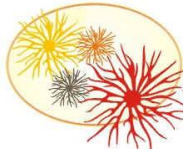




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA



Lais Mattos de Aguiar

Exposição ao herbicida Roundup Original causa alterações no sistema de defesa antioxidante da mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*

Rio Grande

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

Exposição ao herbicida Roundup Original causa alterações no sistema de defesa antioxidante da mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*

Trabalho a ser apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, por Lais Mattos de Aguiar, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre. Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo da Rosa

Rio Grande

2015

Dedico este trabalho à minha
mãe Helena Mattos, pelo
incansável apoio e estímulo em
todos os momentos da minha
vida. Te amo! ♥

Agradecimentos

E agora que mais um ciclo se encerra eu gostaria de agradecer a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

Primeiramente agradeço a Deus e a minha mãe Iemanjá, por sempre me acompanharem e me protegerem ao longo de toda a minha vida.

Agradeço à minha mãe Helena Mattos, uma pessoa simplesmente sensacional e fantástica, que me apoia de todas as maneiras possíveis, fazendo dos meus sonhos, os dela. Mãe, todo esse esforço e trabalho árduo são pra ti. Te amo!

Agradeço ao meu namorado Jean Lopes, uma pessoa linda em todos os aspectos, que além de me dar todos os empurrões necessários pra chegar até aqui, soube lidar como ninguém com a minha ausência nos últimos meses. Amor, obrigado por tudo. Enfrentar o mundo se torna uma tarefa simples se te tenho ao meu lado. Te amo!

Agradeço também (e muito) ao meu orientador Carlos Eduardo da Rosa (ou Nino), pois sem ele nada disso seria possível. Nino, obrigada por todos esses anos de parceria, pelo apoio, puxões de orelha, mas principalmente por ter aceitado me orientar desde o início da Graduação e fazer de mim uma pessoa melhor em muitos aspectos. Ter a oportunidade de aprender contigo é um privilégio!

Meu muito obrigado à Fernanda Hernandes Figueira (a Fê HF) que é minha amigona dentro e fora do laboratório. Uma pessoa maravilhosa e super querida que dividiu o trabalho de uma maneira descontraída e ainda me deu o privilégio da convivência fora da FURG. Fê, tu é um dos melhores presentes que a vida acadêmica me deu. Amo tu!

Deixo também um obrigado às minhas amigas da Graduação: Suélen Cavalheiro Amaral, Nathália Fontella Sturbelle, Amapola Correa Soares e Barbara Alves. Todas escolhemos caminhos diferentes e infelizmente não estamos mais juntas no dia-a-dia, mas nossa amizade não mudou em nada e o apoio de vocês é fundamental. Amo vocês e estou com saudades.

Obrigada também ao Fábio de Melo Tarouco, um amigo incondicional que fiz logo no início da Graduação, e que divide a orientação do Nino comigo.

Obrigada negrinho pelas boas conversas nos corredores e da ajuda que me dessem durante o Mestrado. Tu é “shows”.

Obrigada também à Fernanda Moreira Lopes e ao Robson Velasques por terem me ajudado a fazer algumas análises aos 45 do 2º tempo. Sem vocês essa conquista não seria possível.

Como não poderia deixar de agradecer, aqui vai o meu muito obrigado à uma pessoinha que está bem longe de mim no mapa, mas que em momento algum deixou de me apoiar e entender minhas ausências. Fernanda Rissi, obrigada por tudo, de coração minha florzinha. Amo você pra sempre!

Claro, que com tantos agradecimentos, um é pra alguém que convive comigo há 7 anos e me conhece como a palma da sua mão. Obrigada Gabriela Leon (migaaaah) pelo apoio, pelas conversas, por existir na minha vida. Te amuuuuuh.

Agradeço também ao Anderson Acunha (Antsu) que foi minha alavanca nos momentos de desespero, e com seu bom-humor não deixou a minha “peteca cair”. Obrigada por acreditar em mim mesmo quando nem eu acreditava.

Deixo um “miaubrigado” aos meus companheiros da vida e de escrita: Fiona, Luna e Sheldon. Obrigado por existirem e completarem o meu ser. A mamãe ama vocês.

Por fim, agradeço à todos professores, técnicos e funcionários do PPGCF-FAC por crescerem tanto na minha vida, profissional e pessoal. Tenho orgulho por ter convivido e aprendido com todos.

Sumário

Resumo	7
Introdução Geral	8
Abstract.....	21
1. Introduction	22
2. Material and Methods	24
2.1. Model organisms	24
2.2. Toxicological Tests	24
2.3. Oxidative Stress Markers	25
2.4. Acetylcholinesterase activity (AChE)	26
2.5. Gene expression analysis.....	27
2.6. Fly weights	28
2.7. Statistical analysis	28
3. Results	29
3.1. Mortality	29
3.2. Oxidative Stress Markers	29
3.4. Acetylcholinesterase activity.....	33
3.5. Fly weights	34
4. Discussion.....	34
4.1. Mortality	34
4.2. Oxidative Stress Markers	35
4.3. Gene expression.....	37
4.4. Acetylcholinesterase activity.....	39
4.5. Fly weights	40
4.6. Conclusion.....	40
Acknowledgements	40
References	41
Discussão Geral da Dissertação.....	48
Referências Bibliográficas Citadas na Introdução Geral e Discussão Geral.....	53

Resumo

O glifosato é um herbicida não- seletivo e pós emergente que atua diretamente no crescimento da planta. Em organismos não-alvo pode acarretar em efeitos adversos como desregulador endócrino, causador de estresse oxidativo e pode vir a causar distúrbios comportamentais. Drosofilídeos têm se mostrado como uma eficaz ferramenta para estudos toxicológicos. No presente estudo foram investigados os efeitos do Roundup Original (360 g/L de glifosato) em parâmetros de estresse oxidativo, sistema de defesa antioxidante e atividade acetilcolinesterásica utilizando a *Drosophila melanogaster* como modelo. Moscas (ambos os gêneros) de 1 a 3 dias de emersão foram expostas à diferentes concentrações de glifosato (1,0; 2,0; 5,0; 10,0 mg/L) no meio de cultivo por 24 e 96h. Após o período de exposição foram quantificados os níveis de espécies reativas de oxigênio (EAO), capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) e dano lipídico (LPO). Foram ainda realizadas análises de expressão gênica através de RT-PCR para genes atuantes no sistema de defesa antioxidante (*keap1*, *nrf-2*, *sod1*, *sod2*, *cat*, *catir*, *gclc*, *gclm*, *gs*, *trxr1* e *trxr2*). Além disso, foi analisada a atividade da acetilcolinesterase (AChE) para o tempo de 96h. Foi visto um aumento nos níveis de EAO para o tempo 96h. Os níveis de ACAP bem como a expressão dos genes tiveram um aumento a partir de 24h, enquanto que LPO e a atividade da AChE não foram afetadas após a exposição ao Roundup. Nossos dados sugerem que a exposição da *D. melanogaster* ao Roundup faz com que o sistema de defesa antioxidante seja ativado e isso pode vir a evitar danos subsequentes causados através do EAO. Através do presente estudo conclui-se que essa espécie mostrou-se sensível frente à exposição ao Roundup e essa sensibilidade poderia vir a causar efeitos ao nível de população, onde uma das possíveis consequências seriam a diminuição dessa espécie em termos de abundância.

Introdução Geral

Durante a produção de alimentos, os herbicidas desempenham um papel muito importante através do controle de ervas daninhas (Stephenson et al., 2006). Antigamente, por meados de 1940, não havia muitos herbicidas disponíveis no mercado e a escolha entre eles se limitava ao tipo de ação de cada um (Lein et al., 2004). Trinta anos após houve o aumento na produção de herbicidas, não apenas em quantidade, mas também em diversidade de formulações com os mesmos ingredientes ativos e com diferentes nomes comerciais (Lein et al., 2004). De maneira geral, os herbicidas apresentam ainda duas classes com base à sua forma de aplicação: ao solo e as folhas. Esse último pode ainda ser dividido em herbicidas de contatos, os quais têm o seu efeito somente quando entram em contato com a planta, e herbicidas sistêmicos, que são absorvidos pela planta e transportados tanto pelo floema quanto pelo xilema aos seus sítios de ação, que normalmente são as regiões de crescimento ativo, de reprodução ou ainda de armazenamento (Gwynne e Murray, 1985).

Dentre os herbicidas sistêmicos, podemos destacar os que são inibidores da síntese de aminoácidos aromáticos, onde se encaixa o glifosato [N-(fosfonometil)glicina] (Fig.1). Esse é um herbicida não seletivo e pós-emergente que atua diretamente com o crescimento da planta (Ross e Childs, 1996). A enzima 5-enopiruvil-3-shikimato-fosfato-sintase (EPSPS) está envolvida na síntese de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofato e fenilalanina), os quais são responsáveis por funções essenciais nas plantas (Stephenson et al., 2006). O mecanismo de ação do glifosato é bloquear a ação dessa enzima, ocorrendo um acúmulo de shikimato na planta e uma perda de aminoácidos aromáticos que são necessários para a produção de enzimas essenciais para o crescimento da planta (Ross e Childs, 1996).

Os herbicidas são responsáveis por cerca de 40% do volume de pesticidas utilizada em todo o mundo e o glifosato é um dos herbicidas mais usados na agricultura, silvicultura e horticultura (incluindo uso doméstico) (US EPA, 2011). Além disso, o glifosato é um dos primeiros herbicidas contra os quais diferentes culturas (por exemplo, soja, milho, algodão) têm sido geneticamente modificadas (James, 1997). Assim, espera-se que a expansão de culturas resistentes ao glifosato irá aumentar ainda mais a utilização deste pesticida.

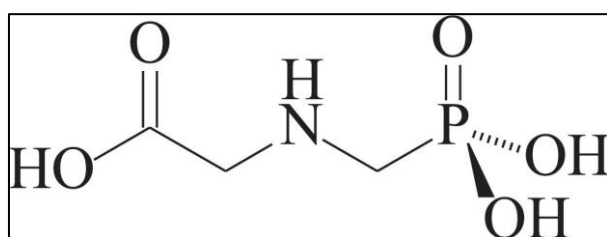


Figura 1. Estrutura molecular do glifosato (N-(fosfonometil)glicina). Retirado de Fouodjou et al.(2015).

