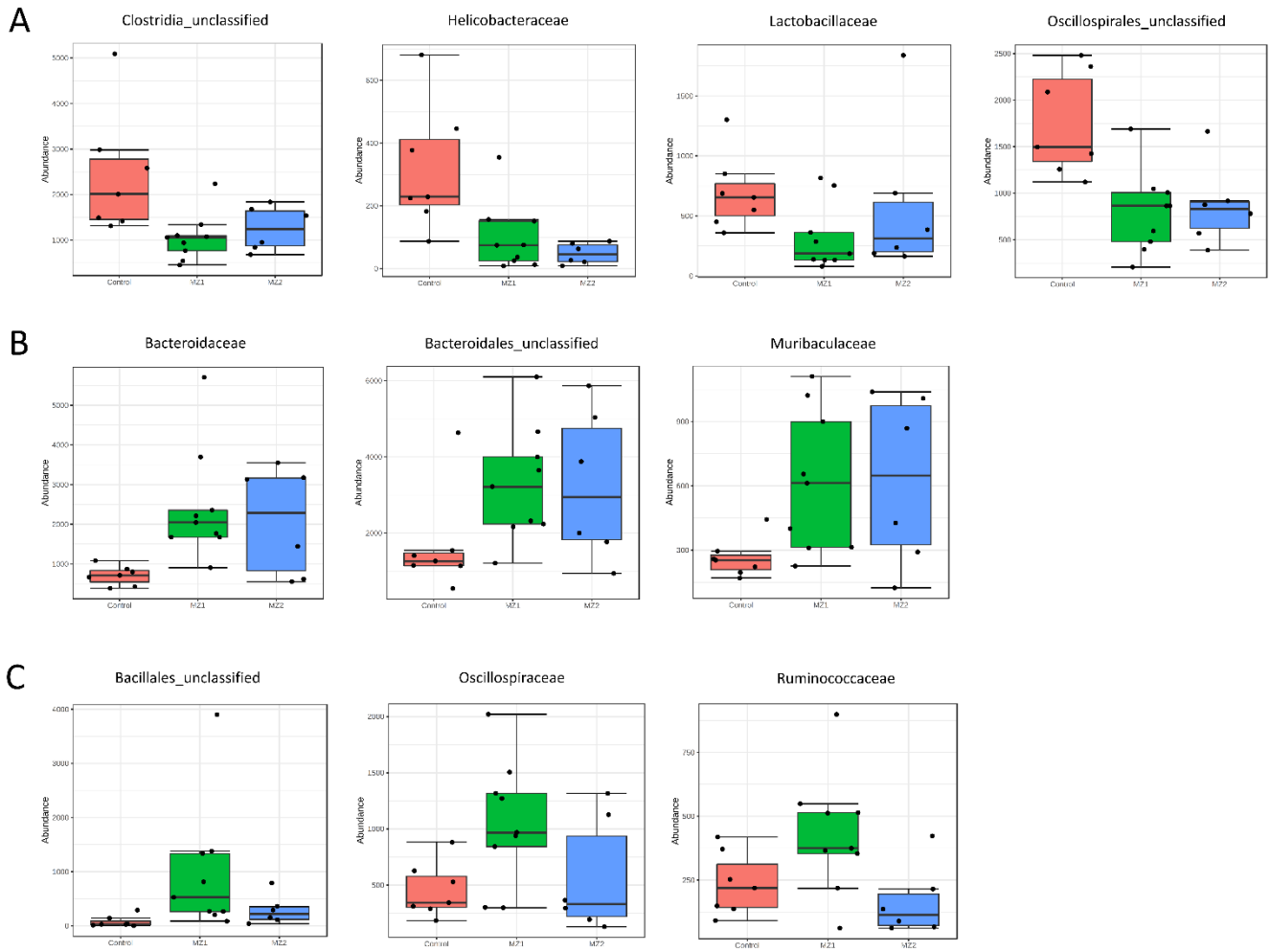


Figure 4. Lefse analysis at the family level. Family taxa differentially abundant in Control (A), MZ1/MZ2 (B), and MZ1 (C). Statistical confidence was assessed using the Kruskal-Wallis test. Taxa were ranked by LDA score. Differences were considered significant with a logarithmic LDA score threshold of ± 2.0 and $P < 0.05$.

Among the 103 genera, 14 presented an abundance higher than 2% (Supplementary Fig. 2C), with 12 being differentially abundant among samples (Fig. 5). *Helicobacter*, *Lactobacillus*, as well as unclassified members of Lachnospiraceae, Clostridia, and Oscillospirales were differentially abundant in Control (Fig. 5A); *Bacteroides*, *Paraclostridium*, and unclassified members of Bacteroidales and Muribaculaceae were differentially abundant in MZ1 and MZ2 (Fig. 5B). *Ruminococcus*, Ruminococcaceae UCG_005, and an unclassified member of Bacillales were differentially abundant only in MZ1 (Fig. 5C). No taxa genus was differentially abundant only in MZ2.

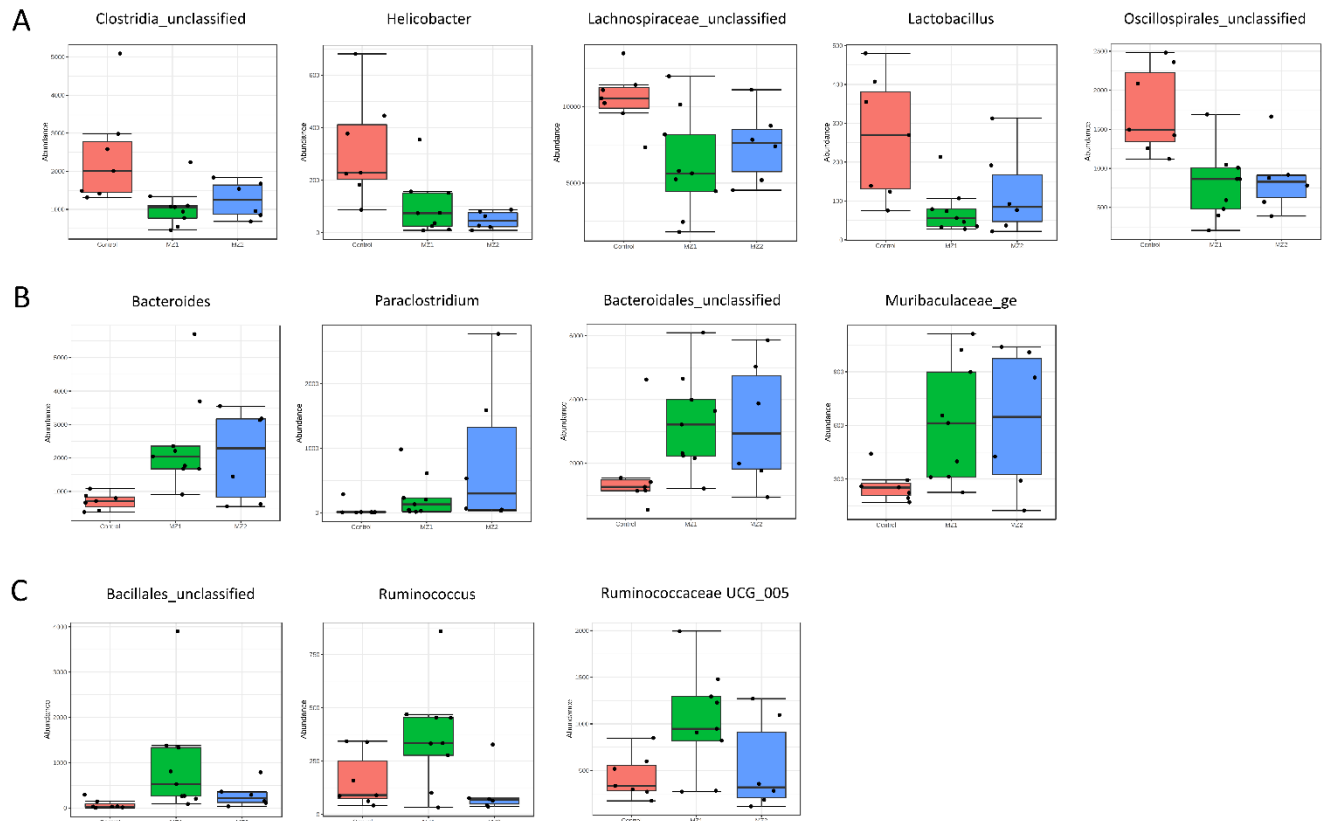


Figure 5. Lefse analysis at the genus level. Genus taxa differentially abundant in Control (A), MZ1/MZ2 (B), and MZ1 (C). Statistical confidence was assessed using the Kruskal-Wallis test. Taxa were ranked by LDA score. Differences were considered significant with a logarithmic LDA score threshold of ± 2.0 and $P < 0.05$.

3.4. Shared and unique microbiota

A total of 74 taxa at the genus level were shared by the three groups (Fig. 6). Three genera were unique to Control, seven to MZ1, and three to MZ2 (Table S2). In addition, 12 genera were exclusively shared between MZ1 and MZ2, while Control only shared three genera with MZ1 and one with MZ2 (Table S3).

