

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**TOXICIDADE DO HERBICIDA ATRAZINA SOBRE SISTEMA
DOPAMINÉRGICO E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
*Drosophila melanogaster***

TESE DE DOUTORADO

Fernanda Hernandes Figueira

**Rio Grande, RS, Brasil
2016**

**TOXICIDADE DO HERBICIDA ATRAZINA SOBRE SISTEMA
DOPAMINÉRGICO E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
*Drosophila melanogaster***

por


Fernanda Hernandes Figueira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, como requisito parcial para obtenção do título de
Doutora em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo da Rosa

Rio Grande, RS, Brasil

2016

Dedico este trabalho aos
meus pais Vera Regina
Hernandes Figueira e José
Otavio Figueira. 

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me ensinarem a acreditar nos meus sonhos e me encorajar a persistir no caminho que escolhi, mas principalmente por me deixarem livre para desistir de tudo a qualquer hora. A liberdade traz a força para encarar todos os desafios da vida. E saber que vocês, Pai e Mãe, estarão sempre ao meu lado para apoiar todas as minhas decisões é a maior prova de amor e de que nunca estarei sozinha. Muito obrigada!

Aos meus amigos, por todo o carinho e amor. Agradeço em especial aos amigos: Luciana Duarte, pela amizade, amor, conselhos, amparo, abrigo e compreensão; Jivago Röpke, pela companhia e amor; Elizete Reis, pela lealdade e amor; e Leandro Saggiomo, pela amizade. Muito obrigada! Sem vocês eu não teria concluído este trabalho.

Aos colegas da Sala 1 pela companhia, paciência e muitas risadas. Agradeço em especial aos amigos: Juliano Barreto, Silvana Nunes, Carolina Peixoto, Mauricio Sopezki, André Koth e Fábio Tarouco.

Ao meu orientador, Prof. Carlos Eduardo da Rosa, pela disponibilidade, atenção e paciência. Tua dedicação e profissionalismo tornaram possível a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Aos funcionários que contribuíram para minha formação e conclusão deste trabalho. Agradeço em especial ao Prof. Pablo Martinez, à Prof. Daniela Barros, ao técnico Josencler Ferreira, à Dona Maria e à Inês. Muito obrigada!

À colega Ana Laura Escarrone por toda a dedicação nas tentativas de dosar dopamina nas moscas e nas análises de atrazina no meio de cultura. Muito obrigada!

Ao Instituto de Ciências Biológicas por disponibilizar a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade de formação profissional e acadêmica oferecida através do curso.

À Universidade Federal do Rio Grande pela realização do curso.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, e demais agências de fomento que viabilizaram a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Aminoácidos

ADP – Difosfato de adenosina, do inglês: *adenosine diphosphate*

AMPc – Monofosfato de adenosina cíclico

ARE – Elementos de resposta antioxidante, do inglês: *antioxidant responsive element*

ATP – Trifosfato de adenosina, do inglês: *adenosine triphosphate*

bZIP – Zíper de leucina básico

CAT – Catalase

Cit c – Citocromo c

Cu,Zn-SOD – SOD citoplasmática dependente de cobre e zinco

Cu⁺ - Cobre reduzido

D1-like – Homólogos de receptor de dopamina D1 de mamíferos

D2-like – Homologo de receptor de dopamina D2 de mamíferos

DA – Dopamina

DAMB – Receptor de dopamina dos corpos pedunculados, do inglês: *dopamine receptors in mushroom bodies*

DAT – Transportador de dopamina

DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês: *deoxyribonucleic acid*

DOPA – Diidroxifenilalanina

DOPA descarboxilase - L-aminoácido descarboxilase aromática

ERO – Espécies reativas de oxigênio

Fe²⁺ - Ferro reduzido

GCL – Glutamato cisteína ligase

Gi – Proteína G inibitória

GPx – Glutaciona peroxidase

GPx-Se – Glutaciona peroxidase selênio dependente

GR – Glutaciona redutase

GRx – Glutaredoxina

Gs – Proteína G estimulatória

GSH – Glutaciona

GSS – Glutaciona sintetase

GSSG – Glutaciona oxidada

GST – Glutathione-S-transferase

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HO· – Radical hidroxila

Keap1 – do inglês: *Kelch like-ECH-associated protein 1*

MnSOD – Superóxido dismutase dependente de manganês

MPP⁺ - 1-metil-4-fenilpiridina

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês: *messenger ribonucleic acid*

NADH – Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzido

NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida-adenina

Nrf-2 – Fator nuclear eritóide-2 relacionado ao fator 2

O₂ – Oxigênio molecular

O₂⁻ - Radical ânion superóxido

PKA – Proteína quinase A

PKC – Proteína quinase C

PI3K/AKT – Fosfatidilinositol 3- quinase

Q – Ubiquinona

RNA_t – Ácido ribonucleico transportador

SOD – Superóxido dismutase

TH – Tirosina hidroxilase

TRXR – Tiorredoxina redutase

TRXT – Tiorredoxina

VMAT – Transportador vesicular de monoaminas, do inglês: *vesicular monoamine transporter*

SUMÁRIO

1. RESUMO	8
2. ABSTRACT	9
3. INTRODUÇÃO GERAL	10
3.1. Geração de ERO, estresse oxidativo e efeitos neurotóxicos	11
3.2. Sistema de defesa antioxidante e proteção do tecido nervoso	14
3.3. <i>D. melanogaster</i> como modelo experimental para estudo de neurotoxicologia	23
3.4. Sistema dopaminérgico de <i>D. melanogaster</i>	27
3.5. Efeitos do herbicida atrazina e relação com sistema dopaminérgico ..	33
4. Hipótese	37
5. OBJETIVOS	38
5.1. Objetivo geral	38
5.2. Objetivos específicos	38
6. ARTIGO	39
6.1. Introduction	41
6.2. Materials and methods	43
6.3. Results	48
6.4. Discussion	51
6.5. References	57
6.6. Legends and Figures	61
7. MANUSCRITO	68
7.1. Introduction	71
7.2. Materials and methods	73
7.3. Results	78
7.4. Discussion	80
7.5. References	85
7.6. Legends, figures and table	92
8. DISCUSSÃO GERAL	99
9. PERSPECTIVAS	104
10. BIBLIOGRAFIA GERAL	106
11. ANEXO	116

1. RESUMO

Vários poluentes ambientais são conhecidos por causar danos ao sistema dopaminérgico devido ao desequilíbrio do metabolismo energético. A atrazina é um herbicida amplamente utilizado e, por isso, tornou-se um dos contaminantes ambientais mais comuns. Foi demonstrado que a exposição à atrazina diminui a viabilidade larval, aumenta o metabolismo energético de moscas fêmeas e inibe a atividade da enzima ATP sintase. Em mamíferos diversos estudos relatam que a exposição à atrazina altera a neurotransmissão dopaminérgica. Entretanto, poucos ou nenhum estudo tem investigado os mecanismos de neurotoxicidade da atrazina em *Drosophila melanogaster*. Devido à isto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do herbicida atrazina no balanço oxidativo bem como no sistema dopaminérgico de *D. melanogaster* expostas durante o desenvolvimento embrionário e larval. Para isto, os embriões recém-fertilizados foram coletados e divididos em quatro grupos experimentais: grupo controle (meio de cultura livre de atrazina), grupo etanol (meio de cultura livre de atrazina, contendo 0,02% de etanol) e dois grupos contendo atrazina em diferentes concentrações (10 μM e 100 μM) e etanol 0,02% no meio de cultura. Após a emergência, os testes foram realizados em machos e fêmeas separadamente. A exposição à atrazina reduziu a viabilidade de larvas e pupas. Moscas recém emergidas apresentaram alterações do metabolismo redox como aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, redução da capacidade antioxidante e dano lipídico. Além destes resultados, alterações comportamentais foram observadas em fêmeas, acompanhado de um aumento da atividade da enzima tirosina hidroxilase e aumento da expressão dos genes que codificam os receptores de dopamina. Machos não tiveram alterações nos testes comportamentais realizados, bem como nos parâmetros relacionados ao sistema dopaminérgico. Entretanto, a expressão de genes associados à proteção celular foram alterados em machos e fêmeas, porém apresentando um padrão diferente entre os sexos. Os resultados indicam que o desequilíbrio redox causado pela exposição à atrazina em *D. melanogaster* pode estar relacionado à desregulação do sistema dopaminérgico.

2. ABSTRACT

Various environmental pollutants are known to cause damage to the dopaminergic system due to imbalance in energy metabolism. Atrazine is an herbicide widely used and therefore became one of the most common environmental contaminants. It has been shown that atrazine exposure decreases larval viability, increases the energy metabolism of flies and inhibits the activity of the ATP synthase enzyme. In mammals several studies reported that atrazine exposure alters dopaminergic neurotransmission. However, few or no study has investigated the neurotoxicity mechanisms of atrazine in *Drosophila melanogaster*. Due to this, the goal of this study was to evaluate the effect of atrazine in the oxidative balance and the dopaminergic system of *D. melanogaster* exposed during embryonic and larval development. The newly fertilized embryos were collected and divided into four groups: control group (atrazine-free culture medium), ethanol group (atrazine-free and 0.02% ethanol in culture medium) and two groups containing atrazine in different concentrations (10 μ M and 100 μ M) and 0.02% ethanol in culture medium. Exposure to atrazine reduces the viability of larvae and pupae, reducing the rates of pupation and emergence. The tests were conducted on males and females separately. Newly emerged flies that were exposed during embryonic and larval development showed changes in redox metabolism as increased reactive oxygen species generation, decreased antioxidant capacity and lipid damage. The behavioral changes were observed in females, accompanied by an increased activity of the tyrosine hydroxylase enzyme and increased mRNA gene expression of dopamine receptors. Males did not change in the behavioral tests as well as the parameters related to the dopaminergic system. However, the expression of genes associated with redox metabolism have changed in males and females, with a different pattern between the genders. The results indicate that the redox imbalance caused by exposure to atrazine in *D. melanogaster* may be related to dysfunction of the dopaminergic system.

3. INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento de um sistema nervoso funcional resulta de uma exata conexão de populações celulares. Durante o desenvolvimento, o sistema nervoso passa por uma modificação dramática que envolve morte celular programada, remodelamento axonal e geração de novos neurônios (Veverlytsa e Allan, 2013). A exposição a agentes tóxicos durante o desenvolvimento é uma preocupação particular devido à muitos mecanismos de detoxificação estarem ausentes nas fases iniciais do desenvolvimento (Crisp et al., 1998). Além disso, a exposição à xenobióticos pode levar à consequências latentes, gerando déficits de função neural na fase adulta devido às alterações causadas durante a exposição no início do desenvolvimento (Rice et al., 2000).

Um dos mecanismos de neurotoxicidade mais relatados na literatura é o aumento da geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (Segura-Aguilar e Kostrzewa, 2006). Evidências sugerem que há uma forte correlação entre alterações metabólicas e distúrbios neurofisiológicos (Procaccini et al., 2016). Além disso, foi demonstrada uma maior sensibilidade do tecido nervoso às alterações no metabolismo energético (Plasse et al., 2015), assim como disfunção mitocondrial e aumento da geração de ERO tem sido relatados como possíveis mecanismos para muitas doenças neurodegenerativas (Johri e Beal, 2012).

A atrazina é um herbicida amplamente utilizado que devido à sua eficiência e baixo custo tornou-se um dos contaminantes ambientais mais comuns (Thornton et al., 2010). Estudos demonstram que a exposição à atrazina pode alterar o metabolismo energético devido à redução da atividade da enzima ATP sintase (Hase et al., 2008) e aumento do conteúdo de enzimas, como por exemplo a amilase, que pode ocorrer de maneira sexo-dependente (Thornton et al., 2010). Em mamíferos, a

exposição à atrazina pode levar à alterações nos sistemas monoaminérgicos (Lin *et al.*, 2013), com ênfase no sistema dopaminérgico (Walters *et al.*, 2015). Em *Drosophila melanogaster*, poucos estudos investigaram os efeitos da atrazina e nenhum estudo foi realizado a fim de investigar os mecanismos de neuroxicidade deste herbicida.

3.1. Geração de ERO, estresse oxidativo e efeitos neurotóxicos

O trifosfato de adenosina (ATP) é o produto final de uma série de vias metabólicas que envolvem a oxidação de substratos e representa a principal fonte de energia das células. As mitocôndrias são as maiores responsáveis pela geração de ATP dentro das células através de uma via chamada cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa. A cadeia transportadora de elétrons é composta por quatro complexos proteicos ligados a membrana interna mitocondrial. O complexo I é responsável por realizar a transferência dos elétrons doado por dinucleotídeo de nicotinamida-adenina reduzido (NADH) para a ubiquinona (Q), bombeando prótons para o espaço intermembrana (Lenaz *et al.*, 2006). O complexo II, que participa do ciclo de Krebs, converte o succinato à fumarato, e também transfere elétrons para a Q, porém sem bombear prótons. O complexo III acopla a transferência dos elétrons de Q reduzida para o citocromo c (Cit c) com o transporte de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana. O Cit c por ser um elemento móvel de ligação, assim como Q, passa elétrons ao complexo IV que transfere os elétrons ao oxigênio molecular (O_2), reduzindo-o à água (H_2O), e usa a energia desta reação para bombear prótons para o espaço intermembranas (Hatefi, 1985).

Neste transporte, forma-se um gradiente eletroquímico no espaço intermembranas da mitocôndria. Este processo está acoplado à síntese de ATP

através da fosforilação oxidativa. A energia eletroquímica gerada pela cadeia transportadora de elétrons impulsiona a síntese de ATP devido à ação da enzima ATP sintase. Na medida que os prótons atravessam a membrana, fluindo para a matriz mitocondrial através da subunidade F₀ da ATP sintase, a energia eletroquímica é transformada em energia mecânica capaz de fosforilar o difosfato de adenosina (ADP) à ATP, através da subunidade F₁ da ATP sintase (Hatefi, 1985) (Figura 1).

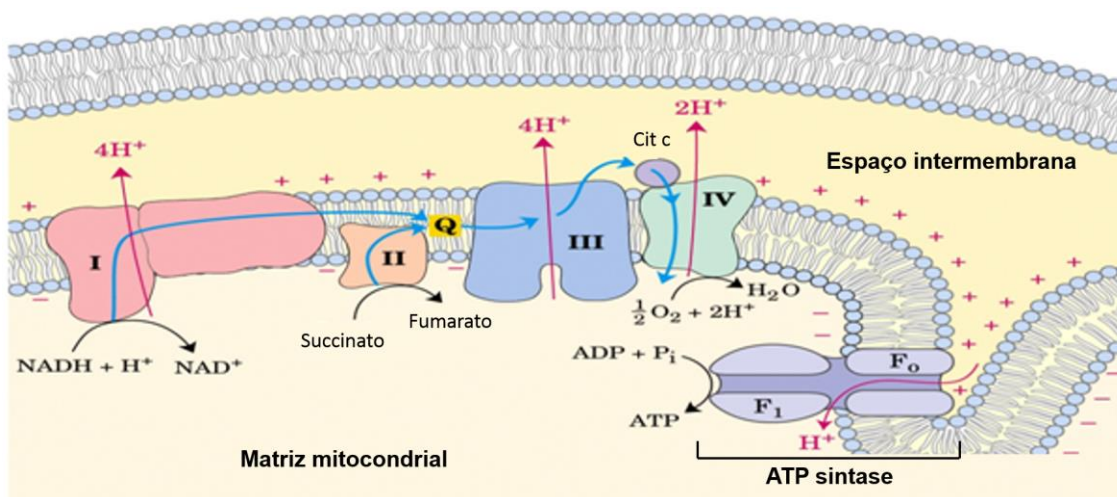


Figura 1. Cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa. Os elétrons são transferidos através de complexos proteicos acoplados à membrana interna mitocondrial até o O₂, fazendo a redução do mesmo. Durante este processo ocorre o bombeio de prótons para o espaço intermembranas, formando um gradiente eletroquímico capaz de gerar força motriz suficiente para fosforilação do ADP à ATP através do complexo da ATP sintase. Adaptado de Nelson e Cox (2013).

A geração de ERO ocorre endogenamente através da cadeia transportadora de elétrons. Cerca de 1-2% do O₂ consumido pode vir a gerar ERO devido ao escape de elétrons da cadeia transportadora de elétrons e redução parcial do O₂ (Halliwell e Gutteridge, 2007). Os complexos I e III são considerados os principais locais de geração de ERO devido a um mecanismo ainda não muito claro (Lenaz *et*

al., 2006). A geração de ERO também pode ser uma resposta celular à exposição à xenobióticos (Ray *et al.*, 2012).

As ERO consistem em espécies radicalares e não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($HO\cdot$) (Ray *et al.*, 2012). Quando a geração de ERO sobrecarrega o sistema de defesa antioxidante, as ERO podem reagir com biomoléculas como proteínas, lipídeos e até mesmo o ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês: *deoxyribonucleic acid*), levando ao dano celular (Fridovich, 2004; Storey, 1996; Sies, 1991). Este processo é conhecido com estresse oxidativo. Entretanto, a geração de ERO nem sempre resulta em dano macromolecular como o estresse oxidativo. ERO podem ativar vias de sinalização celular relacionados à proliferação celular, sobrevivência ou ainda induzir a expressão de genes que podem contribuir para disfunções fisiológicas (Ray *et al.*, 2012).

Considerando a exigência energética intensa e a baixa capacidade de regeneração dos neurônios, disfunções mitocondriais podem ter efeitos devastadores na sobrevivência neuronal (Johri e Beal, 2012). A Doença de Parkinson, caracterizada por degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra, está associada à menor atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons (Shults, 2004). Substâncias como a rotenona e o 1-metil-4-fenilpiridina (MPP^+), são inibidores do complexo I e tem sido extensivamente utilizados para induzir efeitos semelhantes à Doença de Parkinson em modelos experimentais de vertebrados e invertebrados (Tieu, 2011). Evidências mostram que o mecanismo de toxicidade da rotenona não é a redução da síntese de ATP e sim o aumento da geração de ERO (Shults, 2004). Neste sentido, estudos epidemiológicos tem encontrado uma consistente associação entre a Doença de Parkinson e a

exposição à pesticidas, os quais são substâncias reconhecidamente indutoras de estresse oxidativo (Tanner e Aston, 2000).

Outros pesticidas muito utilizados atualmente, como o glifosato, também apresentam efeitos neurotóxicos (Astiz *et al.*, 2012; Cattani *et al.*, 2014). Estes efeitos apresentam como um dos principais mecanismos o aumento da geração de ERO, que pode ser revertido com a suplementação de moléculas com ação antioxidante (Astiz *et al.*, 2012).

3.2. Sistema de defesa antioxidante e proteção do tecido nervoso

Como relatado anteriormente, a geração de ERO ocorre endogenamente durante o transporte de elétrons. Para evitar consequências indesejáveis relacionadas a este processo, os organismos possuem um sistema de defesa antioxidante. Este sistema pode ser dividido de maneira geral em sistema de defesa antioxidante não enzimático e sistema de defesa antioxidante enzimático (Sies, 1997).

O sistema de defesa antioxidante não-enzimático inclui moléculas como o ácido ascórbico, tocoferol e polifenóis (Lushchak, 2014). Entretanto, o sistema de defesa antioxidante não enzimático inato é melhor representado pela glutathiona (GSH) (Storey, 1996). O tripeptídeo GSH é a principal molécula não proteica contendo grupo sulfidrilica encontrada nas células em concentrações na ordem milimolar. Esta molécula é sintetizada em duas etapas (Figura 2). A enzima glutamato cisteína ligase (GCL) catalisa a síntese de γ -glutamilcisteína a partir dos aminoácidos glutamato e cisteína. Esta reação requer ATP e é o passo limitante para a síntese de GSH. A segunda reação também requer ATP e é catalisada pela enzima glutathiona sintetase (GSS), que liga o dipeptídeo γ -glutamilcisteína ao

aminoácido glicina. A função antioxidante da GSH é mediada pelo grupo sulfidríla do resíduo de aminoácido cisteína, o qual permite ligações dissulfeto com proteínas e serve como mediador de reações fisiológicas, incluindo a metabolização de xenobióticos (Marí *et al.*, 2009).

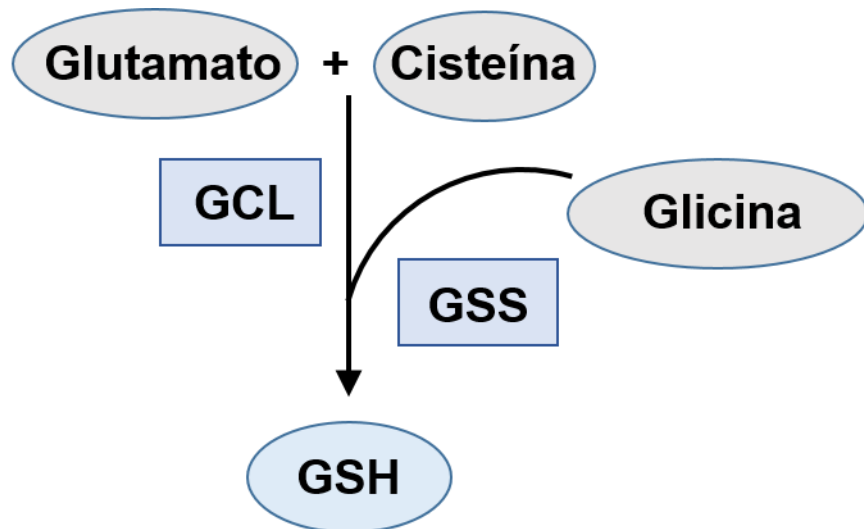


Figura 2. Síntese de glutathiona (GSH). A síntese de GSH ocorre através da ação das enzimas glutamato cisteína ligase (GCL) e GSS (glutathiona sintetase) a partir dos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina.

Os organismos podem elevar a capacidade de defesa antioxidante em situações estressantes, como a causada pelo aumento da geração de ERO (Halliwell and Gutteridge, 2007). Esta elevação do sistema de defesa antioxidante se dá principalmente pela indução da expressão gênica relacionada à enzimas com ação antioxidante. O fator nuclear eritóide-2 relacionado ao fator 2 (Nrf-2) atua nos elementos de resposta antioxidante (ARE, do inglês: *antioxidant responsive element*) presentes nas regiões promotoras dos genes com função citoprotetiva. Em condições normais de geração de ERO, o Nrf-2 encontra-se no citoplasma ligado à proteína repressora Keap1 (do inglês: *Kelch like-ECH-associated protein 1*). Um aumento na intensidade de geração de ERO é capaz de oxidar grupos sulfidríla dos

resíduos de cisteína de Keap1, tornando-o incapaz de interagir com Nrf-2 (Lushchak, 2014). Assim, Nrf-2 transloca-se para o núcleo, onde combina-se com outras proteínas contendo domínios de ligação ao DNA, como o motivo zíper de leucina básico (bZIP), e interagem com os ARE ativando a transcrição de genes que atuam na defesa do organismo (Figura 3) (Nguyen *et al.*, 2004). Além desta outras vias de sinalização são capazes de ativar o Nrf-2. A fosforilação do Nrf-2 é capaz de desconectá-lo da proteína Keap1. Assim, proteínas quinase como fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K/Akt) e proteína quinase C (PKC) podem facilitar a translocação do Nrf-2 para o núcleo e a ativação da transcrição dos genes alvos deste fator de transcrição (Son *et al.*, 2008).

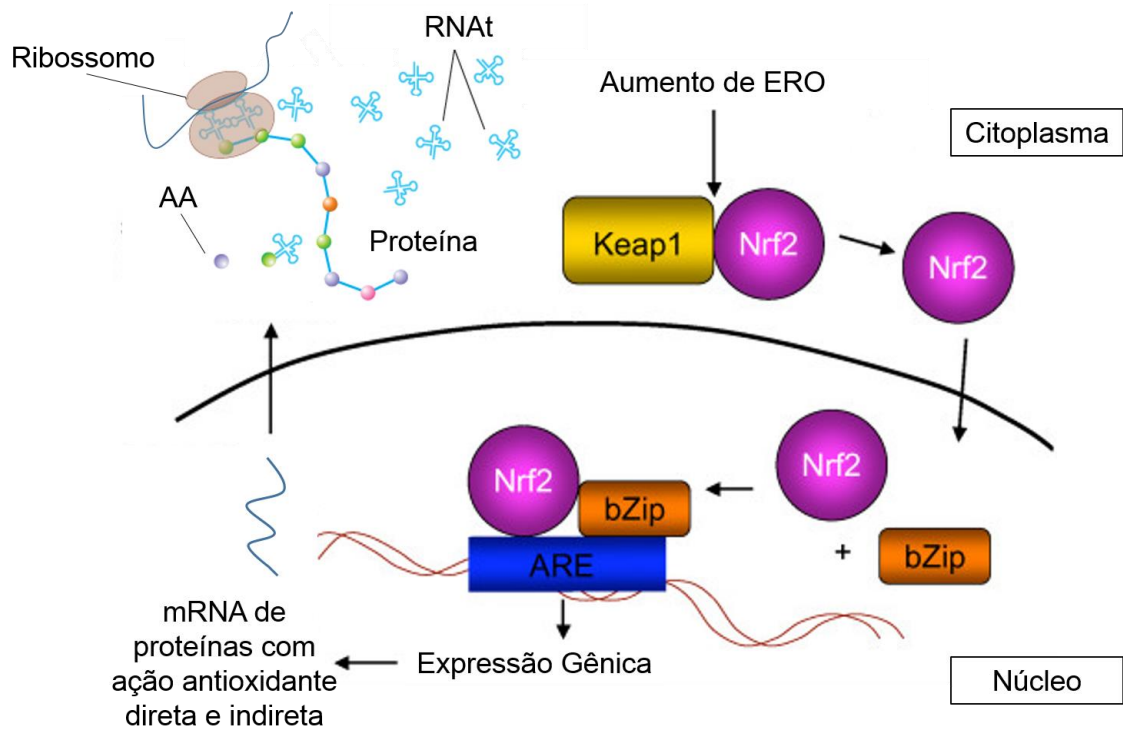


Figura 3. Expressão gênica induzida por ERO. O aumento da geração de ERO leva a oxidação dos resíduos de cisteína da proteína Keap1, liberando o Nrf-2, que migra para o núcleo, associa-se a outras proteínas e liga-se aos ARE do DNA, induzindo a síntese de mRNA de genes de proteínas ligadas à proteção celular. O mRNA é então transportado para o citoplasma onde serve de molde para a síntese de proteínas a partir de aminoácidos (AA) que são levados até os ribossomos pelos RNA transportadores (RNAt). Adaptado de Saw e colaboradores (2010).