Apesar de o glifosato apresentar um modo de ação que atue por inibir a EPSPS, que existe exclusivamente em plantas, alguns autores já relataram efeitos adversos em organismos não-alvo (Sandrini et al., 2013; Mottier et al. 2015; Larsen et al., 2012; Thongprakaisang et al., 2013). Porém, o glifosato é utilizado em larga escala através de diversas formulações comerciais presentes no mercado (dentre elas, o Roundup), onde ao ingrediente ativo (glifosato) são adicionadas substâncias conhecidas como surfactantes, que tem por função aumentar a eficácia do herbicida (Giesy et al., 2000) e a esses têm sido atribuído os efeitos negativos do mesmo. Estudos comparativos em organismos não-alvo já relatam que o glifosato possui uma menor toxicidade quando comparado com suas formulações comerciais (Brausch e Smith, 2007; Mottier et al., 2013). Dentre outras informações sobre o glifosato, sabe-se que ele tende a ser inativado pelo solo através de sua ligação com íons específicos (metais) ou com substâncias

húmicas. Quando o glifosato está livre no solo ele é degradado a CO_2 através da atividade microbiana (Amarante Jr. et al., 2002). Registros de glifosato já foram documentados em solos argentinos por Peruzzo et al. (2008), onde após aplicações de glifosato foram encontradas concentrações que variaram de 0,1 a 0,7 mg/L em água, 0,5 a 4,3 mg/Kg em solo sem água e 0,0 a 4,9 mg/Kg em sedimento (solo com água). Com relação à meia-vida desse composto em solo, Wauchope et al. (1992) relatam que a meia-vida pode chegar até 174 dias e Giesy et al. (2000) sugerem que essa variação ocorra de 2 até 197 dias. Ainda, Toni et al. (2006) relataram uma variação temporal de menos de uma semana até alguns meses, sendo esse tempo determinado por fatores como: teores de argila e matéria orgânica e do nível de atividade microbiana.

Distúrbios no meio ambiente (como a presença de herbicidas) tendem a perturbar os organismos de uma maneira a gerar o que é conhecido por estresse oxidativo: um processo no qual há um desbalanço na produção de espécies ativas de oxigênio (EAO) e do sistema de defesa antioxidante (SDA), podendo culminar em dano oxidativo (Sies, 1991). Uma das fontes de EAO é através do metabolismo energético pela cadeia transportadora de elétrons e da fosforilação oxidativa, onde de maneira geral o oxigênio é reduzido à água acoplado à produção de ATP. Durante esse processo cerca de 0,1% do oxigênio consumido pode vir a gerar EAO (Fridovich, 2004). Dentre os tipos de EAO temos o peróxido de hidrogênio, o radical ânion superóxido e o radical hidroxila, onde esses tem a capacidade de reagir com biomoléculas como proteínas, lipídeos e até mesmo no DNA, levando ao mal funcionamento das organelas membranosas, dos processos enzimáticos e da manutenção da informação genética (Fridovich, 2004; Storey, 1996; Sies 1991).

Para minimizar os danos causados pelas espécies ativas de oxigênio, os organismos desenvolveram um SDA que pode ser dividido de maneira geral em duas

classes: defesa antioxidante enzimática e não enzimática. No sistema de defesa enzimático estão incluídas enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), tioredoxina (Trx), tioredoxina redutases (Trx) bem como as enzimas relacionadas com a síntese de antioxidantes não enzimáticos. Já no SDA não enzimático são encontradas moléculas de baixo peso molecular como a glutathione (GSH), o ácido ascórbico, a melanina, a melatonina e o ácido úrico, por exemplo (Hermes-Lima, 2004). Já se sabe também que todos esses componentes atuam de forma cooperativa a fim de manter uma defesa antioxidante efetiva para o organismo através da interceptação, degradação e/ou correção dos danos causados pelas EAO (Regoli e Winston, 1998; Amado et al., 2009). Muitos estudos utilizam os níveis das enzimas bem como os níveis de componentes do sistema de defesa não-enzimático (principalmente a GSH) e respostas de aumento de dano (lipídico, proteico e de DNA) como parâmetro para avaliação da presença de EAO, bem como a resposta do SDA, frente à exposição a diferentes contaminantes (Monserrat et al., 2007).

Um dos mecanismos de toxicidade do glifosato e herbicidas à base de glifosato (dentre eles o Roundup) em organismos não-alvo é a geração de estresse oxidativo, onde já foi visto que eles são capazes de alterar o SDA, bem como produzir EAO e/ou dano oxidativo. Um mecanismo proposto para a geração de EAO através da administração do Roundup é devido às disfunções mitocondriais, onde Peixoto (2005) viu que mitocôndrias de ratos isoladas expostas a concentração de 5mM apresentaram uma diminuição de cerca de 91% na atividade da ATP sintase, enfatizando um desbalanço energético. Além disso, foi visto que houve uma diminuição no potencial transmembrana mitocondrial, o qual é essencial para a eficiente conversão de energia advinda dos processos oxidativos na cadeia de elétrons em ATP pela fosforilação

oxidativa. O autor nos traz que disfunções energéticas como essa podem ser as causadoras diretas na produção do EAO.

O incremento na produção de EAO em animais expostos ao glifosato ou a herbicidas a base de glifosato já foram sugeridas em alguns organismos, através da visualização de alterações no SDA. Minhocas que foram expostas ao Roundup Ultra apresentaram um incremento na atividade da SOD e CAT, sugerindo que esse aumento tenha sido causado devido à presença de EAO (Contardo-Jara et al., 2009). Já foi visto também que ostras expostas ao Roundup de maneira crônica (56 dias em uma concentração de 100 µg/L) apresentaram um aumento da GST, reforçando a ativação de um sistema de defesa antioxidante devido às condições pró-oxidantes que foram propostas (Mottier et al., 2015).

Com relação aos danos oxidativos, sabe-se que esse herbicida tem a capacidade de causar danos lipídicos, como foi reportado por Modesto e Martinez (2010a) que viram um aumento da lipoperoxidação em peixes expostos às concentrações de 1 e 5 mg/L pelo período de 6h. Nesse estudo a presença do dano foi correlacionada com a diminuição da atividade das enzimas do SDA. Senhorin et al. (2014) relataram também um aumento de dano lipídico e protéico no peixe surubim *Pseudoplatystoma sp* após a exposição ao Roundup para uma concentração máxima de 7,5 mg/L, o que nos sugere que o Roundup é capaz de aumentar os níveis de espécies ativas de oxigênio, onde essas seriam responsáveis pelos danos subsequentes. Já foi relatado também o aumento da peroxidação lipídica em jundiás *Rhamdia quelen* após 96h de exposição ao Roundup nas concentrações de 0,2 e 0,4 mg/L (Gluszczak et al 2007). Nesse ponto, além de enfatizar essas análises para uma possível determinação do balanço redox dos organismos, cabe ressaltar que o Roundup pode estar agindo de uma maneira espécie-específica, onde uns apresentam maior sensibilidade do que os outros.

Dentre alguns outros efeitos do glifosato e de suas formulações cabe ressaltar a inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Sandrini et al., 2013). Essa é uma enzima que atua na fenda sináptica ou junção neuromuscular quebrando a acetilcolina (ACh) em acetato e colina. A inibição dessa enzima causa um acúmulo de ACh e isso pode interferir diretamente na transmissão colinérgica, causando distúrbios locomotores que podem vir a interferir, por exemplo, na fuga de predadores e reprodução (Saglio e Trijasse, 1998; Bretaud et al., 2000). Essa diminuição na atividade da AChE já foi vista por Modesto e Martinez (2010b) em peixes *Prochilodus lineatus* após 24h e 96h de exposição ao Roundup, onde as autoras sugerem que essa diminuição da atividade da enzima pode afetar os parâmetros comportamentais. Resultados contrários a esses já foram reportados por Harayashiki et al. (2013), onde a exposição do peixe *Poecilia vivipara* não causou diferenças na atividade da AChE, podendo corroborar com a hipótese de que o Roundup pode atuar de maneira espécie-específica, ou ainda essa resposta pode ter sido devido às baixas concentrações empregadas (130 e 700 µg/L). De qualquer maneira, essa é uma análise bastante importante uma vez que alterações na atividade dessa enzima podem afetar também a parte comportamental do animal.

Em insetos já foi visto que houve uma diminuição na fertilidade e fecundidade, bem como o desenvolvimento de tumores na região abdominal após a exposição à uma formulação comercial de glifosato (Glifoglex) em uma espécie de Neuroptera (Schneider et al., 2009). Para drosofilídeos já foi reportado que o glifosato, em concentrações de 0,1 a 10mM é capaz de causar efeitos genotóxicos que foram vistos através do “wing spot test” que é um teste de mutação somática e recombinação gênica (SMART) (Kaya et al., 2000).

A fim de investigar os efeitos do Roundup, se fez necessário a escolha de um organismo-modelo e houve grande interesse nos insetos, pois esses apresentam importância ecológica no ambiente terrestre, participando, por exemplo, da polinização de flores (Powell, 1997), como consumidores primários e como fonte de alimento para outros organismos (Resh e Cardé, 2009). Dentro de Insecta, podemos citar os drosofilídeos, que serviram de modelo para diversos estudos, havendo informações sobre ecologia, biologia de população, sistemática comportamento, genética, desenvolvimento e biologia molecular (Resh e Cardé, 2009). Sabe-se também que é vantajoso a sua utilização devido ao seu tamanho reduzido, dimorfismo sexual, ciclo de vida curto e grande fecundidade. Além de serem organismos de fácil cultivo em laboratório, com poucas exigências nutricionais e baixo custo, a espécie *Drosophila melanogaster* apresenta seu genoma sequenciado (Adams et al., 2000). Por fim, mas não menos importante, drosofilídeos tem sido amplamente utilizados em ensaios toxicológicos onde, após serem empregados diferentes compostos químicos, diversos ensaios tem sido aplicados com sucesso, como por exemplo, expressão de genes do SDA, ensaios comportamentais, determinação de dano lipídico e protéico (Sudati et al., 2013), determinação de EAO, atividade enzimática (SOD, CAT, GPx, AchE), conteúdo de tióis totais (Abolaji et al., 2015) bem como ensaios para verificar a genotoxicidade dos compostos (Kaya et al., 2000). É importante ressaltar que análises do sistema de defesa antioxidantes de drosofilídeos já vêm sendo reportadas. Gupta et al. (2005) expôs larvas de terceiro instar de *Drosophila melanogaster* à uma faixa de concentração de 0,1 a 100,0 ppb de um inseticida organofosforado e viu que houve uma diminuição da AChE, aumento da atividade da SOD e CAT, bem como a produção de dano lipídico. Em outro ensaio, para o mesmo inseticida numa faixa de 0,1 a 15 ppb, foi visto o aumento da atividade enzimática da SOD e CAT, bem como uma diminuição da GSH e

aumento de dano lipídico (Gupta et al., 2007). Esses dados corroboram com a afirmativa de que a *Drosophila* é um organismo-modelo ideal para verificação dos efeitos do Roundup.

Objetivos gerais

Com base no que foi proposto, o objetivo geral do estudo foi analisar os efeitos do herbicida Roundup em parâmetros de estresse oxidativo, sistema de defesa antioxidante e atividade acetilcolinesterásica na mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*.

Objetivos específicos

- Determinar os efeitos do Roundup sobre a viabilidade de adultos de *D. melanogaster*;
- Analisar alterações nos níveis de espécies ativas de oxigênio, capacidade antioxidante e peroxidação lipídica em *D. melanogaster* após a exposição ao Roundup;
- Determinar a expressão de enzimas chave no sistema de defesa antioxidante frente à exposição ao Roundup;
- Verificar a atividade enzimática da acetilcolinesterases de drosofilídeos expostos ao Roundup.