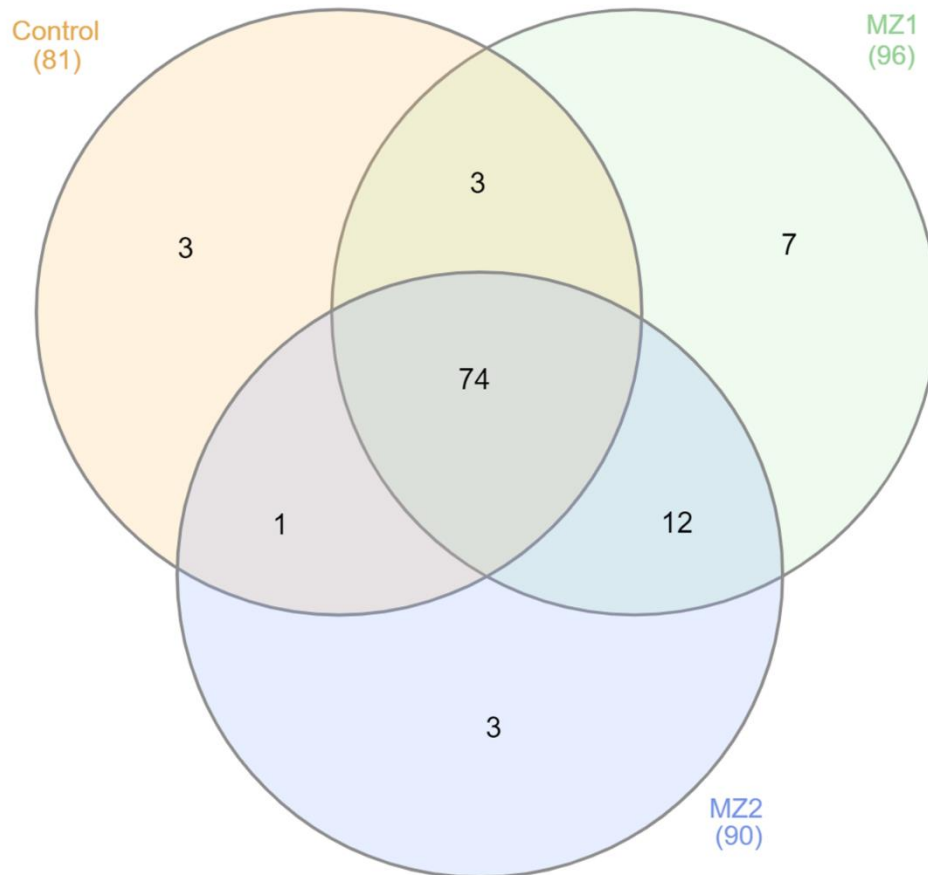


Figure 6. Venn diagram showing unique and shared taxa at the genus level among the groups (Control, MZ1, and MZ2).

3.5. Network Analysis

The co-occurrence networks were constructed to explore the interaction patterns of the microbial communities in the three groups (Fig. 7). In Control, the co-occurrence network presented a clustered structure (Modularity=0.433 and Clustering Coefficient = 0.202), with high Graph Density (0.058) and Degree Centrality (4.316) when compared to MZ1 and MZ2 (Fig. 7A, Table S4). On the other hand, the topological properties of the networks were significantly lower in both groups exposed to Mancozeb, especially for MZ1 (Fig. 7B). In MZ1, the Clustering Coefficient was 3x lower when compared to Control (i.e., 0.065), while the Degree Centrality was nearly 5x lower (i.e., 0.891) and the Graph Density was 8x lower (i.e., 0.007). No major differences were observed between the percentage of positive and negative interactions. Based on the topological properties of the networks, these results suggest that exposure to Mancozeb reduces the microbial community network complexity, despite the increase in diversity observed in Fig. 1. This reduction in complexity means a microbial community less clustered and more modular (as observed by the lower Clustering Coefficient values and higher Modularity), and with each microbial genera making fewer interactions with other taxa in the network (as observed by the Degree Centrality).

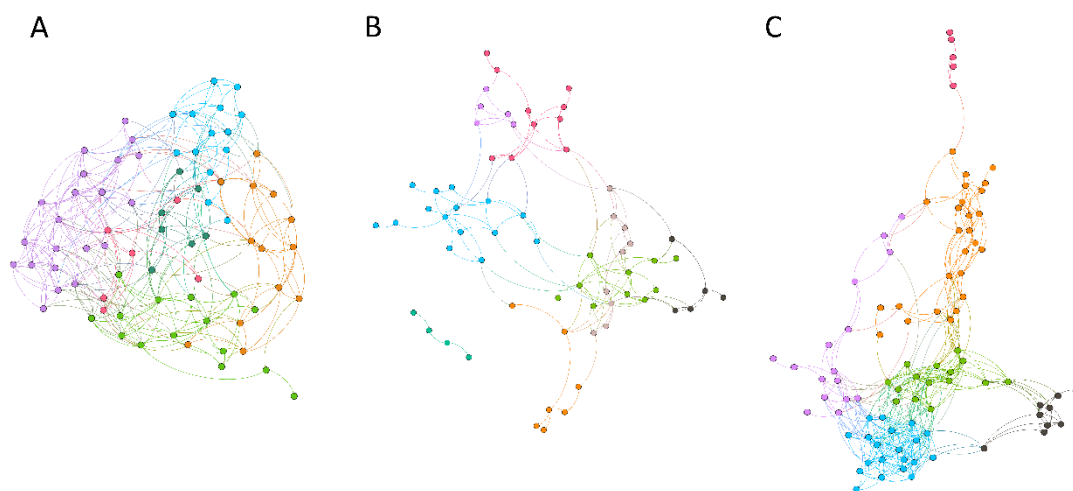


Figure 7. Co-occurrence network at the genus level. Nodes and edges were colored according to their modularity class, i.e. groups of nodes more densely connected with each other than the rest of the network. Figure S3 presents the same networks with nodes colored according to their phyla and edges colored as positive or negative interactions.

4. Discussion

In recent years, an increasing number of evidence have proven that environmental compounds including pesticides could significantly induce changes in the gut microbiota, with major negative health impacts on the host (Duperron et al., 2020; Meng et al., 2020; Djekkoun et al., 2021). Previous studies have indicated extensive developmental and metabolic interferences caused by Mancozeb exposure in different animal models and humans (Yahia et al., 2019; Dall'Agnol et al., 2021; Leandro et al., 2021). Additionally, as a fungicide, Mancozeb could potentially influence the gut microbiota, although no study has tackled this issue so far.

To address this knowledge gap in Mancozeb toxicology, we took advantage of recent progress in high-throughput omics technologies, which have been used to evaluate the molecular composition of the microbiota at different taxonomic levels. Our results provide initial evidence that exposures to the commonly used fungicide Mancozeb can modify the gut microbiota in a rodent model. In addition to major changes in alpha and beta diversity, modifications in the composition of the microbiota at different taxonomic levels were also observed. Since no difference was observed between both tested doses, our results do not show a dose-response relationship as expected by most toxicological studies, which could be in part explained by the resilience of the gut microbiota.

Interestingly, exposure to Mancozeb increased the diversity of the gut microbiota of rats, being reflected by a significantly higher value for all three metrics used in this study. Each metric used reflects a different measure of microbial richness and diversity, which highlights the robustness of our surprising results. While observed taxa are simple the total count of different bacterial taxa observed in each sample, Simpson and Shannon indexes consider the whole microbial community.

In fact, increased alpha diversity indexes were also observed in other studies using animals exposed to fungicides (e.g., Propamocarb and Vinclozolin, (Zhang et al., 2019; Kang et al., 2022)) or other environmental pollutants (e.g., lead and cadmium, (Xia et al., 2018; Ya et al., 2020)). However, no previous study has provided a reasonable explanation for these results, nor have they considered the influence of the gut mycobiome.

Here, we hypothesize that the increase in bacterial diversity may be mainly explained by a potential effect of the fungicide on the gut mycobiome. Exposure to Mancozeb could then directly affect the fungal community resident of the gut and decrease its population, which in turn would open new niches for bacterial proliferation in the host. This interesting hypothesis highlights the need for further studies focused on understanding the impact of Mancozeb and other fungicides on the host mycobiome, an area of research not yet explored. In fact, the mycobiota has only been recently studied, but several pieces of evidence have already demonstrated that the fungal community has a significant impact on host health and is associated with different pathological conditions (Li et al., 2019; Richard et al., 2019). Although fungi and bacteria interact directly with one another or indirectly via the host response, the mechanistic ways they may intercommunicate still is little known (Krüger et al., 2019; Santus et al., 2021). For these reasons, understanding how fungal-bacterial interactions impact the host after exposure to fungicides will be essential to ecotoxicology and public health.

Linear discriminant analysis was used to identify specific taxa that significantly differed after exposure to Mancozeb. While the abundance of Firmicutes and Campylobacterota decreased, Bacteroidota increased. Firmicutes and Bacteroidota are two dominant phyla representing together 90% of the total gut microbial community. The Firmicutes and Bacteroidota ratio has been suggested to be an important index of the health of gut microbiota. This ratio is known to be associated with different pathological states including obesity and metabolic syndrome (Woting and Blaut, 2016). Firmicutes is more effective in extracting energy from food than Bacteroidota, thus promoting more efficient absorption of calories and a decrease in the abundance of this phylum has been correlated with a loss of animal body mass (Giambò et al., 2021). In our study, a significant loss of body mass was observed in MZ1 and MZ2, those groups where Firmicutes was decreased. Although Campylobacterota is a less abundant and diverse phylum, it includes *Helicobacter*, an important genus of the gut microbiota.

At the genus level, seven taxa were selectively enriched following Mancozeb exposure. Interestingly, MAFLD patients have increased concentrations of *Bacteroides* and *Ruminococcus* (Valentin-Cortez et al., 2022), which may indicate a relationship between gut dysbiosis with liver damage after exposure to fungicides. Indeed, previous studies have demonstrated that changes in gut microbiota may be early signs of liver toxicity induced by fungicides (Xu et al., 2014; Meng et al., 2021). In addition, hepatic metabolic disorders caused by environmental pollutant exposure are usually closely related to changes in gut microbiota (Jin et al., 2017; Xia et al., 2018; Zhang et al., 2019; Bao et al., 2020). *Paraclostridium*, on the other hand, is a less known member of the gut microbiota, but our results indicate that further studies to better characterize this genus are needed. Members of Bacillales and Bacteroidales (which also includes the genus *Bacteroides* and the

family Muribaculaceae) have been associated with experimental and clinical studies on alcoholic liver disease (Fukui, 2015).

