# UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

# FRANCISCO RUBENS ALVES DOS SANTOS

Toxicidade de doses subletais do herbicida Imazapyr sobre o desenvolvimento pós-embrionário e balanço redox de *Drosophila melanogaster* 

Maceió

2024

# FRANCISCO RUBENS ALVES DOS SANTOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Anhezini de Araujo

Maceió

2024

## Catalogação na Fonte Universidade Federal de Alagoas Biblioteca Central Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237t Santos, Francisco Rubens Alves dos. Toxicidade de doses subletais do herbicida Imazapyr sobre o desenvolvimento pós-embrionário e balanço redox de *Drosophila melanogaster /* Francisco Rubens Alves dos Santos. – Maceió, 2024. 37 f. : il.
Orientador: Lucas Anhezini de Araujo. Monografía (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas: bacharelado) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2024.
Bibliografía: f. 34-37.
1. Herbicidas. 2. Xenobióticos. 3. Técnicas biossensoriais. I. Título. CDU: 595.77

### FRANCISCO RUBENS ALVES DOS SANTOS

Toxicidade de doses subletais do herbicida Imazapyr sobre o desenvolvimento pós-embrionário e balanço redox de *Drosophila melanogaster* 

> Trabalho de conclusão de curso submetido ao corpo docente do curso de Ciências Biológicas Bacharelado da Universidade Federal de Alagoas e aprovado em 15 de Março de 2024.

Pr. Dr. Lucas Anhezini de Araújo Instituto de Ciências Biológicas da Saúde-UFAL

**Banca Examinadora:** 

Dra. Jerusa Maria de Oliveira, Instituto de Física-UFAL

Pr. Dr. Igor Santana de Melo, Instituto de Ciências Biológicas da Saúde-UFAL

Dedico esse trabalho à memória de minha falecida bisavó Maria Jacira, descanse em paz.

### AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha avó Sebastiana Rodrigues, sem ela nada do que está escrito nesse trabalho existiria.

Agradeço também minha namorada Laís, que desde que apareceu na minha vida tem se tornado minha companheira de todas as horas.

Agradeço também meu irmão Fernando José, minha mãe Rúbia Hérica e meus tios, principalmente meu tio Henrique, minha tia Aparecida e meu tio Severino por sempre acreditarem em mim.

Agradeço também meu orientador Lucas Anhezini por abrir as portas do seu laboratório para mim e por todos ensinamentos, além de despertar em mim a paixão pela mosca-da-fruta,

Agradeço também a Dra. Jerusa por todos os ensinamentos, principalmente por me ensinar a ter autonomia nos meus próprios resultados.

Agradeço também ao Clube de Regatas Flamengo, que desde que eu ingressei na Universidade Federal de Alagoas tem me trazido muitas e muitas alegrias.

Agradeço também a companhia de meus amigos, os amigos que fiz durante a universidade: Laura, Letícia, Erick, Heloisa, Amanda, Emilly e Viviane.

Agradeço também os meus companheiros de laboratório que ajudaram diretamente nesse trabalho, tanto aqueles que seguem no laboratório, quanto aqueles que hoje seguem outro caminho, sem o qual não seria possível a produção desses resultados. Agradeço ao Gabriel pela ajuda nos ensaios enzimáticos, agradeço a Rose pelos ensinamentos e pelos dados de prospecção das concentrações subletais, agradeço também a Talita e Luciana por ajuda nos experimentos de desenvolvimento.

Agradeço também os outros membros do laboratório pela troca de ensinamentos e pela amizade desenvolvida: Kauã, Renata, Auana, Larissa e Vanessa.

Agradeço também meus amigos de escola que ainda lembram de mim mesmo depois de tantos anos: Cayo, Mayara, Estephanny , João e Manoel.

Agradeço também aos professores Igor e Jerusa por aceitarem compor minha banca de defesa.

Por fim agradeço do fundo do meu coração, meus professores do colégio, que despertaram em mim a paixão pelos estudos: Professor de português Marcelo e professor de biologia João Pedro (JP).

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

# LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Receita de meio de cultura padrão para Drosophila	21
Quadro 2: Receita de meio de oviposição padrão para Drosophila	22

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tendência global do consumo de pesticidas em milhões de toneladas	15
Figura 2: Estrutura química do herbicida Imazapyr	16
Figura 3: Prospecção de concentrações subletais do herbicida imazapyr em Drosophila melanogaster	27
<i>Figura 4:</i> Efeito das concentrações subletais do herbicida imazapyr sobre o desenvolvimento pós-embrionário em <i>Drosophila melanogaster</i>	27
<i>Figura 5:</i> Imagens representativas de animais expostos às concentrações subletais de imazapyr presos no envoltório pupal	28
<i>Figura 6:</i> Efeito das concentrações subletais do herbicida imazapyr sobre a taxa de pupas formadas por dia em <i>Drosophila melanogaster</i>	28
<i>Figura 7:</i> Efeito da exposição a concentrações subletais de imazapyr sobre o tamanho larval em <i>Drosophila melanogaster</i>	29
<i>Figura 8:</i> Exposição ao herbicida IMZR resulta em aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio nas mitocôndrias de corpo gorduroso.	o 30
<i>Figura 9:</i> Exposição ao herbicida IMZR resulta em aumento dos níveis de glutationa reduzida nas mitocôndrias do co gorduroso.	rpo 30
Figura 10: Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo em larvas expostas às concentrações subletais do herbici	ida
imazapyr	31

#### **RESUMO**

A agricultura moderna é marcada principalmente pelo uso extensivo de pesticidas, principalmente de herbicidas e insecticidas. Os herbicidas da classe das imidazolinonas, como o imazapyr, são amplamente utilizados devido à sua seletividade em inibir a enzima acetolactato sintase, afetando a síntese de aminoácidos em plantas daninhas. No entanto, diversos artigos demonstram que mecanismos de toxicidade não-específicos podem tornar os herbicidas extremamente tóxicos a organismos não-alvo, principalmente a partir de exposições a concentrações subletais. Os efeitos do herbicida imazapyr sobre organismos não-alvo é pouco conhecido, sendo fundamental trabalhos que avaliem sua toxicidade. A mosca-da-fruta, Drosophila melanogaster, destaca-se como modelo ideal para avaliação da toxicidade de herbicidas como o imazapyr devido ao seu ciclo de vida rápido e custo acessível. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi a avaliação das concentrações subletais do herbicida imazapyr sobre o desenvolvimento pós-embrionário em Drosophila melanogaster. Neste trabalho, foi realizada a prospecção de concentrações subletais por meio da concentração letal média (CL50). Em seguida, animais em diferentes estágios de desenvolvimento foram expostos às concentrações subletais e quantificadas diferentes alterações no desenvolvimento pós-embrionário, além de alterações no padrão de homeostase redox. Observamos retardo no desenvolvimento, aumento na mortalidade larval e diminuição nas taxas de pupação e eclosão. Utilizando o biosensor de peróxido de hidrogenio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (roGFP-Orp1) observamos que a exposição ao imazapyr resultou em desequilíbrio redox mitocondrial, evidenciado pelo aumento nos níveis de H2O2 no corpo gorduroso. Além disso, houve alterações na atividade enzimática de biomarcadores de enzimas antioxidantes, indicando um estado de balanço redox. Esses resultados destacam a elevada toxicidade do imazapyr sobre o desenvolvimento pós-embrionário em Drosophila melanogaster em concentrações subletais.

Palavras-chave: Herbicida. Xenobióticos. Biossensor.

### ABSTRACT

Modern agriculture is primarily characterized by extensive use of pesticides, particularly herbicides and insecticides. Imidazolinone herbicides, such as imazapyr, are widely used due to their selectivity in inhibiting the enzyme acetolactate synthase, affecting amino acid synthesis in weeds. However, several studies have shown that non-specific toxicity mechanisms can make herbicides extremely toxic to non-target organisms, particularly at sublethal concentrations. The effects of the herbicide imazapyr on non-target organisms are poorly understood, necessitating research to assess its toxicity. The fruit fly, Drosophila melanogaster, stands out as an ideal model for evaluating the toxicity of herbicides like imazapyr due to its rapid life cycle and cost-effectiveness. Thus, the aim of this study was to evaluate sublethal concentrations of the herbicide imazapyr on post-embryonic development in Drosophila melanogaster. Sublethal concentrations were determined through the median lethal concentration (LC50). Subsequently, animals at different stages of development were exposed to sublethal concentrations, and various changes in post-embryonic development were quantified, along with alterations in the pattern of redox homeostasis. We observed developmental delays, increased larval mortality, and decreased pupation and eclosion rates. Using the hydrogen peroxide biosensor (roGFP-Orp1), we observed that exposure to imazapyr resulted in mitochondrial redox imbalance, evidenced by increased H2O2 levels in the fat body. Furthermore, there were alterations in the enzymatic activity of antioxidant biomarkers, indicating a state of redox balance. These results highlight the high toxicity of imazapyr on post-embryonic development in Drosophila melanogaster at sublethal concentrations.

Key Word: Herbicide. Xenobiotics. Biosensor.

# SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	14
	2.1 PESTICIDAS	14
	2.2 MECANISMO DE TOXICIDADE.	16
	2.3 Drosophila melanogaster COMO ORGANISMO MODELO.	18
3.	OBJETIVOS	20
	3.1 Objetivo geral	20
	3.2 Objetivo específico	21
4.	METODOLOGIA	21
	4.1 Preparo do meio de cultura.	21
	4.2 Preparo do meio de oviposição.	22
	4.3 Cultivo dos animais e linhagens utilizadas.	22
	4.4 Preparo das soluções.	22
	4.5 Ensaio de CL50.	22
	4.6 Avaliação do desenvolvimento pós-embrionário.	23
	4.7 Avaliação dos níveis de peróxido de hidrogênio mitocondrial.	23
	4.8 Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo.	24
	4.8.1 Preparação dos homogenatos.	24
	4.8.2 Ensaio de quantificação de proteína total	25
	4.8.3 Ensaio de atividade de catalase (CAT).	25
	4.8.4 Ensaio de atividade de superóxido dismutase (SOD)	25
	4.8.5 Ensaio de atividade de glutationa s-transferase (GST).	25
5.	RESULTADOS	26

6.	DISCUSSÃO	31
7.	CONCLUSÃO	33
8.	REFERÊNCIAS	34

## 1. INTRODUÇÃO

A agricultura moderna é marcada pela produção em alta escala, dentre as práticas que tornam isso possível está o uso extensivo de pesticidas, principalmente inseticidas e herbicidas, os quais podemos chamar de pesticidas. Entretanto, apesar dos avanços ligados à alta produção de alimentos, o uso desenfreado desses compostos resultam em riscos à saúde humana e ao meio ambiente (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011). A exposição a herbicidas com glifosato e paraquat apresenta potencial neurotóxico e está fortemente relacionada a uma série de casos de doenças neurodegenerativas (CABALLERO et al., 2018). Ademais, muitos pesticidas atuam como contaminantes no solo e na água, devido a sua alta persistência no ambiente, além de resultarem em danos a organismos não-alvo. Dessa forma, esses compostos tornam-se uma grande ameaça à biodiversidade existente nesses ambientes. A exposição a concentrações subletais do inseticida carbofuran foi responsável por uma série de danos fisiológicos ao figado e rins em peixes (AMÉRICO-PINHEIRO et al., 2020). Além disso, estudos demonstram que a mistura de pesticidas apresenta efeito sinérgico larvicida em abelhas (ZHU et al., 2014). Muitos pesticidas tiveram seu uso proibido em diversos países devido sua alta toxicidade a organismos não-alvo e aos seres humanos (AFFLECK; WALKER, 2019). Diante o exposto, é essencial a existência de trabalhos que avaliem a toxicidade de pesticidas existentes no mercado, principalmente os efeitos das concentrações sub-letais.

O imazapyr é um herbicida amplamente utilizado, pertencente ao grupo das imidazolinonas, cuja característica é apresentar como mecanismo de ação a inibição do crescimento vegetal (DUGDALE et al., 2020). As imidazolinonas destacam-se por sua alta seletividade, o que a caracteriza como de uso seguro (HESS et al., 2010). Entretanto, poucos trabalhos foram publicados a fim de avaliar a toxicidade desse herbicida em organismos não-alvo, principalmente em relação a suas concentrações subletais. Dessa forma, trabalhos que visem preencher essas lacunas em relação ao uso de pesticidas apresentam um enorme valor para a sociedade.

Dentre os principais modelos experimentais para a avaliação toxicológica,

destaca-se a mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster*. Esse pequeno díptero apresenta características que o fazem um ideal modelo para pesquisa científica em diversas áreas, como a genética, fisiologia e toxicologia (AFFLECK; WALKER, 2019). Dentre essas características podemos citar seu rápido ciclo-de-vida, alta progênie, biologia esclarecida, fácil cultivo e manuseio, além do baixo custo de manutenção de biotério (RAND et al., 2023). Ademais, a mosca-da-fruta apresenta uma série de ferramentas experimentais desenvolvidas ao longo de mais de 100 anos de uso como organismo modelo (BELLEN; TONG; TSUDA, 2010). Diante o exposto, é notório observar que a mosca-da-fruta pode ser utilizada como uma excelente plataforma *in vivo* para entender os efeitos do imazapyr em organismos não-alvo.

### 1. **REFERENCIAL TEÓRICO**

#### 1.1 PESTICIDAS.

Durante as décadas de 60 e 70, houve um crescente processo de industrialização da agricultura em todo mundo, marcado principalmente pela incorporação de novas tecnologias que garantem a produção em larga escala (EVENSON; GOLLIN, 2003) . Esse recorte histórico ficou conhecido como Revolução Verde. Dentre as marcas dessa revolução, destacam-se o uso extensivo de sementes geneticamente modificadas e de agroquímicos (fertilizantes, inseticidas e herbicidas). Apesar dos avanços na produção de alimentos em larga escala, principalmente nos países subdesenvolvidos, a Revolução Verde é responsável por drásticos impactos ao meio ambiente e à saúde humana (PINGALI, 2012).

Diante deste cenário, surge a iminente preocupação em relação ao uso abusivo dos pesticidas, sendo esse debate catalisado pela publicação do livro *Silent Spring* em setembro de 1962, escrito pela bióloga Rachel Carson (PIMENTEL, 2012). O livro aborda os danos ao meio ambiente, especialmente as aves, causados pela exposição ao pesticida Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT) (DEVI; MANJULA; BHAVANI, 2022). O DDT é um inseticida do grupo dos organoclorados, sintetizado pela primeira vez no ano de 1874 e foi amplamente utilizado durante a Segunda Guerra Mundial (JARMAN; BALLSCHMITER, 2012). Devido seu baixo custo de produção, o composto foi adotado como principal pesticida para uso em grandes cultivos (TURUSOV; RAKITSKY; TOMATIS, 2002). A forte influência da publicação de Rachel Carson, juntamente com diversos trabalhos que demonstravam a ligação do DDT com casos de câncer e problemas gestacionais resultaram em um movimento que levou à proibição do uso do DDT e de outros organoclorados em diversos países (D'AMATO; TORRES; MALM, 2002).

Entretanto, apesar da proibição do uso do DDT, a agroindústria ainda se mostra dependente do uso de pesticidas, dados da *Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database* (FAOSTAT) demonstram que o consumo de pesticidas em milhões de toneladas cresceu drasticamente no mundo todo de 1961 até 2019 (Figura 1). No Brasil, 82% dos pesticidas comercializados no país são usados nas principais culturas do país: soja, milho e cana-de-açúcar (PIGNATI et al., 2017).



Figura 1: Tendência global do consumo de pesticidas em milhões de toneladas. Dados da FAOSTAT (DEVI; MANJULA; BHAVANI, 2022).

Dessa forma, atualmente no mercado encontram-se uma enorme variedade de pesticidas. Esses compostos são classificados de acordo dois fatores: seu mecanismo de ação e principalmente sua composição química (HASSAAN; EL NEMR, 2020). O uso extensivo desses compostos ameaça a biodiversidade vigente, especialmente a de insetos polinizadores (BRÜHL; ZALLER, 2019). Destaca-se principalmente os efeitos resultantes das doses subletais, as quais são mais presentes no meio ambiente e promovem uma série de alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais (FRANÇA et al., 2017). A exposição a concentrações subletais de pesticidas neonicotinoides resultou em toxicidade crônica em colônias de abelhas selvagens (STULIGROSS; WILLIAMS, 2020) Em *Apis mellifera*, a exposição a doses sub-letais de glifosato resulta em problemas comportamentais e de aprendizado (FARINA et al., 2019).

Dentre os pesticidas, os herbicidas são historicamente os mais utilizados pela indústria (Figura 1). Diversas classes de herbicidas atuam principalmente como inibidores do metabolismo do crescimento vegetal (RETZINGER; e MALLORY-SMITH, 1997). Algumas classes destacam-se devido sua alta seletividade, como por exemplo a classe das imidazolinonas (FRANCISCHINI et al., 2012). A presença de anéis aromáticos heterocíclicos denominados imidazol é a característica que define quimicamente os herbicidas desta classe (Figura 2). As imidazolinonas atuam seletivamente em organismos vegetais, pois seu mecanismo de ação é a inibição da atividade da enzima acetolactato sintase (ALS) (RIZZARDI et al., 2002). Essa enzima atua no processo de síntese de aminoácidos de cadeia ramificadas em plantas (leucina, valina e isoleucina) (SHANER; ANDERSON;

STIDHAM, 1984). Dessa forma, as imidazolinonas são consideradas de uso seguro e altamente seletivo, uma vez que ALS não está presente no grupo dos metazoários. Dentre os representantes desta classe, encontram-se os herbicidas imazapyr (IMZR), imazethapyr (IMZT), imazaquin (IMZQ) e imazamox (IMZX) (TAN et al., 2005). O IMZR é amplamente utilizado no combate de ervas-daninhas conhecidas como tiririca (*Cyperus haspan*). Este herbicida apresenta alta solubilidade e baixa persistência no solo, sendo adotado principalmente em culturas de arroz.