A presente dissertação gerou um artigo, o qual será submetido à revista “Chemosphere”

Fator de Impacto 3,340

Título do artigo:

Glyphosate-based herbicides exposure causes antioxidant defenses induction in fruit fly
Drosophila melanogaster

Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defense response in the fruit fly *Drosophila melanogaster*

Lais Mattos de Aguiar^a, Fernanda Hernandes Figueira^a, Marco Silva Gottschalk^b, Carlos Eduardo da Rosa^{a,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Av. Itália km 8, Campus Carreiros, 96203-900 Rio Grande, RS, Brazil

^b Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética (DEZG), Instituto de Biologia (IB), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

Lais Mattos de Aguiar – gessinger.lais@gmail.com

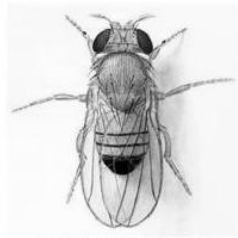
Fernanda Hernandes Figueira – fhf52@hotmail.com

Marco Silva Gottschalk – gotts007@gmail.com

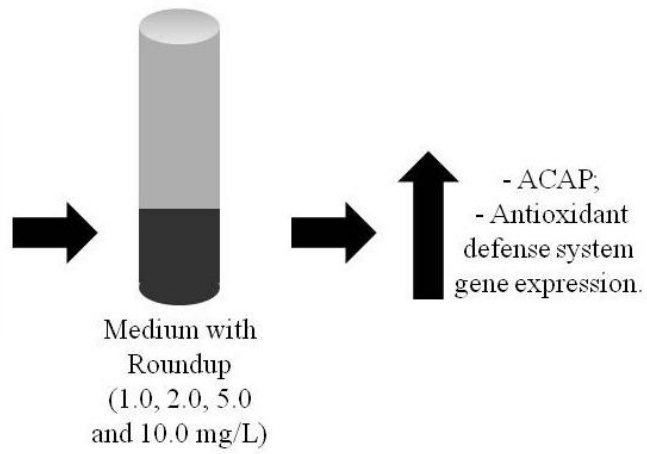
Carlos Eduardo da Rosa – carlosrosa@furg.br

* Corresponding author at: Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Instituto de Ciências Biológicas, Av. Itália km 8, Campus Carreiros, 96203-900 Rio Grande, RS, Brasil, Tel.: ; fax: . E-mail address: carlosrosa@furg.br (Rosa CE)

Graphical abstract



Fonte: <http://flybase.org/>
Male and female



Highlights

- *Drosophila melanogaster* were exposed to the herbicide Roundup.
- Herbicide exposure altered reactive oxygen species levels.
- Roundup induced the antioxidant defense system at biochemical and molecular levels.

Abstract

Glyphosate is a non-selective and post-emergent herbicide that affects plant growth. Animal exposure to this herbicide can lead to adverse effects such as endocrine disruption, oxidative stress and behavioral disorders. *Drosophilids* have been utilized previously as an effective tool within toxicological tests. In the present study, the effects of glyphosate-based herbicide (Roundup Original) were investigated regarding oxidative stress, antioxidant defense system and acetylcholinesterase activity within *Drosophila melanogaster*. Flies (both gender) of 1 to 3 days old were exposed to different glyphosate concentrations (1.0, 2.0, 5.0 and 10.0 mg/L) in the diet for 24 and 96h. After the exposure periods, reactive oxygen species (ROS) levels, antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) and lipid damage (LPO) levels were quantified. In addition, the mRNA expression of antioxidant genes (*keap1*, *nrf-2*, *sod1*, *sod2*, *cat*, *catir*, *gclc*, *gclm*, *gs*, *trxt*, *trxr1* e *trxr2*) were evaluated via RT-PCR. In addition, acetylcholinesterase (AChE) activity was evaluated only after the 96h exposure period. Results indicated that Roundup exposure leads to a reduction in ROS levels in flies exposed for 96h. ACAP levels and gene expression of the antioxidant defense system presented an increase from 24h, while LPO did not show any significant alterations in both exposures periods. AChE activity was not affected following Roundup exposure. Our data suggest that Roundup exposure causes an early activation of the antioxidant defense system in *D. melanogaster*, and this can prevent subsequent damage caused by ROS.

Keywords: Roundup, oxidative stress, gene expression, reactive oxygen species.

1. Introduction

Herbicides represent 40% of total pesticides used worldwide. In particular, glyphosate-based herbicides are among the most employed herbicides for multiple purposes in agriculture, silviculture, horticulture, and domestic uses (US EPA, 2011). Glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine] is a non-selective and post-emergent herbicide compound that interferes directly with plant growth. Its mode of action is via the inhibition of the 5-enolpyruvyl-3shikimate-phosphate-sintase (EPSPS) enzyme that is involved in aromatic amino acid synthesis, which are responsible for essential functions in plants (Stephenson et al., 2006). Although targeted enzyme is present only in microorganisms and plants, adverse effects of glyphosate exposure in animals have been reported in literature (Larsen et al., 2012; Sandrini et al., 2013; Mottier et al., 2015). Nevertheless, this herbicide is employed on a large scale and as several commercial formulations (e.g. Roundup). These formulations may include inert substances recognized as surfactants, in addition to glyphosate. Such formulations have presented higher toxicity when compared with glyphosate by itself (Giesy et al., 2000). Environmental analyses regarding the presence of this herbicide have reported significant levels in areas located close to application sites such as river-water, sediments and soil (Peruzzo et al., 2008). Disturbances in the environment, such as pesticides, commonly affect organisms by inducing a physiological situation referred as oxidative stress (Monserrat et al., 2007). This situation is defined as an imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and the antioxidant defense system, in favor of the former, culminating in the generation of oxidative damage (Sies, 1993). In order to minimize such damage, an organism responds via increasing the activity of its antioxidant defense system, which is comprised of both enzymes and non-enzymatic molecules. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx),

glutathione *S*-transferase (GST), thioredoxin reductase (Trxr) as well as enzymes related to the synthesis of low molecular weight scavengers (such as glutathione (GSH) and ascorbic acid), are among the primary enzymes related to this activity (Halliwell and Gutteridge, 2007). The generation of oxidative stress represents a toxicity mechanism suggested for glyphosate and glyphosate-based herbicides in non-target organisms. It has been demonstrated that exposure to such contaminants can alter antioxidant defense systems as well as induce ROS and oxidative damage in oysters (Mottier et al., 2015), earthworms (Contardo-Jara et al., 2009) and several fish species (Gluszczak et al., 2007; Modesto and Martinez, 2010a; Sinhorin et al., 2014). However a clear pattern of effects cannot be demonstrated, since such parameters vary in a species-specific manner.

Another glyphosate and Roundup toxicity mechanism is the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity (Modesto and Martinez 2010a; Modesto and Martinez 2010b; Sandrini et al., 2013). This enzyme acts in the synaptic cleft and neuromuscular junctions of vertebrates, causing the breakdown of acetylcholine into its base compounds, acetate and choline. Inhibition of AChE results in neurotransmitter accumulation and subsequent interference with the cholinergic pathway, causing muscle hyper stimulation and disturbances in movement. Consequently, behavioral processes such as predator escape and reproduction may be affected by this (Bretaud et al., 2000).

Only a few studies have reported glyphosate and glyphosate-based herbicide effects on insects. Previous literature demonstrates that Roundup may cause a reduction in fertility and fecundity as well as abdominal tumor development in neuropteran species (Schneider et al., 2009). Furthermore, in Diptera, it has been reported that glyphosate causes genotoxicity effects in *Drosophila melanogaster* (Kaya et al., 2000) although the mechanism was not determined. Insects present significant ecological importance in the terrestrial environment as they contribute to flower pollination and

serve as both primary consumers and as a food source for other organisms. Beyond this, drosophilids have been employed as model organisms in a range of studies, facilitating scientific development within systematics, ecology, behavior, genetics, ontogenetic development and molecular biology (Resh and Cardé, 2009). Also, use of insects as a powerful toxicological tool has been previously proposed (Rand et al., 2010). Therefore, investigating the effects of glyphosate on drosophilids may elucidate defense mechanisms and toxicological effects for this species, which could aid in predicting the effects of this herbicide on insects. Thus, the objective of the present study was to analyze the Roundup effects with respect to mortality, oxidative stress parameters, antioxidant defense mechanisms and acetylcholinesterase activity with the fruit-fly *Drosophila melanogaster* as a model organism.

2. Material and Methods

2.1. Model organisms

Drosophila melanogaster harwich stocks were provided by the Santa Maria Federal University – Brazil (Universidade Federal de Santa Maria – UFSM). Stocks were then maintained in the Terrestrial Animal Room at the Federal University of Rio Grande – Brazil (Universidade Federal do Rio Grande – FURG). Flies were reared at 25°C in a 12:12h light dark cycle, in flasks (300ml) containing a conventional *Drosophila* medium composed of banana, corn flour, and yeast supplemented with the mold inhibitor nipagin.

2.2. Toxicological Tests

Experimental procedures followed the protocol described by Abolaji et al. (2014). The Roundup® (Monsanto) was employed. This herbicide includes in its

formulation glyphosate (CAS number 1071-83-6) at a final concentration of 360g/L, along with other inert ingredients. Four different concentrations were tested (1.0 mg/L, 2.0 mg/L, 5.0 mg/L and 10mg/L), which are equivalent to glyphosate concentration present in the commercial formulation. Herbicide was added directly during the preparation of the exposure media and transferred to 30 ml vials. The exposure media was composed of water, yeast extract, sugar, milk powder, agar and nipagin. Newly reared 1-3 day old flies were grouped into sets of 30 (15 males and 15 females) and placed into flasks containing the experimental media (control and Roundup). Each treatment consisted of at least three replicates. The number of dead flies was registered every day. The media was not renewed until the end of both exposures times.

2.3. Oxidative Stress Markers

Concerning reactive oxygen species (ROS) and antioxidant capacity against peroxy radicals, animals were sacrificed in ice and then separated in pools of 15 animals per sample (n=3-5 per experimental group). In each sample it was added 200 μ L of cold buffer (Tris HCl 10mM) with pH adjusted for 7.2. The extracts were centrifuged (2000 x g, 20 min at 4 °C) and the supernatant employed for the subsequent analyses. The protein content was measured according to the Bradford (1976) method and bovine serum albumin as employed as standard.

Reactive oxygen species (ROS) were determined via the use of 2,7-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA – Molecular Probes) following the protocol of Myhre and Fonnum (2011). Fluorescence area was calculated via integration analysis of arbitrary fluorescence units per unit of time. Since protein content varied between samples (data not show), results were presented as fluorescence area/animal and expressed relative to the control group.

Antioxidant capacity against peroxyradicals (ACAP) was determined according to the methodology of Amado et al. (2009) employing the thermal decomposition (37°C) of 2,2'-azobis (2 methylpropionamide) dihydrochloride (SIGMA - 4 mM). The ACAP values were obtained by the difference in ROS area in the presence and absence of ABAP and standardized by the fluorescence registered without ABAP. The results were presented as relative 1/ACAP level/animal. The data were expressed relative to the control group values.

Concerning lipid peroxidation, sample pools of 15 animals were homogenized in 100µl of cold methanol following centrifugation at 1000 x g, for 5 min at 4 °C. The supernatant from this centrifugation was then used for analyses. The assay followed the protocol of Jiang et al. (1992) employing the xylenol orange (SIGMA) and cumene hydroperoxide (SIGMA) as standard. Results were expressed as nmoles of CHP/animal.