Regarding those five genera that decreased after exposure to Mancozeb, *Lactobacillus* and the Clostridia members (which includes the unclassified taxa of Lachnospiraceae and Oscillospirales) are key taxa of the microbiome, well known for their beneficial impact on gut health. Some of the most extensively studied and widely used probiotic strains of bacteria are members of the *Lactobacillus* genus (Jeong et al., 2022). The genus *Helicobacter* also includes commensal gut species, even if some species can be pathogenic (e.g., *Helicobacter pylori*).

Although the abundance and composition of the gut microbiota changed following Mancozeb treatment, 74 genera were shared by all three groups, which suggests they may be resistant to fungicide exposure. MZ1 presented with the highest number of unique genera (i.e., seven). In addition, Control only shared one and three genera exclusively with the treatment groups, while MZ1 and MZ2 shared 12 between them, suggesting that exposure to the fungicide also increases the number of rare/unique bacterial taxa.

Microbes form complex social-interaction networks, which are critical for maintaining the stability of microbial communities in response to external perturbations (Banerjee et al., 2019; Jiao et al., 2019a). In this study, we found that exposure to Mancozeb reduced the microbial co-occurrence network complexity. While no other similar study was performed on gut samples, it has also been reported in soils studies that exposure to pesticides leads to a weak effect on soil microbial diversity but there are major changes in the microbial networks (Fournier et al., 2020; Zhang et al., 2021). In this regard, microbial network complexity may be used as a potential indicator for assessing the effect of fungicides on the gut microbiota.

While it is almost impossible to recreate exact human exposure to any environmental chemical compound, we tried to resolve this issue by calibrating the dose to achieve similar exposure to humans. In especial, the model proposed to mimize the exposure of winegrowers who apply the fungicide between October and December annually, with a total of approximately 12 weeks of exposure. Gavage is preferred over other routes of exposure to environmental chemicals when low doses are used because it is not possible to define with precision the true intake when chemicals are mixed into food or drinking water *ad libitum*. This strategy is an advantage when compared to most studies that examine the effect of a pesticide on the gut microbiota of a rodent model (mice or rats), as the drug is usually administered by the oral route using drinking water or feed in such studies. In addition, the microbiota is generally determined in fecal pellets, whereas only in a few cases the intestinal content is directly examined. Furthermore, the mice or rats are usually exposed to much higher doses of fungicide (1000-1500 mg/kg/day), which are not comparable to real-life human exposure (Gambarte and Wolansky, 2022).

Although the doses used in this study (i.e., 250 and 500 mg/kg/day) might still be higher than the dosage ordinary people can be exposed to, agricultural and industrial workers are of primary concern given their continuous exposure to the fungicide for long periods of time, when the major routes of exposure are the skin or through inhalation during spray application of the product. While some recent real-life field studies have been performed to estimate the dose of Mancozeb absorbed

by agricultural pesticide applicators (Mandic-Rajcevic et al., 2018; 2019; 2020), they are based on a group of low-exposed and well-protected workers, which is common for Europe, but quite different from the exposure in some developing countries. In tomato farms from Central Uganda, it was observed that none of the farmers used personal protection equipment during the application of Mancozeb, which could be attributed to the low level of awareness about the toxicity of this fungicide and the sheer lack of personal protective equipment (Kaye et al., 2015). The study also showed that farmers applied 3 to 6 times more Mancozeb than recommended by the manufacturers. Furthermore, the observed pre-harvest interval after application of Mancozeb was 1–2 days as opposed to 3–7 days set by manufacturers. All the tomato samples analyzed had detectable concentrations of Mancozeb residue, from farm to market, a piece of evidence also observed in other studies (Ssemugabo et al., 2022). Noteworthy, a relationship has been reported between the intake of Mancozeb-treated vegetables and its harmful effects on the liver of rats (Adjrah et al., 2013). In the Democratic Republic of Congo, tomato samples were found to have Mancozeb residues which exceeded by 24% the maximum residue limits stipulated by the European Food Safety Authority, with a maximum of 3.25 mgCS₂/kg (Kavatsurwa et al., 2014). In Brazil, 60.8% of the 520 samples from 9 crops had detectable dithiocarbamate levels \geq 0.10 mgCS₂/kg, with a maximum of 3.8 mg CS₂/kg (Caldas et al., 2004). In Uganda, the most contaminated farm in a study had a mean dithiocarbamate concentration of 7.7 mg CS₂/kg (Atuhaire et al., 2017). These results indicate that human exposure to the fungicide Mancozeb in some developing countries may be excessively high. Nevertheless, further studies using lower doses or doses at environmentally relevant concentrations of the fungicide should be tested to better understand the threshold of Mancozeb toxicity and the related changes to molecular, physiological, and microbiological aspects of the host.

In addition to mimetize the human exposure to the fungicide, this rodent model could also be used as a baseline reference for assessing environmental risks in wild animals. Fungicides can affect different parameters of the animal microbiota, from general diversity metrics to changes in specific taxa, and modify the microbial community of various organisms, from insects to mammals, thereby threatening animal life and health. Indeed, recent studies have shown that several pesticides in doses that are considered safe can change the gut microbiota of wild animals (Evariste et al., 2019; Syromyatnikov et al., 2020).

Lastly, only male rats were used in this investigation, so any gender-specific effects on the microbiome could not be addressed. It is known that male and female humans and animals can have different microbiome profiles due to the different endocrinology of the sexes. In addition, the host-microbiome interaction may happen differently between sexes. Growing evidence has shown that Mancozeb exposure in experimental models is a risk factor for spontaneous abortion, fetal malformations, and maternal mortality (Bianchi et al., 2020). Thus, future preclinical microbiome studies including both males and females should be performed to investigate a potential gender-specific effect of Mancozeb on the gut microbiota.

5. Conclusions

In this study, we were able to demonstrate that the commonly used fungicide Mancozeb induced changes in the gut microbiota of rats. In especial, the exposure to Mancozeb presented side effects by changing the structure and composition of the gut microbiota, increasing bacterial diversity regardless of the dose used, and reducing the microbial co-occurrence network complexity. In addition, seven genera significantly increased in abundance following Mancozeb exposure, while five genera decreased. Since understanding how fungal-bacterial interactions impact the host after exposure to fungicides is essential to ecotoxicology and public health, further studies should focus on understanding the impact of Mancozeb and other fungicides on the host mycobiome, an area of research not yet explored.

Credit author contribution statement

Marina Ferri Pezzini: Methodology; Pabulo Henrique Rampelotto: Methodology, Formal Analysis, Writing – Original Draft; Juliana Dall'Agnol: Methodology; Gabriel Tayguara Silveira Guerreiro: Methodology; Larisse Longo: Methodology; Nelson D. Suarez Uribe: Methodology; Mário Reis Álvares-da-Silva: Writing – Review & Editing; Dvora Joveleviths: Conceptualization, Funding Acquisition, Writing – Review & Editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This study was supported by the following Brazilian funding agencies: National Council for Scientific and Technological Development, CNPq; Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel, CAPES; and Research Incentive Fund from Hospital de Clínicas de Porto Alegre, FIPE-HCPA.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at:

References

- 1 Adjrah, Y., Karou, D., Agbonon, A., 2013. Effect of mancozeb-treated lettuce on Wistar rat liver. *Ethiop. J. Environ. Stud.* 6, 223-225. doi: 10.4314/ejesm.v6i1.8
- 2 Ahmed, A.G.F., Gamila, A.M.K., 2017. Hemato biochemical responses under stress of Mancozeb fungicide (75 % WP) in male albino rat. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 4, 116-127. doi: 10.22192/ijarbs.2017.04.10.016
- 3 Atuhaire, A., Kaye, E., Mutambuze, I.L., Matthews, G., Friedrich, T., Jørs, E., 2017. Assessment of dithiocarbamate residues on tomatoes conventionally grown in Uganda and the effect of simple washing to reduce exposure risk to consumers. *Environ. Health Insights* 11, 1-8. doi: 10.1177/1178630217712218
- 4 Axelstad, M., Boberg, J., Nellemann, C., Kiersgaard, M., Jacobsen, P.R., Christiansen, S., Hougaard, K.S., Hass, U., 2011. Exposure to the widely used fungicide mancozeb causes