Figura 2: Estrutura química do herbicida Imazapyr. Imagem disponível em pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. (PUBCHEM, 2024)

De modo geral, os efeitos do IMZR em organismos não-alvo é pouco documentado, principalmente pelo efeito de concentrações subletais. A exposição cutânea ao IMZR é capaz de causar irritação na pele e olhos, além disso, a ingestão de IMZR pode comprometer o funcionamento de órgãos e sistemas (COX, 1996). Em *Drosophila melanogaster*; a exposição ao IMZR não apresentou potencial genotóxico no teste de recombinação e mutação somática (SMART) (FRAGIORGE et al., 2008). Além disso, já foi reportado que a exposição combinada de IMZR e Imazapic resultou em toxicidade aguda e alterações no metabolismo em *Rhamdia quelen* (GOLOMBIESKI et al., 2016).

#### 1.2 MECANISMO DE TOXICIDADE.

A geração exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs) é uma marca comum à toxicidade de muitos pesticidas (SULE; CONDON; GOMES, 2022). O conceito de EROs abrange uma série de moléculas altamente reativas que são derivadas do

oxigênio molecular. As mitocôndrias são os principais sítios de geração de EROs, devido a fosforilação oxidativa que ocorre na membrana interna mitocondrial (MURPHY, 2009). Essas moléculas apresentam papéis essenciais em diversos processos biológicos, como na modulação do ciclo celular e no processo de diferenciação celular (PATTERSON et al., 2019). Dentre as EROs encontram-se: o radical hidroxila (OH-), ânion superóxido ( $O_2^*$ -) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (PIZZINO et al., 2017). A fim de neutralizar a ação dessas espécies reativas, as células apresentam um conservado sistema de defesa antioxidante, que é formado por uma série de enzimas, vitaminas e minerais (DUMANOVIĆ et al., 2021). Dentre as principais enzimas que compõem o sistema de defesa antioxidante, podemos citar a superóxido dismutase (SOD), que realiza a neutralização do radical superóxido, gerando oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, bem como a enzima catalase (CAT), responsável por decompor o peróxido de hidrogênio e como resultado gera oxigênio molecular e água (HESS et al., 2010).

Além das enzimas antioxidantes, as células contam com antioxidantes não-enzimáticos como o tripeptídeo não linear de baixo peso molecular, chamado de glutationa (GSH). As moléculas de glutationa são formadas por aminoácidos de glicina, glutamato e cisteína (VAŠKOVÁ et al., 2023). A GSH apresenta um importante papel em diferentes processos biológicos, sendo os grupamentos tiol (-SH) presentes nas cisteínas responsáveis pelo seu papel antioxidante (RAJ RAI et al., 2021). Dessa forma, GSH atua como redutor das EROs, gerando como produto a glutationa oxidada (GSSG) (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009). Essa atividade antioxidante pode ser mediada por enzimas como a glutationa peroxidase, que utiliza GSH como cofator para redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (HANDY; LOSCALZO, 2022)

A enzima glutationa redutase (GR) realiza a restauração de GSH a partir da redução de GSSG (COUTO; WOOD; BARBER, 2016). A restauração dos de GSH é de extrema importância para manter o padrão de homeostase de glutationa (ALKAZEMI; RAHMAN; HABRA, 2021). Dessa forma, os níveis de GSH/GSSG são ótimos indicadores de homeostase redox. As enzimas da família glutationa S-transferase (GST) conjugam GSH ao núcleo eletrofílico de xenobióticos, processo importante durante a segunda fase de detoxificação celular(CROOM, 2012)r. Ademais, GSH pode ser conjugado aos resíduos de cisteínas de proteínas em um processo chamado de S-glutationilação, mediado principalmente por GST. A S-glutationilação de proteínas protege a integridade das proteínas durante o estresse oxidativo (XIONG et al., 2011).

Esse processo pode ser revertido por enzimas da família da glutarredoxina (Grx), essas por sua vez, respondem diretamente aos níveis de GSH/GSSG.

O desbalanço entre o aumento da geração de EROs e a capacidade do sistema antioxidante caracteriza um fenômeno denominado estresse oxidativo. O estresse oxidativo resulta em danos às moléculas de DNA, proteínas e lipídios, promovendo disfunções mitocondriais, podendo culminar em apoptose (JOMOVA et al., 2023). Ademais, o estresse oxidativo pode resultar em danos sistêmicos e comprometer o funcionamento de órgãos e sistemas (ALBANO et al., 2022; SONGBO et al., 2019; WANG et al., 2020). Dessa forma, a avaliação da toxicidade desses compostos é essencial para garantir o seu uso racional ou até mesmo sua proibição, principalmente em relação ao dano que os pesticidas podem causar a organismos não-alvo.

### 1.3 Drosophila melanogaster COMO ORGANISMO MODELO.

A fim de avaliar os efeitos de pesticidas como o IMZR e pesticidas em organismos não-alvo é possível implementar abordagens in vivo e em in vitro. Devido a grande gama de complexas interações que esses compostos apresentam com sistemas biológicos, as abordagens in vitro apresentam uma série de limitações. Dessa forma, o uso de modelos in vivo se torna ideal para realização desses bioensaios. A mosca-da-fruta, Drosophila melanogaster destaca-se entre os principais organismos modelo na área da toxicologia (CHIFIRIUC et al., 2016). Dentre as características que a tornam um excelente modelo experimental destaca-se seu rápido ciclo de vida, alta progênie e baixo custo de manutenção. Ademais, a mosca-da-fruta foi um dos primeiros seres vivos a ter seu genoma totalmente seguenciado (ADAMS et al., 2000), além de ter sido essencial para o entendimento de diversos processos biológicos: embriogênese, tumorigênese, ciclo circadiano, dentre outros (ALI-MURTHY; KORNBERG, [s.d.]; MUKHERJEE et al., 2016; ROSATO; TAUBER; KYRIACOU, 2006). Por fim, devido ao processo de conservação evolutiva ao longo da história dos metazoários, diversos genes e vias de sinalização presentes em Drosophila apresentam ortólogos em humanos e em outros animais(MIRZOYAN et al., 2019)

O ciclo de vida em *Drosophila melanogaster* a 25°C dura cerca de dez dias e apresenta características marcantes dos insetos holometábolos, ou seja, que apresentam

metamorfose completa. Após 24 horas, os ovos eclodem larvas de primeiro instar (L1). Essas larvas iniciam um processo contínuo de alimentação com o objetivo de alcançar uma biomassa crítica. Quando isso ocorre, a cutícula limita o tamanho larval, o que tem início a primeira muda, dando origem a uma larva de segundo instar (L2). O mesmo processo ocorre para a transição de segundo instar para terceiro instar (L3). Tanto as transições de L1 para L2, quanto de L2 para L3 duram aproximadamente 24 horas (RIDDIFORD, 1993). No estágio de L3, a larva de Drosophila continua a acumular biomassa durante cerca de 48-72 horas. Durante todo esse período, uma estrutura análoga ao tecido adiposo humano, chamada de corpo gorduroso, atua no controle do metabolismo animal e na estocagem de energia. Ademais, o corpo gorduroso tem papel no desenvolvimento de diversas estruturas larvais, como o cérebro (ZHENG; YANG; XI, 2016). Após alcançar a biomassa crítica, a larva cessa sua alimentação e se torna errante, procurando um local para iniciar o processo de pupação. Durante o período de pupação (pré-pupa/pupa) o animal passa por uma série de remodelações corporais, além da degeneração de diversos tecidos larvais, o corpo gorduroso é todo consumido durante essa fase (RUSCONI et al, 2000). Ao final da pupação ocorre a eclosão do imago.

Uma das principais ferramentas experimentais presentes em *Drosophila* é o sistema de expressão binária UAS-GAL4. O sistema UAS-GAL4 permite a expressão tecido-específica de um gene de interesse em *Drosophila* ((BRAND; PERRIMON, 1993). Isso é possível a partir do cruzamento de duas linhagens transgênicas. A primeira linhagem contém uma construção que codifica o fator de transcrição GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae* sob o comando de um promotor de um tecido de interesse (*driver*). A segunda linhagem apresenta uma construção que codifica um gene de interesse sobre o comando da sequência de ativação a montante de *Saccharomyces cerevisiae*, denominada UAS (*responder*).