2.4. Acetylcholinesterase activity (AChE)

At the end of the experimental period, animals were sacrificed and kept on ice. Pools of 15 flies per sample (n=3-5 pools) were prepared. Initially, samples were homogenized in cold sodium phosphate buffer (10mM) (Melanson et al., 1985), and centrifuged (9000 x g; 30min; 4 °C). The resulting supernatant was used as the enzyme source (cytosolic fraction). The pellet from the first centrifugation was then homogenized in cold sodium phosphate buffer with Triton X100 added at a final concentration of 0.5%. The homogenate was centrifuged (9000 x g; 30min; 4 °C) and the supernatant from this centrifugation was employed as the enzyme source for biochemical analysis (membrane fraction) as described by Sandrini et al. (2013). Total protein content from homogenates was measured by the Bradford method. Acetylcholinesterase activity was analyzed spectrophotometrically according to Ellman

et al. (1961), employing acetylthiocholine iodide (SIGMA - 30mM) as substrate. Results were expressed as mmoles/animal/min.

2.5. Gene expression analysis

After the exposure period (24 and 96h) pools composed of 15 animals per sample were prepared (n=5). The TRIZOL reagent (Invitrogen) was used in accordance with procedures following the manufacturer's protocol to extract RNA from samples. RNA integrity was checked via electrophoresis gel analysis (agarose 1%). Quantification was performed spectrophotometrically (260 and 280nm) and RNA from different samples was diluted in order to standardize concentrations, which were 0.0112 µg/µl at 24h and 0.0168 µg/µl at 96h. RNA was used for cDNA confection employing the High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), following the manufacturers' protocol. cDNA was used for Real-Time PCR analysis. The GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega) was employed. The following genes were analyzed: erythroid nuclear factor-2 (*nrf-2*), kelch-like ECH-associated protein 1 (*keap1*), superoxide dismutase isoform 1 (*sod1*) and isoform 2 (*sod2*), catalase (*cat*), immune regulated catalase (*catir*), glutamate cysteine ligase catalytic (*gclc*) and modulator (*gclm*) subunits, glutathione synthetase (*gs*), thioredoxin (*trxt*), thioredoxin reductase isoform 1 (*trxr1*) and isoform 2 (*trxr2*). The ribosomal protein 49 (*rp49*), tubulin (*tub*) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) were tested for stability in order to identify as housekeeping genes. Stability was tested with geNorm software (Vandesompele et al., 2002). The *rp49* gene was excluded as a housekeeping gene as it presented a low stability in its expression between samples. The gene expression was calculated employing the delta Ct method and expressed as fold induction compared with the control group.

Table 1. Sequences of RT-PCR primers

Gene		Sequence
Keap1	For	5'CCAGAAAGGCACAGCAGGCATC3'
	Rev	5'CGCCAGCTCCAAGGGGTGTGT3'
Nrf-2	For	5'CGGCGACAAATATCATCCTT3'
	Rev	5' CCAACTTCCTCAAGGAGCAG3'
SOD1	For	5'GAACTCGTGCACGTGGAATC3'
	Rev	5'AATTAACGGCGATGCCAAGG3'
SOD2	For	5'CTGGTGGTGCTTCTGGTGAT3'
	Rev	5'CAAACCTGCAAGCCTGGCG3'
CAT	For	5'TCTGCTCCACCTCAGCAAAG3'
	Rev	5'CAACCCCTTCGATGTCACCA3'
CATIR	For	5'GTTGAGCGTGTGAAAGGCTG3'
	Rev	5'TAGGCAAAGCGACTGGAGG3'
GCLm	For	5'CCTGCTGACGTTGGAATCCT3'
	Rev	5'GTGGACAATGTGGTGTGGC3'
GCLc	For	5'CACCACGGAATCCTGCTTGT3'
	Rev	5'GACACCGATACGCATTGCAC3'
GS	For	5' TGACATTGGGACGGGGAAAA3'
	Rev	5'TTCCACCTGTTGCCTCAGTC3'
Trxr1	For	5'CACCTCGATCTCATCGGCTC3'
	Rev	5'GTTTTACGCCCCTGGAGTA3'
Trxr2	For	5'CAACAGGAGGCTGGTGTAGG3'
	Rev	5'CTGAACACGGTGGGAATCCA3'
Trxt	For	5' GTTAATGAGGTGTCCGCCCA 3'
	Rev	5' TGTTGAATGATGAGATATGTTGTCG 3'
GAPDH	For	5'GCTCCTCAATGGTTTTTCCA3'
	Rev	5'ATGGAGATGATTCGCTTCGT3'
Tubulin	For	5'ATCCCCAACAACGTGAAGAC3'
	Rev	5'ACCAATGCAAGAAAGCCTTG3'
RP49	For	5'GCGGGTGCCTTGTTCGATCC3'
	Rev	5'CCAAGGACTTCATCCGCCACC3'

2.6. Fly weights

At the end of the 96h exposure period, animals were individually weighed using precision equipment. The results were expressed in mg. The number of animals varied between sexes and experimental group: control group = 33 males and 33 females; Roundup 1.0 mg/L = 17 males and 20 females; Roundup 2.0 mg/L= 43 males and 31 females; Roundup 5.0 mg/L = 32 males and 24 females.

2.7. Statistical analysis

One way Anova and Newman-Keuls post hoc tests ($p < 0.05$) were performed. Non-parametric tests of multiple comparisons followed by the post hoc of Kruskal-Wallis were used when the pre-requisites of data normality and variance of homogeneity were not achieved.

3. Results

3.1. Mortality

Concerning mortality rate, an increase in mortality at the 10.0 mg/L treatment relative to the control ($p = 0.0001$) after 96h of exposure was observed (Fig. 1). Due to this reason, this exposure group was eliminated for further analysis.

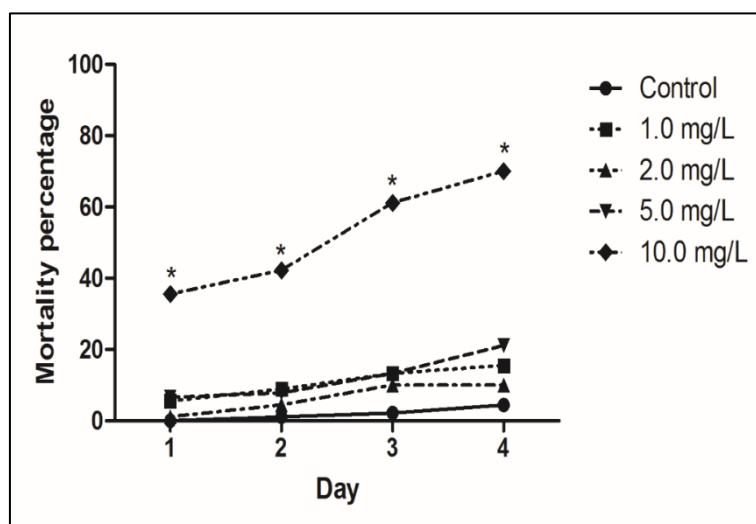


Figure 1: Mortality of *D. melanogaster* after 4 days of exposure to Roundup treatments 0.0, 1.0, 2.0, 5.0 and 10.0 mg/L. Asterisks represents statistical difference between the control and Roundup exposure groups. Assays were conducted in triplicate for each treatment with 30 flies per replicate.

3.2. Oxidative Stress Markers

Since protein levels in tissue extracts varied according to Roundup treatment, the results from biochemical analyses were normalized by the number of animals employed for each pool. Reactive oxygen species levels decreased in all tested Roundup concentrations after 24h (Fig. 2A). Differently, data related to Roundup exposure for

96h did show any significant differences between Roundup exposed groups and control groups (Fig. 2D). Considering the antioxidant capacity against peroxy radicals, a significant increase ($p < 0.05$) in ACAP levels for animals exposed to the Roundup highest concentration (5.0 mg/L) was observed when compared with all other groups in both exposure periods (Fig. 2B and 2E). No difference in lipid peroxidation was observed between experimental groups in both exposure periods ($p > 0.05$) (Fig. 2C and 2F).

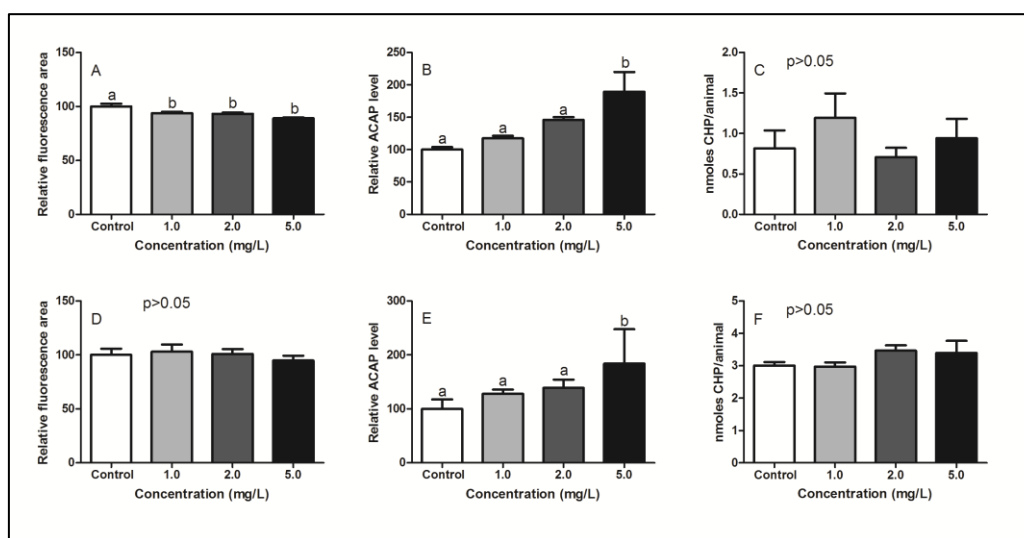


Figure 2. Reactive oxygen species generation (ROS), antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) and lipid peroxidation (LPO) in *D. melanogaster* after exposure to the Roundup herbicide for 24h and 96h. Data from (A) ROS 24h, (B) ACAP 24h, (C) LPO 24h, (D) ROS 96h, (E) ACAP 96h and (F) LPO 96h were presented as means \pm standard error. Different letters represent significant differences between treatments in the same experimental group ($p < 0.05$).

3.3. Gene expression analysis

The genes *gapdh* and *tubulin* presented adequate stability, and for this reason were employed as housekeeping genes in all analyses. The gene expression analysis focused on the effects of Roundup on proteins and enzymes within the antioxidant defense system. In general, a significant increase in gene expression was observed in both experimental periods for animals exposed to higher Roundup concentration (5.0 mg/L). A significant induction of *nrf-2* gene expression in animals exposed to Roundup

5.0 mg/L ($p < 0.05$) after 24 and 96h exposure periods was observed in comparison to all other experimental groups (Fig. 3A and 3B). Gene expression was induced 1.64 times and 6.75 times greater after 24 and 96h, respectively, when compared with the control group. A significant induction of *keap-1* gene expression ($p < 0.05$) in animals exposed to the highest treatment concentration after 24h (Fig. 3A) relative to all experimental groups was observed. A mRNA expression 1.75 times greater was observed in comparison to the control group.