- thyroid hormone disruption in rat dams but no behavioral effects in the offspring. *Toxicol. Sci.* 120, 439-446. doi: 10.1093/toxsci/kfr006
- 5 Bao, Z., Zhao, Y., Wu, A., Lou, Z., Lu, H., Yu, Q., Fu, Z., Jin, Y., 2020. Sub-chronic carbendazim exposure induces hepatic glycolipid metabolism disorder accompanied by gut microbiota dysbiosis in adult zebrafish (*Daino rerio*). *Sci. Total Environ.* 739, 140081. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140081
 - 6 Bastian, M., Heymann, S., Jacomy, M., 2009. Gephi: An open-source software for exploring and manipulating networks. AAI Publications. In Proceedings of the Third International AAAI Conference on Weblogs and Social Media, San Jose, CA, USA.
 - 7 Belizário, J.E., Faintuch, J., 2018. Microbiome and gut dysbiosis. *Exp Suppl.* 109, 459-476. doi: 10.1007/978-3-319-74932-7_13
 - 8 Bianchi, S., Nottola, S.A., Torge, D., Palmerini, M.G., Necozone, S., Macchiarelli, G., 2020. Association between female reproductive health and Mancozeb: Systematic review of experimental models. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17, 2580. doi: 10.3390/ijerph17072580
 - 9 Brouwer, M., Huss, A., van der Mark, M., Nijssen, P.C.G., Mulleners, W.M., Sas, A.M.G., van Laar, T., de Snoo, G.R., Kromhout, H., Vermeulen, R.C.H., 2017. Environmental exposure to pesticides and the risk of Parkinson's disease in the Netherlands. *Environ. Int.* 107, 100-110. doi: 10.1016/j.envint.2017.07.001
 - 10 Caldas, E.D., Miranda, M.C., Conceicao, M.H., Souza, L.C., 2004. Dithiocarbamates residues in Brazilian food and the potential risk for consumers. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1877-1883. doi: 10.1016/j.fct.2004.07.006
 - 11 Corsini, E., Birindelli, S., Fustinoni, S., De Paschale, G., Mammone, T., Visentin, S., Galli, C.L., Marinovich, M., Colosio, C., 2005. Immunomodulatory effects of the fungicide Mancozeb in agricultural workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 208, 178-185. doi: 10.1016/j.taap.2005.02.011
 - 12 Dall'Agnol, J.C., Ferri Pezzini, M., Suarez Uribe, N., Joveleviths, D., 2021. Systemic effects of the pesticide mancozeb - A literature review. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 25, 4113-4120. doi: 10.26355/eurrev_202106_26054
 - 13 DeGruttola, A.K., Low, D., Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., 2016. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm. Bowel Dis.* 22, 1137-1150. doi:10.1097/MIB.0000000000000750
 - 14 Djekkoun, N., Lalau, J.D., Bach, V., Depeint, F., Khorsi-Cauet, H., 2021. Chronic oral exposure to pesticides and their consequences on metabolic regulation: role of the microbiota. *Eur. J. Nutr.* 60, 4131-4149. doi: 10.1007/s00394-021-02548-6
 - 15 Duperron, S., Halary, S., Gallet, A., Marie, B., 2020. Microbiome-aware ecotoxicology of organisms: Relevance, pitfalls, and challenges. *Front. Public Health*, 8, 407. doi: 10.3389/fpubh.2020.00407
 - 16 Easton, A., Guven, K., de Pomerai, D.I., 2001. Toxicity of the dithiocarbamate fungicide mancozeb to the nontarget soil nematode, *Caenorhabditis elegans*. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 15-25. doi: 10.1002/1099-0461
 - 17 Evariste, L., Barret, M., Mottier, A., Mouchet, F., Gauthier, L., Pinelli, E., 2019. Gut microbiota of aquatic organisms: A key endpoint for ecotoxicological studies. *Environ. Pollut.* 248, 989-999. doi: 10.1016/j.envpol.2019.02.101
 - 18 Fournier, B., Santos, S., Gustavsen, J.A., Imfeld, G., Lamy, F., Mitchell, E.A.D, Mota, M., Noll D., Planchamp, C., Heger, T.J., 2020. Impact of a synthetic fungicide (fosetyl-Al and

- propamocarb-hydrochloride) and a biopesticide (*Clonostachys rosea*) on soil bacterial, fungal, and protist communities. *Sci. Total Environ.* 738, 139635. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139635.
- 19 Friedman, J.; Alm, E.J., 2012. Inferring correlation networks from genomic survey data. *PLoS Comput. Biol.* 8, e1002687. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002687.
 - 20 Fukui, H., 2015. Gut microbiota and host reaction in liver diseases. *Microorganisms* 3, 759-791. doi:10.3390/microorganisms3040759
 - 21 Gambarte, P.C., Wolansky, M.J., 2022. The gut microbiota as a biomarker for realistic exposures to pesticides: A critical consideration. *Neurotoxicol. Teratol.* 91, 107074. doi: 10.1016/j.ntt.2022.107074
 - 22 Giambò, F., Teodoro, M., Costa, C., Fenga, C., 2021. Toxicology and microbiota: How do pesticides influence gut microbiota? A review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 5510. doi: 10.3390/ijerph18115510
 - 23 Goldner, W.S., Sandler, D.P., Yu, F., Hoppin, J.A., Kamel, F., Levan, T.D., 2010. Pesticide use and thyroid disease among women in the Agricultural Health Study. *Am. J. Epidemiol.* 171, 455-464. doi:10.1093/aje/kwp404
 - 24 Gullino, M.L., Tinivella, F., Garibaldi, A., Kemmitt, G.M., Bacci, L., Sheppard, B., 2010. Mancozeb: Past, present, and future. *Plant Dis.* 94, 1076-1087. doi: 10.1094/PDIS-94-9-1076
 - 25 Harrison Brody, A., Chou, E., Gray, J.M., Pokyrwka, N.J., Raley-Susman, K.M., 2013. Mancozeb-induced behavioral deficits precede structural neural degeneration. *Neurotoxicology*, 34, 74-81. doi: 10.1016/j.neuro.2012.10.007
 - 26 Heberle, H., Meirelles, G.V., da Silva, F.R., Telles, G.P., Minghim, R., 2015. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics* 16, 169. doi: 10.1186/s12859-015-0611-3
 - 27 Jeong, J.J., Park, H.J., Cha, M.G., Park, E., Won, S.M., Ganesan, R., Gupta, H., Gebru, Y.A., Sharma, S.P., Lee, S.B., Kwon, G.H., Jeong, M.K., Min, B.H., Hyun, J.Y., Eom, J.A., Yoon, S.J., Choi, M.R., Kim, D.J., Suk, K.T., 2022. The *Lactobacillus* as a probiotic: Focusing on liver diseases. *Microorganisms* 10, 288. doi: 10.3390/microorganisms10020288
 - 28 Jin, C., Luo, T., Zhu, Z., Pan, Z., Yang, J., Wang, W., Fu, Z., Jin, Y., 2017. Imazalil exposure induces gut microbiota dysbiosis and hepatic metabolism disorder in zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 202, 85-93. doi: 10.1016/j.cbpc.2017.08.007
 - 29 Kamel, F., Hoppin, J.A., 2004. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. *Environ. Health Perspect.* 112, 950-958. doi: 10.1289/ehp.7135
 - 30 Kang, C.Q., Meng, Q.Y., Dang, W., Shao, Y.J., Lu, H.L., 2022. Effects of chronic exposure to the fungicide vinclozolin on gut microbiota community in an aquatic turtle. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 239, 113621. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.113621
 - 31 Kaye, E., Nyombi, A., Mutambuze, I.L., Muwesa, R., 2015. Mancozeb residue on tomatoes in Central Uganda. *J. Health. Pollut.* 5, 1-6. doi: 10.5696/i2156-9614-5-8.1
 - 32 Kavatsurwa, S.M., Kiremire, B., Wasswa, J., Mpiana, P.T., 2014. Dithiocarbamates residues level in selected vegetables from Bukavu, Democratic Republic of Congo. *J. Phys. Chem. Sci.* 1, V1I3. doi: 10.1177/1178630217712218
 - 33 Kong, A., Zhang, C., Cao, Y., Cao, Q., Liu, F., Yang, Y., Tong, Z., Rehman, M.U., Wang, X., Huang, S., 2020. The fungicide thiram perturbs gut microbiota community and causes lipid metabolism disorder in chickens. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 206, 111400. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111400

- 34 Krüger, W., Vielreicher, S., Kapitan, M., Jacobsen, I.D., Niemiec, M.J., 2019. Fungal-bacterial interactions in health and disease. *Pathogens* 8, 70. doi: 10.3390/pathogens802007
- 35 Leandro, L.P., Siqueira, de Mello R., da Costa-Silva, D.G., Medina Nunes, M.E., Rubin Lopes, A., Kemmerich Martins, I., Posser, T., Franco, J.L., 2021. Behavioral changes occur earlier than redox alterations in developing zebrafish exposed to Mancozeb. *Environ. Pollut.* 268, 115783. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115783
- 36 Li, X.V., Leonardi, I., Iliev, I.D., 2019. Gut mycobiota in immunity and inflammatory disease. *Immunity* 50, 1365-1379. doi: 10.1016/j.immuni.2019.05.023
- 37 Lori, G., Tassinari, R., Narciso, L., Udriou, I., Sgura, A., Maranghi, F., Tait, S., 2021. Toxicological comparison of Mancozeb and Zoxamide fungicides at environmentally relevant concentrations by an in vitro approach. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 8591. doi: 10.3390/ijerph18168591
- 38 Liu, Q., Shao, W., Zhang, C., Xu, C., Wang, Q., Liu, H., Sun, H., Jiang, Z., Gu, A., 2017. Organochloride pesticides modulated gut microbiota and influenced bile acid metabolism in mice. *Environ. Pollut.* 226, 268-276. doi: 10.1016/j.envpol.2017.03.068
- 39 Mandic-Rajcevic, S., Rubino, F.M., Ariano, E., Cottica, D., Neri, S., Colosio, C., 2018. Environmental and biological monitoring for the identification of main exposure determinants in vineyard mancozeb applicators. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 28, 289-296. doi: 10.1038/jes.2017.14
- 40 Mandic-Rajcevic, S., Rubino, F.M., Ariano, E., Cottica, D., Neri, S., Colosio, C., 2019. Exposure duration and absorbed dose assessment in pesticide-exposed agricultural workers: implications for risk assessment and modeling. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 222, 494-502. doi: 10.1016/j.ijheh.2019.01.006
- 41 Mandić-Rajčević, S., Rubino, F.M., Colosio, C., 2020. Establishing health-based biological exposure limits for pesticides: A proof of principle study using mancozeb. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 115, 104689. doi: 10.1016/j.yrtph.2020.104689
- 42 Meng, Z., Liu, L., Jia, M., Li, R., Yan, S., Tian, S., Sun, W., Zhou, Z., Zhu, W., 2019. Impacts of Penconazole and its enantiomers exposure on gut microbiota and metabolic profiles in mice. *J. Agric. Food Chem.* 67, 8303-8311. doi: 10.1021/acs.jafc.9b02856.
- 43 Meng, Z., Liu, L., Yan, S., Sun, W., Jia, M., Tian, S., Huang, S., Zhou, Z., Zhu, W., 2020. Gut microbiota: A key factor in the host health effects induced by pesticide exposure? *J. Agric. Food Chem.*, 68, 10517-10531. doi: 10.1021/acs.jafc.0c04678
- 44 Meng, Z., Huang, S., Sun, W., Yan, S., Chen, X., Diao, J., Zhou, Z., Zhu, W., 2021. A typical fungicide and its main metabolite promote liver damage in mice through impacting gut microbiota and intestinal barrier function. *J. Agric. Food Chem.* 69, 13436-13447. doi: 10.1021/acs.jafc.1c05508
- 45 Mora, A.M., Córdoba, L., Cano, J.C., Hernandez-Bonilla, D., Pardo, L., Schnaas, L., Smith, D.R., Menezes-Filho, J.A., Mergler, D., Lindh, C.H., Eskenazi, B., van Wendel de Joode, B., 2018. Prenatal Mancozeb exposure, excess manganese, and neurodevelopment at 1 year of age in the infants' Environmental Health (ISA) Study. *Environ. Health Perspect.* 126, 057007. doi: 10.1289/EHP1955
- 46 National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th edition. National Academies Press: Washington, USA.
- 47 Negga, R., Rudd, D.A., Davis, N.S., Justice, A.N., Hatfield, H.E., Valente, A.L., Fields, A.S., Fitsanakis, V.A., 2011. Exposure to Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate and