Os genes modulados positivamente por Nrf-2 incluem aqueles que codificam o sistema de defesa antioxidante enzimático por ação antioxidante direta, assim como os genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de antioxidantes, como a GCL e a GSS, e enzimas responsáveis pela metabolização de xenobióticos, como a glutatona S-transferase (GST) (Lushchak, 2014). As enzimas que participam do sistema antioxidante enzimático e que possuem ação direta sobre as ERO são as superóxido dismutases (SODs), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase selênio dependente (GPx-Se). Além destas, as enzimas do sistema da tioredoxina (TRXT) e do sistema da GSH também fazem parte do sistema de defesa antioxidante enzimático (Halliwell e Gutteridge, 2007).

As SODs são as principais enzimas de defesa antioxidante contra o $O_2^{\cdot-}$ (Fridovich, 1995). Duas principais isoformas, a SOD citoplasmática dependente de cobre e zinco (Cu,Zn-SOD) e a SOD mitocondrial dependente de manganês (Mn-SOD), são encontradas tanto em vertebrados (Fukai e Ushio-Fukai, 2011) como invertebrados (Lee *et al.*, 1981). Ambas isoformas fazem a conversão do $O_2^{\cdot-}$ à H_2O_2 (Figura 4) (Fridovich, 1995).

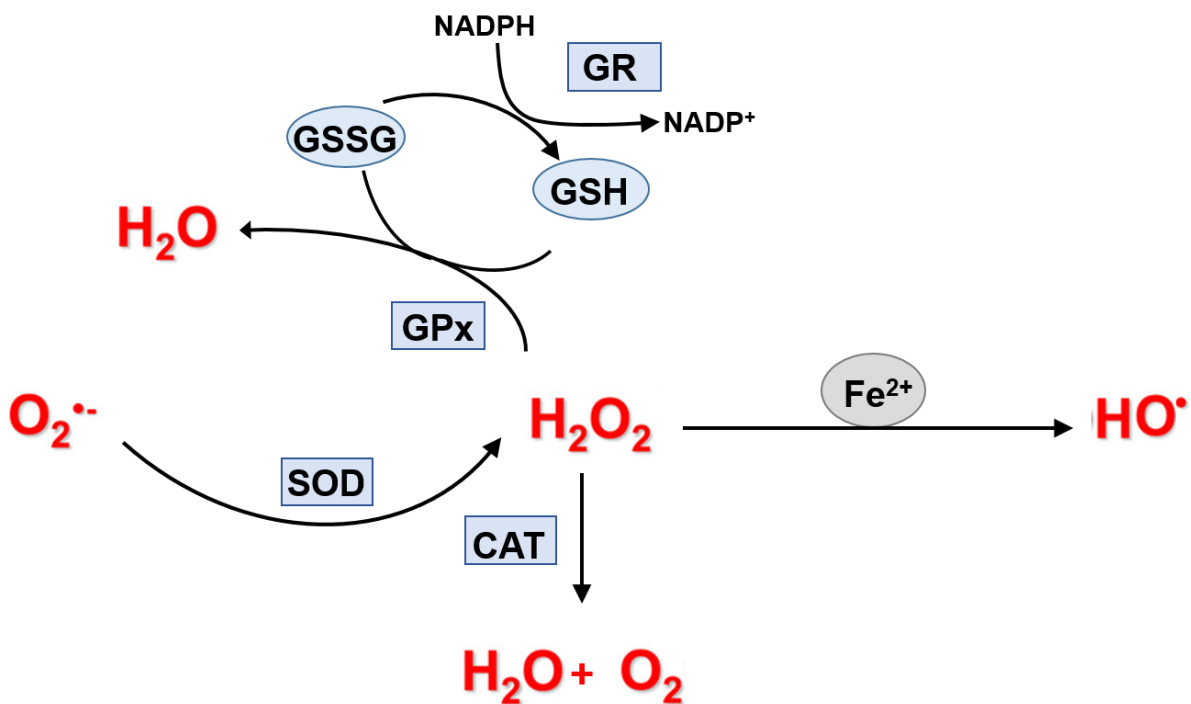


Figura 4. Sistema de defesa antioxidante. As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) atuam diretamente sobre as ERO, reduzindo sua reatividade. Por outro lado, a enzima glutatona redutase (GR) não tem ação antioxidante direta, mas ela catalisa a reciclagem da glutatona (GSH) que é extremamente importante para o sistema de defesa antioxidante.

A presença de metais de transição reduzidos, como o ferro (Fe^{2+}) e o cobre (Cu^+), pode converter espontaneamente o H_2O_2 à HO^{\cdot} , esta reação é conhecida como Reação de Fenton e é a principal via de geração do HO^{\cdot} (Sies, 1985). Apesar

de extremamente reativo (Fukai e Ushio-Fukai, 2011), o HO· não pode ser eliminado enzimaticamente, sendo um grande mediador da oxidação de proteínas (Wood *et al.*, 2008). Para eliminar o H₂O₂ e evitar a geração de HO·, os organismos utilizam as enzimas CAT e glutathiona peroxidase (GPx) (Figura 4). A CAT é uma enzima altamente eficiente (Chelikani *et al.*, 2004; Nicholls *et al.*, 2000), e qualquer aumento na sua atividade é possivelmente reflexo de um aumento do conteúdo de enzima (Bewley e Laurie-Ahlberg 1984).

O sistema da GSH é composto pela própria GSH, as enzimas GCL e GSS que, como relatado anteriormente, participam da síntese de GSH e as enzimas GPx, GST (Dickinson e Forman, 2002), glutaredoxina (GRx) e glutathiona redutase (GR) (Holmgren *et al.*, 2005). Além de poder interagir diretamente com o H₂O₂ (Ribeiro *et al.*, 2010), a GSH também pode servir como substrato para as GPx-Se, que promove a redução de hidroperóxidos através da oxidação da GSH, formando GSSG.

Interessantemente, a análise do genoma de alguns organismos, como o da mosca da fruta não apresentam esta isoforma, somente outras com funções biológicas distintas (Missirilis *et al.* 2003). As GPx são uma família de proteínas que tem como substratos específicos não somente o H₂O₂, mas diferentes tipos de hidroperóxidos gerados como consequência da reação de ERO com macromoléculas (Dickinson e Forman, 2002).

Mudanças no balanço redox em favor da geração de ERO podem induzir a oxidação de proteínas. Os grupos sulfidrilas das proteínas oxidadas passam por estágios de oxidação que podem se tornar irreversíveis, formando ácido sulfênico, sulfínico ou sulfônico. A formação de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína intra ou inter-cadeias, bem como a ligação de proteínas à GSH no processo de S-glutathionilação, evita que os grupos sulfidrilas sejam oxidados permanentemente

(Dalle-Donne *et al.*, 2007). Com o retorno da célula ao estado redox normal, estes processos podem ser revertidos de maneira enzimática e não enzimática, dependendo do poder redutor do ambiente. As enzimas capazes de induzir a S-glutationilação/deglutationilação das proteínas são os sistemas da glutarredoxina (GRx) e a TRXT (Holmgren *et al.*, 2005).

O sistema da TRXT é amplamente distribuído em diversos organismos, até mesmo em plantas (Brugidou *et al.*, 1993), sendo responsável por reduzir ligações dissulfeto em proteínas (Figura 5) (Svensson e Larsson, 2007). A TRXT possui no seu sítio catalítico grupos sulfidríla de dois resíduos de cisteína que são responsáveis pela redução dos dissulfetos proteicos, tornando-se assim, oxidada. A manutenção do estado reduzido da TRXT é feita pelas enzimas da família das tioredoxina redutases (TRXR) (Figura 4) (Holmgren *et al.*, 2005).

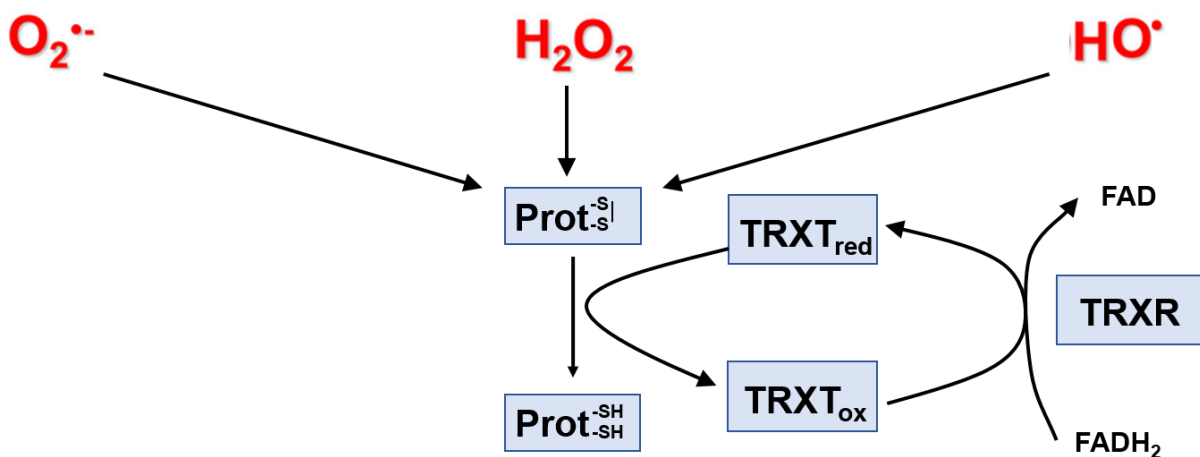


Figura 5. Sistema da tioredoxina (TRXT). A TRXT reduz grupos sulfidríla de proteínas que sofreram oxidação devido à ação de ERO.

Como relatado anteriormente, além do sistema da TRXT, o sistema da GSH também participa das reações de S-glutationilação/deglutationilação. A enzima GRx participa destas reações como um catalizador eficiente de reações de conversão de

mono sulfidril. A redução do grupo sulfidril proteico é realizada pela enzima GRx através da oxidação de GSH e da própria enzima. A manutenção da GRx para sua forma ativa (reduzida) ocorre através do sistema da TRXT, como descrito acima. A GSSG também precisa ser reciclada, voltando a sua forma reduzida. Esta reação é catalisada pela enzima GR, que utiliza equivalentes redutores doados pelo NADPH (Holmgren *et al.*, 2005)

As GST são uma família de proteínas que, assim como as GPx, possuem diferentes substratos, os quais são conjugados com a GSH (Figura 6). A metabolização de diversos xenobióticos, como por exemplo a atrazina, ocorrem devido à ação da GST (Egaas *et al.*, 1993). Alterações neste sistema, como redução da síntese de GSH, podem levar à uma detoxificação deficiente, tornando o organismo mais susceptível aos efeitos tóxicos dos xenobióticos. Assim com o aumento da conjugação da GSH à uma substância tóxica pode levar ao aumento dos níveis de ERO devido à GSH também participar do metabolismo redox, como descrito acima (Strange *et al.*, 2000).

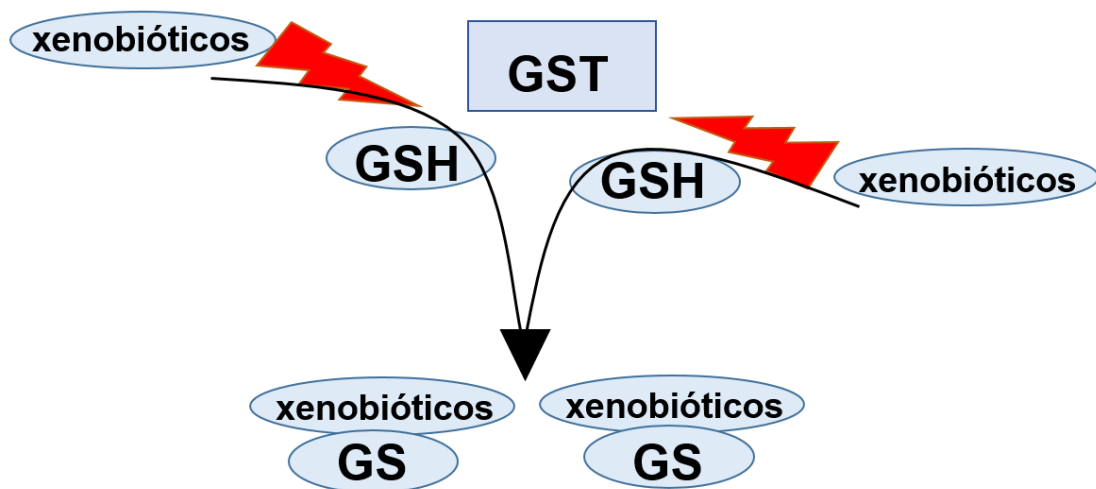


Figura 6. Metabolização de xenobióticos através da ação da glutathione-S transferase (GST). A GST catalisa a conjugação do xenobiótico à GSH, reduzindo seu potencial tóxico.

Devido à fatores ambientais, estilo de vida e/ou situações patológicas, o estresse oxidativo pode ocorrer como consequência do aumento da geração de ERO e/ou redução da capacidade antioxidante dos tecidos. O uso de antioxidantes pode reverter os danos oxidativos causados pela exposição à xenobióticos (Astiz *et al.*, 2012). Trabalhos mostram que a administração de antioxidantes previne os efeitos neurotóxicos em diversos modelos experimentais de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson e Alzheimer (Jiang *et al.*, 2016). Por outro lado, tem se demonstrado que compostos ricos em grupos sulfidríla, como a N-acetil cisteína ou aqueles capazes de induzir um aumento do conteúdo do mesmo, como a curcumina, apresentam efeito neuroprotetor em animais experimentais (Gazal *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2009). Portanto, torna-se clara a relação entre uma situação de exacerbação nos níveis de ERO e a neurotoxicidade.

Evidências sugerem que o aumento da geração de ERO no tecido nervoso pode desempenhar um papel no desenvolvimento de disfunções neuronais relacionadas à idade (Fusco *et al.*, 2007). Além disso, a teoria de que o aumento da geração de ERO pode ser a causa do envelhecimento proposta por Harman (1956), tem recebido crescente aceitação como uma possível explicação para as bases fisiológicas do envelhecimento. A partir disso, diversos estudos tem mostrado que a suplementação com antioxidantes proporciona um efeito protetor contra os possíveis danos causados pelo aumento da geração de ERO com consequente aumento da expectativa de vida (Fusco *et al.*, 2007).

3.3. *D. melanogaster* como modelo experimental para estudo de neurotoxicologia

A *D. melanogaster*, também conhecida como mosca da fruta, tem sido bastante utilizada para estudos acerca do metabolismo energético (Rajan e Perrimon, 2013). Além disso, é um animal muito utilizado como modelo em toxicologia (Rand, 2010). A importância do estresse oxidativo em relação ao desenvolvimento associado à conservação e simplicidade do sistema nervoso de *D. melanogaster* fazem deste animal um excelente modelo para estudo de distúrbios neurofisiológicos (O’Kane, 2011).

O emprego de *D. melanogaster* representa um avanço no estudo de doenças neurodegenerativas. Por ser um animal com sistema genético facilmente manipulável e possuir em seu genoma genes com similaridade considerável quando comparado à mamíferos, tem sido muito utilizada para gerar linhagens com mutações idênticas às encontradas no genoma de portadores de doenças neurodegenerativas (Lu e Vogel, 2009). Estudos *post-mortem* em casos de doenças esporádicas tem demonstrado o envolvimento do metabolismo redox, como redução da atividade dos complexos mitocondriais, em sua fisiopatologia (Dexter *et al.*, 1994). Neste sentido, diversos agentes tóxicos desreguladores da função mitocondrial utilizados para induzir modelos de doenças em mamíferos tem apresentado sucesso no desenvolvimento de modelos também em *D. melanogaster* (Lu e Vogel, 2009).

O ciclo de vida da mosca da fruta é composto por fases bem distintas (Figura 7). Os estágios embrionário, larval, de pupa e adulto representam oportunidades únicas para avaliar a sensibilidade à exposição de xenobióticos no sistema nervoso. Durante as primeiras horas do desenvolvimento, o embrião é um sincício onde os

núcleos dividem-se e migram em um citoplasma comum (Foe *et al.*, 1993). Cerca de quatro horas após a fertilização, as primeiras manifestações morfológicas da gastrulação podem ser observadas no embrião em formação. A transição da blástula intermediária para gástrula ocorre em determinados grupos celulares com diferença de até 2 horas. Movimentos morfogenéticos permitem ao embrião estabelecer uma organização elaborada do plano corporal, subdividindo-o em três folhetos germinativos: ectoderme, mesoderme e endoderme. A especificação da neuroectoderme envolve a participação da proteína *Short gastrulation* e a diferenciação de suas células darão origem aos precursores do sistema nervoso central de *Drosophila sp* (Gilbert, 1997). O sistema nervoso central de *Drosophila sp* compreende o cérebro e o cordão nervoso ventral. A neuroectoderme subdivide-se formando o cordão nervoso ventral e células progenitoras do cérebro, como neuroblastos e glioblastos. Cada neuroblasto dá origem a uma célula ganglionar mãe (Kim *et al.*, 2007).

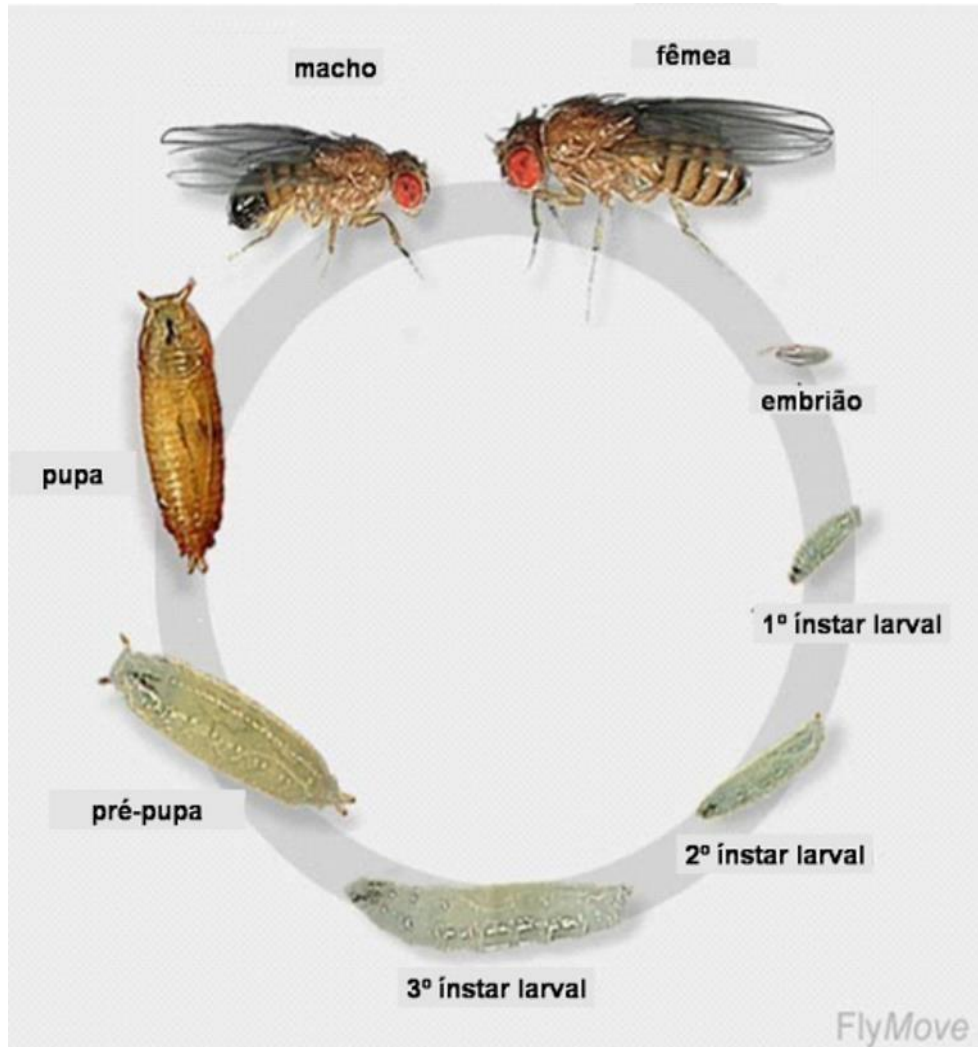


Figura 7. Ciclo de vida da mosca da fruta (Weigmann et al., 2003).

Cerca de 24 horas após a fertilização os embriões eclodem e as larvas que emergem alimentam-se do substrato onde os ovos foram postos (Tyler, 2000). As larvas passam por 3 trocas de cutícula chamadas de *instars*. O primeiro e o segundo *instar* tem duração de cerca de 24 horas cada. O hormônio juvenil mantém as características imaturas e atua modulando negativamente a ação do hormônio ecdisona, prevenindo a metamorfose em estágios larvais. A passagem do primeiro para o segundo *instar* é coordenada pela ação do hormônio juvenil que age fazendo a manutenção da forma corpórea enquanto a ecdisona induz a troca do exoesqueleto (Truman e Riddiford, 2007). O primeiro pulso de ecdisona durante o terceiro *instar* dispara um comportamento de fuga do substrato e dá início ao estágio

de pré-pupa (Greenspan, 1997). Durante o começo da formação da pupa o hormônio juvenil volta a dar um salto e rapidamente volta a níveis muito baixos (Truman e Riddiford, 2007). O segundo pulso de ecdisona dá início ao estágio de pupa, onde a pupa formada tem aparência mais escura e endurecida. Neste estágio, o hormônio juvenil encontra-se em níveis muito baixos ou inexistentes. Após o segundo pulso de ecdisona e a formação completa do pupário, a larva sofre metamorfose. A morte celular programada dos tecidos larvais, como a histólise da glândula salivar, e diferenciação de células de origem embrionária, como os discos imaginais, dá origem aos tecidos e estruturas adultas. Quando a metamorfose se completa, o indivíduo já adulto rompe a região anterior do pupário e emerge exibindo uma coloração clara, asas não expandidas e abdômen longo. Cerca de oito horas após a emersão, os animais tornam-se maduros sexualmente (Greenspan, 1997).

A soma de aspectos muito bem documentados do desenvolvimento fazem da *D. melanogaster* um modelo especialmente informativo e adaptável para investigar uma ampla variedade de parâmetros toxicológicos relevantes para a biologia animal. Diversos compostos e misturas têm sido investigados para coletar informações toxicológicas necessárias devido ao seu impacto ambiental, como pesticidas, resíduos industriais e até mesmo produtos farmacêuticos. No caso de contaminantes ambientais, existe uma necessidade maior de investigações acerca dos seus efeitos tóxicos quando comparado aos produtos farmacêuticos (Rand, 2010).

Foi demonstrado que a exposição à neurotoxinas produz alterações sinápticas em *D. melanogaster* semelhantes às encontradas em vertebrados (Hirsch *et al.*, 2012; Guo, 2012). Desta forma, parâmetros comportamentais de *D. melanogaster* também são bem documentados. Comportamentos como locomoção, *grooming*, sono, corte e acasalamento são controlados por sistemas de

neurotransmissão bastante conservados e bem descritos em *D. melanogaster*, como o sistema dopaminérgico (Greenspan e Dierick, 2004; Nichols, 2006). Compreender as interações complexas entre os componentes dentro de um sistema biológico que levam a modificações no comportamento ou desenvolvimento podem ser importantes vias de descoberta para mecanismos neurotóxicos.

As características citadas acima somadas ao baixo custo e facilidade de manutenção do cultivo, associados aos mais de cem anos de pesquisas com *D. melanogaster* (Bellen *et al.*, 2010), fazem da mosca da fruta o organismo modelo selecionado por muitos pesquisadores.

3.4. Sistema dopaminérgico de *D. melanogaster*

O sistema nervoso de insetos é composto por um cordão nervoso ventral que forma uma cadeia de gânglios, as fibras nervosas viscerais, aferentes e eferentes. Os gânglios são grupos de corpos celulares de neurônios que funcionam como centros de integração do sistema nervoso. A *D. melanogaster* possui um gânglio na região anterior do corpo onde os neurônios reunidos formam um agrupamento maior, o cérebro, um centro de integração mais complexo (Figura 8) (Moyes e Schulte, 2010).

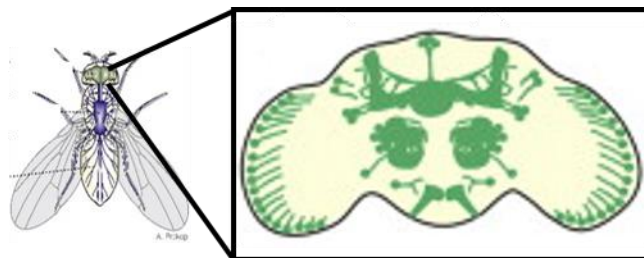


Figura 8. Sistema nervoso da *D. melanogaster*. O sistema nervoso é composto pelo cordão nervoso ventral e os gânglios, como por exemplo o cérebro. As regiões marcadas em verde representam porções ocupadas por neurônios dopaminérgicos. Adaptado de Inagaki e colaboradores (2012).

Em comparação ao córtex de vertebrados, a *D. melanogaster* apresenta uma estrutura chamada corpos pedunculados (em inglês: *mushroom bodies*) localizados no cérebro (Heisenberg, 1998; Zwarts *et al.*, 2015). Essas estruturas são formadas por milhares de células nervosas, conhecidas como células de Kenyon, unidas paralelamente e separadas do resto do cérebro por uma fina bainha de células gliais. Avaliação imuno-histoquímica demonstrou que diversos neurotransmissores são utilizados pelas células de Kenyon, inclusive dopamina (DA) (Heisenberg, 1998).

Diversos estudos de imagem foram realizados a fim de determinar a localização dos neurônios dopaminérgicos no cérebro da mosca da fruta. Foram identificados três grupos simétricos nos dois lóbulos do cérebro da larva, os quais estão distribuídos ao longo do comprimento do gânglio ventral (Pallanck e Whitworth, 2005). Na mosca adulta, foram identificados seis principais grupos dispostos simetricamente em relação à linha média com os corpos celulares residentes na periferia do cérebro e seus axônios projetados para o centro (Nässel e Elekes, 1992).

A neurotransmissão dopaminérgica de *D. melanogaster* apresenta muita similaridade com mamíferos. A DA é sintetizada a partir do aminoácido tirosina que serve de substrato inicial para a síntese de outras catecolaminas. A conversão do aminoácido tirosina à DA depende da ação de duas enzimas: a tirosina hidroxilase (TH) e a L-aminoácido descarboxilase aromática (DOPA descarboxilase). A enzima regulatória desta via é a TH, que converte tirosina em diidroxifenilalanina (DOPA). A DOPA, por sua vez, é convertida até DA por ação da enzima DOPA descarboxilase (Goodman e Gilman, 2006) (Figura 9). Após sintetizada, a DA é transportada para uma vesícula sináptica através do transportador vesicular de monoaminas (VMAT –

do inglês *vesicular monoamine transporter*) e liberada na fenda sináptica onde interage com seus receptores específicos (Grygoruk *et al.*, 2014).