The *cat* gene was significantly induced following exposure to 5.0 mg/L of Roundup when compared with all experimental groups after 24h ($p < 0.05$). This represents an mRNA expression 3.2 times greater relative to control group animals (Fig. 3A). The alternate isoform of this gene (*catir*) was induced in both experimental periods for animals exposed to the highest Roundup concentration ($p < 0.05$). This induction, relative to control group animals, was 1.94 and 3.27 times greater for 24h and 96h periods (Fig. 3A and 3B), respectively. Superoxide dismutase isoforms, *sod1* and *sod2*, were altered after 24h Roundup exposure. The *sod1* presented a 0.71 times lower expression in animals exposed to 2.0 mg/L in comparison to control group animals. The *sod2* isoform presented a 2.4 times higher expression in animals exposed to 5.0 mg/L Roundup concentration relative to control group animals (Fig. 3).

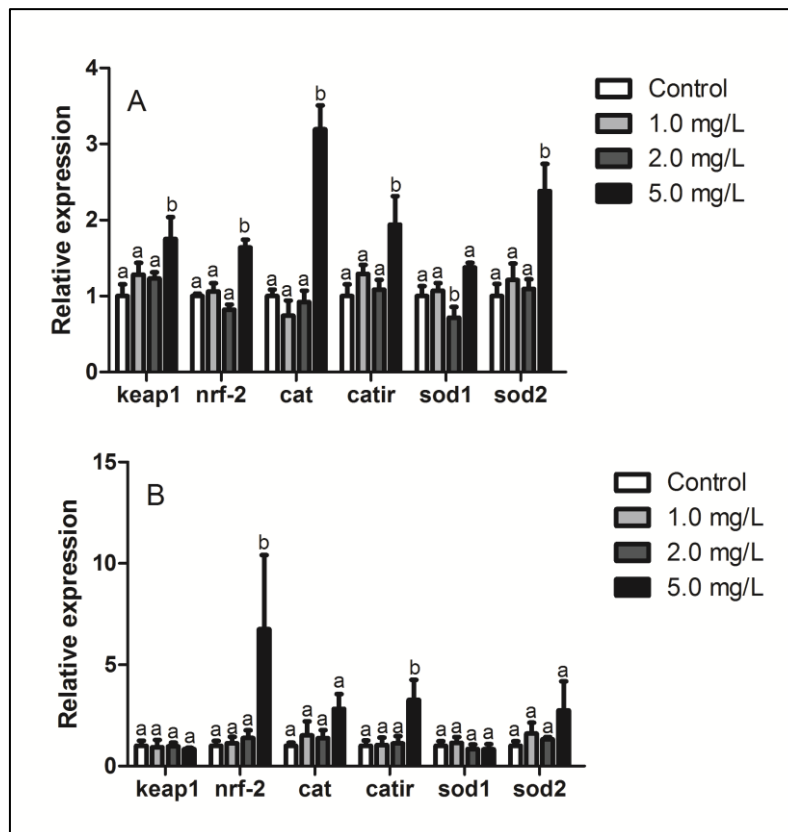


Figure 3. *keap1*, *nrf-2*, catalase (*cat*, *catir*) and superoxide dismutase genes (*sod1*, *sod2*) gene expression in *D. melanogaster* after Roundup exposure for 24 (A) and 96h (B). Data were expressed as mean \pm standard error. For control, 1.0 mg/L and 2.0 mg/L groups n= 5; and for 5 mg/L group n=3. Different letters represent significant differences between groups of the same experimental period ($p < 0.05$).

An induction in the gene expression of thioredoxin and both isoforms of thioredoxin reductase was observed in animals exposed to the highest Roundup concentration. Induction of *trxt* and *trxr1* expression was observed in both experimental periods when compared with the other groups ($p < 0.05$). This induction represents an mRNA expression 3.56 and 13.98 times greater for *trxt* and 1.6 and 2.0 times greater for *trxr1* when compared to the control group (Fig. 4A and 4B). The *trxr2* gene presented an expression 3.2 times greater following 24h exposure to Roundup 5.0 mg/L (Fig. 4A).

Gene expression of glutathione synthesis was evaluated. A significant induction ($p < 0.05$) of both *gclc* and *gclm* following Roundup exposure of 5.0 mg/L after 24h was

observed. These results represent an expression 4.14 and 2.7 times greater when compared to control group animals (Fig. 4A). The *gs* gene was induced in both experimental periods in animals exposed to higher treatment concentrations ($p < 0.05$).

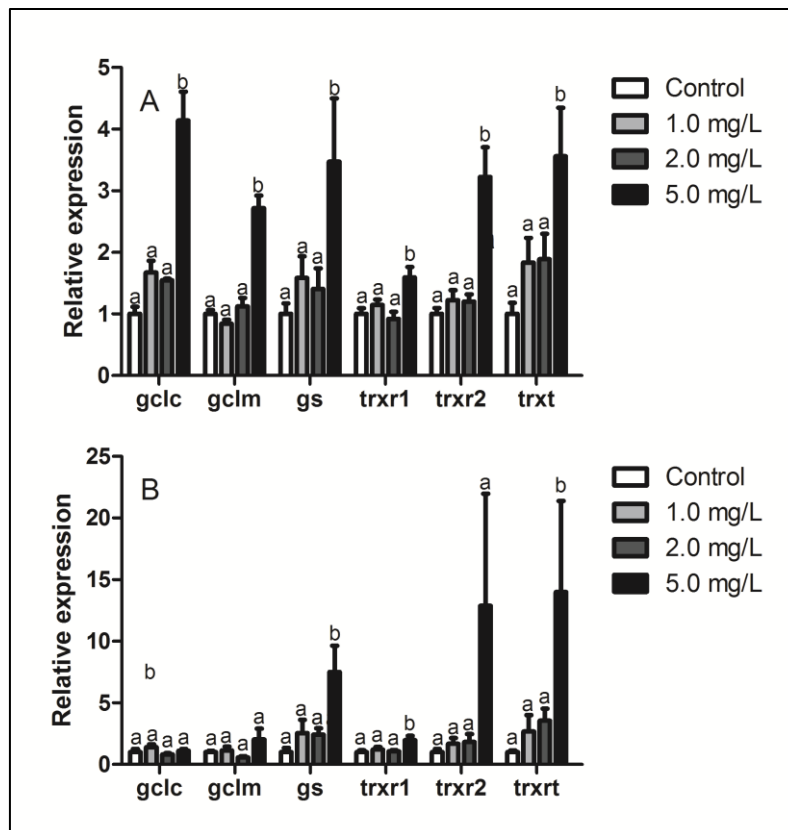


Figure 4. Gene expression of thioredoxin (*trxt*), thioredoxin reductase isoforms 1 (*trxr1*) and 2 (*trxr2*), glutamate cysteine ligase catalytic subunit (*gclc*) and modulatory subunit (*gclm*) and glutathione synthetase (*gs*) in *D. melanogaster* exposed to Roundup herbicide for 24h (A) e 96h (B). Data represents mean fold induction \pm standard error. For control, 1.0 mg/L and 2.0 mg/L groups $n = 5$; and for 5 mg/L group $n = 3$. Different letters represents significant differences between experimental groups ($p < 0.05$).

3.4. Acetylcholinesterase activity

No significant difference ($p > 0.05$) in acetylcholinesterase activity was observed in both fractions (soluble and membrane) of organisms following Roundup herbicide exposure (Fig. 5).

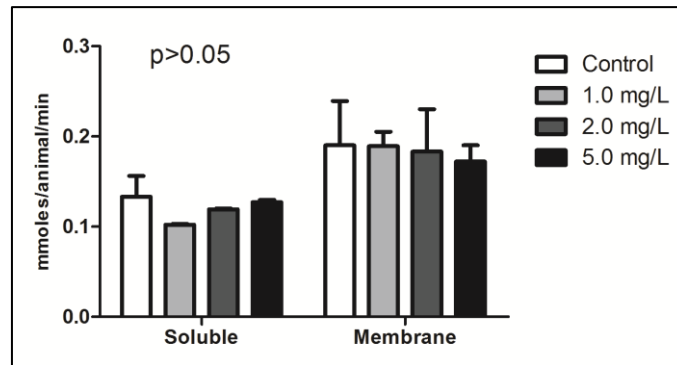


Figure 5: Acetylcholinesterase activity of *D. melanogaster* after Roundup exposure for 96h. Data were expressed as means \pm standard error. For control, 1.0mg/L and 2.0mg/L groups n= 5; and for 5.0 mg/L group n=3.

3.5. Fly weights

Females presented a concentration dependent reduction in weight with respect to Roundup treatment following exposure for 96h (Fig. 6). The greatest weight loss was observed in female flies exposed to the highest Roundup concentration. Male flies did not present any significant difference in weight after Roundup exposure ($p>0.05$).

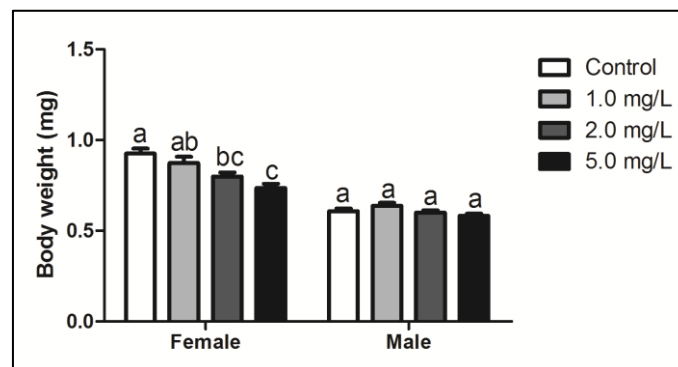


Figure 6. Body weight (mg) of *D. melanogaster* following Roundup exposure for 96h. Data represent mean \pm standart error. N= 17-43 animals per sex/group. Different letters represent significant differences between experimental groups ($p<0.05$).

4. Discussion

4.1. Mortality

Studies have demonstrated adverse effects due to glyphosate or glyphosate-based herbicide exposure in non-target organisms, including rats (Larsen et al., 2012), fish (Lopes et al., 2014), oysters (Mottier et al., 2015), earthworms (Contardo-Jara et al., 2009), spiders (Benamú et al., 2010) and insects (Schneider et al., 2009). Effects varied according to species, type of herbicide and range of herbicide concentration. Considering this, Relyea (2005) observed a significant reduction in viability of amphibian populations exposed to Roundup, such that mortality rates were observed as 90% in animals exposed to 3.8 mg/L. The LC50 96h to the fish *Prochilodus lineatus* was 13.69mg/L (Langiano and Martinez, 2008). In this respect, the present study demonstrated acute mortality of *D. melanogaster* with exposure to higher Roundup concentrations. Animals exposed to 10.0 mg/L presented significant mortality after 96h, reaching mortality rates of approximately 70%. This concentration is in the same range as those observed for fish species, representing similar sensitivity. Due to the significant mortality observed in exposure groups of 10.0 mg/L this group was discarded from the analysis.