- glyphosate pesticides leads to neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology* 32, 331-341. doi: 10.1016/j.neuro.2011.02.002
- 48 Nordby, K.C., Andersen, A., Irgens, L.M., Kristensen, P., 2005. Indicators of Mancozeb exposure in relation to thyroid cancer and neural tube defects in farmers' families. *Scand. J. Work Environ. Health.* 31, 89-96. doi: 10.5271/sjweh.855
- 49 Palmerini, M.G., Belli, M., Nottola, S.A., Miglietta, S., Bianchi, S., Bernardi, S., Antonouli, S., Cecconi, S., Familiari, G., Macchiarelli, G., 2018. Mancozeb impairs the ultrastructure of mouse granulosa cells in a dose-dependent manner. *J. Reprod. Dev.* 64, 75-82. doi: 10.1262/jrd.2017-143
- 50 Paro, R., Tiboni, G.M., Buccione, R., Rossi, G., Cellini, V., Canipari, R., Cecconi, S., 2012. The fungicide mancozeb induces toxic effects on mammalian granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 260, 155-161. doi: 10.1016/j.taap.2012.02.005
- 51 Parrón, T., Requena, M., Hernández, A.F., Alarcón, R., 2011. Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256, 379-385. doi: 10.1016/j.taap.2011.05.006
- 52 Richard, M.L., Sokol, H., 2019. The gut mycobiota: insights into analysis, environmental interactions, and role in gastrointestinal diseases. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 331-345. doi: 10.1038/s41575-019-0121-2
- 53 Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F., 2016. VSEARCH: A versatile open-source tool for metagenomics. *PeerJ* 4, e2584. doi: 10.7717/peerj.2584
- 54 Ruan, Q.L., Ju, J.J., Li, Y.H., Liu, R., Pu, Y.P., Yin, L.H., Wang, D.Y., 2009. Evaluation of pesticide toxicities with differing mechanisms using *Caenorhabditis elegans*. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 72, 746-751. doi: 10.1080/15287390902841532
- 55 Runkle, J., Flocks, J., Economos, J., Dunlop, A.L., 2017. A systematic review of Mancozeb as a reproductive and developmental hazard. *Environ. Int.* 99, 29-42. doi: 10.1016/j.envint.2016.11.006
- 56 Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537-7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09
- 57 Santus, W., Devlin, J.R., Behnsen, J., 2021. Crossing kingdoms: How the mycobiota and fungal-bacterial interactions impact host health and disease. *Infect. Immun.* 89, e00648-20. doi: 10.1128/IAI.00648-20
- 58 Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., Huttenhower, C., 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 12, R60. doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60
- 59 Ssemugabo, C., Bradman, A., Ssempebwa, J.C., Sillé, F., Guwatudde, D., 2022. Pesticide residues in fresh fruit and vegetables from farm to fork in the Kampala Metropolitan Area, Uganda. *Environ. Health Insights* 16. doi: 10.1177/11786302221111866
- 60 Srivastava, A.K., Ali, W., Singh, R., Bhui, K., Tyagi, S., Al-Khedhairi, A.A., Srivastava, P.K., Musarrat, J., Shukla, Y., 2012. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. *Life Sci.* 90, 815-824. doi: 10.1016/j.lfs.2011.12.013
- 61 Stadler, K., Li, X., Liu, B., Bao, W., Wang, K., Lehmler, H.J., 2022. Systematic review of human biomonitoring studies of ethylenethiourea, a urinary biomarker for exposure to

- dithiocarbamate fungicides. Environ. Pollut 292, 118419. doi: 10.1016/j.envpol.2021.118419
- 62 Syromyatnikov, M.Y., Isuwa, M.M., Savinkova, O.V., Derevshchikova, M.I., Popov, V.N., 2020. The effect of pesticides on the microbiome of animals. Agriculture 10, 79. <https://doi.org/10.3390/agriculture10030079>
- 63 Valentin-Cortez, F.J., Córdova-Gallardo, J., Méndez-Sánchez, N., 2022. Narrative review of gut microbiota and liver diseases: facts and fictions. Dig. Med. Res. 5, 16. doi: 10.21037/dmr-21-85
- 64 van Wendel de Joode, B., Mora, A.M., Lindh, C.H., Hernández-Bonilla, D., Córdoba, L., Wesseling, C., Hoppin, J.A., Mergler, D., 2016. Pesticide exposure and neurodevelopment in children aged 6-9 years from Talamanca, Costa Rica. Cortex 85, 137-150. doi: 10.1016/j.cortex.2016.09.003
- 65 Vieira, R., Venâncio, C.A.S., Félix, L.M., 2020. Toxic effects of a mancozeb-containing commercial formulation at environmental relevant concentrations on zebrafish embryonic development. Environ. Sci. Pollut. Res Int, 27, 21174-21187. doi: 10.1007/s11356-020-08412-0
- 66 Wang, Z., Kottawatta, K.S.A., Kodithuwakku, S.P., Fernando, T.S., Lee, Y.L., Ng, E.H.Y., Yeung, W.S.B., Lee, K.F., 2021. The fungicide Mancozeb reduces spheroid attachment onto endometrial epithelial cells through downregulation of estrogen receptor β and integrin $\beta 3$ in Ishikawa cells. Ecotoxicol. Environ. Saf. 208, 111606. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111606
- 67 Woting, A., Blaut, M., 2016. The intestinal microbiota in metabolic disease. Nutrients 8, 202. doi: 10.3390/nu8040202
- 68 Xia, J., Lu, L., Jin, C., Wang, S., Zhou, J., Ni, Y., Fu, Z., Jin, Y., 2018. Effects of short-term lead exposure on gut microbiota and hepatic metabolism in adult zebrafish. Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 209, 1-8. doi: 10.1016/j.cbpc.2018.03.007
- 69 Xu, C., Liu, Q., Huan, F., Qu, J., Liu, W., Gu, A., Wang, Y., Jiang, Z., 2014. Changes in gut microbiota may be early signs of liver toxicity induced by Epoxiconazole in rats. Chemotherapy 60, 135-142. doi: 10.1159/000371837
- 70 Ya, J., Li, X., Wang, L., Kou, H., Wang, H., Zhao, H., 2020. The effects of chronic cadmium exposure on the gut of *Bufo gargarizans* larvae at metamorphic climax: Histopathological impairments, microbiota changes and intestinal remodeling disruption. Ecotoxicol Environ Saf. 195, 110523. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110523
- 71 Yahia, D., El-Amir, Y.O., Rushdi, M., 2019. Mancozeb fungicide-induced genotoxic effects, metabolic alterations, and histological changes in the colon and liver of Sprague Dawley rats. Toxicol. Ind. Health. 35, 265-276. doi: 10.1177/0748233719834150
- 72 Yuan, X., Pan, Z., Jin, C., Ni, Y., Fu, Z., Jin, Y., 2019. Gut microbiota: An underestimated and unintended recipient for pesticide-induced toxicity. Chemosphere, 227, 425-434. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.04.088
- 73 Zhang, R., Pan, Z., Wang, X., Shen, M., Zhou, J., Fu, Z., Jin, Y., 2019. Short-term propamocarb exposure induces hepatic metabolism disorder associated with gut microbiota dysbiosis in adult male zebrafish. Acta. Biochim. Biophys. Sin. 51, 88-96. doi: 10.1093/abbs/gmy153
- 74 Zhang, H., Song, J., Zhang, Z., Zhang, Q., Chen, S., Mei, J., Yu, Y., Fang, H., 2021. Exposure to fungicide difenoconazole reduces the soil bacterial community diversity and the

co-occurrence network complexity. *J Hazard Mater.* 405, 124208. doi:
10.1016/j.jhazmat.2020.124208.