A partir do sistema UAS-GAL4 é possível monitorar tecidos *in vivo* a partir da expressão tecido-específica de uma série de sondas fluorescentes (HALES et al., 2015). Em 2011, Albrecht e colaboradores estabeleceram em *Drosophila* duas linhagens que expressam uma sonda mitocondrial fluorescente sensível a mudanças redox, denominada roGFP2. A partir dessas linhagens é possível entender *in vivo* o padrão de homeostase redox mitocondrial e citosólico em diferentes contextos. As roGFP são sondas biológicas baseadas em variações de GFP contendo resíduos de cisteínas em sua superfície que são sensíveis a alterações redox (REN; AI, 2013). Em meio redutor, a redução dos resíduos de cisteína resulta na formação de grupos tióis. Em meio oxidante,

a oxidação dos resíduos de cisteína resultam na formação de pontes de dissulfeto. (MEYER; DICK, 2010). Essas alterações resultam em mudanças conformacionais em roGFP e consequentemente resultam em mudanças no canal de excitação da sonda, que quando reduzida apresenta excitação na faixa de 488 nm e 405 nm quando oxidada. A partir da avaliação da razão 405 nm/488 nm é possível traçar o perfil de homeostase redox.. Ademais, ao fusionar roGFP ao receptor microbiano de peróxido de hidrogênio denominado Orp1, é possível estabelecer uma sonda sensível aos níveis específicos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(ALBRECHT et al., 2011). De forma complementar, ao fusionar roGFP a glutaredoxins que respondem diretamente ao pool de glutationa mitocondrial, os pesquisadores estabeleceram uma sonda sensível ao níveis específicos de GSH/GSSG (BHASKAR et al., 2014). Desde que foi estabelecida em 2002, os estudos com ro-GFP permitiram o aperfeiçoamento desta ferramenta experimental, de forma a gerar uma segunda versão mais eficiente, denominada roGFP2. A mosca-fruta apresenta ferramentas que permitem o entendimento da toxicidade de compostos em diferentes níveis de especificidade. De modo a tornar esse modelo uma plataforma ideal para ajudar a preencher a lacuna de conhecimento existente em relação aos efeitos de muitos pesticidas, dentre eles o IMZR. Diante o exposto, a hipótese desse trabalho é que concentrações subletais do herbicida imazapyr podem gerar danos a organismos não-alvo, por meio da geração exacerbada de EROs e do desbalanço redox.

## 2. **OBJETIVOS**

# 2.1 Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos de doses subletais do herbicida IMZR em Drosophila melanogaster.

2.2 Objetivos específicos:

- Estabelecer concentrações subletais do herbicida IMZR para os ensaios biológicos.
- Avaliar os efeitos de concentrações subletais do herbicida IMZR sobre o desenvolvimento pós-embrionário em *Drosophila melanogaster*.

- Entender os efeitos da exposição a concentrações subletais do herbicida IMZR sobre o padrão de homeostase redox.
- Mensurar os níveis de atividade enzimas antioxidantes de animais expostos às concentrações subletais do herbicida IMZR

# **3. METODOLOGIA**

### 3.1 Preparo do meio de cultura

Em todos os experimentos utilizamos o meio de cultura padrão para *Drosophila*, a seguir encontram-se as medidas e os ingredientes necessários para a preparação de um litro e meio de meio de cultura.

Ingrediente	Quantidade
Ágar	5 g
Dextrose (D-Glicose)	78,75
Sacarose	26,2 g
Levedo de cerveja	15,9 g
Fubá de milho	90,9
Água destilada	836 ml
Nipagin 10%	5,75 ml
Mistura de ácidos (418 mL de ácido propiônico, 41,5 mL de ácido fosfórico e 1.000 mL de água destilada)	5 ml

## Quadro 1: Receita de meio de cultura padrão para Drosophila

# 3.2 Preparo do meio de oviposição

Para a coleta de larvas em todos os experimentos utilizamos copos contendo placas preenchidas com meio de oviposição padrão para *Drosophila*. A seguir

encontram-se os ingredientes e medidas para preparação de 36 placas de oviposição.

Ingrediente	Quantidade
Ágar	1,875 g
Sacarose	6,25 g
Suco de uva	19 ml
Ácido propiônico	0,5 ml
Água destilada	130 ml

Quadro 2 : Receita de meio de oviposição padrão para Drosophila

# 3.3 Cultivo dos animais e linhagens utilizadas

Todos os animais foram cultivados em frascos e garrafas contendo meio de cultura padrão para *Drosophila*, a temperatura de 25°C sobre um ciclo de 12 horas de claro/escuro. Para os ensaios de desenvolvimento pós-embrionário e avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo ultizamos a linhagem de moscas selvagens Cantons Special (CS). Para avaliação da homeostase redox mitocondrial foram utilizados as linhagens *ppl-GAL4* (58768), *UAS-mito-roGFP2-Grx1* (67664) e *UAS-mito-roGFP2-Orp1* (67667). Linhagens obtidas do Bloomington Stock Center.

## 3.4 Preparo das soluções

Em todos os experimentos foi utilizado solução comercial de IMZR (Matt Tiririca, Grupo Keldrin ©) na concentração 2% p/p. A solução foi diluída em água destilada e misturada ao meio de cultura padrão para *Drosophila* em concentrações nominais de 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.75; 1.0 mg/mL.

3.5 Ensaio de concentração letal média (CL50)

A fim de determinar as concentrações subletais para os demais experimentos,

moscas selvagens recém eclodidas foram coletadas, separadas por sexo e expostas em frascos contendo uma série de concentrações de IMZR (0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.75; 1.0 mg/mL). Em seguida, após a exposição, foi quantificado o número de mortes durante o período de 24 horas e 96 horas de exposição. A partir dos dados de letalidade foi calculado o CL50 e estabelecido as concentrações subletais.

### 3.6 Avaliação do desenvolvimento pós-embrionário

Animais machos e fêmeas foram coletados e postos em copos de oviposição contendo em sua base placas com meio padrão para oviposição, além de uma pasta de fermento para estimular a oviposição. Os copos e placas foram trocados durante 3-4 dias em intervalos de 8 em 8 horas, para aclimatação dos animais e sincronização da coleta. As placas contendo embriões com intervalo máximo de 8 horas de postura foram coletadas. Após 24 horas, os embriões da placa eclodem em larvas de primeiro instar (L1). Essas larvas foram coletadas com o auxílio de pinças e expostas aos frascos contendo as concentrações nominais de IMZR diluídas em meio padrão. São inseridos 30 larvas por frasco, seis replicatas para cada concentração, ao todo nesse experimento são utilizadas 900 larvas de *Drosophila*. Após a exposição, os estágios subsequentes do desenvolvimento pós-embrionário foram acompanhados, sendo quantificado o número de pupas formadas por dia, o número total de pupas, taxa de letalidade larval e taxa de eclosão. Ademais, quando presente, alterações morfológicas são mensuradas e fotografadas com auxílio de um estereomicroscópio acoplado com câmera (Opticam modelo LOPT14003 de 14 megapíxel).

### 3.7 Avaliação dos níveis de peróxido de hidrogênio mitocondrial

A fim de avaliar os efeitos da exposição a concentrações subletais do herbicida IMZR sobre os níveis de  $H_2O_2$  mitocondrial, utilizamos o sistema UAS-GAL4 para expressar a sonda *mito-roGFP2-Orp1* no tecido do corpo gorduroso, cuja importância para o desenvolvimento pós-embrionário é seminal. Dessa forma, fêmeas virgens *ppl-GAL4* foram cruzadas com machos *UAS-mito-roGFP2-Orp1*. O mesmo procedimento foi realizado para mensurar os níveis de GSH/GSSG a partir do cruzamento de *ppl-GAL4 x UAS-mito-roGFP2-Grx1*. Em seguida, os animais foram postos em copos de oviposição, sendo realizada a coleta de larvas de primeiro instar da geração F1 e colocadas em placas contendo meio padrão de cultura para Drosophila. Após 72 horas de desenvolvimento, essas larvas foram coletadas e expostas às

concentrações subletais de IMZ. Após 24 horas de exposição, 6 larvas *ppl-GAL4>UAS-mito-roGFP2-Orp1* e *ppl-GAL4>UAS-mito-roGFP2-Grx1* foram coletadas por grupo e dissecadas com auxílio de pinças em solução fosfato-salina 1X (ph 7). Em seguida, o corpo gorduroso foi coletado e submetido a microscopia de fluorescência utilizando o microscópio de fluorescência EVOS M7000, as imagens foram feitas utilizando a câmera do próprio equipamento no aumento de 10X. As imagens nos canais de 405 nm (canal de oxidação) e 488 nm (canal de redução) fotografadas foram posteriormente processadas e analisadas no software Fiji (SCHINDELIN et al., 2012) seguindo as seguintes etapas: 1-Subtraímos o fundo das imagens utilizando a opção "subtract background" configurado para "rolling ball radius = 50 pixels". 2-Realizamos a conversão das imagens para o formato de 32 bits utilizando a opção tipo>32 bits. 3-Criamos um limite de intensidade de pixel para as imagens do canal de redução (488 nm) ao selecionar a opção "threshold" e aplicar o algoritmo de Otsu, definindo os pixels abaixo do limiar definidos como "not a number" (NaN)". 4-Criamos imagens técnica raciométricas da razão 405/488 nm utilizando o plugin "Ratio plus". 5-As imagens tiveram sua exibição definida pela opção "Fire". 6-Por fim, utilizando a opção "Measure "para obter obtidos os dados médios e desvio padrão das imagens raciométricas.