4.2. Oxidative Stress Markers

Alteration in ROS production after Roundup exposure has been previously attributed to mitochondrial dysfunctions. Peixoto (2005) relates that, in general, mitochondrial bioenergetics is affected after *in vitro* mitochondrial exposure to Roundup. It is stated that the herbicide formulation leads to a 91% reduction in ATP synthase activity, leading to impairment in ATP production. Further, the same author describes a reduction in mitochondrial membrane potential following Roundup incubation. Therefore, such mitochondrial dysfunctions may be related directly with alterations to oxidative balance and ROS levels. In this sense, it is well established that organisms may enhance antioxidant defense systems to cope with stressor situations

such as alterations in ROS production (Halliwell and Gutteridge, 2007). An example of this circumstance was observed in the present study, where an increase in ACAP levels across both experimental periods was observed. Considering this, the evaluation of total capacity against oxyradicals is advantageous, since aggregates in one parameter the entire capacity of a system to mitigate specific ROS damage such as that incurred by peroxy radicals (Regoli et al., 2002). Other studies have demonstrated that when fish species were exposed to glyphosate or glyphosate-based herbicides alterations in the antioxidant defense system were induced (Langiano and Martinez, 2008; Sinhorin et al.; 2014; Nwani et al., 2013). It has been demonstrated that Roundup exposure elicits an induction in antioxidant enzyme activity (Langiano and Martinez, 2008) as well as an increase in non-enzymatic ROS scavengers such as ascorbic acid (Sinhorin et al., 2014). With respect to ACAP analysis, only a few studies have employed this technique to evaluate Roundup effects. Harayashiki et al. (2013) did not observe any ACAP level differences in sperm from the fish *Poecilia vivipara* when exposed to Roundup. This lack of response may have been due to the low Roundup concentrations employed (130 and 700 µg/L) or due to a detoxification system previously activated that mitigated the situation.

A combination of previous results suggests that flies exposed to Roundup respond via a strong induction of the antioxidant defense system. Since this enhancement was observed in the present study, further analysis of oxidative damage in lipids was analyzed. No significant alteration in lipid peroxidation was observed following Roundup treatment. These findings corroborate the idea that the induction in ACAP levels was sufficient to avoid redox state alteration due to Roundup exposure. Such results are contrary to previous studies regarding other animal species exposed to Roundup. An increase in lipid damage in rats concomitant to a reduction in GSH levels

has been observed in previous literature (El-Shenawy, 2009). Further, in the fish surubim, an increase in damage to proteins and lipids has been observed (Sinhorin et al., 2014). Finally, Modesto and Martinez (2010a) reported an increase in lipid peroxidation in the fish species *Prochilodus lineatus* after 6h exposure. Considering this prior information, it is clear that the present study observed an increase in ACAP capable of preventing or repairing possible oxidative damage in *D. melanogaster* tissues.

4.3. Gene expression

The induction of the antioxidant defense system gene expression in a pro-oxidant situation occurs in part by the action of the transcriptional mechanisms by the NF-E2-related factor 2 (NRF-2). This transcription factor acts on the *cis*-acting element called the antioxidant responsive element (ARE) present in the promoter regions of cytoprotective genes. The regulation of NRF-2 action is governed by its ligation to the repressor Kelch like-ECH-associated protein 1 (KEAP-1). Ligation to KEAP-1 maintains NRF-2 in the cytoplasm, avoiding accumulation in the nucleus (Nguyen et al., 2004). Besides the increment of antioxidant defense system genes, the expression of *nrf-2* is self regulated. In fact, *nrf-2* induction has been previously observed in biological systems exposed to herbicides (Narasimhan et al., 2014; Osburn et al., 2006). These previous results corroborate observations in the present study, whereby an induction of *nrf-2* expression was observed in flies exposed to a pro-oxidant situation (Roundup exposure), which caused an initial induction of the antioxidant defense system.

Since flies exposed to Roundup presented an imbalance in ROS/ACAP levels and *nrf-2* gene expression, the gene expression of key components of the antioxidant systems were evaluated. Interestingly, an induction of all genes analyzed in flies exposed to the higher herbicide concentration was observed after the first 24h. This result suggests that the antioxidant defense system is being activated in an earlier way to

cope with the pro-oxidant situation. This induction was also observed for some genes in *D. melanogaster* after 96h.

Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) (Sies, 1993) represent important enzymes to be considered. The present study observed that Roundup exposure caused an induction in gene expression in both CAT (*cat* and *catir*) and SOD isoforms (*sod1* and *sod2*) analyzed in the first 24h and a later induction for the *catir* gene. These results are in agreement with data from Contardo-Jara et al. (2009) that report an increase of SOD and CAT activity in earthworms exposed to a glyphosate-based herbicide, Roundup Ultra. This data suggests an earlier increase of the antioxidant defense system in this animal to cope with the oxidative stress situation.

Another antioxidant mechanism employed to cope with ROS generation is the protein S-glutathionylation, a reversible process in which the non-enzymatic antioxidant glutathione (GSH) reacts with sulphidryl groups of proteins (Dalle-Donne et al., 2007). When physiological conditions stabilize, the process of deglutathionylation occurs, which is regulated by thioredoxin (TrxT) and thioredoxin reductase (Trxr). Such components of this defense mechanism were induced after herbicide exposure for 24h. These genes appear to be responsive to stressful situations in drosophilids. The use of Trxr expression as a parameter of antioxidant defense was proposed by Abolaji et al. (2015), in which an alteration to the pattern of this expression in *D. melanogaster* exposed to organic compounds was observed. However, this study found a reduction in *trxr1* gene expression associated with a disruption in the flies' antioxidant capacity.

In addition, the expression of genes related to GSH synthesis was analyzed. The rate-limiting step in GSH synthesis is the activity of the enzyme glutamate cysteine ligase (GCL). GCL is comprised of both catalytic (GCLC) and modulatory (GCLM) subunits (White et al., 2003). The last stage of GSH synthesis is catalyzed by the

glutathione synthetase enzyme (GS). Observations indicated that expression of the three genes were up-regulated in flies in response to Roundup exposure (5.0 mg/L) after 24h of treatment. Previous evidence corroborates these findings, indicating that the induction of GSH synthesis would be a first response to a pro-oxidant situation. When fish species were exposed to Roundup for 96h, an induction of total sulphhydryl content was observed (Sinhorin et al., 2014). A similar response was observed in a previous study, when the exposure of rats to water containing Roundup lead to an induction of GSH content associated with a reduction in oxidative damage in lipids (Larsen et al., 2012). For this reason, it is suggested in the present study that an induction of GSH synthesis mechanisms would represent an increase of overall GSH synthesis in order to cope with a pro-oxidant situation caused by Roundup exposure.

4.4. Acetylcholinesterase activity

Previous literature has demonstrated that glyphosate and Roundup may cause a reduction in acetylcholinesterase (AChE) enzyme activity in tissues from several animal species (Gluszczak et al., 2007; Sandrini et al., 2013; Braz-Mota et al., 2015). Contrary to vertebrates, the neuromuscular junctions in insects are not stimulated by acetylcholine, and AChE is absent from this structure (Resh and Cardé, 2009). However, this system does play a pivotal role in neurons in other parts of the nervous system. In the present study no differences were observed in AChE activity of flies following exposure to Roundup. Similar results were also observed in the fish *Poecilia vivipara* Roundup exposure (Harayashiki et al., 2013). Such differences in response among organisms would suggest that AChE sensitivity is in fact species-specific. In this sense, Sandrini et al. (2013) observed that *in vitro* AChE inhibition for mollusks occurs in concentrations almost ten times lower than that for fish.

4.5. Fly weights

Weight reduction was another variable effect observed in flies exposed to Roundup. Such variation would occur by different mechanisms that would require further investigation. However since only females experienced this result in significance, a possible explanation could be related to an impact on the gonads, as female ovarioles represent a significant mass compared to total body weight of an individual. Ovarioles maintain a capacity to carry large amounts of eggs in different developmental stages, and any factor that stimulates egg laying or a regression in ovariole development would lead to a decrease in body weight. Further, previous literature has reported that glyphosate and commercial formulations may generate an endocrine disruption (Gasnier et al., 2009; Walsh et al., 2014). In this sense, the production of ecdysterol hormones like ecdysone and processes regulated by these would affect *D. melanogaster* metabolism. Another possibility from this is that some factor would lead to a reduction in general food intake, leading to weight reduction. As further evidence for this, spiders exposed to Glifoglex presented a significant reduction in prey consumption, which in turn would be related to metabolism alterations after exposure to the herbicide (Benamú et al., 2010).

4.6. Conclusion

In conclusion, Roundup exposure is capable of inducing an oxidative imbalance in *Drosophila melanogaster* tissues, leading to a potent induction of antioxidant systems, including the expression of genes related to this antioxidant defense system.

Acknowledgements

Aguiar LM is a graduate students fellow from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). The authors would like to thank the

financial support from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - process 480919/2013-5).

References

- Abolaji, A.O., Kamdemb, J.P., Lugokenski, T.H., Farombi, E.O., Souza, D.O., Loreto, E.L.S., Rocha, J.B.T., 2015. Ovotoxicants 4-vinylcyclohexene 1,2-monoepoxide and 4-vinylcyclohexene diepoxide disrupt redox status and modify different electrophile sensitive target enzymes and genes in *Drosophila melanogaster*. *Redox Biology* 5, 328–339.
- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R., Yunes, J.S., Monserrat, J.M., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the total environment*, 407, 2115- 2123.
- Benamú, M.A., Schneider, M.I., Sánchez, N.E., Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae), in laboratory *Chemosphere*, 78, 871–876.
- Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Braz-Mota, S., Sadauskas-Henrique, H., Duarte, R.M., Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., 2015. Roundup exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere*, 135, 53–60.
- Brethead, S., Toutant, J.P., Saglio, P., 2000. Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47, 117-124.

- Contardo-Jara, V., Klingelmann, E., Wiegand, C., 2009. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution*, 157, 57–63.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R., Milzani, A., 2007. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radical Biology & Medicine* 43, 883–898.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95.
- El-Shenawy, N.S., 2009. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28, 379–385.
- Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M.E., Séralini, G.E., 2009. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262 184–191.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Environmental Contaminant Toxicology*, 167, 35-120.
- Gluszczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C.C., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 146, 519–524.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press; 963 pp.
- Harayashiki, C.A.Y., Varela Junior, A.S., Machado, A.A.S., Cabrerad, L.C., Primel, E.G., Bianchini, A., Corcini, C.D., 2013. Toxic effects of the herbicide Roundup

- in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquatic Toxicology*, 142–143, 176–184.
- Jiang, Z.Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous Ion Oxidation in the Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxide in Low Density Lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 202,384-389.
- Kaya, B., Creus, A., Yanikoğlu, A., Cabré, O., Marcos, R., 2000. Use of the *Drosophila* Wing Spot Test in the Genotoxicity Testing of Different Herbicides. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 36, 40–46.
- Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 147, 222–231.
- Larsen, K., Najle, R., Lifschitz, A., Virkel, G., 2012. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: Glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine . *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34, 811–818.
- Lopes, F.M., Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Silva, A.C., Guazzelli, V.G., Tavares, G., Rosa, C.E., 2014. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 155, 322–326.
- Melanson, S.W., Yun, C.H., Pezzementi, M.L., Pezzementi, L., 1985. Characterization of acetylcholinesterase activity from *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 81(1), 87-96.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010a. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81, 781–787.

- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010b. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294–299.
- Monserrat, J.M., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Lima, J.V., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 146, 221–234.
- Mottier, A., Séguin, A., Devos, A., Le Pabic, C., Voiseux, C., Lebel, J.M., Serpentine, A., Fievet, B., Costil, K., 2015. Effects of subchronic exposure to glyphosate in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): From molecular to individual levels. *Marine Pollution Bulletin* 95, 665–677.
- Myhre, O., Fonnum, F., 2001. The effect of aliphatic, naphthenic, and aromatic hydrocarbons on production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in rat brain synaptosome fraction: the involvement of calcium, nitric oxide synthase, mitochondria, and phospholipase A. *Biochemical Pharmacology*, 62, 119–128.
- Narasimhan, M., Riar, A.K., Rathinam, M.L., Vedpathak, D., Henderson, G., Mahimainathan, L., Wu, B., Li, M.F., Qiu, Q.M., Lu, Z.Q., 2014. Hydrogen peroxide responsive miR153 targets Nrf2/ARE cytoprotection in paraquat induced dopaminergic neurotoxicity. *Toxicology Letters*, 228, 179–191.
- Nguyen, T., Yang, C.S., Pickett, C.B., 2004. The pathways and molecular mechanisms regulating NRF-2 activation in response to chemical stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(4), 433–441.
- Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwahab, B., Lakrab, W.S., 2013. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in

- freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36, 539–547.
- Osburn, W.O., Wakabayashi, N., Misra, V., Nilles, T., Biswal, S., Trush, M.A., Kensler, T.W., 2006. Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 454, 7–15.
- Peixoto, F., 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere*, 61, 1115–1122.
- Peruzzo, P.J., Porta, A.A., Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, 156, 61-66.
- Rand, M.D., 2010. Drosophotoxicology: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. Review article . *Neurotoxicology and Teratology*, 32, 74–83.
- Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Winston, G.W., 2002. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research*, 54, 419–423.
- Relyea, R.A., 2005. The letal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*, 15(4), 1118–1124.
- Resh, V.H., Cardé, R.T., 2009. *Encyclopedia of insects*. Second edition .Copyright © Elsevier, Inc. All rights reserved.
- Ross, M.A., Childs, D.J., 1996. Herbicide mode-of- action summary. Cooperative Extension Service Publication WS-23, Purdue University, West Lafayette, IN. Disponível em: < <https://www.extension.purdue.edu/extmedia/ws/ws-23-w.html>>. Acess in 01 aug 2015.

- Sandrini, J.Z., Rola, R.C., Lopes, F.M., Buffona, H.F., Freitas, M.M., Martins, C.M.G., Rosa, C.E., 2013. Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: In vitro studies. *Aquatic Toxicology*, 130–131, 171–173.
- Schneider, M.I., Sanchez, N., Pineda, S., Chi, H., Ronco, A., 2009. Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach. *Chemosphere*, 76, 1451-1455.
- Sies, H., 1993. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215, 213-219.
- Sinhorin, V.D.G., Sinhorin, A.P., Teixeira, J.M.S., Miléski, K.M.L., Hansen, P.C., Moreira, P.S.A., Kawashita, N.H., Baviera, A.M., Loro, V.L., 2014. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106, 181–187.
- Stephenson, G.R., Ferris, I.G., Hollnad, P.T., Nordberg, M., 2006. Glossary of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*, 78, 11, 2075-2154.
- US EPA 2011. United States Environmental Protection Agency. Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. Washington, DC.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3 (7): RESEARCH0034.

Walsh, L.P., McCormick, C., Martin, C., Stoccol, D.M., 2000. Roundup Inhibits Steroidogenesis by Disrupting Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Protein Expression. *Environmental Health Perspectives*, 108(8), 769-776.

White, C.C., Viernes, H., Kreysa, C.M., Botta, D., Kavanagh, T.J., 2003. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. *Analytical Biochemistry*, 318, 175-180.

Discussão Geral da Dissertação

Estudos mostram efeitos danosos aos organismos devido à exposição ao glifosato ou ao herbicida Roundup em animais, ou seja, nos organismos não alvo, quando diferentes faixas de concentração são aplicadas como, por exemplo, em ratos (0,7 – 7,0 mg/L) (Larsen e al. 2012), peixes (5 e 10 mg/L) (Lopes et al. 2014), ostras (0,1, 1 e 100µg/L) (Mottier et al. 2015), minhocas (0,05 a 5 mg/L) (Contardo-Jara et al. 2009), aranhas (192 mg/L) (Benamú et al. 2010) e insetos (192 mg/L) (Schneider et al. 2009).

A toxicidade do Roundup é bastante variável de organismo para organismo. Relyea (2005) visualizou uma redução expressiva em diferentes populações de anfíbios expostos à concentração de 3,8 mg/L, onde a taxa de mortalidade atingiu cerca de 90%. Já para o peixe *Prochilodus lineatus* foi relatada uma CL₅₀ para a concentração de 13,69 mg/L (Langiano e Martinez, 2008). No presente estudo foi demonstrado que em concentrações elevadas este herbicida também pode ser letal a este grupo de organismos. Para a exposição ao Roundup, na concentração de 10 mg/L foi visto um aumento significativo na mortalidade dos indivíduos expostos, onde após o 4º dia de exposição houve um percentual de cerca de 70% de mortalidade. Essa concentração está dentro da faixa que foi observada para peixes, representando similar sensibilidade.

Alterações na produção de espécies ativas de oxigênio (EAO) após a exposição ao Roundup têm sido atribuídas a disfunções mitocondriais. O oxigênio molecular (O₂) é essencial para a sobrevivência de todos os organismos aeróbicos, devido à dependência da geração de energia através da fosforilação oxidativa. Esse último é um processo no qual a energia advinda dos processos de oxirredução de compostos orgânicos é convertida em ATP através do transporte de elétrons (pela via mitocondrial), o qual tem o oxigênio comoceptor final de elétrons. Essa e outras

reações de transferência de elétrons podem ocasionar a formação de metabólitos de oxigênio, os quais são parcialmente reduzidos e altamente reativos, as EAO (Thannickal e Fanburg, 2000). Dentro desse panorama sabe-se que a exposição à xenobióticos pode resultar no desbalanço da geração de oxirradicais de forma direta pelos processos de detoxificação ou indiretamente por alteração do metabolismo (Wells et al., 1997). Tal efeito geral de desbalanço nos níveis de EAO foi observado no presente estudo em *D. melanogaster* após a exposição à diferentes concentrações de Roundup. Observou-se uma redução nos níveis dessas moléculas para os animais expostos à todas as concentrações para o tempo de 24h. Tal efeito do Roundup tem sido atribuído a sua capacidade de causar disfunções mitocondriais. Peixoto (2005) relatou que, de maneira geral, a bioenergética da mitocôndria é afetada após a exposição ao Roundup, onde ressalta-se uma diminuição de 91% na atividade da ATP sintetase o que resulta em um distúrbio na geração de energia do organismo. Adicionalmente já foi visto que a exposição ao Glifosato II Atanor (10 mg/L) acarreta em uma redução da carga energética dos adenilatos (onde se incluem as moléculas de ATP, ADP e AMP) no peixe *Odontesthes bonariensis* (Menéndez-Helman et al., 2015). Esses dados corroboram com a diminuição da atividade mitocondrial vista por Peixoto (2005) e reforçam essa alteração no balanço oxidativo e níveis de EAO.

Para lidar com situações de estresse, os organismos desenvolveram um sistema de defesa antioxidante. No presente estudo foi verificado um aumento na capacidade antioxidante contra peroxirradicais nos animais expostos à concentração de 5,0 mg/L em ambos os tempos experimentais. Isso representa uma indução do mecanismo de defesa do organismo frente à exposição ao contaminante, tendo em vista que os animais expostos a esta concentração apresentaram um incremento na geração de EAO. Desta forma, este incremento da ACAP poderia representar uma tentativa de manutenção do

balanço oxidativo (EAO/ACAP). Levando-se em consideração a análise da capacidade antioxidante total, poucos trabalhos têm avaliado através desta abordagem os efeitos do Roundup. No trabalho de, Harayashiki et al. (2013) não foram vistas diferenças significativas em ACAP no esperma de peixes que foram expostos ao Roundup. Tal ausência de resposta pode ser devido às baixas concentrações utilizadas de Roundup (130 e 700 µg/L) ou ainda por um sistema de detoxificação que está sendo previamente ativado e está conseguindo neutralizar/eliminar o contaminante.

Quando os organismos enfrentam situações adversas, como um desbalanço nos níveis de EAO, muitos antioxidantes de baixo peso molecular e enzimas atuam para neutralizar essas substâncias tóxicas e seus metabólitos, e para isso precisam ter sua quantidade elevada. A indução dessas substâncias antioxidantes ocorre em grande parte através da indução da transcrição pelo fator nuclear eritóide-2 relacionada ao fator 2 (Nrf-2), o qual atua nos elementos de resposta antioxidante (ARE) presentes na região promotoras de genes citoprotetivos, desta forma controlando distúrbios fisiológicos e patofisiológicos causados por oxidantes (Nguyen et al., 2004). A regulação de Nrf-2 se dá através da ligação direta com a proteína repressora Keap1, a qual evita o acúmulo de Nrf-2 no núcleo. Já é sabido que Keap1 contém resíduos de cisteína, os quais representam alvos para ataques de compostos eletrofílicos. Em situações de estresse oxidativo a ligação de Keap1 e Nrf-2 é perdida e esse último se transloca para o núcleo da célula, onde lá ele se liga ao ARE para que ocorra a transcrição de genes atuantes na defesa do organismo (Nguyen, 2004). Além do incremento da expressão dos genes do sistema de defesas antioxidantes, a expressão de *nrf-2* é auto-regulada. Desta forma, o aumento na expressão de Nrf-2 frente à exposição a contaminantes já foi bem relatada por outros autores (Narasimhan et al., 2014; Hong et al., 2013; Wilmes et al., 2011; Osburn et al., 2006), corroborando assim com os resultados visualizados no presente

estudo, onde houve um aumento da expressão gênica do *nrf-2* para ambos os tempos experimentais, culminando assim numa atuação antioxidante do organismo frente a exposição ao Roundup.

Uma vez que os animais expostos ao Roundup apresentaram um incremento da ACAP e de *nrf-2*, foi investigada a expressão gênica de algumas enzimas chave no processo de defesa antioxidante. Um resultado bastante interessante foi que para as primeiras horas de exposição (24h) houve o aumento da expressão gênica de quase todos os genes analisados para a concentração de 5 mg/L de Roundup (*keap1*, *nrf-2*, *sod2*, *cat*, *catir*, *gclc*, *gclm*, *gs*, *trxt*, *trxr1* e *trxr2*). Isso nos sugere que o sistema de defesa antioxidante está sendo ativado de forma precoce frente à estas condições. Esta indução de expressão permanece para o tempo 96h em alguns dos genes analisados (*nrf-2*, *catir*, *gs* e *trxr1*).