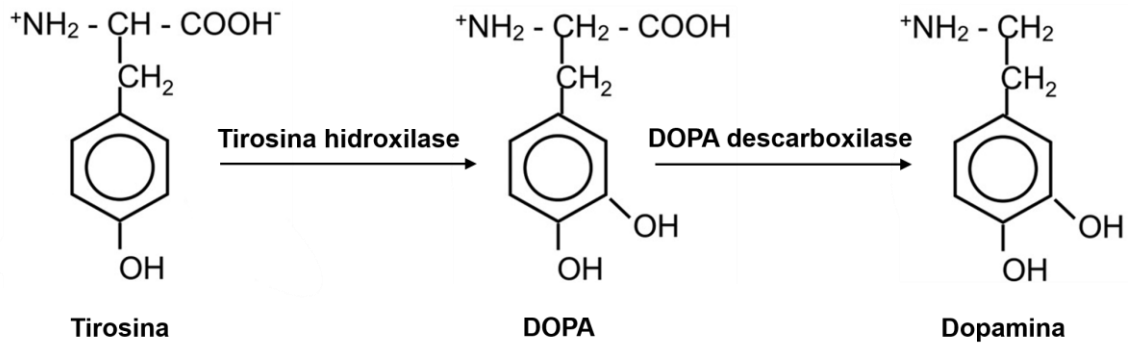


Figura 9. Síntese de dopamina. O aminoácido tirosina é convertido à DA pela ação das enzimas TH e DOPA descarboxilase. Adaptado de Goodman e Gilman (2006).

A TH é altamente conservada entre espécies evolutivamente divergentes. Em *D. melanogaster*, esta enzima apresenta 50% de homologia com a enzima de mamíferos (Neckameyer e Quinn, 1989). Além disso, os receptores de DA de *D. melanogaster* também são bastante semelhantes aos receptores de mamíferos, tanto em caracterização farmacológica como em vias de transdução de sinais (Nichols, 2006).

O genoma de *D. melanogaster* codifica quatro receptores de DA todos acoplados a proteína G. Dois receptores são homólogos de receptor D1 de mamíferos (D1-like): o Dop1R1 (homologia de 49-53% com receptor D1 de mamíferos) (Kim *et al.*, 2003) e o Dop1R2 (Han *et al.*, 1996). O receptor Dop1R2 é também conhecido como DAMB (do inglês *dopamine receptors in mushroom bodies*) e é expresso exclusivamente nas células de Kenyon dos corpos pedunculados (Han *et al.*, 1996). O receptor Dop2R é homólogo de receptor D2 de mamíferos (D2-like) (Hearn *et al.*, 2002). Assim como em mamíferos, o receptor D2-like de *D. melanogaster* atua como um receptor de neurônios pré-sinápticos, reduzindo a liberação de DA (Vickrey e Venton, 2011). Um quarto receptor, chamado DopEcR, é

ativado por DA e interage com esteroides, porém difere de qualquer um dos subtipos clássicos de vertebrados (Srivastava *et al.*, 2005).

A ativação dos receptores D1-like associados a proteína G estimulatória (Gs) leva a produção de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) pela ativação da enzima adenilato ciclase (Nichols, 2006). O AMPc gerado ativa a proteína quinase A (PKA) que fosforila canais de cálcio dependentes de voltagem (Rosenbaum *et al.*, 2009). A ativação do receptor D2-like acoplado a proteína G inibitória (Gi) modula negativamente a atividade da adenilato ciclase, reduzindo a concentração de AMPc e ativando canais de potássio (Rosenbaum *et al.*, 2009). O receptor DopEcR possui afinidade tanto para DA como para esteroides. A ligação da DA neste receptor leva ao aumento dos níveis de AMPc e a ligação de esteroides inibe este aumento. Entretanto a afinidade do receptor para esteroides é maior quando comparada a afinidade por DA (Srivastava *et al.*, 2005) (Figura 10).

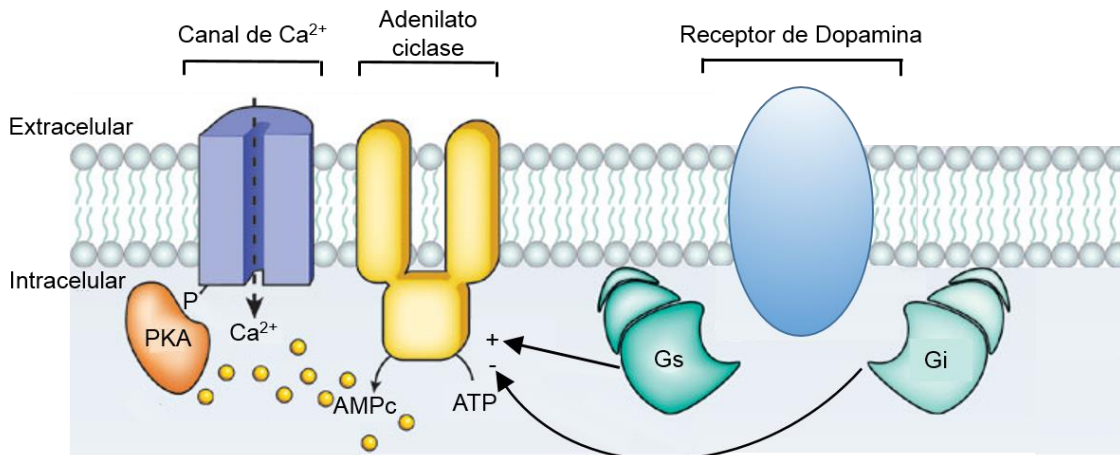


Figura 10. Transdução de sinal dos receptores acoplados a proteína G. Adaptado de Rosenbaum e colaboradores (2009).

A interação da DA com receptores *Dop2R* dos neurônios pré-sinápticos leva a uma modulação negativa na atividade da TH e conseqüentemente à redução na síntese e liberação de DA (Daubner *et al.*, 2011). Outro mecanismo de controle dos

níveis de DA é através da retirada do neurotransmissor da fenda sináptica via transportador de DA (DAT) (Ueno e Kume, 2014). Em *D. melanogaster*, a DA transportada através do DAT é enzimaticamente desativada pela ação da enzima N-acetil-transferase que catalisa a N-acetilação de aminas em insetos e é considerada a principal forma de degradação de DA nesses animais (Cheng *et al.*, 2012) (Figura 11).

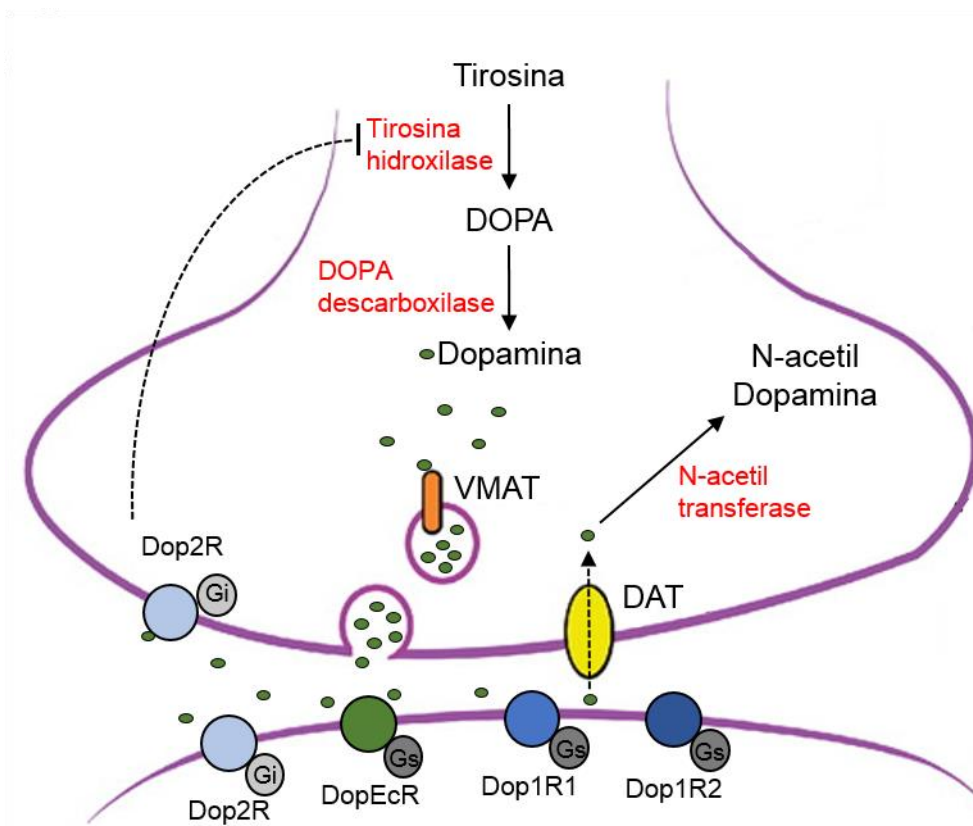


Figura 11. Neurotransmissão dopaminérgica. Adaptado de Shao e colaboradores (2011).

Como relatado anteriormente, diversos parâmetros comportamentais em *Drosophila sp* podem ser modulados por DA. A locomoção é um dos comportamentos mais bem descritos. Em geral, a redução da neurotransmissão dopaminérgica leva à redução da atividade locomotora (Araújo *et al.*, 2015; Sudati *et al.*, 2013). Já o aumento da neurotransmissão dopaminérgica, seja induzido por

metanfetamina como aumentando a expressão de VMAT, produz um aumento da atividade locomotora e redução do comportamento semelhante ao sono (Foltenyi *et al.*, 2007).

Diferentes testes podem ser usados para avaliar a locomoção. O teste de geotaxia negativa, que mede o tempo de escalada, e o teste do *open field* são muito utilizados para avaliar locomoção e comportamento exploratório em *D. melanogaster* (Kaur *et al.*, 2015; Poddighe *et al.*, 2014). Além destes, o tempo de imobilidade e os episódios de *grooming* também podem ser avaliados no teste de *open field*. Estes comportamentos tem uma estreita relação com a neurotransmissão dopaminérgica, assim como a locomoção. Foi demonstrado que a redução da neurotransmissão dopaminérgica aumenta o tempo de imobilidade e o comportamento *sleep-like* e um tratamento farmacológico que potencializa a atividade da DA tem efeito contrário (Foltenyi *et al.*, 2007).

O *grooming* é um comportamento mais complexo. Além de ser modulado por outras aminas biológicas, foi demonstrado que a ativação de diferentes receptores dopaminérgicos pode modular diferentemente o comportamento de *grooming* (Mustard *et al.*, 2010). Além disso, o *grooming* com as pernas traseiras é modulado por receptores dopaminérgicos do cordão nervoso ventral. Já o *grooming* com as pernas dianteiras parece ter maior relação com ativação de receptores dopaminérgicos do cérebro (Pitmon *et al.*, 2016).

Xenobióticos que causam efeitos neurotóxicos frequentemente afetam parâmetros comportamentais (Kaur *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2012). Em mamíferos, a exposição à atrazina pode causar redução da atividade locomotora (Rodríguez *et al.*, 2013). Em *D. melanogaster*, nenhum trabalho foi realizado afim de investigar os efeitos da atrazina em parâmetros comportamentais. Entretanto, a

performance sexual de moscas macho foi afetada após exposição à atrazina, indicando que o comportamento de cópula pode ter sido alterado (Vogel *et al.*, 2015).

3.5. Efeitos do herbicida atrazina e relação com sistema dopaminérgico

Tem sido demonstrado que certos contaminantes podem interferir com a transmissão dopaminérgica. Dentre estes contaminantes podemos citar a atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina) (Figura 12). Esta molécula é um herbicida utilizado mundialmente para o controle de ervas daninhas de folha larga que atua inibindo seletivamente o sistema de transporte de elétrons na fotossíntese (Eldridge *et al.*, 1994). Devido a eficiência e baixo custo, o herbicida atrazina tem sido amplamente utilizado, tornando-se um dos contaminantes ambientais mais comuns (Thornton *et al.*, 2010). Além disso, este herbicida possui alta persistência no solo e potencial de escoamento podendo ser encontrado no ambiente até um ano após sua aplicação (Li *et al.*, 2008). A presença residual e contaminação de água e comida aumenta o risco de intoxicação de organismos não alvo.

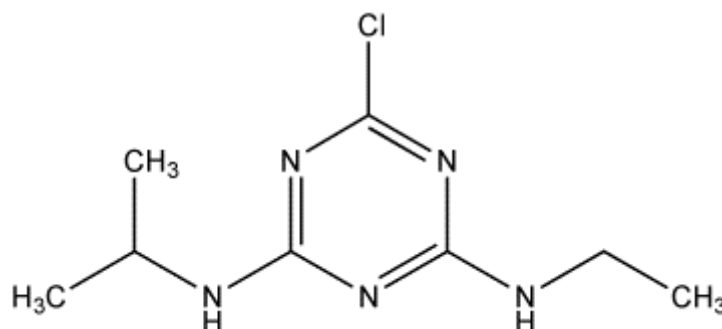


Figura 12. Estrutura molecular do herbicida atrazina. Adaptado de Eldridge e colaboradores (1994).

Estudos *in vivo* com ratos e *in vitro* com células de câncer de mama mostram que atrazina é um desregulador endócrino capaz de induzir efeitos estrogênicos

(Connor *et al.*, 1996). Em modelos experimentais esses efeitos estrogênicos incluem redução nos níveis de testosterona (Friedmann, 2002), picos de prolactina (Cooper *et al.*, 2000), aumento das glândulas mamárias (Cooper *et al.*, 1996) e tumores (Laws *et al.*, 2000). Alguns destes efeitos em mamíferos, como por exemplo os picos de prolactina e hormônio luteinizante, têm sido atribuídos a alterações na atividade dopaminérgica e noradrenérgica no hipotálamo. É possível que as alterações ocorram também em outras vias dopaminérgicas afetando funções cognitivas e locomoção (Cooper *et al.*, 2000).

Um estudo demonstrou que a atrazina afeta a fosforilação oxidativa pela inibição da atividade da ATP sintase (Hase *et al.*, 2008). Apesar deste estudo ter sido realizado em células espermáticas, o estudo conduzido por Lim e colaboradores (2009) demonstrou que a atrazina reduz o conteúdo de ATP no músculo e fígado de ratos expostos cronicamente, indicando uma possível redução da atividade da enzima ATP sintase. Resultado semelhante à este foi demonstrado por Zaya e colaboradores (2011), onde os autores observam um aumento do metabolismo energético que não foi compensado pelo aumento do conteúdo de ATP em rãs expostas à atrazina. A inibição da atividade da ATP sintase pode aumentar a geração de ERO, podendo levar ao estresse oxidativo, bem como causar um desequilíbrio do metabolismo energético.

Diversos estudos em mamíferos mostram que a neurotoxicidade da atrazina se manifesta principalmente pela redução dos níveis de DA estriatal, reduzindo os neurônios dopaminérgicos positivos para TH na substância negra e área ventral tegmentar de ratos e camundongos (Coban e Filipov, 2007; Rodriguez *et al.*, 2005). Entretanto, estudos mostram que este efeito da atrazina parece controverso. O estudo realizado por Lin e colaboradores (2014) relata que a exposição de curto

prazo à atrazina por via oral aumenta o conteúdo de DA no estriado de camundongos machos. Um estudo mais recente realizado por Walters e colaboradores (2015) demonstrou que a exposição à atrazina durante o desenvolvimento gestacional e pós-gestacional induziu déficit locomotor moderado e significativa redução do conteúdo de DA estriatal.

O DAT e o VMAT são responsáveis por proteger os neurônios da oxidação da DA. Uma possível causa da redução da neurotransmissão dopaminérgica induzida por atrazina é a redução da captação de DA para vesícula sináptica através do VMAT (Hossain e Filipov, 2008). O aumento dos níveis de DA livre no citosol podem levar à oxidação da mesma, que pode gerar estresse oxidativo devido ao aumento da geração de ERO e metabólitos reativos, com conseqüente morte de neurônios dopaminérgicos (Coban e Filipov, 2007; Rodriguez *et al.*, 2005). Porém, nenhum estudo foi realizado a fim de avaliar os efeitos da atrazina sobre a neurotransmissão dopaminérgica de *D. melanogaster*.

Tem se demonstrado que este herbicida apresenta potencial tóxico também para drosofilídeos. Thornton e colaboradores (2010) demonstraram que a exposição à atrazina aumenta o conteúdo da enzima amilase em moscas fêmeas. Esse efeito poderia representar um aumento da metabolização de carboidratos e uma possível elevação da taxa metabólica. No teste de mutagênese denominado teste da mancha da asa (em inglês: *wing spot test*) realizado em *Drosophila*, a atrazina apresentou um efeito mutagênico semelhante ao paraquat que teve seu efeito associado ao aumento da produção do O_2^- (Torres *et al.*, 1992). Recentemente foi demonstrado que a atrazina reduz a viabilidade de larvas e altera o desenvolvimento de *D. melanogaster* (Marcus e Fiumera, 2016). Além disso, estes autores demonstraram também que a atrazina reduz a expectativa de vida das moscas expostas durante

sua vida adulta. Estes autores sugerem que a redução na taxa de pupação, taxa de emergência e na expectativa de vida de moscas expostas à atrazina pode ser devido ao aumento da geração de ERO e consequente estresse oxidativo. No entanto, nenhum estudo foi realizado a fim de investigar os mecanismos dessas alterações.

O uso de herbicidas é o método mais comum para controlar ervas daninhas, porém gera impactos negativos sobre os ecossistemas. Os drosofilídeos além de serem utilizados como bioindicadores da saúde dos ecossistemas, possuem grande similaridade genética e bioquímica quando comparados com mamíferos possibilitando assim a investigação de alterações específicas e ainda pouco esclarecidas. Mesmo com a grande exposição ao risco de contaminação pela atrazina ainda sabe-se pouco sobre os efeitos deste herbicida no sistema nervoso central. Com isso, a importância de testar as alterações dopaminérgicas induzidas pela atrazina torna-se evidente.

4. Hipótese

Uma vez que tem-se demonstrado que a exposição à atrazina pode interferir no metabolismo oxidativo e que este processo está diretamente relacionado ao desenvolvimento de alterações neurofisiológicas, a exposição de drosofilídeos à atrazina pode desencadear uma alteração na produção de ERO, acarretando em uma situação de estresse oxidativo, a qual pode levar a um disfunção na produção de neurotransmissores, como a DA, podendo causar alterações comportamentais.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da exposição durante o período embrionário e larval de *D. melanogaster* ao herbicida atrazina no balanço oxidativo bem como no sistema dopaminérgico de moscas adultas recém emergidas.

5.2. Objetivos Específicos

5.2.1. Analisar a viabilidade e a sobrevivência de *D. melanogaster* expostas a diferentes concentrações de atrazina através da dieta durante o desenvolvimento embrionário e larval.

5.2.2. Avaliar os efeitos em parâmetros associados ao estresse oxidativo induzidas pela exposição à atrazina em machos e fêmeas de *D. melanogaster*.

5.2.3. Avaliar possíveis alterações comportamentais relacionadas a toxicidade do herbicida atrazina em machos e fêmeas de *D. melanogaster*.

5.2.4. Verificar componentes chave do sistema dopaminérgico em moscas machos e fêmeas após a exposição à atrazina.

6. ARTIGO

Artigo aceito para publicação na revista *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* (Anexo).

Embryo-larval exposure to atrazine reduces viability and alters oxidative stress parameters in *Drosophila melanogaster*

Fernanda Hernandes Figueira^a, Lais Mattos de Aguiar^a, 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

* Corresponding author at:

Universidade Federal do Rio Grande — FURG, Instituto de Ciências Biológicas
Av. Itália km 8, Campus Carreiros
96203-900 Rio Grande, RS, Brazil.

E-mail address: carlosrosa@furg.br (C.E. da Rosa).

Abstract

The herbicide atrazine has been used worldwide with subsequent residual contamination of water and food, which may cause adverse effects on non-target organisms. Animal exposure to this herbicide may affect development, reproduction and energy metabolism. Here, the effects of atrazine regarding survival and redox metabolism were assessed in the fruit fly *D. melanogaster* exposed during embryonic and larval development. The embryos (newly fertilized eggs) were exposed to different atrazine concentrations (10 μ M and 100 μ M) in the diet until the adult fly emerged. Pupation and emergence rates, developmental time and sex ratio were determined as well as oxidative stress parameters and gene expression of the antioxidant defence system were evaluated in newly emerged male and female flies. Atrazine exposure reduced pupation and emergence rates in fruit flies without alterations to developmental time and sex ratio. Different redox imbalance patterns were observed between males and females exposed to atrazine. Atrazine caused an increase in oxidative damage, reactive oxygen species generation and antioxidant capacity and decreased thiol-containing molecules. Further, atrazine exposure altered the mRNA expression of antioxidant genes (*keap1*, *sod*, *sod2*, *cat*, *irc*, *gss*, *gclm*, *gclc*, *trxt*, *trxr-1* and *trxr-2*). Reductions in fruit fly larval and pupal viability observed here are likely consequences of the oxidative stress induced by atrazine exposure.

Keywords: Herbicide, fruit fly, reactive oxygen species, antioxidant defence

6.1. Introduction

The herbicide atrazine (IUPAC name: 6-chloro-N-methyl-N 0 -isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) has been used worldwide since its production in the '50s (Dong et al., 2009). Due to its low cost and high efficacy, atrazine has persisted in various environmental compartments and subsequently been observed in excess of water quality guideline concentrations, becoming a serious environmental problem (Griboff et al., 2014; Roustan et al., 2014). Residual presence and contamination of water and food is common such that atrazine represents a risk factor for various impacts on non-target organisms. It is documented that atrazine exposure leads to genotoxicity effects (Torres et al., 1992), decreases in reproductive performance (Vogel et al., 2015) and changes in developmental period (Marcus and Fiumera 2016) in drosophilids. Such detrimental effects would be derived from oxidative stress situations induced by atrazine exposure.

Oxidative stress is defined as an imbalance between the antioxidant defence and the generation of reactive oxygen species (ROS) in favour of the latter, resulting in cellular damage (Valavanidis et al., 2006). It has been demonstrated that atrazine has as its molecular target the mitochondrial ATP synthase complex (Hase et al., 2008). Increased ROS generation results from inhibition of ATP synthesis, wherein electron transfer becomes compromised and electron leakage to oxygen may occur (Griboff et al., 2014). In addition, atrazine exposure increases the amylase content in *Drosophila melanogaster*. This effect may indicate an increase in mobilizing carbohydrate reserves and increased energy metabolism (Thornton et al., 2010). As 1-2% of oxygen consumed by an organism is converted into ROS, such an effect would contribute to an increase in ROS generation (Halliwell and Gutteridge 2007). Previous literature indicates that exposure to toxic agents can also decrease

antioxidant defences (Valavanidis et al., 2006). Decreased antioxidant defence, coupled with an increase in ROS generation likely may results in oxidative damage, characterizing an oxidative stress situation.

Molecules with thiol groups, such as glutathione and thioredoxin systems, represent substances with antioxidant capacity that may reduce the toxic potential of xenobiotics and ROS (Lee et al. 2015; Limón-Pacheco and Gonsebatt 2009). The glutathione system is known for its important role in metabolizing xenobiotics via conjugation, which is catalyzed by glutathione S-transferases (Egaas et al., 1993) as well as ROS scavengers (Halliwell and Gutteridge 2007). In addition, other antioxidant defence mechanisms may be activated in order to protect tissues from oxidative damage, such as those provided by catalase and superoxide dismutase, among other antioxidant enzymes (Hermes-Lima and Zenteno-Savín, 2002). These enzymes act directly on ROS to form less toxic and non-toxic compounds such as hydrogen peroxide, oxygen and water (Limón-Pacheco and Gonsebatt 2009; Sichak and Dounce 1986).

Organisms may enhance antioxidant defence systems in stressful situations, as caused by increased ROS levels (Halliwell and Gutteridge 2007). Such enhancements may proceed via transcriptional mechanisms mediated by the NF-E2-related factor 2 (Nrf-2). This transcription factor acts by binding to the electrophile response element (EpRE) in the promoter region of genes related to antioxidant defence. However, ligation to the repressor Kelch like-ECH-associated protein 1 (Keap-1) maintains Nrf-2 in the cytoplasm, blocking the activation of the antioxidant response (Nguyen et al., 2004).

Some studies have examined the effects of atrazine exposure during gestational development in rats (Belloni et al., 2007; Walters et al., 2015) and frogs

(Ji et al., 2016). Recently, Marcus and Fiumera (2016) observed that atrazine exposure causes reduction in viability and alterations in *D. melanogaster* development. Such studies corroborate with previous findings that atrazine exposure during development causes genotoxicity in the same species (Torres et al. 1992). However, no study has been conducted to evaluate the mechanisms behind such development impairment, such as those related to redox metabolism during species development. In this sense, *D. melanogaster* is a widely used model organism to study biological processes and traditionally used in developmental biology (Jennings, 2011), and is considered powerful in toxicological studies (Rand, 2010). Therefore, studying the effects of atrazine exposure in *D. melanogaster* may provide relevant information to ascertain the environmental health risks associated with exposure.

Considering the importance of oxidative stress regarding the development, lifespan and reproduction of *D. melanogaster*, and the lack of information about the possible involvement of oxidative stress in the toxicity mechanism of atrazine, the goal of this study was to evaluate possible changes induced by atrazine in survival and redox metabolism of flies exposed during embryonic and larval stages.

6.2. Materials and methods

6.2.1. Animals

D. melanogaster wild type strains were provided by the Santa Maria Federal University – Brazil (Universidade Federal de Santa Maria – UFSM) and maintained in the Terrestrial Animal Room of the Federal University of Rio Grande – Brazil (Universidade Federal do Rio Grande – FURG). The flies were maintained at 25 °C under a light/dark cycle of 12 h in conventional medium as described by Aguiar et al. (2016).