8. CONCLUSÃO

Neste estudo, pudemos demonstrar que o fungicida comumente utilizado, o Mancozebe, induziu a alterações na microbiota bacteriana intestinal de ratos em doses mimetizadas à exposição humana. Além disso, a exposição ao Mancozebe apresentou efeitos na microbiota bacteriana, alterando sua estrutura e composição, bem como aumentando a diversidade bacteriana independentemente da dose utilizada. Sete gêneros aumentaram significativamente em abundância após a exposição ao Mancozebe, enquanto que cinco gêneros diminuíram. O aumento na diversidade bacteriana é explicado por um efeito potencial do fungicida na microbiota intestinal, diminuindo sua população e conseqüentemente aumentando a proliferação bacteriana no hospedeiro.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora fungos e bactérias interajam diretamente entre si ou indiretamente por meio da resposta do hospedeiro, as formas mecânicas pelas quais podem se comunicar ainda são pouco conhecidas. Por essas razões, entender como as interações entre fungos e bactérias impactam o hospedeiro após a exposição a fungicidas será essencial para a ecotoxicologia e à saúde pública.

Faz-se necessária a elaboração de um estudo futuro - o qual tem previsão de início breve - o qual terá como objetivo avaliar a correlação entre os marcadores de hepatotoxicidade (estresse oxidativo, genotoxicidade, análise bioquímica e hematológica, indicador biológico de exposição e histologia) com a análise da microbiota bacteriana, a fim de compreender melhor quais os mecanismos envolvidos nas interações propostas.

Este estudo atingiu os objetivos propostos e está sendo utilizado como base para um estudo clínico que avaliará os efeitos tóxicos do Mancozebe em agricultores expostos ao pesticida, incluindo a análise dos marcadores de hepatotoxicidade, microbioma bacteriano e micobioma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/62619259/brasil-e-o-quarto-maior-produtor-de-graos-e-o-maior-exportador-de-carne-bovina-do-mundo-diz-estudo>.
[Acessado em 15Jun2022](#)
2. CARNEIRO, F. F. et al. Segurança Alimentar e nutricional e saúde. Parte 1. In CARNEIRO, Fernando Ferreira et al. (org.) **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. Disponível em: https://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wpcontent/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf Acessado em 15Jun2022
3. Pignati WA, et al. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. *Ciência Saúde coletiva*; 2017, 22(10): 3281-3293. DOI: 10.1590/1413-812320172210.17742017.
4. Ding, F, X.N. Li, J.X. Diao, Y. Sun, L. Zhang & Y. Sun. (2012). Chiral recognition of metalaxyl enantiomers by human serum albumin: evidence from molecular modeling and photophysical approach. *Chirality*. 24:471–480.
5. Pawan K.Gupta. Toxicity of Fungicides, Chapter 45, *Veterinary Toxicology*; 2018, 569-580 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00045-3>.
6. Yahia E, Aiche MA, Chouabbia A, Boulakoud MS. Subchronic mancozeb treatment induced liver toxicity via oxidative stress in male Wistar rats. *Comm. Appl. Biol. Sci*; 2014, 79(3):553-9.

7. Lemes RR; Barretto HC; Kussumi A; Colacioppo S. Avaliação de resíduos de ditiocarbamatos e etilenotiouréia (ETU) em mamão e sua implicação na saúde pública. Rev Inst Adolfo Lutz; 2005, 64(1): 50-7.
8. Paro, R, Tiboni G.M, Buccione R, G. Rossi, Cellini V, Canipari R. (2012). The fungicide mancozeb induces toxic effects on mammalian granulosa cells. Toxicology and Applied Pharmacology. 260: 155–161.
9. Rašković A, Pavlović N, Kvirgić M, Jan S, Gorana M, Ivan Č, Momir M (2015) Effects of pharmaceutical formulations containing thyme on carbon tetrachloride induced liver injury in rats. BMC Complement Altern Med 15:442.
10. Innes J, Ulland B, Valerio M, Petrucelli L, Fishbein L. et al. Bioassay of pesticides and industrial chemicals for tumorigenicity in mice: a preliminary note. J. Natl. Cancer Inst; 1969, 42(6): 1101-1114.
11. Ahmed, A. Gh. Farag. Gamila, A. M. Kotb. Hemato Biochemical Responses under Stress of Mancozeb Fungicide (75 % WP) in Male Albino Rat. Int. J. Adv. Res. Biol. Sci. (2017). 4(10): 116-
12. Yahia E, Aiche M, Chouabbia A, Boulakoud M. Biochemical and Hematological Changes Following Long Term Exposure to Mancozeb. Adv. Biores; 2015, 6 (2): 83-86.
13. Li ZH, Velisek J, Zlabek V, Grabic R, Machova J, Kolarova J, Randak T. Hepatic antioxidant status and hematological parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after chronic exposure to carbamazepine. ChemBiol Interact 2010 183:98–104
14. Lushchak VI. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. AquatToxicol 101:13–30.

15. Meco G, Bonifati V, Vanacore N, Fabrizio E. 1994. Parkinsonism after chronic exposure to the fungicide Maneb (manganese ethylene-bis-dithiocarbamate). *Scand J Work Environ Health* 20:301–305.
16. Atamaniuk T, Kubrak O, Husak V, Storey K, Lushchak V. The Mancozeb-Containing Carbamate Fungicide Tattoo Induces Mild Oxidative Stress in Goldfish Brain, Liver, and Kidney. *Environmental Toxicology*; 2014, 29(11): 1227-1235. DOI 10.1002/tox.
17. Bolognesi, C., Creus, A., Ostrosky-Wegman, P., Marcos, R. (2011) Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* 26, 19-26.
18. Durante, M. et al. From DNA damage to chromosome aberrations: joining the break. *Mutat Res* 756, 5–13 (2013).
19. Belpoggi, F, Soffritti, M, Guarino, M, Lambertini, L, Cevolani, D, Maltoni, C. (2002) Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bisdithiocarbamate (Mancozeb) in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 982, 123-13
20. Calviello, G, Piccioni, E, Boninsegna, A, Tedesco, B, Maggiano, N, Serini, S, Wolf, F. I, Palozza, P. (2006) DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211, 87-96.
21. Srivastava, A.K; Ali, W; Singh, R; Bhui, K; Tyagi, S; Al- Khedhairi, A. A; Srivastava, P. K; Musarrat, J; Shukla, Y. Mancozeb-induced genotoxicity and apoptosis in cultured human lymphocytes. *Life Sci.* (2012) 90, 815-824.
22. Pirozzi AV, Stellavato A, La Gatta A, Lamberti M, Schiraldi C. Mancozeb, a fungicide routinely used in agriculture, worsens nonalcoholic fatty liver disease in the human HepG2 cell model. *Toxicology Letters*; 2016, 13(249): 1-4
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.03.004>

23. Djekkoun N, Lalau JD, Bach V, Depeint F, Khorsi-Cauet H. Chronic oral exposure to pesticides and their consequences on metabolic regulation: role of the microbiota. *Eur J Nutr.* 2021 Dec;60(8):4131-4149. doi: 10.1007/s00394-021-02548-6. Epub 2021 Apr 10. PMID: 33837455
24. Zhao Y., Zhang Y., Wang G., Han R., Xie X. (2016). Effects of chlorpyrifos on the gut microbiome and urine metabolome in mouse (*Mus musculus*). *Chemosphere* 153, 287–293. 10.1016/j.chemosphere.2016.03.055
25. Liu Q., Shao W., Zhang C., Xu C., Wang Q., Liu H., et al. (2017a). Organochloride pesticides modulated gut microbiota and influenced bile acid metabolism in mice. *Environ. Pollut.* 226, 268–276. 10.1016/j.envpol.2017.03.068
26. Wang X., Shen M., Zhou J., Jin Y. (2019a). Chlorpyrifos disturbs hepatic metabolism associated with oxidative stress and gut microbiota dysbiosis in adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 216, 19–28. 10.1016/j.cbpc.2018.11.010
27. Yan J., Wang D., Meng Z., Yan S., Teng M., et al. (2020a). Effects of incremental endosulfan sulfate exposure and high fat diet on lipid metabolism, glucose homeostasis and gut microbiota in mice. *Environ. Pollut.* 268, 115697.
28. Meng Z., Liu L., Yan S., Sun W., Jia M., Tian S., et al. (2020). Gut microbiota: a key factor in the host health effects induced by pesticide exposure? *J. Agric. Food Chem.* 68, 10517–10531. 10.1021/acs.jafc.0c04678
29. Governo do Rio Grande do Sul - Departamento de Políticas Agrícolas e Desenvolvimento - Rural Radiografia da Agropecuária Gaúcha 2020 - Disponível em:

<https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/202009/26185534-radiografia-da-agropecuaria-gaucha-2020-1.pdf> Acessado em 15Jun2022