Foi visto que o Roundup é capaz de gerar uma situação pró-oxidante, a qual acarretou em um incremento nas defesas do organismo, através da ativação precoce da expressão de genes. No intuito de avaliar se o incremento na geração de espécies ativas de oxigênio causada pela exposição ao Roundup acarretou em dano oxidativo e consequentemente em estresse oxidativo, ou se o incremento de ACAP foi suficiente para evitar tal situação, foi avaliada a peroxidação em lipídios. Tal processo acarreta em alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, podendo ocorrer a perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos (Halliwell e Gutteridge, 1999). Não foi observada qualquer alteração na peroxidação lipídica após o tratamento com Roundup em ambos os tempos experimentais. Tais resultados são contrários aos observados em outras espécies animais, na qual após a exposição a diferentes concentrações do contaminante há aumento na lipoperoxidação tecidual (El-Shenawy, 2009). Desta forma foi observado

que, de maneira geral, o aumento da geração de EAO devido à exposição ao Roundup foi capaz de ativar o sistema de defesa antioxidante, e este teve a capacidade de prevenir (ou recuperar) os possíveis danos oxidativos resultantes do processo de peroxidação.

Além do desbalanço oxidativo, tem-se demonstrado que o Roundup é capaz de acarretar na diminuição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) nos tecidos de diversas espécies animais (Gluszczak et al., 2006; Gluszczak et al., 2007; Braz-Mota et al., 2015). No presente estudo, após 96h de exposição ao Roundup foi visto que para concentrações que foram de 1 a 5 mg/L não houve diferenças significativas na atividade desta enzima. Resultados semelhantes ao do presente estudo são observados em peixes, aonde concentrações menores de Roundup (130 e 700ug/L) também não mostraram diferenças na atividade da AChE (Harayashiki et al., 2013) ao mesmo tempo que para outra espécie de peixe, concentrações intermediárias com o estudo que foi proposto e a literatura (0,2 e 0,4 mg/L) mostram que há uma diminuição na atividade da AChE *in vivo* e *in vitro* (Gluszczak et al., 2007). Tais diferenças nas respostas entre os organismos da atividade das AChE frente a exposição ao Roundup podem sugerir uma sensibilidade espécie-específica uma vez que Sandrini et al. (2013) observaram que a inibição da AChE ocorreu em uma menor concentração de glifosato para moluscos do que para outras duas espécies de peixes.

Outro efeito do Roundup que foi observado foi uma diminuição significativa de 26% no peso das fêmeas. Pode-se sugerir que tal variação possa estar relacionada com uma alteração específica gonadal das fêmeas, tendo em vista que os ovários representam uma biomassa significativa do total do animal pelo armazenamento de uma quantidade significativa de ovos em diferentes estágios de desenvolvimento. Portanto, qualquer fator que estimulasse a desova ou leva-se a uma regressão do desenvolvimento gonadal poderia levar a uma redução geral de peso. Outra possibilidade é que algum

fator, hormonal ou não, poderia levar a uma redução da ingestão de alimentos apenas das fêmeas e com isso levar a uma queda de peso.

Referências Bibliográficas Citadas na Introdução Geral e Discussão Geral

- Abolaji, A.O., Kamdemb, J.P., Lugokenski, T.H., et al., 2015. Ovotoxicants 4-vinylcyclohexene 1,2-monoepoxide and 4-vinylcyclohexene diepoxide disrupt redox status and modify different electrophile sensitive target enzymes and genes in *Drosophila melanogaster*. *Redox Biology* 5, 328–339.
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, et al., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. Mar 24;287(5461):2185-95.
- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., et al., 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the total environment*, 407, 2115- 2123.
- Amarante Jr., O.P., Santos, T.R.C., Brito, N.M., et al., 2002. Glifosato: Propriedades, toxicidade, uso e legislação. *Química Nova*, 25, 589–593.
- Benamú, M.A., Schneider, M.I., Sánchez, N.E., Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae), in laboratory *Chemosphere*, 78, 871–876.
- Brausch, J.M., Smith, P.N., 2007. Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp *Thamnocephalus platyurus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52 (2), 217–221.
- Braz-Mota, S., Sadauskas-Henrique, H., Duarte, R.M., et al., 2015. Roundup exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic

- activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*. *Chemosphere*, 135, 53–60.
- Brethead, S., Toutant, J.P., Saglio, P., 2000. Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47, 117-124.
- Contardo-Jara, V., Klingelmann, E., Wiegand, C., 2009. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution*, 157, 57–63.
- El-Shenawy, N.S., 2009. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28, 379–385.
- Fouodjouo, M., Laminsi, S., Kamgang, G.Y., et al., 2015. Non-Thermal Plasma Induced Total Mineralization of Glyphosate in Water in the Presence of Iron II Ions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26(3) 411-419.
- Fridovich, I., 2004. Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging Cell*, 3, 13–16.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Environmental Contaminant Toxicology*, 167, 35-120.
- Gluszczak, L., Miron, D.S., Crestani, M., et al., 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 237–241.

- Gluszczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., et al., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 146, 519–524.
- Gupta, S.C., Siddique, H.R., Mathur, N., et al., 2007. Induction of hsp70, alterations in oxidative stress markers and apoptosis against dichlorvos exposure in transgenic *Drosophila melanogaster*: Modulation by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770, 382–1394.
- Gupta, S.C., Siddique, H.R., Saxena, D.K., et al., 2005. Hazardous effect of organophosphate compound, dichlorvos in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ): Induction of hsp70, anti-oxidant enzymes and inhibition of acetylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1725, 81 – 92.
- Gwynne, D.C., Murray, R.B., 1985. *Weed Biology and control in agriculture and horticulture*. London: Batsford Academic and Educational, 258p.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd edition., Oxford University Press, New York, pp. 617–783.
- Harayashiki, C.A.Y., Varela Junior, A.S., Machado, A.A.S., et al., 2013. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquatic Toxicology*, 142–143, 176–184.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, edited by Kenneth B. Storey.
- Hong, G.L., Liu, J.M., Zhao, G.J., et al., 2013. The reversal of paraquat-induced mitochondria-mediated apoptosis by cycloartenyl ferulate, the important role of Nrf2 pathway. *Experimental Cell Research*, 319, 2845 – 2855.

- James, C., 1997. Global Status of Transgenic Crops in 1997. ISAAA Briefs No. 5. ISAAA: Ithaca, NY. pp. 31.
- Kaya, B., Creus, A., Yanikoğlu, A., et al., 2000. Use of the *Drosophila* Wing Spot Test in the Genotoxicity Testing of Different Herbicides. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 36, 40–46.
- Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 147, 222–231.
- Larsen, K., Najle, R., Lifschitz, A., et al., 2012. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: Glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34, 811–818.
- Lein, W., Börnke, F., Reindl, A., et al., 2004. Target-based discovery of novel herbicides. *Current opinion in Plant Biology* 7:2, 219-255.
- Lopes, F.M., Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., et al., 2014. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 155, 322–326.
- Menéndez-Helman, R. J., Miranda, L.A., Afonso, M.S., et al., 2015. Subcellular energy balance of *Odontesthes bonariensis* exposed to a glyphosate-based herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 157–163.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010a. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81, 781–787.

- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010b. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78, 294–299.
- Monserrat, J.M., Martinez, P.E., Geracitano, L.A., et al., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 146, 221–234.
- Mottier, A., Kientz-Bouchart, V., Serpentine, A., et al., 2013. Effects of glyphosate-based herbicides on embryo-larval development and metamorphosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology* 128–129, 67–78
- Mottier, A., Séguin, A., Devos, A., et al., 2015. Effects of subchronic exposure to glyphosate in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): From molecular to individual levels. *Marine Pollution Bulletin* 95, 665–677.
- Narasimhan, M., Riar, A.K., Rathinam, M.L., et al., 2014. Hydrogen peroxide responsive miR153 targets Nrf2/ARE cytoprotection in paraquat induced dopaminergic neurotoxicity. *Toxicology Letters*, 228, 179–191.
- Nguyen, T., Yang, C.S., Pickett, C.B., 2004. The pathways and molecular mechanisms regulating NRF-2 activation in response to chemical stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(4), 433–441.
- Osburn, W.O., Wakabayashi, N., Misra, V., et al., 2006. Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 454, 7–15.
- Peixoto, F., 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere*, 61, 1115–1122.

- Peruzzo, P.J., Porta, A.A., Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, 156, 61-66.
- Powell, J.R., 1997. *Progress and prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila Model*. Oxford. Oxford University.
- Regoli, F. Winston, G.W., 1998. Applications of a new method for measuring the total oxyradical scavenging capacity in marine invertebrates. *Marine Environmental Research*, 46(1), 439–442.
- Relyea, R.A., 2005. The letal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*, 15(4), 1118–1124.
- Resh, V.H., Cardé, R.T., 2009. *Encyclopedia of insects*. Second edition .Copyright © Elsevier, Inc. All rights reserved.
- Ross, M.A., Childs, D.J., 1996. *Herbicide mode-of- action summary*. Cooperative Extension Service Publication WS-23, Purdue University, West Lafayette, IN. Disponível em: < <https://www.extension.purdue.edu/extmedia/ws/ws-23-w.html>>. Access in 01 aug 2015.
- Saglio, P., Trijasse, S., 1998. Behavioral Responses to Atrazine and Diuron in Goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35, 484–491.
- Sandrini, J.Z., Rola, R.C., Lopes, F.M., et al., 2013. Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: In vitro studies. *Aquatic Toxicology*, 130–131, 171–173.

- Schneider, M.I., Sanchez, N., Pineda, S., et al., 2009. Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach. *Chemosphere*, 76, 1451-1455.
- Sies, H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*, 91, 31–38.
- Sinhorin, V.D.G., Sinhorin, A.P., Teixeira, J.M.S., et al., 2014. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma sp*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106, 181–187.
- Stephenson, G.R., Ferris, I.G., Hollnad, P.T., et al., 2006. Glossary of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*, 78, 11, 2075-2154.
- Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, 29, 1715-1733.
- Sudati, J.H., Vieira, F.A., Pavin, S.S., et al., 2013. *Valeriana officinalis* attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *NeuroToxicology*, 37, 118–126.
- Thannickal, V.J., Fanburg, B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279, 1005–1028.
- Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., et al., 2013. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 129–136.

- Toni, L.R.M., Santana, H., Zaia, D.A.M., 2006. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. *Química Nova*, 29 (4), 829-833.
- US EPA 2011. United States Environmental Protection Agency. Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. Washington, DC.
- Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby, A.G., et al., 1992. The SCSI ARS/CES Pesticide Properties Database for Environmental Decision-Making. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Vol. 123.
- Wells, P.G., Kim, P.M., Laposa, R.R., et al., 1997. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutation Research*, 396, 65–78.
- Wilmes, A., Crean, D., Aydin, S., et al., 2011. Identification and dissection of the Nrf2 mediated oxidative stress pathway in human renal proximal tubule toxicity. *Toxicology in Vitro*, 25, 613–622.