6.2.2. *Experimental protocol*

The parental generation of flies were allowed to lay eggs into Petri dishes with medium (50% of banana and 1.5% of agar). After 24 h, the flies were removed, the embryos collected and transferred to vials with 30ml of the experimental medium (basic composition: 1% brewer's yeast, 2% sucrose, 1% powdered milk, 1% agar, 0.08% Nipagin dissolved in ethanol and added before boiling). The embryos were divided into four groups of 30 embryos each: control (C), ethanol (EtOH – 0.02%), 10 μ M and 100 μ M of atrazine (ATZ) (Sigma Aldrich - St. Louis, MO). The ethanol group was added as a vehicle control, since the atrazine was dissolved in ethanol with a final ethanol concentration of 0.02% (in accordance with previous studies). Atrazine concentrations were chosen based on previous results that showed reductions in embryonic and larval viability in higher concentrations (data not shown). The concentration employed in the present study (equivalent to 2.25mg/kg and 22.54mg/kg and) were 1000 and 100 times higher than the maximum limit of atrazine residue in foods (0.25 mg / kg) allowed by the National Health Surveillance Agency (ANVISA – Brazil) (ANVISA, 2003) It is important to note that the variables analysed in the present study presented no significant differences between control group and vehicle control group. The embryos were allowed to develop until emergence. After emergence, adult flies of all groups were sexed and employed for further analysis. As atrazine is considered a molecule that possesses neurological action, analyses concerning oxidative stress effects were conducted on tissues from dissected fly heads. All analyses were done with flies separated by gender.

6.2.3. *Survival analyses*

Survival analyses consisted of six independent experiments containing at least three replicates of each treatment, in vials containing 30 embryos each. The pupation

rate in each vial was calculated by dividing the number of pupae by the number of embryos at the beginning of the experiment (Pupation rate = # of pupae / # of total embryos). The adult emergence rate was calculated by dividing the number of adult flies by number of pupae (Emergence rate = # of adult flies / # of pupae) observed in each vial. The development time was evaluated by counting days until adult fly emergence. The vials were observed every 24h for any emerged adult flies. In addition, sex ratio of the emerged flies was analysed. Data is shown as a percentage, considering the total number of male and female flies as 100%.

6.2.4. ROS levels and antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP)

ROS levels were measured based on the protocol of Myhre and Fonnum (2001). Pools of five fly heads ($n = 7$) and five larvae (L3) (6 day old) from all experimental groups were dissected and homogenized in cold buffer (100 μ l, Tris-HCl 10 mM, pH 7.2), centrifuged (2000 x g, 20 min at 4 °C). A supernatant aliquot (10 μ l) was incubated at 25 °C with 2,7-dichlorofluorescein diacetate (H₂DCF-DA 2.4 mM – Sigma). H₂DCF-DA oxidation was determined every 5 minutes over a 120 minutes period using a fluorometer (488 nm for excitation and 525 nm for emission). Fluorescence area was calculated and standardized for μ g of protein. ACAP was measured based on Amado et al. (2009). Pools of ten fly heads ($n = 7$) from all experimental groups were dissected and homogenized in cold buffer (80 μ l, Tris-HCl 10 mM, pH 7.2), centrifuged (2000 x g, 20 min at 4 °C). The supernatant aliquot (10 μ l) was incubated with H₂DCF-DA with and without 2,2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (ABAP 4 mM - SIGMA) for 35 minutes at 37 °C. This temperature is necessary for ABAP thermolysis and the generation of peroxyradicals. Fluorescence was determined (every 5 minutes) using a fluorometer (488 nm for excitation and 525 nm for emission). The fluorescence area for each

group was determined, and ACAP levels were calculated via the following equation: $1 / (\text{area with ABAP} - \text{area without ABAP}) / \text{area without ABAP} / \mu\text{g protein}$. Protein content was measured based on the Bradford (1976) method with bovine serum albumin curve as standard.

6.2.5. Content of thiol groups

Total (Total-SH) and non-protein (NP-SH) thiol groups were measured based on Ellman (1959) with minor modifications. Fly heads were dissected and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ before total thiol determination. Pools of ten fly heads ($n = 5$) were homogenized in cold buffer (100 μl , Tris-HCl 10 mM, pH 7.2) and centrifuged (2000 \times g, 20 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). For Total-SH a supernatant aliquot (12.5 μl) was incubated for 30 minutes at room temperature with 12.5 μl of DTNB (5 mM) in a medium containing 225 μl potassium phosphate buffer (1 M, pH 7.4). For NP-SH quantification, supernatant was precipitated with 10% trichloroacetic acid (1 : 1 v / v) and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. Then, a supernatant aliquot was incubated in the same conditions for total thiol. The absorbance was measured at 412 nm. A standard curve of GSH (2 – 40 μM) was employed for each measurement. The protein thiol groups (P-SH) were calculated by Total-SH – NP-SH. Data was expressed as μM of GSH / μg of protein.

6.2.6. Lipid peroxidation

For lipid peroxidation analysis, pools of six fly heads ($n = 6$) were collected after adult emergence and frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. The tissues were homogenized in 100 μl of cold methanol following centrifugation at 1000 \times g for 5 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. An aliquot of the supernatant (15 μl) was added to 175 μl of ultra pure water, 35 μl of xylenol orange (1 mM), 35 μl of sulphuric acid (0.25 mM) and 90 μl of ferrous sulphate (1

mM). Lipid peroxidation was determined spectrophotometrically (550 nm), with cumene hydroperoxide (SIGMA – 0.175 mM) as a standard (Jiang et al., 1992).

6.2.7. RT-PCR

Adult flies (1 day old) were dissected on ice, and heads were collected (pools of 25 heads, n = 5 - 6). RNAs were extracted with the TRIZOL reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. RNA integrity was checked using electrophoresis gel analysis (1% agarose) and subsequent quantification was performed spectrophotometrically (260 and 280 nm). RNA concentration was standardized (0.0088 µg/µl for males and 0.0092 µg/µl for females) for subsequent cDNA confection employing the High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions.

The cDNA sequences were amplified by Real-Time PCR analysis using GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega) and Termocycler ABI 7300 Applied Biosystems. The following genes from the antioxidant defence system were analyzed after atrazine exposure: kelch-like ECH-associated protein 1 (*keap1*), superoxide dismutase isoform 1 (*sod*) and isoform 2 (*sod2*), catalase (*cat*), immune regulated catalase (*irc*), glutathione synthetase (*gss*), glutamate cysteine ligase modulator (*gclm*) and catalytic (*gclc*) subunits, thioredoxin (*trxt*), thiorredoxin reductase isoform 1 (*trxr-1*) and isoform 2 (*trxr-2*). The primers were previously described in Aguiar et al. (2016). PCR amplification efficiency was determined from serial dilution of cDNA derived from tissue (range of the dilution factor - 10, 20, 40, 80, 160). The slope of standard curve was considered adequate when as close to -3.3 (-3.5 and -3.1) and r^2 0.9 - 0.99. All the primers employed reached this parameter. For gene expression analyses cDNA was used in a dilution of 40x. The tubulin (*βtub56d*) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*gpdh*) were used as housekeeping

genes. The stability of housekeeping genes (β tub56d and *gdph*) was tested with geNorm software (Vandesompele et al., 2002). The gene expression was calculated via the relative gene quantification divided by the calculated normalization factor and expressed relative to the control group.

6.2.8. Statistical analyses

Statistical analyses were conducted using the Graphpad Prism 5. Data were analysed by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test when appropriate. Chi-square test was used to evaluate the sex ratio. Significance levels were considered when $p < 0.05$.

6.3. Results

6.3.1. Atrazine developmental effects

The animals exposed to atrazine concentrations of 100 μ M presented a reduction in pupation rate ($p < 0.05$) when compared to all groups tested (Figure 1A). The pupation rate was 24.99% lower when compared with the control group, 16.24% when compared with the ethanol group and 14.36% when compared to the group exposed to atrazine at concentration of 10 μ M. Animals exposed to concentrations of 10 μ M of atrazine showed a reduction in emergence rate of 34.99% and 32.79% when compared to control and ethanol groups, respectively (Figure 1B). Flies exposed to concentrations of 100 μ M of atrazine showed a reduction in the emergence rate of 27.95% and 25.74% when compared to control and ethanol groups, respectively. Development time was not significantly altered by exposure to atrazine for both males and females (Figure 1C). In addition, sex ratio showed no significant difference between the experimental groups (Figure 1D).

6.3.2. Biochemical analyses

Exposure to atrazine did not alter ROS levels in larvae after exposure to atrazine from embryonic development (Figure 2), as well as no alter ROS levels in males exposed to atrazine during embryonic and larval development ($p > 0.05$; Figure 3A). However, females exposed to atrazine at 10 μM showed increases in ROS levels of 17.47% when compared to the control group and 21.01% when compared to the ethanol group ($p < 0.05$). Flies exposed to atrazine during embryonic and larval development showed significant alteration in ACAP (Figure 3B). In males exposed to concentrations of 10 μM of atrazine, the decrease in ACAP was 38.25% when compared to the control group and 41.32% when compared to the ethanol group ($p < 0.05$). Males exposed to 100 μM of atrazine also showed decreases in ACAP, of 34.32% and 37.58% when compared to control and ethanol groups, respectively ($p < 0.05$). Females exposed to 10 μM of atrazine showed an increase in ACAP ($p < 0.05$) of 127% and 149% when compared to control and ethanol groups, respectively. Exposure to the atrazine concentration of 100 μM in females reduced ACAP by 47.05% and 41.8% when compared to control and ethanol groups, respectively ($p < 0.05$).

Male and female flies were tested to measure oxidative lipid damage (Figure 3C). Females flies exposed to atrazine at the concentration of 100 μM presented significant increases in oxidative damage ($p < 0.05$) by 74.67% when compared to the control group.

With respect to thiol groups, P-SH (Figure 3D) and NP-SH (Figure 3E) did not present any significant differences between groups ($p > 0.05$). However, female flies exposed to atrazine at concentrations of 10 μM showed a decrease in Total-SH content ($p < 0.05$) of 27.4% when compared to the control group.

6.3.3. Effects of atrazine on antioxidant defence gene expression profile

In order to further understand the effect of atrazine on oxidative status, mRNA gene expression of antioxidant response was determined. Interestingly, atrazine did not affect mRNA expression of *keap* gene in male flies (Figure 4A). However, in female flies, atrazine significantly increased *keap* mRNA transcription levels in both tested concentrations ($p < 0.05$). Exposure to the atrazine concentration of 10 μM increased *keap* mRNA gene expression by 130.6% and 138.3% when compared to control and ethanol groups, respectively. Moreover, atrazine exposure at 100 μM increased *keap* transcription levels by 149.1% and 156.8% when compared to control and ethanol groups, respectively.

Both males and females exposed to atrazine showed no change in mRNA gene expression of *sod* (Figure 4B) and *sod2* (Figure 4C). *Cat* and *irc* genes displayed different expression patterns between males and females exposed to atrazine. There was a reduction in *cat* expression in males exposed to atrazine at 10 μM (59.48%) and 100 μM (69.34%) when compared with the control group (Figure 4D) ($p < 0.05$). As depicted in Figure 4E, females exposed to atrazine at 10 μM showed a significant reduction in *irc* mRNA expression when compared with the control (67.93%) and ethanol (49.04%) groups ($p < 0.05$). This reduction was by 64.32% and 45.43% when flies were exposed to atrazine at a concentration of 100 μM were compared with control groups and ethanol, respectively ($p < 0.05$).

Atrazine did not alter *gss* mRNA gene expression (Figure 5A). However, *gclm* and *gclc* genes displayed different expression patterns between males and females exposed to atrazine. Female flies exposed to atrazine at a concentration of 10 μM showed significant increases in *gclm* mRNA transcription levels compared with the control (65.27%), ethanol (76.06%) and 100 μM (67.03%) atrazine groups (Figure 5B) ($p < 0.05$). As depicted in Figure 5C, the concentration of 100 μM atrazine

caused significant increases in *gclc* mRNA transcription levels compared with the control (315.7%), ethanol (293.7%) and 10 μ M (312.5%) atrazine groups ($p < 0.05$) in male flies.

Male flies exposed to atrazine at a concentration of 100 μ M during embryonic and larval development showed significant increases in *trxt* mRNA transcription levels compared with the control (184.8%), ethanol (192.8%) and 10 μ M (156.9%) atrazine groups (Figure 6A) ($p < 0.05$). In addition, the concentration of 100 μ M atrazine caused significant increases in *trxr-2* mRNA transcription levels by 94.62% when compared with the control group ($p < 0.05$) in male flies (Figure 6C). However, atrazine exposure did not cause changes in the *trxr-1* mRNA gene expression in males (Figure 6B). Female flies exposed to atrazine during embryonic and larval development did not alter *trxt* (Figure 6A), *trxr-1* (Figure 6B) and *trxr-2* (Figure 6C) mRNA gene expression.

6.4. Discussion

Few studies have been dedicated to understanding the mechanisms of atrazine toxicity in *D. melanogaster*. The aim of the present study was to evaluate the effects of atrazine on young adult flies exposed during embryonic and larval development in order to understand the mechanisms of toxicity. Our results indicate that atrazine causes reductions in larval and pupal viability, alterations in oxidative status and alterations to gene expression related to redox metabolism.

Atrazine caused effects on embryo/larval development; specifically a reduction in pupation and emergence rates in flies exposed to atrazine during development. The present results corroborate with previous studies, which demonstrate that atrazine concentrations similar to this study (9.2 μ M and 92 μ M), caused a reduction

in pupated and emerged proportions in fruit flies (Marcus and Fiumera 2016). In addition, the authors observed that atrazine exposure to the same concentrations accelerated adult emergence and reduces lifespan. However, results of the present study show that atrazine does not alter development time. Such differences between results may reflect the way the data were collected. Here, vials were observed each 24 h for adult fly emergence, while observations were made at 8 to 10 hour intervals in the study conducted by Marcus and Fiumera (2016). The authors suggest that these effects were a result of atrazine increasing ROS and thus inducing oxidative stress. This hypothesis was checked in the present study. As atrazine inhibits the mitochondrial ATP synthase complex (Hase et al., 2008), mitochondrial dysfunction may result in overproduction of ROS. Contrary to this, it was demonstrated in the present study that exposure to atrazine does not alter the ROS levels in larvae exposed during embryonic and larval development. So, the alteration observed in redox metabolism in adults would occur due to atrazine effects occurring during or after metamorphosis.

In this sense, ROS levels in adult flies exposed to atrazine during embryonic and larval development were analyzed. Male flies exposed to atrazine did not present alteration in ROS levels and females exposed to atrazine at 10 μ M presented increases in ROS levels. In order to investigate the mechanisms of atrazine toxicity, the present study evaluated the oxidative status of adult fruit flies exposed to atrazine. ACAP levels, thiol group content and lipid damage in adult flies exposed to atrazine during embryonic and larval development were analyzed.

One of the consequences of imbalance between ROS generation and antioxidant defences in favour of the former is the generation of an oxidative stress situation, culminating in oxidative damage such as lipid peroxidation. Lipid damage is

a process in which ROS reacts with lipids, especially polyunsaturated fatty acids (Yin et al., 2011). In the present study, male flies exposed to atrazine did not present alteration in ROS levels and did not induce lipid damage. However, a decrease in ACAP was observed. The reduction in ACAP without an increase in ROS levels does not appear to be able to cause lipid damage in the tissues in males, unlike females. However, this situation was able to induce some genes from the antioxidant defence system. Considering females, flies exposed to atrazine at 100 μM presented a reduction in ACAP although ROS levels have not been altered. However, females presented increases in lipid damage at this concentration. These results are consistent with the hypothesis that atrazine alters energy metabolism in males and females differently (Thornton et al., 2010). Thornton et al. (2010) reports that atrazine exposure increases amylase content in female flies. The authors suggest that this increase in amylase content may increase the mobilization of carbohydrate reserves. It is possible that this supposed increase in energy metabolism, accompanied by a reduction in ACAP shown in this study, contributes to the oxidative stress situation in females exposed to atrazine at 100 μM . This reduction would represent the consumption of low molecular weight components from the antioxidant pool in animals exposed to the higher concentration.

The present results show that the effects of atrazine are dose-dependent. Females exposed to atrazine at 10 μM presented increases in ROS levels. As previously reported, atrazine inhibits the activity of ATP synthase (Hase et al., 2008). With ATP synthesis compromised, the atrazine exposure may be compromising overall energy metabolism. This would result in an increase in energy metabolism and increased oxygen consumption, further increasing electron leakage to oxygen and subsequent ROS levels. An increase in ACAP was also observed at this

concentration. This result suggests that atrazine exposed flies had protected the tissue from lipid damage, representing an upregulation of antioxidant defences to compensate for situations of increased ROS levels (Halliwell and Gutteridge 2007).

Many important molecules for redox/xenobiotic metabolism are dependent on thiol groups, such as molecules of the glutathione system (Lee et al., 2015). Glutathione transferase is an important enzyme that acts on atrazine metabolism in both vertebrates and invertebrates (Egaas et al., 1993). Previous studies show that the glutathione S-transferase enzyme content present significant upregulation in female flies exposed to atrazine, while males present significant down-regulation (Thornton et al., 2010). Although no effect was found in P-SH and NP-SH content, female flies exposed to atrazine at a concentration of 10 μ M showed a decrease in Total-SH content. Thiol-containing molecules are used as markers of oxidative stress, represented by glutathione (low molecular mass) and some proteins (high molecular mass) (Droge, 2002). Goldfish exposed to triazine metribuzin presented reductions of 28% in low molecular mass thiol in liver tissue (Maksymiv et al., 2015). Thus, it is possible to assume that females exposed to concentrations of 10 μ M increase ACAP via thiol-containing molecules, supporting detoxification of atrazine.

As previously mentioned, an increase in ROS levels may disconnect NRF-2 from keap and induce transcription of an antioxidant response (Nguyen et al., 2004). Therefore, evaluating expression of the *keap1* gene is very useful in toxicological tests, as it is a target of *Nrf-2* regulation (Dinkova-kostova et al., 2005). Atrazine exposure caused induction of *keap1* mRNA gene expression in females in both concentrations tested. Several xenobiotics promote increases in *keap1* mRNA gene expression in *D. melanogaster*. Abolaji et al. (2014) report that adult flies exposed to 4-vinylcyclohexene showed increased expression of *keap1* mRNA. Similarly, Aguiar

et al. (2016) report increased expression of *keap1* mRNA in adult flies exposed to the herbicide Roundup. Atrazine exposure causes imbalances in redox state by increasing ROS levels and/or reducing ACAP, which may cause oxidative stress and induction of *keap1* mRNA gene expression.

Superoxide dismutases are enzymatic oxygen radical scavengers that catalyse the conversion of superoxide into hydrogen peroxide, thereby reducing its toxic effects in tissues (Limón-Pacheco and Gonsebatt 2009). Hydrogen peroxide is then converted to water by catalase activity. Catalase is a heme-containing enzyme that does not depend on thiol groups in the catalytic site to act as a peroxidase (Sichak and Dounce 1986). Although our results show that atrazine exposure did not alter *sod* and *sod2* mRNA expression, a reduction in catalase gene expression was observed in both genders. However, *cat* and *irc* genes displayed different expression patterns between males and females exposed to atrazine. Catalase is very efficient, such that changes in activity of this enzyme are more related to varied rates of its synthesis and degradation (Bewley and Laurie-Ahlberg 1984). Immune-regulated catalase is a secretory form of catalase that acts by minimizing oxidative stress provoked during gut infection (Ryu et al., 2010). The reduction in catalase gene expression may be involved in reduction of ACAP, except for females exposed to 10 μ M of atrazine.

Glutathione synthesis is a highly important mechanism in redox regulation (Dalle-Donne et al., 2007). Further, the glutathione system has extreme importance in atrazine metabolism as GSTs catalyse the conjugation of glutathione with atrazine in order to detoxify and excrete this substance (Egaas et al., 1993). The activity of glutamate cysteine ligase is a rate-limiting step in the synthesis of glutathione, whose last stage reaction is catalysed by the glutathione synthetase enzyme (White et al.,

2003). Females exposed to atrazine presented increased *gclm* mRNA gene expression only when exposed to concentrations of 10 μ M. This increase may be involved in ACAP increases, since its interaction with the catalytic subunit with modifier subunits improves its catalytic properties, reducing k_m (Solis et al., 2002).

Thioredoxin is a protein disulphide oxido-reductase that acts by reducing thiol groups of proteins. The thioredoxin reductase is the enzyme that alters the oxidized and reduced states of thioredoxin (Limón-Pacheco and Gonsebatt 2009). In addition, longevity and resistance to oxidative stress in adult flies has been reported as related to overexpression of *trxr-2* (Svensson and Larsson 2007). Atrazine exposure increased *trxt* and *trxr-2* mRNA gene expression in males exposed during embryonic and larval development, but not in females. Thus, it is possible to assume that the thioredoxin system in males may provide greater resistance to the toxicity of atrazine, reducing cellular proteins through its redox-active property.

In conclusion, atrazine exposure during embryonic and larval development is capable of inducing oxidative stress in *D. melanogaster*. In addition, atrazine exposure causes alterations in the gene expression profile related to antioxidant defence. The present results support the hypothesis of redox imbalance as toxicity mechanism of atrazine. Since our analyses were performed on the heads of flies, these results suggest that atrazine exposure can increase the risk of neurodegenerative diseases.

Acknowledgements. Figueira FH is a PhD student fellow from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). The authors would like to gratefully acknowledge João Batista Teixeira da Rocha and Ronaldo Medeiros Golombieski for gently providing the *D. Melanogaster* stock. This study was supported by the National Institute of Science and Technology – Aquatic Toxicology

(INCT-TA) from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

6.5. References

- Abolaji, A.O., Kamdem, J.P., Lugokenski, T.H., Nascimento, T.K., Waczuk, E.P., Farombi, E.O., Loreto, É.L.D.S., Rocha, J.B.T., 2014. Involvement of oxidative stress in 4-vinylcyclohexene-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic. Biol. Med.* 71, 99–108.
- Aguiar, L.M., Figueira, F.H., Gottschalk, M.S., Da Rosa, C.E., 2016. Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 185–186, 94–101.
- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.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. *Sci. Total Environ.* 407, 2115–2123.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2003. Consulta Pública nº 50 de nove de julho de 2003.
- Belloni, V., Alleva, E., Dessì-Fulgheri, F., Zaccaroni, M., Santucci, D., 2007. Effects of low doses of atrazine on the neurobehavioural development of mice. *Ethol. Ecol. Evol.* 19, 309–322.
- Bewley, G.C., Laurie-Ahlberg, C.C., 1984. Genetic variation affecting the expression of catalase in *Drosophila melanogaster*: correlations with rates of enzyme synthesis and degradation. *Genet. Soc. Am.* 106, 435–448.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R., Milzani, A., 2007. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.*
- Dinkova-kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kensler, T.W., 2005. The Role of Keap1 in Cellular Protective Responses. *Chem. Res. Toxicol.* 18, 1779–1791.
- Dong, X., Zhu, L., Wang, J., Wang, J., Xie, H., Hou, X., Jia, W., 2009. Effects of

- atrazine on cytochrome P450 enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 77, 404–412.
- Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
- Egaas, E., Skaare, J.U., Svendsen, N.O., Sandvik, M., Falls, J.G., Dauterman, W.C., Collier, T.K., Netland, J., 1993. A comparative study of effects of atrazine on xenobiotic metabolizing enzymes in fish and insect, and of the in vitro phase II atrazine metabolism in some fish, insects, mammals and one plant species. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp.* 106, 141–149.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.
- Griboff, J., Morales, D., Bertrand, L., Bonansea, R.I., Monferrán, M.V., Asis, R., Wunderlin, D.A., Amé, M.V., 2014. Oxidative stress response induced by atrazine in *Palaemonetes argentinus*: The protective effect of vitamin E. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108, 1–8.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine, Free Radical Biology and Medicine*.
- Hase, Y., Tatsuno, M., Nishi, T., Kataoka, K., Kabe, Y., Yamaguchi, Y., Ozawa, N., Natori, M., Handa, H., Watanabe, H., 2008. Atrazine binds to F1F0-ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 66–72.
- Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress, in: *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. pp. 537–556.
- Jennings, B.H., 2011. *Drosophila - a versatile model in biology & medicine*. *Mater. Today* 14, 190–195.
- Ji, Q., Lee, J., Lin, Y.H., Jing, G., Tsai, L.J., Chen, A., Hetrick, L., Jocoy, D., Liu, J., 2016. Atrazine and malathion shorten the maturation process of *Xenopus laevis* oocytes and have an adverse effect on early embryo development. *Toxicol. Vitr.* 32, 63–69.
- 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. *Anal. Biochem.* 202, 384–389.
- Lee, S.Y., Lim, I.A., Kang, G.U., Cha, S.J., Altanbyek, V., Kim, H.J., Lee, S., Kim, K., Yim, J., 2015. Protective effect of *Drosophila* glutathione transferase omega 1

- against hydrogen peroxide-induced neuronal toxicity. *Gene* 568, 203–210.
- Limón-Pacheco, J., Gonsebatt, M.E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*
- Maksymiv, I. V., Husak, V. V., Mosiichuk, N.M., Matviishyn, T.M., Sluchyk, I.Y., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2015. Hepatotoxicity of herbicide Sencor in goldfish may result from induction of mild oxidative stress. *Pestic. Biochem. Physiol.* 122, 67–75.
- Marcus, S.R., Fiumera, A.C., 2016. Atrazine exposure affects longevity, development time and body size in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*
- 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. *Biochem. Pharmacol.* 62, 119–128.
- Nguyen, T., Yang, C.S., Pickett, C.B., 2004. The pathways and molecular mechanisms regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic. Biol. Med.*
- Rand, M.D., 2010. Drosophotoxicology: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 74–83.
- Roustan, A., Aye, M., De Meo, M., Di Giorgio, C., 2014. Genotoxicity of mixtures of glyphosate and atrazine and their environmental transformation products before and after photoactivation. *Chemosphere* 108, 93–100.
- Ryu, J.H., Ha, E.M., Lee, W.J., 2010. Innate immunity and gut-microbe mutualism in *Drosophila*. *Dev. Comp. Immunol.*
- Sichak, S.P., Dounce, A.L., 1986. Analysis of the peroxidatic mode of action of catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* 249, 286–295.
- Solis, W.A., Dalton, T.P., Dieter, M.Z., Freshwater, S., Harrer, J.M., He, L., Shertzer, H.G., Nebert, D.W., 2002. Glutamate-cysteine ligase modifier subunit: Mouse Gclm gene structure and regulation by agents that cause oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 63, 1739–1754.
- Svensson, M.J., Larsson, J., 2007. Thioredoxin-2 affects lifespan and oxidative stress in *Drosophila*. *Hereditas* 144, 25–32.
- Thornton, B.J., Elthon, T.E., Cerny, R.L., Siegfried, B.D., 2010. Proteomic analysis of

atrazine exposure in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Chemosphere* 81, 235–241.