De forma a validar a metodologia, antes dos ensaios com o herbicida IMZR, larvas *ppl-GAL4>UAS-mito-roGFP2-Orp1* e *ppl-GAL4>UAS-mito-roGFP2-Grx1* não expostas ao herbicida foram dissecadas e tiveram o corpo gorduroso imersos em soluções 0,1 mM de DDT (agente redutor) e 0,1 mM de diamida (agente oxidante) e posteriormente foram submetidos aos mesmos passos experimentais citados anteriormente.

3.8 Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo

### 3.8.1 Preparação dos homogenatos

Após 96 horas de exposição de larvas selvagens às diferentes concentrações de IMZR, com o auxílio de pinças, 20 larvas de terceiro de instar (L3) foram coletadas para cada grupo, sendo realizado 5 replicatas por grupo. As larvas foram limpas em PBS 1X e posteriormente armazenadas em microtubos de 2 ml, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra-freezer a -80°C até a preparação dos homogenatos. A fim de realizar a preparação dos homogenatos, foram adicionados aos microtubos 300 µl de

tampão fosfato de potássio (0.2 mol/L) contendo 0,1 mol/L de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 0,1% de Triton X-100. As amostras foram homogeneizadas individualmente com o auxílio de um homogeneizador mecânico em banho de gelo. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm e 4°C, durante 15 minutos para separação e coleta do sobrenadante.

### 3.8.2 Ensaio de quantificação de proteína total

A quantificação da concentração de proteínas totais por amostra foi realizada por meio do método colorimétrico de Bradford. A curva de referência da proteína foi preparada a partir da diluição seriada de solução de 1,6 mg/ml de albumina de soro bovino. O meio reacional continha 200 µl de reagente de Bradford e 10 µl de amostra. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo registrado a absorbância na faixa de 595 nm utilizando o leitor de microplaca SpectraMax M2.

### 3.8.3 Ensaio de atividade de catalase (CAT)

O ensaio de atividade catalase foi realizado utilizando o ensaio colorimétrico baseado na reação do peróxido de hidrogênio com o molibdato de amônia O meio reacional continha 5  $\mu$ l de amostra e 100  $\mu$ l de solução 20 mM de peróxido de hidrogênio e após 5 minutos foi adicionada 150  $\mu$ l de solução 30 mg/ml de molibdato de amônia. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo registrado a absorbância na faixa de 375 nm.

3.8.4 Ensaio de atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade de superóxido dismutase foi mensurada a partir do ensaio colorimétrico de inibição da oxidação do substrato de pirogalol pela superóxido dismutase presente na amostra. Dessa forma, o meio reacional continha 30 µl de amostra, 99 µl de solução tampão, 6 µl de solução de 0,05 mg/ml de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina (MTT)e 15 µl de solução de 0.0126mg/ml de Pirogalol. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços. Após 15 minutos de incubação, a reação foi parada com adição de 150 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi registrada na faixa de 570 nm utilizando o leitor de microplaca SpectraMax M2.

3.8.5 Ensaio de atividade de glutationa S-transferase (GST)

A atividade da glutationa S-transferase foi mensurada a partir do ensaio de Ellman (ELLMAN, 1959), a partir da formação de um complexo colorido a partir da ligação do ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (CDNB) com um substrato de GSH conjugado a GST. Dessa forma, o meio reacional continha 670  $\mu$ l de tampão (pH 7), 7  $\mu$ l de amostra, 70  $\mu$ l de 0,1 M de CDNB e 7  $\mu$ l de 0,1 M de GSH. A absorbância foi registrada na faixa de 570 nm utilizando o espectrofotômetro digital Kazuaki modelo IL-593-S-BI

### 3.9 Análise estatística.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism (versão 8.0, GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA). Sendo realizado os testes de one-way ANOVA para o ensaios de CL50, desenvolvimento pós-embrionário, ensaios utilizando biossensores e biomarcadores de enzimas antioxidantes. O teste de two-way ANOVA foi utilizado para avaliação do desenvolvimento pós-embrionário. Para todas as análises foi adotado o nível de significância de 5%, com valor de p<0,05. Os gráficos expressam média ± erro padrão da média (EPM).

### 4. **RESULTADOS**

A fim de realizar a prospecção de concentrações subletais do herbicida IMZR, após 24 horas de exposição, observou-se que dentro do conjunto de concentrações testadas às concentrações de 0,10 mg/ml a 0,50 mg/ml tanto para fêmeas quanto para machos apresentaram letalidade média menor que 50%, podendo ser definidas como subletais.. (Figura 3-A e Figura 3-B). Em relação à exposição de 96 horas, as concentrações foram subletais entre 0,10 mg/ml a 0,20 mg/ml para ambos os sexos. (Figura 3-A e Figura 3-B).

Dessa forma, a partir desses dados foram estabelecidas as concentrações de 0,05, 0,1 e 0,2 mg/ml como subletais, sendo a concentração de 0,05 mg/ml pensada a partir da concentração mínima observada neste ensaio. Diante disso, todos os próximos resultados presentes neste trabalho avaliam essas três concentrações.



Figura 3- Prospecção de concentrações subletais do herbicida imazapyr em *Drosophila melanogaster*. Observa-se a taxa de letalidade de moscas adultas durante um intervalo de 24 e 96 horas de exposição ao herbicida IMZR. Em "A" observa-se as taxas de letalidade para as fêmeas e em "B" para os machos em comparação com o grupo controle.. Altas taxas de letalidade foram observadas a partir da concentração de 0,30 mg/ml para ambos os sexos. Os gráficos apresentam média  $\pm$  erro padrão da média, com valor P < 0,05 para o teste de One-way ANOVA, seguido do teste de tukey para múltiplas comparações. Valores de p em comparação ao grupo controle, \*\*p $\leq 0,01$ , \*\*\*p $\leq 0,001$  e \*\*\*\*p $\leq 0,001$ . (n = 25 animais por grupo).

A exposição de larvas de *Drosophila* às concentrações subletais (0,05, 0,1 e 0,2 mg/ml) estabelecidas no ensaio anterior resultaram em marcantes alterações no desenvolvimento pós-embrionário (Figura 4). Observou-se potencial diminuição significativa no número de pupas formadas na maior concentração (0,1 e 0,2 mg/ml) quando comparadas ao grupo controle ( $p \le 0,00001$ ) (Figura 4-A). De forma complementar, observa-se um aumento na taxa de letalidade larval nos grupos expostos a essas mesmas concentrações (Figura 4-B). Em relação à taxa de eclosão, a exposição a todas as concentrações subletais de IMZR resultaram em uma diminuição significativa no sucesso de eclosão dos imagos (Figura 4-C). Ademais, com o auxílio de um estereomicroscópio foi possível observar que os animais que não completaram a metamorfose conseguiram realizar uma ruptura inicial do envoltório pupal, entretanto, não conseguiram dar procedimento à eclosão em todas as concentrações testadas (Figura 5-A,B e C).



Figura 4: Efeito das concentrações subletais do herbicida IMZR sobre o desenvolvimento pós-embrionário em *Drosophila melanogaster.* Em "A" observa-se a taxa de letalidade larval dos animais expostos às concentrações subletais de imzapyr.. As maiores taxas de letalidade foram observadas nas concentrações de 0,1 e 0,2 mg/ml. controle x 0,1 mg/ml =  $**p \le 0,01$ , controle x 0,2 mg/ml =  $**p \le 0,01$ . De forma complementar, em "B" a exposição às maiores concentrações resultou em diminuição significativa na taxa de pupação, controle x 0,1 mg/ml =  $**p \le 0,01$  e controle x 0,2 mg/ml =  $**p \le 0,01$  Em relação à taxa de eclosão, em C observa-se diminuição drástica do número de eclosões em todas as concentrações avaliadas, controle x 0,05 =  $****p \le 0,00001$ , controle x 0,1 mg/ml =  $***p \le 0,00001$ , controle x 0,2 mg/ml =  $**p \le 0,00001$ . (n = 180 animais por grupo). Os gráficos apresentam média  $\pm$  erro

padrão da média, com valor  $P \le 0.05$  para o teste de One-way ANOVA, seguido do teste de tukey para múltiplas comparações.



**Figura 5- Animais expostos às concentrações subletais de IMZR presos no envoltório pupal.** Em A, B e C observa-se respectivamente as concentrações de 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml e 0,2 mg/ml. Em todas as concentrações, os animais conseguem realizar o rompimento inicial do envoltório pupal, porém, não conseguem emergir completamente. Barra de escala de 2 mm.

Em relação ao número de pupas formadas por dia, a exposição a maior concentração do herbicida gerou um atraso na transição larva-pupa quando em comparação ao grupo exposto somente ao meio de cultura padrão para *Drosophila* (Figura 6) Na maior concentração de 0,2 mg/ml, as pupas surgiram somente 24 horas após as primeiras pupas surgirem no grupo controle.