30. Oliveira-Silva, JJ; Alves, SR; Meyer, A; Perez, F .; Sarcinelli, P. de N; Mattos, R. de CO de C .; Moreira, JC "Influence of socioeconomic factors on pesticide contamination, Brazil". Journal of Public Health, 2001, v. 35, no. 2, São Paulo.
31. Swanson, MB; Davis, GA; Kincaid, LE et al. Environmental Chemistry and Toxicology 16, 2, 372-383; 1997
32. PAN - American Health Organization (PAHO). Sanitary surveillance manual for populations exposed to pesticides. Brasilia, 1997.
33. Pires AC, Costa RC, Perez D. Methodology for the conservation of the fungicide Mancozeb in soil samples. Chem. Nova, Vol. 34, No. 9, 1639-1642, 2011.
34. Pawan K.Gupta. Toxicity of Fungicides, Chapter 45, Veterinary Toxicology; 2018, 569-580 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00045-3>
35. Hashem MA, Mohamed WAM, Attia ESM. Assessment of protective potential of Nigella sativa oil against carbendazim- and/or mancozeb-induced hematotoxicity, hepatotoxicity, and genotoxicity. Environ Sci Pollut Res; 2018, 25(2): 1270-1282. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0542-9>
36. Lamberti M, Stellavato A, Pirozzi A. et al. Effects of Pyriproxyfen on Viability and Increase of Intracellular Lipids in HepG2 Cell Line. Occup Med Health Aff; 2014, 2, 189-193. DOI: 10.4172/2329-6879.1000189
37. Thind TS, Hollomon DW. Thiocarbamate fungicides: reliable tools in resistance management and future outlook. Pest Manag Sci. 2018; 74(7): 1547-1551. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.4844>

38. Faria, NMX et al. Trabalho rural e intoxicações por agrotóxicos. *Cad. Saúde Pública*; 2004, 20(5): 1298-1308.
39. Faria NMX, Rosa JAR, Facchini LA. Intoxicações por agrotóxicos entre trabalhadores rurais de fruticultura, Bento Gonçalves, RS. *Rev Saúde Pública*; 2009, 43(2): 335-44
40. Vargas TS, Salustriano NA, Klein B, Romão W, Silva SRC, Wagner R, Scherer R (2018) Fungicides in red wines produced in South America, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35:11, 2135-2144. DOI: 10.1080/19440049.2018.1529439.
41. Boedeker, W., Watts, M., Clausing, P. *et al.* The global distribution of acute unintentional pesticide poisoning: estimations based on a systematic review. *BMC Public Health* **20**, 1875 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09939-0>
42. Faria NMX, Fassa AG, Facchini LA. Pesticide poisoning in Brazil: official information systems and challenges for conducting epidemiological studies. *Science of collective health*. 2007 Mar; 12 (1): 25-38
43. Mello CM, Silva LF. Factors associated with pesticide poisoning: a cross-sectional study with coffee plantation workers in southern Minas Gerais. *Epidemiol. Health Service*. 2013; 22 (4): 609-620.
44. Guarner F., Malagelada J. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003; 361:512–519. 109
45. Proctor L.M. The human microbiome project in 2011 and beyond. *Cell Host Microbe*. 2011; 10:287–291.
46. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*. 2008; 320:1647–1651.

47. Vassallo G, Mirijello A, Ferrulli A, Antonelli M, Landolfi R, Gasbarrini A, et al. Review article: Alcohol and gut microbiota- The possible role of gut microbiota modulation in the treatment of alcoholic liver disease. *Aliment. Pharm.* 2015; 41:917– 927.
48. Talaro, K. P. (2008). Microbe-Human Interactions. In: Talaro, K. P. (Eds.). *Foundations in Microbiology*, 6ªEdição. Dubuque, Iowa, McGraw-Hill Higher Internacional Education, pp. 384-387.
49. Biasucci, G. et al. (2008). Cesarean delivery may affect hearly biodiversity of intestinal bactéria. *The Journal of Nutrition*, vol. 138, pp. 1796S-1800S.
50. Penders, J. et al. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pedriatics*, vol. 118, pp. 511-521.
51. Fiocchi, C. e Pereira de Sousa, H.S. (2012). Microbiota Intestinal - Sua importância e função. *Jornal Brasileiro de Medicina*, vol. 100, pp. 30-38.
52. Bajaj JS. Alcohol, liver disease and the gut microbiota. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2019; 16:235–246.
53. Hold GL, Smith M, Grange C, Watt ER, El-Omar EM, Mukhopadhy I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? *World J. Gastroenterol.* 2014; 20:1192–1210.
54. Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Mäkivuokko H, Rinttilä T, Paulin L, Corander J, et al. The Fecal Microbiota of Irritable Bowel Syndrome Patients Differs Significantly from That of Healthy Subjects. *Gastroenterology.* 2007; 133:24–33.
55. Goodman B, Gardner H. The microbiome and cancer. *J. Pathol.* 2018; 244:667–67

56. Larsen N, Vogensen FK, Van Den Berg FWJ, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS ONE*. 2010;5: E9085.
57. Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-Induced Obesity Is Linked to Marked but Reversible Alterations in the Mouse Distal Gut Microbiome. *Cell Host Microbe*. 2008; 3:213–223. 81
58. Lopetuso LR, Scaldaferri F, Petito V, Gasbarrini A. Commensal Clostridia: Leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut. Pathog.* 2013;5:23.
59. Xu C, Liu Q, Huan F, Qu J, Liu W, Gu A, Wang Y, Jiang Z. Changes in gut microbiota may be early signs of liver toxicity induced by Epoxiconazole in rats. *Chemotherapy*. 2014, 60(2), 135-142. doi: 10.1159/000371837
60. Jin C, Luo T, Zhu Z, Pan Z, Yang J, Wang W, Fu Z, Jin Y. Imazalil exposure induces gut microbiota dysbiosis and hepatic metabolism disorder in zebrafish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2017, 202, 85-93. doi: 10.1016/j.cbpc.2017.08.007
61. Meng Z, Liu L, Jia M, Li R, Yan S, Tian S, Sun W, Zhou Z, Zhu W. Impacts of Penconazole and its enantiomers exposure on gut microbiota and metabolic profiles in mice. *J Agric Food Chem*. 2019, 67(30), 8303-8311. doi: 10.1021/acs.jafc.9b02856.
62. Kong A, Zhang C, Cao Y, Cao Q, Liu F, Yang Y, Tong Z, Rehman MU, Wang X, Huang S. The fungicide thiram perturbs gut microbiota community and causes lipid metabolism disorder in chickens. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2020, 206, 111400. doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.111400

63. Bibbò S, Ianiro G, Dore MP, Simonelli C, Newton EE, Cammarota G. Gut Microbiota as a Driver of Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Mediators Inflamm.* 2018 :9321643.
64. Saltzman ET, Palacios T, Thomsen M, Vitetta L. Intestinal Microbiome Shifts, Dysbiosis, Inflammation, and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Microbiol.* 2018; 9:61.
65. WIGG, A.J.; ROBERTS-THOMSON, I.C.; DYMOCK, R.B. et al. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*; 48: 206-211, 2001.
66. SAJJAD, A.; MOTTERSHEAD, M.; SYN, W.K. et al. Ciprofloxacin suppresses bacterial overgrowth, increases fasting insulin but does not correct low acylated ghrelin concentration in non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*; 22: 291-299, 2005.
67. SABATÉ, J.M.; JOUËT, P.; HARNOIS, F. et al. High prevalence of small intestinal bacterial overgrowth in patients with morbid obesity: A contributor to severe hepatic steatosis. *Obes Surg*; 18: 371-377, 2008.
68. MIELE, L.; VALENZA, V.; LA TORRE, G. et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*; 49: 1877-1887, 2009.
69. SHANAB, A.A.; SCULLY, P.; CROSBIE, O. et al. Small intestinal bacterial overgrowth in nonalcoholic steatohepatitis: Association with toll-like receptor 4 expression and plasma levels of interleukin 8. *Dig Dis Sci*; 56: 1524-1534, 2011

70. MIELE, L.; VALENZA, V.; LA TORRE, G. et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*; 49: 1877-1887, 2009.
71. VOLYNETS, V.; KÜPER, M.A.; STRAHL, S. et al. Nutrition, intestinal permeability, and blood ethanol levels are altered in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Dis Sci*; 57: 1932-1941, 2012.
72. FEROLLA, S.M.; COUTO, C.A.; COSTA-SILVA, L.; ARMILIATO, G.N. et al. Beneficial Effect of Synbiotic Supplementation on Hepatic Steatosis and Anthropometric Parameters, But Not on Gut Permeability in a Population with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Nutrients*; 28: 8 (7), pii: E397, 2016
73. Bibbò S, Ianiro G, Dore MP, Simonelli C, Newton EE, Cammarota G. Gut Microbiota as a Driver of Inflammation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Mediators Inflamm*. 2018 :9321643.
74. Saltzman ET, Palacios T, Thomsen M, Vitetta L. Intestinal Microbiome Shifts, Dysbiosis, Inflammation, and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Front Microbiol*. 2018; 9:61.
75. Engen PA, Green SJ, Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol Res*. 2015; 37:223–236.
76. De Boer, YS and Sherker, AH (2017). Herbal and Dietary Supplement-Induced Liver Injury. *Liver Disease Clinics*, 21 (1), 135-149.<https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.08.1010>
77. Wahlang, B., Beier, JI, Clair, HB, Bellis-Jones, HJ, Falkner, KC, McClain, CJ and Cave, MC (2013). Steatohepatitis associated with toxic substances. *Toxicological Pathology*, 41 (2), 343-360.<https://doi.org/10.1177/0192623312468517>