Torres, C., Ribas, G., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R., 1992. Genotoxicity of four herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res. Toxicol.* 280, 291–295.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178–189.

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 Biol.* 3, RESEARCH0034.

Vogel, A., Jocque, H., Sirot, L.K., Fiumera, A.C., 2015. Effects of atrazine exposure on male reproductive performance in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 72, 14–21.

Walters, J.L., Lansdell, T.A., Lookingland, K.J., Baker, L.E., 2015. The effects of gestational and chronic atrazine exposure on motor behaviors and striatal dopamine in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 289, 185–192.

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

Yin, H., Xu, L., Porter, N.A., 2011. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chem. Rev.* 111, 5944–5972.

6.6. Legends

Figure 1. Effects of atrazine exposure during embryonic and larval development on pupation rate (A), emergence rate (B), development time to emergence (C) and sex ratio (D). Data represents mean \pm SEM. Different letters represent significant differences between experimental groups ($p < 0.05$).

Figure 2. ROS levels in larvae after exposure to atrazine from embryonic development. Data represents mean \pm SEM.

Figure 3. ROS levels (A), antioxidant capacity (B), lipid peroxidation (C), protein thiol levels (D), non-protein thiol levels (E) and total thiol levels (F) in male and female flies after exposure to atrazine during embryonic and larval development. Data represents mean \pm SEM. Different letters represent significant differences between experimental groups ($p < 0.05$).

Figure 4. Gene Expression of *keap* (A), *sod* (B), *sod2* (C), *cat* (D) and *irc* (E) in male and female flies exposed to atrazine during embryonic and larval development. Data represents mean fold induction \pm SEM relative to control group animals. Different letters represent significant differences between experimental groups ($p < 0.05$).

Figure 5. Gene Expression of *gss* (A), *gclm* (B) and *gclc* (C) in male and female flies exposed to atrazine during embryonic and larval development. Data represent mean fold induction \pm SEM. Different letters represents significant differences between experimental groups ($p < 0.05$).

Figure 6. Gene Expression of *trxt* (A), *trxr-1* (B) and *trxr-2* (C) in male and female flies exposed to atrazine during embryonic and larval development. Data represents mean fold induction \pm SEM. Different letters represent significant differences between experimental groups ($p < 0.05$).

Figure 1.

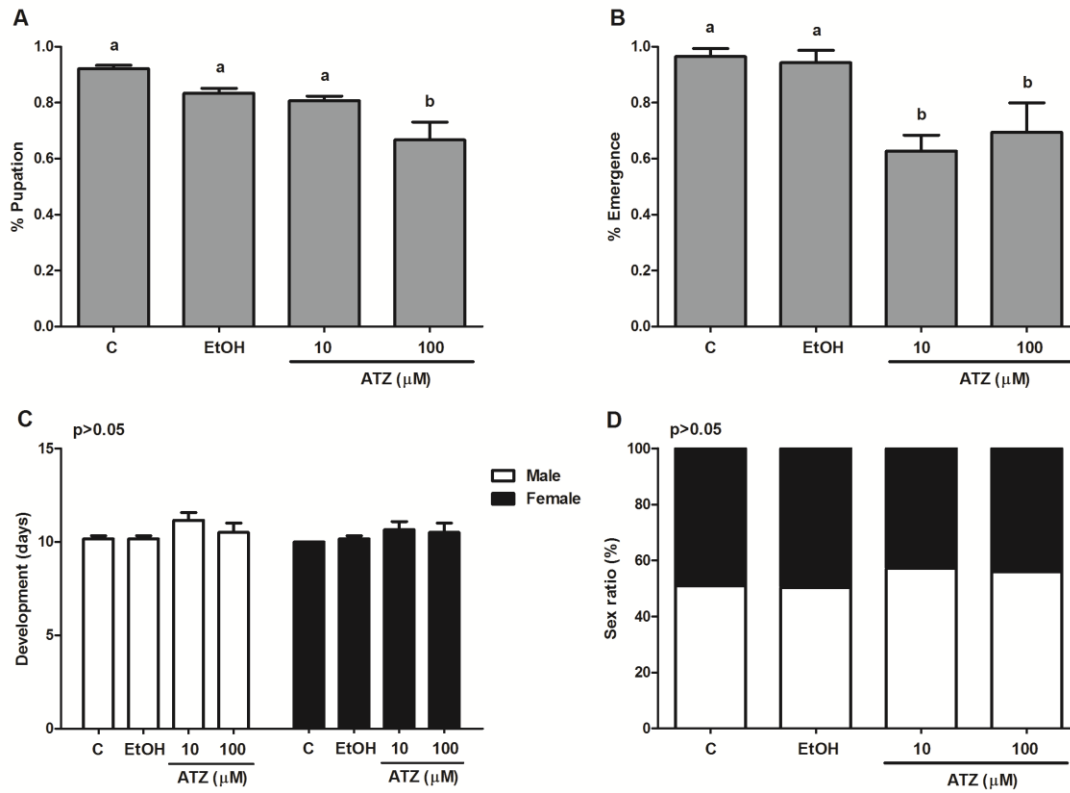


Figure 2.

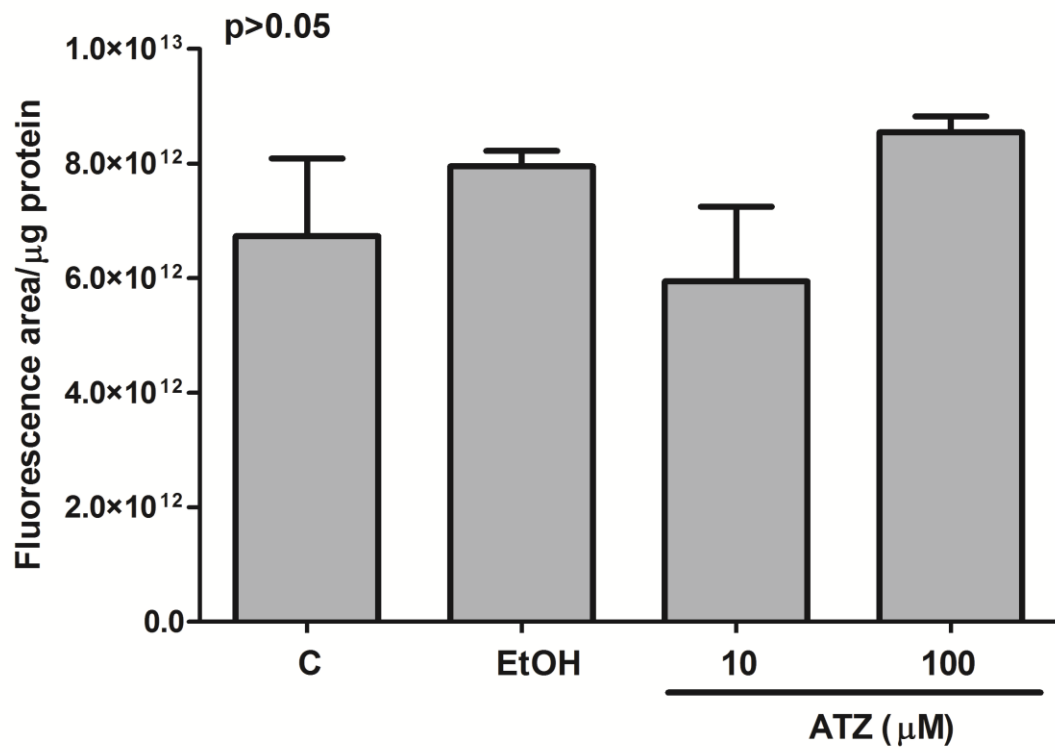


Figure 3.

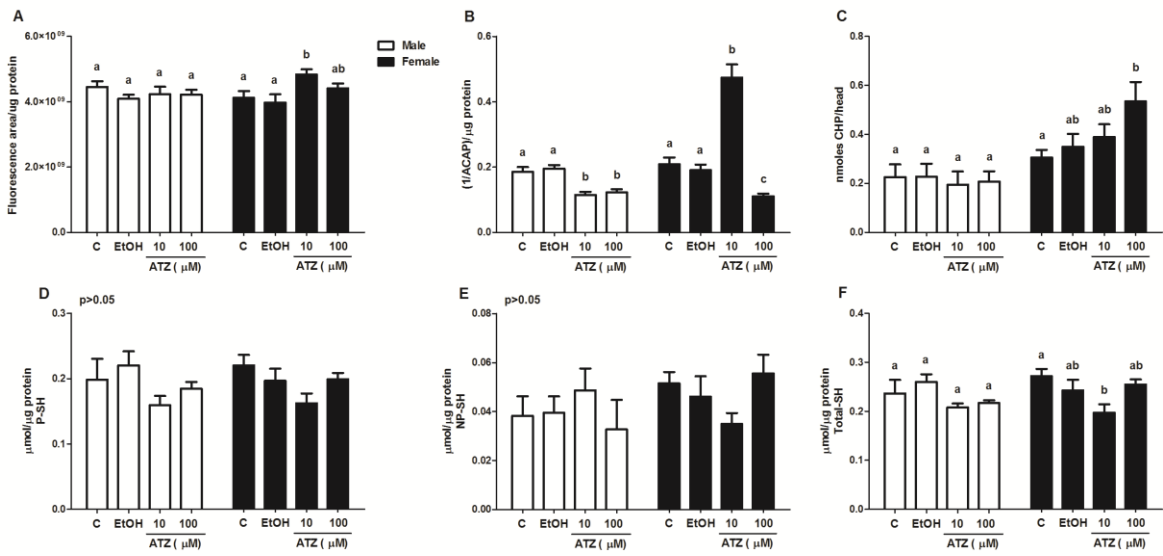


Figure 4.

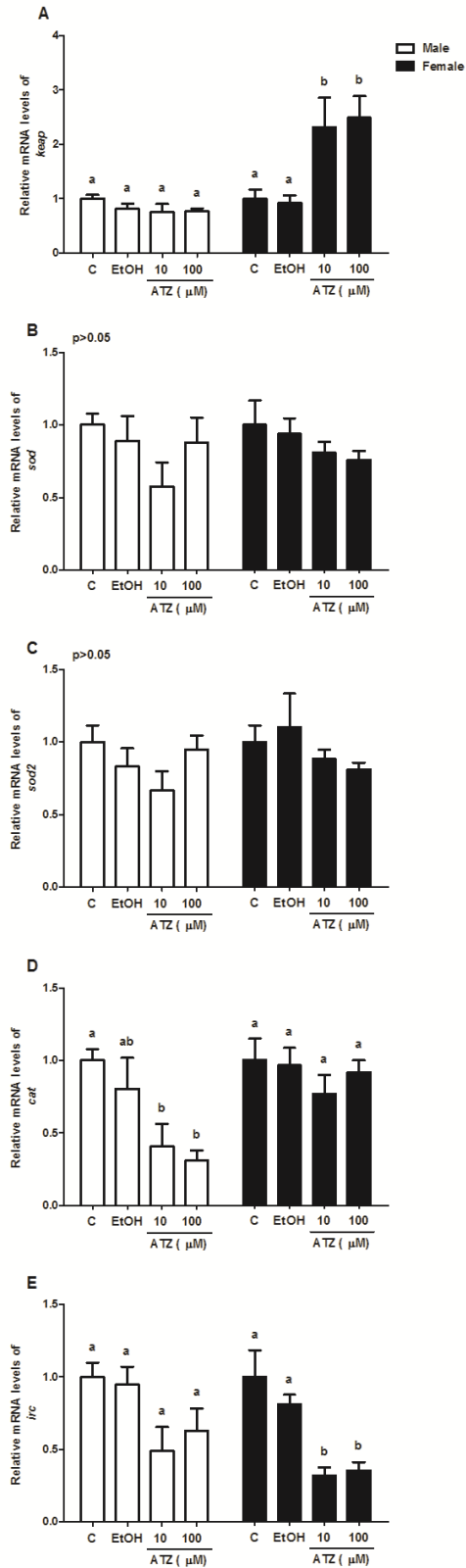


Figure 5.

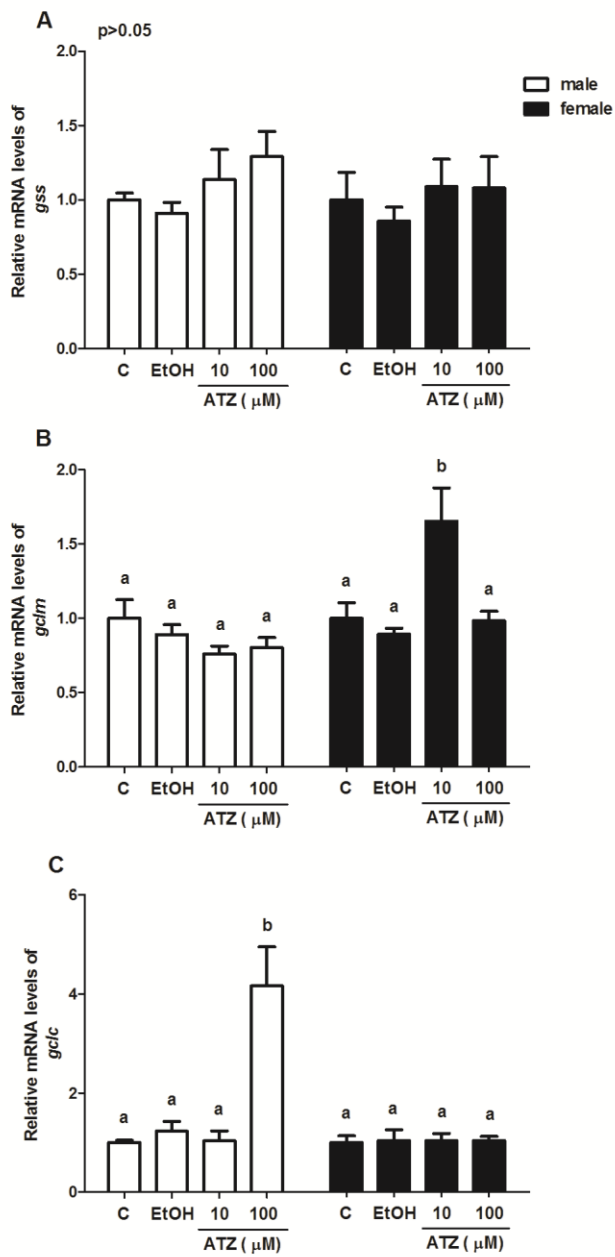
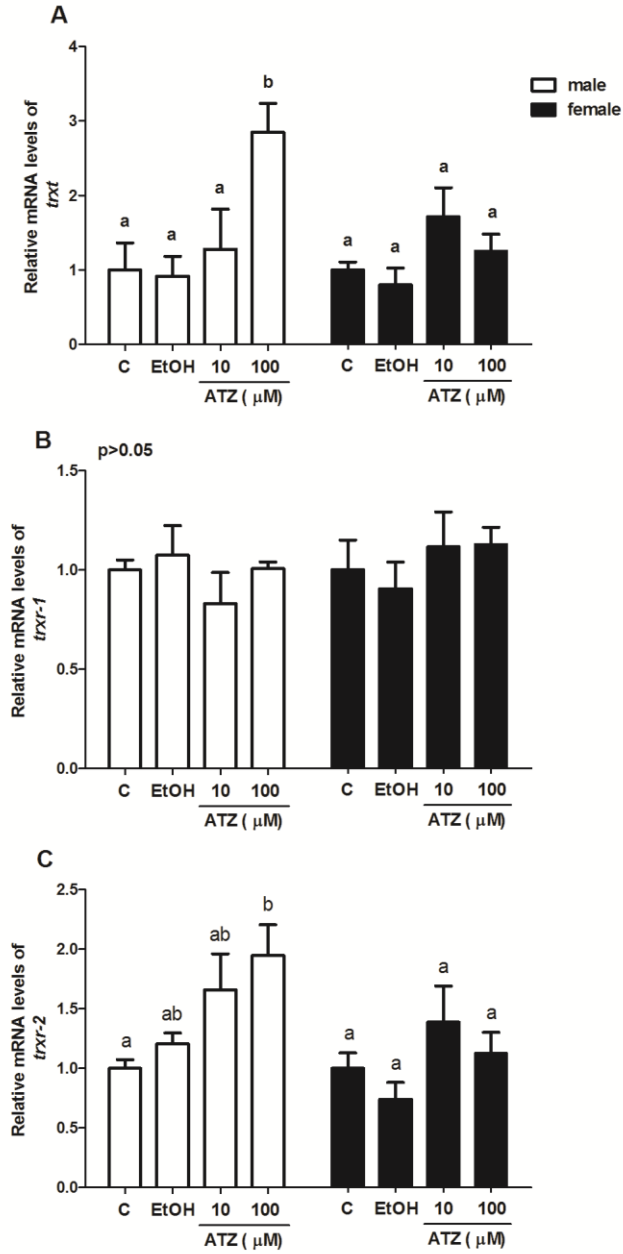


Figure 6.



7. MANUSCRITO

Manuscrito a ser submetido para a revista *Environmental Pollution*.

Atrazine exposure alters behaviour and disrupt dopaminergic system in *Drosophila melanogaster*

Fernanda Hernandes Figueira^a, Natália de Quadros Oliveira^b, Lais Mattos de Aguiar^a, Ana Laura Escarrone^b, Daniela Martí Barros^a, Ednei Gilberto Primel^c, Carlos Eduardo da Rosa^{a*}

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

^b Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Av. Itália km 8, Campus Carreiros, 96203-900 Rio Grande, RS, Brazil.

^c Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Av. Itália km 8, Campus Carreiros, 96203-900 Rio Grande, RS, Brazil.

* Corresponding author at:

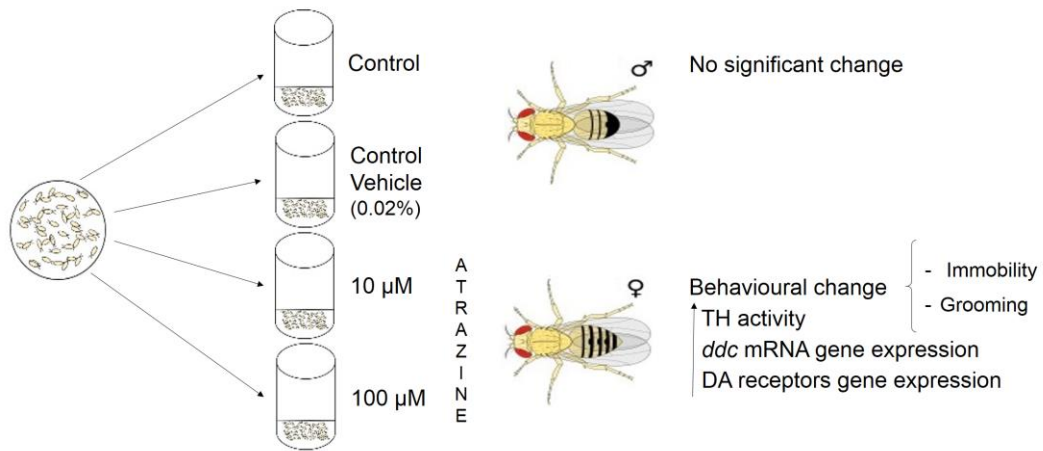
Universidade Federal do Rio Grande — FURG, Instituto de Ciências Biológicas
Av. Itália km 8, Campus Carreiros
96203-900 Rio Grande, RS, Brazil.

E-mail address: carlosrosa@furg.br (C.E. da Rosa).

Abstract

Various environmental pollutants are known to cause damage to the dopaminergic system due to energy imbalance. Atrazine is an extensively used worldwide herbicide and due to this it has become one of the most common environmental contaminants and effects on dopaminergic neurotransmission in mammals were previously demonstrated. Here, the effects of atrazine regarding behaviour and dopaminergic neurotransmission parameters were assessed in an insect model, the fruit fly *D. Melanogaster*, exposed during embryonic and larval development. The embryos (newly fertilized eggs) were exposed to two atrazine concentrations (10 μ M and 100 μ M) in the diet until the adult fly emerged. Negative geotaxis assay as well as exploratory behaviour, immobility time and number of grooming episodes in an open-field system were accessed. Also, tyrosine hydroxylase (TH) activity and gene expression of the dopaminergic system were evaluated in newly emerged male and female flies. All the parameter analysed in male flies were not significantly modified by atrazine exposure. By the other hand, female flies exposed to atrazine at 10 μ M presented an increased in immobility time and a reduction in exploratory activity in the open field test that was offset by increases in number of grooming episodes. Also, female flies exposed to 100 μ M of atrazine presented an increased in immobility time. The DOPA decarboxylase and dopamine (DA) receptors gene expression were also increased only in females. . It is possible to assume that female flies were more sensitive to the neurotoxic effects of atrazine due to increased oxidative effect previously described.

Keywords: Atrazine; Herbicide; Dopamine; Grooming; Immobility.

Graphical abstract

7.1. Introduction

The atrazine (IUPAC name: 6-chloro-N-methyl-N 0 -isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine) is an herbicide that due to efficiency, low cost and massive application worldwide, has become one of the most common environmental contaminants (Griboff et al., 2014; Roustan et al., 2014). Residual presence and contamination of water and food is common and due to these atrazine exposure represents a risk factor for various impacts on non-target organisms (Thornton et al., 2010). Among this impacts, various environmental pollutants, including atrazine, are known to cause damage to the dopaminergic system (Wilson et al., 2014).

Previous studies show that atrazine exposure reduces dopamine (DA) content in mammals (Bardullas et al., 2011; Coban and Filipov, 2007; Walters et al., 2015). Dopamine is a neurotransmitter that coordinates locomotion, cognition as wells as endocrine secretion. Due to the conservation of dopaminergic system and the relative simplicity of its nervous system, *D. melanogaster* is considered a good model to evaluate dopaminergic function (O’Kane, 2011) and the action of molecules that interferes with such system. In this sense, *Drosophila melanogaster* is a widely used model organism to toxicological studies and its one of the most important organisms for the environmental stress research (Rand, 2010). Functional parallels exist between the fly and mammalian dopaminergic systems, with both playing roles in modulating locomotor activity, sexual function (Wicker-Thomas and Hamann, 2008). As in mammals, *D. melanogaster* synthesizes DA through the coordinate action of the enzyme tyrosine hydroxylase (TH) and DOPA decarboxylase (DDC) from the aromatic amino acid tyrosine (Livingstone and Tempel, 1983). In addition, the DA receptors in flies are also quite similar to mammals in both pharmacological characterization and signal transduction pathways (Nichols, 2006). Four DA

receptors have been identified in *D. Melanogaster*. D2-like receptor, Dop2R is a receptor that transduces its signal via inhibitory G proteins, which lead to inhibition of adenylate cyclase (Hearn et al., 2002). Orthologs of mammalian D1 receptors, Dop1R1 and Dop1R2 (DAMB - DA receptor exclusively expressed in the Mushroom Bodies) are coupled to stimulatory G proteins thereby triggering activation of adenylate cyclase (Han et al., 1996; Kim et al., 2003). The DopEcR (DA/ecdysteroid receptor), is a receptor different of any of the classical vertebrate DA receptor subtypes, its activation by DA increases cAMP levels and the binding of ecdysteroids to this receptor can inhibit the effects of DA (Srivastava et al., 2005). The action of DA transporter (DAT) pumps the neurotransmitter of synaptic cleft back into cytosol of pre-synaptic neuron (Ueno and Kume, 2014), which is consequently acetylated by DA N-acetyltransferase (AANAT) leading to its degradation (Cheng et al., 2012).

In *D. melanogaster*, it is known that reduced dopaminergic neurotransmission can cause reduction on locomotor activity (Hanna et al., 2015; Sudati et al., 2013). It is also known that grooming episodes can be modulated by DA in insects and such modulation depends on which DA receptor type was stimulated (Mustard et al., 2010). Considering this aspects, any substance that interferes with components of dopaminergic neurotransmissions would interfere with such behaviours that are essential for the survival and reproduction this animals.

Recently, it was demonstrated that atrazine exposure alters development in *D. melanogaster* (Marcus and Fiumera, 2016) and increases energy metabolism in female flies (Thornton et al., 2010). In previous studies we have demonstrated that female flies exposed to atrazine during embryonic and larval development showed significant increase in the reactive oxygen species levels (Figueira et al., 2017). However, no study has been conducted in order to evaluate the effects of atrazine on

the dopaminergic neurotransmission of *D. melanogaster*. Considering that atrazine exposure and oxidative stress situation would lead to neurological disorders, the goal of the present study was to evaluate the atrazine effects on behaviour and dopaminergic system of flies exposed during embryonic and larval stages. Our results demonstrated that atrazine exposure alters behaviour of female flies possibly due to modulation in dopaminergic system.

7.2. Materials and methods

7.2.1. Animals

D. melanogaster wild type strains were provided by the Santa Maria Federal University – Brazil (Universidade Federal de Santa Maria – UFSM) and maintained in the Terrestrial Animal Room of the Federal University of Rio Grande – Brazil (Universidade Federal do Rio Grande – FURG). The flies were maintained at 25 °C under a light/dark cycle of 12 h in in vials (300mL) containing a banana based medium (Figueira et al., 2017)

7.2.2. Experimental protocol

The basic experimental protocol for atrazine exposure was the same previously employed in Figueira et al. (2017). The parental generation of flies were allowed to lay eggs into Petri dishes with medium (50% of banana and 1.5% of agar). After 24 h, the flies were removed, the embryos collected and transferred to vials with 30ml of the experimental medium (basic composition: 1% brewer's yeast, 2% sucrose, 1% powdered milk, 1% agar, 0.08% Nipagin dissolved in ethanol and added before boiling). The embryos were divided into four groups of 30 embryos each: control (C), ethanol (EtOH – 0.02%), 10 µM and 100 µM of atrazine (Sigma Aldrich - St. Louis, MO). The ethanol group was added as a vehicle control, since the atrazine

was dissolved in ethanol with a final ethanol concentration of 0.02%. Atrazine concentrations were chosen based on previous results that showed reductions in embryonic/larval viability and an imbalance on redox metabolism (Figueira et al., 2017). It is important to note that the variables analysed in the present study presented no significant differences between control group and vehicle control group. The embryos were allowed to develop until adulthood. After emergence, adult flies of all groups were sexed and employed for further analysis. All analyses were done with flies separated by gender.