Figura 6- Efeito das concentrações subletais do herbicida IMZR sobre a taxa de pupas formadas por dia em *Drosophila* melanogaster. O gráfico apresenta a média de pupas formadas por dia em todos os grupos experimentais. Observa-se atraso na média de pupas formada nos grupos expostos ao herbicida quando comparados ao grupo controle. controle x 0,2 mg/ml = \*\*\*\*p $\leq$ 0,00001. O gráfico apresenta média ± erro padrão da média, com valor P < 0,05 para o teste de Two-way ANOVA, seguido do teste de tukey para múltiplas comparações

O atraso no desenvolvimento pós-embrionário (Figura 6) apresenta conexão direta com a diminuição no tamanho larval após a exposição ao herbicida, o que pode ser observado a partir da comparação da relação comprimento/largura entre todos os grupos experimentais (Figura 7).



Figura 7- Efeito da exposição a concentrações subletais de IMZR sobre o tamanho larval em *Drosophila melanogaster*. Em "A" observa-se que a exposição ao herbicida IMZR resultou em diminuição média do tamanho larval, sendo observado a partir da relação comprimento/largura (mm), controle x 0,05 mg/ml = \*\* $p \le 0,001$ , controle x 0,1 mg/ml = \*\* $p \le 0,001$  e controle x 0,2 mg/ml = \*\* $p \le 0,0001$  (n = 5 por grupo). O gráfico apresenta média ± erro padrão da média, com valor P < 0,05 para o teste de One-way ANOVA, seguido do teste de tukey para múltiplas comparações. Em B observa-se uma figura representativa de uma larva do grupo controle em comparação com uma larva exposta ao herbicida IMZR em C. Barra de escala de 2,5 mm para B e 1,5 mm para C.

O atraso no desenvolvimento, juntamente com o tamanho diminuto das larvas, tornou extremamente difícil realizar a avaliação da homeostase redox mitocondrial devido principalmente a pouca quantidade do corpo gorduroso de larvas expostas desde o primeiro instar e a falta de sincronicidade entre os estágios larvais de todos os grupos expostos. Dessa forma, para esse experimento foi realizada a exposição aguda de larvas L3 durante o intervalo de 24 horas.

Em relação ao biossensor de peróxido de hidrogênio, observou-se uma maior intensidade de fluorescência no canal de oxidação (Figura 8-J). Diante disso, notou-se a partir da quantificação da razão da florescência nos dois canais (405/488) um aumento expressivo nos níveis de  $H_2O_2$  mitocondrial no corpo gorduroso de larvas expostas à concentração de 0,2 mg/ml de IMZR (Figura 8-A). Entretanto, em relação ao biossensor de GSH/GSSG, observa-se a partir do padrão de homeostase redox, um aumento nos níveis de glutationa reduzida na concentração de 0,2 mg/ml quando comparada às demais concentrações (Figura 9-J).



Figura 8- Exposição ao herbicida IMZR resulta em aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio nas mitocôndrias do corpo gorduroso. Nas linhas são apresentados os grupos analisados (controle, 0,05 mg/ml e 0,2 mg/ml). Na primeira coluna encontram-se imagens representativas do canal de oxidação da sonda, em A, D e G. Na segunda coluna imagens representativas do canal de redução da sonda, em B, E e H. Por fim, na última coluna em C, Fe I é apresentada a imagem raciométrica dos dos canais vistos anteriormente. O filtro utilizado na última coluna mostra cores mais quentes onde os níveis de peróxido de hidrogênio são maiores, indicando um desbalanço redox pró-oxidativo. As cabeças de seta indicam os pontos de maior intensidade de desbalanço redox pró-oxidativo. Barra de escala de 300µm. Em J observa-se o perfil raciométrico dos animais expressando o biossensor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicando aumento significativo nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração de 0,2 mg/m, controle x 0,2 mg/ml = \*\*p≤ 0,001 gráfico apresenta média  $\pm$  erro padrão da média, com valor P < 0,05 para o teste de One-way ANOVA, seguido do teste de tukey para múltiplas comparações.



Figura 9- Exposição ao herbicida IMZR resulta em aumento dos níveis de glutationa reduzida nas mitocôndrias do corpo gorduroso. Nas linhas são apresentados os grupos analisados (controle, 0,05 mg/ml e 0,2 mg/ml). Na primeira (A, D e G) e segunda (B, E e H) coluna encontram-se respectivamente imagens das imagens representativas do canal de oxidação e redução da sonda. Na útima coluna em C, Fe I é apresentada a imagem raciométrica de canal de oxidação/canal de redução. O filtro utilizado na última coluna mostra cores mais frias onde os níveis de glutationa reduzida são maiores, indicando um desbalanço redox pró-redução na maior concentração avaliada. As cabeças de seta indicam os pontos de maior intensidade dos níveis de glutationa oxidada. Barra de escala de 300µm. Em B é apresentado o perfil raciómetrico de animais expressando o biossensor de GSH/GSSG, indicando diminuição dos níveis de glutationa oxidada na maior concentração avaliada em comparação ao grupo controle., controle x 0,2 mg/ml \*\*\*p< 0,0001. Os gráficos apresentam média  $\pm$  erro padrão da média, com valor P < 0,05 para o teste de One-way ANOVA, seguido do teste de tukey para múltiplas comparações.

As alterações no padrão de homeostase redox mitocondrial causadas pela exposição ao herbicida IMZR correlaciona-se com o aumento da atividade das enzimas antioxidantes. A partir dos ensaios com biomarcadores de estresse oxidativo, observou-se uma maior atividade das enzimas CAT e SOD na maior concentração testada (Figura 10-A e Figura 10-B). Entretanto, os níveis de atividade da enzima GST encontram-se significativamente menores em todas concentrações testadas em relação ao grupo controle (Figura 10-C).



Figura 10- Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo em larvas expostas às concentrações subletais do herbicida IMZR. Em A observa-se a média de atividade da enzima catalase em  $\mu$ g/mg de proteína. A exposição a maior concentração resultou em um aumento significativo da atividade de CAT em relação às demais concentrações, controle x 0,2 mg/ml \*\*\*p≤0,0001 . Em B é apresentado a média de atividade da enzima superóxido dismutase em U SOD/mg de proteína. Semelhante ao gráfico A, a atividade de SOD foi significativamente elevada na concentração de 0,2 mg/ml em relação aos demais grupos experimentais, controle x 0,2 mg/ml \*\*\*p≤0,0001. Por fim, em C é observado os níveis de atividade da enzima glutationa s-transferase em µmol de GST por GSH/g. Em relação ao grupo controle, a exposição às doses subletais do herbicida resultou em diminuição na atividade de GST nas larvas de *Drosophila*, controle x 0,1 mg/ml = \*p≤0,01 e controle x 0,2 mg/ml = \*p≤0,01 (n=20 larvas por grupo, 5 repetições por grupo). Os gráficos apresentam média ± erro padrão da média, com valor *P* < 0,05 para o teste de One-way ANOVA, seguido do teste de tukey para múltiplas comparações.

## 5. DISCUSSÃO

A alta toxicidade observada em nosso estudo durante o desenvolvimento pós-embrionário pode ser um indicativo do dano que o IMZR pode apresentar a insetos polinizadores como as abelhas, cujo desenvolvimento é caracterizado como holometábolo, assim como em *Drosophila*. O impacto de muitos pesticidas a organismos não-alvo estão entre os principais problemas associados ao seu uso extensivo, principalmente os efeitos associados a doses subletais, pois uma vez no ambiente, os organismos são expostos a concentrações extremamente menores em relação às aplicadas nas culturas.

Observa-se que apesar da alta seletividade do IMZR, diversos trabalhos demonstram que outros herbicidas da classe das imidazolinonas apresentam efeitos tóxicos a organismos não-alvo. Em condições de laboratório, formulações contendo imazethapyr e imazapic geraram alterações no metabolismo e toxicidade em *Cyprinus* 

carpio (MORAES et al., 2011). Diferentes formulações de imazethapyr resultaram em oxidativo alterações morfológicas genotoxicidade, estresse e em anuros 2016; PÉREZ-IGLESIAS (GOLOMBIESKI et al., et al., 2017. 2021; PÉREZ-IGLESIAS; BRODEUR; LARRAMENDY, 2020). Dessa forma, a partir dos resultados expostos é possível concluir que doses subletais do herbicida IMZR podem apresentar riscos à saúde humana e à biodiversidade, como já foi documentado para outros herbicidas dessa mesma classe.

Os altos níveis de atividade de CAT e SOD indicam um processo de resposta ao estresse, corroborando a literatura vigente que demonstra que a geração exacerbada de EROs e, por consequência o estresse oxidativo, apresenta-se como um mecanismo de toxicidade não-específica de muitos pesticidas (SULE; CONDON; GOMES, 2022). As mitocôndrias, principalmente a partir da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, produzem EROs naturalmente como subproduto de suas reações redox. Entretanto, disfunções mitocondriais como resultado da exposição a xenobióticos podem resultar em um estado exacerbado de produção de EROs. O mecanismo pelo qual IMZR é capaz de induzir a disfunção mitocondrial pode ser explicado a partir da fase 1 de metabolização de xenobióticos. Durante essa fase, ocorre a ação de proteínas da superfamília citocromo P450, que são capazes de promover a monoxigenação de compostos químicos, de forma a tornar compostos insolúveis e inertes, podendo serem metabolizados pelo organismo. (ANZENBACHER, P.; ANZENBACHEROVÁ, E., 2001). Entretanto, esse mecanismo pode resultar na formação de compostos altamente eletrofílicos, extremamente tóxicos ao ambiente intracelular (GONZALEZ, F. J., 2005).