78. Brauner, Cristiano. 2019. Metabolic syndrome and hepatotoxicity associated with solvent exposure. Master's Thesis (Sciences in Gastroenterology and Hepatology), UFRGS.
79. Corsini A, Bortolini M. Drug-induced liver injury: the role of drug metabolism and transport. *J. Clin. Pharmacol.* May 2013; 53 (5): 463–74.
80. Chen M, Suzuki A, Borlak J, Andrade RJ, Lucena MI. Drug-induced liver injury: Interactions between drug properties and host factors. *J Hepatol* 2015;63:503–14. (Journal full text)
81. Hoofnagle JH, Björnsson ES. Drug-induced liver injury: types and phenotypes. *N Engl J Med.* 2019 Jul 18; 381 (3): 264-273. Doi: 10.1056 / NEJMra1816149. PMID: 31314970.
82. Brautbar N. Williams J. Industrial solvents and liver toxicity: evaluation of risks, risk factors and mechanisms. *Int J Hyg Environ Health.* 2002; 205: 479-491
83. Robles-Diaz M. Lucena MI Kaplowitz N. Stephens C. Medina-Caliz I. González-Jimenez A. et al. Use of Hy's law and a new compound algorithm to predict acute liver failure in patients with drug-induced liver injury. *Gastroenterology* 2014; 147: 109-118
84. Danan G, Benichou C. Assessment of the causality of adverse drug reactions - I. A novel method based on the conclusions of international consensus meetings: application to drug-induced liver injury. *J Clin Epidemiol* 1993; 46: 1323-1330.
85. Urban TJ, Nicoletti P, Chalasani N, Serrano J, Stolz A, Daly AK, et al. Minocycline hepatotoxicity: clinical characterization and identification of HLA-B*35:02 as a risk factor. *J Hepatol* 2017; 67:137-144. - [PMC](#) - [PubMed](#)
86. Sandhu, N. and Navarro, V. (2020), Drug-Induced Liver Injury in GI Practice. *Hepatol Commun*, 4: 631-645. <https://doi.org/10.1002/hep4.1503>

87. Zimmerman HJ Effects of alcohol on other hepatotoxins. *Alcohol Clin Exp Res.* 1986; 10: 3-15
88. Chalasani N, Fontana RJ, Bonkovsky HL, Watkins PB, Davern T, Serrano J, et al. Causes, clinical characteristics and results of a prospective study of the Drug-induced liver injury in the United States. *Gastroenterology* 2008; 135 (1924-1934) e4.
89. European Association for the Study of the Liver. Clinical Practice Guidelines Panel: Chairperson: Panel Members: EASL Board of Directors Representative: EASL Clinical Practice Guidelines: Occupational Liver Diseases. *J Hepatol.* November 2019; 71 (5): 1022-1037. Doi: 10.1016 / j. jhep.2019.08.008. Epub 17 Sep 2019 PMID: 31540728.
90. Anders LC Lang AL Anwar-Mohamed A. Douglas AN Bushau AM Falkner KC et al. Vinyl chloride metabolites potentiate inflammatory liver injury caused by LPS in mice. *Toxicol Sci.* 2016; 151: 312-323
91. Senior JR Alanine Aminotransferase: A Clinical and Regulatory Tool to Detect Past, Present, and Future Liver Lesions. *Clin Pharmacol Ther.* 2012; 92: 332-339
92. Núñez M. Hepatotoxicity of antiretrovirals: incidence, mechanisms and management. *J Hepatol* 2006; 44: S132-S139
93. Dawwas MF, Aithal GP. End-stage liver disease related to methotrexate is rare and is associated with features of the metabolic syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 40: 938-948
94. B. Fromenty, "Drug-induced liver injury in obesity," *Journal of Hepatology*, vol. 58, no. 4, pp. 824–826, 2013. View at: [Publisher Site](#) | [Google Scholar](#)

95. R. Pais, E. Rusu, and V. Ratziu, “The impact of obesity and metabolic syndrome on chronic hepatitis B and drug-induced liver disease,” *Clinics in Liver Disease*, vol. 18, pp. 165–178, 2014. View at: [Google Scholar](#)
96. J. Massart, K. Begriche, C. Moreau, and B. Fromenty, “Role of nonalcoholic fatty liver disease as risk factor for drug-induced hepatotoxicity,” *Journal of Clinical and Translational Research*, vol. 3, pp. 212–232, 2017. View at: [Google Scholar](#)
97. Li, Xu et al. “Metabolic Comorbidities and Risk of Development and Severity of Drug-Induced Liver Injury.” *BioMed research international* vol. 2019 8764093. 18 Aug. 2019, doi:10.1155/2019/8764093
98. Kaufman KR Carbamazepine, hepatotoxicity, organic solvents and paints. Embargo. 1999; 8: 250-252.
99. Kubo S. Matsuzaki K. Seki T. Ohsawa M. Kumagai S. Endo G. Severe hepatitis in a printing press worker: an acute case study. *J Occup Health*. 2015; 57: 87-90
100. Sies, H., 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte chemie international edition in english*, 25 (12), 1058–1071.
101. Perl, A., 2013. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. *Nature reviews rheumatology*, 9, 674–686
102. Ayala, A., Munoz, M.F., and Arg ~ uelles, S., 2014. Lipid peroxidation: pro- € duction, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 360438
103. Biswas, S.K., 2016. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 5698931

104. Kreuz, S., and Fischle, W., 2016. Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. *Epigenomics*, 8 (6), 843–862
105. Monastero, R.N., and Pentylala, S., 2017. Cytokines as biomarkers and their respective clinical cutoff levels. *International journal of inflammation*, 2017, 4309485
106. Birben, E., et al., 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World allergy organization journal*, 5 (1), 9–19.
107. Bus, J.S., and Gibson, J.E., 1984. Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environmental health perspectives*, 55, 37–46.
108. Alves, J.S., et al., 2016. Investigation of potential biomarkers for the early diagnosis of cellular stability after the exposure of agricultural workers to pesticides. *Anais da academia brasileira de ciencias*, 88 (1), 349–360.
109. Madani, F.Z., et al., 2016. Hemostatic, inflammatory, and oxidative markers in pesticide user farmers. *Biomarkers*, 21 (2), 138–145
110. Taghavian, F., et al., 2016. Comparative toxicological study between exposed and non-exposed farmers to organophosphorus pesticides. *Cell journal*, 18, 89–96.
111. Lerro, C.C., et al., 2020. 2, 4-D exposure and urinary markers of oxidative DNA damage and lipid peroxidation: a longitudinal study. *Occupational and environmental medicine*, 77 (4), 276–280.
112. Zepeda-Arce, R., et al., 2017. Oxidative stress and genetic damage among workers exposed primarily to organophosphate and pyrethroid pesticides. *Environmental toxicology*, 32, 1754–1764.

113. Saks, M. Upreti, S., Rajendra, SV, and Dang R. (2017). Genotoxicity: Mechanisms, Test Guidelines, and Glob J PharmaceuSci Methods 1 (5): GJPPS.MS.ID.555575 (2017) <https://juniperpublishers.com/gjpps/pdf/GJPPS.MS.ID.555575.pdf>
114. Franke SIR, Boeira JM, Erdtmann B, Henriques JAP, Genotoxicity of synthetic and natural agents, Toxicological Genetics, 2003, Editora Alcance. PP 307-321
115. Flores M, Yamaguchi A. Micronucleus test: an evaluation for genotoxic screening. Journal of Health Research. 2008; 1: 337-40.
116. Sandoval-Herrera, N., Paz Castillo, J., Herrera Montalvo, L.G. and Welch, K.C., Jr. (2021), Micronucleus Test Reveals Genotoxic Effects in Bats Associated with Agricultural Activity. Environ Toxicol Chem, 40: 202-207. <https://doi.org/10.1002/etc.4907>
117. Gontijo, Ammc, Tice, R; 2003. Comet test for the detection and repair of DNA damage in individualized cells. In: Ribeiro, IR; Salvadori, DMF, Marques, EK (Org.). Environmental mutagenesis. Canoas: Ulbrap. 173-200
118. Ross, GM, McMillan, TJ; Wilcox, P; Collins, AR, 1995. Single cell gel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Cancer Research Institute. Mutation Research, 337: 57-60
119. Tice, RR, Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, JC, Sasaki, YF, 2000. Single Cell / Comet Gel Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35: 206-22
120. SILVA, C. C.; CRUZ, A.D. Genotoxicidade da triancinolona e do nitrato de prata em linfócitos utilizando o teste cometa. Estudos, n. 2, p. 155-163, 2012

121. Senior JR Alanine Aminotransferase: A Clinical and Regulatory Tool to Detect Past, Present, and Future Liver Lesions. *Clin Pharmacol Ther.* 2012; 92: 332-339
122. Wahlang B. Beier JI Clair HB Bellis-Jones HJ Falkner KC McClain CJ et al. Steatohepatitis associated with toxic substances. *Toxicol Pathol.* 2013; 41: 343-360
123. Lundqvist G. Flodin U. Axelson O. A case-control study of fatty liver disease and organic solvent exposure. *Am J Ind Med.* 1999; 35: 132-136
124. Younes R. Bugianesi E. NASH in thin people. *Semin Liver Dis.* 2019; 39: 86-
125. Mastrangelo G. Fedeli U. Fadda E. Valentini F. Agnesi R. Magarotto G. et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis in vinyl chloride workers: synergistic effect of occupational exposure with alcohol intake. *Environmental health perspective.* 2004; 112: 1188-1192
126. Pivetta F; Huet JM; Araujo CU; MF branches; Apostoli Pietro. Biological surveillance: concepts and applications in public health. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro,* 17 (3): 545-554, May-June 2001
127. BERLIN, A.; YODAIKEN, RE & HENMAN, BA, 1984. Evaluation of toxic agents in the workplace. Roles of environmental and biological monitoring. Boston: Haya Nijhoft.
128. Fustinoni S, Campo L, Liesivuori J, Pennanen S, Vergieva T, et al. Biological monitoring and questionnaire to assess exposure to ethylenebisdithiocarbamates in a multicenter European field study. *Human and Experimental Toxicology,* 2008; 27: 681-691 DOI: 10.1177 / 0960327108100003.
129. Dall’Agnol, J. C., et al. "Systemic effects of the pesticide mancozeb–A." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 25 (2021): 4113-4120.

ANEXO A

DOI: 10.26355/eurrev_202106_26054