7.2.3. Quantification of atrazine

Atrazine concentration in culture medium was quantified by HPLC-DAD to check the real value in the exposure medium. Analysis was performed according Zhou et al. (2006) by a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) provided with an LC-10ADvp pump, SIL-10Avp automatic injector, SPD-10 Avp UV–Vis. detector and SLC-10Avp controller with CLASS-VP software. Chromatographic separations were achieved by a Waters 4.6 x 15 mm ODS 2 (5 μm) column. The mobile phase consisted of a mixture of ACN and ultra-pure water, with a composition of 70/30 (v/v), respectively, and a 0.5 mL min^{-1} flow. The injection volume was 20 μL and the detector was set at 223 nm. The sample preparation technique used was the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) method (Anastassiades et al., 2003). This method has been employed for the extraction of several group of pesticides, pharmaceuticals and personal care products from solids and semi solid samples (Escarrone et al., 2014; Prestes et al., 2009). An aliquot of 10 g sample was weighed and placed directly into a polypropylene tube (50 mL capacity), Then, 10 mL acetonitrile acidified with 1% acetic acid (v/v) was added to perform the extraction. The mixture was manually shaken for 1 min. Afterwards, 6 g anhydrous magnesium

sulfate (MgSO_4) and 1.5 g anhydrous sodium acetate (CH_3COONa) were added to the mixture and, then, it was manually shaken for 1 min. Finally, the tube was centrifuged at 5000 rpm for 1 min. An aliquot of the supernatant was injected into the HPLC-DAD.

For the sample preparation, sodium chloride and glacial acetic acid 96% were purchased from Merck (RJ, Brazil). Sodium acetate 99.5% and magnesium sulfate anhydrous were bought from JT Baker, Mallinckrodt (NJ, USA). LC-grade methanol and acetonitrile were purchased from Mallinckrodt (Phillisburg, NJ, USA). Atrazine analytical standard (purity > 99%) was purchased from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil). Water was purified by a Direct-Q UV3 (resistivity 18.2 M cm, Millipore, USA) water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

7.2.4. Behavioural analyses

The negative geotaxis assay ($n = 13 - 15$) was evaluated according to Poddighe et al. (2014) with some modifications. The flies were placed individually into tubes with 20 cm length and 6 cm diameter. The tubes were gently tapped to the flies got down to the bottom. This assay was repeated three times at 1 min intervals and video recorded to later analyses. The climbing time crossing up to the 8cm mark of the tube was registered. Data is shown as the mean time climbing in seconds obtained with each fly.

An open field apparatus was developed in order to check exploratory behaviour. It consists in a petri dish (85mm in diameter and 2mm in height) placed on a millimetered marked paper. The flies ($n = 15/\text{treatment}$ and sex) were anaesthetized on ice for a few seconds and individually transferred to the apparatus. After 10 min of recovery from anaesthesia, flies were allowed to walk freely and the video recording was performed for 5 min to analyze locomotion, immobility and

grooming. Locomotion was evaluated according to Angus (1974) with modifications. The number of squares crossed during 5 min was registered. Data is shown as a number of crossings. During the evaluation of locomotion, an immobility period was observed among the experimental groups. Because of this, the immobility time was also analysed during this 5min period. Data is shown as immobility time in seconds. Grooming was evaluated according to Kaur et al. (2015). The grooming episodes were analysed during a 5min period. Data is shown as a number of grooming episodes.

All behavioural studies were performed at 25 °C, under adequate daylight and -between 9am and 4pm. The total number of flies analysed by gender were fifteen of each experimental group from five independent experiments.

7.2.5. TH activity

For TH activity analysis, pools of 15 fly heads ($n = 5 - 6$) were collected after adult emergence and frozen at -80°C . The tissues were homogenized in cold buffer (250 μl , Tris-HCl 0.05 M, pH 7.2) and centrifuged (12,000 rpm, 5 min at 4°C). An aliquot of the supernatant (100 μl) was added to 100 μl of mixture containing HEPES (100mM), tyrosine (100 μM) and sodium periodate (200 μM). TH activity was determined spectrophotometrically (475 nm) for 30 minutes at 25°C . Production of L-DOPA was determined using a molar extinction coefficient for dopachrome of $\epsilon = 3,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Vermeer et al., 2013). Protein content was measured based on the Bradford (1976) method with bovine serum albumin curve as standard (ranging from 2.5 μg to 30 μg).

7.2.6. RT-PCR

In order to further understand the effect of atrazine in dopaminergic neurotransmission, we determined the levels of mRNA gene expression for dopaminergic system considering its biosynthesis, degradation, transporter and its receptors. Adult flies (1 day old) were dissected on ice, and heads were collected (pools of 25 heads, n = 5 - 6). Total RNA was extracted with the TRIZOL reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. RNA integrity was checked using electrophoresis gel analysis (1% agarose) and subsequent quantification was performed spectrophotometrically (260 and 280 nm). RNA concentration was standardized for subsequent cDNA confection employing the High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions.

cDNA sequences were amplified by Real-Time PCR analysis employing the GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega). The following genes from the dopaminergic neurotransmission were analyzed after atrazine exposure: tyrosine hydroxylase (*ple*), DOPA decarboxylase (*ddc*), DA N acetyltransferase (*aanat1*), DA transporter (*dat*), D1-like receptor 1 (*dop1r1*), D1-like receptor 2 (*dop1r2* or *damb*), DA/ecdysteroid receptor (*dopecr*) and D2-like receptor (*dop2r*) (Table 1). PCR amplification efficiency was determined from serial dilution of cDNA and was considered adequate when as close to -3.3. The tubulin (*βtub56d*) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*gpdh*) genes were used in order to normalize gene expression (Table 1). Primers sequences were obtained in previous studies or designed employing the PrimerBlast tool based on specific sequences from each gene published in Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The stability of housekeeping genes was tested with geNorm software (Vandesompele et al., 2002). The gene expression was calculated via the relative gene quantification divided by the calculated normalization factor and expressed as relative to the control group.

7.2.7. Statistical analyses

Atrazine effects in each gender were accessed separately. Data were analysed by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test when appropriate. The pre-requisites of homogeneity and normality were previously checked and when the pre-requisites were not achieved the data were transformed or analysed by non-parametric tests followed by post hoc Kruskal-Wallis test. Significance levels were considered when $p < 0.05$.

7.3. Results

7.3.1. Atrazine concentration

It was found that the actual value of atrazine was 94.7% of the nominal value of 100 μM ($n = 3$, RSD = 4.54). Considering the lower atrazine concentration, it was found that the actual value of atrazine was 92.7% of the nominal value of 10 μM ($n = 3$, RSD = 4.6).

7.3.2. Atrazine behavioural effects

It is important to emphasize that none of the molecular, biochemical or behavioural parameters analyzed were affected by the vehicle treatment considering both sexes. Embryo-larval exposure to atrazine did not alter behavioural parameters in males (Figure 1). However, females exposed to atrazine presented significant differences in these parameters (Figure 2). The female flies exposed to atrazine concentration of 10 μM presented alteration in exploratory behaviour demonstrated by a 39.47% reduction in the number of crossings when compared to flies exposed to 100 μM of atrazine ($p < 0.05$; Figure 2B). The females exposed to 10 μM of atrazine also presented an increase in immobility time when compared to control (49.68%) and ethanol (63.03%) groups ($p < 0.05$; Figure 2C). There was also significant

increment in immobility time between females exposed to 100 μM of atrazine and those from control (30.97%) and ethanol (42.65%) groups ($p < 0.05$). An increase in grooming episodes in female flies exposed to atrazine concentration of 10 μM was also observed, there about 42.42%, 43.18% and 27.63% when compared to control, ethanol and 100 μM of atrazine groups respectively.

7.3.3. TH activity

Male and female flies were tested to measure TH activity (Figure 3). Exposure to atrazine did not alter TH activity in males exposed to atrazine during embryonic and larval development ($p > 0.05$; Figure 3A). Considering females, animals exposed to atrazine did not presented any significant alteration in TH activity when compared to vehicle control group, although when compared with control group, animals exposed to atrazine at 10 μM and 100 μM showed increases in TH activity of 59.09% and 70.45% ($p < 0.05$; Figure 3B).

7.3.4. Effects of atrazine on dopaminergic system gene expression profile

Male flies exposed to atrazine did not present any alteration on genes related to dopaminergic system when compared with control groups. In contrast, Females flies exposed to atrazine showed increase in levels of mRNA gene expression of all evaluated receptors. Animals exposed to atrazine concentration of 10 μM presented increase in DA decarboxylase (*ddc*) mRNA gene expression about 256% and 249.1% when compared to control and ethanol groups, respectively ($p < 0.05$; Figure 4B). There was an increase in *dop1r1* expression in females exposed to atrazine at 10 μM (131.7% and 119.1%) and 100 μM (110.3% and 97.7%) concentrations when compared to with the control and ethanol groups, respectively ($p < 0.05$; Figure 5B). Increased expression of *dop1r2* was also observed in females exposed to atrazine at

10 μ M when compared to control and ethanol groups (114.5% and 92.8%, respectively) ($p < 0.05$; Figure 4B). The embryo-larval exposure at 100 μ M of atrazine also increased the *dop1r2* mRNA gene expression. This increase was approximately 149.5% and 127.7% when compared to the control and ethanol groups, respectively ($p < 0.05$). There was also an increase in *dopecr* mRNA gene expression in females exposed to atrazine at 10 μ M (144.7% and 161.6%) and 100 μ M (102.5% and 119.4%) concentrations when compared to with the control and ethanol groups, respectively ($p < 0.05$; Figure 4B). The females flies exposed to atrazine at 10 μ M showed an increase in *dop2r* mRNA gene expression of approximately 85.5% compared to control group and 74.5% compared to ethanol group ($p < 0.05$; Figure 3D). The atrazine exposure at 100 μ M also increased *dop2r* gene expression in 92.5% and 81.4% when compared to control and ethanol groups, respectively ($p < 0.05$).

7.4. Discussion

It is recognized that environmental pollutants can caused behavioural alterations in flies. The bisphenol A chronic exposure, i.e., induces an increase in number of grooming episodes in *D. melanogaster* (Kaur et al., 2015), as well as flies exposed to titanium nanoparticles during development decreased climbing assay (Sabat et al., 2016). However, any study has focused on the determination of atrazine neurotoxicity mechanisms in *D. melanogaster* as well as its effects on behaviour. It is documented that atrazine exposure can cause inhibition mitochondrial ATP synthase complex (Hase et al., 2008) which in turns would leads to an alteration in the energy metabolism. Consequently, several biochemical and physiological parameters were affected after atrazine exposure. Such interference may be causing

to the increased reactive oxygen species levels previously observed in heads from *D. melanogaster* females flies (Figueira et al., 2017). Since alteration on energetic balance and oxidative stress situation is closely related to neurophysiological disorders, the aim of the present study was to evaluate the effects of atrazine in dopaminergic system of young adult flies exposed to atrazine during embryonic and larval development. Our results support the hypothesis that the behavioural modulation can be related to alterations on monoaminergic system caused by atrazine.

Male flies exposed to atrazine did not presented behavioural alterations on performed tests. However, atrazine caused behavioural alterations in female flies exposed during development. Female flies exposed to atrazine at 10 μM presented an increment in immobility time and an increase in grooming episodes. These results associated with no change in the negative geotaxis assay indicate that exposure to atrazine does not caused locomotor deficit in flies exposed to this concentration. However, reduction in exploratory behaviour was compensated by grooming episodes. Flies exposed to atrazine at 100 μM presented an increase on immobility time although the number of crossings has not been modified, indicating an increased in velocity of exploratory activity. Our results, corroborates the previous findings that substances that possibly reduces DA signalling in *D. melanogaster* leads to disturbances in behavioural analysis (Araújo et al., 2015).

In order to check this interference in dopaminergic system, we evaluated the TH activity. This enzyme presented a trend to increase after atrazine exposure to both concentrations during embryo-larval development, although there is no difference when compared to vehicle control group. It is known that the TH enzyme is activated by phosphorylation on multiple serine residues that reduces the K_m value

for tetrahydrobiopterin, an essential cofactor for TH activity in *D. melanogaster* (Daubner et al., 2011; Vié et al., 1999). In addition, monoamines are feedback inhibitors of TH enzyme and DA affinity for TH is reduced by phosphorylation (Daubner et al., 2011). The enzymatic and regulatory properties of vertebrate TH are generally conserved in insect (Vié et al., 1999). As in vertebrates, the D2-like receptor antagonist increases TH phosphorylation (Bogomolova et al., 2010) and increase release of DA in *D. melanogaster* (Vickrey and Venton, 2011). Studies demonstrated that atrazine exposure activates the PKA and PKC pathways (Pogrmic-Majkic et al., 2016), but not ERK in cell cultures (Fa et al., 2013). So, the relationship of atrazine with protein kinases can indicate a direct action of atrazine with cell signaling systems that would interfere with TH activity. Another possibility for the modification of TH activity is induction of protein synthesis. However, the *ple* mRNA gene expression was not altered. For this reason, the temporal variation of *ple* mRNA expression should be further considered.

Considering DA synthesis pathway, the DOPA decarboxylase gene expression was also analyzed and it was observed an increase in *ddc* mRNA expression in female flies exposed to atrazine. It has been demonstrated that the blockade of DA receptors increases DDC activity in rat brain, except in the cortex (Cumming et al., 1997). Once the kinetic mechanisms DDC enzyme of *D. melanogaster* is very similar to mammals (Black and Smarrelli Jr, 1986) and the mushroom bodies in insects is compared to the vertebrate cerebral cortex (Heisenberg, 1998; Zwarts et al., 2015), it is possible to assume that atrazine exposure reduces DA neurotransmission resulting in increase of TH activity and increased in DDC activity which was not compensated in all regions of the brain, as mushroom bodies, resulting in increased synthesis of this enzyme. Reinforce the

idea that atrazine would affect dopaminergic system and consequently behaviour, the increase in *ddc* mRNA gene expression is prominent on flies exposed to 10 μ M atrazine, were grooming episodes, a behaviour that is related with mushroom bodies (Mustard et al., 2010), were also affected.

In the present study, atrazine exposure causes induction of DA receptors mRNA gene expression in female flies. Pharmacological reductions of dopaminergic transmission results in elevations of DA receptor protein and gene expression in the central nervous system of mammals (Papp et al., 1994; Xiang et al., 2009). Due to this, it is possible to assume that exposure to atrazine reduces DA levels or its signalling in *D. melanogaster*.

Taken together, our results suggest that DA system is being affected by atrazine and this is leading to behavioural alterations. The extend of such alteration appears to be dependent on the atrazine concentration. The immobility response, when related to behaviour sleep-like, seems to be modulated by dopaminergic neurotransmission in *D. melanogaster* (Foltenyi et al., 2007). Previous studies link sleep-like regulation to mushroom bodies that is necessary for the many responses as learning and memory (Joiner et al., 2006; Pitman et al., 2006). In honeybee, reduction of expression levels of a D1-like receptor, ortholog of the *Drosophila* (Dop1R2 or DAMB - DA receptor in mushroom bodies), reduces the time walking and is offset by increases in grooming behaviour by the forelegs but does not hind legs (Mustard et al., 2010). In the present study, the flies exposed to 10 μ M of atrazine presented an alteration in behavioural parameters. The increased in *ddc* mRNA gene expression and besides behavioural alteration when flies exposed to 10 μ M of atrazine indicates that the toxic effects of this concentration can be acting mostly on mushroom bodies. Thus, it is possible that the increase in antioxidant capacity of

female flies exposed to 10 μM of atrazine described by Figueira et al. (2017), can be preventing further damage, restricting the effects to particular brain regions, such as mushroom bodies.

By the other hand, it was previously demonstrated that the inhibition of DA synthesis by 3-iodo-tyrosine administration increases the behaviour sleep-like but does not alters locomotor activity in *D. melanogaster* (Andreatic et al., 2005). In addition, previous studies have demonstrated that the removal of Dop1R1 by RNAi, a wide expressed receptor in insect brain regions, does not alters the foreleg grooming events as well as locomotor activity when compared wild-type flies (Pitmon et al., 2016). This data is similar to showed in the present study for the female flies exposed to 100 μM of atrazine. The increase of immobility time without altering number of grooming episodes and number of crossings observed in flies exposed to 100 μM indicate that atrazine exposure can be causing reduction in the synthesis of DA and reducing D1-like receptor signalling. In addition, Figueira et al. (2017) demonstrated that atrazine exposure at 100 μM cause increased ROS levels in head of female flies, indicating that, in this concentration, atrazine exposure can be causing a larger extend of damage, differently in flies exposed at 10 μM of atrazine.

Interestingly, it has been shown that impaired mitochondrial function may be the cause of neurodegeneration rather than its consequence (Johri and Beal, 2012). Our results demonstrated that atrazine exposure alters behavioural and biochemical/molecular aspects of DA system only in female flies, and we speculated that female flies were more sensitive to the neurotoxic effects of atrazine due to increased imbalance between ROS generation and the antioxidant mechanisms in favour of the first. According to Figueira et al. (2017), only female flies exposed to atrazine presented increases in ROS levels and lipid damage, unlike the males. Also,

Thornton et al. (2010) reported that atrazine can causing an increase in energy metabolism only in females. In addition, such differences in gender responsiveness to atrazine exposure would be explained due to gender differences in DA systems. Long-term atrazine exposure during pubertal development demonstrated that female rats are more sensitive than male rats, because one year after cessation of atrazine exposure at 25mg/kg since *ple* and *dat* mRNA gene expression was reduced in females but not in males (Li et al., 2014). In this sense, another aspect that has to be considered is that DA contents varies in a gender dependent manner in flies right after its emergence. Marican et al. (2004) demonstrates that after emergence, the DA content in female flies were lower when compared with male ones. So, enzymes related with synthesis/degradation of the neurotransmitter would be differentially regulated between genders and any process that interferes with dopaminergic system at this time would causes different consequences from the genders, as observed in the present study. In conclusion, atrazine exposure during embryonic and larval development is capable of inducing behaviour alterations and disrupt DA neurotransmission in *D. melanogaster* female flies.

Acknowledgements

Figueira FH and Aguiar LM are PhD students followed from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. Daniela Martí Barros is a research fellow from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 305268/2015-5).

7.5. References

Abolajji, A.O., Kamdem, J.P., Lugokenski, T.H., Nascimento, T.K., Waczuk, E.P.,

- Farombi, E.O., Loreto, É.L.D.S., Rocha, J.B.T., 2014. Involvement of oxidative stress in 4-vinylcyclohexene-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic. Biol. Med.* 71, 99–108.
- Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J., 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “Dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86, 412–431.
- Andretic, R., Van Swinderen, B., Greenspan, R.J., 2005. Dopaminergic modulation of arousal in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 15, 1165–1175.
- Angus, J., 1974. Measurement of locomotor activity in *Drosophila*. *Anim. Behav.* 22, 890–898.
- Araújo, S.M., de Paula, M.T., Poetini, M.R., Meichtry, L., Bortolotto, V.C., Zarzecki, M.S., Jesse, C.R., Prigol, M., 2015. Effectiveness of γ -oryzanol in reducing neuromotor deficits, dopamine depletion and oxidative stress in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson’s disease induced by rotenone. *Neurotoxicology* 51, 96–105.
- Bardullas, U., Giordano, M., Rodríguez, V.M., 2011. Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague-Dawley rat. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 263–272.
- Black, B.C., Smarrelli Jr, J., 1986. A kinetic analysis of *Drosophila melanogaster* dopa carboxylase. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Protein Struct. Mol. Enzymol.* 870, 31–40.
- Bogomolova, E. V., Rauschenbach, I., Adonyeva, N. V., Alekseev, A.A., Faddeeva, N. V., Gruntenko, N.E., 2010. Dopamine down-regulates activity of alkaline phosphatase in *Drosophila*: The role of D2-like receptors. *J. Insect Physiol.* 56, 1155–1159.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cheng, K.-C., Liao, J.-N., Lyu, P.-C., 2012. Crystal structure of the dopamine N-acetyltransferase-acetyl-CoA complex provides insights into the catalytic mechanism. *Biochem. J.* 446, 395–404.
- Coban, A., Filipov, N.M., 2007. Dopaminergic toxicity associated with oral exposure

- to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice. *J. Neurochem.* 100, 1177–1187.
- Cumming, P., Ase, a, Laliberté, C., Kuwabara, H., Gjedde, a, 1997. In vivo regulation of DOPA decarboxylase by dopamine receptors in rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 1254–60.
- Daubner, S.C., Le, T., Wang, S., 2011. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 508, 1–12.
- Escarrone, A.L.V., Caldas, S.S., Furlong, E.B., Meneghetti, V.L., Fagundes, C.A.A., Arias, J.L.O., Primel, E.G., 2014. Polycyclic aromatic hydrocarbons in rice grain dried by different processes: Evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. *Food Chem.* 146, 597–602.
- Fa, S., Pogrmic-Majkic, K., Samardzija, D., Glisic, B., Kaisarevic, S., Kovacevic, R., Andric, N., 2013. Involvement of ERK1/2 signaling pathway in atrazine action on FSH-stimulated LHR and CYP19A1 expression in rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 270, 1–8.
- Figueira, F.H., Aguiar, L.M., Da Rosa, C.E., 2017. Embryo-larval exposure to atrazine reduces viability and alters oxidative stress parameters in *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 191, 78–85.
- Foltenyi, K., Andretic, R., Newport, J.W., Greenspan, R.J., 2007. Neurohormonal and neuromodulatory control of sleep in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72, 565–571.
- Griboff, J., Morales, D., Bertrand, L., Bonansea, R.I., Monferrán, M.V., Asis, R., Wunderlin, D.A., Amé, M.V., 2014. Oxidative stress response induced by atrazine in *Palaemonetes argentinus*: The protective effect of vitamin E. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108, 1–8.
- Han, K.A., Millar, N.S., Grotewiel, M.S., Davis, R.L., 1996. DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron* 16, 1127–1135.
- Hanna, M.E., Bednárová, A., Rakshit, K., Chaudhuri, A., O'Donnell, J.M., Krishnan, N., 2015. Perturbations in dopamine synthesis lead to discrete physiological effects and impact oxidative stress response in *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* 73, 11–19.
- Hase, Y., Tatsuno, M., Nishi, T., Kataoka, K., Kabe, Y., Yamaguchi, Y., Ozawa, N., Natori, M., Handa, H., Watanabe, H., 2008. Atrazine binds to F1F0-ATP

synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 66–72.

Hearn, M.G., Ren, Y., McBride, E.W., Reveillaud, I., Beinborn, M., Kopin, A.S., 2002. A *Drosophila* dopamine 2-like receptor: Molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14554–14559.

Heisenberg, M., 1998. What Do the Mushroom Bodies Do for the Insect Brain? An Introduction. *Learn. Mem.* 5, 1–10.

Inagaki, H.K., Ben-Tabou De-Leon, S., Wong, A.M., Jagadish, S., Ishimoto, H., Barnea, G., Kitamoto, T., Axel, R., Anderson, D.J., 2012. Visualizing neuromodulation in vivo: TANGO-mapping of dopamine signaling reveals appetite control of sugar sensing. *Cell* 148, 583–595.

Johri, A., Beal, M.F., 2012. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 342, 619–30.

Joiner, W.J., Crocker, A., White, B.H., Sehgal, A., 2006. Sleep in *Drosophila* is regulated by adult mushroom bodies. *Nature* 441, 757–760.

Kaur, K., Simon, A.F., Chauhan, V., Chauhan, A., 2015. Effect of bisphenol A on *Drosophila melanogaster* behavior - A new model for the studies on neurodevelopmental disorders. *Behav. Brain Res.* 284, 77–84.

Kim, Y.C., Lee, H.G., Seong, C.S., Han, K.A., 2003. Expression of a D1 dopamine receptor dDA1/DmDOP1 in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Gene Expr. Patterns* 3, 237–245.

Laurent, R. St., O'Brien, L.M., Ahmad, S.T., 2013. Sodium Butyrate Improves Locomotor Impairment and Early Mortality in a Rotenone-Induced *Drosophila* Model of Parkinson's Disease. *Neuroscience* 246, 382–390.

Li, Y., Sun, Y., Yang, J., Wu, Y., Yu, J., Li, B., 2014. The long-term effects of the herbicide atrazine on the dopaminergic system following exposure during pubertal development. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 763, 23–29.

Livingstone, M.S., Tempel, B.L., 1983. Genetic dissection of monoamine neurotransmitter synthesis in *Drosophila*. *Nature* 303, 67–70.

Marcus, S.R., Fiumera, A.C., 2016. Atrazine exposure affects longevity, development time and body size in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.*

Marican, C., Duportets, L., Birman, S., Jallon, J.M., 2004. Female-specific regulation

- of cuticular hydrocarbon biosynthesis by dopamine in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 823–830.
- Mustard, J.A., Pham, P.M., Smith, B.H., 2010. Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee. *J. Insect Physiol.* 56, 422–430.
- Nichols, C.D., 2006. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacol. Ther.* 112, 677–700.
- Norry, F.M., Larsen, P.F., Liu, Y., Loeschcke, V., 2009. Combined expression patterns of QTL-linked candidate genes best predict thermotolerance in *Drosophila melanogaster* 55, 1050–1057.
- O’Kane, C.J., 2011. *Drosophila* as a model organism for the study of neuropsychiatric disorders., in: *Molecular and Functional Models in Neuropsychiatry*. pp. 37–60.
- Papp, M., Klimek, V., Willner, P., 1994. Parallel changes in dopamine D2 receptor binding in limbic forebrain associated with chronic mild stress-induced anhedonia and its reversal by imipramine. *Psychopharmacology (Berl.)* 115, 441–446.
- Pitman, J.L., McGill, J.J., Keegan, K.P., Allada, R., 2006. A dynamic role for the mushroom bodies in promoting sleep in *Drosophila*. *Nature* 441, 753–756.
- Pitmon, E., Stephens, G., Parkhurst, S.J., Wolf, F.W., Kehne, G., Taylor, M., Lebestky, T., 2016. The D1 family dopamine receptor, DopR, potentiates hind leg grooming behavior in *Drosophila*. *Genes, Brain Behav.* 15, 327–334.
- Poddighe, S., De Rose, F., Marotta, R., Ruffilli, R., Fanti, M., Secci, P.P., Mostallino, M.C., Setzu, M.D., Zuncheddu, M.A., Collu, I., Solla, P., Marrosu, F., Kasture, S., Acquas, E., Liscia, A., 2014. *Mucuna pruriens* (Velvet bean) rescues motor, olfactory, mitochondrial and synaptic impairment in PINK1B9 *Drosophila melanogaster* genetic model of Parkinson’s disease. *PLoS One* 9, 1–11.
- Pogrmic-Majkic, K., Fa, S., Samardzija, D., Hrubik, J., Kaisarevic, S., Andric, N., 2016. Atrazine activates multiple signaling pathways enhancing the rapid hCG-induced androgenesis in rat Leydig cells. *Toxicology* 368–369, 37–45.
- Prestes, O.D., Friggi, C.A., Adaime, M.B., Zanella, R., 2009. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de

pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim. Nova* 32, 1620–1634.