A toxicidade das doses subletais de IMZR aparentam comprometer o desenvolvimento pós-embrionário a partir de danos a tecidos importantes, como o corpo gorduroso. A dinâmica mitocondrial nas células do corpo gorduroso são bastante do metabolismo importantes controle durante 0 período para larval(SRISKANTHADEVAN-PIRAHAS et al., 2022). O crescimento larval e o início do processo de pupação dependem de cascatas de sinalização que perpassam o corpo gorduroso (LI; YU; FENG, 2019). Nos insetos holometábolos, as mudas entre os instares larvais e entre o terceiro instar larval e a fase de pupa depende de picos do hormônio esteroide 20-hidroxiecdisona (20E)(WARREN et al., 2006). O papel desse hormônio é antagonizar os peptídeos semelhantes à insulina (DILPs), que atuam se ligando a receptores de insulina no corpo gorduroso e levam a ativação do crescimento celular principalmente durante a fase larval (HYUN, 2018). A presença de 20E resulta na ativação dos receptores de ecdisona presentes nas células do corpo gorduroso, o que induz a superprodução de ERO nas mitocôndrias do corpo gorduroso, atuando como inibidores do crescimento celular (TOSHNIWAL et al., 2019). A exposição às concentrações subletais de IMZR ao gerar elevados níveis de EROs podem ativar de forma ininterrupta o mecanismo de parada do crescimento celular. Como consequência, ocorre a diminuição do tamanho das larvas expostas e gera atraso no desenvolvimento. A hipótese de que a exposição ao herbicida IMZR pode está cooptando o sistema de controle de proliferação celular mediado por EROS pode ser suportada a partir dos resultados que indicam que o corpo gorduroso de larvas expostas a altas concentrações de IMZR apresentam maiores níveis de peróxido de hidrogênio.

Outra hipótese pode ser levantada é que as doses subletais de IMZR podem bloquear a síntese de 20-hidroxiecdisona, uma vez que a geração desse hormônio esteroide depende da entrega do colesterol as células da glândula protorácica, que é mediado por enzimas da família da GST (NIWA; NIWA, 2011). Como foi observado pelos ensaios com biomarcadores, a atividade de GST é drasticamente menor nos grupos expostos ao herbicida, indicando que a toxicidade do IMZR pode resultar numa deficiência nos níveis de GST, o que dificulta a entrega de colesterol as glândulas protorácicas e resulta em problemas no desenvolvimento pós-embrionário. Entretanto, para confirmar essa hipótese, seria necessário realizar novos ensaios de atividade enzimática somente com amostras de glândula protorácica.

## 6. CONCLUSÃO

Nossos dados confirmam a hípotese inicial de que a exposição a concentrações subletais do herbicida IMZR são capazes de causar toxicidade a organismos não-alvo. Mostramos que concentrações subletais do herbicida IMZR são capazes de gerar toxicidade durante o desenvolvimento pós-embrionário, levando a altas taxas de letalidade larval, atraso no desenvolvimento e diminuição no tamanho larval. Diante disso, a exposição a concentrações subletais do herbicida IMZR resulta em aumento da atividade das enzimas antioxidantes (CAT e SOD). Ademais, as altas concentrações testadas do herbicida resultaram em desbalanço redox mitocondrial no tecido do corpo gorduroso. Nossos dados indicam que apesar da alta seletividade do IMZR, o herbicida é capaz de gerar toxicidade a organismos não-alvo.

# 7. REFERÊNCIAS

- 1. ADAMS, M. D. et al. The genome sequence of Drosophila melanogaster. Science (New York, N.Y.), v. 287, n. 5461, p. 2185–2195, 24 mar. 2000.
- AFFLECK, J. G.; WALKER, V. K. Drosophila as a Model for Developmental Toxicology: Using and Extending the Drosophotoxicology Model. Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), v. 1965, p. 139–153, 2019.
- 3. ALBANO, G. D. et al. Overview of the Mechanisms of Oxidative Stress: Impact in Inflammation of the Airway Diseases. Antioxidants, v. 11, n. 11, p. 2237, nov. 2022.
- 4. ALBRECHT, S. C. et al. In vivo mapping of hydrogen peroxide and oxidized glutathione reveals chemical and regional specificity of redox homeostasis. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 6, p. 819–829, 7 dez. 2011.
- 5. ALI-MURTHY, Z.; KORNBERG, T. B. Bicoid gradient formation and function in the Drosophila pre-syncytial blastoderm. eLife, v. 5, p. e13222, [s.d.].
- 6. ALKAZEMI, D.; RAHMAN, A.; HABRA, B. Alterations in glutathione redox homeostasis among adolescents with obesity and anemia. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3034, 4 fev. 2021.
- AMÉRICO-PINHEIRO, J. H. P. et al. Histological Changes in Targeted Organs of Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) Exposed to Sublethal Concentrations of the Pesticide Carbofuran. Water, Air, & Soil Pollution, v. 231, n. 5, p. 228, 6 maio 2020.
- BELLEN, H. J.; TONG, C.; TSUDA, H. 100 years of Drosophila research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. Nature reviews. Neuroscience, v. 11, n. 7, p. 514–522, jul. 2010.
- 9. BHASKAR, A. et al. Reengineering Redox Sensitive GFP to Measure Mycothiol Redox Potential of Mycobacterium tuberculosis during Infection. **PLoS pathogens**, v. 10, p. e1003902, 30 jan. 2014.
- 10. BRAND, A. H.; PERRIMON, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. **Development**, v. 118, n. 2, p. 401–415, 1 jun. 1993.
- 11. BRÜHL, C. A.; ZALLER, J. G. Biodiversity Decline as a Consequence of an Inappropriate Environmental Risk Assessment of Pesticides. Frontiers in Environmental Science, v. 7, 2019.
- 12. CABALLERO, M. et al. Estimated Residential Exposure to Agricultural Chemicals and Premature Mortality by Parkinson's Disease in Washington State. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 15, n. 12, p. 2885, dez. 2018.
- 13. CHIFIRIUC, M. C. et al. Drosophotoxicology: An Emerging Research Area for Assessing Nanoparticles Interaction with Living Organisms. International Journal of Molecular Sciences, v. 17, n. 2, p. 36, 14 fev. 2016.
- COUTO, N.; WOOD, J.; BARBER, J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. Free Radical Biology & Medicine, v. 95, p. 27–42, jun. 2016.
- 15. COX, C. Imazapyr: herbicide factsheet. Journal of Pesticide Reform Imazapyr, v.16, n.3, p.16-20, 1996.
- CROOM, E. Chapter Three Metabolism of Xenobiotics of Human Environments. Em: HODGSON, E. (Ed.). Progress in Molecular Biology and Translational Science. Toxicology and Human Environments. [s.l.] Academic Press, 2012. v. 112p. 31–88.
- 17. DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Pesticide Exposure, Safety Issues, and Risk Assessment Indicators. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 8, n. 5, p. 1402–1419, maio 2011.
- D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental <FONT FACE=Symbol&gt;-&lt;/FONT&gt; uma revisão. Química Nova, v. 25, p. 995–1002, nov. 2002.
- 19. DEVI, P. I.; MANJULA, M.; BHAVANI, R. V. Agrochemicals, Environment, and Human Health. Annual Review of Environment and Resources, v. 47, n. 1, p. 399–421, 2022.
- 20. DUGDALE, T. M. et al. Residues and Dissipation of the Herbicide Imazapyr after Operational Use in Irrigation Water. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 17, n. 7, p. 2421, abr. 2020.