- Rand, M.D., 2010. Drosophotoxicology: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 74–83.
- Roustan, A., Aye, M., De Meo, M., Di Giorgio, C., 2014. Genotoxicity of mixtures of glyphosate and atrazine and their environmental transformation products before and after photoactivation. *Chemosphere* 108, 93–100.
- Sabat, D., Patnaik, A., Ekka, B., Dash, P., Mishra, M., 2016. Investigation of titania nanoparticles on behaviour and mechanosensory organ of *Drosophila melanogaster*. *TL - 167. Physiol. Behav.* 167 VN-, 76–85.
- Srivastava, D.P., Yu, E.J., Kennedy, K., Chatwin, H., Reale, V., Hamon, M., Smith, T., Evans, P.D., 2005. Rapid, Nongenomic Responses to Ecdysteroids and Catecholamines Mediated by a Novel *Drosophila* G-Protein-Coupled Receptor. *J. Neurosci.* 25, 6145–6155.
- Sudati, J.H., Vieira, F.A., Pavin, S.S., Dias, G.R.M., Seeger, R.L., Golombieski, R., Athayde, M.L., Soares, F.A., Rocha, J.B.T., Barbosa, N.V., 2013. *Valeriana officinalis* attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicology* 37, 118–126.
- Thornton, B.J., Elthon, T.E., Cerny, R.L., Siegfried, B.D., 2010. Proteomic analysis of atrazine exposure in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Chemosphere* 81, 235–241.
- Ueno, T., Kume, K., 2014. Functional characterization of dopamine transporter in vivo using *Drosophila melanogaster* behavioral assays. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 303.
- 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 Biol.* 3, RESEARCH0034.
- Vermeer, L.M., Higgins, C.A., Roman, D.L., Doorn, J.A., 2013. Real-time monitoring of tyrosine hydroxylase activity using a plate reader assay. *Anal. Biochem.* 432, 11–15.
- Vié, A., Cigna, M., Toci, R., Birman, S., 1999. Differential regulation of *Drosophila* tyrosine hydroxylase isoforms by dopamine binding and cAMP-dependent phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274, 16788–16795.

- Walters, J.L., Lansdell, T.A., Lookingland, K.J., Baker, L.E., 2015. The effects of gestational and chronic atrazine exposure on motor behaviors and striatal dopamine in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 289, 185–192.
- Wicker-Thomas, C., Hamann, M., 2008. Interaction of dopamine, female pheromones, locomotion and sex behavior in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 54, 1423–1431.
- Wilson, W.W., Shapiro, L.P., Bradner, J.M., Caudle, W.M., 2014. Developmental exposure to the organochlorine insecticide endosulfan damages the nigrostriatal dopamine system in male offspring. *Neurotoxicology* 44, 279–287.
- Xiang, L., Szebeni, K., Szebeni, A., Klimek, V., Stockmeier, C.A., Karolewicz, B., Kalbfleisch, J., Ordway, G.A., 2009. Dopamine Receptor Gene Expression in Human Amygdaloid Nuclei: Elevated D4 Receptor mRNAs in Major Depression. *Brain Res.* 1207, 214–224.
- Zhou, Q., Xiao, J., Wang, W., Liu, G., Shi, Q., Wang, J., 2006. Determination of atrazine and simazine in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes as the adsorbents for preconcentration prior to high performance liquid chromatography with diode array detector. *Talanta* 68, 1309–1315.
- Zwarts, L., Vanden Broeck, L., Cappuyns, E., Ayroles, J.F., Magwire, M.M., Vulsteke, V., Clements, J., Mackay, T.F.C., Callaerts, P., 2015. The genetic basis of natural variation in mushroom body size in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Commun.* 6, 10115.

7.6. Legends, figures and table

Figure 1. Negative geotaxis assay (A), number of crossings in open field assay (B), immobility time in open field assay (C), and grooming episodes in open field arena (D) in male flies after exposure to atrazine during embryo/larval development. Data represents mean \pm SEM. Different letters represents significant differences between experimental groups ($p < 0.05$).

Figure 2. Negative geotaxis assay (A), number of crossings in open field assay (B), immobility time in open field assay (C), and grooming episodes in open field arena (D) in female flies after exposure to the atrazine during embryo/larval development. Data represents mean \pm SEM. Different letters represents significant differences between experimental groups ($p < 0.05$).

Figure 3. TH activity in males (A) and females (B) flies after exposure to the atrazine during embryo/larval development. Data represents mean \pm SEM. Different letters represents significant differences between experimental groups ($p < 0.05$).

Figure 4. Gene Expression of *ple*, *ddc*, *aanat1* and *dat* in male (A) and female (B) flies exposed to atrazine during embryo/larval development. Data represents mean fold induction \pm SEM relative to control group animals. Different letters represents significant differences between experimental groups ($p < 0.05$).

Figure 5. Gene Expression of *dop1r1*, *dop1r2*, *dopecr* and *dop2r* in male (A) and female (B) flies exposed to atrazine during embryo/larval development. Data represents mean fold induction \pm SEM relative to control group animals. Different letters represents significant differences between experimental groups ($p < 0.05$).

Table 1.

Sequences of RT-PCR primers.

Gene		Sequence	Source
<i>ple</i>	For	5'CTACCAGGATCAGGAGTACCA3'	Laurent et al. (2013)
	Rev	5'GCGACGGAAGCTTGTCTT3'	
<i>ddc</i>	For	5'ACACAAATGGATGCTGGTGA3'	Norry et al. (2009)
	Rev	5'AGAGGGTCCACATTGAACG3'	
<i>aanat1</i>	For	5'AACGAATCGGGCGAAAGTCT3'	Present study
	Rev	5'CGTTCAGGCGTGAAATTGGC3'	
<i>dat</i>	For	5'GGTGCCCCTCTTCAAAGGAAT3'	
	Rev	5'ATTACACGACGTCCAAGGCA3'	
<i>dop2r</i>	For	5'CACAAGGCCTCGAAAAAGAA3'	Inagaki et al. (2012)
	Rev	5'GCGAAACTCGGGATTGAATA3'	
<i>dopecr</i>	For	5'AGGGTCCTGTGTGTACTGGT3'	Present study
	Rev	5'GCAAGAATTGTTGGCTTTTCCG3'	
<i>dop1r1</i>	For	5'ACGATGGCACAACGTTGACA3'	
	Rev	5'GCACCGATAGGAAGATGCCA3'	
<i>dop1r2</i>	For	5'ATGTGCTGTCCACGCAAGAT3'	
	Rev	5'CCACGTGACACTGCGATTTG3'	
<i>βtub56d</i>	For	5'ATCCCAACAACGTGAAGAC3'	Abolaji et al. (2014)
	Rev	5'ACCAATGCAAGAAAGCCTTG3'	
<i>gpdh</i>	For	5'GCTCCTCAATGGTTTTTCCA3'	
	Rev	5'ATGGAGATGATTCGCTTCGT3'	

Figure 1

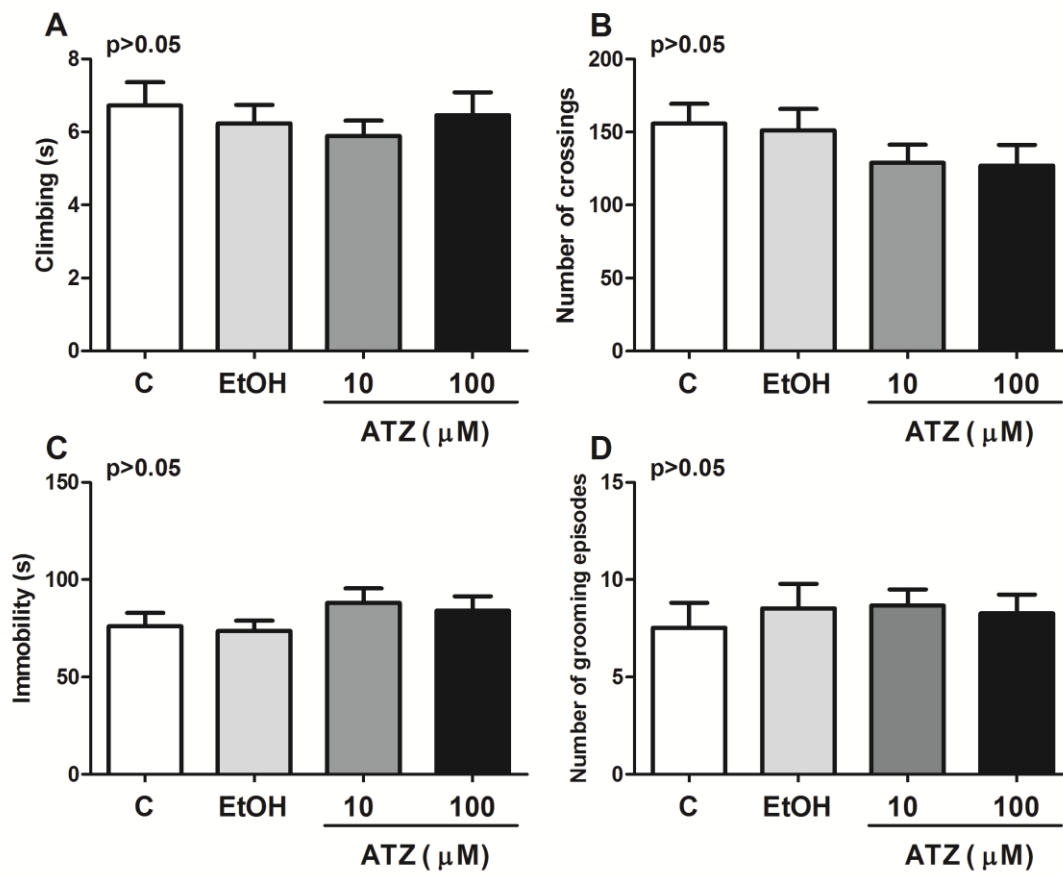


Figure 2

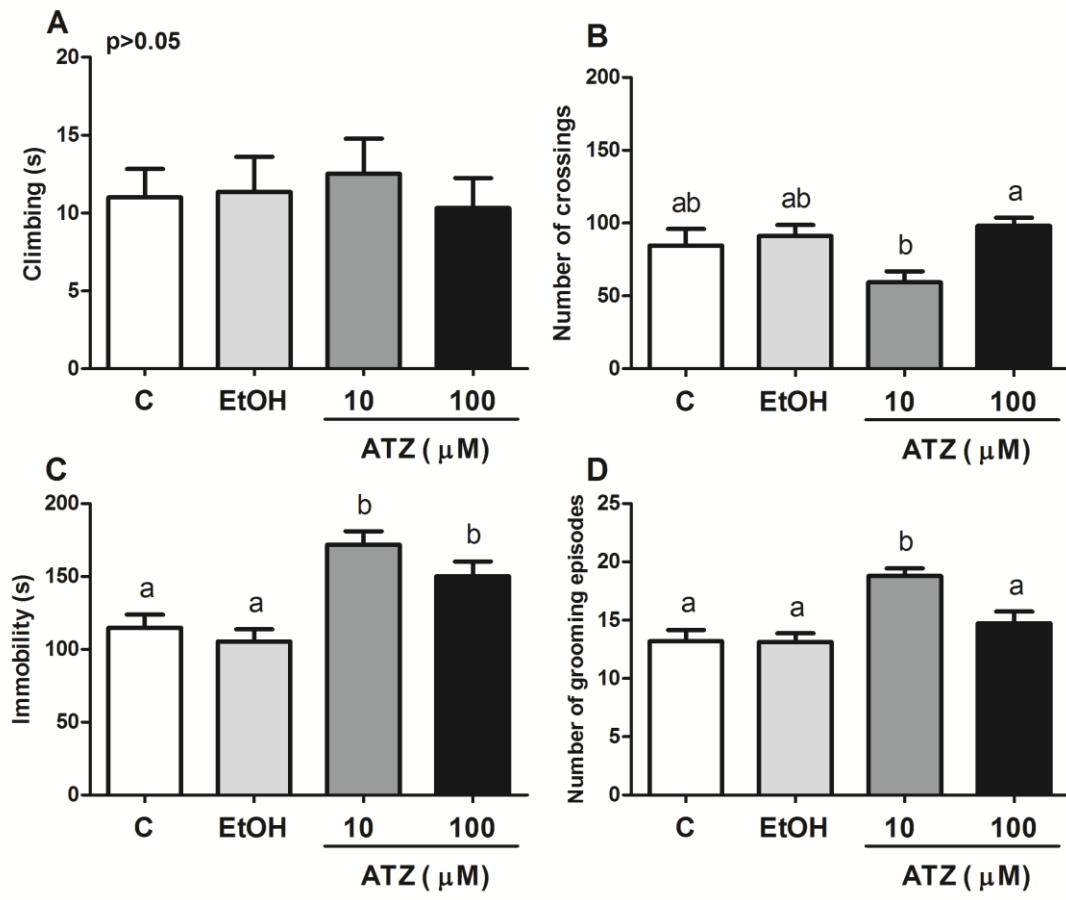


Figure 3

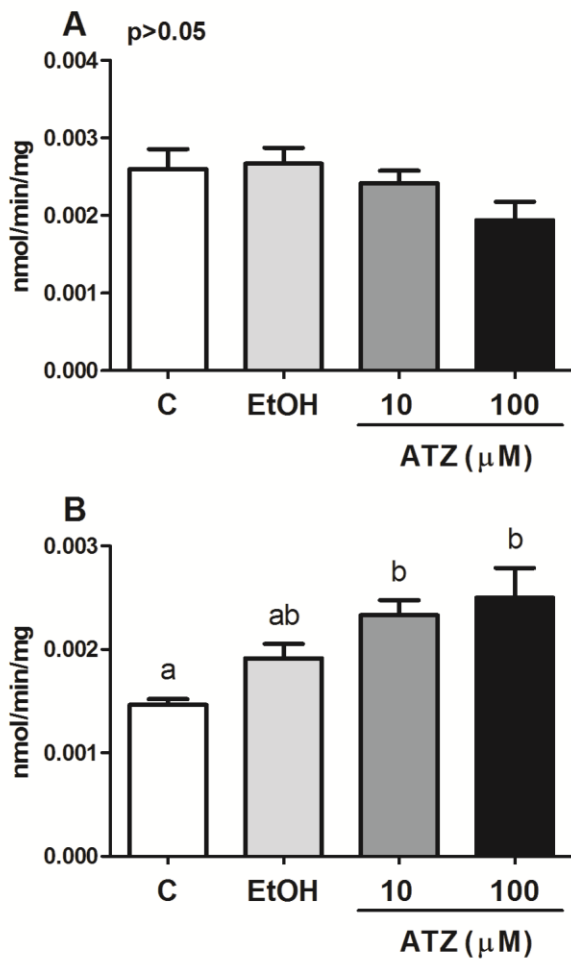


Figure 4

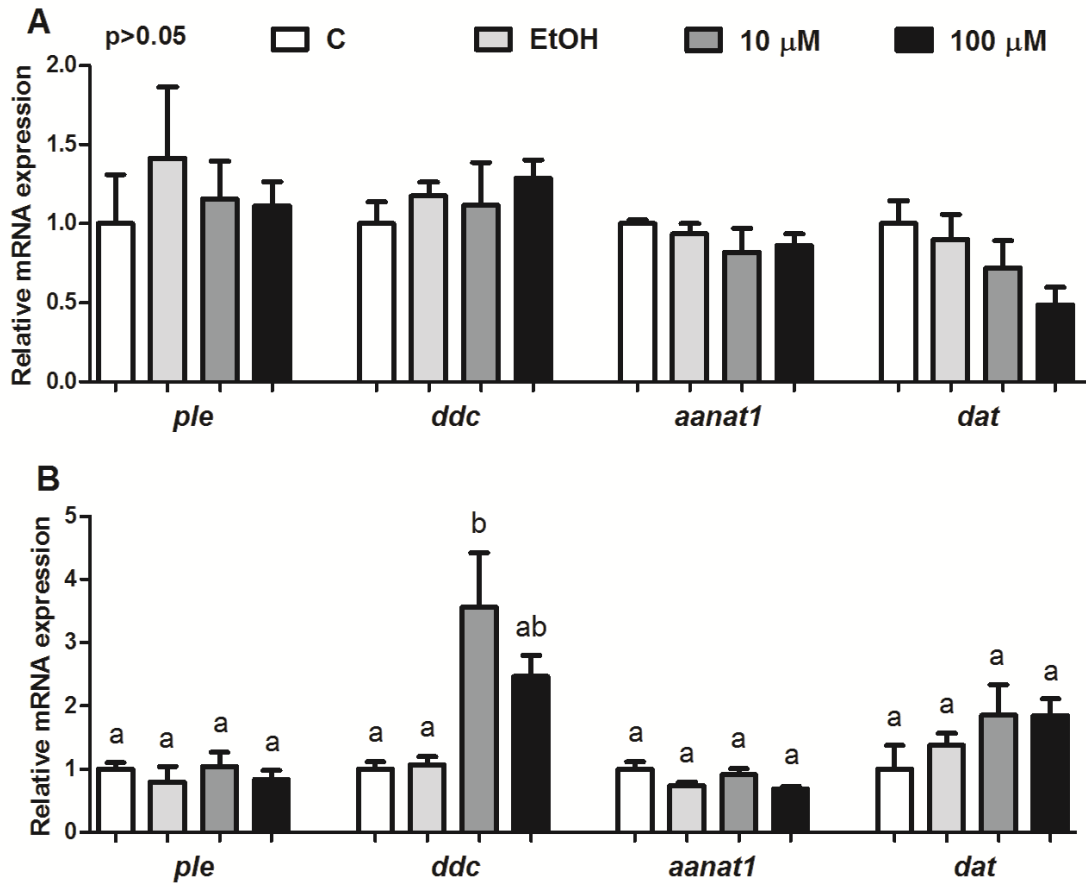
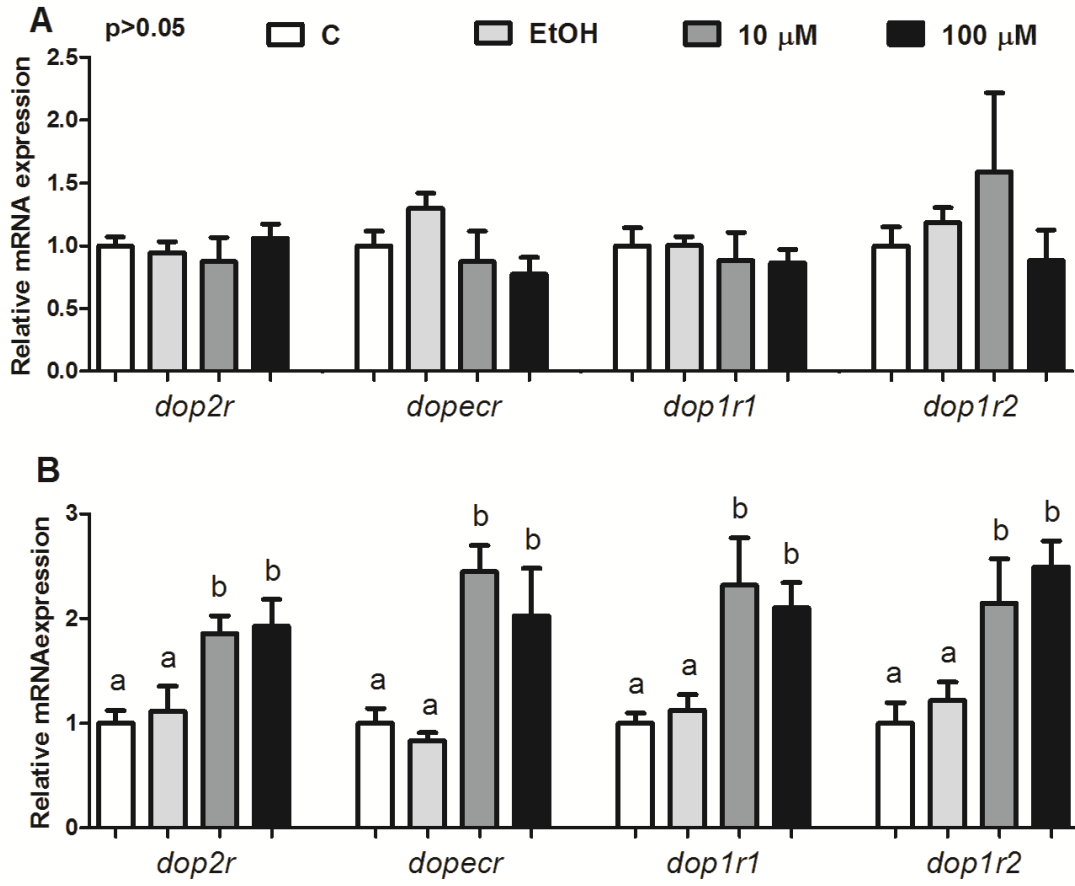


Figure 5



8. DISCUSSÃO GERAL

Poucos estudos têm se dedicado a compreensão dos mecanismos de neurotoxicidade induzidos pela atrazina em insetos, em especial em *D. melanogaster*. Como mencionado anteriormente, a atrazina é capaz de inibir a atividade da ATP sintase (Hase *et al.*, 2008) podendo levar ao aumento da geração de ERO. Além disso, Marcus e Fiumera (2016) demonstram que concentrações de atrazina similares às utilizadas neste estudo (9,2 μM e 92 μM) causaram redução da taxa de pupação e emergência em *D. melanogaster*. Devido à isto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de atrazina em moscas adultas jovens expostas durante o desenvolvimento embrionário e larval de modo a compreender os mecanismos de toxicidade e os efeitos do herbicida atrazina no sistema dopaminérgico.

Atrazina causou efeitos no desenvolvimento de *D. melanogaster*, especificamente uma redução da taxa de pupação e emergência de moscas expostas durante o desenvolvimento embrionário e larval, corroborando os resultados apresentados por Marcus e Fiumera (2016). Os autores sugerem que estes efeitos foram resultado do aumento da geração de ERO, podendo estar desta forma colaborando para a indução de estresse oxidativo. No presente estudo foi verificada esta hipótese. No entanto, a exposição à atrazina não altera os níveis de ERO em larvas expostas durante o desenvolvimento. É possível que as alterações no metabolismo redox ocorram apenas após a metamorfose.

Neste sentido, os níveis de ERO em cabeça de moscas adultas expostas a atrazina durante o desenvolvimento embrionário e larval foi analisado. Uma das consequências do desequilíbrio entre a geração de ERO e as defesas antioxidantes em favor do primeiro é a indução de estresse oxidativo, culminando em dano celular,

tal como a peroxidação lipídica. Foi observada uma diminuição da capacidade antioxidante em machos. A redução da capacidade antioxidante sem um aumento em níveis de ERO não parecem ter sido capaz de provocar dano lipídico em moscas macho. Moscas fêmeas expostas à concentração de 10 μM de atrazina apresentaram aumento nos níveis teciduais de ERO. Um aumento na capacidade antioxidante também foi observado em moscas expostas à concentração de 10 μM de atrazina. Este resultado, associado à redução do conteúdo de grupo sulfidril em fêmeas expostas à mesma concentração, sugere que o aumento da capacidade antioxidante pode ter ocorrido através do poder redutor de moléculas contendo grupo sulfidril. Considerando as fêmeas, moscas expostas à concentração de 100 μM de atrazina apresentaram uma redução na capacidade antioxidante embora os níveis de ERO não tenham sido alterados. Estes resultados são consistentes com a hipótese gerada através do estudo de Thornton e colaboradores (2010) de que a atrazina altera o metabolismo energético em machos e fêmeas de maneira diferente, sendo aumentado em fêmeas. É possível que este suposto aumento no metabolismo energético, acompanhado de uma redução na capacidade antioxidante mostrado neste estudo, contribui para uma possível situação de desequilíbrio redox em fêmeas expostas à concentração de 100 μM de atrazina.

A expressão dos genes relacionados ao metabolismo redox também apresentaram perfis diferentes para machos e fêmeas. Como mencionado anteriormente, um aumento nos níveis de ERO pode desconectar a proteína Keap1 do Nrf-2 e induzir a transcrição de uma resposta antioxidante (Nguyen *et al.*, 2004). A exposição à atrazina induz a transcrição do gene *keap1* somente em fêmeas.

Os genes *cat* e *irc* apresentaram diferentes padrões de expressão em machos e fêmeas expostos à atrazina. A CAT imuno responsiva é uma isoforma

produto do gene *irc*, que atua minimizando o acúmulo do H₂O₂ produzido durante infecções do trato gastrointestinal (Ryu *et al.*, 2010). A redução da transcrição dos genes *cat* e *irc* pode estar envolvida na redução da capacidade antioxidante, exceto para as fêmeas expostas à concentração de 10 µM de atrazina que apresentou aumento da capacidade antioxidante. Este aumento pode também estar relacionado ao aumento da expressão do gene *gclm*. O aumento da interação da subunidade catalítica com a subunidade modulatória, codificada pelo gene *gclm*, da enzima GCL, melhora as propriedades catalíticas da enzima, reduzindo k_m (Solis *et al.*, 2002).

Relatos indicam que disfunções mitocondriais podem estar relacionadas à distúrbios neurofisiológicos (Johri e Beal, 2012). Tal observação, associada aos resultados apresentados acerca do metabolismo redox, reforçam a hipótese de que as alterações da neurotransmissão dopaminérgica podem apresentar diferentes padrões entre os sexos. Sabe-se que a exposição à atrazina altera a neurotransmissão dopaminérgica em mamíferos (Coban e Filipov, 2007; Walters *et al.*, 2015). Com relação à *D. melanogaster*, Marican e colaboradores (2004) demonstram que após a emergência, o conteúdo de DA em moscas fêmeas é menor quando comparado aos machos. Portanto, as enzimas relacionadas com a síntese/degradação do neurotransmissor seriam regulados diferencialmente entre os sexos e qualquer processo que interfira neste sistema de neurotransmissão poderia provocar consequências diferentes entre os gêneros, como observado no presente estudo.

Corroborando esta hipótese, as análises comportamentais mostraram um efeito da atrazina apenas em fêmeas. As moscas expostas à concentração de 10 µM de atrazina apresentaram aumento do tempo de imobilidade e aumento do número

de episódios de *grooming*. Comportamento semelhante foi encontrado em abelhas com níveis reduzidos de um receptor ortólogo do receptor de DA expresso exclusivamente nos corpos pedunculados de *D. melanogaster* (Dop1R2) (Mustard *et al.*, 2010). As alterações comportamentais observadas neste estudo foram acompanhadas por aumento da expressão da enzima DDC e de todos os receptores dopaminérgicos, indicando um efeito compensatório. Considerando estes resultados, é possível supor que a exposição à esta concentração de atrazina reduz a neurotransmissão dopaminérgica, possivelmente afetando de maneira mais restrita os corpos pedunculados.