- DUMANOVIĆ, J. et al. The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. Frontiers in Plant Science, v. 11, 6 jan. 2021.
- 22. ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1 maio 1959.
- 23. EVENSON, R. E.; GOLLIN, D. Assessing the Impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. Science, v. 300, n. 5620, p. 758–762, 2 maio 2003.
- FARINA, W. M. et al. Effects of the Herbicide Glyphosate on Honey Bee Sensory and Cognitive Abilities: Individual Impairments with Implications for the Hive. Insects, v. 10, n. 10, p. 354, 18 out. 2019.
- 25. FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular aspects of medicine**, v. 30, n. 1–2, p. 1–12, 2009.
- FRAGIORGE, E. J. et al. Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food and Chemical Toxicology, v. 46, n. 1, p. 393–401, 1 jan. 2008.
- 27. FRANÇA, S. M. DE et al. The Sublethal Effects of Insecticides in Insects. Em: Biological Control of Pest and Vector Insects. [s.l.] IntechOpen, 2017.
- 28. FRANCISCHINI, A. C. et al. Eficácia e seletividade de herbicidas do grupo das imidazolinonas aplicados em pós-emergência de plantas daninhas monocotiledôneas na cultura do girassol CL. **Planta Daninha**, v. 30, p. 843–851, dez. 2012.
- GOLOMBIESKI, J. I. et al. Imazapyr+imazapic herbicide determines acute toxicity in silver catfish Rhamdia quelen. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 128, p. 91–99, jun. 2016.
- 30. HALES, K. G. et al. Genetics on the Fly: A Primer on the Drosophila Model System. Genetics, v. 201, n. 3, p. 815–842, 1 nov. 2015.
- 31. HANDY, D. E.; LOSCALZO, J. The role of glutathione peroxidase-1 in health and disease. Free Radical Biology and Medicine, v. 188, p. 146–161, 1 ago. 2022.
- 32. HASSAAN, M. A.; EL NEMR, A. Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 46, n. 3, p. 207–220, 1 set. 2020.
- 33. HESS, F. G. et al. Imidazolinones\*. Em: KRIEGER, R. (Ed.). Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition). New York: Academic Press, 2010. p. 1853–1863.
- 34. HYUN, S. Body size regulation by maturation steroid hormones: a Drosophila perspective. **Frontiers in Zoology**, v. 15, n. 1, p. 44, 20 nov. 2018.
- 35. JARMAN, W. M.; BALLSCHMITER, K. From coal to DDT: the history of the development of the pesticide DDT from synthetic dyes till Silent Spring. **Endeavour**, v. 36, n. 4, p. 131–142, dez. 2012.
- 36. JOMOVA, K. et al. Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. Archives of Toxicology, v. 97, n. 10, p. 2499–2574, 1 out. 2023.
- 37. LI, S.; YU, X.; FENG, Q. Fat Body Biology in the Last Decade. Annual Review of Entomology, v. 64, n. Volume 64, 2019, p. 315–333, 10 jan. 2019.
- 38. MEYER, A. J.; DICK, T. P. Fluorescent Protein-Based Redox Probes. Antioxidants & Redox Signaling, v. 13, n. 5, p. 621–650, set. 2010.
- 39. MIRZOYAN, Z. et al. Drosophila melanogaster: A Model Organism to Study Cancer. Frontiers in Genetics, v. 10, p. 51, 1 mar. 2019.
- 40. MORAES, B. S. et al. Toxicological responses of *Cyprinus carpio* after exposure to a commercial herbicide containing imazethapyr and imazapic. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 74, n. 3, p. 328–335, 1 mar. 2011.
- 41. MUKHERJEE, S. et al. Drosophila Brat and human ortholog TRIM3 maintain stem cell equilibrium and suppress brain tumorigenesis by attenuating Notch nuclear transport. **Cancer research**, v. 76, n. 8, p. 2443–2452, 15 abr. 2016.
- 42. MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. Pt 1, p. 1–13, 1 jan. 2009.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 54738, Imazapyr. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Imazapyr. Accessed Mar. 17, 2024.
- 44. NIWA, R.; NIWA, Y. S. The Fruit Fly Drosophila melanogaster as a Model System to Study Cholesterol Metabolism and Homeostasis. **Cholesterol**, v. 2011, p. 176802, 2011.
- 45. PATTERSON, J. C. et al. ROS and Oxidative Stress Are Elevated in Mitosis during

Asynchronous Cell Cycle Progression and Are Exacerbated by Mitotic Arrest. Cell Systems, v. 8, n. 2, p. 163- 167.e2, 27 fev. 2019.

- 46. PÉREZ-IGLESIAS, J. M. et al. Avaliação do dano oxidativo ao DNA induzido por imazethapir por ensaio de eletroforese alcalina em gel unicelular modificado por Endo III e Fpg em girinos *de Hypsiboas pulchellus* (Anura, Hylidae). Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 142, p. 503–508, 1 ago. 2017.
- 47. PÉREZ-IGLESIAS, J. M. et al. Multiple Level Effects of Imazethapyr on Leptodactylus latinasus (Anura) Adult Frogs. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 81, n. 3, p. 492–506, 1 out. 2021.
- PÉREZ-IGLESIAS, J. M.; BRODEUR, J. C.; LARRAMENDY, M. L. An imazethapyr-based herbicide formulation induces genotoxic, biochemical, and individual organizational effects in Leptodactylus latinasus tadpoles (Anura: Leptodactylidae). Environmental Science and Pollution Research, v. 27, n. 2, p. 2131–2143, 1 jan. 2020.
- 49. PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. Ciência & Saúde Coletiva, v. 22, p. 3281–3293, out. 2017.
- 50. PIMENTEL, D. Silent Spring, the 50th anniversary of Rachel Carson's book. **BMC Ecology**, v. 12, p. 20, 27 set. 2012.
- 51. PINGALI, P. L. Green Revolution: Impacts, limits, and the path ahead. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 109, n. 31, p. 12302–12308, 31 jul. 2012.
- 52. PIZZINO, G. et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 2017, p. 8416763, 2017.
- 53. PUBCHEM. Imazapyr. Disponível em: <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54738">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/54738</a>>. Acesso em: 17 mar. 2024.
- 54. RAJ RAI, S. et al. Glutathione: Role in Oxidative/Nitrosative Stress, Antioxidant Defense, and Treatments. ChemistrySelect, v. 6, n. 18, p. 4566–4590, 2021.
- 55. RAND, M. D. et al. Perspectives on the Drosophila melanogaster Model for Advances in Toxicological Science. **Current Protocols**, v. 3, n. 8, p. e870, 2023.
- 56. REN, W.; AI, H.-W. Genetically Encoded Fluorescent Redox Probes. Sensors, v. 13, n. 11, p. 15422–15433, nov. 2013.
- RETZINGER, E. J.; MALLORY-SMITH, C. Classification of Herbicides by Site of Action for Weed Resistance Management Strategies. Weed Technology, v. 11, n. 2, p. 384–393, jun. 1997.
- 58. RIDDIFORD, Lynn M. Hormones and Drosophila Development. BATE, Michael. M.A, Alfonso (org.). **The Development of Drosophila melanogaster**. 1993. p. 889
- 59. RIZZARDI, M. A. et al. Resistência de plantas aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase. **Planta Daninha**, v. 20, p. 149–158, abr. 2002.
- 60. ROSATO, E.; TAUBER, E.; KYRIACOU, C. P. Molecular genetics of the fruit-fly circadian clock. **European Journal of Human Genetics**, v. 14, n. 6, p. 729–738, jun. 2006.
- 61. RUSCONI, J. C.; HAYS, R.; CAGAN, R. L. Programmed cell death and patterning in Drosophila. p. 1063–1070, 2000.
- 62. SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nature Methods, v. 9, n. 7, p. 676–682, jul. 2012.
- 63. SHANER, D. L.; ANDERSON, P. C.; STIDHAM, M. A. Imidazolinones: potent inhibitors of acetohydroxyacid synthase. Plant Physiology, v. 76, n. 2, p. 545–546, out. 1984.
- 64. SONGBO, M. et al. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Toxicology** Letters, v. 307, p. 41–48, 1 jun. 2019.
- 65. SRISKANTHADEVAN-PIRAHAS, S. et al. Adipose mitochondrial metabolism controls body growth by modulating systemic cytokine and insulin signaling. **Cell Reports**, v. 39, n. 6, p. 110802, 10 maio 2022.
- STULIGROSS, C.; WILLIAMS, N. M. Pesticide and resource stressors additively impair wild bee reproduction. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, v. 287, n. 1935, p. 20201390, 30 set. 2020.
- 67. SULE, R. O.; CONDON, L.; GOMES, A. V. A Common Feature of Pesticides: Oxidative Stress—The Role of Oxidative Stress in Pesticide-Induced Toxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 5563759, 19 jan. 2022.
- 68. TAN, S. et al. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. Pest

Management Science, v. 61, n. 3, p. 246-257, 2005.

- 69. TOSHNIWAL, A. G. et al. ROS Inhibits Cell Growth by Regulating 4EBP and S6K, Independent of TOR, during Development. **Developmental Cell**, v. 49, n. 3, p. 473-489.e9, 6 maio 2019.
- 70. TURUSOV, V.; RAKITSKY, V.; TOMATIS, L. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks. Environmental Health Perspectives, v. 110, n. 2, p. 125–128, fev. 2002.
- 71. VAŠKOVÁ, J. et al. Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1447, 2 fev. 2023.
- 72. WANG, Y. et al. New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. Journal of Functional Foods, v. 75, p. 104248, 1 dez. 2020.
- WARREN, J. T. et al. Discrete pulses of molting hormone, 20-hydroxyecdysone, during late larval development of Drosophila melanogaster: correlations with changes in gene activity. Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists, v. 235, n. 2, p. 315–326, fev. 2006.
- 74. XIONG, Y. et al. S-Glutathionylation: From Molecular Mechanisms to Health Outcomes. Antioxidants & Redox Signaling, v. 15, n. 1, p. 233–270, jul. 2011.
- 75. ZHENG, H.; YANG, X.; XI, Y. Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila*. Life Sciences, v. 167, p. 22–31, 15 dez. 2016.
- 76. ZHU, W. et al. Four Common Pesticides, Their Mixtures and a Formulation Solvent in the Hive Environment Have High Oral Toxicity to Honey Bee Larvae. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. e77547, 8 jan. 2014.