Por outro lado, as moscas expostas à concentração de 100 μ M de atrazina apresentaram um aumento do tempo de imobilidade sem compensação por outros comportamentos. Pitmon e colaboradores (2016) demonstraram que a remoção do Dop1R1 por RNAi, não altera os episódios de *grooming*, bem como a atividade locomotora quando comparado às moscas de tipo selvagem. Além disso, a administração de 3-iodotirosina, um inibidor da atividade da enzima TH, aumenta o comportamento *sleep-like* sem causar alterações na atividade locomotora de *D. melanogaster* (Andreatic *et al.*, 2005). As alterações comportamentais observadas nas moscas expostas a 100 μ M indicam que esta concentração pode estar causando redução mais acentuada na neurotransmissão dopaminérgica, reduzindo a sinalização via Dop1R1, que é amplamente expresso no cérebro de *D. melanogaster*. Corroborando tal efeito mais generalizado causado pela maior concentração de atrazina, observou-se uma concomitante redução da capacidade antioxidante e uma tendência a aumento da produção de ERO nestes organismos. Neste sentido, é possível que o aumento da capacidade antioxidante das moscas fêmeas expostas à concentração de 10 μ M de atrazina, tenha evitado um dano

maior, tornando os efeitos restritos aos corpos pedunculados. Em conjunto, nossos resultados apontam para efeito da atrazina no metabolismo redox de *D. melanogaster* relacionando este às alterações no sistema dopaminérgico. A falta de alterações comportamentais e do sistema dopaminérgico em machos podem estar associados ao fato de que estes não apresentaram a situação de estresse oxidativo.

Uma hipótese que justifica a maior sensibilidade das moscas fêmeas à atrazina está baseada nos resultados apresentados associados aos dados descritos em estudos anteriores. A inibição da atividade da ATP sintase descrito por Hase e colaboradores (2008) e redução da concentração de ATP demonstrada por Zaya e colaboradores (2011) associados ao aumento do metabolismo energético em fêmeas (Thornton *et al.*, 2010) leva ao desequilíbrio do metabolismo redox. Como o tecido nervoso é bastante sensível às alterações redox (Plasse *et al.*, 2015) e moscas fêmeas apresentam um menor conteúdo de DA quando comparado aos machos (Marican *et al.*, 2004), a exposição à atrazina causou um desequilíbrio da neurotransmissão dopaminérgica, alterando comportamentos tipicamente modulados por DA. Tais achado corroboram observações anteriores que demonstram que, em ratos, as fêmeas são mais sensíveis aos efeitos neurotóxicos da exposição crônica à atrazina quando comparado com machos (Li *et al.*, 2014).

9. PERSPECTIVAS

A partir desta tese de doutorado, muitas perspectivas surgem. Como foi observado neste trabalho um efeito da atrazina diferente entre os sexos, um efeito da atrazina a ser testado é sobre o metabolismo energético de moscas machos e fêmeas. Além da atividade de enzimas da via glicolítica e da mobilização de carboidratos, poderia ser testada a atividade dos complexos mitocondriais após a exposição à atrazina. Esses dados poderiam contribuir para os resultados diferentes entre os sexos.

Além disso, mais estudos devem ser realizados afim de testar a hipótese de que o desequilíbrio redox induzido pela exposição à atrazina estaria causando uma disfunção no sistema dopaminérgico. A adição de um potente antioxidante no meio de cultura durante ou depois da exposição à atrazina poderia corroborar esta hipótese.

Outra hipótese a ser testada seria observar se a atrazina está interferindo na síntese de DA por uma redução do conteúdo e/ou atividade da enzima DDC. É possível realizar uma análise da atividade da enzima DDC associada à uma medida de conteúdo de proteína. Porém, seria mais acessível um teste farmacológico, com adição de L-DOPA ao meio de cultura. Além disso, uma dosagem do conteúdo de DA em moscas expostas à atrazina poderia corroborar com a hipótese de redução da neurotransmissão dopaminérgica citada neste estudo.

Por fim, testes farmacológicos também são possíveis para investigar se a atrazina reduz os níveis de DA e conseqüentemente causa as alterações comportamentais. A utilização de agonistas dos receptores de DA seria bastante eficiente neste teste. Além disso, a utilização também de antagonistas poderia

fornecer maiores informações acerca das diferentes regiões que podem estar sendo afetadas pela exposição à atrazina.

10. BIBLIOGRAFIA GERAL

- Andretic R., Van Swinderen B., Greenspan R.J. 2005. Dopaminergic modulation of arousal in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 15, 1165–1175.
- Araújo S.M., de Paula M.T., Poetini M.R., Meichtry L., Bortolotto V.C., Zarzecki M.S., Jesse C.R., Prigol M. 2015. Effectiveness of γ -oryzanol in reducing neuromotor deficits, dopamine depletion and oxidative stress in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease induced by rotenone. *Neurotoxicology* 51, 96–105.
- Astiz M., De Alaniz M.J.T., Marra C.A. 2012. The oxidative damage and inflammation caused by pesticides are reverted by lipoic acid in rat brain. *Neurochem. Int.* 61, 1231–1241.
- Bellen H.J., Tong C., Tsuda H. 2010. 100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience : a history lesson for the future. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 514–522.
- Bewley G.C., Laurie-Ahlberg C.C. 1984. Genetic variation affecting the expression of catalase in *Drosophila melanogaster*: correlations with rates of enzyme synthesis and degradation. *Genet. Soc. Am.* 106, 435–448.
- Brugidou C., Marty I., Chartier Y., Meyer Y. 1993. The *Nicotiana tabacum* genome encodes two cytoplasmic thiredoxin genes which are differently expressed. *Mol. Genet. Genomics* 238, 285–293.
- Cattani D., de Liz Oliveira Cavalli V.L., Heinz Rieg C.E., Domingues J.T., Dal-Cim T., Tasca C.I., Mena Barreto Silva F.R., Zamoner A. 2014. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology* 320, 34–45.
- Chelikani P., Fita I., Loewen P.C. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 192–208.
- Cheng K.-C., Liao J.-N., Lyu P.-C. 2012. Crystal structure of the dopamine N-acetyltransferase-acetyl-CoA complex provides insights into the catalytic mechanism. *Biochem. J.* 446, 395–404.
- Coban A., Filipov N.M. 2007. Dopaminergic toxicity associated with oral exposure to the herbicide atrazine in juvenile male C57BL/6 mice. *J. Neurochem.* 100, 1177–1187.

- Connor K., Howell J., Chen I., Liu H., Berhane K., Sciarretta C., Safe S., Zacharewski T. 1996. Failure of Chloro-S-triazine-Derived Compounds to Induce Estrogen Receptor-Mediated Responses in Vivo and in Vitro. *Toxicol. Sci.* 30, 93–101.
- Cooper R.L., Stoker T.E., Goldman J.M., Parrish M.B., Tyrey L. 1996. Effect of atrazine on ovarian function in the rat. *Reprod. Toxicol.* 10, 257–264.
- Cooper R.L., Stoker T.E., Tyrey L., Goldman J.M., McElroy W.K. 2000. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol. Sci.* 53, 297–307.
- Crisp T.M., Clegg E.D., Cooper R.L., Wood W.R., Anderson D.G., Baetcke K.R., Hoffmann J.L., Morrow M.S., Rodier D.J., Schaeffer J.E., Touart L.W., Zeeman M.G., Patel Y.M. 1998. Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis*. *Env. Heal. Perspect* 1, 6–11.
- Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Colombo R., Milzani A. 2007. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.*
- Daubner S.C., Le T., Wang S. 2011. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 508, 1–12.
- Dexter D.T., Sian J., Rose S., Hindmarsh J.G., Mann V.M., Cooper J.M., Wells F.R., Daniel S.E., Lees J., Schapira H. 1994. Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann. Neurol.* 35, 38–44.
- Dickinson D.A., Forman H.J. 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 64, 1019–1026.
- Egaas E., Skaare J.U., Svendsen N.O., Sandvik M., Falls J.G., Dauterman W.C., Collier T.K., Netland J. 1993. A comparative study of effects of atrazine on xenobiotic metabolizing enzymes in fish and insect, and of the in vitro phase II atrazine metabolism in some fish, insects, mammals and one plant species. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp.* 106, 141–149.
- Eldridge J.C., Tennant M.K., Wetzel L.T., Breckenridge C.B., Stevens J.T. 1994. Factors affecting mammary tumor incidence in chlorotriazine-treated female rats: Hormonal properties, dosage, and animal strain, in: *Environmental Health Perspectives*. pp. 29–36.
- Foe V.E., Odell G.M., Edgar B.A. 1993. Mitosis and Morphogenesis in the *Drosophila* embryo: Point and Counterpoint. In: Bate, M. & Martinez-Arias, A. *The development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harb. Lab. Press I,

149–300.

- Foltenyi K., Andretic R., Newport J.W., Greenspan R.J. 2007. Neurohormonal and neuromodulatory control of sleep in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 72, 565–571.
- Fridovich I. 2004. Mitochondria: Are they the seat of senescence? *Aging Cell.* 3(1), 13-16.
- Fridovich I. 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 97–112.
- Friedmann A.S. 2002. Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. *Reprod. Toxicol.* 16, 275–279.
- Fukai T., Ushio-Fukai M. 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1583–606.
- Fusco D., Colloca G., Lo Monaco M.R., Cesari M. 2007. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin. Interv. Aging* 2, 377–387.
- Gazal M., Valente M.R., Acosta B.A., Kaufmann F.N., Braganhol E., Lencina C.L., Stefanello F.M., Ghisleni G., Kaster M.P. 2014. Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 724, 132–139.
- Gilbert S. 1997. *Developmental Biology*, Sinauer Associates, Inc.
- Goodman & Gilman. Brunton LL, Lazo JS, Parker, KL. 2006. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11ª Edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill.
- Greenspan R.J. 1997. *Fly pushing: The theory and practice of Drosophila genetics*. Cold Spring Harb. Lab. Press 418.
- Greenspan R.J., Dierick H.A. 2004. “Am not I a fly like thee?” From genes in fruit flies to behavior in humans. *Hum. Mol. Genet.* 1;13 Spec No 2:R267-73.
- Grygoruk A., Chen A., Martin C.A., Lawal H.O., Fei H., Gutierrez G., Biedermann T., Najibi R., Hadi R., Chouhan A.K., Murphy N.P., Schweizer F.E., Macleod G.T., Maidment N.T., Krantz D.E. 2014. The redistribution of *Drosophila* vesicular monoamine transporter mutants from synaptic vesicles to large dense-core vesicles impairs amine-dependent behaviors. *J. Neurosci.* 34, 6924–6937.
- Guo M. 2012. *Drosophila* as a model to study mitochondrial dysfunction in Parkinson’s disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, 1–18.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Free Radical Biology and Medicine.

- Han K.A., Millar N.S., Grotewiel M.S., Davis R.L. 1996. DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron* 16, 1127–1135.
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298–300.
- Hase Y., Tatsuno M., Nishi T., Kataoka K., Kabe Y., Yamaguchi Y., Ozawa N., Natori M., Handa H., Watanabe H. 2008. Atrazine binds to F1F0-ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 66–72.
- Hatefi Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 1015–1069.
- Hearn M.G., Ren Y., McBride E.W., Reveillaud I., Beinborn M., Kopin A.S. 2002. A *Drosophila* dopamine 2-like receptor: Molecular characterization and identification of multiple alternatively spliced variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14554–14559.
- Heisenberg M. 1998. What Do the Mushroom Bodies Do for the Insect Brain? An Introduction. *Learn. Mem.* 5, 1–10.
- Hirsch H.V.B., Lnenicka G., Possidente D., Possidente B., Garfinkel M.D., Wang L., Lu X., Ruden D.M. 2012. *Drosophila melanogaster* as a model for lead neurotoxicology and toxicogenomics research. *Front. Genet.* 3, 1–7.
- Holmgren A., Johansson C., Berndt C., Lönn M.E., Hudemann C., Lillig C.H. 2005. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1375–1377.
- Hossain M.M., Filipov N.M. 2008. Alteration of dopamine uptake into rat striatal vesicles and synaptosomes caused by an in vitro exposure to atrazine and some of its metabolites. *Toxicology* 248, 52–58.
- Inagaki H.K., Ben-Tabou De-Leon S., Wong A.M., Jagadish S., Ishimoto H., Barnea G., Kitamoto T., Axel R., Anderson D.J. 2012. Visualizing neuromodulation in vivo: TANGO-mapping of dopamine signaling reveals appetite control of sugar sensing. *Cell* 148, 583–595.
- Jiang T., Sun Q., Chen S. 2016. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 147, 1-19.
- Johri A., Beal M.F. 2012. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases.

- J. Pharmacol. Exp. Ther. 342, 619–30.
- Kaur K., Simon A.F., Chauhan V., Chauhan A. 2015. Effect of bisphenol A on *Drosophila melanogaster* behavior - A new model for the studies on neurodevelopmental disorders. *Behav. Brain Res.* 284, 77–84.
- Kim I.O., Jeon S.H., Kim S.H. 2007. CNS midline cells are required for establishment and differentiation of *Drosophila* MP2 interneurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 535–541.
- Kim Y.C., Lee H.G., Seong C.S., Han K.A. 2003. Expression of a D1 dopamine receptor dDA1/DmDOP1 in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Gene Expr. Patterns* 3, 237–245.
- Laws S.C., Ferrell J.M., Stoker T.E., Schmid J., Cooper R.L. 2000. The effects of atrazine on female wistar rats: an evaluation of the protocol for assessing pubertal development and thyroid function. *Toxicol. Sci.* 58, 366–376.
- Lee Y.M., Misra H.P., Ayala F.J. 1981. Superoxide dismutase in *Drosophila melanogaster*: biochemical and structural characterization of allozyme variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 7052–5.
- Lenaz G., Fato R., Genova M.L., Bergamini C., Bianchi C., Biondi A. 2006. Mitochondrial Complex I: Structural and functional aspects. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1757, 1406–1420.
- Li K.-B., Cheng J.-T., Wang X.-F., Zhou Y., Liu W.-P. 2008. Degradation of Herbicides Atrazine and Bentazone Applied Alone and in Combination in Soils. *Pedosphere* 18, 265–272.
- Li Y., Sun Y., Yang J., Wu Y., Yu J., Li B. 2014. The long-term effects of the herbicide atrazine on the dopaminergic system following exposure during pubertal development. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 763, 23–29.
- Lim S., Ahn S.Y., Song I.C., Chung M.H., Jang H.C., Park K.S., Lee K.U., Pak Y.K., Lee H.K. 2009. Chronic exposure to the herbicide, atrazine, causes mitochondrial dysfunction and insulin resistance. *PLoS One.* 4(4), e5186.
- Lin Z., Dodd C.A., Filipov N.M. 2013. Short-term atrazine exposure causes behavioral deficits and disrupts monoaminergic systems in male C57BL/6 mice. *Neurotoxicol. Teratol.* 39, 26–35.
- Lin Z., Roede J.R., He C., Jones D.P., Filipov N.M. 2014. Short-term oral atrazine exposure alters the plasma metabolome of male C57BL/6 mice and disrupts α -

- linolenate, tryptophan, tyrosine and other major metabolic pathways. *Toxicology* 326, 130–141.
- Lu, B., Vogel, H., 2009. *Drosophila* models of neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Pathol.* 4, 315–342. doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012. Investigations
- Lu H., Zhang D.M., Chen H.L., Lin Y.X., Hang C.H., Yin H.X., Shi J.X. 2009. N-acetylcysteine suppresses oxidative stress in experimental rats with subarachnoid hemorrhage. *J. Clin. Neurosci.* 16, 684–688.
- Lushchak V.I. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 224, 164–175.
- Marcus S.R., Fiumera A.C. 2016. Atrazine exposure affects longevity, development time and body size in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 91-92, 18-25.
- Marí M., Morales A., Colell A., García-Ruiz C., Fernández-Checa J.C. 2009. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2685–2700.
- Marican C., Duportets L., Birman S., Jallon J.M. 2004. Female-specific regulation of cuticular hydrocarbon biosynthesis by dopamine in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 823–830.
- Missirlis F., Rahlfs S., Dimopoulos N., Bauer H., Becker K., Hilliker A., Phillips J. P., Jäckle H. 2003. A putative glutathione peroxidase of *Drosophila* encodes a thioredoxin peroxidase that provides resistance against oxidative stress but fails to complement a lack of catalase activity. *Biol Chem.* 384(3), 463-72.
- Moyes, C. D.; Schulte, P. M. *Princípios de fisiologia animal.* 2ª Ed. Artmed.
- Mustard J.A., Pham P.M., Smith B.H. 2010. Modulation of motor behavior by dopamine and the D1-like dopamine receptor AmDOP2 in the honey bee. *J. Insect Physiol.* 56, 422–430.
- Nässel D.R., Elekes K. 1992. Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons. *Cell Tissue Res.* 267, 147–167.
- Neckameyer W.S., Quinn W.G. 1989. Isolation and characterization of the gene for *Drosophila* tyrosine hydroxylase. *Neuron* 2, 1167–1175.
- Nelson D.L., Cox M.M. 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry* 6th ed., Book.
- Nguyen T., Yang C.S., Pickett C.B. 2004. The pathways and molecular mechanisms

- regulating Nrf2 activation in response to chemical stress. *Free Radic. Biol. Med.* 15;37(4), 433-41.
- Nicholls P., Fita I., Loewen P.C. 2000. Enzymology and structure of catalases. *Adv. Inorg. Chem.* 51, 51–106.
- Nichols C.D. 2006. *Drosophila melanogaster* neurobiology, neuropharmacology, and how the fly can inform central nervous system drug discovery. *Pharmacol. Ther.* 112, 677–700.
- O’Kane C.J. 2011. *Drosophila* as a model organism for the study of neuropsychiatric disorders., in: *Molecular and Functional Models in Neuropsychiatry*. pp. 37–60.
- Pallanck, L.J., Whitworth, A.J., 2005. *Animal Models of Movement Disorders*, *Animal Models of Movement Disorders*.
- Pitmon E., Stephens G., Parkhurst S.J., Wolf F.W., Kehne G., Taylor M., Lebestky T. 2016. The D1 family dopamine receptor, DopR, potentiates hind leg grooming behavior in *Drosophila*. *Genes, Brain Behav.* 15, 327–334.
- Plasse G. Van Der, Zessen R. Van, Luijendijk M.C.M., Erkan H., Stuber G.D., Ramakers G.M.J., Adan R.A.H. 2015. Modulation of cue-induced firing of ventral tegmental area dopamine neurons by leptin and ghrelin. *Int J Obes (Lond)*. 39(12), 1742–1749.
- Poddighe S., De Rose F., Marotta R., Ruffilli R., Fanti M., Secci P.P., Mostallino M.C., Setzu M.D., Zuncheddu M.A., Collu I., Solla P., Marrosu F., Kasture S., Acquas E., Liscia A. 2014. *Mucuna pruriens* (Velvet bean) rescues motor, olfactory, mitochondrial and synaptic impairment in PINK1B9 *Drosophila melanogaster* genetic model of Parkinson’s disease. *PLoS One.* 9, 1–11.
- Procaccini C., Santopaolo M., Faicchia D., Colamatteo A., Formisano L., De Candia P., Galgani M., De Rosa V., Matarese G. 2016. Role of metabolism in neurodegenerative disorders. *Metabolism.* 65, 1376–1390.
- Rajan A., Perrimon N. 2013. Of flies and men: insights on organismal metabolism from fruit flies. *BMC Biol.* 15, 11-38.
- Rand M.D. 2010. *Drosophotoxicology*: The growing potential for *Drosophila* in neurotoxicology. *Neurotoxicol. Teratol.* 32, 74–83.
- Ray P., Huang B., Tsuji Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24, 981–990.
- Ribeiro J.P.N., Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.F.C. 2010.

- Hydrogen peroxide, antioxidant compounds and biological targets: An in vitro approach for determination of scavenging capacity using fluorimetric multisyringe flow injection analysis. *Talanta*. 81, 1840–1846.
- Rice, D., Barone, S., Perspectives, E.H., Jun, S., Jr, S.B., 2000. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System : Evidence from Humans and Animal Models. *Environ Health Perspect.* 108, 511–533.
- Rodríguez V.M., Limón-Pacheco J.H., Mendoza-Trejo M.S., González-Gallardo A., Hernández-Plata I., Giordano M. 2013. Repeated exposure to the herbicide atrazine alters locomotor activity and the nigrostriatal dopaminergic system of the albino rat. *Neurotoxicology*. 34, 82–94.
- Rodríguez V.M., Thiruchelvam M., Cory-Slechta D.A. 2005. Sustained exposure to the widely used herbicide atrazine: Altered function and loss of neurons in brain monoamine systems. *Environ. Health Perspect.* 113, 708–715.
- Rosenbaum D.M., Rasmussen S.G.F., Kobilka B.K. 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459, 356–63.
- Ryu J.H., Ha E.M., Lee W.J. 2010. Innate immunity and gut-microbe mutualism in *Drosophila*. *Dev. Comp. Immunol.* 34(4), 369-376.
- Saw C.L.-L., Wu Q., Kong A.-N.T. 2010. Anti-cancer and potential chemopreventive actions of ginseng by activating Nrf2 (NFE2L2) anti-oxidative stress/anti-inflammatory pathways. *Chin. Med.* 27, 5-37.
- Segura-Aguilar J., Kostrzewa R.M. 2006. Neurotoxins and neurotoxicity mechanisms. An overview. *Neurotox. Res.* 10, 263–285.
- Shao L., Shuai Y., Wang J., Feng S., Lu B., Li Z., Zhao Y., Wang L., Zhong Y. 2011. Schizophrenia susceptibility gene dysbindin regulates glutamatergic and dopaminergic functions via distinctive mechanisms in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18831–6.
- Sharma A., Mishra M., Shukla A.K., Kumar R., Abdin M.Z., Chowdhuri D.K. 2012. Organochlorine pesticide, endosulfan induced cellular and organismal response in *Drosophila melanogaster*. *J. Hazard. Mater.* 221–222, 275–287.
- Shults C.W. 2004. Mitochondrial dysfunction and possible treatments in Parkinson's disease - A review. *Mitochondrion* 4, 641–648.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291–295.
- Sies H. 1991. Oxidative stress: From basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91.

- Sies H. (Helmut) 1985. Oxidative stress. Orlando.
- Solis W.A., Dalton T.P., Dieter M.Z., Freshwater S., Harrer J.M., He L., Shertzer H.G., Nebert D.W. 2002. Glutamate-cysteine ligase modifier subunit: Mouse Gclm gene structure and regulation by agents that cause oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.* 63, 1739–1754.
- Son T.G., Camandola S., Mattson M.P. 2008. Hormetic Dietary Phytochemicals. *Neuromolecular Med* 10, 236–246.
- Srivastava D.P., Yu E.J., Kennedy K., Chatwin H., Reale V., Hamon M., Smith T., Evans P.D. 2005. Rapid, Nongenomic Responses to Ecdysteroids and Catecholamines Mediated by a Novel *Drosophila* G-Protein-Coupled Receptor. *J. Neurosci.* 25, 6145–6155.
- Storey K.B. 1996. Oxidative stress: Animal adaptations in nature. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 29, 1715–1733.
- Strange R.C., Jones P.W., Fryer A.A. 2000. Glutathione S-transferase: Genetics and role in toxicology. *Toxicol. Lett.* 112–113, 357–363.
- Sudati J.H., Vieira F.A., Pavin S.S., Dias G.R.M., Seeger R.L., Golombieski R., Athayde M.L., Soares F.A., Rocha J.B.T., Barbosa N.V. 2013. *Valeriana officinalis* attenuates the rotenone-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicology* 37, 118–126.
- Svensson M.J., Larsson J. 2007. Thioredoxin-2 affects lifespan and oxidative stress in *Drosophila*. *Hereditas* 144, 25–32.
- Tanner C.M., Aston D.A. 2000. Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes. *Curr. Opin. Neurol.* 12, 427–430.
- Thornton B.J., Elthon T.E., Cerny R.L., Siegfried B.D. 2010. Proteomic analysis of atrazine exposure in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Chemosphere* 81, 235–241.
- Tieu K. 2011. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a009316.
- Torres C., Ribas G., Xamena N., Creus A., Marcos R. 1992. Genotoxicity of four herbicides in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res. Toxicol.* 280, 291–295.
- Truman, J.W., Riddiford, L.M., 2007. The morphostatic actions of juvenile hormone. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 761–770.
- Tyler M.S. 2000. *Developmental Biology, A Guide for Experimental Study.* Dev. Biol.

- A Guid. Exp. Study 85–106.
- Ueno T., Kume K. 2014. Functional characterization of dopamine transporter in vivo using *Drosophila melanogaster* behavioral assays. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 303.
- Veverytsa L., Allan D.W. 2013. Subtype-specific neuronal remodeling during *Drosophila* metamorphosis. *Fly (Austin)*. 7, 78–86.
- Vickrey T.L., Venton B.J. 2011. *Drosophila* dopamine2-like receptors function as autoreceptors. *ACS Chem. Neurosci.* 2, 723–729.
- Vogel A., Jocque H., Sirot L.K., Fiumera A.C. 2015. Effects of atrazine exposure on male reproductive performance in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 72, 14–21.
- Walters J.L., Lansdell T.A., Lookingland K.J., Baker L.E. 2015. The effects of gestational and chronic atrazine exposure on motor behaviors and striatal dopamine in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 289, 185–192.
- Weigmann K., Klapper R., Strasser T., Rickert C., Technau G., Jäckle H., Janning W., Klämbt C. 2003. FlyMove - A new way to look at development of *Drosophila*. *Trends Genet.* 19, 310–311.
- Wood K.C., Hsu L.L., Gladwin M.T. 2008. Sickle cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 1506–1528.
- Zaya R.M., Amini Z., Whitaker A.S., Ide C.F. 2011. Exposure to atrazine affects the expression of key genes in metabolic pathways integral to energy homeostasis in *Xenopus laevis* tadpoles. *Aquat. Toxicol.* 104, 254–262.
- Zwarts L., Vanden Broeck L., Cappuyens E., Ayroles J.F., Magwire M.M., Vulsteke V., Clements J., Mackay T.F.C., Callaerts P. 2015. The genetic basis of natural variation in mushroom body size in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Commun.* 6, 10115.

11. ANEXO